



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

ANTHONY EPIFANIO ALVES

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SEDIMENTO DE TANQUE
ESCAVADO PARA A PRODUÇÃO DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO NO
SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO**

RECIFE

2017

ANTHONY EPIFANIO ALVES

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SEDIMENTO DE TANQUE
ESCAVADO PARA A PRODUÇÃO DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO NO
SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. William Severi

RECIFE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

A474a Alves, Anthony Epifanio
Avaliação da qualidade do sedimento de tanque escavado para a produção de alevinos de tilápia do Nilo no semiárido pernambucano / Anthony Epifanio Alves. – 2018.
79 f. : il.

Orientador : William Severi.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. Reservatório de Itaparica 2. Ecotoxicologia 3. 17α -metiltestosterona
4. oxitetraciclina. I. Severi, William, orient. II. Título

CDD 620.8

ANTHONY EPIFANIO ALVES

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SEDIMENTO DE TANQUE
ESCAVADO PARA A PRODUÇÃO DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO NO
SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. William Severi (Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Alex Souza Moraes (Avaliador interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Cristiane M. Varela de Araújo de Castro (Avaliadora externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Martins Sobral (Avaliadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que tem concedido a minha vida, iluminando meus caminhos com tantas bênçãos e concedendo a presença de pessoas iluminadas ao longo desta caminhada.

Aos meus Pais Tereza Maria da Conceição e Antonio Epifanio que me apoiam por toda a vida e ao meu irmão Philippe Epifanio que sempre esteve ao meu lado. Minha querida companheira Ariane Cardoso que tem sido um espelho de força de vontade e que com muito amor, carinho e paciência tem estado ao meu lado ao longo dos últimos anos.

Aos meu Professor e orientador William Severi o qual admiro profissionalmente, e que esteve sempre a postos pra ajudar. Obrigado pela oportunidade que me concedeu e pelo aprendizado.

Ao pessoal do Laboratório de Limnologia e Ictiologia da UFRPE, em especial a Tereza, obrigado pelo apoio direto e indireto.

A professora Cristiane M. Varela de Araújo de Castro e aos seus alunos e amigos: Ana Carla, Estefanni, Heitor, Lucas, Erick, Victor. Obrigado pelos ensinamentos e companheirismo e ajuda direta e indiretamente para conclusão deste trabalho.

A professora Maristela Casé Costa Cunha, amiga e profissional dedicada que sempre me apoiou e ajudou nessa caminhada profissional e na vida. Obrigada por nossa amizade, pelos ensinamentos, carinho e confiança.

A universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Departamento de Tecnologia Rural, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, aos professores, funcionários, alunos e amigos que lá fiz e que contribuíram em minha formação acadêmica.

Ao Centro de Tecnologia das Radiações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR-IPEN), da Universidade de São Paulo (USP), em especial a Professora Suelly Ivone Borreli e sua aluna Anny por me ceder os organismos utilizados nas análises desta dissertação e me propor treinamento.

A Capes pelo apoio financeiro concedido, o qual possibilitou o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Projeto INOVATTE pelo apoio estrutural e financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa. A Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Sobral pelo grande auxílio no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus amigos Ericarlos Neiva, Cacilda Michelle, Jucelia Tavares. Obrigado pela amizade de vocês.

RESUMO

O sucesso da atividade de piscicultura requer uma demanda de produção de alevinos que supra o desenvolvimento do setor. No entanto, os métodos de produção podem acarretar danos ao ambiente através da disponibilização dos resíduos gerados. O aumento da atividade aquícola nos reservatórios vem contribuindo para o aumento do aporte de nutrientes, entre eles nitrogênio e fósforo. Somados ao acréscimo de nutrientes, os cultivos também lançam ao corpo hídrico rejeitos fármacos, como antibióticos, antifúngicos e hormônios. O sedimento é um dos compartimentos mais importantes quando se deseja avaliar o grau de contaminação nos ecossistemas aquáticos, tendo em vista sua capacidade de acumular compostos orgânicos e inorgânicos ao longo do tempo, assim como, em determinadas condições, voltar a disponibilizar tais contaminantes para o meio. Os impactos ambientais e toxicidade gerado pelas atividades aquícolas na região do submédio São Francisco, sobretudo em tanques escavados são pouco conhecidos. Deste modo, o presente trabalho gerou conhecimento sobre os impactos desse sistema de produção, subsidiando informações para a melhoria do gerenciamento ambiental da atividade de piscicultura. A área de estudo consiste em três tanques de produção de alevinos e no corpo do reservatório de Itaparica, localizado no município de Itacuruba, semiárido de Pernambuco. Foi avaliado a toxicidade do sedimento dos tanques de cultivo de alevinos de tilápia do nilo (*Oreochromis nilóticos*) e do corpo receptor e de dois compostos fármacos de maior utilização na produção de alevinos, o hormônio masculinizante 17 α -metiltestosterona, e o antibiótico oxitetraciclina. Os nutrientes do sedimento e da água, assim como a granulometria do sedimento foram quantificados. Como organismos teste se utilizou o anfípoda *Hyalella azteca* (Saussure, 1858) e o crustácea *Daphnia similis* (Richard, 1894). Os nutrientes presentes no sedimento, exibiu valores dentro do recomendado pela legislação Conama 454/12. As frações granulométricas exibiram um maior percentual de areia na maioria dos pontos amostrais. Os testes ecotoxicológicos com o sedimento integral dos tanques de cultivo e do reservatório de Itaparica, utilizando o organismo teste *Hyalella azteca*, não exibiu efeito agudo nos organismos, contudo foi observado efeito crônico na exposição dos organismos por 240 horas nos pontos T1, T2 e reservatório. Os testes ecotoxicológicos no elutriato do sedimento utilizando *Daphnia similis* exibiu toxicidade aguda para dois pontos amostrais T2 e T3 na exposição dos organismos por 48 horas. O hormônio 17 α -metiltestosterona, causou toxicidade a *Daphnia similis* (CE50;48h = 7.62 $\mu\text{g L}^{-1}$), e a *Hyalella azteca* (CE50;240h = 0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$). O antibiótico oxitetraciclina não exibiu toxicidade nas concentrações testadas para os dois organismos teste. Os resultados demonstram que a atividade causa perturbações significativas ao ambiente e que devem ser monitoradas para evitar que impactos ambientais na qualidade da água possam representar uma barreira para o crescimento do setor na região.

Palavras-chave: Reservatório de Itaparica, Ecotoxicologia, 17 α -metiltestosterona, Oxitetraciclina.

ABSTRACT

The success of the fish farming activity requires a demand for fry production that supports the development of the sector. However, production methods can cause damage to the environment by making waste available. The increase of the aquaculture activity in the reservoirs has contributed to the increase of the nutrient supply, among them nitrogen and phosphorus. In addition to the addition of nutrients, the crops also release into the body water rejects drugs, such as antibiotics, antifungals and hormones. Sediment is one of the most important compartments when assessing the degree of contamination in aquatic ecosystems, considering their ability to accumulate organic and inorganic compounds over time, as well as, under certain conditions, to make such contaminants available again medium. The environmental impacts and toxicity generated by aquaculture activities in the São Francisco sub-region, especially in excavated tanks, are little known. In this way, the present work generated knowledge about the impacts of this production system, subsidizing information for the improvement of the environmental management of the fish farming activity. The study area consists of three tuna production tanks and the body of the Itaparica reservoir, located in Itacuruba, semi-arid region of Pernambuco. The toxicity of the sediment of the Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis nilotic*) and of the receiving body and of two compounds of higher use in the production of fingerlings, the masculine hormone 17 α -methyltestosterone, and the antibiotic oxytetracycline were evaluated. Sediment and water nutrients as well as sediment granulometry were quantified. As test organisms, the amphipod *Hyalella azteca* (Saussure, 1858) and the crustacean *Daphnia similis* (Richard, 1894) were used. The nutrients present in the sediment, showed values within the recommended by the legislation Conama 454/12. The granulometric fractions exhibited a higher percentage of sand at most sampling points. The ecotoxicological tests with the integral sediment of the culture tanks and the Itaparica reservoir, using the test organism *Hyalella azteca*, did not show an acute effect in the organisms, however a chronic effect was observed in the exposure of the organisms for 240 hours at points T1, T2 and reservoir. Ecotoxicological tests on sediment elutriate using *Daphnia similis* exhibited acute toxicity for two sample points T2 and T3 on organisms exposure for 48 hours. The hormone 17 α -methyltestosterone, caused toxicity to *Daphnia similis* (EC50; 48h = 7.62 $\mu\text{g L}^{-1}$.) and *Hyalella azteca* (EC50; 240h = 0.03 $\mu\text{g L}^{-1}$). The antibiotic oxytetracycline showed no toxicity at the concentrations tested for the two test organisms. The results demonstrate that the activity causes significant disturbances to the environment and that they must be monitored to avoid that environmental impacts on water quality may represent a barrier to the growth of the sector in the region.

Keywords: Itaparica Reservoir, Ecotoxicology, 17 α -methyltestosterone, Oxytetracycline.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Larva de peixe com presença de saco vitelínico (A), Pós-larva de peixe com desenvolvimento da boca, redução do saco vitelínico e formação das brânquias (B).	21
Figura 2 - A: Organismos macho de <i>H. azteca</i> ; B: <i>H. azteca</i> em cópula.	29
Figura 3 - Indivíduo de <i>Daphnia similis</i>	31
Figura 4 - Mapa da localização do município de Itacuruba-PE, às margens do reservatório de Itaparica, na bacia do rio São Francisco.....	33
Figura 5 - Imagem da piscicultura de tanque escavado, no município de Itacuruba-PE.....	34
Figura 6 - Pontos de amostragem na piscicultura de tanque escavado, no povoado de Coité, em Itacuruba-PE em maio de 2016.....	36
Figura 7- Aspectos gerais da vista lateral de <i>H. azteca</i> com ênfase na posição dos embriões na fêmea.....	38
Figura 8 - Cultivo de <i>Hyalella azteca</i> em caixas plásticas no Laboratório de Limnologia da UFRPE.....	38
Figura 9- Cultivo de <i>D. similis</i> em béquer no Laboratório de Limnologia da UFRPE.....	39
Figura 10- Ensaio ecotoxicológico com sedimento utilizando <i>H. azteca</i> em ambiente refrigerado.....	40
Figura 11- A- Preparação dos organismos para processo de secagem em membranas; B- Organismos disposto em bandejas de alumínio e colocados em estufa; C- Processo de secagem dos organismos em estufa a 60° C por 12 horas; D- Pesagem das membranas em balança analítica..	41
Figura 12- Preparação e ensaio ecotoxicológico com elutriato utilizando <i>D. similis</i> em câmara de germinação.....	43
Artigo 1	
Figura 1 – Distribuição percentual (%) das frações granulométricas areia, argila e silte nas estações de amostragem T1, T2, T3 e no reservatório de Itaparica.....	

Figura 2 – Concentração de nitrogênio (dag.kg^{-1}) no sedimento das estações de amostragem T1, T2, T3 e no reservatório de Itaparica nos meses de maio e outubro/16.....	
Figura 3 – Concentração de fósforo (mg dm.m^3) no sedimento das estações de amostragem T1, T2, T3 e no reservatório de Itaparica nos meses de maio e outubro/16.....	
Figura 4 – Mortalidade (%) de <i>Hyalella azteca</i> expostos ao sedimento integral em piscicultura de tanques escavados T1, T2, T3 e no reservatório de Itaparica.....	60
Figura 5 – Peso seco (mg.org) de <i>Hyalella azteca</i> expostos ao sedimento de piscicultura com tanques escavados T1, T2, T3 e no reservatório de Itaparica, durante 240 horas de exposição.....	61
Figura 6 – Percentual da mortalidade de <i>Hyalella azteca</i> expostos a diferentes concentrações de 17α -metiltestosterona em 240 horas de exposição.....	63
Figura 7 - Percentual da mortalidade de <i>Hyalella azteca</i> expostos a diferentes concentrações do antibiótico oxitetraciclina, em 240 horas de exposição.....	64
Artigo 2	
Figura 1 – Percentual de mortalidade de <i>Daphnia similis</i> expostos ao elutriato do sedimento dos pontos de amostragem em piscicultura de tanque escavado P1, P2, P3 e ponto no reservatório de Itaparica, após 48 horas de exposição.....	74
Figura 2 – A- Percentual de mortalidade de <i>Daphnia similis</i> expostos a diferentes concentrações de 17α -Metiltestosterona.....	75
Figura 3 – Número de neonatos de <i>Daphnia similis</i> nascido em 240 horas de exposição a diferentes concentrações de 17α -Metiltestosterona.....	76
Figura 4 - Percentual da mortalidade de <i>Daphnia similis</i> expostos a diferentes concentrações de oxitetraciclina por 48 horas.....	77

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem na piscicultura de tanque escavado, no povoado de Coité, em Itacuruba-PE em maio de 2016.....	35
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- APHA - American Public Health Association
- APL – Arranjo Produtivo Local
- ASTM - American Society for Testing and Materials
- BMBF - *Bundesministerium für Bildung und Forschung* (Ministério Federal de Ensino e Pesquisa da Alemanha)
- CENO - Concentração de Efeito não Observado
- CEO - Concentração de Efeito Observado
- CE₅₀ - Concentração efetiva do agente tóxico que causa imobilidade a 50% dos organismos-teste
- CEPTA - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
- CL₅₀ - Concentração letal do agente tóxico que causa letalidade a 50% dos organismos-teste
- CHESF – Companhia Hidro Elétrica do São Francisco
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CNRH - Conselho Nacional de Recursos Hídricos
- CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba
- CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente
- CTR - Centro de Tecnologia das Radiações
- DNOCS - Departamento Nacional de Obras Contra a Seca
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICSU - *Committee of the International Council of Scientific Unions*
- INNOVATE - *Interplay coupling of substance cycle in aquatic and terrestrial ecosystems*
- IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
- ISO – *International Organization for Standardization*

KCl - cloreto de potássio

LAPAVI - Laboratório de Produção de Alimento Vivo

LECA – Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal

MCTI - Ministério de Ciência e Tecnologia e Inovação do Brasil

MT – 17 α -metiltestosterona

NaCl - Cloreto de sódio

NUPEA - Núcleo de Pesquisas em Ecossistemas Aquáticos

OECD – *Organisation for Economic Cooperation and Development*

OD – oxigênio dissolvido

pH – potencial hidrogeniônico

PAHs - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

PCBs - Bifenilos policlorados

PIB - Produto Interno Bruto

RD - Região de Desenvolvimento

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

TDS - sólidos totais dissolvidos

UNESP- Universidade Estadual Paulista

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

USP – Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
1.2 Estrutura da dissertação	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Desenvolvimento da atividade aquícola e a produção de tilápia do nilo	19
2.2 Produção de alevinos	20
2.3 Impactos potenciais das pisciculturas sobre a água em reservatórios	22
2.4 Ensaio de toxicidade no sedimento	25
2.5 Ensaio ecotoxicológico com <i>Hyalella azteca</i>	28
2.6 Ensaio ecotoxicológico com <i>Daphnia similis</i>	30
3. METODOLOGIA	33
3.1 Caracterização da região de estudo	33
3.2 Procedimento de análise físico-química do sedimento de piscicultura	36
3.3 Cultivo dos organismos- teste	37
3.3.1 Cultivo de <i>Hyalella azteca</i>	38
3.3.2 Cultivo de <i>Daphnia similis</i>	39
3.4 Sensibilidade dos organismos à substância química	39
3.5 Ensaio ecotoxicológico	40
3.5.1 Ensaio com sedimento integral utilizando <i>Hyalella azteca</i>	40
3.5.2 Teste ecotoxicológicos dos compostos 17- α -metiltestosterona e do antibiótico oxitetraciclina em água utilizando <i>H. azteca</i>	41
3.5.3 Ensaio com solubilizado do sedimento utilizando <i>D. similis</i>	42
3.5.4 Teste ecotoxicológicos dos compostos 17- α -metiltestosterona e do antibiótico oxitetraciclina em água utilizando <i>D. similis</i>	42
3.6 Avaliação estatística	43
Referências	45
4. POTENCIAL TÓXICO DE SEDIMENTO DE VIVEIROS E COMPOSTOS FÁRMACOS UTILIZADOS NO CULTIVO DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO	50

5. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SEDIMENTO DE VIVEIRO E COMPOSTOS FÁRMACOS NA PRODUÇÃO DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO.....	65
6. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES	78

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura é um ramo da aquicultura destinado ao cultivo de peixes e se configura como uma atividade de grande relevância econômica e social, constituindo atualmente uma alternativa na produção de proteína animal. A produção de peixes oriunda de piscicultura no Brasil, em 2015, foi da ordem de 483,24 mil quilos. O estado de Pernambuco foi responsável por 1,4% da produção nacional, contando com 6.625 mil quilos. Entre as espécies utilizadas, a tilápia do nilo desponta como a mais cultivada, respondendo por 219,33 mil quilos despescadas em 2015, correspondendo a 45,4% do total despescado (IBGE, 2015).

O sucesso crescente na produção e consumo de tilápia demanda uma produção de alevinos que supra o desenvolvimento do setor. Os métodos de produção, no entanto, quando praticados de maneira inadequada, podem acarretar danos ao ambiente através da disponibilização dos resíduos gerados.

As principais estruturas encontradas no reservatório de Itaparica no cultivo de tilápia são os tanques-rede e os viveiros escavados. Os tanques-rede se caracterizam por gaiolas flutuantes feitas de tela ou rede que ficam ancoradas no corpo d'água permitindo assim um fluxo constante de água. Esse sistema necessita de um baixo investimento, menor dimensionamento dos custos e maior rapidez de implantação (SKAJKO; FIRETTI, 2000; BARROSO; ANDRÉS, 2014).

Os viveiros escavados são reservatórios de água, construídos para criação de peixes e escavados em terreno apropriado, com aproximadamente 1,0 m a 1,5 m de profundidade, com domínio de nível, entrada e saída de água. São classificados como sistema intensivo com adubação e calagem, alimentação com ração balanceada e renovação da água (GUIMARÃES, 2012). De acordo com Kubitzka (2010), em cultivos com tanque escavado, a disponibilidade de alimentos naturais disponíveis na água, como o plâncton, contribui para redução com o custo da ração por quilo de peixe produzido.

A criação de tilápia em tanque escavado chama atenção para os impactos ambientais decorrentes do lançamento dos efluentes na operação (SEBRAE, 2014). Quando destinados a produção de alevinos esses impactos são potencializados pela utilização de

fármacos como o hormônio 17α -metiltestosterona e o antibiótico oxitetraciclina. O hormônio 17α -metiltestosterona é utilizado no processo de reversão dos alevinos uma vez que a tilápia alcança maturidade sexual muito cedo, a reversão sexual em alevinos é necessária para impedir o desvio energético (proteínas, lipídios e carboidratos) do crescimento para a reprodução. Já o antibiótico oxitetraciclina é utilizado no combate a enfermidades causadas por bactérias. Nos sistemas de piscicultura na região do São Francisco a maioria das doenças exibidas nos peixes estão relacionadas às infecções por bactérias.

A maioria dos resíduos lançados no ambiente aquático ao longo do curso dos rios e reservatórios, incluindo esgotos domésticos e industriais sem tratamento prévio, tem propriedades físico-químicas que são consideradas tóxicas (CARREIRA et al., 2001).

A legislação brasileira cita que “Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos” (BRASIL, 2011). Os cultivos e criações desenvolvidas nas margens dos reservatórios ou no próprio corpo d’água são geralmente praticados de forma potencialmente nociva e conflitante nas áreas instaladas, podendo tornar a água imprópria para diversos usos, de modo direto ou indireto.

Grande parte do material alóctone e autóctone decantam e fica depositada nos sedimentos, como por exemplo, metais pesados e compostos organoclorados. Esses resíduos comprometem o ambiente, ao elevar a quantidade de matéria orgânica, vitaminas e nutrientes, culminando na eutrofização, aumento da turbidez e bioacumulação de xenobióticos na fauna de corpos d’água naturais (CAVALCANTI, 2010). Por sua vez, o sedimento possui grande importância para os ecossistemas aquáticos, pois serve como fonte de recursos de matérias orgânicas e inorgânicas, quando em condições adequadas.

O método biológico mais comum utilizado para a análise da qualidade ambiental no sedimento é verificar a comunidade dos macroinvertebrados bentônicos, uma vez que a comunidade bentônica associa todos os fatores ambientais aos quais está exposta. A análise da estrutura dessas comunidades fornece indicação de efeitos poluentes associados aos sedimentos (ALLABY, 1999). Entretanto, respostas específicas para determinadas substâncias ou característica ambiental não podem ser previstas tão somente

por esta comunidade, bem como as metodologias que dispõem apenas das análises físico-químicas para a avaliação ambiental, que não retratam adequadamente o impacto causado pelos poluentes, pois não demonstram os efeitos sobre o ecossistema, apenas inferem sobre suas potenciais causas (CAVALCANTI, 2010).

Os testes de toxicidade, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, são utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos). Nesses ensaios, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações de amostras e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (RIBO, 1997; DORNFELD, 2002).

Dentre os organismos utilizados para testes ecotoxicológicos com sedimento encontramos *Chironomus riparius* (Meigen, 1804), *Chironomus tentans* (Fabricius, 1805) e *Hyalella azteca* (Saussure, 1858), muito utilizados no exterior para testes com sedimentos (USEPA, 2000; OECD, 2004). No Brasil, *H. azteca* tem seu procedimento de ensaio ecotoxicológico normatizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 15470, 2013). A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) vem utilizando este procedimento atrelado a outros para a análise ambiental, denominada tríade de qualidade dos sedimentos, formada pela integração de análises químicas, biológicas e ecotoxicológicas para estimar a qualidade e os potenciais riscos ambientais (VIVEIROS, 2012).

Os níveis de impacto ambiental e toxicidade causados pelas práticas econômicas na região do submédio São Francisco, sobretudo pelos empreendimentos aquícolas em tanques escavados, são pouco conhecidos. Parte destes impactos foram abordados por uma vertente de estudos do projeto INNOVATE, criado em 2012, numa cooperação de estudos entre pesquisadores do Brasil e da Alemanha, onde o vínculo terra-água foi discutido através da abordagem “fígado verde”, com processos de tratamento de efluente da produção de peixe em tanques escavados.

Desse modo, o presente estudo se propôs a contribuir gerando informações ecotoxicológicas em amostras de sedimento e dos fármacos proveniente de pisciculturas de tanque escavado destinadas à produção de alevinos de tilápia do Nilo.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade do sedimento nos tanques escavados e do corpo receptor e compostos químicos 17- α -metiltestosterona e o antibiótico oxitetraciclina utilizados na produção de alevinos de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), utilizando como organismos teste as espécies *Hyaella azteca* e *Daphnia similis*, a fim de inferir os efeitos tóxicos no sistema de produção e subsidiar informações para a melhoria do gerenciamento ambiental desta atividade econômica.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar as características granulométricas e os nutrientes nitrogênio e fósforo do sedimento de piscicultura em tanque escavado;
- Estimar a toxicidade do sedimento integral e elutriado proveniente de piscicultura de tanque escavado utilizando os organismos *Hyaella azteca* e *Daphnia similis*;
- Analisar a toxicidade do hormônio 17- α -metiltestosterona inserido na produção de alevinos de tilápia do nilo;
- Analisar a toxicidade do antibiótico oxitetraciclina inserido na produção de alevinos de tilápia do Nilo.

1.2 Estrutura da dissertação

A dissertação está estruturada em seis capítulos. No primeiro capítulo está a introdução, apresentando o tema, justificativa da pesquisa e os objetivos gerais e específicos. No segundo capítulo encontra-se o referencial teórico, onde é feita a conceituação científica da pesquisa, abordando os conceitos e discussões acadêmicas sobre o desenvolvimento da atividade de piscicultura, o cultivo de tilápia do nilo, a produção de alevinos, os potenciais impactos ambientais em reservatório e o uso da ecotoxicologia em sedimento. No terceiro capítulo estão descritos os materiais e métodos utilizados na pesquisa, com a delimitação e caracterização da área de estudo e os procedimentos metodológicos utilizados. No quarto e quinto capítulos estão apresentados os resultados obtidos no decorrer da investigação em formato de artigos. No sexto capítulo estão as conclusões e recomendações da pesquisa.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Desenvolvimento da atividade aquícola e a produção de tilápia do nilo

A produção aquícola nacional foi introduzida há mais de um século, porém ainda é inferior às demais atividades agropecuárias do país (MUÑOZ et al., 2015). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção aquícola nacional foi de 483,24 mil toneladas em 2015, sendo o cultivo de tilápia do nilo o mais expressivo entre os cultivos aquícolas em termos de volume produzido e com grande relevância no aspecto socioeconômico (IBGE, 2015).

Regionalmente, as espécies cultivadas são variadas, predominando no norte do país as espécies locais, como o tambaqui. O Nordeste se destaca com a produção de tilápia e camarão marinho, assim como o Sudeste e o Sul onde, além da tilápia, podemos acrescentar também os cultivos de carpa, ostras e mexilhões nativos. As espécies nativas tem sua maior produção na região centro-oeste com o cultivo de pacu, pintado e tambaqui (MUÑOZ et al., 2015).

Estudos de Silva; Silva; Barbosa (2011) indicaram que o Nordeste brasileiro possui vocação para a piscicultura tropical, visto que apresenta condições climáticas e hidrobiológicas favoráveis, boa infraestrutura e potencialidade para explorar 1,0 a 1,5 milhões de hectares de lâmina d'água com a piscicultura, gerando 500.000 a 750.000 empregos diretos e faturamento de bilhões de reais ao ano.

As pisciculturas nos reservatórios da região nordeste, instaladas no curso do rio São Francisco, se desenvolveram a partir de 1980, na região do baixo São Francisco, através de um projeto experimental da Codevasf, financiado pelo Banco Mundial. Em 1982, instalou a Estação Piloto de Piscicultura de Itiúba, em Porto Real do Colégio (AL), oferecendo alevinos à comunidade rural da região, para que estes passassem a implantar e explorar comercialmente a criação de peixes (EMBRAPA, 2014).

No Nordeste, a tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) de origem africana, foi introduzida pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) para a produção de peixe nos reservatórios da região (EMBRAPA, 2014).

O sucesso da atividade aquícola no baixo São Francisco impulsionou o desenvolvimento da atividade nos reservatórios a montante, Complexo Paulo Afonso e Itaparica. Grandes empreendimentos privados se instalaram no reservatório de Itaparica, a partir das empresas Pesca Nova e Netuno. Contudo, a atividade aquícola passou a ser desenvolvida também por pequenos produtores familiares, como alternativa de renda. Em 2002, um projeto desenvolvido pela Diocese de Floresta- PE organizou os produtores familiares numa associação, objetivando oferecer uma alternativa de renda para os jovens das comunidades localizadas no entorno do lago de Itaparica. O projeto conta hoje com aproximadamente 9 associações de produtores que, juntos, produzem mensalmente cerca de 120 toneladas de tilápia (EMBRAPA, 2014).

2.2 Produção de alevinos

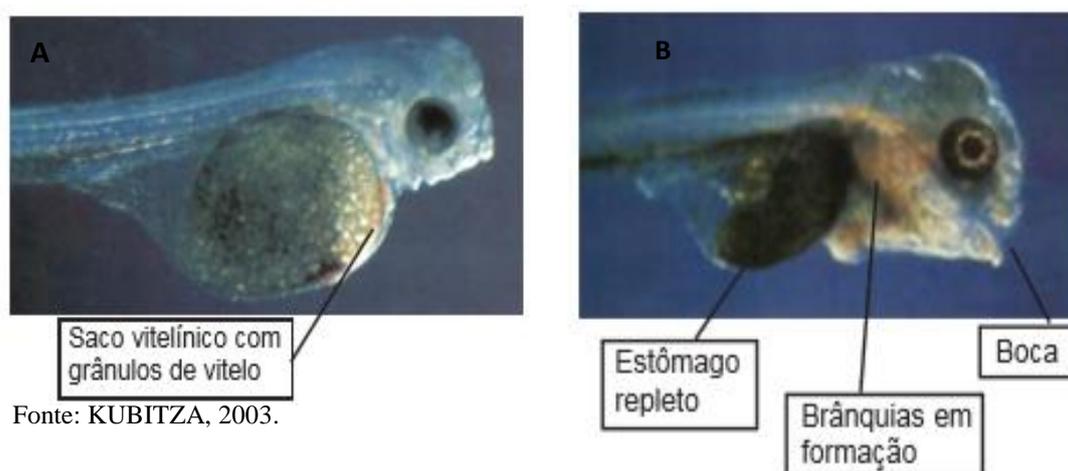
Diante da crescente demanda na produção de tilápia, a produção de alevinos saudáveis para suprir os estoques de produção é imprescindível. O domínio das técnicas de produção requer conhecimento da biologia da espécie para reprodução induzida e técnicas de larvicultura. A consolidação destas técnicas iniciou na década de 1980, a partir de esforços do DNOCS, CODEVASF, CEPTA-IBAMA e UNESP de Jaboticabal (EMBRAPA, 2014).

Embora muitas pisciculturas produzam alevinos de diversas espécies, a incerteza quanto aos meios de produção e a produção máxima, à procedência/idoneidade da estação produtora de alevinos, garantia do índice mínimo de reversão sexual e obtenção de lotes homogêneos (mesma idade e tamanho) e livres de doenças é motivo de dúvidas nos produtores. Os estágios de desenvolvimento dos peixes incluem ovo, larva, pós-larva e juvenis (alevinos). A fase larval dura de horas a poucos dias e as larvas inicialmente se nutrem da reserva do saco vitelínico, ao abrir a boca a larva passa a ser denominada de pós-larva. Tanto a larva como a pós-larva apresentam respiração cutânea, pouca pigmentação e morfologia corpórea que não lembram um peixe adulto (KUBITZA, 2006) (Figura 1).

A pós-larva da tilápia apresenta trato digestivo bem desenvolvido, o que difere da maioria das espécies cuja pós-larva não é capaz de aproveitar por completo a ração oferecida,

alimentando-se então de organismos planctônicos. A pós-larva requer condições ambientais adequadas, como oxigênio dissolvido em concentração maior que 3 mg/L O₂, pH entre 6 a 8,5, temperatura média de 30°C na superfície e/ou inversões térmicas superiores a 2°C. Em geral as pós-larvas são transferidas para os viveiros entre o segundo e terceiro dia após a eclosão dos ovos e quando estas apresentam a boca desenvolvida e natação horizontal (KUBITZA, 2006). Na produção de tilápia na região do São Francisco, a alimentação das pós-larvas com ração começa a partir do quinto dia após a eclosão, quando passam a receber a ração triturada acrescida de hormônio para a reversão sexual.

Figura 1: Larva de peixe com presença de saco vitelínico (A), Pós-larva de peixe com desenvolvimento da boca, redução do saco vitelínico e formação das brânquias (B).



Os alevinos são assim denominados quando a pós-larva atinge a fase juvenil e passa a apresentar morfologia corporal semelhante à dos peixes adultos. De forma geral, os alevinos possuem entre 3 a 6 cm ao final de 28 dias de vida e já possuem o processo de reversão sexual finalizado. A alimentação é realizada com ração com tamanho médio de 5 mm (KUBITZA, 2003).

De acordo com o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2014), os empreendimentos para produção de alevinos em tanques escavados requerem tanques com dimensão entre 400 a 6.000 m², devem apresentar forma retangular e estar dispostos uniformemente. O solo ideal deve apresentar textura argilo-arenosa com composição de argila entre 35% a 40%. A água de cultivo deve apresentar oxigênio acima

de 3 mg/L, o pH deve ser mantido entre 6,5 a 8,5 e uma temperatura média entre 27 a 32°C. A tilápia ainda é tolerante a salinidades em torno de 15 ppt, exibindo crescimento ótimo com salinidade máxima de 10 ppt. Uma área inundada de 750 m² dividida em quatro tanques de engorda mais um tanque de berçário com área de 200 m² de área inundada está dimensionado para produzir 5.100 peixes por ciclo de cultivo de 180 dias.

O manual de criação de tilápia em tanque escavado do SEBRAE chama atenção para os impactos ambientais decorrentes do lançamento dos efluentes na durante o cultivo (SEBRAE, 2014). Os tanques devem passar por um período de quarentena entre uma despesca e um novo cultivo e, como processo asséptico, o fundo deve ser raspado e passar por um processo de calagem para eliminação de bactérias e organismos indesejados.

2.3 Impactos potenciais da atividade de piscicultura na qualidade da água em reservatórios

Os impactos sobre os recursos hídricos são cumulativos e decorrentes das diversas atividades antrópicas e de seus diferentes usos. O aumento da atividade aquícola nos reservatórios vem contribuindo para o aumento do aporte de nutrientes, entre eles nitrogênio e fósforo. Macedo e Sipaúba-Tavares (2010) evidenciam que os efluentes gerados pelas pisciculturas são semelhantes aos gerados pelos esgotos domésticos. O excesso destes nutrientes no corpo dos reservatórios é visto com grande preocupação, uma vez que contribui para a eutrofização dos corpos d'água.

A eutrofização é definida pelo processo de aumento de nutrientes que propicia aumento da produtividade biológica, resultando principalmente na proliferação de macrófitas aquáticas e fitoplâncton nos corpos hídricos, podendo ter origem natural ou antrópica (ESTEVEZ, 2011). A maior parte dos nutrientes contido nos efluentes gerado pela piscicultura provem das rações para alimentação do cultivo. As excretas dos peixes também são ricas em amônia, que através de diversos processos químicos naturais disponibilizam nitrogênio para o meio. Somados ao acréscimo de nutrientes, os cultivos também adicionam no lançamento rejeitos fármacos, como antibióticos, antifúngicos e hormônios. Tais compostos são utilizados no tratamento e no manejo das culturas para evitar doenças no cultivo e para a reversão sexual. Entre estes, a maior incidência é a do

hormônio esteróide 17- α metiltestosterona, utilizado diariamente junto à alimentação de larvas na fase do cultivo de alevinos, e o uso de antibióticos para prevenção de doenças nas fases iniciais.

Hormônios

A metiltestosterona é um composto sintético de origem do metilado da testosterona, pertencente aos hormônios utilizados em humanos, principalmente para reposição do hormônio testosterona para tratamento dos efeitos da andropausa, no tratamento de câncer de mama e em sarcopenias. Em seres humanos, sua toxicidade é considerada baixa, sendo o fígado o primeiro órgão a ser afetado. Entretanto, pode causar câncer de próstata e esterilidade no homem. Apresenta massa molar de 302,45 g. mol⁻¹, sendo comercializado em pó com coloração esbranquiçada, insolúvel em água mas facilmente dissolvido em álcool etílico, metanol, éter e outros solventes orgânicos (MIRANDA et al., 2015).

Na atividade aquícola, a metiltestosterona é utilizada no processo de reversão sexual, sobretudo na produção de tilápia, sendo um processo comum e muito importante para a produtividade do cultivo. A tilápia do nilo alcança maturidade sexual muito cedo, o que torna a reversão sexual em alevinos necessária para impedir o desvio energético (proteínas, lipídios e carboidratos) do crescimento para a reprodução. Revertidos em organismos machos, a espécie passa então a apresentar rápido crescimento e ganho de peso (LEONHARDT, 1997).

Na maioria das vezes, a 17- α metiltestosterona é adicionada à ração ou diluída na água para banhos de imersão nos alevinos. Alguns estudos zootécnicos têm avaliado a dosagem de hormônio necessária em ração para máxima reversão nos alevinos. Em geral, são utilizados entre 30 a 60 mg.Kg, por um período máximo de 30 dias (MAINARDES-PINTO et al., 2000). O excedente desta ração adicionada com 17- α -metiltestosterona tende a ficar no meio, decantar no fundo dos tanques de cultivo e se acumular no sedimento e na água ao longo do tempo (FALONE, 2007; HOMKLIN, 2011).

A presença de excedentes de hormônio de reversão na água de cultivo em tanque escavado e no substrato de lagoas para cultivo de tilápia foi avaliado por Contreras-Sanchez et al. (2001), sendo encontrada concentração média de 0,0068 ng de 17- α -metiltestosterona.L na água dos tanques de cultivo e de 0,691 ng.g no sedimento durante

o período de reversão sexual. O excedente de 17α -metiltestosterona disponível ao longo do tempo nos corpos hídricos pode causar danos à comunidade dos peixes, sobretudo àqueles do entorno ao lançamento dos efluentes, causando desequilíbrio na proporção entre machos e fêmeas no ambiente natural.

Antibióticos na aquicultura

O manejo adequado na piscicultura é essencial para o sistema produtivo. Uma água de boa qualidade e uma alimentação balanceada são as primeiras medidas que devem ser tomadas para manter a saúde do cultivo e para prevenir as doenças. Quando a piscicultura está mal gerenciada e apresenta falhas na prevenção das enfermidades, algumas doenças podem se disseminar e trazer prejuízos ao cultivo. Na maioria das vezes, têm como agentes causadores dinoflagelados, protozoários, crustáceos, além de fungos, bactérias e vírus, que podem acarretar danos aos peixes (TAVECHIO et al., 2009).

As enfermidades mais combatidas nos sistemas de piscicultura na região do São Francisco estão relacionadas às infecções por bactérias. As ocorrências dessas enfermidades são favorecidas, geralmente, pelas altas taxas de estocagem dos cultivos, qualidade da água, variação de temperatura, manejo inadequado que causam lesões na pele e por infestações de parasitas. As bactérias com maior recorrência nos sistemas de cultivo de tilápia no Brasil são: *Flavobacterium columnaris*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Edwardsiella tarda* e *Francisella* sp. (KUBITZA, 2008).

Entre os principais fármacos utilizados na aquicultura, destacam-se a formalina, o sulfato de cobre, a verde malaquita, a cloramina, os pesticidas organofosforados, o diflubenzuron. Entre os antibióticos, segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), os mais utilizados na aquicultura estão a oxitetraciclina, o florfernicol, a sarafloxacina, a eritromicina e as sulfonamidas (GASTALHO et al., 2014). Para o Brasil, não existem antibióticos aprovados para o uso na aquicultura, embora, nas pisciculturas da região estudada, a oxitetraciclina seja o mais utilizado (CAMPOS, 2005). Assim como os hormônios esteroides, estes fármacos, em sua grande maioria, são adicionados na ração ofertada no cultivo. No caso dos antibióticos, estes são diluídos em óleo de soja e misturados na ração, sendo a função do óleo de soja garantir que o fármaco não se solubilize na água.

O uso dos antibióticos nas pisciculturas, sobretudo nos cultivos de alevinos e juvenis, tem se tornado prática comum como medida profilática. Contudo, o uso indiscriminado desses fármacos traz o risco de seleção de bactérias resistentes no ambiente aquático, além de comercialmente trazer a possibilidade da presença de resíduos desses fármacos no peixe direcionado ao consumo humano (GASTALHO *et al.*, 2014). Parte do antibiótico é eliminado pelas excretas dos peixes, e parte continua agregado a ração que não é consumido pelo cultivo e fica disponível no ambiente. Em geral, os antibióticos possuem grande solubilidade, baixa biodegradabilidade e grande potencial de bioacumulação no ambiente (WOLLENBERGER, 2000).

Wollenberger *et al.* (2000) realizaram ensaios ecotoxicológicos utilizando o organismo teste *Daphnia magna*, testando nove antibióticos amplamente utilizados. A oxitetraciclina foi um dos fármacos testados e apresentou CE 50 em 48 h na concentração de 1000 mg/L e toxicidade crônica com efeitos na reprodução a partir da CE 50 de 46,2 mg/L.

Isidori *et al.* (2005) analisaram a toxicidade de seis antibióticos: eritromicina, oxitetraciclina, sulfametoxazol, ofloxacina, lincomicina e claritromicina, em ensaios com bactérias, algas, rotíferos, microcrustáceos e peixes, a fim de avaliar toxicidade aguda e crônica. Os resultados obtidos evidenciaram CL 50 de 22,64 mg/L da oxitetraciclina para *Daphnia magna* e CL 50 de 18,65 mg/L para *Ceriodaphnia dubia*.

Estudos relatando o potencial ecotoxicológico dos antibióticos em outros organismos testes de água doce, como *H. azteca* e *D. similis* ainda são incipientes, estabelecendo a lacuna de conhecimento quanto à mínima concentração dos fármacos utilizados nas pisciculturas, que pode causar alteração na biota aquática.

2.4 Sedimento e ensaios ecotoxicológicos

Formado por partículas de diversos tamanhos, formas, composição química e material precipitado, o sedimento é o compartimento que atua como depósito de nutrientes e contaminantes em ambientes aquáticos (MOZETO, 2006) e, por conseguinte, também é repositório de muitos produtos químicos, dentre esses possíveis compostos tóxicos para os organismos de vida aquática (ZAGATO e BERTOLLETTI, 2006).

Araújo et al. (2008) e Esteves (2011) descrevem o sedimento como um dos compartimentos mais importantes quando se deseja avaliar o grau de contaminação nos ecossistemas aquáticos, tendo em vista sua capacidade de acumular compostos orgânicos e inorgânicos ao longo do tempo, assim como, em determinadas condições, voltar a disponibilizar tais contaminantes para o meio. Uma vez disponibilizados, esses contaminantes podem trazer efeitos sobre a biota aquática. O prognóstico da toxicidade através de ensaios ecotoxicológicos com sedimento é uma ferramenta fundamental na avaliação dos efeitos da interação de diversos compostos para a biota aquática.

Embora reconhecido como um compartimento de grande importância, a análise ecotoxicológica para verificar contaminação no sedimento só é prevista segundo a Resolução Conama 454/12 nas atividades que envolvem material dragado quando a concentração de mercúrio, cádmio, chumbo ou arsênio, ou de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) estiver acima do permitido pela legislação (BRASIL, 2012).

Inciso III do art. 7 - o material cuja concentração de mercúrio, cádmio, chumbo ou arsênio, ou de PAHs do Grupo A estiver entre os níveis 1 e 2, ou se a somatória das concentrações de todos os PAHs estiver acima do valor correspondente à soma de PAHs, deverá ser submetido a ensaios ecotoxicológicos, entre outros testes que venham a ser exigidos pelo órgão ambiental competente ou propostos pelo empreendedor, de modo a enquadrá-lo nos critérios previstos nos incisos I e II deste artigo (BRASIL, 2004).

A Resolução Conama 430/11, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes em corpos receptores, aplica de forma genérica o potencial toxicológico do sedimento e não traz diretrizes específicas sobre o potencial dos contaminantes no solo e a sua potencialidade de repositores de compostos na água, bem como a possível interação da interface água sedimento e os organismos que transitam nesta interface (BRASIL, 2011).

Art. 2º A disposição de efluentes no solo, mesmo tratados, não está sujeita aos parâmetros e padrões de lançamento dispostos nesta

Resolução, não podendo, todavia, causar poluição ou contaminação das águas superficiais e subterrâneas (BRASIL, 2011, p.01).

O início dos trabalhos ecotoxicológicos com o objetivo de avaliar o sedimento foram desenvolvidos no Brasil em 1980, na represa Billings e no Rio Cubatão, ambos no estado de São Paulo, através do projeto de controle e recuperação ambiental desenvolvidos pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Nesse estudo, foi avaliada a liberação de nutrientes e compostos tóxicos entre o sedimento e a coluna d'água, além de verificar se as frações das substâncias encontradas foram capazes de causar efeito agudo para a biota local. Posteriormente, no ano de 1990, os trabalhos foram continuados pela CETESB com ensaios ecotoxicológico no sedimento a partir da água intersticial (ARAÚJO, 2005).

Rosado (1998) utilizou os organismos *Hyalella azteca* e *Ceriodaphnia dubia* na avaliação do sedimento da bacia do rio Ipanema, no Rio Grande do Sul. Costa e Espindola (2000) avaliaram a qualidade da água e do sedimento no reservatório de Barra Bonita, região do médio Tietê em São Paulo, encontrando altas concentrações de metais pesados (zinco, cádmio e cobre) biodisponíveis no sedimento (RIOS, 2013).

Araújo (2005) estabeleceu protocolo de cultivo e teste com *H. azteca* para a avaliação da qualidade dos sedimentos de água doce das principais bacias do estado de São Paulo. A partir da compilação dos seus dados, foram elaborados critérios que expressam a classificação da qualidade do sedimento, sendo bom quando o sedimento não exibiu toxicidade, regular quando observado apenas subletal (redução do crescimento); ruim quando a mortalidade alcançou 50% dos organismos testes e péssimo para mortalidade superior a 50%, sendo esses critérios adotados em parte das unidades de gerenciamento de recursos hídricos do estado.

A natureza do sedimento, entre outras coisas, interfere diretamente na disponibilidade dos contaminantes. Os compostos orgânicos não iônicos (bifenilas policloradas - PCBs) hidrocarbonetos poliaromáticos têm sua disponibilidade alterada quando a composição do sedimento é rica em matéria orgânica. A disponibilidade de metais no sedimento está relacionada com a quantidade de íons metálicos presentes nos minerais constituintes do sedimento. Contudo, não há um único fator que atua na disponibilidade de contaminantes

metálicos, de modo que estes reagem de diferentes formas, como complexação, precipitação e sorção. Além disto, oxigênio, potencial redox, pH, temperatura, sedimentação e tamanho das partículas podem influenciar na disponibilidade de metais no sedimento (ZAGATO e BERTOLLETTI, 2006).

A escolha do organismo teste está relacionada diretamente com o método proposto para avaliar a toxicidade do sedimento que, por sua vez, deve levar em conta a complexidade e as diversas fases suscetíveis de avaliação, entre eles, o sedimento integral, a água intersticial e o solubilizado. Segundo Botta *et al* (2006), a água intersticial é a fração mais representativa para análise da toxicidade do sedimento, no entanto, para análise dos efeitos de dispersão ou ressuspensão de contaminantes do sedimento para a coluna da água, a fração mais indicada é o solubilizado.

Entre os métodos e organismos utilizados no Brasil e no exterior, na avaliação ecotoxicológica do sedimento de água doce, se destacou a United States Environmental Protection Agency (USEPA) e a American Society for Testing and Materials (ASTM), com procedimentos padronizados com o Amphipoda *Hyaella azteca* e a larva de diptera *Chironomus tentans* como organismos teste. No Brasil, a ABNT padronizou apenas o ensaio com *H. azteca* para ensaios com sedimento integral de água doce (ABNT, 2013). Um segundo organismo pode ser utilizado para investigação da água solubilizada, sendo este em geral um organismo de coluna d'água, como os dafnídeos.

2.5 Ensaio ecotoxicológico com *Hyaella azteca*

Anfípodos possuem ampla distribuição em águas claras e desprovidas de poluição, tais como nascentes, córregos, lagos e lagoas. O gênero *Hyaella* é o único Anfípoda a se apresentar em águas continentais na América do Sul. Pertence à classe Malacostraca, da Superordem Talitroidea, Família Dogielinotidae (VAINOLA, 2008). O gênero apresenta cerca de 56 espécies, porém o número delas registrado no Brasil ainda é incerto. Trabalhos recentes apontam para cerca de 17 espécies identificadas para o Brasil: *H. gracilicornis* (Faxon, 1876); *H. longistila* (Faxon, 1876); *H. warmingi* (Stebbing, 1899); *H. meinerti* (Stebbing, 1899); *H. curvispina* (Shoemaker, 1942); *H. brasiliensis* (Bousfield, 1996; Cecos H. Pereira, 1989); *H. montenegrinae* (Bond Backup e Araújo,

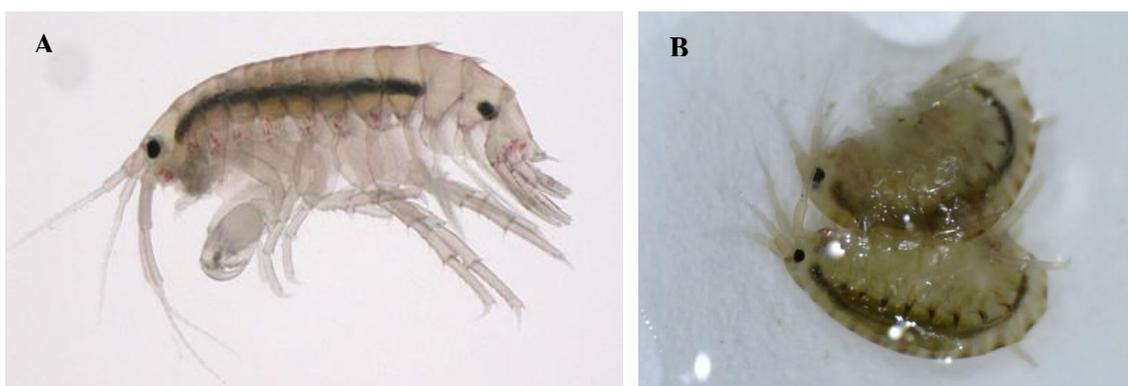
1988); *H. pseudoazteca* (González ; Watling, 2003); *H. dielaii* (Pereira, 2004); *H. pleoacuta* (González, Bond-Buckup ; Araujo, 2006) e *H. castroi* (Gonzalez et al., 2006) (CARDOSO; BUENO ; FERREIRA, 2011, TORRES, 2012).

O gênero *Hyaella* passou a ser utilizado no Brasil para testes ecotoxicológicos na década de 90, contudo na análise entre as espécies foi possível comprovar que *Hyaella azteca* foi a espécie mais sensível a diversos compostos e apresenta maior taxa de reprodução em relação a *Hyaella* sp., o que torna vantajosa a utilização desta espécie na quantidade de culturas disponíveis para a obtenção de jovens para teste (ARAÚJO, 2005).

Estudos de Torres (2012) demonstraram o ciclo de vida de *H. azteca* no cultivo em laboratório. Segundo o autor, o comportamento pré cópula dura em média $3,4 \pm 1,647$ dias, após o período de cópula as fêmeas incubam os ovos por $7,9 \pm 2,685$ dias, eclodindo em média $6,43 \pm 2,149$ organismos.

Os ensaios ecotoxicológicos no sedimento utilizando *H. azteca* são feitos com indivíduos jovens com idade de 7 a 14 dias, que devem ser separados no momento da manutenção do cultivo. Os ensaios duram 10 dias, devendo ser utilizados 10 organismos para cada replicação, recomendando-se um mínimo de quatro réplicas. Os efeitos observados são a letalidade (ensaio crônico) e o crescimento (ensaio agudo).

Figura 2: A: Organismos macho de *H. azteca*; B: *H. azteca* em cópula.



Fonte: McCourt, 2017.

Embora existam diversos procedimentos para o cultivo de *Hyaella* spp, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), normalizou a utilização de *Hyaella* spp. (ABNT NBR, 15470: 2013) para ensaios em sedimento (BRASIL, 2013).

Os estudos ecotoxicológicos no Brasil utilizando *H. azteca* como organismo teste estão concentrados nas regiões sul e sudeste, com as demais regiões exibindo vasta lacuna com ensaios utilizando o sedimento integral. Os trabalhos produzidos trazem análises sobre a qualidade de sedimentos em rios, estudos ecológicos (CARDOSO; BUENO; FERREIRA, 2011; TORRES, 2012) e na investigação de resíduos de contaminantes (BORRELY, 2012; TALLINI et al., 2012).

Alegre (2009) avaliou o sedimento integral em cinco pontos ao longo do rio Tietê entre as cidades de Salesópolis, Suzano e São Paulo, com duas coletas no verão e duas no inverno. Para investigação do sedimento integral foi utilizado *H. azteca* e o elutriado investigado com *Ceriodaphnia dubia*. Os resultados obtidos evidenciaram o sedimento integral como tóxico em dois dos cinco pontos amostrais que, paralelamente, continham concentrações elevadas de metais pesados.

Hwang et al. (2009) avaliaram a toxicidade de sedimentos no rio Juqueri, na cidade de Cajamar (SP), que continha lançamentos de efluentes oriundos da indústria de cosméticos. As amostragens foram realizadas em ponto a montante e jusante do lançamento. Para investigação do sedimento integral foi utilizado *H. azteca*, sendo encontrada toxicidade em todas as amostras testadas.

2.6 Ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia similis*

As espécies de *Daphnia* apresentam tamanho que variam de 0,5 a 5,0 mm de comprimento. As dáfneas são organismos filtradores, que se alimentam de algas, bactérias e pequenas partículas de material orgânico. O alimento é levado para a boca, onde é moído pelas mandíbulas e direcionado para o trato digestivo. O ciclo de vida varia entre cerca de 40 dias a 25°C e 56 dias a 20°C, contudo, a norma ABNT NBR 12713 sugere que organismos com idade superior a 28 dias sejam descartados. Quando mantida em laboratório, esta espécie entra na fase de maturação com 6 dias de vida e necessita de 6 a 10 dias para dar origem aos primeiros filhotes, que são denominados de neonatos e que normalmente nascem de 2 em 2 dias. Os neonatos são liberados quando acontece a muda das carapaças.

A espécie *Daphnia similis* (Claus, 1876) pertence à Ordem Anomopoda e à Família Daphniidae, são microcrustáceos de hábito planctônico em água doce. Sua população é composta primeiramente de fêmeas, uma vez que sua reprodução é por partenogênese, apenas com os machos se desenvolvendo a partir de ovos diplóides quando a população se encontra muito densa (TUDINSI, 2008).

Figura 3: Indivíduo de *Daphnia similis*.



Fonte: Cardoso, 2017.

Os microcrustáceos do gênero *Daphnia* vêm sendo bastante utilizados por serem facilmente cultivados em laboratórios sob condições controladas, possuírem normas padronizadas nacionalmente e internacionalmente, por sua estabilidade genética através da reprodução partenogenética dos organismos, originando populações com atributos biológicos semelhantes, o que permite capacidade de resposta a diversos poluentes e pelo conhecimento da sua biologia. Por isso, ensaios com *Daphnia* sp. são importantes na predição ecotoxicológica, tendo em vista a avaliação dos riscos ambientais nos ecossistemas aquáticos, sobretudo, visando atender às normas estabelecidas pela legislação brasileira quanto à toxicidade da água.

Os efeitos tóxicos na produção de alevinos de *Deuterodon iguape*, popularmente conhecido como lambari, foram observados por Campos et al. (2014), a partir de ensaio ecotoxicológico utilizando *D. similis* e análises físico-químicas da água. O trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisa e Produção de Peixes Nativos de Peruíbe, situado no núcleo Itariru do Parque Estadual da Serra do Mar, no Estado de São Paulo, onde foi

analisada a água dos viveiros, sistema de captação, rio a jusante e incubadora de ovos, totalizando 11 amostras. Os autores utilizaram *D. similis* como organismo teste para os ensaios que se procederam de acordo com a norma ABNT NBR 12713 (2009), com exposição de 20 organismos-teste por com idade média de 24 a 48 horas de vida, dividido em 4 réplicas de 5 organismos cada. Os ensaios se procederam em tubos de ensaio contendo 10 ml da água bruta coletada sem diluições. Como resultado, foi observada toxicidade na água de captação e na incubadora de larvas, sem efeitos nas demais estações. Os resultados obtidos pelos autores revelam que o efluente produzido pela piscicultura analisada não era tóxico ou a atividade analisada possuía baixo potencial poluidor.

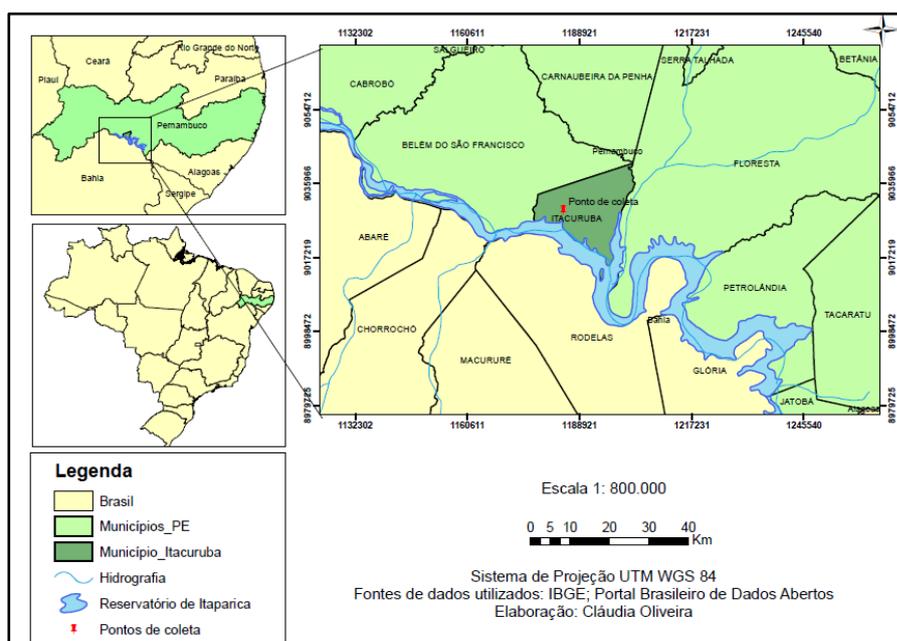
3. METODOLOGIA

3.1 Caracterização da região de estudo

O reservatório de Itaparica está situado, em sua margem esquerda, nos municípios de Belém do São Francisco, Itacuruba, Floresta e Petrolândia, no estado de Pernambuco; e na margem direita, nos municípios de Rodelas e Glória, no estado da Bahia, inserido na região semiárida e no trecho submédio da bacia do rio São Francisco. A usina hidrelétrica Luiz Gonzaga, cuja barragem foi responsável pela formação do reservatório de Itaparica, está localizada 25 km a jusante da cidade de Petrolândia e 50 km a montante do Complexo Hidrelétrico de Paulo Afonso, formado pelas usinas Apolônio Salles (reservatório de Moxotó); PA I, II e III e PA IV. O reservatório tem como função a geração de energia elétrica e a regularização das vazões afluentes diárias e semanais das usinas do complexo Paulo Afonso (CHESF, 2011).

O clima da região é semiárido, quente e seco, com precipitação mensal média de 44 mm, concentrada no primeiro semestre do ano. A insolação é de 3.000 horas/ano, com 300 dias de sol por ano.

Figura 4 – Mapa da localização do município de Itacuruba-PE, às margens do reservatório de Itaparica, na bacia do rio São Francisco.



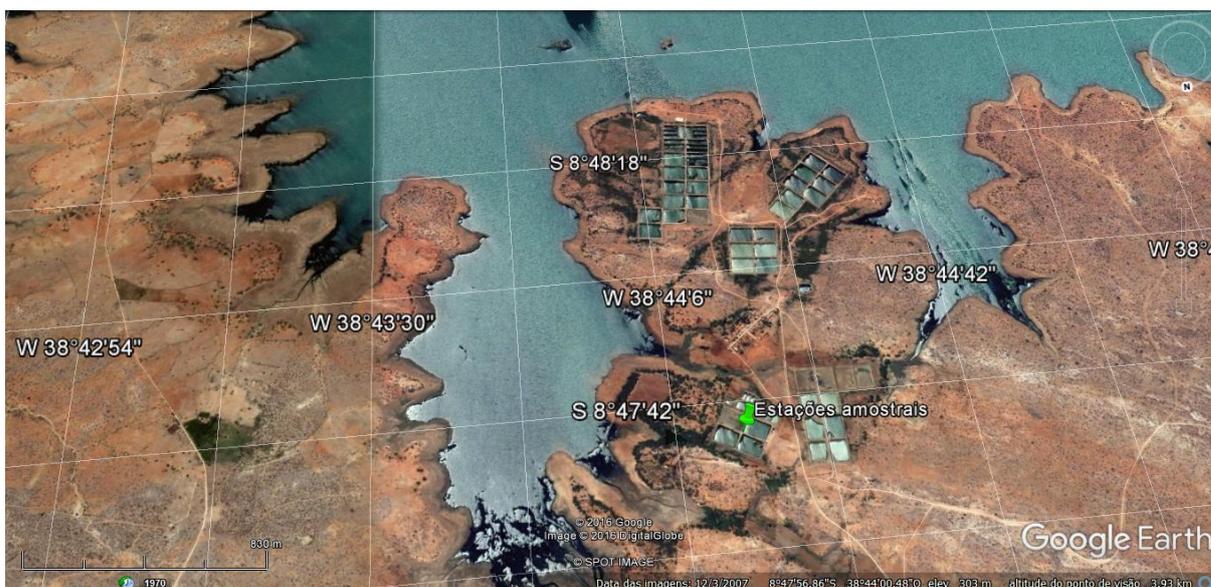
Fonte: Oliveira (2016).

A maioria das atividades aquícolas no reservatório de Itaparica está concentrada na margem esquerda do reservatório, no estado de Pernambuco, situada nos municípios de Itacuruba e Petrolândia; contudo, apenas em Itacuruba apresenta também tanques escavados de terra às margens do reservatório, além de tanques-rede.

O município de Itacuruba possui uma área de aproximadamente 430 Km². Possui uma população estimada de 4.754 pessoas para o ano de 2015. O Produto Interno Bruto (PIB) *per capita* é de aproximadamente R\$ 8.044, 00 (oito mil e quarenta e quatro reais), tendo na aquicultura, a maior fonte de renda (IBGE, 2015).

A área de estudo está situada no município de Itacuruba, sendo composta de 30 tanques escavados, seis dos quais são destinados à produção de alevinos, comercializados localmente (Figura 5). Todos os tanques são abastecidos com água bombeada do reservatório de Itaparica, onde também são lançados seus efluentes líquidos.

Figura 5 – Imagem da piscicultura de tanque escavado, no município de Itacuruba-PE.



Fonte: Google Earth (2016).

Tanques de cultivo

Na área estudada existe seis tanques de cultivo de juvenis que possuem área individual de 1.800 m³, comportam até 75 mil litros de água por tanque, exibindo profundidades que variam de 1,5 a 1,8 m e têm renovação da água entre 10 a 15 dias (Figura 6, Quadro 1). Ao final de cada ciclo de cultivo, os tanques são esvaziados mantidos em quarentena e

tratados com calagem para um novo ciclo, de modo que estes são usados em sistema de revezamento. Os tanques das fases iniciais de alevinagem, onde ocorre oferta de antibióticos e hormônios são sempre os mesmos, separados daqueles das fases finais do crescimento.

No tanque de cultivo das fases iniciais (T1), as larvas retiradas das incubadoras são mantidas por 10 dias, sendo ofertada apenas ração sem a introdução de fármacos, em um total médio de 10kg/dia. Durante a primeira amostragem, realizada em maio/16, este tanque apresentava água com cinco dias de retenção, enquanto na segunda amostragem em outubro/16, a água apresentava 40 dias de retenção. Após este período, os alevinos com aproximadamente 15 dias de vida, foram transferidos para um novo tanque de cultivo (T2), que continha água com 50 dias de retenção na primeira campanha, e 30 dias na segunda campanha. No tanque de cultivo T2, a partir do 15º dia de vida dos alevinos é iniciada a adição do hormônio diluído na ração, e os alevinos passam a receber uma média de 20kg/dia de ração por tanque. Ao completar 35 dias de vida, os alevinos foram transferidos para um novo tanque T3, que durante a primeira campanha amostral continha água no tanque há 35 dias, e na segunda amostragem o mesmo havia passado por despesca recente e continha água retida no tanque a 60 dias. Neste tanque, os alevinos foram alimentados com ração acrescentada de antibiótico, em uma média de 40kg/dia de ração por tanque.

Em geral, a ração é inserida após cinco dias da entrada dos peixes nos tanques e a finalização ocorre quatro dias antes da despesca, com uma permanência média de das tilápia no tanque de 60 a 65 dias. Cada tanque destinado a alevinagem possuía aproximadamente 24.000 indivíduos, correspondente a produção média anual total de 700.000 a 800.000 unidades.

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de amostragem na piscicultura de tanque escavado, no povoado de Coité, em Itacuruba-PE em maio de 2016.

Pontos de amostragem	Latitude	Longitude
T1	S 08°47'37.1"	W 038°44'13.3"
T2	S 08°47'37.1"	W 038°44'13.6"
T3	S 08°47'39.2"	W 038°44'14.5"
Reservatório	S 08°48'49.0"	W 038°44.21.1"

Figura 06: Pontos de amostragem na piscicultura de tanque escavado, em Itacuruba-PE em maio de 2016. A – T1; B – T2; C – T3 e D – Reservatório Itaparica.



Fonte: Cardoso (2016).

Para esta pesquisa foram realizadas duas amostragens, uma no mês de maio/2016 e a segunda em outubro de 2016.

3.2 Procedimento de análise físico-química do sedimento de piscicultura

As análises granulométricas e os nutrientes do sedimento foram processadas e analisadas no Laboratório de Química Ambiental de solos, no Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

O sedimento destinado para análises granulométricas do sedimento, foi analisado pelo método do densímetro para as frações de silte, argila e areia através das metodologias

dispostas no manual da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2011).

Para a determinação dos valores de nitrogênio total foi utilizado o método de extração de *Kjeldahl*, utilizando sistemas de digestão e destilação por arraste a vapor (EMBRAPA, 2011). Já o fósforo assimilável foi extraído através do método de *Mehlich 1* e determinado por colorimetria (EMBRAPA, 2011).

3.3 Cultivo dos organismos- teste

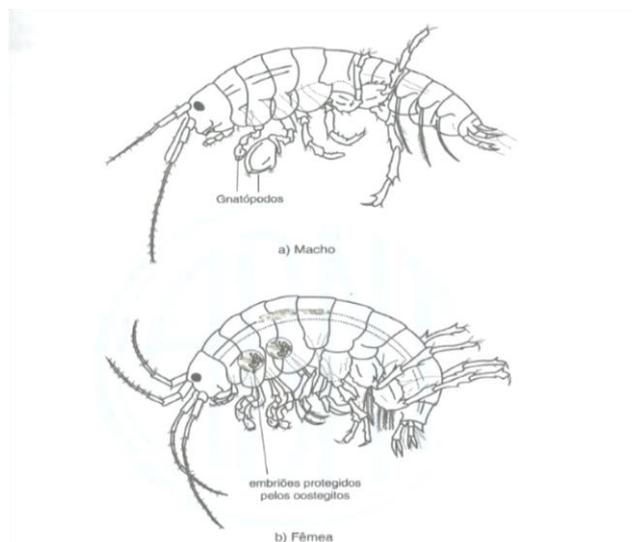
A metodologia de cultivo está normalizada pela ABNT, tanto para a espécie *Hyaella azteca* (ABNT NBR 15470, 2013) quanto para *Daphnia similis* (ABNT NBR 12713, 2004), em geral, os cultivos atenderam aos requisitos básicos. Os organismos devem ser cultivados em água doce natural ou reconstituída em laboratório, de modo que possa dar condições aos organismos sobreviver, crescer e se reproduzir. A água deve ser mantida em aeração constante para que mantenha condições adequadas de pH e oxigênio dissolvido. A qualidade da água deve ser monitorada e ajustada quando necessário, de modo a manter a temperatura entre 22° e 24° C para *H. azteca*, e 20° e 22° C para *D. similis* com intensidade luminosa de aproximadamente 3000 lux, fotoperíodo de oito horas de escuro por 16 horas de luz.. A dureza da água precisa estar em torno de 40 mg/L CaCO₃, o pH entre 7 e 8, a condutividade elétrica entre 190 e 250 µS.cm⁻¹ e o oxigênio dissolvido superior a 5 mg.L⁻¹.

Os organismos-teste de *H. azteca* (Saussure, 1858) (Figura 8) e *D. similis* (Claus, 1876) foram provenientes do Laboratório de Ensaio Biológicos Ambientais, do Centro de Tecnologia das Radiações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CTR-IPEN, da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo (SP), e mantidos no Laboratório de Limnologia, Departamento de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife (PE). O cultivo das duas espécies, bem como os ensaios, foi realizado segundo as recomendações das normas da ABNT NBR referidas anteriormente.

3.3.1 Cultivo de *Hyalella azteca*

Os organismos foram cultivados em caixas plásticas de 550 mm (comprimento) X 300 mm (largura) X 150 mm (altura), contendo cerca de 100 organismos cada, em 3,5 litros de água natural com dureza ajustada (40 a 48 mg CaCO₃), utilizando tela de nylon de 200 µm como substrato artificial (Figura 07). Os meios de cultivo foram renovados em 2/3 do volume total, uma vez por semana, e os organismos jovens foram retirados e mantidos nas mesmas condições do cultivo por sete dias até o momento do teste. Para alimentação, foi utilizado alimento composto preparado de acordo com a norma NBR 15470, com ração para peixe (Alcon®) e alga clorofíceia *Chlorella vulgaris*.

Figura 07: Aspectos gerais da vista lateral de *H. azteca* com ênfase na posição dos embriões na fêmea.



Fonte: ABNT (2013).

Figura 08: Cultivo de *Hyalella azteca* em caixas plásticas no Laboratório de Limnologia da UFRPE.



Fonte: Alves (2016).

3.3.2 Cultivo de *Daphnia similis*

Os organismos foram mantidos em béqueres de 1000 mL com 800 mL de água natural com dureza ajustada, contendo 25 organismos cada, com manutenção diária para retirada de carapaças e neonatos (Figura 6). Os organismos foram mantidos em sala refrigerada, sob temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com a água do cultivo renovada a cada 8 dias. Para alimentação foi utilizada diariamente a alga clorofícea *Chlorella vulgaris* e, uma vez por semana, ofertado alimento preparado de acordo com NBR 15470, composto de ração para peixe (Alcon®).

Figura 09: Cultivo de *D. similis* em béquer no Laboratório de Limnologia da UFRPE.



Fonte: Alves (2016).

3.4 Sensibilidade dos organismos à substância química

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) propõe em sua metodologia a utilização de cloreto de potássio (KCl) ou cloreto de sódio (NaCl) para realização de ensaio de sensibilidade e viabilidade dos organismos testes. Para tal, foram utilizadas quatro réplicas contendo solução teste de cloreto de potássio para *H. azteca*, com tempo de exposição de 96 horas e solução teste de cloreto de sódio para *D. similis*, com tempo de exposição de 48 horas. Para o controle foi utilizada apenas água de diluição.

3.5 Ensaios ecotoxicológicos

3.5.1 Ensaios com sedimento integral utilizando *Hyalella azteca*

Os ensaios foram realizados em recipiente plásticos com capacidade 500 mL, em quatro réplicas, sendo adicionado cerca de 100 mL do sedimento e 200 mL da água de diluição utilizada no cultivo, após isso, os recipientes foram mantidos em repouso por 24 horas para decantação das partículas do sedimento. Em paralelo, a mesma quantidade de réplicas foi utilizada como controle, utilizando tela de nylon de 8 cm X 8 cm com malha de 200 μm de como substrato artificial. Em cada recipiente foram utilizados 10 organismos testes, expostos por 240 horas. O ensaio foi realizado em sala climatizada com temperatura de $22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, com intensidade luminosa de aproximadamente 3000 lux, fotoperíodo de oito horas de escuro por 16 horas de luz. Ao final do período de exposição, foi feita uma contagem dos organismos vivos em cada recipiente para avaliar o efeito agudo. Em paralelo, diariamente registraram-se os teores finais de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica e pH.

Na ausência de efeito agudo, o crescimento dos anfípodes para cada repetição foi determinado dividindo a massa seca total de anfípodes sobreviventes, obtida após a secagem dos organismos em estufa a 60°C , pelo número total de anfípodes sobreviventes (Figura 11). Esses valores foram comparados com o peso encontrado nos organismos controle, estabelecendo assim a avaliação de efeito crônico. Em paralelo, registrou-se os teores finais de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e potencial hidrogeniônico (pH).

Figura 10: Ensaio ecotoxicológico com sedimento utilizando *H. azteca* em ambiente refrigerado.



Fonte: Alves (2016).

Figura 11: A- Preparação dos organismos para processo de secagem em membranas; B- Organismos disposto em bandejas de alumínio e colocados em estufa; C- Processo de secagem dos organismos em estufa a 60° C por 12 horas; D- Pesagem das membranas em balança analítica.



Fonte: Alves (2016).

3.5.2 Teste ecotoxicológicos dos compostos 17- α -metiltestosterona e do antibiótico oxitetraciclina em água utilizando *H. azteca*.

Como subsidio na avaliação da toxicidade do hormônio 17 α -metiltestosterona (MT) foi realizado um levantamento bibliográfico no sentido de encontrar trabalhos anteriores com *H. azteca* ou com outros organismos teste, e trabalhos em que se foi quantificado a concentração de hormônios encontrado no ambiente, como o de Contreras-Sanchez et al. (2001), para assim estimar as concentrações utilizadas no ensaio.

Deste modo, foram realizados ensaios com soluções-teste nas concentrações 0,003 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0,006 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0,012 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0,024 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,036 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no período de 240 horas, seguindo as mesmas condições do ensaio descritas com as amostras de sedimento. Nesse

ensaio foram preparados dois controles, um com água de cultivo e outro com uma solução água de cultivo/álcool etílico comercial a 46%, na concentração de 0,2 ml. O álcool etílico foi utilizado para diluição do hormônio que é insolúvel em água, assim utilizou-se o controle somente com álcool diluído a água de cultivo, para excluir possíveis interferências deste composto nos resultados. A solução estoque do MT foi preparada na proporção 240 mg.L⁻¹ de álcool etílico comercial a 46%.

Para os testes ecotoxicológicos com o antibiótico oxitetraciclina foram preparadas cinco concentrações: 200 mg.L⁻¹, 150 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹, 75 mg.L⁻¹ e 50 mg.L⁻¹, onde os organismos ficaram expostos por um período de 240 horas, seguindo as mesmas condições do ensaio com o hormônio, mas com apenas um controle utilizando água de cultivo.

3.5.3 Ensaio com solubilizado do sedimento utilizando *D. similis*

Para os testes ecotoxicológicos com o microcrustáceo *D. similis*, foi utilizada água solubilizada (elutriato) preparada a partir da agitação de amostras do sedimento por 30 minutos em agitação manual. Após este período, a água foi extraída e deixada em repouso sob refrigeração por 24 horas para decantação do material particulado. Para cada amostra foram preparadas quatro réplicas com 10 ml do elutriato em tubos de ensaio, e adicionados 5 organismos em cada réplica, totalizando um número de 20 organismos por concentração-teste. Os organismos utilizados para o teste foram jovens com tempo de vida entre 6 e 24 h (Quadro 3). O ensaio foi realizado em câmara de germinação, sob temperatura controlada de 22°C, no escuro. Ao término das 48 horas de exposição, foi feita a contagem dos organismos imobilizados e/ou mortos em cada concentração e registrados os teores finais de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e pH.

3.5.4 Teste ecotoxicológicos dos compostos 17- α -metiltestosterona e do antibiótico oxitetraciclina em água utilizando *D. similis*.

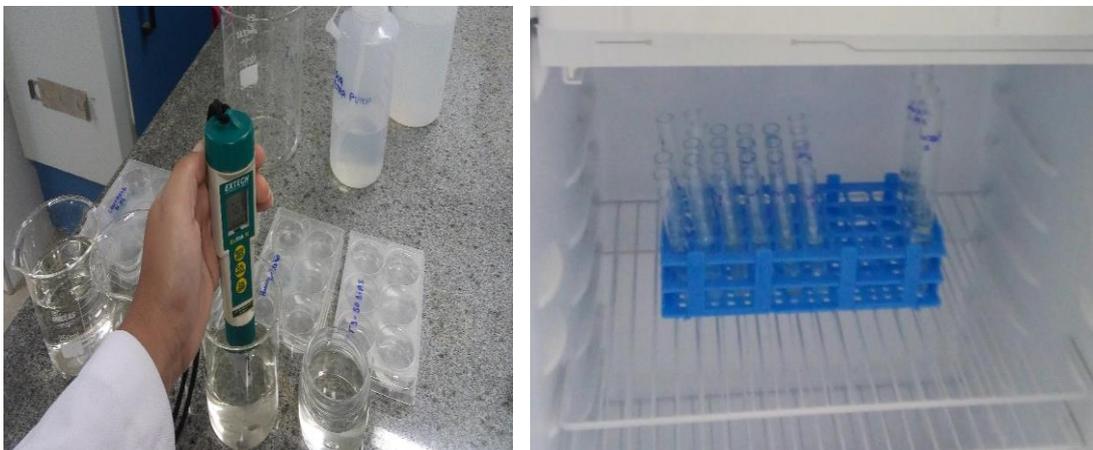
Para avaliar a toxicidade aguda e crônica do hormônio 17 α -metiltestosterona (MT) no organismo teste *D. similis*, foi realizado ensaios com soluções-teste nas concentrações: 4,8 μ g.L⁻¹, 9,6 μ g.L⁻¹, 14,4 μ g.L⁻¹, 19,2 μ g.L⁻¹ e 24 μ g.L⁻¹, no período de 48 horas sob as

mesmas condições do ensaio com as amostras de água solubilizada do sedimento (Figura 12). Nesse ensaio foram preparados dois controles, um com água de cultivo e outro com uma solução teste de água de cultivo/álcool etílico comercial a 46% na concentração de 0,1 ml.

Para verificação do possível efeito crônico de MT nos organismos foi avaliada a reprodução da *D. similis*, a partir da exposição dos organismos nas concentrações 4,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 2,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 1,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ por um período de 240 horas com troca da solução a cada 48 horas. Ao final do teste foi avaliado a quantidade de neonatos produzidos e se houve diferenças significativas entre as concentrações e o grupo controle.

Para o ensaio agudo do antibiótico oxitetraciclina foram preparadas soluções-teste nas concentrações: 50 mg.L^{-1} , 30 mg.L^{-1} , 25 mg.L^{-1} , 12,5 mg.L^{-1} e 6,25 mg.L^{-1} , onde os organismos ficaram expostos por 48 horas sob as mesmas condições do ensaio com as amostras de água solubilizada do sedimento.

Figura 12: Preparação e ensaio ecotoxicológico com elutriato utilizando *D. similis* em câmara de germinação.



Fonte: Alves (2016).

3.6 Avaliação estatística

Para avaliar se ocorreram diferenças significativas entre os ensaios e o controle, foram realizados testes estatísticos no programa “SigmaPlot 11.0”. De acordo com os resultados da normalidade foram aplicados os testes não paramétricos: teste t para amostras

independentes dois-a-dois, e os paramétricos: One-way ANOVA. Os valores de p foram determinados pelo teste de Kruskal Wallis ou Dunnett.

Quando os resultados exibiram diferenças significativas foram utilizados os testes Dunnett ou Dunn's, para verificar as diferenças entre as concentrações testadas e controle. As análises estatísticas foram realizadas considerando o nível de significância de 5%.

Para as análises estatísticas, no cálculo da concentração do agente tóxico que causa imobilidade ou letalidade para 50% dos organismos expostos no período de 48 horas (CE50/48 horas) para *D. similis* e 240 horas (CE50/240 horas) para *H. azteca*, foi utilizado o método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al.,1977), através do programa computacional "Abbott".

Os valores das Concentrações de Efeito não Observado (CENO) e Concentração de Efeito Observado (CEO) foram estimados, sempre que o teste revelasse diferença estatística significativa entre as concentrações testadas nos ensaios em relação ao controle.

Referências

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Ecotoxicologia aquática- Toxicidade aguda e crônica- Método de ensaio com *Hyaella* spp (Amphipoda) em sedimentos**. ABNT NBR 15470, 21 p, 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea: Cladocera)**. ABNT NBR 12713, 23p, 2009.
- ALLABY, M., **A Dictionary of Zoology**, 2nd edition, Oxford University Press. Kline Science Library Reference QL9 C66X, 1999.
- ALEGRE, G. F. Avaliação ecotoxicológica de sedimentos do rio Tietê, entre os municípios de Salesópolis e Suzano, SP. *Dissertação de mestrado em Ciências na área de Tecnologia nuclear-aplicações. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares*. São Paulo. 112p., 2009.
- ARAÚJO, R. P. D. A. Testes de toxicidade como instrumento na avaliação dos sedimentos de água doce do Estado de São Paulo. *Tese Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo*. São Paulo. p. 283, 2005.
- ARAÚJO, R. P. A.; SHIMIZU, G. Y.; BOHRER, M. B. C.; JARDIM, W. Avaliação da Qualidade de Sedimentos. In: ZAGATTO, P. A. e BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. Capítulo 13, 293-320. 2º edição.
- BARROSO, R. M.; ANDRÉS, M. P. **A Tilápia e o Desenvolvimento do Sertão de Itaparica/ PE - Análise Econômica para Investimentos de Desenvolvimento na Região**. Documentos 4: Embrapa Pesca e Aquicultura, ed. 1, 44 p., Palmas - TO, 2014.
- BERTOLETTI, E. **Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB (Série manuais), 2ª ed, 42 p., São Paulo, 2013.
- BOTTA, C. M. R.; ARAÚJO, R. P. A.; SILVÉRIO, P. F.; ALMEIDA, F. V.; MOZETO, A. A. Avaliação e identificação de toxicidade (AIT) de amostras de sedimento de água doce. In: MOZETO A.A.; UMBUZEIRO G.A.; JARDIM W.F.; **Método de coleta, análises físico-químicas e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimento de água doce**. Cubo multimídia. São Carlos. 2006. Projeto Qualised. Capítulo 2, 135-159.1º edição.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA PESCA E DA AQUICULTURA. **Censo aquícola nacional**. Brasília, 336p.; 2011.

BRASIL. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução Nº 430 de 13 de maio de 2011.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res43011.pdf>>. Acesso em: 03/03/2012.

BORRELY, S. I. Contaminação das águas por resíduos de medicamentos: ênfase ao cloridrato de fluoxetina. **O Mundo da Saúde**, v. 36(4), p. 556–563, 2012.

CAMPOS, B. G.; ABESSA, D. M. S.; LOPES, M. C.; SILVA, N. J. R. Avaliação ecotoxicológica em piscicultura no parque estadual da Serra do Mar-SP, Núcleo Itariru. **O Mundo da Saúde**, v. 38, n. 1, p. 98–104, 2014.

CAMPOS, J. L. A falta de produtos registrados para uso em aqüicultura no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, v. 15, n. 87, p. 14–15, 2005.

CARDOSO, G. M.; BUENO, A. A. D. P.; FERREIRA, R. L. A new troglobiotic species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from Southeastern Brazil. **Nauplius**, v. 19, n. 1, p. 17–26, 2011.

CARREIRA, R.; WAGENER, A.L.R.; FILEMAN, T.; READMAN, J.W. Distribuição de coprostanol (5b(H)-coleston-3b-ol) em sedimentos superficiais da Baía de Guanabara: indicador da poluição recente por esgotos domésticos. **Química Nova**. v.24, p. 37 – 42, 2001.

CAVALCANTI, V. A. Avaliação da toxicidade de sedimentos e água contaminados com azocorantes têxteis utilizando *Chironomus sancticaroli* e *Dapinia similis*. *Dissertação (Mestrado)- Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca*, Rio de Janeiro: s.n., 2010.

COSTA, J. B.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Avaliação ecotoxicológica da água e sedimento de tributários do reservatório de Barra Bonita (médio Tietê Superior). In: Espindola, E. L. G.; PASCHOAL, C. M. R. B.; ROCHA, O.; BOHER, M. B. C.; NETO, A. L. O. (Ed). **Ecotoxicologia perspectiva para o século XXI**. São Carlos: Rima, 2000. p 75-93.

CONTRERAS-SANCHEZ, W.M.; FITZPATRICK, M.S.; SCHEREK, C.B. Fate of methyltestosterone in the pond environment: Detection of MT in pond soil from a CRSP site. *Effluents and Pollution Research*, 2B (9ER2B), 2001.

DORNFELD, C.B. Utilização de análises limnológicas, bioensaios de toxicidade e macroinvertebrados bentônicos para o diagnóstico ambiental do reservatório de Salto Grande (Americana, SP). *Dissertação de mestrado*, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2002.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **A Tilápia e o Desenvolvimento do Sertão de Itaparica/PE - Análise Econômica para Investimentos de Desenvolvimento na Região**. Renata Melon Barroso – Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2014.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Manual de métodos de análise de solos**. Guilherme Kangussú Donagema – Rio de Janeiro: Embrapa solos, 2011. 230p.

ESTEVES, Francisco de Assis. **Fundamentos da limnologia**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 3ª edição, 826 p., 2011.

FALONE, S. Z. Desenvolvimento de métodos para a determinação do Hormônio 17A-metiltestosterona em amostras de Água e de sedimentos de piscicultura: Ensaio Ecotoxicológicos Com Cladóceros. p. 179f, 2007.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana : Impacto em saúde pública Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance : Health care impact. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, p. 29–45, 2014.

GUIMARÃES, Adalberto Ferreira. **Criação de peixe**. Ilhéus: CEPLAC/MAPA, 28 p., 2012.

HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C., THURSTON, R.V. Trimed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Technology**, v.7, n. 7, p.714-719, jul. 1977.

HOLLAND, A.F. **Environmental monitoring and assessment program, near coastal program plan for 1990: Estuaries**. Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, 1990.

HOMKLIN, S.; ONG, S. K.; LIMPIYAKORN, T. Biotransformation of 17-methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions. **Chemosphere**, v. 82, n. 10, p. 1401–1407, 2011.

HWANG, H.; ALEGRE, G. F.; BORRELY, S. I.; FLYNN, M. N. Avaliação de toxicidade em sedimentos do rio Juqueri (SP) com *Vibrio fischeri* e *Hyalella azteca*. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 2, nº2, p. 18-28, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro. v. 43, p. 1-49, 2015.

ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PASCARELLA, L.; PARRELLA, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. **Science of the Total Environment**. v. 346, p. 87–98, 2005.

KUBITZA, F. Larvicultura de peixes nativos. **Panorama da Aquicultura**, v. 13, n. 77, p. 47–56, 2003.

KUBITZA, F. Ajustes na nutrição e alimentação das tilápias. **Panorama da Aquicultura**, v. 16, n. 98, p. 14–24, 2006.

KUBITZA, F. Tilápias na mira dos patógenos. **Panorama da Aquicultura**, v. 18, n. 107, p. 28–37, 2008.

LEONHARDT J.H. Efeito da reversão sexual em tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura, Campus de Jaboticabal - UNESP, Jaboticabal*. 1997.

MACEDO, C. F.; SIPAÚBA-TAVARES. L. H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo., 36(2): 149 – 163, 2010.

MAINARDES-PINTO, C. S. R.; FENERICH-VERANI, N.; DE, B. E. S. Masculinização da tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17 α -metiltestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 29, n. 3, p. 654–659, 2000.

MOZETO A.A.; UMBUZEIRO G.A.; JARDIM W.F.; **Método de coleta, análises físico-químicas e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimento de água doce**. Cubo multimídia. São Carlos. 2006. 224 p.

MIRANDA. L., FELSNER M.L., TORRES Y.L., HOSS. H., GALLI.A., QUINÁIA. S.P; Validação intralaboratorial da determinação de metiltestosterona em águas naturais por voltametria usando eletrodo de gota pendente de mercúrio. **Química. Nova.**, v. 38, n. 3, p. 419–426, 2015.

MUÑOZ, A. L. P.; FLORES, R. V.; RODRIGUES A. P. O.; MATAVELI, M. Aquicultura: atividade em ascensão Levantamento dos custos de produção da piscicultura no Tocantins. **Boletim Ativos da Aquicultura**, v. 1, p. 1–4, 2015.

OECD - Organization For Economic Co-operation and Development. Sediment- Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, 2004.

RIBO, J. M.; Environ. Toxicol. Water Qual. 1997.

RIOS, K. C. C. R. Avaliação ecotoxicológica do sedimento a montante e a jusante da barragem do Ribeirão João Leite – Goiânia / GO. *Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia do Meio Ambiente*. Universidade Federal de Goiás. 151p. 2013.

Rosado, R. M. Uma abordagem integrativa da qualidade dos sedimentos de fundo da Baía de Ipanema, Porto Alegre, RS. *Dissertação (Mestrado)*. Universidade Federal do Rio grande do Sul, Rio Grande do Sul. 1998.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Criação de tilápia em tanques escavados**. SEBRAE/RN, 32 p. 2014.

SILVA, R.F.; SILVA, J.L.A.; BARBOSA, A.D. Gestão do uso e reuso da água de Cultivos de alevinos em Itacuruba-PE. In: World Water Congress, XIV, 2011. **Anais. Gerenciamento adaptativo da água e o desenvolvimento sustentável**. Ipojuca- Porto de Galinhas- PE: 2011.

SKAJKO, D.; FIRETTI, R. Tilápias em tanque-rede ótima alternativa de investimento. *Em: ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - Anualpec*. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, p. 309-22, 2000.

TAVECHIO, W.L.G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 335-341, 2009.

TALLINI, K. et al. Estabelecimento de Protocolo de Avaliação de Risco Ecológico em Ambiente Aquático tendo o Programa de Monitoramento do Rio Jacuí , São Jerônimo (RS). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, p. 55–63, 2012.

TORRES, S. H. S. Dinâmica populacional e ciclo de vida de *Hyaella* sp. (Amphipoda: Dogielinotidae) em córrego no oeste de Minas Gerais. *Dissertação mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada, área de concentração em Ecologia e Conservação de Recursos em Paisagens Fragmentadas e Agrossistemas*, Universidade Federal de Lavras, 2012.

TUNDISI, J. G; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Limnologia**. Ed. Oficina de textos, 1ª ed., São Paulo, 2008.

EPA - United States Environmental Protection Agency. **Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates**. 2ed. Washington, D.C.; USEPA, 2000.

VAINOLA, R. Global diversity of Amphipoda (Amphipoda: Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia*. The Hague, v.595, n. 2. P 241-255, 2008.

VIVEIROS, W. *Chironomus sancticaroli* - do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento. *Dissertação (Mestrado)- Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares*. São Paulo, 2012.

ZAGATTO, P. A. e BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 478 p.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SØRENSEN, B.; KUSK, K. O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 40, n. 7, p. 723–730, 2000.

**4. POTENCIAL TÓXICO DE SEDIMENTO DE VIVEIROS E COMPOSTOS
FÁRMACOS UTILIZADOS NO CULTIVO DE ALEVINOS DE TILÁPIA DO
NILO NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO**

Potencial tóxico de sedimento de viveiros e compostos fármacos utilizados no cultivo de alevinos de tilápia do nilo no semiárido pernambucano

Anthony Epifanio Alves¹, Ariane Silva Cardoso², William Severi³, Cristiane M. Varela de Araújo de Castro⁴, Maria do Carmo M. Sobral⁵

RESUMO: O estudo teve como objetivo avaliar o potencial ecotoxicológico do sedimento nos tanques de cultivo de alevinos de tilápia do nilo, do hormônio 17-metiltestosterona e do antibiótico oxitetraciclina utilizados no processo de produção de alevinos, utilizando como organismo-teste o anfípoda *Hyalella azteca* (Saussure, 1858). Amostras de sedimento foram coletados em três tanques e em um ponto no reservatório de Itaparica-PE. A avaliação ecotoxicológica do sedimento dos tanques não exibiu toxicidade aguda para *Hyalella azteca*. Contudo, se observou um efeito crônico, avaliado a partir do decréscimo da biomassa seca dos organismos, nas estações de amostragem T1 e reservatório em maio/2016 e no ponto do reservatório em outubro/2016. Entre os fármacos, o hormônio 17-metiltestosterona utilizado no processo de reversão sexual exibiu toxicidade, apresentando CE50 de 0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Já o antibiótico oxitetraciclina não apresentou toxicidade para *Hyalella azteca* nas concentrações testadas de 50 a 200 mg.L^{-1} .

PALAVRAS-CHAVE: ecotoxicologia, *Hyalella azteca*, 17-metiltestosterona, oxitetraciclina, cultivo de peixes.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the ecotoxicological potential of the sediment from tilapia tanks, 17-methyltestosterone and the antibiotic oxytetracycline used in the production process, using the amphipod *Hyalella azteca* (Saussure, 1858) as test-organism. Sediment samples were collected in three tanks and at one point at the Itaparica-PE reservoir. The ecotoxicological assessment of the sediment of the tanks did not exhibit acute toxic to *Hyalella azteca*. However, it was observed a chronic effect, evaluated from the reduction of the dry biomass of the organisms, at the sampling stations T1 and the reservoir in May 2016 and at the reservoir point in October 2016. Among the drugs, the 17-methyltestosterone hormone used in the sexual reversion process exhibited toxicity, presenting EC50 of 0.03 $\mu\text{g.L}^{-1}$. However, the antibiotic oxytetracycline showed no toxicity to *Hyalella azteca* at the tested concentrations of 50 to 200 mg.L^{-1} .

KEYWORDS: ecotoxicology, *Hyalella azteca*, 17-methyltestosterone, oxytetracyclin, fish farming.

Introdução

As pisciculturas instaladas no curso do rio São Francisco, sobretudo no reservatório de Itaparica, cultivam principalmente a espécie tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). O sucesso na produção em tanques-rede e a aceitação no mercado nacional e internacional requer dos produtores uma demanda crescente na produção de alevinos para abastecer o desenvolvimento do setor. A produção de alevinos requer técnicas particulares e utilizam insumos como hormônios e antibióticos que, se manejados de forma inadequada, podem acarretar danos ao ambiente (MACEDO; SIPAÚBA-TAVARES, 2010).

O uso dos antibióticos nas pisciculturas, sobretudo nos cultivos de alevinos e juvenis, tem se tornado prática comum como medida profilática. Já a 17- α metiltestosterona (MT) é utilizada no processo de reversão sexual, sobretudo na produção de tilápia, sendo um processo comum e muito importante para a produtividade do cultivo.

Quando a produção é realizada em cultivos de tanques escavados, esses resíduos tendem a assentar no sedimento, que atua como depósito de nutrientes e contaminantes nos ambientes aquáticos (MOZETO, 2006) e, por conseguinte, também é repositório de muitos produtos químicos.

Sendo assim, o sedimento é um dos compartimentos mais importantes quando se deseja avaliar o grau de contaminação nos ecossistemas aquáticos, tendo em vista sua capacidade de acumular compostos orgânicos e inorgânicos ao longo do tempo e em determinadas condições, voltar a disponibilizar tais contaminantes para o meio. O prognóstico da toxicidade através de ensaios ecotoxicológicos com sedimento é uma ferramenta fundamental na avaliação dos efeitos da interação de diversos compostos com a biota aquática.

Desse modo, o presente estudo visa gerar informações ecotoxicológicas utilizando como organismo teste o anfípoda *Hyalella azteca* a partir da análise do sedimento integral, do hormônio 17- α metiltestosterona (MT) e do antibiótico oxitetraciclina, utilizados em pisciculturas de tanque escavado destinadas à produção de alevinos de tilápia do nilo, no semiárido pernambucano.

Material e métodos

Área de estudo

O reservatório de Itaparica está à margem dos municípios de Belém do São Francisco – PE, Floresta – PE, Rodelas – BA, Itacuruba – PE, Petrolândia – PE. Entre os seus múltiplos usos, as atividades aquícolas se destacam na margem esquerda do reservatório, no estado de Pernambuco, nos municípios de Itacuruba, Belém do São Francisco e Petrolândia. No município de Itacuruba apresenta, além dos tanques rede, o modelo de tanque escavado.

A área de estudo situada no município de Itacuruba possui aproximadamente 30 viveiros de tanque escavado. Para o cultivo de alevinos são destinados seis tanques escavados. Possuem área individual de 1.800 m³, comportam até 75 mil litros de água por tanque, exibindo profundidades que variam de 1,5 a 1,8 m e têm renovação da água entre 10 a 15 dias. Ao final de cada ciclo de cultivo, os tanques são esvaziados mantidos em quarentena e tratados com calagem para um novo ciclo, de modo que estes são usados em sistema de revezamento. Os tanques das fases iniciais de alevinagem (15 a 60 dias de vida), onde ocorre oferta de antibióticos e hormônios são sempre os mesmos, separados daqueles das fases finais do crescimento.

As amostragens de sedimento para as análises físico-químicas e ecotoxicológicas ocorreram em três tanques de cultivo e em um ponto no reservatório de Itaparica nos meses de maio e outubro/16. A escolha dos meses para amostragem se baseou no processo de quarentena dos tanques de cultivo e do revezamento entre eles.

No viveiro de cultivo das fases iniciais T1 (08°47'37.1"S, 038°44'13.3"W), as larvas retiradas das incubadoras foram mantidas por 10 dias, sendo ofertada apenas ração sem a introdução de fármacos, em um total médio de 10 kg/dia. Durante a primeira amostragem, realizada em maio/16, este tanque apresentava água com cinco dias de retenção, enquanto na segunda amostragem em outubro/16, a água apresentava 50 dias de retenção.

Após 10 dias, os alevinos eram transferidos para um novo tanque de cultivo T2 (08°47'37.1"S, 038°44'13.6"W), que em maio apresentava água com 35 dias de retenção, e em outubro/16 continha água retida no tanque a 60 dias. Neste viveiro de cultivo (T2), os alevinos com aproximadamente 15 dias de vida passaram a ser alimentados com ração

misturada com o hormônio 17- α metiltestosterona (MT) com uma média de 20 kg/dia de ração por tanque.

Ao completar 40 dias de vida, os alevinos foram transferidos para um novo tanque T3 (08°47'39.2"S, 038°44'14.5"W), que continha água com 35 dias de retenção em maio, e 60 dias em outubro/16. Neste tanque, os alevinos foram alimentados com ração que em certo período do dia era acrescentada hormônio 17- α metiltestosterona (MT), e em outro de antibiótico, em uma média de 40kg/dia de ração por tanque.

O quarto ponto amostral (08°48'49.0"S, 038°44.21.1"W) está localizado no corpo do reservatório. Este ponto foi importante pois está localizado depois da área de lançamento dos efluentes dos tanques, próximo às pisciculturas em tanques-rede e ao local de captação da água para os viveiros.

Amostragem

O sedimento foi coletado com auxílio de draga tipo Petersen modificada, na região mais representativa quanto ao aporte de ração no tanque, onde se concentram a maior parte das gaiolas, sendo uma amostra destinada às análises ecotoxicológicas que foi mantida sobre refrigeração e uma para análise granulométrica e de nutrientes.

Análises laboratoriais

Para a avaliação da toxicidade do sedimento integral dos tanques e dos compostos fármacos utilizados na produção de alevinos foi utilizado o anfípoda *Hyaella azteca* (Saussure, 1858), segundo os procedimentos da Norma Técnica ABNT NBR 15470:2013 (ABNT, 2013).

O sedimento destinado às análises granulometrias, foi analisado pelo método do densímetro para as frações de silte, argila e areia através das metodologias dispostas no manual da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2011). Para a determinação dos valores de nitrogênio total foi utilizado o método de extração de *Kjeldahl*, utilizando sistemas de digestão e destilação por arraste a vapor. Já o fósforo assimilável foi extraído através do método de *Mehlich 1* e determinado por colorimetria (EMBRAPA, 2011).

O ensaio ecotoxicológico para avaliação do sedimento seguiu a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT NBR 15470/2013 (ABNT, 2013).

Cada amostra de sedimento foi separada em quatro réplicas, sendo adicionado cerca de 100 mL do sedimento e 200 mL de água de diluição utilizada no cultivo. Em paralelo, a mesma quantidade de réplicas foi utilizada para o controle, usando tela de 8 cm X 8 cm, com malha de 200 μm de como substrato artificial e água de cultivo. Cada recipiente recebeu 10 organismos-teste que ficaram expostos por 240 horas ao sedimento integral e ao controle. Ao final do período, foi feita uma contagem dos organismos vivos em cada recipiente para inferir o efeito agudo. Em paralelo, registraram-se os teores finais de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e potencial hidrogeniônico (pH). Na ausência de efeito agudo, foi determinado o peso seco médio dos anfípodos de cada repetição, a partir da massa seca total de anfípodos sobreviventes. Esses valores foram comparados com o peso encontrado nos organismos-controle e com os valores obtidos previamente dos cultivos em laboratório, estabelecendo assim a avaliação de efeito crônico.

Para avaliar a toxicidade do hormônio 17 α -metiltestosterona (MT) foi realizado ensaio com soluções-teste nas concentrações 0,003, 0,006, 0,012, 0,024 e 0,036 $\mu\text{g.L}^{-1}$, num período de 240 horas, seguindo as mesmas condições do ensaio com as amostras de sedimento. Nesse ensaio, foram preparados dois controles, um com água de cultivo e outro com álcool etílico comercial a 46%, na concentração de 0,2 mL.L^{-1} , correspondente ao volume de solução estoque utilizado para obter a maior concentração de hormônio testada. O álcool etílico foi utilizado para diluição do hormônio, que é insolúvel em água, de modo que se utilizou um controle somente com álcool diluído em água de cultivo, para excluir eventual interferência deste composto nos resultados, tendo sido realizado ensaio com a maior concentração utilizada na solução estoque. A solução estoque do MT foi preparada na proporção 240 mg.L^{-1} de álcool etílico comercial a 46%.

Para avaliar a toxicidade do antibiótico oxitetraciclina foi realizado ensaio com soluções-teste nas concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 mg.L^{-1} , num período de 240 horas, com renovação de 2/3 da solução água/antibiótico a cada 48 horas, seguindo as mesmas condições do ensaio com as amostras de sedimento.

Os resultados foram analisados quanto à normalidade e quanto à homogeneidade de variâncias ou heterodasticidade. A ANOVA foi utilizada para os dados que apresentaram uma distribuição normal ou homogeneidade de variância. Para os dados que não apresentaram uma distribuição normal ou heterodasticidade foi utilizada a análise de

variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis. Ocorrendo diferença significativa entre os tratamentos, foram aplicados testes de comparação múltipla de Dunnett, ou de Dunn no caso da análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis, a um alfa de 5% para todas as análises.

Para estimativa da concentração do agente tóxico que causa imobilidade ou letalidade para 50% dos organismos expostos no período de 48 horas (CE50/48 horas), foi utilizado o método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977), através do programa computacional “Abbott”.

Resultados e Discussão

Análise granulométrica e de nutrientes do sedimento

A natureza do sedimento, entre outras coisas, interfere diretamente na disponibilidade dos contaminantes. Além disto, oxigênio, potencial redox, pH, temperatura, sedimentação e tamanho das partículas podem influenciar na disponibilidade dos compostos no sedimento (ZAGATO e BERTOLLETI, 2006).

A distribuição granulométrica evidenciou a fração areia em maior percentual nos tanques T1 e T3 durante as duas amostragens e em T2 no mês de outubro. Já a estação reservatório exibiu frações de argila (50 % em maio/16 e outubro/16) e silte (45% em maio/16 e 42% em outubro/16) superiores a fração de areia nas duas amostragens (Figura 1). A análise granulométrica do sedimento é importante para verificação da concentração das partículas mais finas, sobretudo silte e argila, uma vez que estas partículas são mais suscetíveis na retenção de compostos orgânicos e metais (BAIRD, 2002).

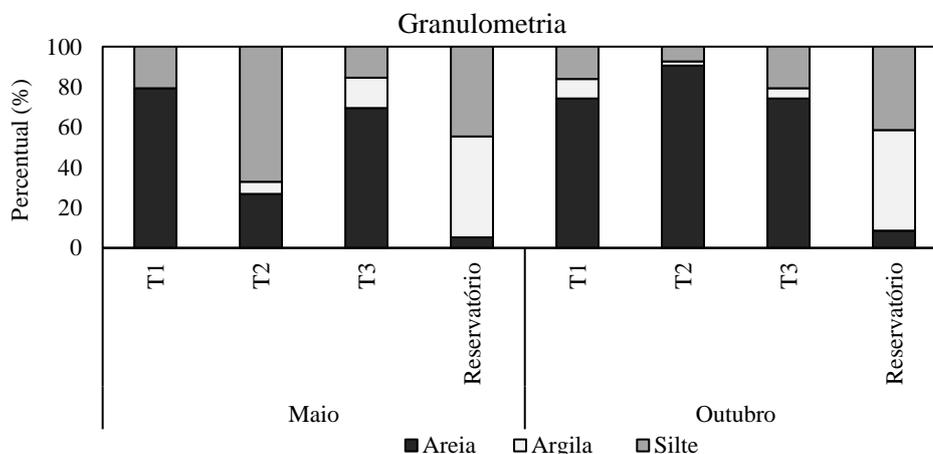


Figura 1 – Distribuição percentual (%) das frações granulométricas areia, argila e silte nas estações de amostragem T1, T2, T3 e no reservatório de Itaparica

O sedimento atua como repositor de nutrientes para o ambiente, sendo a piscicultura uma das atividades antrópicas com potencial para contribuir com o aporte de nitrogênio e fósforo, e a presença desses nutrientes no sedimento é um indicativo para uma potencial avaliação do grau de eutrofização (MACEDO E SIPAÚBA-TAVARES, 2010).

Os valores do nitrogênio total encontrados nos tanques de cultivo não diferiram estatisticamente do reservatório ($p = 0,75$), com valores que não excederam a 0,18 dag.kg na amostragem de maio e 0,16 dag.kg na amostragem de outubro, enquanto no reservatório o valor máximo foi de 0,17 dag.kg na amostragem de outubro (Figura 2).

Os valores do fósforo total no sedimento encontrado para o reservatório foram inferiores àqueles encontrados nos tanques de cultivo, entretanto, não diferiram estatisticamente ($p = 0,64$), exibindo valores que não excederam a 427 mg.dm⁻³ no tanque T3 e 21 mg.dm⁻³ no reservatório, ambos na amostragem de maio (Figura 3).

Em geral, as partículas granulométricas mais finas tendem a reter os compostos utilizados na piscicultura. As oscilações dos valores de nitrogênio e fósforo no sedimento tem a contribuição do aporte diário de nutrientes através da ração, do consumo a partir dos produtores primários, da ciclagem dos nutrientes e dos processos físico-químicos (ESTEVES, 2011). Com exceção do ponto T2, os tanques de cultivo (T1 e T3) e reservatório exibiram um maior percentual da fração areia em maio. Entretanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre a concentração de nitrogênio e fósforo e as frações granulométricas. Estudos realizados Bazante-Yamaguishi et al. (2009) evidenciaram que concentrações de fósforo total acima de 0,10 mg.L⁻¹ causaram toxicidade ao organismo teste *Ceriodaphnia dubia*.

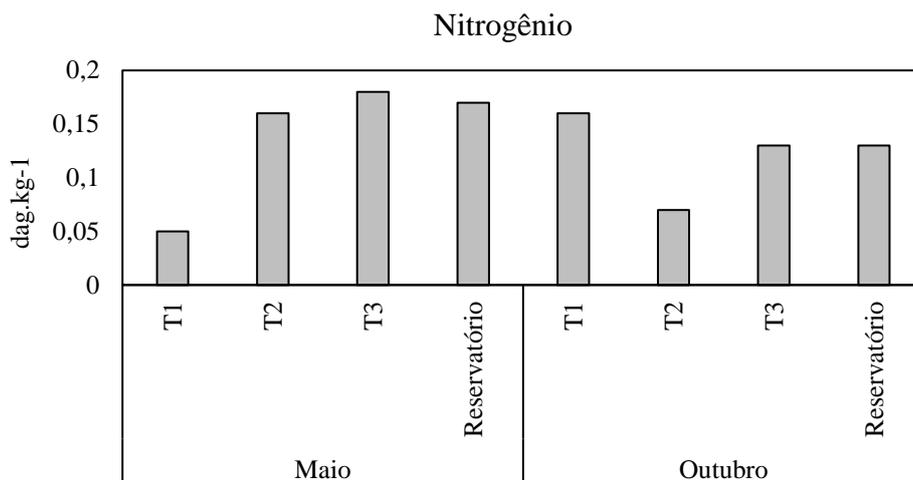


Figura 2 – Concentração de nitrogênio (dag.kg^{-1}) no sedimento das estações de amostragem T1, T2, T3 e no reservatório de Itaparica nos meses de maio e outubro/16

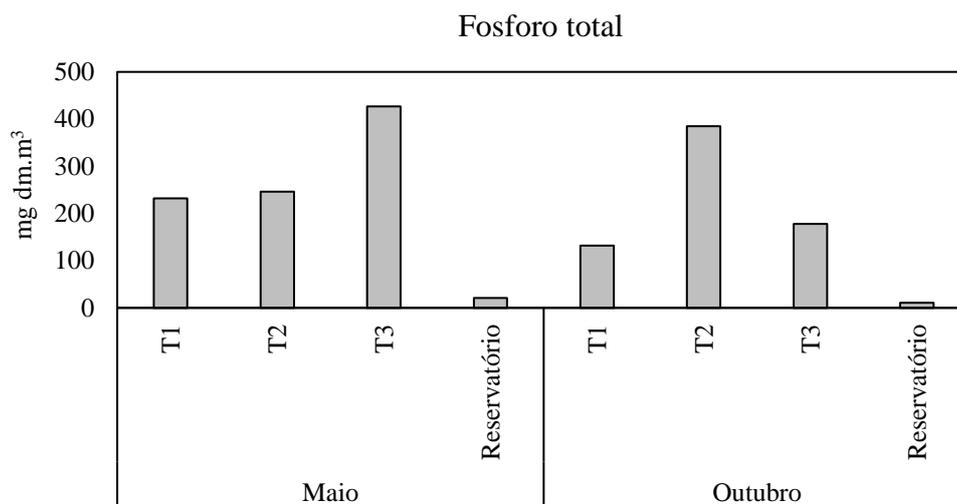


Figura 3 – Concentração de fósforo (mg dm.m^3) no sedimento das estações de amostragem T1, T2, T3 e no reservatório de Itaparica nos meses de maio e outubro/16

Ensaio ecotoxicológicos

O ensaio agudo do sedimento realizado com *Hyaella azteca* exibiu maior percentual de mortalidade nos tanques T2 (25%) no mês de maio e no ponto do reservatório (22,5%) em ambas as amostragens. Contudo, as mortalidades exibidas não diferiram significativamente quando comparadas ao controle ($p=0,07$) (Figura 4). Os tanques que exibiram maior mortalidade corresponderam àqueles onde ocorreu a adição

de hormônios para reversão sexual e do antibiótico oxitetraciclina (T2), além de um maior aporte de ração, e conseqüentemente de nutrientes disponíveis na água. Outro fator observado foi o tempo de retenção da água nos tanques durante as duas amostragens, que exibiu um período de retenção da água maior no mês de outubro, e a granulometria dos pontos amostrais que exibiu uma fração de areia maior em relação à de argila e silte.

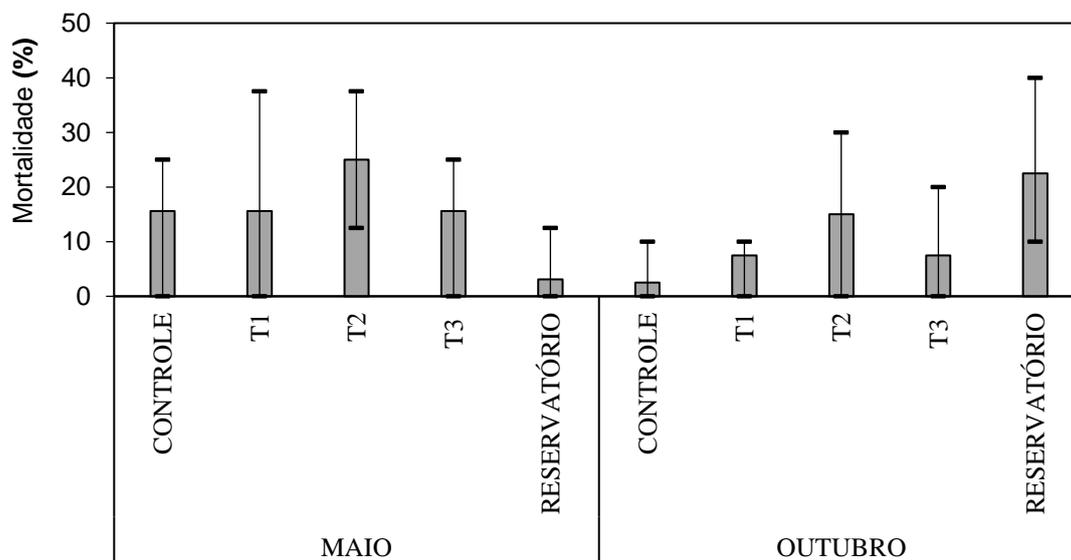


Figura 4 – Mortalidade (%) de *Hyalella azteca* expostos ao sedimento integral em piscicultura de tanques escavados T1, T2, T3 e no reservatório de Itaparica

A análise dos possíveis efeitos crônicos evidenciou no mês de maio um maior desenvolvimento dos organismos expostos ao sedimento do tanque T3, exibindo peso seco médio de 0,08 mg/org. Os organismos com as menores médias de desenvolvimento foram observados no ponto do reservatório, apresentando peso médio de 0,02 mg/org., seguido do ponto T1, com peso seco médio de 0,03 mg/org. (Figura 5). Essas variações entre o peso seco dos organismos expostos ao sedimento dos tanques T1, T2 e do reservatório, em relação ao do grupo controle indicaram a existência de efeito crônico nos organismos expostos, exibindo variação estatística significativa ($p = 0,02$). No mês de outubro assim como no mês anterior, os organismos com as menores médias de desenvolvimento foram observados no ponto do reservatório, apresentando peso seco médio de 0,02 mg/org., seguido do ponto T1, com peso médio de 0,05 mg/org. Os valores exibidos foram estatisticamente significativos, ($p = 0,007$), com os resultados observados no reservatório divergindo do controle.

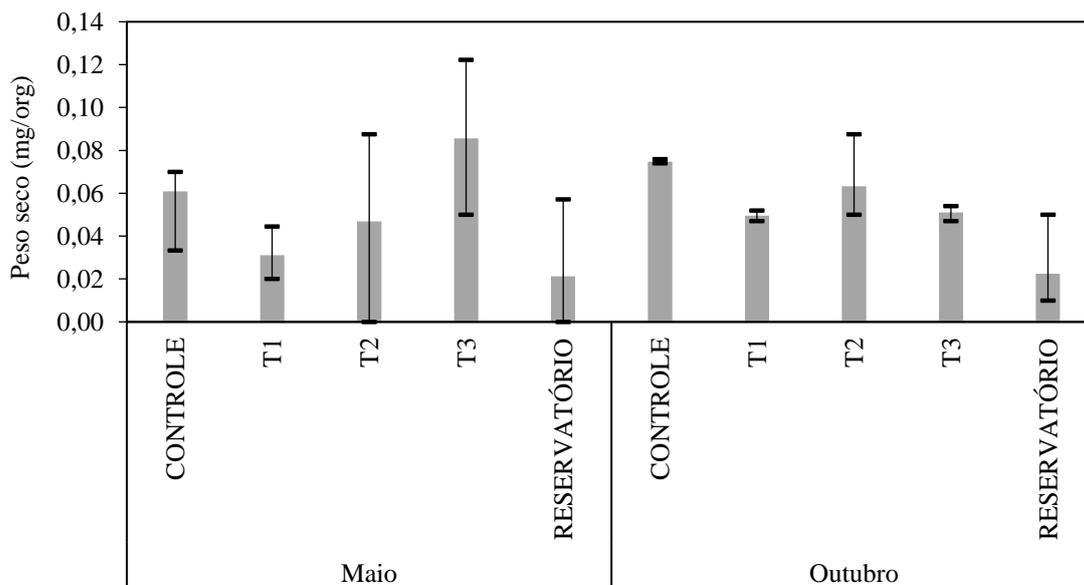


Figura 5 – Peso seco (mg/org) de *Hyalella azteca* expostos ao sedimento de piscicultura com tanques escavados T1, T2, T3 e no reservatório de Itaparica, durante 240 horas de exposição

O efeito tóxico de um sedimento deve ser avaliado sobre amplos aspectos, de modo que esta ação dificilmente é atribuída a um fator isolado de contaminação. As relações entre a fração granulométrica do sedimento e a absorção de contaminantes indica que metais e semi-metais ligam-se melhor a frações mais finas, como argila e silte. Além disso, pH, temperatura e carga de matéria orgânica são fatores que podem potencializar a toxicidade de um determinado sedimento. Essas variáveis podem oscilar de acordo com o ponto e a época da amostragem. Por esse motivo, o sedimento de uma mesma localidade pode apresentar resultados diferentes de mortalidade para o mesmo organismo-teste (ABESSA, 1998).

Avaliação da toxicidade do hormônio 17 α -Metiltestosterona

Com os resultados obtidos entre as concentrações testadas e o controle, foi possível observar que os dados apresentaram variação normal, com diferença estatisticamente significativa ($p = < 0,012$). Os organismos-teste que foram expostos às cinco concentrações de MT exibiram um maior percentual de mortalidade a partir da concentração $0,024 \mu\text{g.L}^{-1}$, registrando mortalidade de 37,5% (Figura 5). Os ensaios com o controle adicionado de álcool etílico comercial a 46%, evidenciaram que sob uma concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ utilizada para a dissolução do hormônio MT ocorreu

toxicidade aguda para a espécie *H. azteca*, indicando que o organismo teste exibe toxicidade quando exposto a concentrações de álcool comercial superiores a esta concentração.

A análise dos resultados obtidos a partir da técnica *Trimmed-Spearman-Kärber* evidenciou que a concentração que causa a mortalidade a 50% dos organismos teste ($CE_{50;240h}$) foi igual a $0,03 \mu\text{g.L}^{-1}$, com limites de confiança de 95% inferior e superior a $0,02 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,036 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. A concentração de efeito não observado (CENO) foi registrada em $0,012 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a concentração de efeito observado (CEO) foi apontada na concentração $0,024 \mu\text{g.L}^{-1}$.

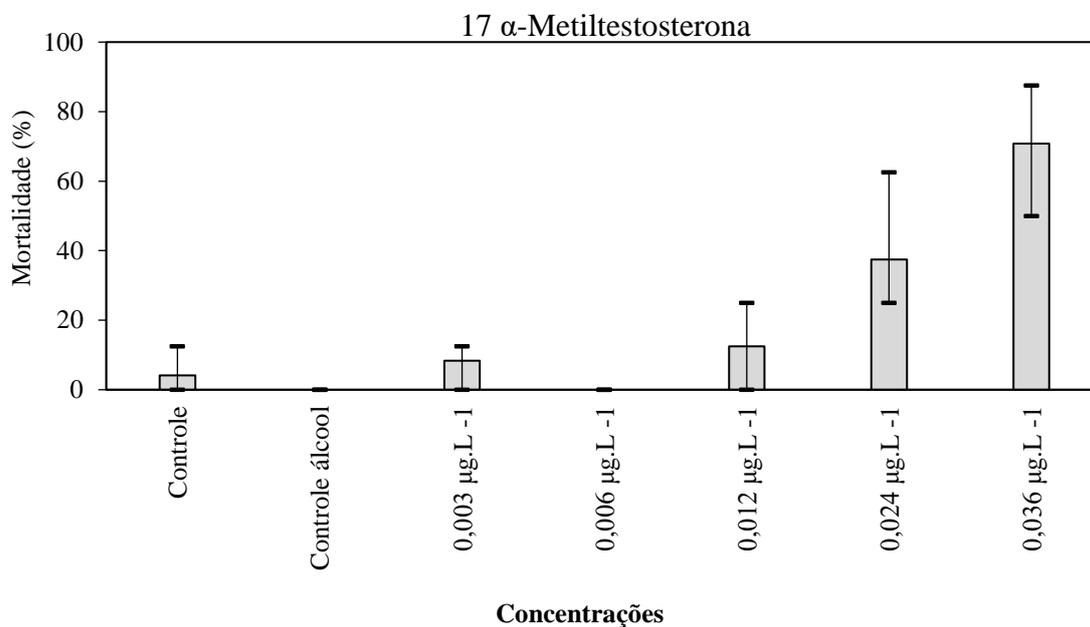


Figura 6 – Percentual de mortalidade de *Hyalella azteca* expostos a diferentes concentrações de 17 α -metiltestosterona em 240 horas de exposição

Estudos de Falone (2007) demonstraram que as concentrações do hormônio MT em piscicultura oscilaram entre $15,5$ e $99,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, em viveiros de cultivo com diferentes condições. O estudo também evidenciou que 10 dias após terminado o processo de reversão sexual dos alevinos, não foi identificada a presença do hormônio na água.

Avaliação da toxicidade do antibiótico oxitetraciclina

O percentual médio de mortalidade de *H. azteca* exposto à maior concentração testada foi de $6,67\%$, e não apresentou diferença estatística significativa ($p = 0,31$) entre

as concentrações analisadas e o grupo controle (Figura 7). Deste modo, a oxitetraciclina não apresentou toxicidade para *H. azteca*. Corroborando com o presente estudo, os trabalhos de Wollenberger et al. (2000) e Kolar et al. (2014), utilizando microcrustáceos para avaliar a toxicidade da oxitetraciclina, também não observaram efeito tóxico em seus experimentos.

O antibiótico oxitetraciclina embora tenha sua utilização regulamentada na Europa, Japão, Canadá e Estados Unidos, não há registro ou regulamentação em nenhum produto no Brasil para uso em aquicultura sendo o monitoramento dos resíduos do antibiótico implantado para os setores de carne bovina, suína e de aves (CAMPOS, 2005). Em geral, os antibióticos possuem grande solubilidade, baixa biodegradabilidade e grande potencial de bioacumulação no ambiente. O uso dos antibióticos nas pisciculturas, sobretudo nos cultivos de alevinos e juvenis, tem se tornado prática comum como medida profilática. Contudo, o uso indiscriminado desses fármacos traz o risco de seleção de bactérias resistentes no ambiente aquático, além de comercialmente trazer a possibilidade da presença de resíduos desses fármacos no peixe direcionado ao consumo humano (GASTALHO *et al.*, 2014).

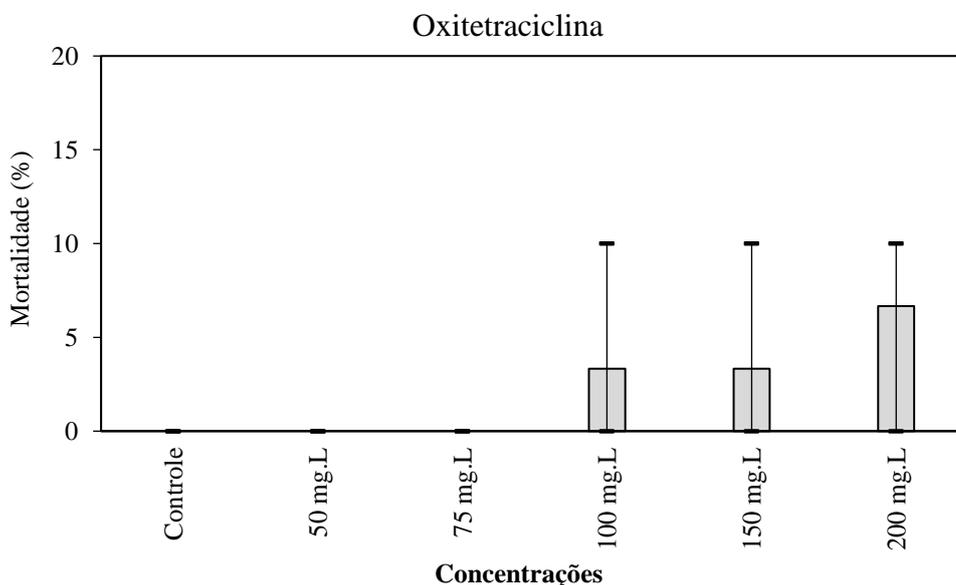


Figura 7 - Percentual da mortalidade de *Hyalella azteca* expostos a diferentes concentrações do antibiótico oxitetraciclina, em 240 horas de exposição.

Conclusão

O sedimento integral dos tanques escavados para a produção de alevinos não produziu efeito tóxico agudo para o organismo-teste *Hyaella azteca*, embora efeitos crônicos tenham sido observados quando analisado o peso seco médio dos organismos expostos, indicando que os compostos presentes no sedimento possuem potencial tóxico a longo prazo para o organismo testado. O hormônio 17 α -metiltestosterona, se disponível no sedimento, pode apresentar potencial tóxico para *Hyaella azteca* quando exposto a concentrações superiores a 0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$ por um período de exposição de 240 horas. A utilização do antibiótico oxitetraciclina não exibiu toxicidade para *Hyaella azteca*, em 240 horas, nas concentrações testadas.

Referencias

- ABESSA, D. M. S.; SOUSA, E. C. P. M.; TOMMASI, L. R. Considerações sobre o emprego da tríade de qualidade de sedimento no estudo da contaminação marinha. *Relat. Téc. Inst. Oceanogr.*, v. 44, p.1-12, 1998.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *Ecotoxicologia aquática- Toxicidade aguda e crônica- Método de ensaio com Hyalella spp (Amphipoda) em sedimentos*. ABNT NBR 15470, 21 p, 2013.
- BAIRD, C. Química Ambiental. 2 ed. *Bookman*. Porto Alegre – RS, 2002.
- Bazante-Yamaguishi, R.; Lombardi, J. V.; Mercante, C. T. J.; Caruso, N. P. P.; Moreira, L. E. B.; Pereira, J. S. Análise Ecotoxicológica em Viveiro de Produção de Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Utilizando o Cladóceros *Ceriodaphnia dubia* como Organismo-Teste. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* v. 4, n. 1-3, p. 55-64, 2009.
- Campos, J. L. A falta de produtos registrados para uso em aquicultura no Brasil. Uma brecha para a imposição de barreiras comerciais e riscos para os consumidores. *Panorama da aquicultura*, V. 15, p. 14-15, 2005.
- ESTEVES, F. A. *Fundamentos da limnologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2011. 826 p.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). *Manual de métodos de*

análise de solos. Guilherme Kangussú Donagema – Rio de Janeiro: Embrapa solos, 2011. 230p

FALONE, S. Z. Desenvolvimento de métodos para a determinação do Hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de Água e de sedimentos de piscicultura: Ensaio Ecotoxicológicos com Cladóceros. p. 179f, 2007.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana : Impacto em saúde pública Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance : Health care impact. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, v. 3, p. 29–45, 2014.

HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C., THURSTON, R.V. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology*, v.7, n. 7, p.714-719, jul. 1977.

Kolar, B.; Arnus, L.; Jeretin, Bogdana.; Gutmaher, A.; Drobne, D.; Durjava, M. K. The toxic effect of oxytetracycline and trimethoprim in the aquatic environment. *Chemosphere*, v115, p. 75–80, 2014.

Macedo, C. F.; Sipaúba-Tavares, L. H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. *Boletim do Instituto da Pesca, São Paulo*.v.36(2). p 149 – 163, 2010.

MOZETO A.A.; UMBUZEIRO G.A.; JARDIM W.F.; *Método de coleta, análises físico-químicas e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimento de água doce*. Cubo multimídia. São Carlos. 2006. 224 p.

ZAGATTO, P. A. e BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006. 478 p.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SØRENSEN, B.; KUSK, K. O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, v. 40, n. 7, p. 723–730, 2000.

**5. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SEDIMENTO DE VIVEIRO E
COMPOSTOS FÁRMACOS NA PRODUÇÃO DE ALEVINOS DE
TILÁPIA DO NILO**

Avaliação da toxicidade de sedimento de viveiro e compostos fármacos na produção de alevinos de tilápia do nilo

Anthony Epifanio Alves¹, Ariane Silva Cardoso², William Severi³, Cristiane M. Varela de Araújo de Castro⁴, Maria do Carmo M. Sobral⁵

RESUMO: O estudo teve como objetivo gerar informações ecotoxicológicas do sedimento e dos fármacos utilizados em piscicultura de tanque escavado destinada à produção de alevinos de tilápia do nilo. As amostras de sedimento foram provenientes de três tanques de cultivo e em um ponto no reservatório de Itaparica-PE. Entre os tanques de cultivo, dois exibiram toxicidade para *Daphnia similis* na primeira amostragem. Entre os compostos químicos testados, o hormônio 17-metiltestosterona utilizado no processo de reversão sexual exibiu toxicidade, apresentando CE50 de 7,62 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Já o antibiótico oxitetraciclina não apresentou toxicidade para *Daphnia similis*.

PALAVRAS-CHAVE: ecotoxicologia, *Daphnia similis*, 17-metiltestosterona, oxitetraciclina

ABSTRACT: The objective of the study was to generate ecotoxicological information on the sediment and the drugs used in fish farms from excavated tanks destined to the production of Nile tilapia. The sediment samples were obtained from three culture tanks and at one point in the Itaparica-PE reservoir. Among culture tanks, two showed toxicity to *Daphnia similis* at the first sampling. Among the chemical compounds tested, the hormone 17-methyltestosterone used in the sexual reversion process exhibited toxicity, presenting EC50 of 7.62 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The antibiotic oxytetracycline did not show any toxicity to *Daphnia similis*.

KEYWORDS: ecotoxicology, *Daphnia similis*, 17-methyltestosterone, oxytetracycline

Introdução

A produção aquícola nacional segundo o Instituto brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) foi de 483,24 mil toneladas em 2015, sendo o cultivo de tilápia do nilo o mais expressivo entre os cultivos aquícolas em termos de volume produzido e com grande relevância no aspecto socioeconômico (IBGE, 2015).

O aumento da atividade aquícola nos reservatórios e seu entorno vem contribuindo para o aumento do aporte de nutrientes além de lançar rejeitos fármacos, como antibióticos, antifúngicos e hormônios. Esses fármacos são utilizados no tratamento e no manejo das culturas para evitar doenças no cultivo e para a reversão sexual. Entre estes, a maior incidência é a do hormônio esteróide 17- α metiltestosterona (MT), utilizado diariamente junto à alimentação do cultivo de alevinos, e o uso de antibióticos como a oxitetraciclina para prevenção de doenças nas fases iniciais.

O sedimento é um compartimento importante quando se deseja avaliar o grau de contaminação e toxicidade nos ecossistemas aquáticos, tendo em vista sua capacidade de acumular compostos orgânicos e inorgânicos e em determinadas condições, voltar a disponibilizar tais contaminantes para o meio (Araújo et al, 2008; Esteves, 2011.). Os ensaios ecotoxicológicos com sedimento é uma ferramenta fundamental na avaliação dos efeitos da interação de diversos compostos para a biota aquática. Os microcrustáceo, *Daphnia* vêm sendo bastante utilizados em ensaios ecotoxicológicos, por serem facilmente cultivados em laboratórios sob condições controladas, possuírem normas padronizadas e por sua capacidade de resposta a diversos poluentes.

Desse modo, o presente estudo visa gerar informações ecotoxicológicas a partir de elutriato proveniente de amostras de sedimento e dos fármacos utilizados em viveiros de tanque escavado destinadas à produção de alevinos de tilápia do nilo utilizando *Daphnia similis* como organismo teste.

Material e métodos

O reservatório de Itaparica está situado à margem dos municípios de Belém do São Francisco – PE, Floresta – PE, Rodelas – BA, Itacuruba – PE, Petrolândia – PE. Entre os seus múltiplos usos, as atividades aquícolas se destacam no reservatório se concentrando na margem esquerda no estado de Pernambuco nos municípios de Itacuruba, Belém do São Francisco e Petrolândia; contudo, no município de Itacuruba apresenta, além dos tanques rede, o modelo de tanque escavado as margens do reservatório.

A área de estudo situada no município de Itacuruba possui aproximadamente 30 viveiros de tanque escavado. Os viveiros de cultivo de alevinos estão entre esses sendo seis tanques estão destinados ao cultivo de juvenis. Possuem área individual de 1.800 m², comportam até 75.000 litros de água por tanque, exibindo profundidades que variam de 1,5 a 1,8 m e têm renovação da água entre 10 a 15 dias. Ao final de cada ciclo de cultivo, os tanques são esvaziados mantidos em quarentena e tratados com calagem para um novo ciclo, de modo que estes são usados em sistema de revezamento. Os tanques das fases iniciais de alevinagem (15 a 60 dias de vida), onde ocorre oferta de antibióticos e hormônios são sempre os mesmos, separados daqueles das fases finais do crescimento.

As amostragens de água e sedimento para as análises físico-químicas e ecotoxicológicas ocorreram em três tanques de cultivo e em um ponto no reservatório de Itaparica nos meses de maio e outubro de 2016. A escolha dos meses para amostragem se baseou no processo de quarentena dos tanques de cultivo e do revezamento entre eles, de modo que a amostragem seguinte (outubro/16) fosse realizada nos mesmos viveiros.

No viveiro de cultivo das fases iniciais P1 (08°47'37,1"S, 038°44'13,3"W), as larvas retiradas das incubadoras foram mantidas por 10 dias, sendo ofertada apenas ração sem a introdução de fármacos, em um total médio de 10 kg/dia. Durante a primeira amostragem,

realizada em maio/16, este tanque apresentava água com cinco dias de retenção, enquanto na segunda amostragem em outubro/16, a água apresentava 50 dias de retenção.

Após 10 dias, os alevinos foram transferidos para um novo tanque de cultivo P2 (08°47'37,1"S, 038°44'13,6"W), que em maio apresentava água com 35 dias de retenção, e em outubro/16 continha água retida no tanque há 60 dias. Neste viveiro de cultivo (P2), os alevinos com aproximadamente 15 dias de vida passaram a ser alimentados com ração misturada com o hormônio 17- α metiltestosterona (MT) com uma média de 20 kg/dia de ração por tanque.

Ao completar 40 dias de vida, os alevinos foram transferidos para um novo tanque P3 (08°47'39,2'S, 038°44'14,5'W'), que continha água com 35 dias de retenção em maio, e 60 dias em outubro/16. Neste tanque, os alevinos foram alimentados com ração que em certo período do dia era acrescentada do hormônio 17- α metiltestosterona (MT), e em outro de antibiótico, em uma média de 40 kg/dia de ração por tanque.

O quarto ponto amostral no reservatório (08°48'49,0"S, 038°44.21,1"W) está localizado no corpo do reservatório. Este ponto foi importante pois está localizado antes da área de lançamento dos efluentes dos tanques, próximo a pisciculturas em tanques-rede, e próximo ao local de captação da água para os viveiros.

Para a avaliação da toxicidade do sedimento de viveiro e dos compostos fármacos utilizados na produção de alevinos foram realizados ensaios utilizando o cladóceros *Daphnia similis* (Claus, 1876), segundo a norma ABNT NBR 12713 da Associação Brasileira de Normas Técnicas:2016 (ABNT, 2016).

Para os ensaios ecotoxicológicos, foi utilizada água solubilizada (elutriato) obtida a partir da agitação de amostra do sedimento por 30 minutos hora em agitação manual. Após este período, a água foi separada do sedimento precipitado e deixada em repouso sob refrigeração por 24 horas, para a decantação final do material particulado. Para cada amostra, foram

preparadas quatro réplicas contendo 20 ml do elutriato, e em cada réplica adicionados cinco organismos, totalizando 20 organismos por ensaio. Os indivíduos utilizados para o teste foram jovens com tempo de vida entre 6 e 24 h. Ao término das 48 horas de exposição, foi feita a contagem dos organismos imóveis e/ou mortos em cada amostra e registrados os teores finais de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e pH, empregando medidores portáteis.

O ensaio de toxicidade aguda (48 horas) com o hormônio 17 α -metiltestosterona (MT) foi realizado com soluções-teste nas concentrações de 4,8; 9,6; 14,4; 19,2 e 24 $\mu\text{g.L}^{-1}$, obtidas mediante diluição de solução estoque de MT preparada com 240 mg.L^{-1} de álcool etílico comercial a 46%. As condições do ensaio foram as mesmas daquele com as amostras de água solubilizada do sedimento. Nesse ensaio, foram preparados dois controles, um com água de cultivo e outro com álcool etílico comercial a 46% na concentração de 0,1 mL.L^{-1} , correspondente ao volume de solução estoque utilizado para obter a maior concentração de hormônio testada. Como o hormônio é insolúvel em água, foi realizado o ensaio com álcool etílico, empregado na preparação do hormônio, para avaliar eventual interferência do álcool nos resultados dos ensaios realizados com o hormônio.

Para avaliação do efeito crônico de MT na reprodução de *D. similis*, foi realizado um ensaio com as concentrações 0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$, por um período de 240 horas, com troca da solução a cada 48 horas. Ao final do teste, foi avaliada a quantidade de neonatos produzidos e se houve diferença significativa entre as concentrações e os controles.

O ensaio com o antibiótico oxitetraciclina foi realizado com soluções-teste nas concentrações 50, 30, 25, 12,5 e 6,25 mg.L^{-1} , no período de 48 horas, sob as mesmas condições do ensaio com as amostras de água solubilizada do sedimento.

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software SigmaPlot para Windows versão 11.0, a um alfa de 5% para todas as análises. Os resultados foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias. A ANOVA foi utilizada para os dados que

apresentaram uma distribuição normal ou homogeneidade de variância. Para os dados que não apresentaram uma distribuição normal ou heterodasticidade utilizamos a análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis. Ocorrendo diferença significativa entre os tratamentos, foram aplicados testes de comparação múltipla de Dunnett, ou de Dunn no caso da análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis.

Para a estimativa da concentração do agente tóxico que causa imobilidade ou letalidade para 50% dos organismos expostos no período de 48 horas (CE50/48 horas), foi utilizado o método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977), através do programa computacional “Abbott”.

Resultados e Discussão

Ensaio ecotoxicológicos

No ensaio de toxicidade aguda realizado com *D. similis* a partir do elutriato no sedimento dos pontos amostrais, foi avaliado o percentual de mortalidade ou imobilidade dos daphnídeos em 48 horas. Os ensaios evidenciaram maior percentual de mortalidade nos tanques P2 (80%) e P3 (60%) na amostragem de maio, com variação significativa quando comparado ao ensaio controle de $p = 0,0001$ (Figura 01). Na análise do elutriato, da coleta realizada em outubro/16, a média na mortalidade de *D. similis* foi inferior a 10 % em todos os pontos amostrais, sem variação significativa dos pontos amostrais ($p=0,38$) quando comparado ao ensaio controle.

Os viveiros que apresentaram as maiores mortalidades correspondem àqueles onde ocorreu a inserção de hormônios para reversão sexual (P1, P2) e do antibiótico oxitetraciclina (P2), e um maior aporte de ração e conseqüentemente maior liberação de nutrientes disponíveis na água (P3). Um outro fator observado, foi o tempo em que os alevinos são mantidos em cada viveiro, no viveiro P2 os alevinos são mantidos por 25 dias até completar aproximadamente 40

dias de vida. Já o viveiro P3 os alevinos são mantidos por até 20 dias com uma média de 60 a 65 dias de vida.

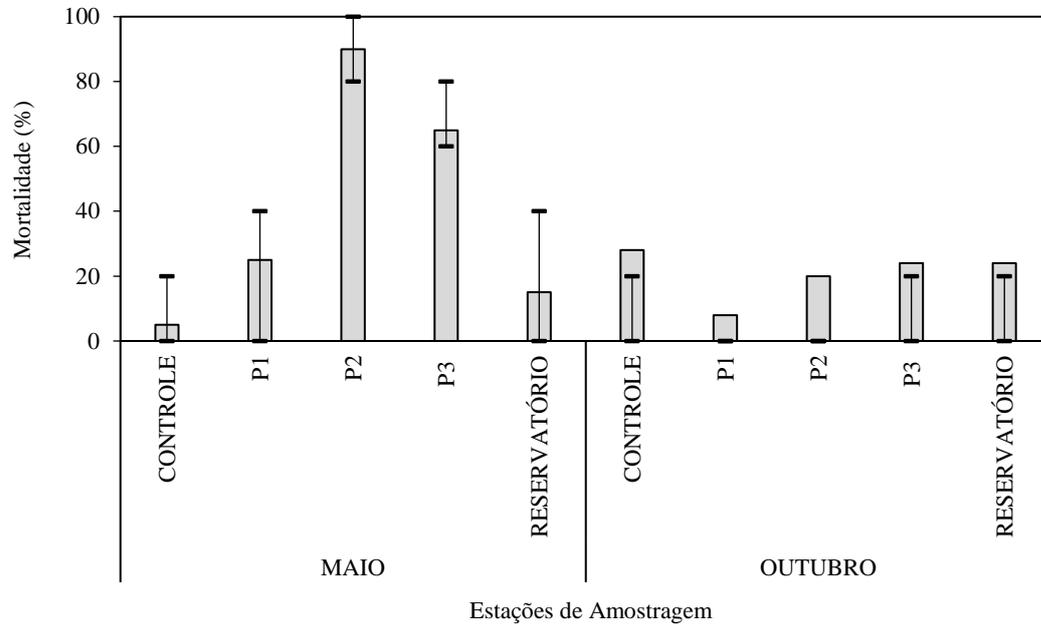


Figura 1 – Percentual de mortalidade de *Daphnia similis* expostos ao elutriato do sedimento dos pontos de amostragem em piscicultura de tanque escavado P1, P2, P3 e ponto no reservatório de Itaparica, após 48 horas de exposição

Avaliação da toxicidade do hormônio 17 α -Metiltestosterona

Os resultados entre as concentrações do hormônio testadas e o controle, exibiram dados com variação normal, e diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Os organismos que foram expostos as cinco concentrações de MT exibiram elevação da mortalidade a partir da concentração de $9,6 \mu\text{g.L}^{-1}$, na qual foi registrada 72% de mortalidade (Figura 2). As análises estatísticas evidenciaram as concentrações do hormônio MT utilizadas nesse estudo apresentaram toxicidade aguda para a espécie *D. similis*, exceto a concentração de $4,8 \mu\text{g.L}^{-1}$, registrando mortalidade média de 30%. De acordo com o método *Trimmed-Spearman-Kärber*, a concentração que causou imobilidade a 50% dos organismos teste ($CE_{50;48h}$) foi calculada em $7,62 \mu\text{g.L}^{-1}$, com limites de confiança de 95% inferior e superior de, respectivamente, $5,25$

e $11,06 \mu\text{g.L}^{-1}$. A Concentração de Efeito não Observado (CENO) foi registrada em $4,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a Concentração de Efeito Observado (CEO) foi apontada na concentração $9,6 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os resultados evidenciaram que não houve influência do álcool comercial sobre a mortalidade nos organismos teste de modo que não foi observada diferença estatística entre o controle e o controle com álcool ($p = 0,686$).

Falone (2007) registrou concentrações de MT em viveiros de piscicultura entre entre $15,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ a $99,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, em viveiros de cultivo com diferentes condições não tendo detectado a presença do hormônio 10 dias após o termino do processo de reversão. A autora indica que, possivelmente, as concentrações mais altas encontradas nos pontos de saída dos viveiros devem ter ocorrido devido ao hormônio presente na ração não ter sido totalmente consumido e ter se acumulado com o passar das aplicações diárias, considerando ainda, que o hormônio é praticamente insolúvel em água.

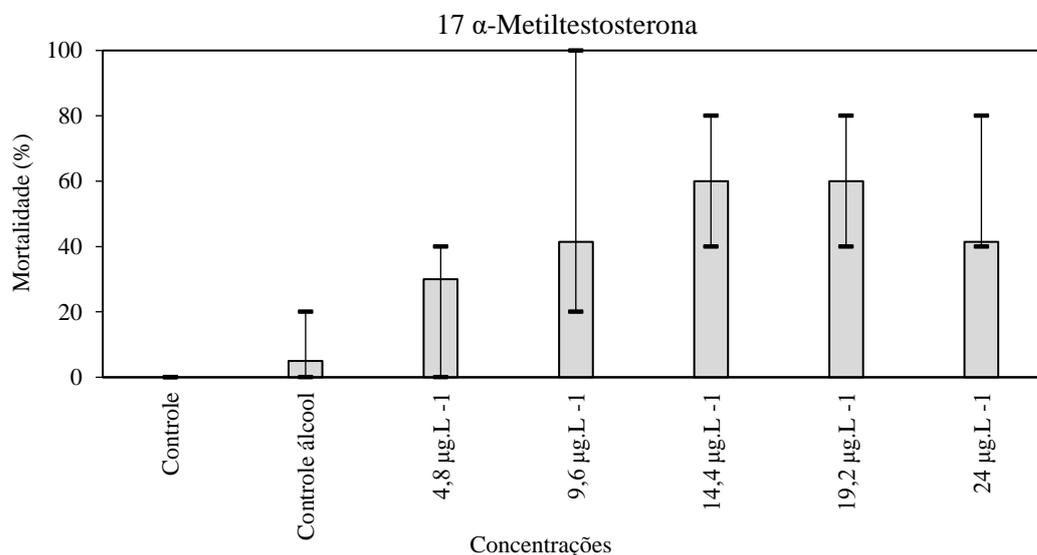


Figura 2 – A- Percentual de mortalidade de *Daphnia similis* expostos a diferentes concentrações de 17 α -Metiltestosterona

A toxicidade crônica do MT sobre *D. similis* foi verificada a partir da possível interferência do hormônio sobre a reprodução. Não foi observada diferença estatisticamente

significativa ($p = 0,558$) no número de neonatos nascidos nas diferentes concentrações testadas, nem diferença entre os resultados do controle e do controle com álcool ($p=0,967$) (Figura 3). Assim, foi possível observar que MT apresentou baixo ou nenhum efeito sobre a reprodução de *D. similis* para as concentrações testadas.

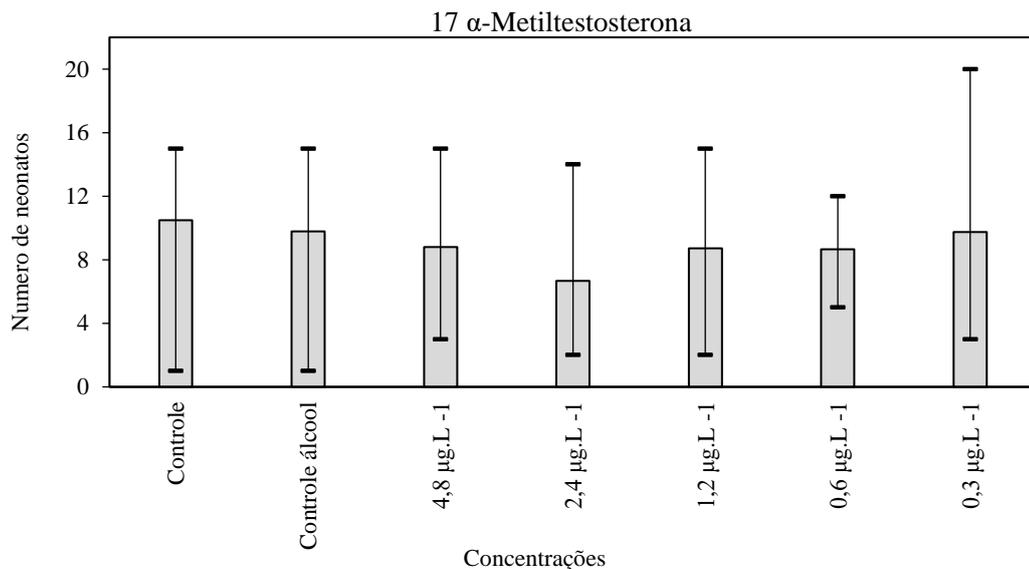


Figura 3 – Número de neonatos de *Daphnia similis* nascido em 240 horas de exposição a diferentes concentrações de 17 α -Metiltestosterona.

Avaliação da toxicidade do antibiótico oxitetraciclina

A mortalidade observada entre o controle e as diferentes concentrações de oxtetraciclina testadas variou entre 14,3 e 33,3 %, sem diferir estatisticamente entre elas ($p=0,53$), deste modo, a oxitetraciclina não apresentou toxicidade para *D. similis*.

Outros trabalhos corroboram com os resultados observados neste estudo, como Wollenberger et al. (2000) testando oxitetraciclina em concentrações que variaram entre 1 a 100 mg.L^{-1} e Kolar et al. (2014) com concentrações que chegaram a 313 mg.L^{-1} também não

observaram efeito tóxico em seus experimentos, contudo, utilizando como organismos-teste a *D. magna*.

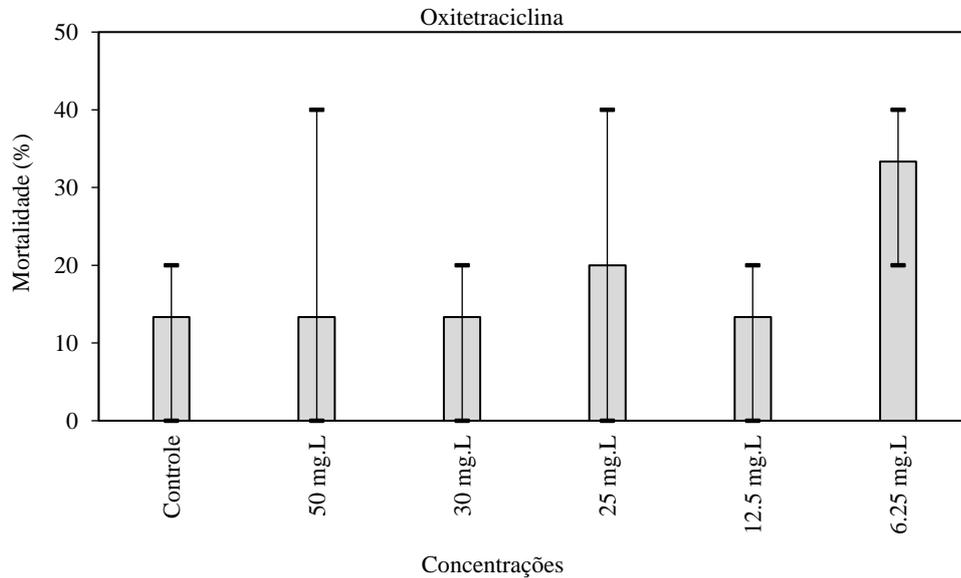


Figura 4 - Percentual da mortalidade de *Daphnia similis* expostos a diferentes concentrações de oxitetraciclina por 48 horas.

Apesar de não ter identificado efeito tóxico agudo em *D. magna*, Wollenberger et al. (2000) registraram um efeito tóxico crônico na reprodução, tendo estimado uma $EC_{50}/48h$ de $46,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Os autores sugerem que testes de reprodução de crustáceos devem ser incluídos em estratégia para o uso de antibióticos. Ainda, enfatizam que, os efeitos de antibióticos em bactérias e microalgas são geralmente entre 2 a 3 ordens de magnitude abaixo dos valores tóxicos para níveis tróficos superiores.

Conclusão

1. O elutriato do sedimento dos tanques escavados na produção de alevinos atua como repositor de compostos tóxicos ao ambiente, sendo capaz de gerar toxicidade a organismos aquáticos.

2. Se disponível no ambiente, o hormônio 17 α -Metiltestosterona possui potencial tóxico para *Daphnia similis*, quando exposto a concentrações superiores a 7,62 $\mu\text{g.L}^{-1}$ por um período de exposição igual o superior a 48 horas.
3. A utilização do antibiótico oxitetraciclina não exibiu toxicidade para *Daphnia similis*, em 48 horas, nas concentrações testadas.

Referencias

Associação Brasileira de normas técnicas – ABNT. **Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea: Cladocera)**. ABNT NBR 12713. 27p. 2016

Bazante-Yamaguishi, R.; Lombardi, J. V.; Mercante, C. T. J.; Caruso, N. P. P.; Moreira, L. E. B.; Pereira, J. S. Análise Ecotoxicológica em Viveiro de Produção de Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Utilizando o Cladóceros *Ceriodaphnia dubia* como Organismo-Teste. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v. 4, n. 1-3, p. 55-64, 2009.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Resolução Conama 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. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Resolução Conama 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, 16 maio 2011. Seção 1, p. 89.

Barroso, R. M.; Andrés, M. P. A Tilápia e o Desenvolvimento do Sertão de Itaparica/ PE - Análise Econômica para Investimentos de Desenvolvimento na Região. Palmas: **Embrapa Pesca e Aquicultura**. 2014. 44p.

ESTEVES, F. A. Fundamentos da limnologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2011. 826 p.

Falone, S. Z. Desenvolvimento de métodos para a determinação do hormônio 17 α -metiltestosterona em amostras de água e de sedimentos de piscicultura: ensaios ecotoxicológicos com cladóceros. São carlos, USP. 2007. 179p. Tese de Doutorado.

Hamilton, M. A.; Russo, R. C.; Thurston, R.V. Trimed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Technology**, v.7, n. 7, p.714-719, jul. 1977.

Instituto Brasileiro de geografia e estatística (IBGE). Produção da pecuária municipal. **Brasil**, 2015. V. 43. p. 39-45.

Kolar, B.; Arnus, L.; Jeretin, Bogdana.; Gutmaher, A.; Drobne, D.; Durjava, M. K. The toxic effect of oxytetracycline and trimethoprim in the aquatic environment. **Chemosphere**, v115, p. 75–80, 2014.

Macedo, C. F.; Sipaúba-Tavares. L. H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Boletim do Instituto da Pesca, São Paulo**.v.36(2). p 149 – 163, 2010.

Muñoz, A. E. P.; Flores R.V.; Rodrigues, A. P. O.; Mataveli, M. Aquicultura : atividade em ascensão Levantamento dos custos de produção da piscicultura no Tocantins. **Boletim Ativos da Aquicultura**, v. 1, p. 1–4, 2015.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SØRENSEN, B.; KUSK, K. O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 40, n. 7, p. 723–730, 2000.

Zaggato, P. A., Bertoletti, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. Rima, São Carlos – SP, 2ª ed. 2008. 486 p.

6. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

A utilização dos recursos naturais pelo homem vem dia a dia causando impactos ambientais cumulativos. A atividade de piscicultura é uma fonte potencial de poluição através da geração de efluentes tóxicos e aumento de nutrientes que gera a eutrofização dos corpos d'água.

Os sedimentos mais finos são mais suscetíveis a reter compostos orgânicos e metais bem como atuam como repositores de nutrientes em determinadas situações, podendo contribuir para o aumento dos nutrientes na água.

A avaliação ecotoxicológica do sedimento da piscicultura em tanque escavado evidenciou toxicidade aguda para o organismo *Daphnia similis* no elutriato e crônica para *Hyalella azteca* no sedimento integral, evidenciando que a atividade de cultivo de alevinos em tanques escavados tem potencial impactante na toxicidade de ambientes aquáticos.

Entre os compostos fármacos, o antibiótico oxitetraciclina não exibiu toxicidade em nenhum dos dois organismos teste. Contudo, o hormônio 17α - metiltestosterona produziu toxicidade para *Daphnia similis* e para *Hyalella azteca*. A presença de efeito crônico em *H. azteca* chama atenção para os riscos a longo prazo pelo acúmulo de substâncias químicas no sedimento e pela falta de regulamentação do seu uso no Brasil.

Os resultados apresentados demonstram que a piscicultura está causando perturbações significativas ao ambiente. De modo que, é essencial um monitoramento constante, a fim de evitar que impactos ambientais na qualidade da água possam representar uma barreira para o crescimento do setor na região.

O aumento na produção de alevinos para suprir a demanda crescente do setor sugere que os impactos relacionados tendem a aumentar e contribuindo para degradação da qualidade da água na região que é utilizada pela comunidade ribeirinha e levada a outras regiões do país através da transposição do rio São Francisco.

Acredita-se que a pesquisa contribuí com subsídios para definição de estratégias de gestão e políticas públicas para as atividades aquícolas em reservatórios, visando reduzir os impactos ambientais. A legislação nacional não aborda as substâncias utilizadas na atividade de piscicultura, nem os parâmetros para testar a toxicidade do sedimento da atividade no país.

Ressalto a importância do trabalho sobretudo por não apresentar estudos ecotoxicológicos para região, com enfoque na atividade de piscicultura e produção de alevinos.

Como estratégia para contribuir com a gestão dos efluentes de piscicultura, recomenda-se os futuros estudos:

- Criação de protocolos para análise da qualidade do sedimento na atividade aquícola;
- Analisar a toxicidade do ambiente utilizando outros organismos testes pertencentes a outros níveis da cadeia trófica;
- Analisar o efeito sinérgico dos compostos fármacos utilizados nas pisciculturas em diferentes organismos teste;
- Formulação de protocolos de ensaios ecotoxicológicos com espécies endêmicas da bacia do rio São Francisco.