



## Redução de volume em ensaio de toxicidade com

## alga *Raphidocelis subcapitata*.



Jeniffer Marins Táparo<sup>1,2\*</sup>, Francine I. Vacchi<sup>1,2</sup>, Gisela A. Umbuzeiro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Limeira, SP

<sup>2</sup> Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG), Limeira, SP

\*jeniffermarinstaparo@gmail.com

### Introdução e objetivo

Ensaio ecotoxicológicos são métodos com organismos aquáticos que auxiliam na detecção, avaliação e limites aceitáveis de substâncias químicas poluentes para a proteção da vida aquática. Conhecer a toxicidade das substâncias químicas no meio hídrico é de suma importância para avaliar o impacto que estas substâncias têm em relação à vida aquática (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006). Atualmente há um número cada vez maior de substâncias químicas sendo produzidas, tornando mais viável a realização de testes de toxicidade com volumes mais reduzidos (BLAISE et al, 2005). Com a preocupação em relação à geração e descarte de resíduos, a redução de volumes em testes, surge como uma opção viável para minimização do problema. As técnicas miniaturizadas de avaliação ecotoxicológica representam a otimização do uso de recursos, corroborando com os conceitos dos 3Rs -(refinement, reduction and replacement), permitindo que um grande número de amostras sejam testadas e pode ser uma boa ferramenta em bateria de testes screening de produtos químicos (SCHECHTMAN, 2002; PAIXÃO ET AL., 2008)

O gênero *Pseudokirchneriella* faz parte da classe Chlorophyceae, a característica das células é possuir simetria externa radial, são células lunadas, e aparecem isoladas ou em grupos, agregadas pela margem convexa, construindo colônias múltiplas, além disso são início da cadeia trófica, qualquer alteração afeta o ecossistema (LEE, 1989). O uso de testes de toxicidade crônica se faz necessário para avaliar os efeitos nocivos aos organismos expostos (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006) .

Em meio a um contexto global em que a preocupação com questões ambientais e sustentáveis só crescem, áreas como a engenharia e a química verde têm papel de extrema importância, pois atuam fortemente

na conscientização da utilização de recursos, diminuição de desperdícios, geração de resíduos, e consequentemente a sua redução (PAVLIC, Z, STJEPANOVIC, B., HORVATIC, J. *et al*, 2006). A redução de volume é uma excelente solução visto que os testes são realizados da mesma forma, mas utilizando um volume menor, gerando economia de tempo, espaço do laboratório, quantidade de amostra e redução no volume gasto (GRINTZALIS *et al*, 2016)

Na mesma vertente a toxicologia verde vem ganhando destaque atualmente por visar uma redução das quantidades de produtos químicos, materiais e descartes gerados durante os testes toxicológicos. Os testes utilizando menor volume de amostra são uma excelente alternativa para economizar recursos, tornando os testes mais sustentáveis e vai ao encontro do princípio da química verde além de englobar aspectos fundamentais dos 3R's. Os 3R's consistem na busca em causar menos impactos no meio ambiente, visando a redução de resíduos, através da redução, reutilização e reciclagem. (PAVLIC, Z, STJEPANOVIC, B., HORVATIC, J. *et al*, 2006)

## Materiais e métodos

O método de ensaio seguindo a norma da ABNT NBR 12648, que consiste em expor as algas *Raphidocelis subcapitata* diversas diluições da amostra, em um período de 72 horas. Os efeitos dos agentes tóxicos serão determinados através da inibição do crescimento exponencial das algas em comparação às amostras de controle. Ainda seguindo a norma, o volume das amostras devem ser de 100 ml para cada erlenmeyer (ABNT, 2018).

As figuras 1 a 4 mostram os recipientes onde os testes foram realizados utilizando os diferentes volumes de 100, 50, 20 e 4 ml.



**Figura 1:** Teste padronizado sendo conduzido



**Figura 2:** Erlenmeyer de 50ml



**Figura 3:** Tubo de 20 mL.



**Figura 4:** Placa de 12 poços.

**Tabela 1.** Condições do teste crônico, de acordo com ABNT NBR 12648/2018.

Requisitos	Espécie
Organismo	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
Tipo de ensaio	Estático: Crônico de 72h
Idade do organismo-teste	Inóculo teste de 72h
Água de cultivo	Meio L. C. Oligo
Água de diluição	Água deionizada estéril
Número mínimo de réplicas por diluição	Três
Concentração de célula por ml	$10^4$ a $10^5$
Diluições	1, 2, 4, 5 e 8 mg/L
Volume das réplica	50 ml, 20ml, 10ml e 4ml.
Temperatura	$25 \pm 2^\circ\text{C}$
Intensidade luminosa	>4500 lux
Efeito observado	Inibição do crescimento.
Substância teste	Cloreto de Sódio (NaCl)
Expressão dos resultados	CI50 e CENO

## Resultados

### Validação dos ensaios

Para a validação dos testes o controle teria que crescer 16 vezes a concentração inicial e não ter um coeficiente de variação maior que 20% entre as réplicas. Nas figuras de 5 a 8 é possível ver as quantidades de vezes que cada réplica cresceu, nos diferentes volumes, todas cresceram mais de 16 vezes, e tiveram uma variação entre as réplicas menor que 20%

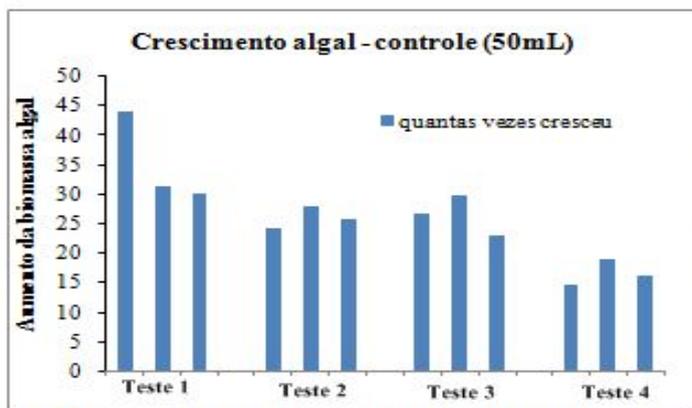


Figura 5: Crescimento algal do controle (viabilidade: 16 vezes) -50ml.

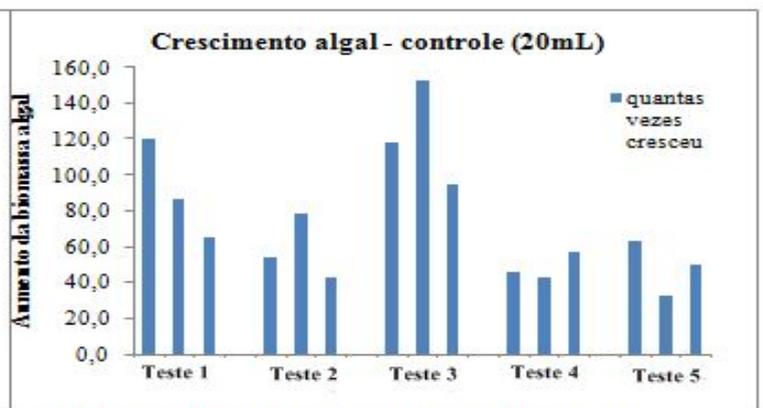


Figura 6: Crescimento algal do controle (viabilidade: 16 vezes) - 20mL.

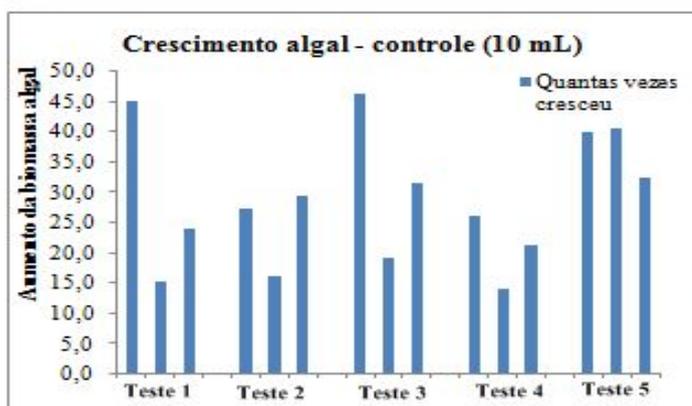


Figura 7. Crescimento algal do controle (viabilidade: 16 vezes) - 10 mL.

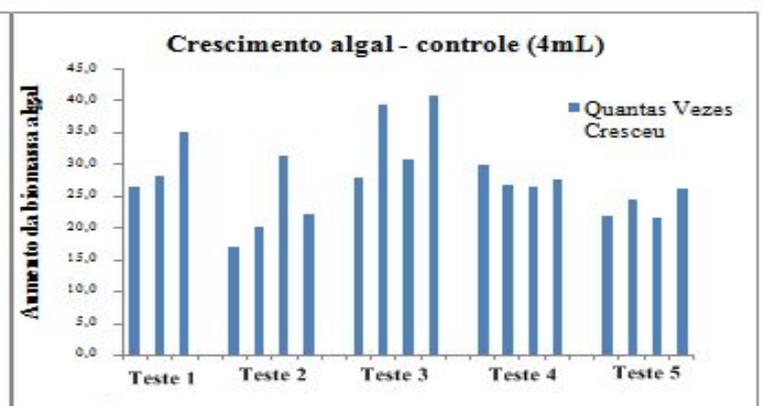


Figura 8. Crescimento algal do controle (viabilidade: 16 vezes) - 4mL.

## Avaliação da Inibição da taxa de crescimento

Para obtenção de resultados confiáveis nos testes, a curva dose resposta deve gerar o CI50 (inibição do crescimento) e o CENO (concentração de efeito não observado).

As figuras 9 á 12 mostram a curva dose resposta no final das 72 horas.

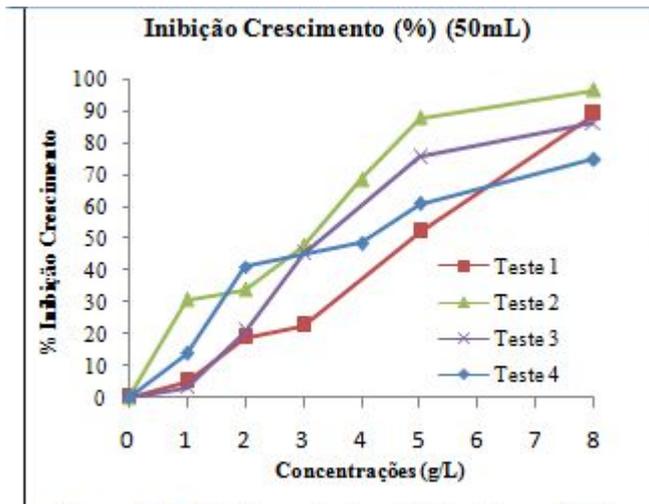


Figura 9.: Inibição do crescimento no final do teste com 50mL.

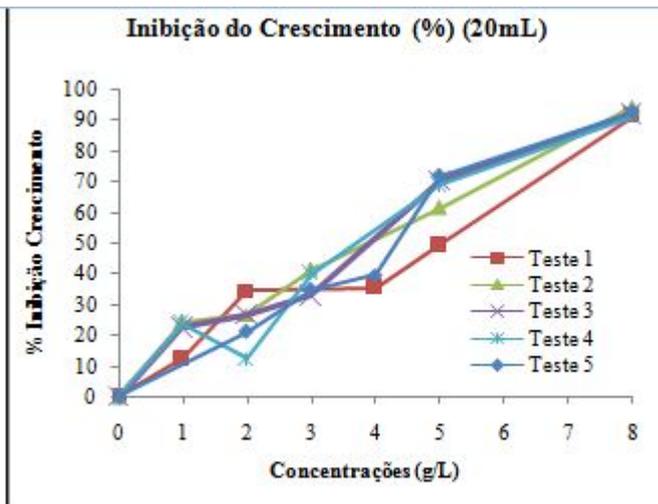


Figura 10: Inibição do crescimento no final do teste com 20mL.

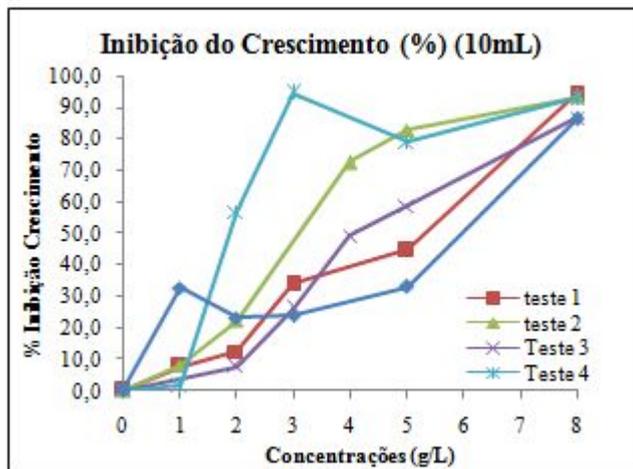


Figura 11: Inibição do crescimento no final do teste com 10mL.

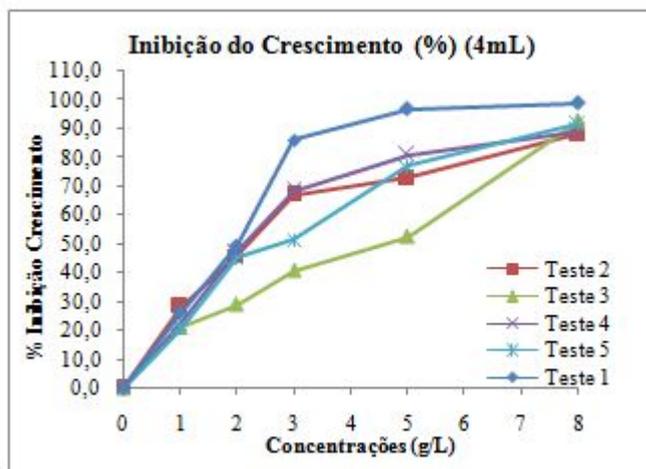


Figura 12: Inibição do crescimento no final do teste com 4mL.

## Discussão e Conclusão

Este estudo apresenta alternativas ao teste crônico convencional realizado com o organismo *Raphidocelis subcapitata*. As técnicas convencionais e a quantidade de amostra serão substituídas por abordagens reduzidas. Os resultados obtidos com diferentes volumes são similares, pois a inibição do crescimento da alga ficou entre 2 e 5 g.L<sup>-1</sup> para todos os volumes testados. De modo geral, pensando na política dos 3R's, conclui-se que a alternativa mais viável seria do teste com o volume de 20 ml, pois no volume de 4 ml, apesar de também ter obtido inibição do crescimento satisfatório, utiliza-se placas de acrílico descartáveis, gerando um maior consumo de plástico, o que não corrobora com os princípios dos 3R's. Porém, em um cenário com

pouca disponibilidade de amostras, os ensaios utilizando o volume de 4 ml pode ser uma alternativa útil, devido a economia de meios e amostras que este método representa.

## Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12648: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica- Método de ensaio com algas (Chlorophyceae), NBR 12648, 2018.

BLAISE, C. & FÉRARD, J.F. Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Vol 1. Toxicity Test Methods. Editora Springer, 2005. 3-345p.

GRINTZALIS, K. DAI, W. PANAGIOTIDIS, K. BELAVGENI, A. VIANT, M.R. Miniaturising acute toxicity and feeding rate measurements in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 39:352-357. 2017. Origin(Pro), Version Number (e.g. "Version 2019b"). OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

PAIXÃO, S.M.; Silva L.; Fernandes, A.; O'Rourke, K.; Mendonça, E.; Picado, A. Performance of miniaturized algal bioassay in phytotoxicity screening. *Ecotoxicology* 17:165- 171, 2008.

PAVLIC, Z, STJEPANOVIC, B., HORVATIC, J. et al. *Bull Environ Contam Toxicol* (2006) 76: 883. <https://doi.org/10.1007/s00128-006-1001-3> (acessado em 24/06/2020).

SCHECHTMAN, L. M. Implementation of the 3Rs (Refinement, Reduction, and Replacement): Validation and Regulatory Acceptance Considerations for Alternative Toxicological Test Methods. European Centre for Validation of Alternative Methods. Rockville, Estados Unidos. 2002.

ZAGATTO, P. A.; Bertoletti E. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Editora RiMa, 464 p.; São Carlos, 2006.