



Miniaturização de teste agudo com microcrustáceo *Daphnia similis*

João Gabriel Mesquita Silva ^{a*}, Francine Inforçato Vacchi ^{a**}, Gisela de Aragão Umbuzeiro ^{a***},
Ádria Caloto de Oliveira ^a, Gabriela Russi de Oliveira ^{a****}

^a Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, Limeira, SP, Brasil

*E-mail (autor): j175934@dac.unicamp.br

**E-mail (coorientadora): francinevacchi@gmail.com

***E-mail (orientadora): giselau@unicamp.br

****E-mail: gabi.russi20@gmail.com

Palavras-chave: *Daphnia similis*; Microplate; Acute test.

1. Introdução

Ensaio ecotoxicológicos com organismos aquáticos auxiliam no estabelecimento de limites permissíveis de substâncias químicas para a proteção da vida aquática e avalia o impacto que os poluentes causam nesta biota (BLAISE et al, 2005).

Testes agudos padronizados de curto prazo são utilizados para avaliar os efeitos severos e rápidos sofridos pelo organismo exposto, em que o critério de avaliação é a imobilidade ou mortalidade (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

A necessidade atual em determinar o efeito adverso de um número cada vez maior de produtos químicos e amostras ambientais complexas, fez com que o desenvolvimento de testes de toxicidade miniaturizados aumentasse (BLAISE et al, 2005). Estes testes são relativamente simples, pois utilizam pouco volume de amostra e são de curta duração, ressaltando sua importância. A miniaturização do teste agudo pode resultar em uma considerável economia de tempo, espaço em laboratório e utilização de quantidades cada vez menores de amostras, e redução na geração de resíduos (GRINTZALIS et al, 2016).

Microcrustáceos são muito utilizados em teste de toxicidade por apresentarem alta sensibilidade a agentes químicos diversos e pelo seu fácil cultivo em laboratório (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006). Diferentes espécies de *Daphnia* são utilizadas para testes agudos, no entanto, a *Daphnia similis* encontrada na maior parte das Américas, representa melhores condições dos recursos hídricos brasileiros (BLAISE et al, 2005), apesar de não ser nativa do Brasil.

O microcrustáceo *Daphnia similis*, também conhecido como pulga - d'água, são filtradores de água doce. São artrópodes, logo, o crescimento ocorre em fases através de ecdises. Sua reprodução é partenogenética, e sua população é constituída apenas por fêmeas (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

Dada a importância dos estudos toxicológicos com organismos aquáticos, há um trabalho na literatura que estudou a miniaturização de testes convencionais já existentes, em que neste foi mostrado que a utilização de microplacas produz resultado equivalentes aos obtidos em método convencional.

Nesse estudo foi utilizado o organismo *Daphnia magna* em microplacas de 24 e 48 poços e a conclusão do trabalho foi que o método em microplacas é viável e mais econômico que o método convencional (Grintzalis et al, 2017).

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo verificar se o método de microplacas pode ser empregado para a espécie *Daphnia similis* utilizando compostos inorgânicos (cloreto de sódio e zinco) e amostras de água superficial sob influência de atividades agrícolas, comparando o método convencional e o miniaturizado.

3. Metodologia

A espécie *D. similis*, organismo-teste deste estudo, é cultivada no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) da UNICAMP desde 2004. As condições de cultivo do organismo são feitas conforme ABNT NBR 12713/2016.

Foram escolhidas duas substâncias inorgânicas: Cloreto de Sódio (NaCl) utilizado como substância de referência em testes de sensibilidade e o Zinco, na forma de sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Também foram avaliadas amostras de corpos de água sob influência de atividades agrícolas.

Em ambos os casos, os testes foram realizados paralelamente, no mesmo dia, tanto convencional (em tubos de ensaio de plástico com capacidade de 15 mL) como em microplacas de 96 poços.

A miniaturização consistiu em realizar testes em microplacas de 96 poços. Em cada poço foi exposto 1 organismo neonato em um volume de 250 μ L por poço mais uma gota contendo o organismo da respectiva concentração. O número de réplicas foi mantido em 20 por concentração em todos os testes em microplacas feitos. É importante ressaltar que, na microplaca o calor excessivo e pouca aeração na água de cultivo (MS) pode ser crítico ao teste.

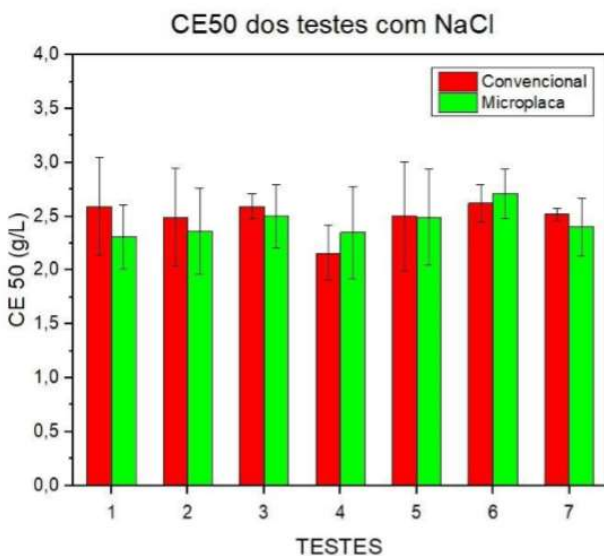
Em ambos os protocolos os testes foram considerados válidos se a porcentagem dos organismos imóveis no controle fosse inferior ou igual a 10%.

Os dados foram analisados regressão logística oferecida pelo software Origin (Pro). O método utilizado para a regressão foi a regressão logística.

4. Resultados e discussões

Para os testes com NaCl, A figura 1 apresenta os valores de CE50 em g/L no eixo y e o número de testes realizados em paralelo no eixo x. No total, foram feitos sete testes em paralelo sendo apresentado em cada o intervalo de confiança de 95%. Todos os CE50 e os intervalos de confiança foram obtidos através do software Origin(Pro).

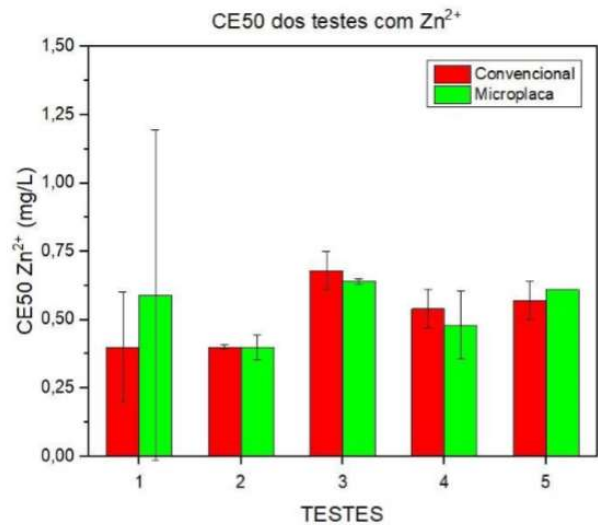
Figura 1. Comparação dos CE50 e intervalo de confiança de 95% dos testes em microplacas e pela metodologia convencional realizados em paralelo para NaCl.



Pode-se notar que os valores de CE50 estão próximos de 2,5 g/L para todos os testes e que não há diferença entre os resultados obtidos nos dois métodos.

Em relação ao Zinco, a figura 2 de barras apresentada a seguir representa os valores de CE50 em mg/L de Zn^{2+} no eixo y e o número de testes realizados em paralelo no eixo x. No total, foram feitos cinco testes em paralelo sendo apresentado em cada um o intervalo de confiança de 95%. Todos os CE50 e os intervalos de confiança foram obtidos através do software Origin (Pro).

Figura 2. Comparação dos CE50 em Zn^{2+} e intervalos de confiança de 95%, obtidos nos testes realizados pelas duas metodologias (miniaturizado e convencional) em paralelo.

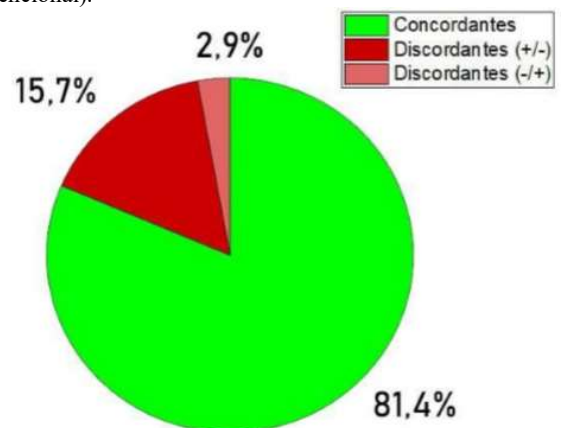


Com exceção do teste 1 que apresentou uma diferença de CE 50, o desvio padrão foi muito grande para o teste em microplaca os demais testes apresentaram resultados similares em relação às metodologias empregadas.

Em relação as amostras ambientais, foram realizados 140 testes em paralelo, sendo 131 amostras e 9 controles negativos. Os resultados dos testes foram expressos em positivos (que apresentaram efeito) ou negativos (que não apresentaram efeito) na imobilidade/mortalidade. Considerou-se positivo acima de 10% de imobilidade/mortalidade. A figura 7 apresenta a porcentagem de concordantes e discordantes dos testes feitos em paralelo com as duas metodologias (microplacas e convencional) para as amostras ambientais avaliadas.

Foi considerado concordante como positivo/positivo ou negativo/negativo são considerados concordantes. Já o par de testes com classificação diferente foi classificado como discordante.

Figura 3. Porcentagem de testes concordantes (verde) e discordantes (+/-) representa positivo para microplaca e negativo para convencional e (-/+) negativo para microplaca e positivo para convencional).

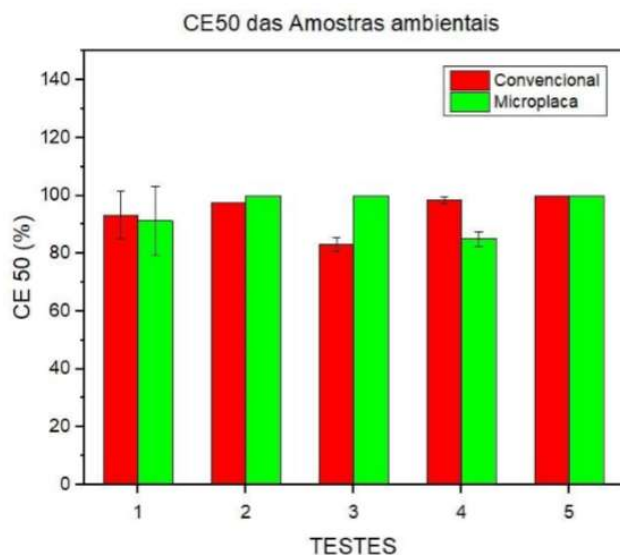


Número de testes feitos em paralelo: 140

Como alguns pontos apresentaram mortalidade de 100%, foram realizados testes em paralelo em concentrações de 6%; 12%; 25%; 50%; 75%; 100% mais o controle.

A figura 4 a apresenta a comparação dos CE50 obtidos expressos em porcentagem.

Figura 4. Valores de CE50 obtidos em experimento de concentração resposta dos testes realizados em paralelo com amostras ambientais que apresentaram 100% de mortalidade nos testes com concentração única.



5. Conclusão

Neste estudo foi apresentada uma alternativa ao teste agudo convencional realizado com o organismo *Daphnia similis*. Nosso estudo concorda com os resultados obtidos por Grintzalis et al, onde os autores mostraram que testes com *Daphnia magna* usando microplacas não apresentam diferenças significativas quando comparados com os métodos já existentes. Os autores testaram dois diferentes metais Cádmio e Níquel e um composto orgânico (Formamida). O nosso trabalho ampliou o escopo de substâncias testadas, reforçando a viabilidade do método miniaturizado. Mais estudos serão necessários utilizando outras substâncias orgânicas para verificar o comportamento dos dois métodos.

Este trabalho trouxe também dados sobre testes com amostras de água reais, coletadas em poças em fazendas experimentais. Observou-se que menos de 20% das amostras testadas apresentaram resultados discordantes. Desses 20%, houve mais negativos para microplacas quando comparada com o positivo do método convencional (15.7%) (Figura 3).

Estudos ainda devem ser realizados para entender a causa desta variação. Porém os CE50 dos testes que apresentaram toxicidade acima de 100% foram realizados em concentração-resposta não houve diferenças entre os dois métodos.

Como conclusão geral, devido a economia de meios e insumos e de volume de amostra a ser coletada o teste miniaturizado pode ser uma alternativa muito útil, em estudos onde há pouca disponibilidade de amostra ou grande quantidade de amostras a serem testadas, por exemplo, em estudos de monitoramento.

Agradecimentos

Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG) - Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referencias

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera) 2016.

BAUMANN J, SAKKA Y, BERTRAND C, KÖSER J, FILSER J. Adaptation of the *Daphnia* sp. acute toxicity test: miniaturization and prolongation for the testing of nanomaterials. *Environ Sci Pollut Res Int.* 21(3):2201-2213. 2014.

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.

POWELL RL, MOSER EM, KIMERLE RA, MCKENZIE DE, MCKEE M. Use of a miniaturized test system for determining acute toxicity of toxicity identification evaluation fractions. *Ecotoxicol Environ Saf.* 35(1):1-6. 1996.

ZAGATTO, P.A & BERTOLETTI, E. (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. São Carlos. Editora RiMa, 2006. 3-167p.