

Miniaturização de teste agudo com microcrustáceo *Daphnia similis* para substâncias orgânicas

Palavras-Chave: ecotoxicidade, corante, poluição aquática

Autoras:

Gabriela Russi de Oliveira | Faculdade de Tecnologia, UNICAMP
Profª Drª Gisela A. Umbuzeiro (orientadora) | Faculdade de Tecnologia, UNICAMP

1. Introdução

Os ensaios ecotoxicológicos são fundamentais para a avaliação do perigo de substâncias químicas bem como para o monitoramento ambiental (MAGALHÃES, FILHO, 2008). Atualmente há uma tendência de reduzir os insumos usados em laboratórios, bem como a quantidade de descartes sólidos e líquidos gerados nos testes com organismos aquáticos, contribuindo assim com a engenharia verde e a química verde, e instituindo-se a toxicologia verde (CRAWFORD ET AL, 2017). Além disso, a quantidade de substância-teste é sempre um fator limitante, como por exemplo na avaliação de compostos que ainda estão em desenvolvimento ou amostras ambientais. Para a redução de insumos utilizados em laboratório é necessário incentivar a criação de novos métodos e técnicas (CRAWFORD ET AL, 2017).

No Brasil, uma espécie comumente utilizada nos ensaios de toxicidade é a *Daphnia similis* (Figura 1) pois é mais representativa de águas com baixa dureza, diferente de *D. magna* que vive em águas mais duras (RODGHER ET AL, 2010). Já foi demonstrado que para efluentes industriais e substâncias químicas, as sensibilidades dessas duas espécies são similares (BURATINI ET AL, 2004). BAUMAN ET AL (2013) e GRINZALIS ET AL (2017) estudaram a miniaturização do teste com o *D. magna*. Porém, não há registros na literatura de miniaturização de teste para *D. similis*.

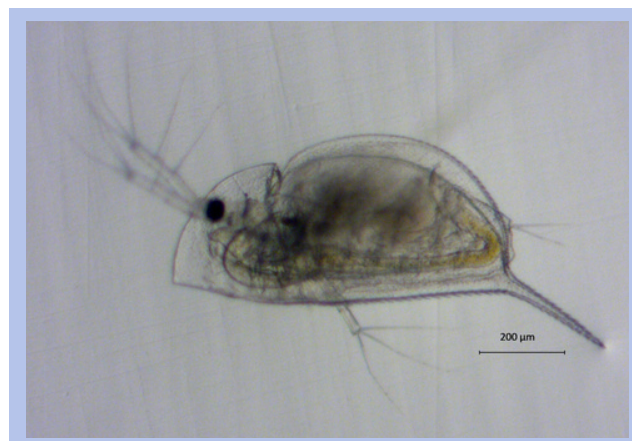


Figura 1. Fotografia de um organismo adulto da espécie *Daphnia similis*

Em 2018 foi realizado um projeto para padronização de testes miniaturizados com *D. similis* por alunos do Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade (LAEG). As condições avaliadas foram 10 mL de solução teste, em tubos de plástico com capacidade de 15 mL, contendo 5 neonatas (protocolo tradicional), e em microplacas de 96 poços contendo 200 μ L e uma neonata por poço (protocolo miniaturizado). As condições como tempo de incubação (48h), fotoperíodo (16h luz: 8h escuro), temperatura (21°C), quantidade de organismos por concentração (20 organismos) foram as mesmas empregadas em ambos os métodos (dados obtidos no LAEG no projeto de Iniciação Científica de João Gabriel Mesquita Silva em 2018). Os testes foram realizados com substâncias inorgânicas, o sulfato de zinco e cloreto de sódio.

Com o objetivo de ampliar os tipos de substâncias avaliadas, foi testado o corante têxtil C.I. Disperse Red 13 nas duas condições (tradicional e miniaturizado) e em testes preliminares observou-se uma redução da toxicidade com o uso das microplacas. Uma possibilidade seria de que o corante, que apresenta um log Kow de 5,22 (PUBCHEM, 2020) e solubilidade em água de 0,012 mg/L (USEPA, 2021), poderia ser adsorvido pela superfície do material plástico e em maior proporção na microplaca devido a maior relação superfície/volume dos poços em comparação ao tubo.

Desta forma, o objetivo deste projeto foi comparar os resultados dos testes de toxicidade aguda do corante C.I. Disperse Red 13 para *D. similis* utilizando os protocolos tradicional e miniaturizado, em duas condições de exposição, com e sem condicionamento dos materiais (tubos e microplacas).

2. Materiais e Métodos

O corante C.I. Disperse Red 13, (CAS 3180-81-2), pureza > 99,75%, foi obtido e purificado pela Prof. Dr. Gisela de Aragão Umbuzeiro por meio da coluna cromatográfica em seu projeto de pós-doutoramento (UMBUZEIRO ET AL, 2017). A solução estoque do corante foi preparada em solvente DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, \geq 99,5%), devido a solubilidade em água <10 mg/L. As soluções de exposição foram diluídas em meio sintético (MS). A concentração máxima de DMSO nos testes foi de 0,01%.

Para a condição de condicionamento, tubos e microplacas foram pré-expostas, por 48 horas, com as soluções das concentrações de teste do corante, para limitar as perdas por adsorção durante o ensaio. Após 48 horas, as soluções foram descartadas (OECD, 2019). Os testes de toxicidade aguda com *D. similis* foram então conduzidos com os materiais condicionados.

O teste agudo tradicional com *Daphnia similis* foi realizado de acordo com a ABNT NBR 12713/2016. No teste, tubos contendo 10 mL de solução de exposição, são expostos cinco organismos com idade < 24 horas. São utilizadas 4 réplicas por concentração totalizando 20 organismos.

O teste agudo miniaturizado foi realizado em microplacas de 96 poços. Em cada poço 270 μL da solução de exposição e uma neonata foram adicionados, no total 20 organismos para cada concentração foram utilizados. Para os dois protocolos foram conduzidos os controles negativo e de solvente (0,01%).

Os testes foram mantidos por 48 horas em incubadora com temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas escuro. Após 48 horas, a imobilidade dos organismos foi observada e comparada ao controle. Os resultados são analisados de forma a calcular a CE50 (Concentração de efeito 50%). O teste é validado quando a imobilidade nos controles for \leq a 10%. Para cada condição de exposição, tubo e microplacas com e sem condicionamento, foram realizados três testes independentes, com seis concentrações e dois controles (negativo e solvente). Os testes para cada experimento independente foram realizados em paralelo (3 testes para cada substância nas quatro condições experimentais). Para a análise dos dados foi utilizado o modelo glm (do inglês generalized linear models) no software Rstudio (R CORE TEAM, 2020). As curvas de concentração – respostas, estimativa das CE50 (intervalo de confiança a 95%) foram obtidas por regressão logística.

3. Resultados e Discussões

Não foram observadas diferenças significativas entre os testes com e sem pré-exposição (condicionamento). Com esses resultados observou-se que a hipótese de que haveria uma possível adsorção do corante na parede dos tubos e de forma mais intensa pela microplaca não se confirmou. Também foi possível observar que não houve diferença significativa entre os protocolos (tubo e microplaca). Nossos resultados foram, portanto, similares aos obtidos por BAUMAN ET AL (2013) e GRINZALIS ET AL (2017) nos seus trabalhos de miniaturização com *Daphnia magna*. O coeficiente de variação de cada uma foi estimado para os testes com tubos e microplacas. Os coeficientes de variação para os testes com microplaca foram menores quando comparados ao tubo. O teste utilizando microplaca se mostra promissor pela similaridade de respostas com o teste tradicional, redução de material e amostras requeridas para ensaio.

4. Conclusões

A miniaturização do teste agudo proposta para *Daphnia similis* parece ser adequada inclusive para compostos orgânicos com altos valores de log de Kow. Mais testes com outras substâncias orgânicas poderiam complementar os resultados obtidos.

Agradecimentos

Agradeço ao PIBIC, pela bolsa de pesquisa, a Anjaina F. de Albuquerque e a Ádria C. de Oliveira pela orientação e à equipe do LAEG, por todos os ensinamentos e apoio.

Referências

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

BURATINI S.V., BERTOLETTI E., ZAGATTO P.A. **Evaluation of *Daphnia similis* as a Test Species in Ecotoxicological Assays.** Environmental Contamination and Toxicology. 2004. doi:10.1007/s00128-004-0508-8.

BAUMANN, Jonas; SAKKA, Yvonne; BERTRAND, Carole; KÖSER, Jan; FILSER, Juliane. **Adaptation of the *Daphnia sp.* acute toxicity test: miniaturization and prolongation for the testing of nanomaterials.** Environmental Science And Pollution Research, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 2201-2213, 17 set. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-013-2094-y>.

CRAWFORD S.E., HARTUNG T., HOLLERT H., MATHES B., RAVENZWAAY B.V., HARTMANN T.S., STUDER C., KRUG H. F. **Green Toxicology: a strategy for sustainable chemical and material development.** 2017. **Environmental Sciences Europe.** <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12302-017-0115-z>.

GRINTZALIS, Konstantinos; DAI, Wenkui; PANAGIOTIDIS, Konstantinos; BELAVGENI, Alexia; VIANT, Mark R.. **Miniaturising acute toxicity and feeding rate measurements in *Daphnia magna*.** Ecotoxicology And Environmental Safety, [S.L.], v. 139, p. 352-357, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.002>.

MAGALHÃES D.P., FILHO A.S.F. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.** Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/27395/2/danielemagalhaes_aloyioferrao_IOC_2008.pdf. Acesso em 09/04/2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PUBCHEM DATABASE. **2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, CID=1486.** Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dichlorophenoxyacetic-acid. Acesso em: 11/04/2020.

OECD. **Guidance Document On Aqueous-phase Aquatic Toxicity Testing Of Difficult Test Chemicals.** 2019. Disponível em: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2000\)6/REV1&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2000)6/REV1&doclanguage=en). Acesso em :15/04/2020.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 19/03/2020.

RODGER S., ESPÍNDOLA E.L.G, LOMBARDI A.T. **Suitability of *Daphnia similis* as an alternative organism in ecotoxicological tests: implications for metal toxicity.** 2010. doi 10.1007/s10646-010-0484-1

UMBUZEIRO, Gisela A.; SZYMCZYK, Malgorzata; LI, Min; CHEN, Yufei; VENDEMIATTI, Josiane A. S.; ALBUQUERQUE, Anjaina F. de; SANTOS, Amanda dos; MASELLI, Bianca de S.; KUMMROW, Fábio; VINUEZA, Nelson R.. **Purification and characterization of three commercial phenylazoaniline disperse dyes.** *Coloration Technology*, [S.L.], v. 133, n. 6, p. 513-518, 2 out. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cote.12307>.

U.S. Environmental Protection Agency. CompTox Chemicals Dashboard. **Ethanol, 2-((4-((2-chloro-4-nitrophenyl)azo)phenyl)ethylamino).** Disponível em: <https://comptox.epa.gov/dashboard/DTXSID5038915>. Acesso em: 24/08/2021.