

Uso da técnica de dosagem passiva para avaliar a toxicidade aguda de corantes dispersos hidrofóbicos em *Daphnia similis*

Palavras chave: Ecotoxicologia, Dosagem passiva, *Daphnia similis*

Marcella Cavalcanti Seraphim*, Gisela A. Umbuzeiro ◦, Rhaul Oliveira ▪
marcellacseraphim@gmail.com *, giselau@ft.unicamp.br ◦, rhaul.oliveira@gmail.com ▪

Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade - LAEG

Faculdade de Tecnologia, UNICAMP, Rua Paschoal Marmo, 1888, 13484-332 Limeira, SP, Brasil

1. Introdução

Compostos Orgânicos Hidrofóbicos (HOCs) são substâncias presentes em diversos produtos do nosso cotidiano, como cosméticos e emulsificantes, e devido a isso podem ser encontrados como poluentes em corpos hídricos, com destaque para os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). Essas substâncias possuem potencial carcinogênico, mutagênico e tóxico, além da capacidade de bioacumulação e por isso representam uma ameaça para organismos aquáticos de todos níveis tróficos e para seres humanos, por ingestão de alimentos. Como principais características, esses compostos apresentam baixa solubilidade em água, alto coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e hidrofobia (Wang et al., 2017), conferindo alto potencial de adsorção em superfície e, portanto, é um desafio a estabilidade de suas concentrações para testes de toxicidade.

Neste contexto, surge a técnica de dosagem passiva, que consiste no carregamento de um polímero biologicamente inerte com a substância a ser testada, que é adicionado ao sistema de teste e aplicado para controlar a exposição do composto por partição de equilíbrio contínuo (Stibany et al., 2020).

Desse modo, a proposta inicial da pesquisa era utilizar a técnica de dosagem passiva para avaliar a toxicidade de corantes dispersos utilizando *Daphnia similis* como organismo modelo, porém, devido à pandemia de COVID-19 e às medidas de isolamento social adotadas pela UNICAMP, os testes não puderam ser realizados e o projeto passou por adaptações, assumindo como metodologia a revisão bibliográfica de artigos sobre a técnica de dosagem passiva utilizando organismos aquáticos como modelo.



Figura 1: Representação das etapas da técnica de dosagem passiva. Adaptado de Stibany et al. (2020).

2. Metodologia

A metodologia utilizada foi a de revisão bibliográfica de artigos encontrados na base de dados ISI WEB of Knowledge por meio das palavras-chaves *passive dosing*, *ecotoxicology*, *toxicology* e *daphnia* e com os seguintes critérios para inclusão: (1) uso de organismos aquáticos como modelo experimental e (2) realização de teste de dosagem passiva. Assim, os artigos selecionados foram revisados e tiveram suas informações organizadas por meio das categorias: material utilizado no teste, etapa de curagem da fase sólida, limpeza da fase sólida, carregamento da fase sólida, organismos modelos utilizados, químicos testados, tempo de teste (exposição), principal resultado e principais conclusões.

3. Resultados e Discussão

Portanto, foram estudados 10 artigos publicados entre os anos de 2010 a 2020, todos abordando a técnica de dosagem passiva para testes de ecotoxicidade com organismos aquáticos de água doce. Os organismos mais recorrentes nos estudos foram: (i) *Daphnia magna*; (ii) *Danio rerio* adulto e embriões; (iii) Algas verdes, das espécies *Raphidocelis subcapitata* e *Desmodesmus subspicatus*. Para aplicação da metodologia de dosagem passiva, a maior parte dos artigos utilizou como fase sólida na manutenção do equilíbrio do sistema anéis de polidimetilsiloxano (PDMS), que deve estar combinado com seu catalisador correspondente para uso no experimento.

Para remoção das impurezas presentes no material da fase sólida, o químico utilizado com maior frequência é o metanol e em segundo lugar o etanol. Depois, o material é enxaguado com água MilliQ e seco em papel sem fiapos, com algumas variações durante estes procedimentos.

Na etapa de carregamento, o solvente mais utilizado na diluição das amostras da solução teste é o metanol.

Na Tabela 1, segue uma breve descrição dos artigos pesquisados.

Tabela 1: Descrição dos artigos pesquisados.

Artigo	Breve descrição
Improving the reliability of aquatic toxicity testing of hydrophobic chemicals via equilibrium passive dosing - A multiple trophic level case study on bromochlorophene (Stitibany et al., 2017)	Teste de toxicidade da substância Bromoclorofeno (BCP > 95%) nos organismos modelo Alga verde <i>Desmodesmus subspicatus</i> , <i>Daphnia magna</i> e embriões de <i>Danio rerio</i> , com comparação da metodologia de dosagem passiva com as concentrações de efeito correspondentes derivadas de configurações de co-solvente padrão. O formato de dosagem passiva levou a valores de EC50 na faixa mais baixa para todos organismos testados.
Toxicity of dodecylbenzene to algae, crustacean, and fish - Passive dosing of highly hydrophobic liquids at the solubility limit (Stibany et al., 2020)	Testes de toxicidade da substância Dodecilbenzeno (DDB 99,8%) nos organismos modelo <i>Daphnia magna</i> , embriões de <i>Danio rerio</i> e algas <i>Raphidocelis subcapitata</i> utilizando o método de dosagem passiva. O DDB exerce toxicidade aquática no limite de solubilidade. Esta concentração limite está acima das concentrações ambientais esperadas e o risco ambiental pode, portanto, ser menor.
Comparing passive dosing and solvent spiking methods to determine the acute toxic effect of pentachlorophenol on <i>Daphnia magna</i> (Kwon et al., 2020)	Testes de toxicidade aguda em <i>Daphnia magna</i> com a substância Pentaclorofenol (PCP > 99,9%) com aplicação da técnica de dosagem passiva e método de adição de solvente. Os resultados mostraram que a dosagem passiva é recomendada para estudos com espécies mais sensíveis e estudos de maior duração.
Quantifying nanoplastic-bound chemicals accumulated in <i>Daphnia magna</i> with a passive dosing method (Jiang et al., 2018)	Testes de toxicidade em <i>Daphnia magna</i> com nanoplasticos e bifenilos policlorados (PCBs) usando a técnica de dosagem passiva. Os principais resultados mostram que nanoplasticos possuem capacidade de absorver grandes quantidades de químicos, porém a capacidade ambiental de absorver detritos plásticos é menor.

Tabela 1: Descrição dos artigos pesquisados.

Controlling and maintaining exposure of hydrophobic organic compounds in aquatic toxicity tests by passive dosing (Smith et al., 2010)	Testes de toxicidade em <i>Daphnia magna</i> usando o método de dosagem passiva com as substâncias: Naftaleno (99%), acenafteno (99%), fluoreno (99%), fenantreno (99,5%), antraceno (99%), fluoranteno (99%), pireno (>99%) e benz(a) antraceno (99%). criseno (99%), benzo(a) pireno (98%) e dibenzo(a, h) antraceno (97%). Os resultados mostraram que dosagem passiva é um meio prático e econômico de melhorar a exposição de HOCs em toxicidade aquática ou testes de bioconcentração.
Relationship between metabolic enzyme activities and bioaccumulation kinetics of PAHs in zebrafish (<i>Danio rerio</i>) (Wang et al., 2017)	Testes de toxicidade em <i>Danio rerio</i> com os PAHs fenantreno e antraceno usando o método de dosagem passiva, que demonstrou uma relação interativa entre o comportamento de bioacumulação de PAHs e atividades de enzimas metabólicas de organismos aquáticos.
Partitioning of Chlorinated Paraffins (CPs) to <i>Daphnia magna</i> Overlaps between Restricted and in-Use Categories (Castro et al., 2018)	Testes de toxicidade de parafinas cloradas (CPs) de três diferentes categorias em <i>Daphnia magna</i> com o uso do método de dosagem passiva, o que resultou em um questionamento em relação a legislação vigente sobre as restrições para cada categoria.
Importance of suspended sediment (SPS) composition and grain size in the bioavailability of SPS-associated pyrene to <i>Daphnia magna</i> (Xia et al., 2016)	Testes de toxicidade em <i>Daphnia magna</i> com pireno associado aos seguintes sedimentos suspensos (SPS): carbono orgânico amorfo (AOC), carvão (BC) e minerais de SPS de diferentes dimensões. Os resultados sugerem que a composição e as dimensões dos grãos de SPS devem ser considerados para a estimativa precisa da toxicidade de HOC e o estabelecimento de critérios de qualidade de água para HOCs em águas naturais.
Baseline Toxic Mixtures of Non-Toxic Chemicals: “Solubility Addition” Increases Exposure for Solid Hydrophobic Chemicals (Smith et al., 2013)	Testes de toxicidade em <i>Daphnia magna</i> com as substâncias antraceno (99%), pireno (>99%), benzo(a)antraceno (99%), criseno (99%) e benzo(a)pireno (99%) utilizando o método de dosagem passiva, com a conclusão de que pesquisas deveriam ser feitas focando na toxicidade de substâncias combinadas, uma vez que produtos químicos aparentemente não tóxicos podem se tornar tóxico em uma mistura.
Quantifying Bioavailability of Pyrene Associated with Dissolved Organic Matter of Various Molecular Weights to <i>Daphnia magna</i> (Lin et al., 2018)	Testes de toxicidade do composto pireno em <i>Daphnia magna</i> utilizando a técnica de dosagem passiva, apresentando com principal conclusão que a biodisponibilidade de HOCs associados a matéria orgânica dissolvida deve ser levada em consideração para a avaliação de risco ecoambiental de HOCs em sistemas de água.

4. Considerações finais

Deste modo, a dosagem passiva apresenta resultados mais confiáveis em comparação aos métodos tradicionais para estudos de toxicidade de Compostos Orgânicos Hidrofóbicos, além de ser economicamente viável, prático e replicável. Ainda, o presente projeto pode servir como orientação para futuras pesquisas no Laboratório de Ecotoxicologia e Genotoxicidade da Unicamp/FT por apresentar uma base sólida de artigos que podem ser usados como referência e reunir as principais informações das etapas da dosagem passiva.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPQ pelo incentivo à pesquisa, ao Prof. Rhaul e Profa. Gisela por todo apoio e orientação e toda equipe do LAEG pela colaboração e ensinamentos.

Referências

- BOOIJ, P. et al. Development of a polydimethylsiloxane film-based passive dosing method in the in vitro DR-CALUX® assay. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 30, n. 4, p. 898-904, 2011.
- CASTRO, Mafalda et al. Partitioning of chlorinated paraffins (CPs) to *Daphnia magna* overlaps between restricted and in-use categories. *Environmental science & technology*, v. 52, n. 17, p. 9713-9721, 2018.
- JIANG, Ruifen et al. Quantifying nanoplastic-bound chemicals accumulated in *Daphnia magna* with a passive dosing method. *Environmental Science: Nano*, v. 5, n. 3, p. 776-781, 2018.
- KWON, Hyun-ah et al. Comparing passive dosing and solvent spiking methods to determine the acute toxic effect of pentachlorophenol on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, v. 29, n. 3, p. 286-294, 2020.
- LIN, Hui et al. Quantifying bioavailability of pyrene associated with dissolved organic matter of various molecular weights to *Daphnia magna*. *Environmental science & technology*, v. 52, n. 2, p. 644-653, 2018.
- SMITH, Kilian EC et al. Baseline toxic mixtures of non-toxic chemicals: “solubility addition” increases exposure for solid hydrophobic chemicals. *Environmental science & technology*, v. 47, n. 4, p. 2026-2033, 2013.
- SMITH, Kilian EC et al. Controlling and maintaining exposure of hydrophobic organic compounds in aquatic toxicity tests by passive dosing. *Aquatic Toxicology*, v. 98, n. 1, p. 15-24, 2010.
- STIBANY, F. et al. Improving the reliability of aquatic toxicity testing of hydrophobic chemicals via equilibrium passive dosing – A multiple trophic level case study on bromochlorophene. *Science of the Total Environment*, v. 584-585, p. 96-104, 2017.
- STIBANY, Felix et al. Toxicity of dodecylbenzene to algae, crustacean, and fish—Passive dosing of highly hydrophobic liquids at the solubility limit. *Chemosphere*, v. 251, p. 126396, 2020.
- XIA, Xinghui et al. Importance of suspended sediment (SPS) composition and grain size in the bioavailability of SPS-associated pyrene to *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, v. 214, p. 440-448, 2016.
- WANG, Haotian et al. Relationship between metabolic enzyme activities and bioaccumulation kinetics of PAHs in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Environmental Sciences*, v. 65, p. 43-52, 2018.
- ZWARG, J. R. R. M. Implementação da técnica de dosagem passiva em estudos de ecotoxicidade. 2018. Universidade Estadual de Campinas, Limeira, 2018.