



# APLICAÇÃO DE TESTES ECOTOXICOLÓGICOS COM MICROCRUSTÁCEOS NO LABORATÓRIO DE MONITORAMENTO DAS ÁGUAS DO RIO PARAÍBA DO SUL

Lisiane Barreto Coitinho, Hingrid Ximenes Silva, Kassila Tavares da Silva,  
Kissila Gomes Barreto, Manildo Marcião de Oliveira

Unidade de Pesquisa e Extensão Agro-Ambiental – UPEA Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense – IFF *Campus* Campos Centro; manildomo@ig.com.br

## INTRODUÇÃO

O impacto ambiental segundo a Legislação Brasileira é “*qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente afetam: I- a saúde, a segurança e o bem-estar da população; II- as atividades sociais e econômicas; III- a biota; IV- as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente; e V- a qualidade dos recursos ambientais*” segundo a Resolução CONAMA 001 de 23/01/1986 (RANZANI-PAIVA et al., 2004).

As substâncias quando são despejadas no ambiente aquático sofrem inúmeros processos de transformação, os principais são a hidrólise, a fotólise, a complexação e a biodegradação. Esses processos são importantes porque determinam a persistência dos contaminantes no ambiente (COSTA et al., 2008). Quando estes compostos persistem no ambiente acabam sendo absorvidos pela biota, que sofrerá os efeitos adversos provocados pela acumulação destes compostos em células e tecidos. Dentre os efeitos bioquímicos e fisiológicos provocados pelos agentes tóxicos podem-se observar: interferência na produção de ATP; modificações na permeabilidade das membranas celulares; inibição competitiva reversível ou irreversível de enzimas; distúrbios no metabolismo de lipídios, podendo resultar em alterações hepáticas; alterações nos sistemas enzimáticos microsossomais, os quais são responsáveis pela biotransformação de xenobiontes; alteração na estrutura ou na atividade de enzimas que participam de processos reguladores, comprometendo a síntese e liberação de hormônios, bem como reduzindo a velocidade de crescimento dos organismos; distúrbios no metabolismo de carboidratos e distúrbios no processo respiratório pela inibição do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa (CONNELL & MILLER, 1984).

O conceito de Ecotoxicologia foi proposto por Blaise em 1984, que significa a junção da ecologia com a toxicologia e, portanto estuda os efeitos dos poluentes aos organismos e como esses interagem em seus habitats. Esta é uma ciência multidisciplinar, que se faz necessária à compreensão da Biologia, Ecologia, Química, Bioquímica, Fisiologia, Estatística, Oceanografia, Limnologia, Toxicologia, etc. Tendo como base as análises estatísticas para a comprovação dos dados em diferentes condições ambientais (RAND, 1995).

*Artemia* sp é um microcrustáceo de ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em lagos de água salgada e salina de todo o mundo.



Por ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos, seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquicultura. Além disso, os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos, se mantidos desidratados, de preferência em vácuo, e a baixas temperaturas (IPIMAR). Quando reidratados, os ovos de *Artemia* sp eclodem em cerca de horas, se em condições ambientais adequadas. Este ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso em testes de toxicidade aguda e crônica.

Vários testes de toxicidade são padronizados nacionalmente pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e aplicados para avaliar a qualidade das águas, a toxicidade relativa de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos, dentre outros.

O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia* sp é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer uma pequena quantidade de amostra. A simplicidade desse teste que não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, favorece sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório.

Já que as análises químicas não são capazes de determinar quais substâncias e em que concentração afetam os sistemas biológicos, não são suficientes para avaliar o risco ambiental dos contaminantes. No entanto, os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais. Por isso as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre a biota. (COSTA et al., 2008).

O lauril sulfato de sódio (dodecil sulfato de sódio) é um surfactante aniônico usado em produtos de uso profissional e doméstico, tanto em escala industrial quanto de produção artesanal, em cosméticos e produtos para a higiene. Sua aplicação também é conhecida em estudos bioquímicos e toxicológicos (DYER et al., 1997). Os objetivos do estudo são: - elaborar a carta controle, ou seja, testes ecotoxicológicos entre o organismo teste (*Artemia salina*) e um composto de referência (lauril sulfato de sódio); - comparar a toxicidade de organofosforados utilizados em aquicultura.

## **METODOLOGIA**

### **- Análises físico-químicas**

Os ensaios Físico-Químicos realizados são os de pH, Turbidez, Dureza Total e Condutividade, todos de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st edition, 2005, publicação mundial de referência para análise de águas.

### **- Bioensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina***

Foi utilizada a metodologia descrita por Meyer et al. (1982) com algumas modificações. Os cistos de *Artemia* sp foram colocados em Becker sob condições ambientais adequadas, tais como: aeração constante, temperatura, iluminação.

### **- Preparação das diluições seriadas**

Foram realizadas diluições seriadas da solução de lauril sulfato de sódio de acordo com cálculos de modo a possibilitar a obtenção das concentrações finais. 9,



12, 16, 21, 27 e 35ppm. Foram preparados tubos controle contendo **somente água do mar artificial**.

#### - Exposição

Os organismos-testes (náuplios de *Artemia*) foram expostos à solução de **lauril sulfato de sódio** por 24 horas, utilizando tubos de ensaio, cada um contendo 10 náuplios de *Artemia*, previamente selecionados. Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração do composto.

Os controles foram utilizados também para ter certeza que a mortalidade observada nos náuplios de *Artemia* foi resultante da toxicidade aos compostos e não devido à falta de alimentação.

#### - Contagem das larvas

Após 24 h de exposição, foi feita a contagem (de náuplios vivos e mortos, sendo considerados vivos todos aqueles que apresentassem qualquer tipo de movimento quando observados).

#### - Análise estatística dos resultados

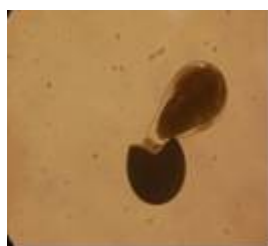
O cálculo de concentração letal média (CL50) foi utilizado a 50% de uma população de organismo-teste, utilizando o método de Trimemed Spearman- Karber (HAMILTON et al., 1977).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os procedimentos de hidratação, desencapsulação e eclosão foram realizados adequadamente e adaptados para o período de 48 h e uso de 700 mg de cistos por experimento (Figura 1).



Cistos eclodidos



Cisto eclodido e saído do náuplio



Náuplio de *Artemia salina*

**Figura 1** – Etapas da desencapsulação e eclosão dos cistos da *Artemia salina* (aumento de 400X).

As análises físico-químicas são relevantes, pois garantem verificação da qualidade da água de diluição usada no teste. Os resultados obtidos com o composto de referência foram semelhantes a outro estudo (ARAÚJO; NASCIMENTO, 1999 apud RESGALLA; LAITANO).

**Tabela 1** - Análise físico-química da água do mar artificial

Teste	pH	Turbidez	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na+	K+	Condutividade	T (°C)
1°	8,65	4,12	0,02ppm	-	36500ppm	2ppm	-	20°C
2°	8,02	3,99	-	-	-	-	3,18mS	21,8°C



**Tabela 2** – Número de náuplios vivos com concentrações de Lauril Sulfato de Sódio

		Experimento 1					
	Controle	35	27	21	16	12	9
Tubo 1	10	01	08	10	10	07	09
Tubo 2	09	08	06	07	09	08	07
Tubo 3	08	01	09	07	09	10	09

**Tabela 3** – Número de náuplios vivos com concentrações de Lauril Sulfato de Sódio

		Experimento 2					
	Controle	35	27	21	16	12	9
Tubo 1	09	04	08	07	07	09	08
Tubo 2	10	05	08	05	10	09	08
Tubo 3	08	04	07	07	08	07	09

**Tabela 4** – Resultado de CL50 nos dois experimentos

Reagente	Experimento 1	Experimento 2	Média ± DP (CV%)
Lauril sulfato de sódio (mg.L <sup>-1</sup> )	32,64	34,44	33,54 ± 1,27 (3,79%)

Concentração letal a 50% de uma população de organismos-testes; DP-desvio padrão

## CONCLUSÃO

Os testes de toxicidade aguda são de grande importância para, juntamente com as análises físico-químicas, serem utilizados para avaliação da eficiência de tratamento dos efluentes.

Os resultados da sensibilidade da *Artemia salina* ao lauril sulfato de sódio são satisfatórios, o CL50 em torno de 33,54 está semelhante ao encontrado na literatura para a espécie.

Este teste deve ser aplicado em amostras ambientais suspeitas de contaminação por xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo vivo) podendo determinar parâmetros metodológicos necessários para o uso da *Artemia* em testes ecotoxicológicos com agrotóxicos usados em aquicultura.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os funcionários da UPEA, ao IF Fluminense - *Campus Campos-Centro* pelo auxílio da bolsa de extensão, à professora Cíntia Neves Carneiro do Curso Técnico de Química do IF Fluminense *Campus Campos-Centro* pelo apoio dado projeto.



## REFERÊNCIAS

- ABNT. *Norma ABNT-NBR 15088: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes*. Rio de Janeiro. 19p, 2004.
- APHA Standard Methods for the examination of water and wastewater. Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E.; Eaton, A.D. (Eds). 21<sup>th</sup> ed. Washington, DC: APHA Publ., 2005.
- BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. *Pond aquaculture water quality management*. Boston: Editora Kluwer Academic, 1998. 700p.
- CETESB. *Norma CETESB, L5.250: Água do mar – teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamark, 1816 (Echinodermata: Echinoidea)*. Método de Ensaio. São Paulo, 1999. 22p,
- COSTA, A.; FREIRE, P.; CRUZ, J.V. Atlas hidrogeológico das águas minerais dos Açores. In: SEMINARIO RECURSOS GEOLOGICOS, AMBIENTE E ORDENAMENTO DO TERRITORIO, UTAD, 5., 2008, Vila Real. *Actas...* p.192-199. CDROM.
- DYER, S.D.; LAUTH, J.R.; MORRALL, S.W.; HERZOG, R.R.; CHERRY, D.S. Development of a chronic toxicity structure-activity relationship for alkyl sulfates. *Environmental Toxicology and Water Quality*, v.12, p. 295-303, 1997.
- ENVIRONMENTAL CANADA: Biological test methods: acute lethality test using *Daphnia* spp. *Report EPS1/RM/11*. Environmental Canada, Conservation and Protection, Ottawa, Ontario. 57p, 1990.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology*, v.11, p.714-718, 1977.
- HUTTER, C. M.; RAND, M. Competition between mitochondrial haplotypes in distinct nuclear genetic environments: *Drosophila pseudoobscura* vs. *D. persimilis*. *Genetics*, v.140, p. 537-548, 1955.
- IPATRICK, S. T.; RAND, D. M. Conditional hitchhiking of mitochondrial DNA: frequency shifts of *Drosophila melanogaster* mtDNA variants depends on nuclear genetic background. *Genetics*, v.141, p. 1113-1124, 1995.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Medica*, v.45, p.31-34, 1982.
- RESGALLA Jr., C; LAITANO, K.S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Téc. Facimar*, v.6, p. 153-163, 2002.



USEPA. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 5th ed. Washington, DC: USEPA, 2002. 266p. (EPA 821-R-02-012).

VARÓ, I.; NAVARRO, J.C.; AMAT, F.L.; GUILHERMINO, L. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica* *Chemosphere*, v.48, p. 563–569, 2002.

### **Internet**

Disponível em: <[www.globalgarbage.org/monografia\\_caio\\_cesar\\_ribeiro.pdf](http://www.globalgarbage.org/monografia_caio_cesar_ribeiro.pdf)>

Disponível em: <<http://www.brown.edu/Departments/EEB/rand/pubs102-295-737>> (*Last edited on 2002/02/27 17:55:41 US/Mountain*)

IPAMAR. Disponível em: <<http://ipimar-iniap.ipimar.pt/>>

Disponível em: <<http://www.getcited.org/pub/102295737>>

**Lamego, F.P.<sup>I</sup>; Vidal, R.A.<sup>I</sup>; Burgos, N.R.<sup>II</sup>**

<sup>I</sup>CNPq/Brazil and PPG Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS, Av Bento Gonçalves 7712, Caixa Postal 15100, 90001-970 Porto Alegre-RS, Brazil, <[fabilamego@yahoo.com.br](mailto:fabilamego@yahoo.com.br)>

<sup>II</sup>Professor, University of Arkansas, Fayetteville, AR, USA <[nburgos@uark.edu](mailto:nburgos@uark.edu)>

**Palavras-chave:** *Artemia sp.* CL50. Lauril Sulfato de Sódio.