

Avaliação da ecotoxicidade aguda em *Daphnia magna*: ensaio de sensibilidade

Evaluation of acute ecotoxicity in *Daphnia magna*: sensitivity test

RESUMO

Oliver Mateus de Paula Moro
olivermoro2002@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Adriane Martins de Freitas
adrianefreitas@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

A ecotoxicologia é responsável por revelar, através de ensaios com matéria viva, efeitos agudos e crônicos causados por substâncias químicas. Estes ensaios por sua vez têm por finalidade apresentar em qual grandeza compostos isolados ou em forma de mistura são nocivas aos organismos, além de trazer à tona onde e como se manifestam seus efeitos. O ensaio de sensibilidade consiste em um experimento preliminar realizado periodicamente com o objetivo de checar a sensibilidade dos organismos-teste. É de suma importância, visto que, sua estabilidade confere confiabilidade aos demais testes realizados com o mesmo organismo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a sensibilidade do organismo-teste (*Daphnia magna*) utilizando do sulfato de zinco como substância de referência. Os neonatos foram expostos durante 48 h. O controle negativo foi água de diluição. O ensaio foi feito em triplicata, a $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ e ausência de fotoperíodo. Após, foram contabilizados os organismos que tiveram sua capacidade natatória inibida e incluindo estes resultados em uma carta de controle. A partir dos resultados obtidos observou-se que a sensibilidade está dentro dos padrões requisitados.

PALAVRAS-CHAVE: Organismo-teste, carta controle, sulfato de zinco.

ABSTRACT

Ecotoxicology is responsible for revealing, through tests with living matter, acute and chronic effects caused by chemical substances. These tests, in turn, aim to show the magnitude of individual compounds or mixtures that are harmful to organisms, in addition to highlighting where and how their effects are manifested. The sensitivity test consists of a preliminary experiment carried out periodically with the aim of checking the sensitivity of the test organisms. It is of paramount importance, since its stability gives reliability to other tests performed with the same organism. The aim of the present study was to evaluate the sensitivity of the test organism (*Daphnia magna*) using zinc sulfate as a reference substance. The neonates were exposed for 48 h. The negative control was dilution water. The test was performed in triplicate, at $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ and no photoperiod. Afterwards, the organisms that had their swimming capacity inhibited were counted and included these results in a control chart. From the results obtained, it was observed that the sensitivity is within the required standards.

KEYWORDS: Test-organism, control chart, zinc sulfate.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Levando em conta que os efeitos causados por substâncias químicas se manifestam principalmente em matéria viva, podemos observar que estes sistemas vivos respondem de forma absoluta e com reações específicas a todos os efeitos e perturbações diretas ou indiretas, causadas por substâncias nocivas (Knie e Lopes, 2004). Em muitos organismos estes efeitos são observados de maneira nítida ou facilmente mensurável, o que os torna hábil a serem usados como sensores biológicos de medição desses efeitos. Os efeitos podem ser considerados agudos ou crônicos e resultam em diversas consequências aos seres empregados no teste, morte, mudanças morfológicas, fisiológicas, e histológicas, são exemplos destas consequências (Zagato e Bertolotti, 2006).

Daphnia magna (Cladocera, Crustacea) apresenta-se como um microcrustáceo plactônico de água doce possuindo cerca de 5 a 6 mm, conhecida vulgarmente por pulga d'água. Age na cadeia alimentar aquática como consumidor primário entre os metazoários, alimentando-se por filtração de matéria orgânica particulada, principalmente de algas unicelulares. Este ser em específico é indicado aos ensaios devido ao fato de que em condições favoráveis reproduzem-se de forma assexuada por intermédio de partenogênese, isso garante a invariabilidade genética possibilitando uma significativa uniformidade de respostas aos ensaios, além disso apresentam fácil manuseio e curto ciclo de vida (Knie e Lopes, 2004). Não obstante as dáfrias também reagem sensivelmente à ampla gama de agentes nocivos e apresentam uma cultura sob condições controladas facilmente executável e sem grandes dispêndios.

Ensaio de sensibilidade e composição de cartas-controle são de fundamental importância para garantir a qualidade, reprodutibilidade e rastreabilidade dos resultados obtidos nos ensaios agudos e crônicos com *D. magna* (ABNT, 2016). Estes ensaios se caracterizam pela realização do protocolo definido para ensaio agudo, porém com uma substância de toxicidade conhecida para o organismo (substância referência). Os organismos são expostos a concentrações pré definidas dos compostos a fim de se calcular a concentração efetiva a 50% dos organismos expostos (CE50). Estes valores são monitorados ao longo de no mínimo 20 ensaios. Qualquer valor de CE50 fora da faixa tolerada, pode indicar resistência ou excesso de sensibilidade dos organismos de um determinado lote. Neste caso, deve-se buscar o que está interferindo nos cultivos e/ou no ensaio. Porém, os resultados gerados nestas condições não serão considerados (ABNT, 2016). Diversas substâncias são usadas em ensaios de sensibilidade para *D. magna*, com especial atenção para o dicromato de potássio. Porém, em função da sua alta toxicidade, outros compostos devem ser testados para o mesmo fim (Persoone et al, 2009).

Neste sentido, o presente teve como objetivo avaliar a sensibilidade de lotes de *D. magna* ao sulfato de zinco.

MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo de *Daphnia magna* bem como os ensaios de sensibilidade foram realizados segundo a norma NBR 12713/2016 (ABNT, 2016). Os neonatos das culturas-estoque de *Daphnia magna* foram cultivados em grupos de 50 indivíduos

em 5 béqueres, contendo aproximadamente 2 litros de água de cultivo em cada um (meio de cultivo M4), preparado e mantido no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Os lotes foram armazenados em câmara de incubação, tipo BOD, sob controle de temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com luminosidade de 1.000 lux e fotoperíodo de 16 horas de luz. A alimentação foi efetuada diariamente com uma suspensão de células de alga da espécie *Desmodesmus subspicatus*, na concentração de aproximadamente 0,25 mL de suspensão por organismo. As algas foram cultivadas em meio Chu, em frascos lavadores sob constante aeração e fotoperíodo e mantidas no laboratório para alimentação dos organismos.

Os ensaios de sensibilidade foram efetuados expondo 10 neonatos de *D. magna* em triplicatas por 48 horas, sob as seguintes concentrações de sulfato de zinco: 1; 2,5; 5; 10; 20; 35; 50 mg/L e sob o controle negativo (água de diluição). Após término do ensaio os resultados foram registrados na carta controle gerada pelo software Biostat. A carta por sua vez no eixo Y vai da concentração mais baixa até a que apresenta 50% de imobilidade, no caso 20 mg/L. No eixo X encontram-se os ensaios os quais são realizados ao longo dos meses. Neste trabalho foram apresentados os resultados de 14 ensaios de sensibilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

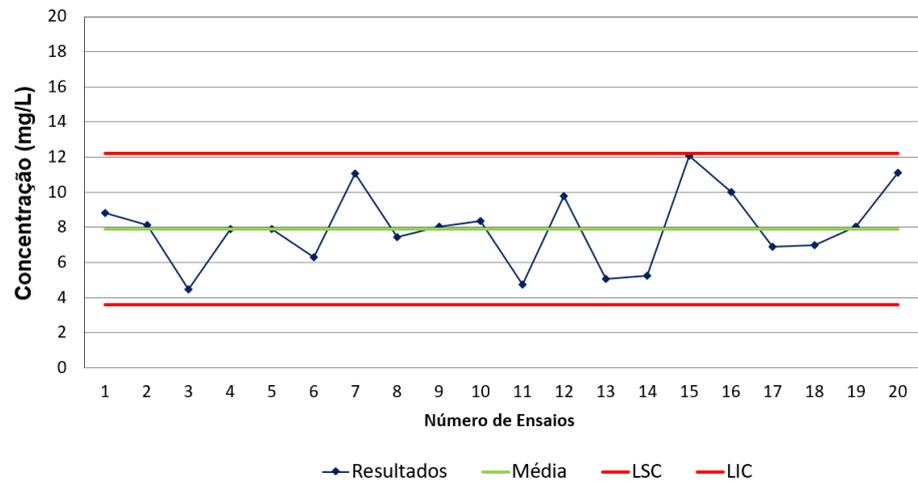
Após o determinado tempo na incubadora (48h), o ensaio foi lido de forma a constatar o número de indivíduos quais tiveram sua capacidade natatória inibida. Um exemplo dos resultados obtidos está apresentado na Tabela 1. Feito isso registrou-se os resultados na carta controle, onde os resultados são representados pela linha azul e os mesmos de preferência devem estar na média, qual é representada pela linha verde. Além disso os resultados não devem ultrapassar o limite inferior ou superior de concentração representados pelas linhas vermelhas. A carta controle é apresentada na Figura 1. A partir do teste de sensibilidade de número catorze utilizando de Sulfato de Zinco pode-se observar que as dáfnias estavam dentro dos parâmetros e cumpriam os requisitos para a realização de testes futuros.

Tabela 1- Número de indivíduos com capacidade natatória inibida por concentração.

Nº do ensaio: 14					
Data: 08/12/2019					
CT	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Média	
1	0	0	0	0,0	
2,5	0	1	0	0,3	
5	1	0	2	1	
10	5	6	5	5,3	
20	7	7	9	7,7	
35	10	9	10	9,7	
50	10	10	10	10	

Fonte: Autoria própria (2019)

Figura 1- Carta controle dos testes de sensibilidade de 2019



Fonte: Autoria própria (2019)

Sulfato de zinco se mostrou uma boa substância de referência, podendo substituir o dicromato de potássio na rotina do laboratório. O zinco, por ser um metal, apresenta toxicidade à *D.magna* quando concentrações na ordem de mg/L são utilizadas. Outros sais à base de zinco, como o cloreto de zinco já tiveram sua toxicidade à *D. magna* avaliada (Ergönül et al, 2012).

CONCLUSÃO

No presente estudo através do ensaio de sensibilidade utilizando Sulfato de Zinco, comprovou-se que os organismos estavam dentro dos parâmetros requisitados e se apresentavam adequados para a realização dos demais testes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo suporte financeiro e ao CNPq pela bolsa de IC.

REFERÊNCIAS

ABNT NBR 12713, 2016. NBR 12713: **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera)** Aquatic 1–23.

Ergönül, M.B.; Atasağun, S.; Beşer, T. The Acute Toxicity of Zinc chloride on *Daphnia magna* Straus. *Gazi University Journal of Science*, 25(2):313-316 (2012).

Knie, J. L. W. ; Lopes, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: Métodos, Técnicas e Aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 288p

Persoone, G.; Baudo, M. Cotman, C. Blaise, K. C. Thompson, M. Moreira; Santos, B. Vollat, A. Torokne, T. Han. **Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test - Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs.** Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems (2009) 393, 01

Zagatto, P. A.; Bertoletti, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** São Paulo: Rima, 2006. 464 p.