

Avaliação da ecotoxicidade de filtros solares em tilápia

Ecotoxicity evaluation of sunscreens in tilapia

RESUMO

Marcos Antonio Severino
marcos.severino.tpa@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Júlio César Rodrigues de
Azevedo
jcrazevedo@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Julia Caroline Freire Sovierzski
jusovierzski@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

O objetivo da presente pesquisa foi a avaliação da ecotoxicidade dos filtros solares em tilápias. Os exemplares foram adquiridos por fornecedores comerciais locais após aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA/UTFPR). Para a realização do bioensaio, os organismos ficaram expostos em aquários durante 29 dias com renovação periódica dos contaminantes benzofenona-3, octilmetoxicinamato e octocrileno. Os contaminantes foram dissolvidos nos aquários em grupos de concentrações de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (concentração ambiental) e $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pelo método de imersão a partir de soluções estoques etanólicas 91%. Os efeitos sobre os organismos estão sendo avaliados a partir de análises de Biomarcador de genotoxicidade utilizando o método de ensaio cometa; biomarcador de mutagenicidade utilizando análises de micronúcleo; e biomarcadores bioquímicos utilizado à análise de Peroxidação Lipídica (LPO), Glutathione S-transferase (GST), catalase e acetilcolinesterase após normalização da concentração de proteínas utilizando o método Bradford.

PALAVRAS-CHAVE: Bioensaio. Biomarcadores. BP-3. OMC. OC.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the ecotoxicity of sunscreens in tilapia. The specimens were purchased by local commercial suppliers after approval of the project by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal Technological University of Paraná (CEUA / UTFPR). To carry out the bioassay, the organisms were exposed in aquariums for 29 days with periodic renewal of contaminants benzophenone-3, octymethoxycinnamate and octocrylene. The contaminants were dissolved in the aquariums in groups of concentrations of $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (environmental concentration) and $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ by the method of immersion using solutions of ethanol stocks 91%. The effects on the organisms are being evaluated from genotoxicity biomarker analysis using the comet assay method; mutagenicity biomarker using micronucleus analyzes; and biochemical biomarkers used for the analysis of Lipid Peroxidation (LPO), Glutathione S-transferase (GST), catalase and acetylcholinesterase after normalization of protein concentration using the Bradford method.

KEYWORDS: Bioassay. Biomarkers. BP-3. OMC. OC.

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

A água é um recurso esgotável e de essencial importância para a manutenção da vida. O gerenciamento dos recursos hídricos é uma das grandes preocupações mundiais, visto que o impacto ambiental causado pelas atividades antrópicas cresce de maneira desordenada e, além dos seres humanos, a poluição da água afeta, principalmente, o ecossistema aquático (MUGNAI, 2001).

Além da avaliação dos parâmetros físicos e químicos da água estudiosos recomendam a medição de parâmetros biológicos em corpos hídricos para que se realize uma caracterização mais ampla. Para tal, pode ser feito o uso de bioindicadores, isto é, espécies sentinelas que respondem a agentes químicos por meio de alterações bioquímicas, fisiológicas e/ou comportamentais (MUGNAI, 2001 e PIMENTA, 2016).

O uso de espécies de peixes como bioindicadores é considerado bastante eficiente, uma vez que estes representam componentes comuns nos ecossistemas, além de sua fácil amostragem, resistência a poluição, sensibilidade aos contaminantes ambientais e localização no topo da cadeia alimentar (FREITAS e SIQUEIRA-SOUZA, 2017). Além de auxiliarem na avaliação e monitoramento de corpos hídricos, estes organismos também podem ser utilizados em estudos para determinar a toxicidade de contaminantes, como os filtros solares, em ensaios laboratoriais (VAN DER OOST et al, 2003). Os filtros solares, ao serem absorvidos, podem ser bioacumulados e alterar a homeostase hormonal dos organismos ao agirem como disruptores endócrinos (GAGO-FERRERO et al, 2017).

A avaliação das alterações genéticas decorrentes da poluição e dos contaminantes pode ser feita através do estudo de biomarcadores genéticos, como o ensaio cometa e teste do micronúcleo písceo, capazes de detectar mutações gênicas e danos cromossômicos. Alterações nos sistemas bioquímicos podem ser monitoradas e detectados por meio da análise de biomarcadores bioquímicos, como peroxidação lipídica e catalase (enzimas associadas ao estresse oxidativo), glutathione S-transferase (enzima envolvida no processo de biotransformação de contaminantes), atividade da acetilcolinesterase (enzima associada à transmissão de impulsos nervosos) (RAMSDORF, 2011).

A pesquisa foi desenvolvida com base nas atividades realizadas no Laboratório de Ecotoxicologia (ECOTOX) e Laboratório de Estudos Avançados em Química Ambiental (LEAQUA) da UTFPR com o intuito de auxiliar a aluna Julia C. F. Sovierzoski durante seu projeto de mestrado (protocolo CEUA/UTFPR número 37-2018), com enfoque na avaliação de biomarcadores genéticos e bioquímicos após bioensaio utilizando tilápias a fim de elucidar possíveis efeitos ecotoxicológicos ocasionados pela exposição a filtros solares.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo com as tilápias, inicialmente, a mestranda adquiriu 50 exemplares de fornecedores comerciais locais após aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA/UTFPR). Durante o período de aclimatação, os indivíduos foram mantidos por 50 dias no Laboratório de Ecotoxicologia (ECOTOX) em tanques de plástico de 250 L sob aeração constante com bomba de oxigênio, temperatura

ambiente, ciclos de 12h claro/escuro, alimentação com ração comercial e limpeza do tanque diárias.

Para realização do bioensaio, foram utilizados aquários de vidro de 24 litros. A limpeza dos mesmos foi feita utilizando água corrente e extran 2,5%, seguido de ácido nítrico 10%. As mangueiras e pedras porosas permaneceram mergulhadas em ácido nítrico 10% por 30 minutos. Em seguida, os aquários foram preenchidos com água filtradas e o sistema de aeração permaneceu montado por 24 h para remoção de resíduos. Após 24 h, o sistema foi desmontado e todos os componentes enxaguados novamente com água da rede.

Os organismos tiveram sua massa aferida e foram divididos em 8 aquários com 5 alevinos em cada um deles, para exposição durante 29 dias com renovação periódica dos contaminantes benzofenona-3, octilmetoxicinamato e octocrileno. O tempo de renovação da água e do contaminante foi de 1 vez a cada 24 h definido de acordo com testes de estabilidade e assimilação dos compostos, realizados previamente.

Os contaminantes foram dissolvidos em água nas concentrações de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (concentração ambiental) e $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pelo método de imersão a partir de soluções estoques etanólicas 91%. Foram mantidos também grupos controle de etanol e controle ausente de solvente e contaminantes, conforme Figura 1.

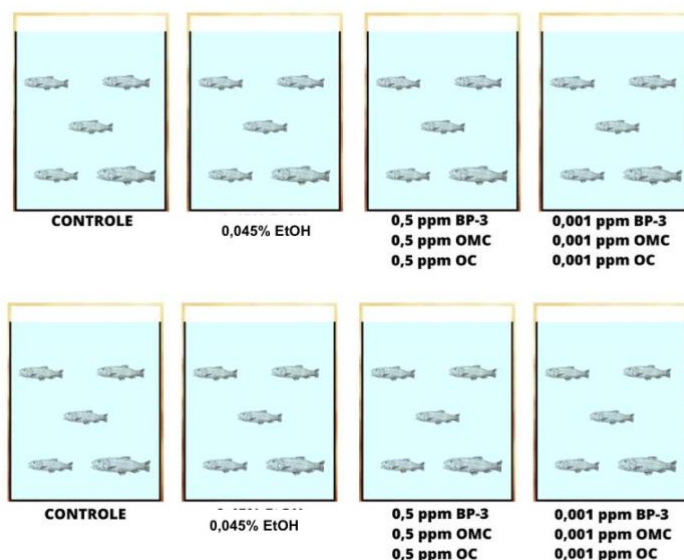


Figura 1 – Grupos de organismos avaliados durante o bioensaio

Fonte: Autoria própria (2020)

Ao término do período de contaminação, os peixes foram anestesiados (benzocaína 10%, Merck), pesados, medidos, e tiveram sangue, fígado, cérebro e músculo retirados.

Para as análises de biomarcadores, ao término do bioensaio, 34 animais tiveram seu sangue retirado e mantido em soro bovino fetal (FBS), refrigerado e na ausência de luz, segundo procedimento descrito por Ramsdorf (2011). O sangue

coletado foi empregado no ensaio cometa e teste do micronúcleo písceo. Além disso, 37 animais tiveram fígado, cérebro e músculo retirados e congelados em ultrafreezer a -70°C para análise de biomarcadores bioquímicos.

Inicialmente para o teste do Micronúcleo Písceo, as lâminas foram limpas com etanol P.A. e identificadas. O sangue do organismo foi retirado com capilar de vidro e uma gota depositada sobre a lâmina, sendo realizado o esfregaço com lamínula (técnica de extensões sanguíneas). Após secagem ao ar, as lâminas foram fixadas em etanol P.A. por 30 minutos em cubetas. Por fim, as lâminas foram coradas com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 8,6) por 10 minutos, lavadas em água corrente e deixadas em posição vertical para secagem ao ar. Após o preparo das lâminas, as mesmas foram avaliadas em microscópio pela mestranda.

Para realização do ensaio cometa, 10 μL do sangue armazenado em 1 mL de soro bovino fetal foi diluído em 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e colocado em uma lâmina coberta por agarose normal. As lâminas foram mantidas em uma solução de lise (solução de lise estoque: NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (1%); solução de lise uso: triton X100 (1%), DMSO (10%) na solução de lise estoque), por 24h em 4°C , na ausência de luz. Na etapa seguinte, as lâminas foram primeiramente imersas em uma solução de NaOH (10 N) e de EDTA (200 mM), pH 13 por 30 minutos, para efetuar a desnaturação do DNA, e submetidas então à eletroforese a 300 mA, 25 V por 25 min. Após a neutralização em 0,4 M Tris, pH 7,5 e fixação no álcool etílico por 10 min, cometas foram corados com 0,02 g/ml de brometo de etídeo e analisados usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLS2 pela mestranda.

Procedimentos para Análise de Biomarcadores Bioquímicos. Baseado no trabalho de Ramsdorf (2011), as amostras de fígado foram homogeneizadas em 1 mL tampão fosfato (0,1M; pH 7,6) e centrifugadas a 12000 xg por 20 min a 4°C . O sobrenadante foi utilizado para análise de Peroxidação Lipídica (LPO), Glutathione S-transferase (GST), catalase e acetilcolinesterase após normalização da concentração de proteínas utilizando o método Bradford. No método Bradford, foram utilizados os reagentes Reativo de Bradford e albumina de soro bovina (padrão de 1 mg/ml preparados em PBS) e mediu-se a absorbância em 595 nm em espectrofotômetro de microplacas.

A atividade global de GST nos sobrenadantes das amostras de fígado foi medida em espectrofotômetro utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 3 mM e glutathione reduzida (GSH) 3 mM como substratos.

Para as análises de LPO em fígado, as amostras foram diluídas em metanol 90% e centrifugadas. O sobrenadante foi adicionado em microplacas, juntamente com a solução reação (0,1 mM laranja de xilenol, 25 mM ácido sulfúrico, 4,0 mM BHT butil hidroxitolueno e 0,25 mM sulfato ferroso amoniacal) e incubado por 30 min. Em seguida, as amostras foram lidas a 570 nm em espectrofotômetro.

Tendo como base o trabalho de Vicentini (2017) para avaliar a atividade da catalase em microplacas, 5 μL de amostra foram pipetados e foi adicionado 295 μL de solução reação (Tampão Tris 1M / EDTA 5mM pH 8,0; peróxido de hidrogênio 30% e água). As amostras foram então lidas por 1 minuto em espectrofotômetro a 240 nm.

Para a análise de acetilcolinesterase, foi utilizado o Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e Iodeto de acetilticolina e mediu-se a absorbância em 405 nm em espectrofotômetro de microplacas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao término do bioensaio, os animais foram anestesiados e tiveram massa e comprimento aferidos, conforme tabela abaixo. Os aquários 1 e 2 receberam renovação diária de 0,5 ppm dos contaminantes; os aquários 3 e 4, renovação diária de 0,001 ppm dos contaminantes; 5 e 6 foram os controles de etanol (0,045% etanol) e os aquários 7 e 8 os controles.

Após obtenção das massas e comprimento, os indivíduos tiveram sangue, fígado e cérebro retirados (Figura 2) e mantidos em *ultrafreezer* para posterior análise de biomarcadores. O músculo foi congelado inteiramente para futuras análises cromatográficas.

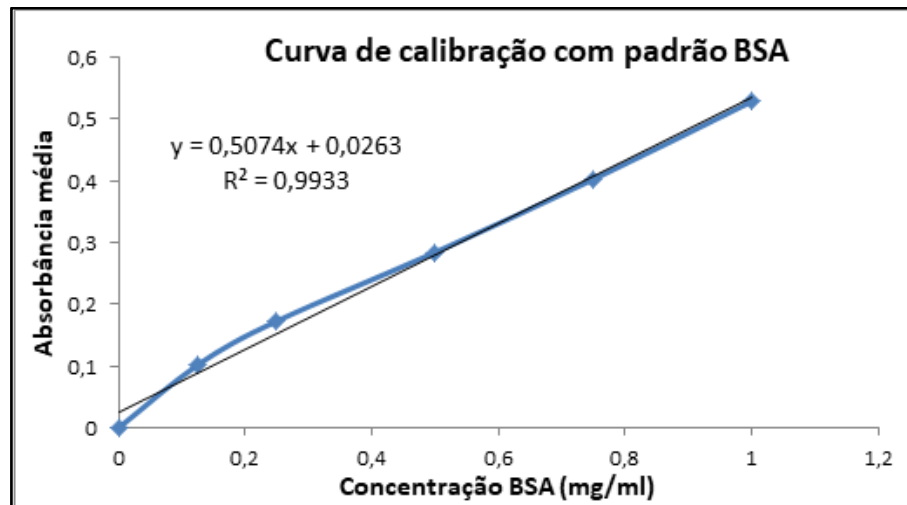
Figura 2 – Retirada de sangue e órgãos das tilápias após o bioensaio



Fonte: Autoria própria (2020)

Após homogeneização do cérebro, fígado e músculo, as amostras foram normalizadas quanto a concentração de proteínas utilizando o método Bradford. Para tal, foi construída uma curva de calibração utilizando o padrão albumina de soro bovina (BSA). Inicialmente, as amostras foram diluídas visualmente de modo a se encaixarem no intervalo da curva construída (Figura 3). Em seguida, medições foram realizadas a fim de determinar a quantidade real de proteínas em cada amostra e a quantidade de diluições necessárias para normalizá-las.

Figura 3 – Curva de calibração com padrão BSA



Fonte: Autoria própria (2020)

As lâminas de sangue para estudos dos biomarcadores genéticos ainda estão sendo lidas e avaliadas estatisticamente. A análise dos biomarcadores GST, catalase, acetilcolinesterase e LPO não apresentou resultados satisfatórios, atualmente a mestranda se dedica a analisá-las novamente e fazer as análises estatísticas.

CONCLUSÃO

Através do presente trabalho, foi possível desenvolver habilidades e o aprendizado a respeito de técnicas que auxiliam na determinação do nível de poluição de corpos hídricos por meio da análise de biomarcadores em organismos bioindicadores como as tilápias. Também foi possível acompanhar um bioensaio sub-crônico, útil para a determinação da ecotoxicidade de contaminantes ambientais, além da dissecação dos animais e retirada/armazenamento dos órgãos.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, CNPQ pelo fomento da pesquisa; a UTFPR; ao Laboratório de Ecotoxicologia (ECOTOX); ao Laboratório de Estudos Avançados em Química Ambiental (LEAQUA); ao LLiEC - Laboratório de Limnologia, Ecologia e Cromatografia e LAMEAA - Laboratório Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais pelo espaço e equipamentos cedidos.

REFERÊNCIAS

MUGNAI, R. **Biomonitoramento das águas: Estratégias para prática de ensino**. 2011. 207 f. Tese (Doutorado Ensino em Biociências) - Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2001.

PIMENTA, S. M. Estudo da qualidade da água por meio de bioindicadores bentônicos em córregos da área rural e urbana. **Rev. Ambient. Água**. Vol. 11, n. 1, Taubaté – Jan. / Mar. 2016.

FREITAS, C., SIQUEIRA-SOUZA, F. O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica. **Rev. Agrogeoambiental**. Vol. 1, n.2. 2017.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. Vol. 13, p. 57-149, 2003.

GAGO-FERRERO, DÍAZ-CRUZ, BARCELÓ. An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Vol. 404, p. 2597-2610, 2012.

RAMSDORF, W. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. 154 f. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, 2011.