

# ENSAIO DE ECOTOXICIDADE COM EMBRIÃO de *Danio rerio* EXPOSTO AO SULFATO DE ZINCO EM DOIS TIPOS DE ÁGUA DE DILUIÇÃO\*

Aline Viana de ARAUJO<sup>1</sup>; Karen de SOUZA-FERREIRA<sup>3</sup>; Fernanda Lie IKARI<sup>2</sup>; Ruan de Oliveira CARNEIRO<sup>1</sup>; Claudia Maris FERREIRA<sup>3</sup>; Carla LIMA<sup>4</sup>; Mônica LOPES-FERREIRA<sup>4</sup>; Cintia BADARÓ-PEDROSO<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Bolsista PIBIC, Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP [viana.aline18@gmail.com](mailto:viana.aline18@gmail.com)

<sup>2</sup> Pós-graduanda, Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP

<sup>3</sup> Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP [pedrosos@pesca.sp.gov.br](mailto:pedrosos@pesca.sp.gov.br)

<sup>4</sup> Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, São Paulo, SP

\*Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 127344/2016-0.

**Palavras-Chave:** ecotoxicologia aquática; zebrafish; CL<sub>50</sub>; “FET” test; meio E2

## INTRODUÇÃO

Os ensaios ecotoxicológicos são utilizados para avaliar os danos que determinados compostos causam ao meio ambiente. Dentre os principais rejeitos que atingem os corpos d’água estão os resíduos de metais pesados provenientes de atividades industriais e agrícolas, como o sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>), que tem aplicação na indústria têxtil e no enriquecimento de solos pobres (MME, 2009). Ele também é muito utilizado como substância de referência em ensaios ecotoxicológicos. Conforme OECD (2013), o teste “FET” (*Fish Embryo Acute Toxicity*) foi aplicado com sucesso a uma ampla gama de substâncias que exibem diversos modos de ação e características físicas. Baseia-se na exposição de ovos recém fertilizados de peixe-zebra (*Danio rerio*) por um período de 96 horas para verificar o efeito de diferentes compostos na sobrevivência dos mesmos. O objetivo do presente trabalho é determinar a toxicidade aguda do sulfato de zinco preparado com água do abastecimento público sem cloro e em meio E2, utilizado para o cultivo de ovos do zebrafish até a sua eclosão.

## MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Centro de Pesquisa em Desenvolvimento de Peixes Ornamentais, no laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Instituto de Pesca seguindo-se as normas da OECD (2013). Os embriões foram obtidos através de três desovas da reprodução de peixes mantidos na proporção de dois machos para uma fêmea em três aquários separados, com base nos protocolos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2007) e também da Plataforma Zebrafish do Instituto Butantan (Dra Monica LOPES-FERREIRA, *com. pessoal*).

A partir da solução estoque de 100 mg Zn.L<sup>-1</sup> em água destilada foram preparadas oito soluções teste nas concentrações nominais de 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 64 mg Zn.L<sup>-1</sup> diluídas em água de abastecimento público e em meio de cultivo E2 que foi descrito por Nüsslein-Volhard e R. Dahm, *apud* ZIRC (2013). Foram dez replicatas por concentração de sulfato de zinco heptahidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), dispostas em placas de cultivo celular com 24 poços, sendo 1 ovo para cada em 2 mL de amostra. Houve a separação de uma placa de controle para as duas águas de diluição e ao termino desse processo todas foram armazenadas em incubadora, na temperatura de 25 ±1°C e fotoperíodo de 12h claro: 12h escuro. Durante as leituras o parâmetro observado foi a mortalidade, verificada através da presença de ovo coagulado. O ensaio teve a duração de 72 horas, e a leitura do mesmo foi realizada a cada 24 horas. A determinação dos valores das CL<sub>50</sub> (concentração letal mediana) foi feita utilizando-se o programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores das desovas foram de 77, 119 e 73 ovos obtidos dos três aquários de reprodução e estão dentro da faixa de produção de 50 a 200 ovos por fêmea por dia citada por HENN (2011).

Segundo a OECD (2013) um dos parâmetros considerados para a aceitabilidade do ensaio é a sobrevivência no controle com água de diluição que deverá ser ≥ 90%. Nos controles com água de abastecimento público e meio E2, os valores de sobrevivência foram de 100 e 80%, respectivamente. No entanto, os resultados dos valores das CL<sub>50</sub> 48 e 72h para o sulfato de zinco indicam um efeito positivo do meio E2 na sobrevivência dos embriões, pois foram maiores cerca de 8 e 7 vezes, respectivamente, em comparação aos valores da água de abastecimento público. Esses resultados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Resultados das CL<sub>50</sub> 48h e 72h após exposição dos embriões com 4 hpf (horas após a fertilização) ao sulfato de zinco (mg.L<sup>-1</sup>) na água de abastecimento e no meio E2.

Água de diluição	CL50 48h	CL50 72h
Água de abastecimento público	6,83	4,37
Meio E2	57,97	30,96

Entre os principais fatores relacionados a esses resultados estão a composição do meio E2, preparado com azul de metileno que apresenta efeito fungicida, e nutrientes que favorecem o desenvolvimento dos ovos e, conseqüentemente aumentam sua sobrevivência. No entanto, mais experimentos serão realizados com outras substâncias e sem o azul de metileno no meio E2 para verificar se o meio funciona como um artefato que pode vir a camuflar os resultados, gerando falsos positivos.

## CONCLUSÃO

O uso do meio E2 para preparar as soluções dos ensaios deve ser reconsiderado, pois pode camuflar o resultado do teste indicando uma diminuição da sensibilidade do mesmo.

## REFERÊNCIAS

- ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2007 Ecotoxicologia Aquática- Ecotoxicidade crônica de curta duração- Método de ensaio com peixes. ABNT, NBR 15499.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. 1977 Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11(7): 714-719.
- HENN, K. 2011 Limites of the fish embryo toxicity test with *Danio rerio* as an alternative to the acute fish toxicity test. Dissertation. Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany.
- MME-Ministério de Minas e Energia. 2009 Relatório técnico N°65: Perfil do Zinco. Disponível em <http://www.mme.gov.br/web/guest/a-mineracao-brasileira>. Acesso em: 17 dez. 2016.
- OECD-Organisation for Economic Co-operation and Development. 2013 Guidelines for the testing of chemicals- Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.
- ZIRC- Zebrafish International Resource Center. 2013 E2 Embryo Media with Methylene Blue. Disponível em [https://zebrafish.org/documents/protocols/pdf/Fish\\_Nursery/E2\\_solution.php](https://zebrafish.org/documents/protocols/pdf/Fish_Nursery/E2_solution.php). Acesso em: 17 dez. 2016.