

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

EFEITO TÓXICO AGUDO E GENOTÓXICO CAUSADO PELA FORMALINA
EM *Danio rerio* (PEIXE-ZEBRA): AVALIAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES
SEGURAS PARA USO PROFILÁTICO NA AQUICULTURA

André Sangineto Resendes

Orientadora: Prof.^a Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Cíntia Badaró Pedroso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo

Novembro – 2017

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

EFEITO TÓXICO AGUDO E GENOTÓXICO CAUSADO PELA FORMALINA
EM *Danio rerio* (PEIXE-ZEBRA): AVALIAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES
SEGURAS PARA USO PROFILÁTICO NA AQUICULTURA

André Sangineto Resendes

Orientadora: Prof.^a Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Cíntia Badaró Pedroso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca - APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

São Paulo

Novembro – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

R433e

Resendes, André Sangineto

Efeito tóxico agudo e genotóxico causado pela formalina em danio rerio (peixe-zebra): avaliação de concentrações seguras para uso profilático na aquicultura. / André Sangineto Resendes. – São Paulo, 2017.
v, 42f. ; il. ; gráf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientadora: Claudia Maris Ferreira Mostério

1. Formol. 2. Formaldeído. 3. Ensaio Agudo. 4. Micronucleo. I. Mostério, Claudia Maris Ferreira. II. Título.

CDD 574

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

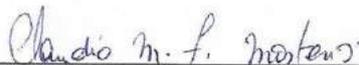
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

“EFEITO TÓXICO AGUDO E GENOTÓXICOS CAUSADO PELA
FORMALINA EM *Danio rerio* (PEIXE-ZEBRA): AVALIAÇÃO DE
CONCENTRAÇÕES SEGURAS PARA USO PROFILÁTICO NA
AQUICULTURA”

AUTOR: André Sangineto Resendes

ORIENTADORA: Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério
CO-ORIENTADORA: Dra. Cíntia Badaró Pedroso

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

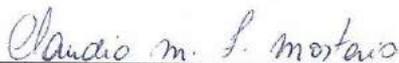


Profa. Dra. Carla Lima



Prof. Dr. Fernando Augusto de Oliveira Ribeiro

Data da realização: 07 de novembro de 2017



Presidente da Comissão Examinadora
Profa. Dra. Cláudia Maris Ferreira Mostério

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência”.
(*Charles Darwin*)

Agradecimentos

Ao instituto de Pesca pela infra-estrutura e todo suporte.

A CAPES por ter concedido a bolsa de Mestrado.

Minha orientadora Dr.^a Cláudia Maris Ferreira Mostério e coorientadora Dr.^a Cintia Badaró Pedroso por toda ajuda, apoio e orientação durante esses dois anos de mestrado, muito obrigado.

A minha família por sempre estarem por perto e me ajudando em todos os momentos, aos meus pais por todo carinho e amor.

A minha esposa Anny por ter vivido comigo toda essa trajetória, sempre me apoiando e me ajudando. Ao nosso filho lindo que Deus nos deu, Gabriel, nosso novo amor incondicional que nos traz muita alegria.

Aos colegas da pós-graduação do IP que sempre ajudaram nos experimentos e nos estudos, Diego Sales, Karen Ferreira, Fernanda Menezes, Patrícia Teixeira, Fernanda Ikari, Cinthia Rodrigues e Sthefany Rosa.

A Dr.^a Maria Letizia Petesse pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos os funcionários do IP que estiveram presentes durante essa jornada, muito obrigado a todos!

Sumário

Agradecimentos	vi
Sumário	vii
Índice de tabelas e figuras	viii
Resumo geral	ix
Abstract	x
Introdução Geral	2
Referências bibliográficas	5
Capítulo 1	7
Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
Materiais e Métodos	12
Resultados	15
Discussão.....	22
Conclusão	25
Referências bibliográficas	25
Considerações finais	29
Anexos	30

Índice de tabelas e figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1: Mortalidade acumulada durante o ensaio agudo com formalina usando o peixe <i>Danio rerio</i> com 96h de exposição.....	16
Figura 2: Mortalidade acumulada durante o ensaio crônico com formalina usando o peixe <i>Danio rerio</i> com 192h de exposição.....	17
Figura 3: Incidência de micronúcleos em <i>Danio rerio</i> do grupo Controle (sem exposição à formalina) antes (Momento Zero), durante (96h) e no final da experimentação (192h).....	18
Figura 4: Incidência de micronúcleos em <i>Danio rerio</i> das 96h (A) e 192h (B) nos diferentes tratamentos de exposição crônica a formalina: C – Controle negativo; T1 – 0,45mg.L ⁻¹ ; T2 – 4,57mg.L ⁻¹ , T3 – 22,86mg.L ⁻¹ e Controle positivo (30,0mg.L ⁻¹). Para atender os requisitos da análise foi retirado um outlier.....	19
Figura 5: Gráfico modelo linear generalizado (GLM) entre as concentrações de formalina e a incidência de micronúcleos (1000 eritrócitos/lâmina) encontrados durante o teste de toxicidade crônica com <i>Danio rerio</i>	20
Figura 6: Fotomicrografia de eritrócitos do sangue periférico de <i>Danio rerio</i> , evidenciando micronúcleos corados através da reação de Fielgen, devido à exposição formalina. Aumento de 1000x.....	21
Tabela 1: Tempo de tombamento e recuperação dos peixes <i>Danio rerio</i> sob a ação da benzocaína (n= 12).....	15

ANEXOS

Figura 1: Mortalidade acumulada durante o ensaio agudo com formalina usando o peixe <i>Danio rerio</i> com 96h de exposição.....	33
Figura 2: Mortalidade acumulada durante o ensaio crônico com formalina usando o peixe <i>Danio rerio</i> com 192h de exposição.....	33
Figura 3: Incidência de micronúcleos em <i>Danio rerio</i> do grupo Controle (sem exposição à formalina) antes (Momento Zero), durante (96h) e no final da experimentação (192h).....	34

Resumo geral

A formalina é um dos fungicidas mais utilizados na aquicultura e tem uma variedade de aplicações porque é altamente reativa, incolor, estável, pura na forma comercial e de baixo custo. É muito usada no tratamento de doenças causadas por fungos e parasitas. A formalina é uma solução aquosa com 37% a 40% de formaldeído, é volátil e irritante e causa câncer em ratos de laboratório podendo causar hipersensibilidade ao contato e danos no pulmão em humanos. É por esta razão que as concentrações ideais e possíveis resíduos da formalina que podem ser lançados no ambiente aquático precisam ser estudados. O *Danio rerio* ou paulistinha é uma espécie de peixe popular entre os aquaristas reconhecida internacionalmente para uso em ensaios ecotoxicológicos. Possui boa capacidade para suportar grandes variações de temperatura, pH e dureza da água e também demonstram uma ótima sensibilidade a elevado número de substâncias químicas. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos tóxicos e genotóxicos da formalina e determinar as concentrações letais e genotóxicas desse químico, para subsidiar seu uso seguro em processos de desinfecção nas pisciculturas comerciais. Para tanto, utilizamos ensaios agudos e crônicos utilizando-se metodologias da ASTM (American Society for Testing and Materials), pela APHA (American Public Health Association) e ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Para verificar o possível efeito genotóxico utilizamos o Teste de micronúcleos realizado nos eritrócitos do sangue periférico dos peixe-zebra em coletas ao longo do ensaio crônico às 0h, 96h e 192h de exposição. A CL_{50-96h} da formalina para o *D. rerio* foi de $45,73\text{mg.L}^{-1}$. Este valor está próximo das concentrações utilizadas em banhos de tratamento de doenças de peixes. Entretanto, este químico mesmo em concentrações crônicas causou mortalidade e efeitos genotóxicos ao longo do tempo nos animais. Assim recomendamos mais estudos e outros testes envolvendo este químico para o uso de concentrações ambientalmente seguras.

Palavras chave: formol, formaldeído, ensaio agudo, micronúcleo.

Abstract

Formalin is one of the most commonly used fungicides in aquaculture and has a variety of applications because it is highly reactive, colorless, stable, pure in commercial form and low cost. It is widely used in treatment of diseases caused by fungi and parasites. Formalin is an aqueous solution with 37% to 40% formaldehyde is volatile and irritant and causes cancer in laboratory rats and may cause contact hypersensitivity and lung damage in humans. It is for this reason that as ideal concentrations and possible formalin residues that can be released into the aquatic environment. *Danio rerio* or paulistinha is a species of fish popular with internationally renowned aquarists for use in ecotoxicological trials. It has good capacity to withstand great variations of temperature, pH and water hardness and demonstrate an excellent sensitivity to high number of chemical substances. Thus, the objective of this study was to verify the toxic and genotoxic effects of the formality and to determine lethal concentrations of the chemical, to subsidize its safe use in disinfection processes in commercial fish farms. Therefore, it uses acute and chronic tests using ASTM (American Society of Testing and Materials), APHA (American Public Health Association) and ABNT (Brazilian Association of Technical Standards) methodologies. To verify the potential of the genotoxic effect we used the Micronucleus test performed on erythrocytes of the peripheral blood of zebrafish collected during the chronic test at 0h, 96h and 192h of exposure. The formaldehyde LC_{50-96h} for *D. rerio* was 45.73mg.L⁻¹. This value is close to concentrations in fish disease treatment baths. However, this chemical even at chronical concentrations caused mortality and genotoxic effects over time in animals. We therefore recommend further studies and other tests involving this chemical for the use of environmentally safe concentrations.

Keywords: formalin, formaldehyde, acute test, micronucleus.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

A formalina é um dos fungicidas mais utilizados na aquicultura e tem uma variedade de aplicações porque é altamente reativa, incolor, estável, pura na forma comercial e de baixo custo. Ela serve como agente de cura, desinfetante, fungicida e conservante (SANTANA *et al.*, 2015). Entretanto, os peixes que sobrevivem ao tratamento podem ter sua saúde afetada (VALLADÃO *et al.*, 2014).

Este químico também é muito usado no tratamento de doenças causadas por parasitas e compete com substâncias como peróxido de hidrogênio, azul de metileno e amônia quaternária neste tipo de utilização. É um dos produtos mais utilizados por ter facilidade em controlar infecções parasitárias externas, atuando sobre parasitas de brânquias, pele e nadadeiras, sendo efetiva contra a maioria dos protozoários e trematódeos monogenéticos (FAJER-ÁVILA *et al.*, 2003).

A formalina é uma solução aquosa com 37% a 40% de formaldeído. É uma substância volátil e irritante. Causa câncer em ratos de laboratório e pode causar hipersensibilidade ao contato e danos no pulmão em humanos por poder ser facilmente absorvido vias oral, dérmica e inalatória. O químico é rapidamente biodegradado e não se bioacumula na cadeia alimentar (HSDB, 2006). Por esta razão as soluções devem ser muito bem seladas durante o armazenamento e nunca ser permitido em contato com a pele humana (WHO, 2006). As concentrações ideais e possíveis resíduos da formalina que podem ser lançados no ambiente aquático precisam ser estudados.

Estudos demonstraram efeitos tóxicos da formalina em peixes, como agressão do epitélio branquial (MARTINS, 2004), também há relatos que a toxicidade aumenta com a elevação da temperatura da água (CARRASCHI *et al.*, 2011) sendo esta afirmação muito importante para a realização de tratamentos em peixes na aquicultura.

Infestações por parasitas monogenéticos caracterizados por serem monoxêmicos apresentam infestações que resultam em lesões que são portas de entrada para bactérias e fungos tem potencial para gerar grandes perdas econômicas. Todavia, pouco se sabe sobre as relações entre os helmintos monogenóides e peixes ornamentais (GARCIA *et al.*, 2003).

Ensaio ecotoxicológicos são capazes de definir um impacto tóxico em organismos individuais e na sua bioquímica e fisiologia. Os conhecimentos adquiridos em laboratório conjuntamente com aqueles obtidos em trabalhos de campo são essenciais para a compreensão do complexo conjunto de parâmetros com os quais o organismo tem que lidar (KLAASSEN e WATKINS, 2001). Estes tipos de ensaios classificados em agudos ou crônicos são realizados com organismos indicadores, os quais possuem baixa tolerância ecológica a determinadas substâncias químicas (MAGALHÃES e FILHO, 2008).

As exposições são feitas em diferentes concentrações de substâncias e compostos químicos, amostras de efluentes ou água bruta, por um determinado período de tempo. A exposição a um agente tóxico pode ser aguda, quando a concentração letal do agente tóxico é liberada em um único evento e rapidamente absorvida, ou crônica, quando o agente tóxico é liberado em eventos periodicamente repetidos, em concentrações menores, durante um longo período de tempo. Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo que se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 horas. (RAND & PETROCELLI, 1985).

Danio rerio, peixe-zebra ou paulistinha é uma espécie de peixe que possui boa capacidade para suportar grandes variações de temperatura, pH e dureza da água e também demonstra ótima sensibilidade a elevado número de substâncias químicas sendo reconhecido internacionalmente para uso em ensaios ecotoxicológicos (AKANDE *et al.*, 2010). É muito estudado mundialmente e popular entre os aquaristas. Seu uso em pesquisas teve início em 1930, devido à capacidade de adaptação em condições ambientais naturais e artificiais variadas.

A espécie caracteriza-se como tropical de água doce e é originária da Ásia. Os indivíduos adultos apresentam coloração prateada com listras azul-escuras e dorso de cor verde-oliva. Vivem em média três anos e atingem até cinco cm de comprimento, são onívoros e apresentam comportamento pacífico vivendo em cardumes. O macho apresenta o corpo mais fino e alongado, coloração levemente dourada no abdômen e nadadeiras e listra abdominal completa. A fêmea é mais robusta, maior que o macho e de abdômen saliente, devido à produção de ovos (AKANDE *et al.*, 2010).

Esse organismo fornece um novo modelo de vertebrado para rastreio de alto rendimento para efeitos de desenvolvimento da exposição química. Muitas características da biologia do peixe-zebra, incluindo tamanho pequeno, desenvolvimento embrionário rápido e altas taxas de reprodução, tornam este sistema modelo muito atraente para avaliação rápida dos efeitos de potenciais tóxicos no desenvolvimento (McCOLLUM *et al.*, 2011).

A genotoxicidade é uma especialidade recente, e se situa na interface entre a toxicologia e a genética, por isto frequentemente denominada de genética toxicológica. Esta visa o estudo os processos que alteram a base genética da vida querem seja na sua estrutura física e química, o ácido desoxirribonucleico (DNA), processo classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético a níveis celulares e orgânicos, identificados, respectivamente, como carcinogênese e teratogênese (SILVA *et al.* 2007).

Os micronúcleos (MN) são ferramentas utilizadas em testes de genotoxicidade. Eles resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos que se atrasam, em relação aos demais, em sua migração para os polos da célula em anáfase. Os micronúcleos podem ser formados pela interação de agentes químicos, físicos ou biológicos com estruturas não-fenômicas, como o fuso mitótico e o cinoceto, promovendo distúrbios na maquinaria mitótica e, conseqüentemente, falhas na segregação cromossômica. Esses agentes também podem afetar o DNA diretamente, gerando quebras cromossômicas, que podem ser visualizadas e quantificadas através de testes de micronúcleos. Este teste também tem sido utilizado para avaliar a toxicidade de produtos químicos e agentes poluidores e a resposta citogenética de organismos aquáticos em ambientes contaminados (AL-SABTI e METCALFE, 1995).

O presente trabalho está escrito em um capítulo, na forma de artigo científico, intitulado “Efeito tóxico agudo e genotóxico causado pela formalina em *Danio rerio* (peixe-zebra): avaliação de concentrações seguras para uso profilático na aquicultura”. Teve como objetivo avaliar o uso seguro da formalina em processos de desinfecção em pisciculturas comerciais e avaliar os possíveis efeitos tóxicos e genotóxicos deste químico, além de determinar suas concentrações letais para o peixe *Danio rerio*.

Referências bibliográficas

- AKANDE, M.G.; ORN, S.; NORRGREN, L. 2010 Evaluation of the Toxic Effects of Clozapine in Zebra fish (*Danio rerio*) embryos with the Fish Embryo Toxicity Test. *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research*, 1: 90-94.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. 1995 Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343: 121-35.
- CARRASCHI, S.P.; CUBO, P.; SCHIAVETTI, B.L.; SHIOGIRI, N.S.; CRUZ, C. PITELLI, R.A. 2011 Efeitos tóxicos de surfactantes fitossanitários para o peixe mato grosso (*Hyphessobrycon eques*). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 33: 191-196.
- FAJER-ÁVILA, E.J.; PARRA, I.A.; AGUILAR-ZARATE, G.; CONTRERAS-ARCE, R.; ZALDÍVAR-RAMÍREZ, J.; BETANCOURT-LOZANO, M. 2003 Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. *Aquaculture*, 223: 41-50.
- GARCIA, F; FUJIMOTO, R.Y.; MARTINS, M. L.; MORAES, F.R. 2003 Parasitismo de *Xiphophorus* spp. por *Urocleidoides* sp. e sua relação com os parâmetros hídricos. *Boletim do Instituto de Pesca*. 29: 123-131.
- HSDB – Hazard Substances Data Base – *Formaldehyde*. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov>>. Acesso em 26 set. 2017.
- KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. 2001 *Toxicologia: A Ciência Básica dos Tóxicos*. 5ª ed. Alfragide: Mcgraw-hill, 472p.
- MAGALHÃES, D.P.; FILHO, A.F. 2008 A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12(3): 355-381.
- MARTINS, M.L., 2004 Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aqüicultura brasileira, 357-70p. In: RANZANI-PAIVA, M.J., TAKEMOTO, R.M., LIZAMA, M.A.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Editora Varela.
- McCOLLUM, C. W.; DUCHARME, N. A.; BONDESSON, M.; GUSTAFSSON, J. 2011 Developmental toxicity screening in Zebrafish. *Birth Defects Research*, 67-114.
- RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R. 1985 *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washington, 665p.
- SANTANA, J. M.; DOS-REIS, A.; TEIXEIRA, P. C.; FERREIRA, F. C.; FERREIRA, C. M. 2015 Median lethal concentration of formaldehyde and its genotoxic potential in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 1-5.

- SILVA, G. N.; DE CAMARGO, E. A.; SALVADORI, D. M.; RIBEIRO, D. A. 2007 Genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to antimicrobial endodontic agents. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endontology*, 104: 58-61.
- VALLADÃO, G. M. R., GALLANI, S. U., PILARSKI, F. 2014 Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 417-428.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2006 *Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-Tert-Butoxypropan-2-ol*. International Agency for Research on Cancer (IARC) monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France. 497p.

CAPÍTULO 1

EFEITO TÓXICO AGUDO E GENOTÓXICO CAUSADO PELA FORMALINA EM *Danio rerio* (PEIXE-ZEBRA): AVALIAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES SEGURAS PARA USO PROFILÁTICO NA AQUICULTURA

Resumo

A formalina é um agente de fácil dissolução e utilizado como produto sanitizante, doméstico e hospitalar. É um dos produtos químicos mais utilizados como agente de cura, além de ter ação como desinfetante, fungicida e conservante. As soluções de formol são intensamente usadas na aquicultura para a profilaxia e tratamento de parasitas e fungos, mas os efeitos adversos da sua aplicação precisam ser melhor investigados. O *Danio rerio* ou peixe-zebra possui grandes vantagens de manejo e criação e alta sensibilidade a produtos químicos, sendo um modelo experimental ideal para este tipo de investigação. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos tóxicos e genotóxicos da formalina e determinar as concentrações letais e genotóxicas desse químico, para subsidiar seu uso seguro em processos de desinfecção nas pisciculturas comerciais. Os ensaios agudos e crônicos foram realizados utilizando-se metodologias da ASTM (American Society for Testing and Materials), pela APHA (American Public Health Association) e ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Para verificar o possível efeito genotóxico utilizou-se o Teste de micronúcleos que foi realizado ao longo do ensaio crônico. Foram coletadas amostras sanguíneas em 0h, 96h e 192h de exposição. A CL_{50-96h} da formalina para o *D. rerio* foi de $45,73\text{mg.L}^{-1}$. Este valor está próximo das concentrações utilizadas em banhos de tratamento de doenças de peixes. Nas contaminações com a formalina houve uma relação positiva de micronúcleos de acordo com o aumento da concentração do químico ao longo do tempo. À medida que a concentração de formalina aumenta, a incidência de micronúcleos cresce e a adição de 1mg.L^{-1} desse químico corresponderia a um aumento de 2,9% no número médio de micronúcleos. Em outras palavras, a formalina mesmo em concentrações crônicas causou efeitos genotóxicos ao longo do tempo em eritrócitos do sangue periférico de *D. rerio*. Assim recomendamos mais estudos e outros testes envolvendo este químico para o uso de concentrações ambientalmente seguras.

Palavras chave: formol, formaldeído, ensaio agudo, micronúcleo.

ACUTE AND GENOTOXIC TOXIC EFFECT CAUSED BY FORMALIN IN *Danio rerio* (ZEBRAFISH): ASSESSMENT OF SECURE CONCENTRATIONS FOR PROFILATIC USE IN AQUACULTURE

Abstract

Formalin is an easily dissolving agent and used as a sanitizing, household and hospital product. It is one of the most used chemicals as a curing agent, besides acting as a disinfectant, fungicide and preservative. Formaldehyde solutions are intensively used in aquaculture for the prophylaxis and treatment of parasites and fungi, but the adverse effects of their application need to be further investigated. *Danio rerio* or zebrafish has great handling and creation advantages and high sensitivity to chemicals, being an ideal experimental model for this type of investigation. Thus, the objective of this study was to verify the toxic and genotoxic effects of formalin and determine the lethal and genotoxic concentrations of the product to support the safe use of this substance in disinfection processes in commercial fish farms. Acute and chronic assays were performed using ASTM (American Society for Testing and Materials), APHA (American Public Health Association) e ABNT (Brazilian Association of Technical Standards). To verify the possible genotoxic effect the Micronucleus Test was used that was carried out during the chronic test. Blood samples were collected at 0h, 96h, and 192h of exposure. The 96 hours median lethal concentration of formalin for *D. rerio* was 45.73mg.L^{-1} . This value is close to the concentrations used in fish disease treatment baths. In the contaminations with the formalin, there was a positive relation of micronuclei according to the increase of the concentration of the chemical over time. As the formalin concentration increases, the incidence of micronuclei increases and the addition of 1mg.L^{-1} of this chemical would correspond to a 2.9% increase in the mean number of micronuclei. In other words, formalin even at chronic concentrations caused genotoxic effects over time in peripheral blood erythrocytes of *D. rerio*. We therefore recommend further studies and other tests involving this chemical for the use of environmentally safe concentrations.

Keywords: formalin, formaldehyde, acute test, micronucleus.

Introdução

A formalina é uma solução aquosa com 37% a 40% de formaldeído, volátil e irritante. Segundo a World Health Organization – WHO (2006) esta substância causa câncer em ratos de laboratório e pode causar hipersensibilidade ao contato e danos no pulmão em humanos. Mesmo com estas ressalvas a formalina é um dos principais produtos químicos utilizados na aquicultura para a profilaxia e o tratamento de parasitas e fungos de organismos aquáticos.

Trabalhos sobre a eficiência do uso desse químico na aquicultura têm sido realizados no Brasil (ARAÚJO *et al.*, 2004; KLEIN *et al.*, 2004; PAIXÃO *et al.*, 2013), porém ainda não existe legislação específica para o uso adequado deste químico. No uso da formalina destacam-se sua solubilidade em água, ser um produto biodegradável e não bioacumulativo, de preço acessível e ubíquo (JOHNSON *et al.*, 2003; SANTANA *et al.*, 2015). As desvantagens relacionam-se ao pH ácido entre 2,0 e 4,0 e provável carcinogenicidade para humanos.

As concentrações ideais e possíveis resíduos da formalina que podem ser lançados no ambiente aquático precisam ser estudados. Para este tipo de investigação o *Danio rerio* ou peixe-zebra é o modelo experimental ideal, pois apresenta boa capacidade para suportar variações de temperatura, pH e dureza da água, além de ser reconhecido internacionalmente para uso em ensaios ecotoxicológicos (LIESCHKE and CURRIE, 2007). Muitas características da biologia do peixe-zebra, incluindo tamanho pequeno, desenvolvimento embrionário rápido e altas taxas de reprodução, tornam este animal um modelo muito eficiente para avaliação dos efeitos de substâncias químicas (McCOLLUM *et al.*, 2011).

AL-SABTI and METCALFE (1995) destacam os ensaios utilizando peixes como organismo modelo. Os peixes frequentemente respondem aos contaminantes de maneira similar a vertebrados superiores, podendo ser utilizados para rastrear substâncias químicas que apresentam potencial teratogênico ou cancerígeno em humanos. De acordo com HOWE *et al.* (2013) a espécie *D. rerio* apresenta 70% de similaridade com o ser humano sendo ideal para o teste de xenobióticos.

A genotoxicidade é uma especialidade recente, e se situa na interface entre a toxicologia e a genética, por isto frequentemente denominada de

genética toxicológica. Esta visa o estudo os processos que alteram a base genética da vida querem seja na sua estrutura física e química, o ácido desoxirribonucleico (DNA), processo classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético a níveis celulares e orgânicos, identificados, respectivamente, como carcinogênese e teratogênese (SILVA *et al.*, 2007).

Os possíveis efeitos genotóxicos da formalina em organismos aquáticos podem ser investigados através da incidência dos micronúcleos nos eritrócitos do sangue periférico desses animais. O micronúcleo (MN) é uma pequena massa nuclear contendo DNA, delimitada por membrana e sem conexão com o núcleo principal, que resulta de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que se perderam do núcleo principal durante a divisão celular. Eles ocorrem por disfunções no fuso mitótico; ou pela falta ou defeito no centrômero, impossibilitando a ligação com as fibras do fuso; ou de quaisquer mecanismos falhos que permitem a distribuição incorreta dos cromossomos após a anáfase, em virtude da presença de xenobióticos (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013; DAVARI *et al.*, 2012; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2011; FENECH, 2000).

O Teste de Micronúcleos consiste na contagem dos fragmentos acêntricos contendo DNA, que são uma resposta citogenética dos organismos aquáticos aos xenobióticos, ambientes contaminados, idade e agentes estressores (AL-SABTI and METCALFE, 1995, FERREIRA *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2003). As alterações nucleares eritrocíticas são excelentes marcadores de instabilidade genética devido as vantagens como simplicidade, confiabilidade e sensibilidade (HARABAWY ASA and MOSLEH YYI, 2014). Apesar dessas características, sabe-se que a incidência de MN no sangue depende de dois fatores principais associados à sua gênese e sua remoção da corrente sanguínea. Em peixes, sua criação ocorre na porção de rim que está localizado no tecido hematopoiético, enquanto a remoção de eritrócitos está associada a diferentes órgãos como fígado e baço dependendo da espécie (DIAZ-SATIZABAL and MAGOR, 2015).

Para subsidiar o uso seguro da formalina em processos de desinfecção em pisciculturas comerciais, propusemos este estudo com o objetivo de avaliar

os possíveis efeitos tóxicos e genotóxicos da formalina, e determinar as concentrações letais desse químico para o peixe *Danio rerio*.

Materiais e Métodos

O trabalho foi executado no Laboratório de Toxicologia Aquática do Instituto de Pesca, SP. Foram adquiridos exemplares de *D. rerio* de um fornecedor comercial no mesmo estado. Utilizamos animais adultos para possibilitar a retirada de sangue periférico. As normas técnicas para condução dos ensaios preliminares, agudo e crônico seguiram as recomendações feitas pela ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 15088:2016) e internacionalmente as normas da APHA - American Public Health Association (2005) e ASTM - American Society for Testing and Materials (2014). Os experimentos foram conduzidos com a permissão do Comitê de Ética e Experimentação Animal do Instituto de Pesca (Protocolo N^o 1535).

O delineamento experimental realizado consistiu em dois testes realizados independentemente: um teste agudo (96h), e um teste crônico (192h), precedidos de testes preliminares. Todos os testes foram conduzidos em sistema semi-estático com quatro réplicas simultâneas.

Os organismos utilizados durante os ensaios preliminar e agudo foram previamente aclimatados por sete dias em sala climatizada a 25°C±1, com fotoperíodo controlado de 12:12h. Estes animais foram alimentados diariamente duas vezes ao dia com 1% da biomassa do aquário, com ração farelada (TETRAMIN®) até o momento dos testes. As análises de pH, oxigênio dissolvido e temperatura foram analisadas pela sonda multiparâmetro HORIBA® e amônia total (NH₄) e cloro foram feitas com testes colorimétricos da marca LABCON®. A amônia tóxica (NH₃) foi calculada de acordo com a temperatura e pH. A água usada em todos os tanques de aclimação e posteriormente nos ensaios foi proveniente da rede de abastecimento público (SABESP) declorada por pernoite.

As soluções estoque de formalina (Labsynth®) na concentração de 100g.L⁻¹ era preparada sempre no dia exato de cada exposição em balão de 500mL sendo 125mL de formalina e 375mL de água destilada. Todos os peixes foram pesados no início do experimento.

Sedação

Alguns testes preliminares para a sedação de *D. rerio* usando benzocaína com o objetivo de determinar a concentração ideal que não causasse algum dano ao peixe. Os animais com peso médio de $1,3 \pm 0,3$ g foram anestesiados em três concentrações de benzocaína, elas foram: $0,03 \text{g.L}^{-1}$; $0,05 \text{g.L}^{-1}$ e $0,10 \text{g.L}^{-1}$. Utilizando-se um cronômetro digital, marcou-se o tempo necessário para cada indivíduo cessar os movimentos, tombar e se recuperar. Os animais em recuperação fica em aquários com água limpa sem a presença do anestésico.

Ensaio Agudo

As concentrações de formalina utilizadas foram de 20mg.L^{-1} , 30mg.L^{-1} , 40mg.L^{-1} e 50mg.L^{-1} mais o grupo controle. Os aquários (8L) foram dispostos sobre as bancadas aleatoriamente contendo um peixe por litro, ou seja, oito peixes por aquário e 160 peixes no total. O teste teve a duração de 96 horas e foi conduzido em sistema semi estático, com renovação a cada 24 horas. Não foi oferecido alimento aos animais durante este teste.

Os parâmetros de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido e pH) foram medidos no momento zero (antes da experimentação) e às 96h no término do experimento, utilizando a sonda multiparâmetros HORIBA®.

Ensaio crônico

Durante o experimento, os animais foram mantidos em aquários de 12L na densidade de um peixe por litro, sendo 12 peixes por aquário num total de 240 peixes. A partir dos resultados obtidos na CL_{50-96h} , foram determinadas três concentrações a serem testadas: $CL_{50 \div 2}$, $CL_{50 \div 10}$, $CL_{50 \div 100}$ (FERREIRA *et al.*, 2003; SANTANA *et al.*, 2015), além do controle negativo (sem adição do químico), e do controle positivo (dicromato de potássio). O dicromato de potássio foi usado na concentração de 30mg.L^{-1} de acordo com NAKAGOME *et al.* (2007). A renovação das soluções ocorreu em 96h e o período de exposição foi de 192h (9 dias).

Os animais foram alimentados de dois em dois dias com uma proporção de 0,5% da biomassa do aquário. Os parâmetros de qualidade da água (pH,

temperatura e oxigênio dissolvido) foram avaliados antes e após a renovação das soluções com a sonda multiparâmetros HORIBA®.

Teste do Micronúcleo

Ao longo do teste crônico foram coletadas amostras sanguíneas de dois animais por aquário nos momentos zero (inicial), às 96h e 192h (encerramento) totalizando 102 animais amostrados (FERREIRA *et al.*, 2003). Esses animais após a retirada do sangue não eram mais colocados nos aquários do ensaio, eles ficavam vivos em outro aquário para recuperação da extração de sangue e não faziam mais parte do experimento. Para a retirada do sangue foram usadas agulhas de insulina introduzidas na região da veia caudal do organismo e por extravasamento sanguíneo o sangue foi coletado.

As extensões foram fixadas em metanol PA durante 10 minutos, seca ao ar, imersas em ácido clorídrico 5N por outros 10 minutos, e coradas pelo método de Feulgen por 2h e contra-coradas com o Fast Green (1,5 min).

As lâminas foram analisadas em teste cego, e a leitura foi realizada em microscópio de luz, com objetiva de imersão (100x). A determinação do número de MN foi feita a partir da leitura de 2000 eritrócitos por lâmina. Outras alterações hematológicas como células binucleadas também foram mensuradas (SANTANA *et al.*, 2015).

Análise estatística

A Concentração Letal Mediana foi estimada através Software Gwbasis 3.0 de acordo com o método estatístico “Trimmed Spearman Karber” (HAMILTON *et al.*, 1977).

Para a análise da incidência de micronúcleos utilizamos como ferramenta estatística a ANOVA e o teste *a posteriori* de Tuckey. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,5$. Também utilizamos um modelo linear generalizado (GLM) para prever a incidência de micronúcleos assumindo a distribuição de Poisson como função de distribuição da variável resposta (AGRESTI, 2007). A distribuição de Poisson foi definida pela equação $Y = e^{\beta_0 + \beta_1 x}$, onde Y é igual ao número de micronúcleos esperados, x é a concentração do produto químico, β_0 e β_1 são o intercepto e inclinação do

modelo (LOGAN, 2010). O teste de Wald foi aplicado para analisar a significância de correlação.

Resultados

Os valores das médias dos parâmetros físicos e químicos da água durante a aclimação foram: pH $7,4 \pm 0,1$, oxigênio dissolvido $6,7 \pm 0,2 \text{mg.L}^{-1}$, $25^\circ\text{C} \pm 1$, amônia $0,002 \pm 0,001 \text{mg.L}^{-1}$ cloro ausente e dureza de água mole.

A melhor concentração para anestésiar os animais foi a de $0,05 \text{g.L}^{-1}$. Nesta concentração pudemos observar que o tempo de recuperação do peixe foi menor do que na concentração de $0,1 \text{g.L}^{-1}$, indicando que o anestésico foi menos traumático aos animais (Tabela 1). Todos os animais se recuperaram e ficaram vivos após a retirada do sangue.

Tabela 1. Tempo de tombamento e recuperação dos peixes *Danio rerio* sob a ação da benzocaína (n= 12).

Concentração de Benzocaína	Tempo médio de tombamento	Tempo médio de recuperação
$0,10 \text{g.L}^{-1}$	1'03"	4'02"
$0,05 \text{g.L}^{-1}$	2'	2'
$0,03 \text{g.L}^{-1}$	9'	7'

Durante o teste de toxicidade aguda os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da água mantiveram-se dentro dos padrões esperados para os testes de toxicidade: Controle pH $7,7 \pm 0,1$, oxigênio dissolvido $8,8 \pm 0,1$ e temperatura $20^\circ\text{C} \pm 1$. Nas concentrações de formalina ficaram nas médias: pH $7,6 \pm 0,4$, oxigênio dissolvido $8,5 \pm 0,3$ e temperatura $21^\circ\text{C} \pm 1$ que estão dentro dos valores estabelecidos (ABNT, 2016).

A concentração letal mediana (CL_{50-96h}) da formalina para *D. rerio* com peso médio de $1,9 \text{g} \pm 0,44$ foi de $45,73 \text{mg.L}^{-1}$. Na Figura 1 são apresentados os resultados da mortalidade acumulada dos animais durante o ensaio.

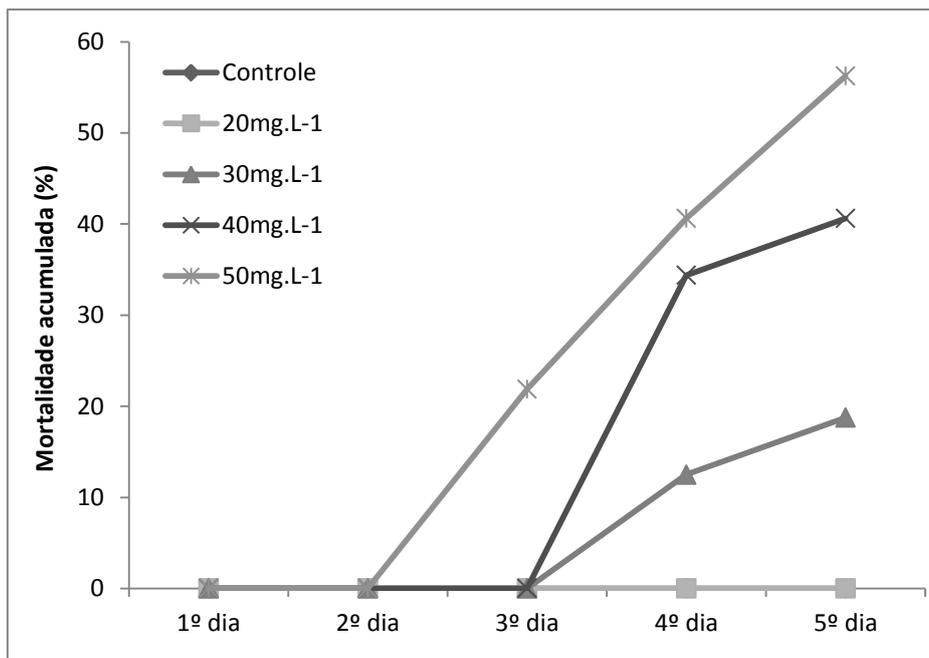


Figura 1. Mortalidade acumulada expressa em porcentagem durante o ensaio agudo com formalina usando o peixe *Danio rerio* em 96h de exposição.

No teste de toxicidade crônica as concentrações de formalina utilizadas foram: $0,45\text{mg.L}^{-1}$, $4,57\text{mg.L}^{-1}$ e $22,86\text{mg.L}^{-1}$. O peso médio dos animais foi de $0,4\text{g}\pm 0,1$. Os valores médios dos parâmetros físicos e químicos da água foram: Controle pH $7,0\pm 0,5$, oxigênio dissolvido $8,0\pm 0,5$ e temperatura 20 ± 1 . Nas concentrações de formalina foi de: pH $7,0\pm 0,7$, oxigênio dissolvido $7,5\pm 1,5$ e temperatura $20^{\circ}\text{C}\pm 1$. No controle positivo (dicromato de potássio) foi de: pH $6,4\pm 0,9$, oxigênio dissolvido $7,2\pm 1,5$ e temperatura $20^{\circ}\text{C}\pm 1$.

A Figura 2 mostra os resultados da mortalidade acumulada dos animais durante o ensaio crônico.

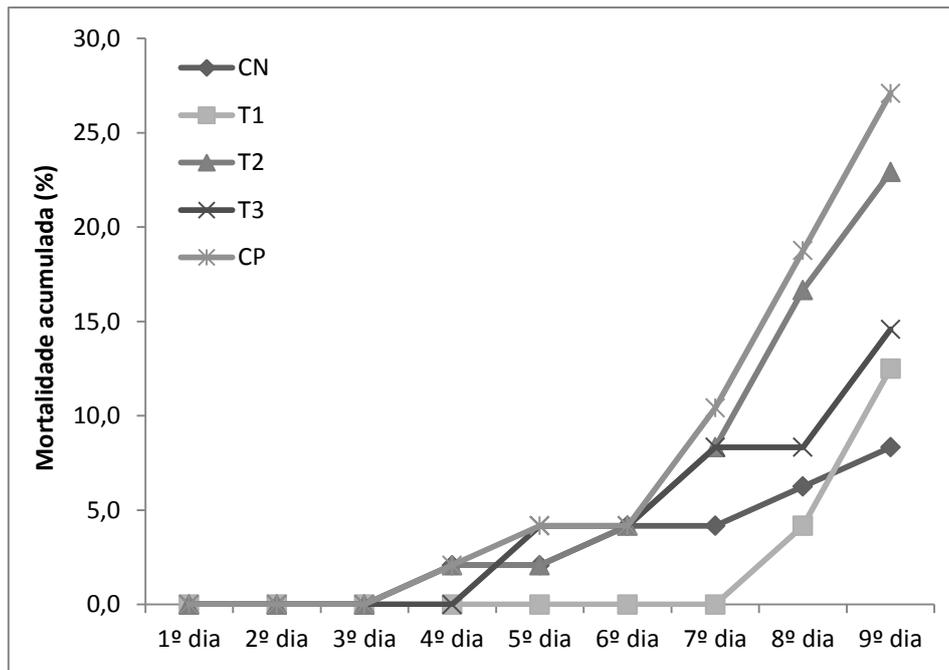


Figura 2. Mortalidade acumulada expressa em porcentagem durante o ensaio crônico com formalina usando o peixe *Danio rerio* em 192h de exposição. CN – Controle negativo; T1: $CL_{50-96h/100} = 0,45\text{mg.L}^{-1}$; T2: $CL_{50-96h/10} = 4,57\text{mg.L}^{-1}$, T3: $CL_{50-96h/2} = 22,86\text{mg.L}^{-1}$; e CP – Controle positivo ($30,00\text{mg.L}^{-1}$).

Para avaliação da genotoxicidade averiguamos primeiramente se houve diferenças significativas na incidência de micronúcleos nos animais do grupo Controle (sem exposição à formalina) antes (Momento Zero), durante (96h) e no final da experimentação (192h) (Figura 3).

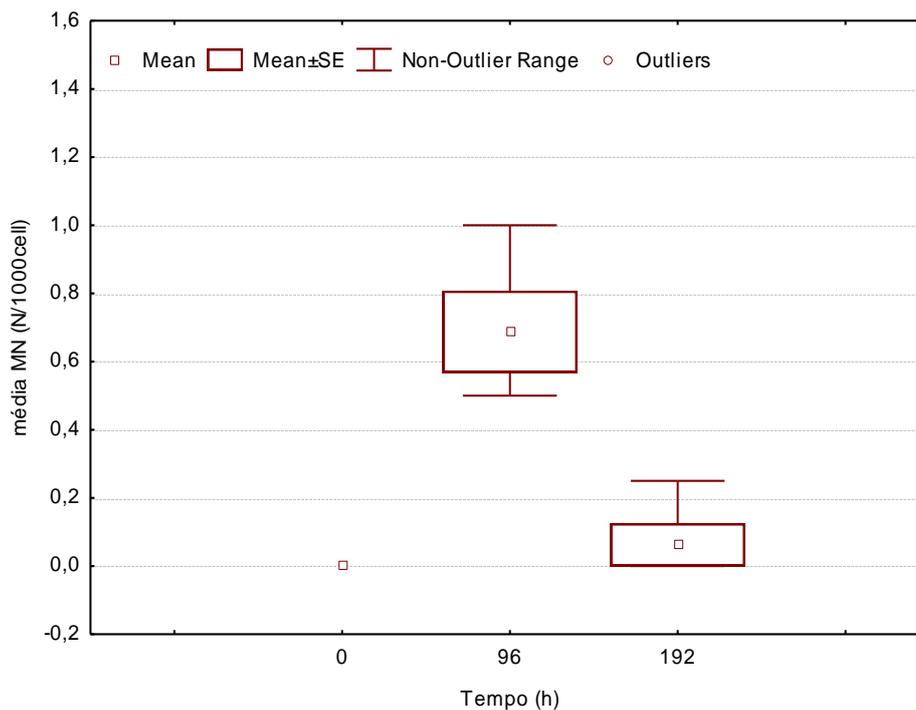


Figura 3. Incidência de micronúcleos em *Danio rerio* nos grupos Controle: sem exposição à formalina antes (Momento Zero), durante (96h) e no final da experimentação (192h).

Os resultados acima mostram que os animais em experimentação, mesmo no grupo controle, tiveram um aumento significativo na incidência de micronúcleos às 96h ($P = 0,00025$). Este tipo de comportamento era esperado, em virtude da adaptação dos animais as condições laboratoriais e mudanças na temperatura e fotoperíodo, com conseqüente alteração na cinética de células sanguíneas.

Em um segundo passo investigamos se houve diferenças significativas na incidência de micronúcleos às 96 e 192h. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa às 96h, mas houve diferenças significativas às 192h ($P < 0,0017$). A análise *a posteriori* de Tuckey mostrou que o grupo Controle negativo foi diferente dos tratamentos T2 – $4,57\text{mg.L}^{-1}$, T3 – $22,86\text{mg.L}^{-1}$ e T5 – Controle positivo (Figura 4).

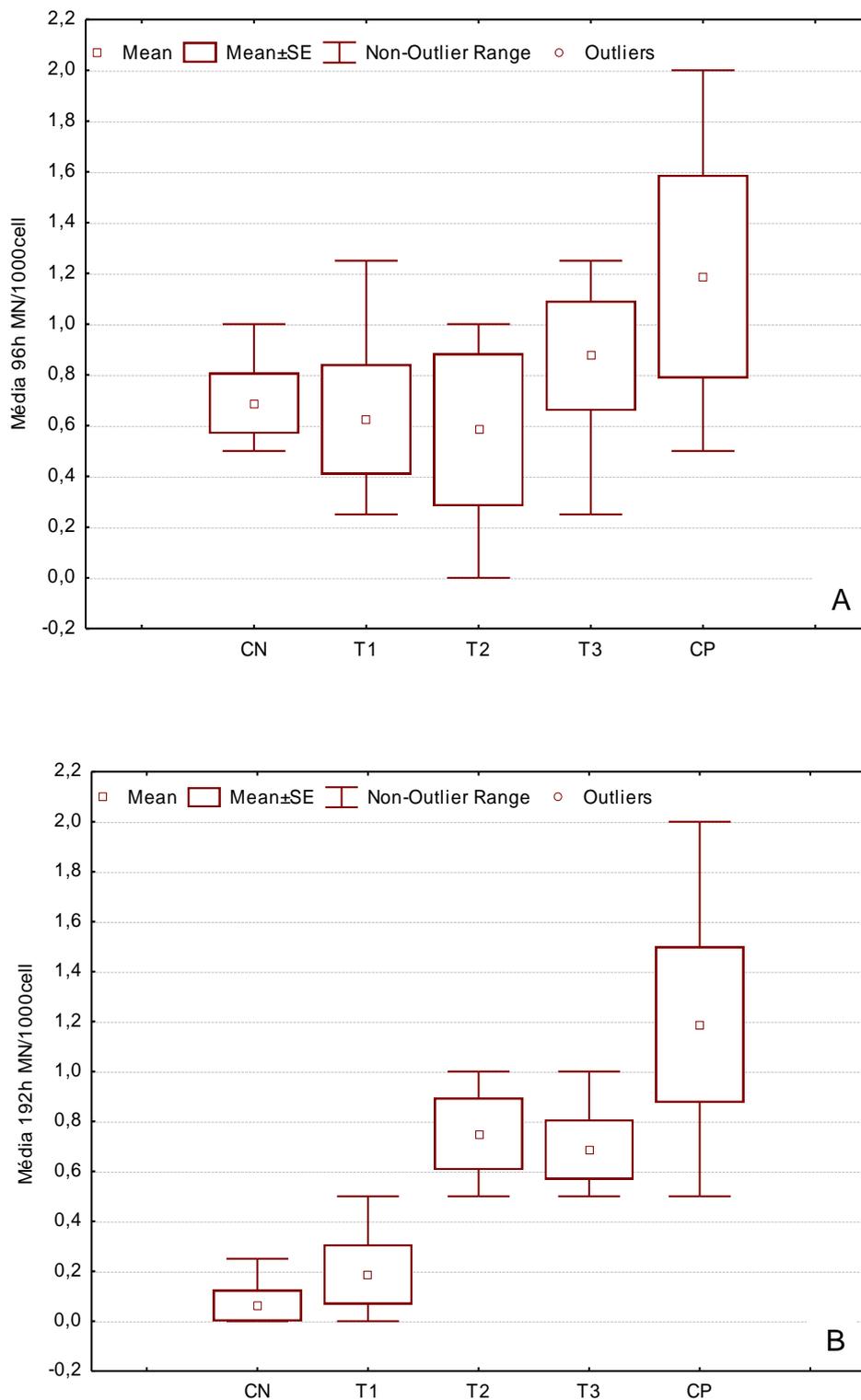


Figura 4. Incidência de micronúcleos em *Danio rerio* as 96h (A) e 192h (B) nos diferentes tratamentos de exposição crônica a formalina: CN – Controle negativo; T1: $CL_{50-96h/100} = 0,45mg.L^{-1}$; T2: $CL_{50-96h/10} = 4,57mg.L^{-1}$, T3: $CL_{50-96h/2} = 22,86mg.L^{-1}$; e CP – Controle positivo ($30,00mg.L^{-1}$). Para atender os requisitos da análise foi retirado um outlier.

Uma análise dois fatores foi realizada para detectar possíveis diferenças entre a incidência de MN às 96 e 192h nos diferentes tratamentos. O resultado revelou diferenças significativas apenas para os tratamentos ($P < 0,0079$).

A Figura 5 representa a equação do modelo linear generalizado (GLM) para prever a incidência de micronúcleos. Houve uma relação positiva entre a incidência de micronúcleos e as concentrações de formalina, sendo que o Teste de Wald foi significativo para esta correlação ($P = 0,010639$). A medida que a concentração de formalina aumenta, a incidência de micronúcleos cresce. A adição de 1mg.L^{-1} desse químico corresponderia a um aumento de um fator de e^{β_1} de MN por organismo, ou seja, a cada adição de 1mg.L^{-1} da formalina provoca o aumento de 2,9% no número médio de MN.

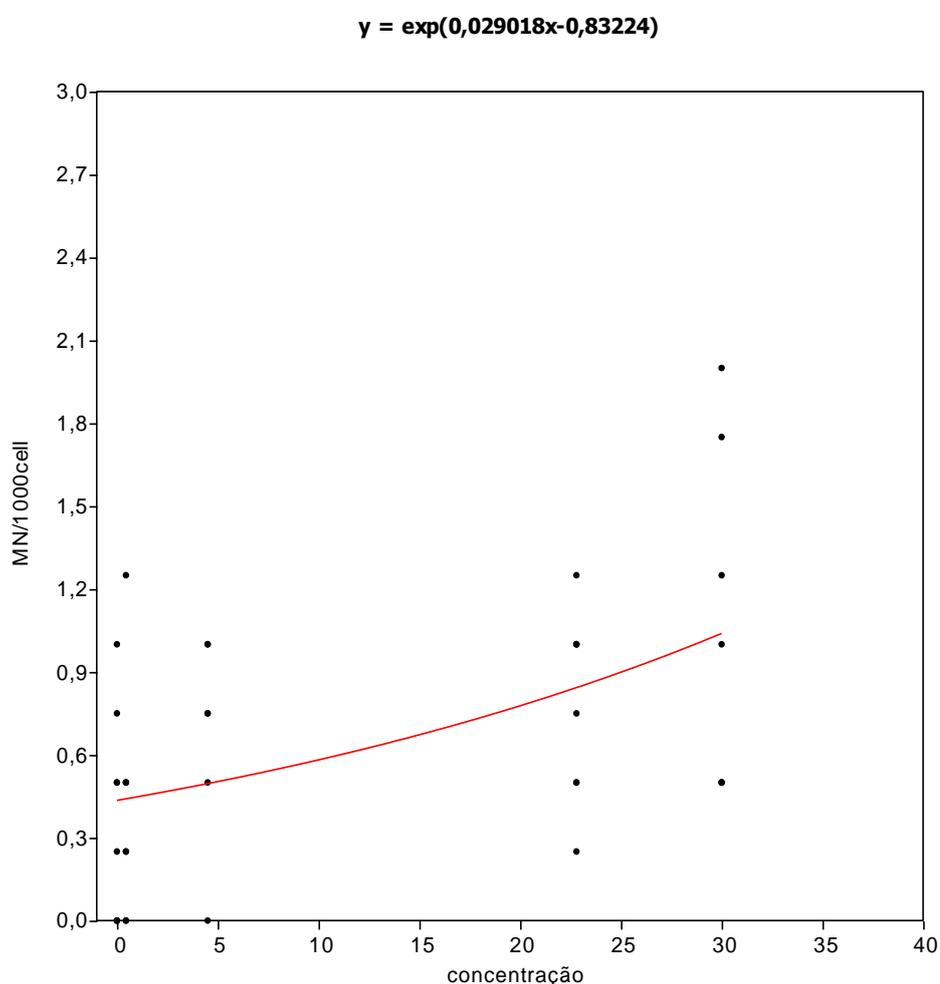


Figura 5. Gráfico modelo linear generalizado (GLM) entre as concentrações de formalina e a incidência de micronúcleos (1000 eritrócitos/lâmina) encontrados durante o teste de toxicidade crônica com *Danio rerio*.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos na quantidade total de células binucleadas ($P < 0,1547$). O número médio dessa anomalia que poderia ocorrer pelo efeito do produto químico foi de $0,98_{\text{cel-Bi}}$ em cada 1000 células.

Na Figura 6 pode-se visualizar eritrócitos do sangue periférico de *D. rerio* com micronúcleo.

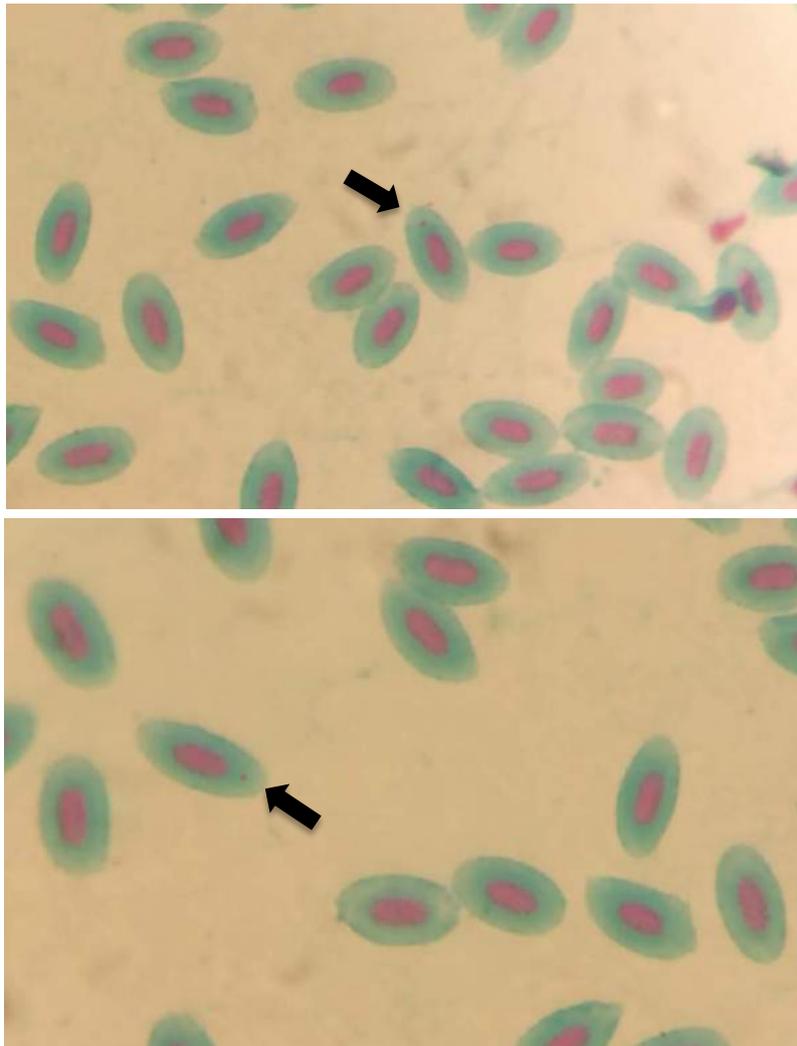


Figura 6. Fotomicrografia de eritrócitos do sangue periférico de *Danio rerio*, evidenciando micronúcleos corados através da reação de Fielgen, devido à exposição à formalina. Aumento de 1000x.

Discussão

O uso da formalina é amplamente discutido na literatura e sua toxicidade varia de espécie para espécie mesmo em condições ambientais ideais de cultivo, onde podem ocorrer riscos de mortalidades quando este químico é utilizado em doses terapêuticas (GANDARA *et al.*, 2002). Além disso, a condição sanitária e nutricional a qual o peixe está anteriormente ao tratamento é importante para sua reposta, pois, peixes parasitados ou peixes desnutridos podem ser mais sensíveis ao tratamento com quimioterápicos e ao manejo. SANTOS & TAVARES-DIAS (2010) complementam ainda que peixes pertencentes a populações naturais podem apresentar comportamentos fisiológicos distintos aos peixes oriundos de regiões impactadas ou mantidos em confinamento.

No Brasil ainda existem poucos trabalhos sobre a eficácia da formalina e quais métodos e concentrações a serem usadas para tratamento de doenças nos peixes. O trabalho de VARGAS *et al.* (2003) mostra que a formalina foi testada em várias concentrações no controle de ectoparasitos em juvenis de *Oreochromis niloticus*. Vários métodos são frequentemente utilizados para tratar ou prevenir a ocorrência de doenças em peixes, sendo que muitos deles são produtos altamente tóxicos se administrados de maneira incorreta ou aplicados sobre espécies mais sensíveis. Estudos realizados com o objetivo de testar a eficácia de drogas utilizadas no combate às doenças são raros. Mais raros ainda, são os que avaliam o efeito secundário dessas drogas, ou seja, as reações que são provocadas ao peixe, como diminuição do desenvolvimento, interferência na taxa de sobrevivência e comportamento (ANDRADE *et al.*, 2005; PAVANELLI *et al.*, 2008).

Neste estudo a CL_{50-96h} da formalina para *D. rerio* adultos foi de $45,73\text{mg.L}^{-1}$. De acordo com ECOTOX (2006) e HSDB (2006) reportam para *D. rerio* e *Pimephales promelas* valores de CL_{50-96h} da formalina de 41mg.L^{-1} e 24mg.L^{-1} , e ANDRADE-PORTO (2015) em *Arapaima gigas* no valor de $36,4\text{mg.L}^{-1}$. DUREZA (1994) reportou um valor de CL_{50-96h} de 148mg.L^{-1} para *Oreochromis niloticus* e, HOHREITER and RIGG (2001) reportou valores de $48,8\text{mg.L}^{-1}$ e $21,78\text{mg.L}^{-1}$ para *Oncorhynchus mykiss* e *Ictalurus punctatus* respectivamente.

Ao compararmos a mortalidade ocorrida no teste agudo e no teste crônico verificamos que na menor concentração de formalina do teste agudo (20mg.L⁻¹) não houve mortalidade em 96h, porém no teste crônico na concentração CL_{50-96h±2} T3 (22,86mg.L⁻¹) houve 15% de mortalidade, a partir de 96h após a reintoxicação dos animais. Talvez esta constatação deva-se possivelmente fato dos peixes do ensaio crônico serem menores que os do agudo refletindo assim maior sensibilidade a formalina.

De acordo com o trabalho de PIRONET and JONES (2000) as concentrações utilizadas para banhos de curta duração estão entre 125 e 250mg.L⁻¹ e, em tratamentos de tempo indefinido, estão entre 15 e 25mg.L⁻¹ o que diz que, em banhos rápidos a quantidade usada de formalina está bem acima das concentrações letais obtidas nesse trabalho e nos banhos sem período determinado está num valor abaixo da concentração letal mediana desse estudo. Isso enfatiza a necessidade de mais estudos sobre as concentrações ideais a serem usadas nos tratamentos em pisciculturas, uma vez que os valores gerados nesse trabalho podem ser boas concentrações para tratar doenças, mas também haverá mortalidade de acordo com espécie e o estado nutricional do organismo.

Alguns trabalhos de tratamentos de doenças em peixes são importantes para demonstrar a eficácia da formalina, como por exemplo, no trabalho de KLEIN *et al.* (2004) onde foram feitos banhos de sete dias com formalina a 25mg.L⁻¹ em juvenis de *Steindachneridion sp* e obteve-se resultado satisfatório com 80% de sobrevivência. No trabalho de ARAÚJO *et al.* (2004) foram banhos de 30, 60 e 120 minutos com adultos de *Colossoma macropomum* em concentrações de 100, 150, 200 e 250mg.L⁻¹ onde 100% dos organismos sobreviveram. Outro exemplo é no trabalho de PAIXÃO *et al.* (2006) com banhos de 24 horas em juvenis de *Pterophyllum scalare* em tratamento de *Capillaria sp* (*Capillariidae*) na concentração de 15mg.L⁻¹ com resultado de 100% de sobrevivência.

Inúmeros testes (SANTANA *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2003; ECOTOX, 2006) têm sido desenvolvidos com organismos aquáticos podendo ser potencialmente usados para análise de químicos genotóxicos. O teste do micronúcleo foi utilizado neste trabalho como ferramenta de análise genotóxica da formalina. A formalina apresenta capacidade de inativar constituintes

celulares, como proteínas e ácidos nucléicos, impedindo assim que compostos celulares realizem suas funções (ROMANO & QUELHAS, 2003). Segundo INTORRE *et al.* (2007) este químico usado em altas concentrações causa em peixes em geral, perda de equilíbrio, natação irregular, hipoatividade e morte.

Nas contaminações com a formalina houve uma relação positiva de micronúcleos de acordo com o aumento da concentração do químico ao longo do tempo. À medida que a concentração de formalina aumenta, a incidência de micronúcleos cresce e a adição de 1mg.L^{-1} desse químico corresponderia a um aumento de 2,9% no número médio de MN. Entretanto, comparando as amostragens as 96h e 192h verificamos diferença estatisticamente significativa apenas na quantidade dessas anomalias. O desenvolvimento de micronúcleos nos peixes do controle negativo pode ter ocorrido em função do estresse de laboratório e das alterações (temperatura e fotoperíodo) as quais os animais foram submetidos. Uma comparação feita do controle negativo com a menor concentração de formalina, evidenciou valores muito próximos indicando que a formalina não causou efeito genotóxicos sobre o fuso mitótico. Já no controle positivo era esperado um valor alto de MN, pois o dicromato de potássio é uma substância conhecida que causa danos genotóxicos em outras espécies de peixes e em outros animais como anfíbios (NAKAGOME *et al.*, 2007). Comparando o controle positivo com a maior concentração de formalina têm-se valores próximos de MN, demonstrando que o efeito genotóxico foi alto. A presença de anormalidades nucleares, além de micronúcleos, tem sido relatada, seja em humanos ou em células de peixes (ÇAVAS and ERGENE-GÖZÜKARA, 2003). Os dados da literatura demonstraram uma relação direta entre a instabilidade genômica e algumas dessas anormalidades, como os botões nucleares, “broken-eggs” e micronúcleos (PACHECO & SANTOS, 1997; FENECH and CROTT, 2002). De acordo com SHIMIZU *et al.* (2003) a formação dessas anormalidades representaria uma maneira de eliminar qualquer material genético amplificado do núcleo celular. Eventualmente, um micronúcleo pode ser eliminado pela célula, dando origem a um micrócito, que seria um eritrócito de tamanho reduzido, microcitose. Provavelmente, a formação de micrócitos seria uma estratégia para manter a integridade da célula, eliminando o material genético excedente.

Apesar de na literatura encontrarmos resultados sugerindo o tratamento de doenças usando a formalina, nesse trabalho demonstramos que mesmo em concentrações crônicas houve mortalidade e o desenvolvimento de micronúcleos nos eritrócitos do peixe-zebra.

Conclusão

A concentração letal mediana 96h obtida nesse estudo está próxima das concentrações utilizadas em banhos de tratamento de doenças de peixes. Entretanto, a formalina mesmo em concentrações crônicas causou efeito genotóxico ao longo do tempo em eritrócitos do sangue periférico de *Danio rerio*. Assim recomendamos outros testes envolvendo este químico para o uso de concentrações ambientalmente seguras.

Referências bibliográficas

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 2016 NBR 15088, *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda. Método de ensaio com peixes*. São Paulo, 19p.
- AGRESTI, A. 2007 *An introduction categorical data analysis*. 2ª ed. New York, 373p.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. 1995 Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, 343: 121-135.
- ANDRADE, R. L. B.; ANDRADE, L. S.; BOSCOLO, W. R; SOARES, C. M. 2005 Comportamento, sobrevivência e desenvolvimento de lebetes, *Poecilia reticulata*, submetidos a agentes utilizados na profilaxia de doenças. *Acta Scientiarum Animal Science*, 27(4): 523-528.
- ANDRADE-PORTO, S. M. 2015 *Formalina no controle de Dawestrema cycloancistrum (Monogenoidea) do Pirarucu Arapaima gigas (SCHINZ, 1822) (Arapaimidae) e seus efeitos toxicológicos, histopatológicos, fisiológicos e residuais, Manaus, Amazonas*. (Dissertação de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA). Disponível em: <<http://pgaquicultura.inpa.gov.br/pgaquicultura/images/Sanny%20Porto.pdf>> Acesso em: 22 set. 2017.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA; AWWA; WPCF. 2005 *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20ª ed. Washington DC.
- ARAÚJO, L. D.; CHAGAS, E. C.; GOMES, L. C.; BRANDÃO, F. R. 2004 Efeito de banhos terapêuticos com formalina sobre indicadores de estresse em tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 217-221.

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. 2014 *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians*. West Conshohocken, PA, 218-238p.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. 2003 Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research*, 538: 81–91.
- DAVARI, H.; HADDAD, F.; MOGHIMI, A.; RAHIMI, M. F.; GHAVAMNASIRI, M. R. 2012 Study of Radioprotective Effect of Green Tea against Gamma Irradiation Using Micronucleus Assay on Binucleated Human Lymphocytes. *Iran Journal Basic Medical Sciences*, 15: 5.
- DIAZ-SATIZABAL L.; MAGOR B.G. 2015 Isolation and cytochemical characterization of melanomacrophages and melanomacrophage clusters from goldfish (*Carassius auratus*, L). *Developmental and Comparative Immunology*, 48: 221–228.
- DUREZA, L.A. 1994 Toxicity of formalin and potassium permanganate to *Oreochromis niloticus* fry and fingerlings and subsequent gill pathology. *Research Digest*, 1(2): 357-358.
- ECOTOX Data Base. 2006 Disponível em: <<https://cfpub.epa.gov/ecotox>>. Acesso em 26 set. 2017.
- FENECH, M. 2000 The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455.
- FENECH, M., CROTT, J., 2002 Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient in human lymphocytes – evidence for breakage – fusion – bridge cycles in the cytokinesis – block micronucleus assay. *Mutation Research*, 504: 131–136.
- FERREIRA, C. M.; GUIMARÃES, H. M. B. ; RANZANI-PAIVA, M. J. ; SOARES, S. R. ; RIVERO, D. H. R. F. ; SALDIVA, P. H. N. 2003 Hematological markers of copper toxicity in *Rana catesbeiana* tadpoles (Bullfrog). *Revista Brasileira de Toxicologia*, 16: 83-88.
- GANDARA, F.; JOVER, M.; GARCÍA-GÓMEZ, A., 2002 Efecto del tratamiento con formol sobre el consumo de oxígeno de juveniles de seriola mediterránea *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *Boletim do Instituto Espanhol de Oceanografia*, 377-388.
- 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.
- HARABAWY ASA, MOSLEH YYI. 2014 The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104: 28–35.

- HOHREITER, D.W.; RIGG, D.K. 2001 Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde. *Chemosphere*, 45: 471-486.
- HOWE, K. *et al.* 2013 The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446): 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>.
- HSDB – Hazard Substances Data Base – *Formaldehyde*. Disponível em: <<http://toxnet.nlm.nih.gov>>. Acesso em 26 set. 2017.
- INTORRE, L.; MEUCCI, V.; DI BELLO, D.; MONNI, G.; SOLDANI, G.; PRETTI, C. 2007 Tolerance of benzalkonium chloride, formalin, malachite green, and potassium permanganate in goldfish and zebrafish. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231.
- JOHNSON, M..L.; BERGER, L.; PHILIPS, L.; SPEARE, R. 2003 Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Disease of Aquatical Organism*, 57: 255-260.
- KIRSCH-VOLDERS, M.; DECORDER, I.; ELHAJOUJI, A.; Aardema, M. J.; FENECH, M. 2011 In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*, 26.
- KLEIN, S.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R.; REIDEL, A.; SIGNOR, A.; SIGNOR A. A. 2004 Utilização de produtos químicos no controle de *Ichthyophthirius multifiliis*, Fouquet (1876) em alevinos de surubim do Iguçu *Steindachneridion sp.*, Garavello (1991). *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 25: 51-58.
- LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. 2007 Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews*, 8: 354-367.
- LOGAN, M. 2010 *Biostatistical Design and Analysis Using R.A. Practical Guide*. Wiley-Blackwell, Oxford. 546p.
- LUZHNA, L.; KATHIRIA, P.; KOVALCHUK, O. 2013 Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics*, 4: 131.
- MCCOLLUM, C. W.; DUCHARME, N. A.; BONDESSON, M.; GUSTAFSSON, J. 2011 Developmental toxicity screening in Zebrafish. *Birth Defects Research*, 67-114.
- NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA JR, C. 2007 Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. *Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 117-122.
- PACHECO, M., SANTOS, M. A. 1997 Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38: 252–259.

- PAIXÃO, L. F.; SANTOS, R. F. B.; RAMOS, F. M.; FUJIMOTO, R. Y. 2013 Efeitos do tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus sp.* (*Osteichthyes: Characidae*). *Acta Amazonica*, 43(2): 211-216.
- PAVANELLI, G.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. 2008 *Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento*. 3ª ed. Maringá, Paraná, Brasil. 311p.
- PIRONET, F. N.; JONES, J. B. 2000 Treatments for ectoparasites and diseases in captive Western Australian huffish. *Aquaculture International*, 81: 349-361.
- ROMANO, J. C.; QUELHAS, M. C. F. *Esterilização por Formaldeído*. Disponível em: <www.hospvirt.org.br/enfermagem/port/formal.html>. Acesso em 26 set. 2017.
- SANTANA, J. M.; DOS-REIS, A.; TEIXEIRA, P. C.; FERREIRA, F. C.; FERREIRA, C. M. 2015 Median lethal concentration of formaldehyde and its genotoxic potential in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 1-5.
- SANTOS, R. B. S.; TAVARES-DIAS, M.; 2010 Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (pisces, *doradidae*) oriundos da bacia do médio rio Solimões. *Boletim do Instituto de Pesca*, 36: 283-292.
- SHIMIZU, N., SHIMUARA, T., TANAKA, T., 2003 Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei, *Mutation Research*, 448: 81–90.
- SILVA, G. N.; DE CAMARGO, E. A.; SALVADORI, D. M.; RIBEIRO, D. A. 2007 Genetic damage in human peripheral lymphocytes exposed to antimicrobial endodontic agents. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endontology*, 104: 58-61.
- SOARES, S. R.; BUENO-GUIMARÃES, H. M.; FERREIRA, C. M.; RIVERO, D. H.; DE CASTRO, I.; GARCIA, M. L.; SALDIVA, P. H. 2003 Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. *Environmental Research*, 92: 191-196.
- VARGAS, L.; POVH, J. P.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; ROCHA, L. B. T. R.; MARONEZE, M. S. 2003 Efeito do tratamento com cloreto de sódio e formalina na ocorrência de ectoparasitas em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidos sexualmente. *Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 6(1): 39-48.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2006 *Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-Tert-Butoxypropan-2-ol*. International Agency for Research on Cancer (IARC) monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France. 497p.

Considerações Finais

A formalina é utilizada na aquicultura para profilaxia e tratamento por possuir ação fungicida, bactericida e parasitária, porém, ainda existem poucos trabalhos que dizem quais as melhores concentrações a serem usadas. Não há relatos de grandes mortalidades nos tratamentos com a formalina apesar de nesse trabalho evidenciarmos que houve efeito genotóxico no organismo em concentrações baixas. A formalina ainda é muito utilizada no Brasil por ser um produto barato e tem-se mostrado muito eficaz no tratamento das doenças, porém, a toxicidade e genotoxicidade ocorrem. A concentração letal mediana da formalina calculada às 96h para adultos de *Danio rerio* no presente estudo foi de $45,73\text{mg.L}^{-1}$. O peixe-zebra, apesar de tolerante a este produto comparativamente com outras espécies de peixes, se mostrou um bioindicador eficaz de genotoxicidade, tendo expressado o aumento da incidência de Micronúcleos de acordo com o aumento das concentrações de formalina a que foi exposto. A exposição crônica a baixas concentrações ($0,45\text{mg.L}^{-1}$, $4,57\text{mg.L}^{-1}$ e $22,86\text{mg.L}^{-1}$) gerou genotoxicidade evidenciada também pela presença de células binucleadas. Tendo como base estes resultados, é plausível propor que este químico precisa ainda ser testado com outros bioindicadores e seu potencial tóxico evidenciado através de mais ferramentas biológicas como histologia de órgãos como, por exemplo, as brânquias e também a contagem de Leucócitos para analisar se houve diminuição dessas células decorrente do efeito da formalina antes de seu uso em tratamentos de doenças na aquicultura, para que a saúde dos organismos aquáticos não seja afetada negativamente.

ANEXOS

ANEXO 1 – Cálculo utilizado nas preparações das soluções:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Onde:

C₁= Concentração inicial (solução estoque);

V₁= Volume a ser pipetado da solução estoque;

C₂= Concentração final (aquela que se pretende preparar);

V₂= Volume final da solução que se deseja preparar.

ANEXO 2 – Pipetagens dos tratamentos do ensaio agudo:

Em 20mg.L⁻¹ adicionou-se 1,6mL do produto diretamente no aquário com água declorada e posteriormente agitou-se. Em 30mg.L⁻¹ foram 2,4mL, em 40mg.L⁻¹ 3,2mL e em 50mg.L⁻¹ 4,0mL da formalina.

ANEXO 3 – Pipetagens dos tratamentos do ensaio crônico:

As 3 concentrações de formalina foram calculadas a partir da CL_{50-96h} do ensaio agudo. Foram: 22,86mg.L⁻¹ para CL_{50/2}, 4,57mg.L⁻¹ para CL_{50/10} e 0,45mg.L⁻¹ para CL_{50/100}.

2,75mL para CL_{50/2}

0,55mL para CL_{50/10}

0,05mL para CL_{50/100}.

ANEXO 4 - A solução de Heparina para o ensaio de micronúcleo foi preparada da seguinte maneira:

Solução de Heparina (5,000ui).....1mL

Solução Salina 7%.....50mL

Essa solução foi preparada e armazenada em geladeira até o uso nos ensaios.

ANEXO 5 - Preparação dos corantes Feulgen (Schiff), Fast Green e Rosenfeld:

Schiff foi preparado da seguinte forma:

- Ferveu-se 200mL de água destilada;
- Deixou esfriar até $\pm 60^{\circ}\text{C}$;
- Adicionou-se 1g de Fucsina Diamante (Merck)
- Agitou até a temperatura cair a 50°C
- Adicionou-se 9g de Metabissulfito de Sódio e agitou;
- Adicionou-se 30mL de ácido clorídrico 1N e agitou;
- Armazenou-se em um fraco revestido em papel alumínio em lugar seco e escuro por 24h;
- Após esse período colocou-se carvão ativado e agitou;
- Foi filtrado em papel filtro por no mínimo 3 vezes até o corante ficasse transparente.

Fast Green foi preparado da seguinte forma:

- Dissolveu-se vagorosamente 0,5g do pó do Fast Green em 100mL de etanol a 95%, triturando os grumos com um bastão de vidro e em seguida filtrou-se em papel filtro.

ANEXO 6 – Figuras ilustrativas



Figura 1. Coleta de sangue através de uma seringa com agulha de insulina na região da veia caudal do peixe *Danio rerio*

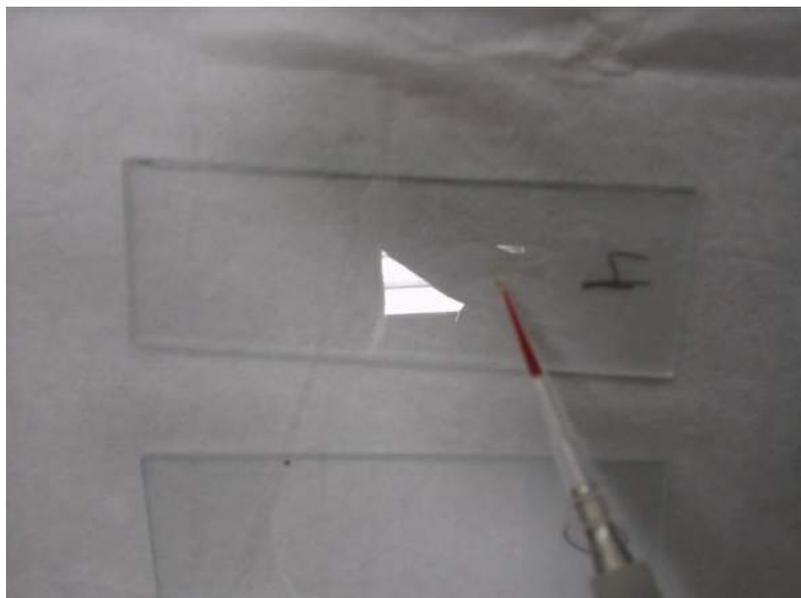


Figura 2. Sangue retirado da veia caudal do peixe *Danio rerio* sendo posto na lâmina para realizar a extensão sanguínea

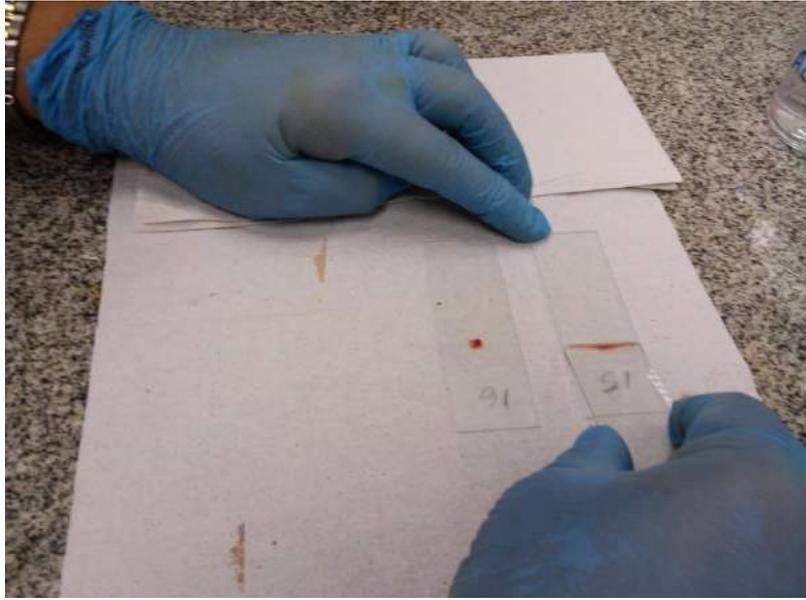


Figura 3. Extensão sanguínea sendo realizada com sangue periférico da veia caudal do peixe *Danio rerio*