

SENSIBILIDADE DE METODOLOGIAS ALTERNATIVAS DE ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE AGUDA AO SULFATO DE COBRE

Camila Cristina Silva de MENDONÇA¹, Ariele Ferreira RODRIGUES¹, Débora Rodrigues da Silva COLOMBO¹, Magda Regina SANTIAGO², Cíntia BADARÓ-PEDROSO^{1,3}

¹ Pesquisador Científico do Instituto de Pesca, IP - APTA/SAA, São Paulo, SP, Brasil.

² Pesquisador Científico do Instituto Biológico, IB - APTA/SAA, São Paulo, SP, Brasil.

³ Endereço: Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Aquicultura - CPDA, Instituto de Pesca - IP/APTA/SAA. Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, Vila Mariana, CEP: 04.014-900, São Paulo, SP, Brasil. e-mail: cintia.pedroso@sp.gov.br.

Palavras-chave: *Aphanomyces* sp.; *Saprolegnia ferax*; *Brachionus plicatilis*; *Danio rerio*; CI50; CL50.

INTRODUÇÃO

As metodologias alternativas são baseadas no princípio dos 3 Rs (*Replacement, Reduction, Refinement*), que visa o uso de modelos animais de forma a não causar dor e sofrimento aos organismos, substituindo por culturas de tecidos e por animais com sistema nervoso pouco desenvolvido, redução do número de organismos utilizados e aprimoramento das metodologias de ensaios, utilizando materiais e técnicas pouco ou não invasivas, sempre considerando o bem-estar animal (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2019). O objetivo foi avaliar a sensibilidade de metodologias de ensaios de toxicidade aguda com diferentes organismos após exposição ao cobre.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da Unidade Laboratorial de Referência em Patologia de Organismos Aquáticos - ULRPOA do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Aquicultura - CPDA do Instituto de Pesca seguindo-se os procedimentos operacionais padrão, desenvolvidos internamente no laboratório de acordo com FERREIRA *et al.* (2021), e as metodologias padronizadas da ASTM (2004) e OECD (2013). Foi utilizado o sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) como substância de referência e as metodologias de ensaios de ecotoxicidade aguda utilizando os oomicetos *Aphanomyces* sp. e *Saprolegnia ferax*, o rotífero *Brachionus plicatilis* e o embrião do peixe *Danio rerio*, com duração de 72, 48 e 96 horas de exposição, respectivamente. Os valores das concentrações letais (CL) e de inibição (CI) a 50% dos organismos expostos foram calculados utilizando-se o programa TS Karber (HAMILTON *et al.*, 1977) e o método de Interpolação Linear (NORBERG-KING *et al.*, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ordem de sensibilidade apresentada pelas diferentes metodologias alternativas de ensaios agudos com os organismos foi rotífero>embrião de peixe>oomiceto (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de CI50;72h, CI50;48h e CL50;96h após exposição ao cobre (mg L⁻¹) em ensaios estáticos de toxicidade aguda com os oomicetos *Aphanomyces* sp. e *Saprolegnia ferax*, ao rotífero *Brachionus plicatilis* e aos embriões do peixe *Danio rerio*.

Organismo	CI50; 72h (IC)	CI50; 48h (IC)	CL50; 96h (IC)	Fonte
<i>Aphanomyces</i> sp.	4,13 (3,55-4,85)	-	-	Presente trabalho
<i>S. ferax</i>	4,6 (3,28-6,46)	-	-	Presente trabalho
<i>B. plicatilis</i> ^a	-	0,06**	-	DANIEL <i>et al.</i> (2014)
<i>D. rerio</i>	-	-	0,62* (0,26-0,97)	FERREIRA <i>et al.</i> (2021)
	-	-	0,23* (0,21-0,5)	Presente trabalho

IC - intervalo de confiança; *média de três ensaios; **média de cinco ensaios; ^a ensaio realizado na salinidade 15.

O ensaio com o rotífero *B. plicatilis* apresentou sensibilidade na mesma ordem de grandeza do ensaio embrio-larval com o mexilhão *Perna perna* e o ouriço do mar *Lytechinus variegatus* (CIELO *et al.*, 2013), que não possuem um dos pré-requisitos necessários que é a criação em laboratório. Portanto o ensaio com rotífero apresenta potencial para substituição destas duas metodologias de ensaio com organismos marinhos.

O ensaio com embrião do *D. rerio* apresenta sensibilidade na mesma ordem de grandeza com o ensaio utilizando adultos do peixe zebra, o qual apresenta o uso da metodologia proibido em vários países e brevemente será substituído pela metodologia com embriões de peixe zebra no Brasil.

A metodologia de ensaio com os oomicetos, embora tenha apresentado a menor sensibilidade, é muito útil como ensaio “screening” utilizado para rastrear a toxicidade e a eficácia de compostos empregados como quimioterápicos e fitoterápicos em aquicultura.

CONCLUSÃO

Os ensaios realizados apresentaram sensibilidade elevada ao cobre quando comparados com metodologias rotineiramente utilizadas na avaliação da toxicidade de efluentes e amostras tóxicas, bem como apresentam os pré-requisitos necessários para serem consideradas metodologias alternativas.

REFERÊNCIAS

ASTM E1440-91. 2004. Standard guide for acute toxicity test with the rotifer *Brachionus*. ASTM standard. United States: [N. p.].

- CIELO, C.C. Del; MALGARIN, J.; RESGALLA, C. Jr. 2013. Revisão dos ensaios crônicos de curta duração com embriões do mexilhão *Perna perna* (L.). *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(2): 37-43. <http://dx.doi.org/10.5132/eec.2013.02.006>.
- DANIEL, G.; MORAIS, A.V.; RODRIGUES, B.A.; MATÕES-SANTOS, J.; KUCHKARIAN, B.; BORRELY, S.I.; BADARÓ-PEDROSO, C. 2014. Toxicidade aguda do cobre e do azo corante Disperse Red 1 em diferentes salinidades utilizando-se os ensaios com os rotíferos *Brachionus plicatilis* e *Brachionus rotundiformes*. Resumo expandido, XVII Simpósio de Biologia Marinha da UNISANTA, Santos, São Paulo.
- FERREIRA, K.S., TACHIBANA, L.; COLOMBO, D.R. da S.; PAIXÃO, S.C.O. da; FERREIRA, C.M.; BADARÓ-PEDROSO, C. 2021. Toxic effects in *Aphanomyces brasiliensis* and zebrafish embryos caused by oomycetocides. *Diseases of Aquatic Organisms*, 144: 75-87. <https://doi.org/10.3354/dao03575>.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*, 11: 714-719.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.; PERAZZOLO, L.M.; ROSA, R.D. 2019. *Biotecnologia e Sanidade de Organismos Aquáticos*. 1ª ed. São Paulo: ABRAPOA, 504p.
- NORBERG-KING, T.J. 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach. Version 2.0. National Effluent Toxicity Assessment Center. Minnesota. 40p.
- OECD 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>.