

SENSIBILIDADE DO TESTE “FET” COM O PEIXE ZEBRA (*Danio rerio*) EM DIFERENTES ÁGUAS DE DILUIÇÃO

Débora COLOMBO^{1,3}, Cláudia Maris FERREIRA^{1,3}, Carla LIMA², Fernanda IKARI^{1,3}, Karen de SOUZA-FERREIRA^{1,3}, Monica LOPES-FERREIRA², Cintia BADARÓ-PEDROSO^{1,3}

¹ Instituto de Pesca

² Instituto Butantan (Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada CETIcs/Fapesp)

³ Endereço/Address: Centro de Pesquisa de Aquicultura – Instituto de Pesca – APTA – SAA. Av. Francisco Matarazzo, 455 CEP: 05.001-970 – São Paulo – SP – Brasil. e-mail: pedrosos@pesca.sp.gov.br

Palavras chave: Teste de fertilização; sulfato de cobre; dureza; ensaio agudo; eclosão.

INTRODUÇÃO

O peixe zebra (*Danio rerio*) é reconhecido mundialmente como um modelo biológico com características ideais em estudos farmacológicos, médicos e ecotoxicológicos. Apresenta similaridade de 70% com o genoma humano e tem sido cada vez mais utilizado na avaliação e compreensão da atividade farmacocinética de compostos sintéticos nos sistemas imune e reprodutivo. Desde 2005, o ensaio com embrião de *D. rerio* é obrigatório para o monitoramento de efluentes em alguns países da Europa (BRAUNBECK e LAMMER, 2006), em substituição ao ensaio de toxicidade aguda com peixes adultos. A metodologia descrita na OECD (2013) referente ao teste de fertilização com embrião recomenda o uso de água de diluição com 100 mg CaCO₃.L⁻¹, enquanto a ABNT (2007) recomenda água com cerca de 40 mg CaCO₃.L⁻¹ para os ensaios com peixes adultos e larvas recém eclodidas. Portanto o presente trabalho teve como objetivo verificar a sensibilidade do teste FET utilizando-se a substância de referência sulfato de cobre em águas de diluição com durezas 40 e 100.

MATERIAL E MÉTODOS

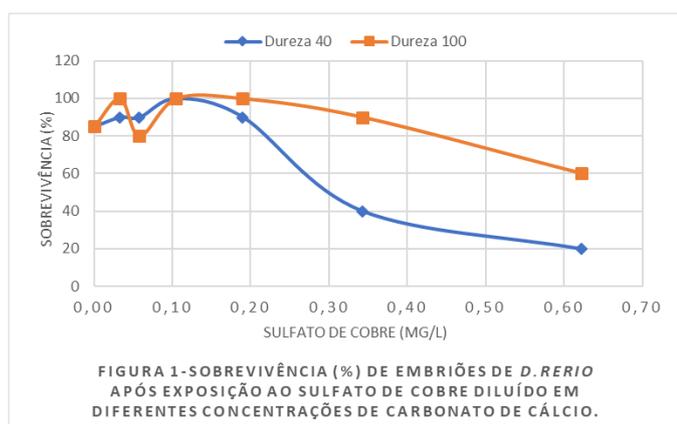
Os ensaios foram realizados em novembro de 2017 no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Recursos Hídricos do Instituto de Pesca seguindo-se as normas da OECD (2013). Os embriões com 1 hpf (hora após a fertilização) foram obtidos de desovas da reprodução do peixe *D. rerio* mantidos na proporção de dois machos para uma fêmea com base nos protocolos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2007) e da Plataforma Zebrafish do Instituto Butantan.

Foi utilizado o sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e a partir da solução estoque de $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em água destilada foram preparadas seis soluções nas concentrações nominais de 0,033; 0,058; 0,105; 0,190; 0,343 e $0,622 \text{ mg Cu} \cdot \text{L}^{-1}$ em água preparada com dureza 40 e $100 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Seguiu-se a metodologia do teste “FET” - Teste de toxicidade aguda com embriões de peixe (OECD, 2013) com modificações referentes ao número de replicatas utilizadas: vinte no controle negativo constituído de água de diluição com durezas 40 e 100, e dez em cada um dos tratamentos com cobre. O ensaio estático com duração de 96hs foi conduzido em placas de cultivo celular com 24 poços contendo 1 ovo por poço em 2 mL de amostra, em câmara incubadora na temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12h de luz.

A cada 24 horas, foram feitas leituras das placas utilizando-se quatro parâmetros biológicos como indicadores de letalidade: (a) coagulação de ovos fertilizados, (b) a falta de formação de somito, (c) ausência de separação entre o pedúnculo caudal e o saco vitelínico, e (d) ausência de batimentos cardíacos. Ao final das 96hs, a toxicidade aguda foi determinada com base num resultado positivo em qualquer um dos quatro parâmetros, e a concentração necessária para produzir a morte de 50% dos indivíduos expostos (CL_{50} ; 96h) foi calculada utilizando-se o programa Trimmed Spearman Karber (HAMILTON *et al.*, 1977). A ausência de eclosão dos embriões foi utilizada como parâmetro biológico de efeito subletal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 1 é apresentada a sobrevivência (%) de embriões do peixe zebra após 96 hs de exposição ao sulfato de cobre diluído em diferentes concentrações de carbonato de cálcio.

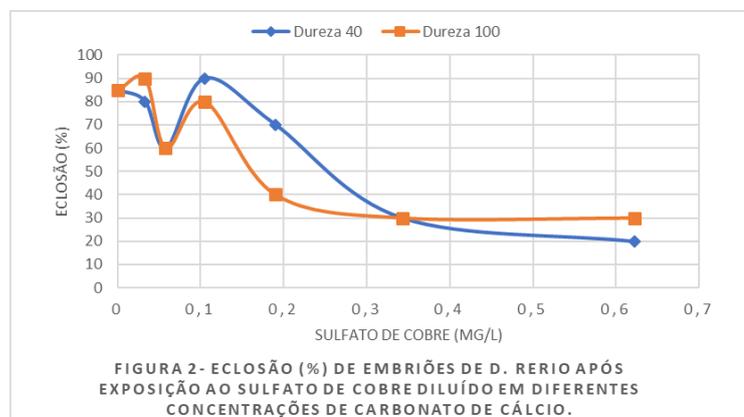


O cálculo e a estimativa dos valores das CL_{50} em 96 hs derivados dos dados de sobrevivência plotados na Fig. 1 resultaram em $0,35 \text{ mgCu} \cdot \text{L}^{-1}$ (IC: 0,24-0,5) para a dureza 40 e $> 0,6 \text{ mgCu} \cdot \text{L}^{-1}$ para a dureza 100, respectivamente. Esta diferença de sensibilidade pode ser explicada pela maior toxicidade dos metais em águas mais moles como foi observado por

POURKHABBAZ *et al.* (2011) ao estudarem os efeitos da dureza da água e os metais cobre e zinco na sobrevivência do peixe *Gambusia holbrooki*.

No entanto, não explica a maior sensibilidade para o parâmetro eclosão, que pode estar relacionada com as diferentes fases do ciclo de vida do organismo, onde o córion, presente no ovo, funciona como uma barreira física que impede a entrada de contaminantes, enquanto nas fases posteriores até a eclosão do embrião esta barreira protetora está ausente (BRAUNBECK e LAMMER, 2006).

Na Fig. 2 é apresentada a eclosão (%) de embriões do peixe zebra após 96hs de exposição ao sulfato de cobre diluído em diferentes concentrações de carbonato de cálcio.



CONCLUSÃO

O uso do sulfato de cobre como substância de referência em água de diluição modula as alterações de desenvolvimento do embrião utilizadas como parâmetros de avaliação de toxicidade. Nossos dados mostram não haver diferença entre as respostas avaliadas quando os organismos nas suas diferentes fases do ciclo de vida são expostos somente às águas de diluição com durezas 40 e 100 mg CaCO₃.L⁻¹ e, que a diminuição da dureza da água em conjunto com o cobre potencializa o efeito do metal resultando no aumento da toxicidade observada.

REFERÊNCIAS

- ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2007 *Ecotoxicologia Aquática- Ecotoxicidade crônica de curta duração- Método de ensaio com peixes*. ABNT, NBR 15499.
- BRAUNBECK, T.; LAMMER, E. 2006 Fish embryo toxicity assays. UBA Contract number 20385422. Aquatic Ecology and Toxicology Department of Zoology, University of Heidelberg, Germany.

- 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.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. 2013 *Guidelines for the testing of chemicals- Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*.
- POURKHABBAZ, A.; KASMANI, M.E.; KIYANI, V.; HOSYNZADEH, M.H. 2011 Effects of water hardness and Cu and Zn on LC₅₀ in *Gambusia holbrooki*. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 23(4): 224-228.