

- [Introdução](#)
- [Testes de toxicidade](#)
- [Exemplos de bioensaios](#)
- [Manutenção dos peixes](#)
- [O teste](#)
- [Água reconstituída](#)
- [Concentrações - testes](#)
- [Controle positivo e controle negativo](#)
- [O que observar - endpoints](#)
- [Trabalho dos dados e resultados](#)
- [Referências](#)

[watch movies](#)   [watch movies](#)   [watch movies](#)   [watch movies](#)

## INTRODUÇÃO

Ecotoxicidade é um termo atualmente muito em voga, dada a necessidade de se conhecer os efeitos que produtos químicos lançados no meio ambiente podem ter sobre indivíduos, sobre populações e comunidades de organismos, além de se conhecer como o homem pode ser afetado. Nos últimos anos, em especial no pós-Revolução Industrial, uma imensa gama de substâncias químicas foram produzidas de forma intencional ou como sub-produto de atividades produtivas. Algumas dessas substâncias são essencialmente artificiais, outras, apesar de terem ocorrência natural, tiveram sua concentração aumentada no meio ambiente.

Muitos metais, hormônios, derivados do petróleo, dioxinas e furanos são exemplos de substâncias de ocorrência natural, mas que são motivo de preocupação dada a alta concentração que são encontradas em alguns locais e dada a capacidade de provocar danos aos seres vivos. Metais não são degradáveis, e podem se acumular no tecido de organismos vivos causando disfunções de metabólicas e até mesmo má-formações em fetos humanos. Hormônios podem causar desregulações endócrinas com consequências no crescimento, no desenvolvimento e na reprodução. Alguns HPAs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos), encontrados em combustíveis fósseis como carvão e petróleo, se acumulam nas gorduras de animais, e são carcinogênicos, ou seja, provocam câncer. Dioxinas e furanos são produzidos na queima de carvão e também de florestas; são bastante tóxicas e comprovadamente carcinogênicas.

Outras substâncias como pesticidas e substâncias farmacêuticas não existiam na natureza,

mas foram criadas pelo homem. Outra classe de substâncias com crescente preocupação são os chamados produtos de nanotecnologia, ou simplesmente nanopartículas. Estas são definidas como materiais particulados com pelo menos uma dimensão menos que 100 nanômetros (nm), sendo 1 nm igual a  $10^{-9}$  m. Sua aplicação tem sido desde componente de drogas, passando por nanotubos com aplicação em ótica, eletrônica e arquitetura. No entanto, existem relatos de danos à saúde humana e a efeitos tóxicos em microcrustáceos e copépodos (CHAPMAN, 2006).

Ecotoxicologia pode ser entendida com a junção de ecologia e toxicidade. Ecologia é o estudo da interação dos seres vivos entre si e com o meio ambiente em que vivem; toxicologia é uma ciência que procura entender os tipos de efeitos causados por substâncias químicas, bioquímicas e os processos biológicos responsáveis por tais efeitos, levando em conta a sensibilidade de diferentes tipos de organismos à exposição de substâncias químicas e as relativas toxicidade de diferentes substâncias. O objetivo da ecotoxicologia seria então entender e prever efeitos de substâncias químicas em seres vivos e comunidades naturais (CHAPMAN, 2002).

Já há alguns anos, a ecotoxicologia tem sido usada também como parâmetro legal de regulamentação de qualidade de água, de efluentes e de sedimento. A Resolução Conama nº 344/04 instituiu testes ecotoxicológicos para casos de disposição de sedimento a ser dragado quando a concentração algumas substâncias podem oferecer risco. Já a Resolução Conama nº 357/05 instituiu o uso de testes ecotoxicológicos tanto como parâmetro de qualidade das águas como de efluentes. Além dessas legislações em nível federal, diversos estados possuem suas legislações próprias que regulamentarizam e dão diretrizes para o uso desses testes, como os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo, dentro outros.

## TESTES DE TOXICIDADE

A ecotoxicologia pressupõe o uso de testes de toxicidade com organismos, também chamados bioensaios. Bioensaios são testes feitos em laboratório que determinam o grau ou o efeito biológico de uma substância desconhecida ou de uma substância-teste (como drogas, hormônio, químicos, etc); o teste é feito através de comparação experimental do efeito da substância testada com efeitos causados por uma substância conhecida, em uma cultura de células vivas ou em um organismo-teste (USEPA).

Os bioensaios diferem principalmente quanto ao tempo de exposição do organismo-teste ao agente ou substância a ser testado. Portanto, os bioensaios podem ser agudo ou crônicos. Teste de toxicidade aguda são estudos experimentais feitos com organismos-teste que determinam se um efeito adverso observado ocorre em um curto período de tempo (em geral até 14 dias) após administração de uma única dose da substância testada ou após múltiplas dosagem administradas em até 24 horas. Já nos testes de toxicidade crônica, os organismos-teste são observados durante uma grande parte do seu tempo de vida, quando acontece a exposição ao agente-teste; os efeitos crônicos persistem por um longo período de tempo, e podem ser evidentes imediatamente após a exposição ou não (DUFFUS, 1993).

Através dos bioensaios pode-se chegar a diversas conclusões, por exemplo:

1.

Concentração na qual a substância provoca efeito adverso observado em 50% dos indivíduos observados (EC50)

2.

A substância é capaz de provocar câncer (carcinogenia)

3.

A substância é capaz de provocar danos ao feto (teratogenia)

4.

A substância é capaz de desregular a atividade endócrina (desruptor endócrino)

5.

A substância é capaz de deformar alguma estrutura do tecido (ex. calcificações) ou da célula (ex. deformações no retículo endoplasmático, lisossomo, etc).

6.

A substância tem tendência a se acumular em tecido específico (ex. adiposo, nervoso) ou órgão (ex. fígado, rim).

### EXEMPLOS DE BIOENSAIOS

#### Bioensaio com peixe paulistinha (*Danio rerio*)

\_Dentre os organismos-teste mais amplamente utilizado está o peixe popularmente conhecido como paulistinha ( *Danio rerio*), em inglês zebrafish. Esse peixe atinge de 3 a 5 cm quando adulto, é de origem indiana e possui um ciclo de vida rápido, que se completa em 3 meses. Em laboratório é de fácil manutenção e produz grande quantidade de ovos translúcidos, portanto de fácil observação sob lupa.

A fêmea carrega os óvulos não fertilizados no abdômen e os deposita no fundo logo após o amanhecer. O macho então libera os espermatozoides que fertilizam os óvulos, dando início ao desenvolvimento embrionário.

#### MANUTENÇÃO DOS PEIXES

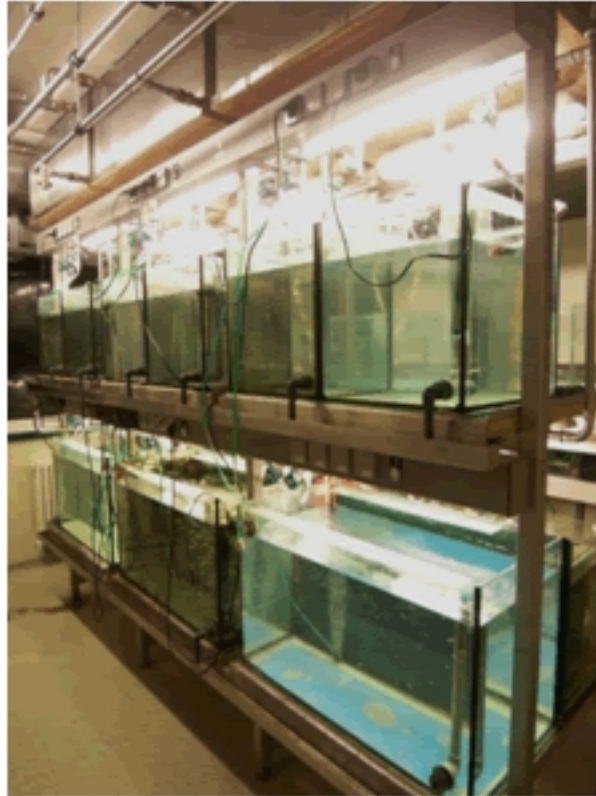
\_Peixes adultos podem ser mantidos em aquários de 160L, com 30 indivíduos, dos quais metade devem ser machos e metade fêmeas (Figura 1A). A tabela abaixo resume algumas condições a serem mantidas:

**Tabela 1.** Condições a serem mantidas nos aquários de criação de paulistinha.

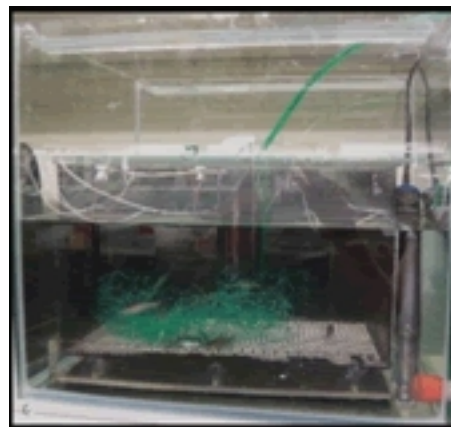
Parâmetro	Condição
Temperatura	27
CaCO <sub>3</sub> (dureza)	379 mg/L CaCO <sub>3</sub>
pH	7,36
Oxigênio dissolvido	95% saturação – 10,
Amônia	0 a
Nitrito	0,025 a
Nitrato	0 a
Fotoperíodo	12 h de luz/ 12 h de escuro
Alimentação	2 vezes por dia com ração em flocos, tipo TetraMin; não
Filtro	De carvão
Limpeza	Restos de comida e fezes removidos 2 x por dia

Quando se deseja a produção dos ovos, os peixes são estimulados na tarde do dia anterior, com a colocação de plantas artificiais. É necessária a colocação de uma bandeja no fundo do aquário coberta por uma tela com malha tamanho suficiente para deixar passar os ovos, mas não os peixes. Esse cuidado é necessário, pois o paulistinha pode comer os próprio ovos (Figura 1B). As fêmeas depositam os ovos logo ao raiar do dia, ou com a luz se acendendo. Os machos liberam os espermatozoides na água, e os ovos são fecundados, permanecendo no fundo.

A)



B)



C)

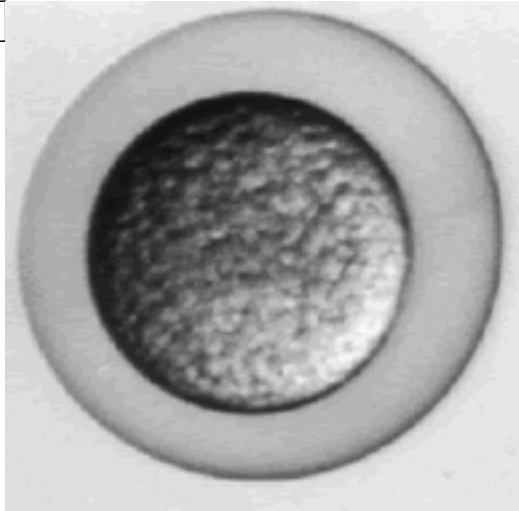


**Figura 1.** A) Sistema de manutenção de paulistinhas em laboratório; B) Aquário para onde os peixes adultos são transferidos visando à produção de ovos; C) paulistinha: fêmea “grávida”(acima) e macho (abaixo). Fonte: (BRAUNBECK *et al.*, 2005).

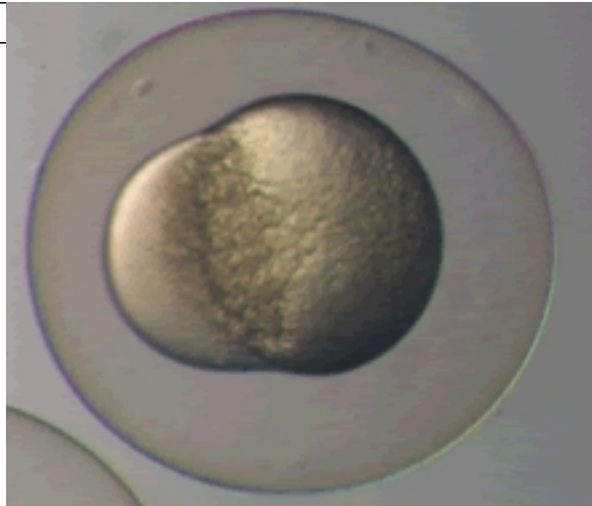
## O TESTE

\_Os ovos são então recolhido em uma bandeja e levados para o laboratório. O experimento começa com a separação dos ovos fecundados dos não fecundados. Os ovos não fecundados permanecem com aparência de zigoto pós-fecundação (Figura 2A); já nos ovos fecundados é possível observar mais de uma célula no pólo animal (Figura 2C).

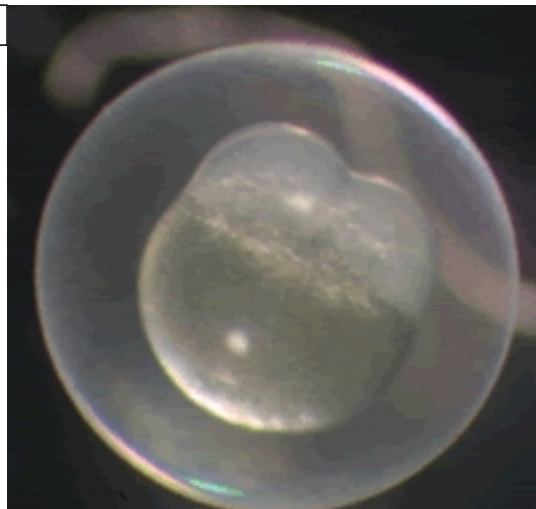
A)



B)



C)





**Figura 2.** Fotos do desenvolvimento embrionário do paulistinha: A) Zigoto, logo após fecundação; B) Zigoto, com pólo animal – 1 célula; C) Clivagem: primeira divisão celular – 2 células.

Os ovos são colocados em diferentes concentrações da substância a ser testada. Além disso, são feitos dois controles: o controle negativo (onde se espera que não seja observado efeito adverso) e o controle positivo (onde se espera que aconteça efeito adverso). Os controles são muito importantes, garantem a qualidade do teste. Se for observado efeito adverso no controle negativo, significa que ou há algum problema com o organismo-teste ou com o material utilizado (ex. contaminação dos frascos utilizados); por outro lado, se não é observado efeito adverso no controle positivo, significa que existe o organismo-teste desenvolveu resistência, portanto, não é mais um bom parâmetro.

Com o intuito de garantir a reprodutibilidade dos testes (ou seja, que o mesmo teste possa ser repetido sob condições semelhantes), os ovos são encubados em estufa, sob temperatura constante de 26 °C. Além disso, é usada água reconstituída, ou água artificial, para produzir o controle negativo e para se fazer as diluições. Essa água é feita misturando-se diversos sais necessários ao desenvolvimento do embrião a água destilada, ou seja, livre de impurezas.

Os ovos são observados após 24 e 48 horas, contando a partir da fertilização.

### **ÁGUA RECONSTITUÍDA**

\_Para fazer água reconstituída é necessário as seguintes soluções padrões:

58,8 mg/ L  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

24,6 mg/ L  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

12,6 mg/L NaHCO<sub>3</sub>

5,5 mg/L KCl

Para cada 1 L de água reconstituída, são adicionados 10 mL de cada uma das soluções padrões, e o volume é completado com água bidestilada.

A água é deve ser preparada no dia anterior ao teste e deixada durante a noite borbulhando ar e a 27 °C.

### **CONCENTRAÇÕES-TESTE**

\_Para prepara as concentrações a serem testadas, sugere-se 1:1 ; 1:2 ; 1:4 ; 1:8 e 1:16. Isso representa 50% de água reconstituída e 50% de substância-teste; 75% água e 25% de substância-teste; 87,5% e 12,5% substância-teste; etc.

No entanto, é desejável que se faça um teste piloto para se ter uma ideia da faixa de concentração que atinge 50% dos indivíduos. Leia “Trabalho dos dados” para mais explicações.

### **CONTROLE POSITIVO E CONTROLE NEGATIVO**

\_Existem muitas substâncias que podem ser usadas como controle positivo para biotestes com paulistinha. Dois exemplos são etanol e 3,4 dicloroanilina (3,4 DCA).

No caso do 3,4 DCA, é usada uma solução de 3,7 mg/L. Para o etanol, é feita uma solução

com 1,75%, usando etanol PA (98,9%).

Em ambos os casos, deve ser observada mortalidade entre 20 e 80% dos embriões.

Para o controle negativo deve ser usada a água artificial, e a mortalidade não pode exceder 10% dos embriões.

Caso o controle positivo não provoque o efeito esperado, ou o controle negativo tenha mortalidade superior a 10%, o teste é considerado não válido e seu resultado não deve ser usado.

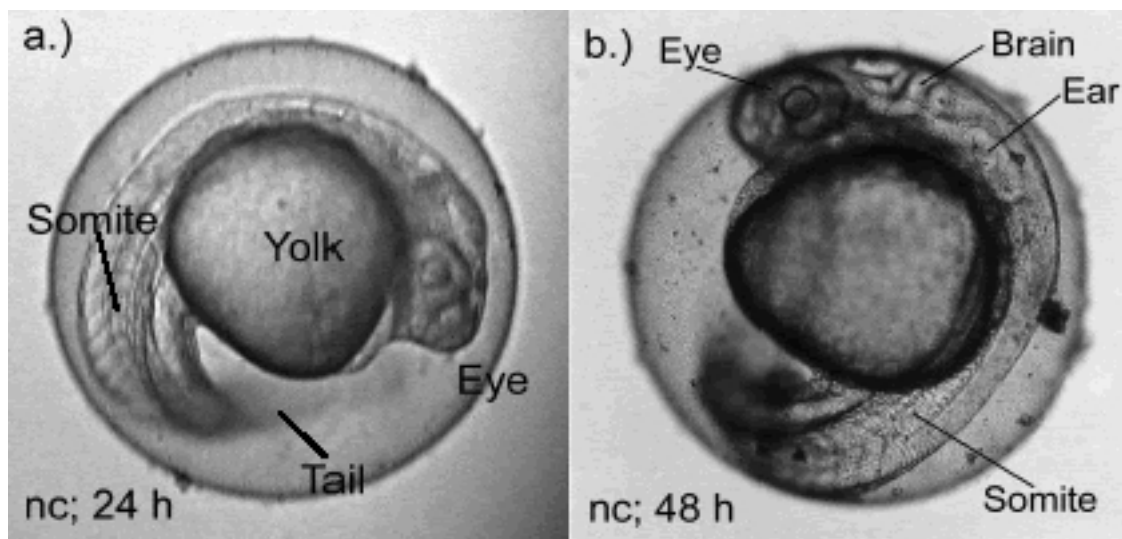
## O QUE OBSERVAR – ENDPOINTS

O teste é pensado de modo que haja um padrão naquilo que é observado. Algumas observações são consideradas sinais de morte do embrião, outras observações são apenas anotadas, e podem auxiliar posteriormente para se caracterizar os efeitos provocados pela substância-teste. A Tabela 2 apresenta os endpoints (ou seja, aquilo que deve ser observado) após 24 e 28 horas de desenvolvimento embrionário, e a Figura 3 apresenta fotos do desenvolvimento normal de um embrião de paulistinha após 24 e 48 horas de desenvolvimento.

**Tabela 2.** Endpoints observados em embriões de peixes após 24 e 48 horas de exposição.

24 horas	48 horas
<input type="checkbox"/> Ovo não fertilizado	<input type="checkbox"/> Sem pigmentação
<input type="checkbox"/> Ovo coagulado*	<input type="checkbox"/> Ovo coagulado*
<input type="checkbox"/> Estádio de epibolia	<input type="checkbox"/> Ausência de circulação sanguínea*
<input type="checkbox"/> Cauda não separada*	<input type="checkbox"/> Ausência de batimento cardíaco*
<input type="checkbox"/> Ausência de movimento espontâneo	<input type="checkbox"/> Edema
<input type="checkbox"/> Ausência de somitos*	<input type="checkbox"/> Embrião mal-formado
<input type="checkbox"/> Embrião subdesenvolvido	
<input type="checkbox"/> Ausência de locus ocular	

\* Endpoint letal (embriões com essas características foram considerados mortos)



**Figura 3.** Desenvolvimento normal de embrião de peixe paulistinha, A) após 24 horas, e; B) após 48 horas de incubação. As principais estruturas a serem observadas estão em destaque. Fonte: (KEITER *et al.*, 2006)

Também é possível dar continuidade ao teste e observar os embriões após 72 e 114 horas. Para mais detalhes dos endpoints ver Hollert *et al.* (2003).

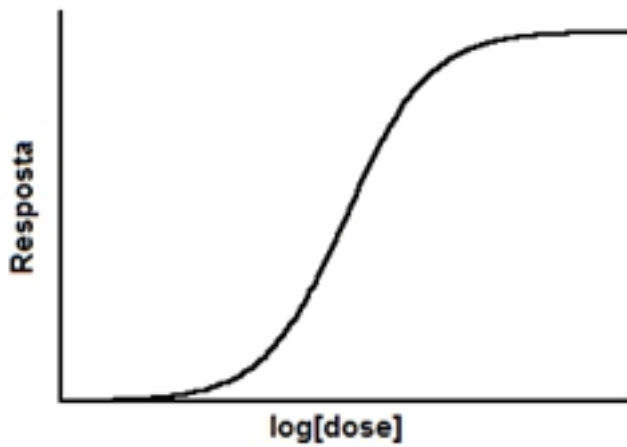
Para se conhecer melhor a respeito do desenvolvimento embrionário do peixe paulistinha, indicamos a consulta dos links abaixo, onde estão disponibilizadas fotos, descrições e filmes.

- [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html)
- [\\_ http://www.cas.vanderbilt.edu/bioimages/animals/danrer/zfish-devel.htm](http://www.cas.vanderbilt.edu/bioimages/animals/danrer/zfish-devel.htm)
- [\\_ http://www.youtube.com/watch?v=ahJjLzyioWM&NR=1](http://www.youtube.com/watch?v=ahJjLzyioWM&NR=1)
- [\\_ http://www.youtube.com/watch?v=6PhnHYZ5-zg&NR=1](http://www.youtube.com/watch?v=6PhnHYZ5-zg&NR=1)

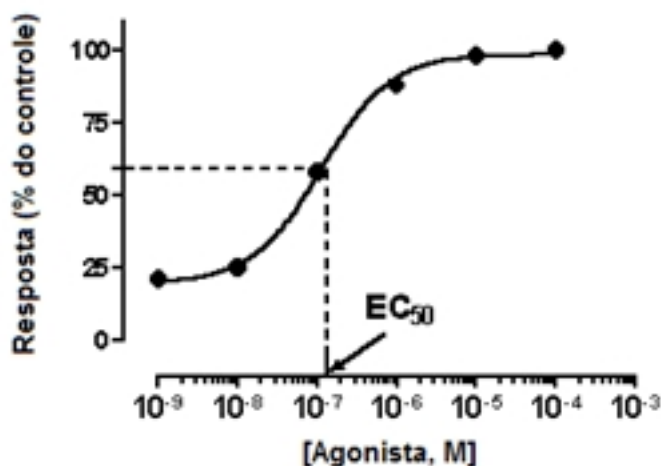
## TRABALHO DOS DADOS E RESULTADOS

\_Em geral, o objetivo de um bioensaio é a geração de uma curva dose-resposta, onde se tem no eixo x a dose (ou concentração da substância) e no eixo y a resposta (ou endpoint). Essa curva possui uma forma usual, como mostra a Figura 4A a seguir.

A)



B)



**Figura 4.** A) Exemplo geral de uma curva dose-resposta. B) Exemplo de curva dose-resposta indicando o EC<sub>50</sub>.

A concentração da substância geralmente é dada em logarítimos pois as concentrações testadas são geralmente preparadas em escala logarítmica (1:1, 1:2, 1:4, etc).

Curvas dose-resposta padrões são definidas por 4 parâmetros: a linha de base da resposta, o máximo da resposta, a inclinação e a concentração da substância-teste que provoca resposta no meio do caminho entre o máximo e a linha de base, ou EC<sub>50</sub> (Figura 4B). No caso do teste com paulistinha, é possível calcular EC

<sup>50</sup> (Effect Concentration 50%), ou seja, a concentração na qual é o efeito é observado em 50% dos indivíduos testados. Isso porque se estabelece a linha de base como 0% de mortalidade e o máximo de resposta como 100% de mortalidade.

De forma prática, as observações são transformadas em mortalidade e, para cada concentração testada, é calculada a porcentagem de mortalidade. A concentração é transformada em logaritmo, e são plotadas dose e resposta em um gráfico. A partir daí, os dados são comparados com uma curva-padrão de dose-resposta, sendo possível calcular a concentração da substância-teste que provoca 50% de mortalidade, ou seja, o EC<sub>50</sub>.

A partir deste ponto, o EC<sub>50</sub> é comparado com EC<sub>50</sub> de outros trabalhos desenvolvidos de forma semelhante, sendo possível ter uma ideia se é alto ou baixo, ou se é equivalente a uma outra substância conhecida.

## REFERÊNCIAS

- CHAPMAN, P. M. Emerging substances — Emerging problems? *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.25, n.6, p.1445-1447. 2006.
- \_\_\_\_\_. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, v.44, p.7-15. 2002.
- BRAUNBECK, T.; M. BÖTTCHER; H. HOLLERT; T. KOSMEHL; E. LAMMER; E. LEIST; M. RUDOLF; N. SEITZ. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species - an Update. *Altex*, v.22, n.2, p.87-102. 2005.
- HOLLERT, H.; S. KEITER; N. KÖNIG; M. RUDOLF; M. ULRICH; T. BRAUNBECK. A new Sediment Contact Assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Soils & Sediments*, v.3, n.3, p.197-207. 2003.
- KEITER, S.; A. C. RASTALL; T. KOSMEHL; K. WURM; L. ERDINGER; T. BRAUNBECK; H. HOLLERT. Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the Upper Danube River.

Environ. Sci. and Pollut. Res.  
, v.13, n.5, p.308-319. 2006.

Por Dra. Carolina F. Mariani  
Laboratório de Limnologia, IB/USP