



ANÁLISE DA TOXICIDADE DE SOLVENTES ORGÂNICOS (DIMETILSULFÓXIDO, METANOL, ETANOL E ACETONA) EM NÁUPLIOS DE *ARTEMIA SP.*

Pitombeira, L.F.

Nilin, J.; Costa - Lotufo, L.V.

Laboratório de Ecotoxicologia Marinha Instituto de Ciências do Mar - UFC Av. da Abolição, 3207 Meireles Fortaleza - Ceará CEP 60165081 livia_pitombeira@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Estudos ecotoxicológicos fundamentados em bioensaios realizados em laboratório vêm sendo utilizados para o monitoramento de poluição e contaminação em corpos d'água como forma de melhor integrar, explicar objetivamente resultados e subsidiar a tomada de decisões rápidas e seguras. Os bioensaios podem avaliar o potencial tóxico de compostos como pesticidas, derivados do petróleo, detergentes, metais sobre os organismos, uma vez que apenas "instrumentos biológicos" são capazes de integrar os vários efeitos complexos de um mistura de poluentes que podem interferir em processos fisiológicos, bioquímicos, celulares, morfológicos e genéticos (Costa; Espíndola, 2000).

Atualmente, um dos problemas mais importantes gerados pelas atividades antrópicas é a poluição dos corpos d'água através da descarga de efluentes industriais e domésticos, e resíduos de agrotóxicos. Segundo Mozetto e Zagatto (2006), os químicos mais testados dentro da ecotoxicologia normalmente são compostos apolares que após alcançarem a coluna d'água podem ser incorporados ao material particulado e depositados no sedimento ou ainda permanecerem biodisponíveis na coluna d'água, entrando, portanto, em contato com os organismos aquáticos.

Contudo, há certa dificuldade na avaliação do potencial tóxico através testes de toxicidade, uma vez que a natureza hidrofóbica das substâncias testadas não permite uma completa dissolução em meio aquoso. Dessa forma torna-se necessário o uso de solventes orgânicos para analisar, em laboratório, a toxicidade dessas substâncias quando em contato com os organismos teste. Hallare *et al.*, (2004) utilizaram o solvente orgânico dimetilsulfóxido na realização do teste para avaliar a toxicidade do fármaco diclofenaco, substância apolar, à embriões de peixes. Outros estudos utilizam solventes para avaliação da toxicidade de pesticidas, como o bispiribac - sódio e fosetil - alumínio em alga verde *Chlorella pyrenoidosa*, e o lindano em copépodo *Bryocampetus zschokkei* (Jiany Ma e Jianmmeng Chen, 2005; Brown *et al.*, 2003).

Todavia é preciso conhecer e avaliar previamente a toxi-

cidade dos solventes que irão ser utilizados nos bioensaios para que não adicionem toxicidade aos testes com compostos apolares estudados. Alguns trabalhos avaliaram a toxicidade na metamorfose de anfíbios (Pollard e Adams, 1988) e no desenvolvimento embrionário de peixes (González - Doncel *et al.*, 008).

O presente trabalho teve como intuito a avaliação da toxicidade aguda dos solventes orgânicos em bioensaios de *Artemia sp.* tendo em vista que é um bioensaio bastante difundido na literatura devido ao seu baixo custo, rapidez e boa reprodutibilidade. Testes de toxicidade com *Artemia* foram amplamente utilizados em testes com inseticidas organofosforados (Sanchez - Fortún *et al.*, 996), produtos farmacêuticos (Parra *et al.*, 001), dentre outros.

OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade dos quatro solventes orgânicos, dimetilsulfóxido, metanol, etanol e acetona, utilizando o teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia sp.*

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Solventes orgânicos

Os solventes testados foram etanol, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e acetona (pureza > 99%, Vetec Química Fina Ltda). As concentrações testadas (em triplicata) foram preparadas em água do mar filtrada (0,45 μm) nas seguintes concentrações: 5; 3; 1; 0,3; 0,1; 0,03% para acetona e etanol, e 15; 10; 5; 3; 1% para DMSO e metanol.

3.2 Bioensaio

Os cistos de *Artemia sp.* foram obtidos comercialmente. Para facilitar a eclosão, os cistos foram hidratados com água destilada por uma hora, em seguida foram descontaminados em solução de hipoclorito de sódio e água destilada por dois minutos, e posteriormente lavados em água corrente. Os cistos foram mantidos em água do mar filtrada com aeração

(salinidade a 35, temperatura $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e fotoperíodo de 12h claro/ 12h escuro) por 48 horas, isto é, até atingirem a fase ideal para a execução dos testes (náuplio II).

Os bioensaios foram executados de acordo com o método descrito por Veiga & Vital (2002). Os experimentos foram realizados em placas de 24 cavidades, em um volume final de 2 mL por réplica. Dez náuplios foram adicionados por réplica e mantidos sob condições controladas por 24 e 48 horas. Decorrido este tempo, as placas foram levadas ao microscópio estereoscópico, para a contagem dos organismos vivos e mortos.

3.3. Análise dos resultados

Para obtenção da concentração letal a 50% dos organismos testados (CL50) os dados foram analisados através do método Trimmed Spearman - Karber (HAMILTON *et al.*, 1977). Para verificar a existência de diferença significativa entre os períodos de exposição, as médias \pm desvio padrão foram comparadas através do teste - t de Student pareado com um nível de significância de 5 %, e para analisar a diferença entre a toxicidade dos solventes foi realizada uma análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, Inc).

RESULTADOS

Os solventes orgânicos são amplamente utilizados em testes ecotoxicológicos com o intuito de aumentar a solubilidade de compostos químicos apolares e dessa forma avaliar o real potencial tóxico desses compostos.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho foi possível identificar toxicidade aguda aos náuplios de *Artemia* sp. em 24 e 48 horas. O DMSO e o etanol apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os períodos testados com CL50 média de $4,9 \pm 1,3\%$ (24h) e $2,9 \pm 1,3\%$ (48h), $n = 7$, e $1,5 \pm 0,3\%$ (24h) e $1,2 \pm 0,3\%$ (48h), $n = 7$, respectivamente, ou seja, aumentaram a toxicidade no decorrer do tempo. Já a acetona e o metanol apresentaram CL50 de $1,6 \pm 0,3\%$ (24h) e $1,3 \pm 0,4\%$ (48h), $n = 7$, e $1,9 \pm 0,4\%$ (24h) e $1,5 \pm 0,3\%$ (48h) $n = 6$, respectivamente.

Dentre os solventes utilizados, o DMSO apresentou a menor toxicidade aos náuplios sendo que a toxicidade aumentou entre os períodos de exposição. Barahona e Sánchez - Fortun (1996) evidenciaram uma maior sensibilidade da *Artemia* quando exposta a contaminantes num período de 48 horas.

Os protocolos para testes de toxicidade com organismos aquáticos da Agência de Proteção Ambiental americana (US. EPA) sugerem uma concentração máxima de solvente de 0,05% para testes agudos e 0,01% para testes crônicos (Jay, 1996), já os protocolos desenvolvidos pela Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômica (OECD, 1992) sugerem concentrações específicas para cada solvente que variam 1,10 mg/l (0,001%) para o DMSO a 79,2 mg/l (0,3%) para o metanol.

Entretanto, ainda há a necessidade da realização de testes específicos para cada composto que possam assegurar a quantidade de solvente que seja adequada para aquele teste.

O presente trabalho sugere o uso do DMSO como solvente orgânico mais indicado para realizações de teste de toxicidade aguda com *Artemia* sp.

CONCLUSÃO

O presente trabalho sugere o uso do DMSO como solvente orgânico mais indicado para realizações de teste de toxicidade aguda com *Artemia* sp.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Benville, P.E.J, Smith, C.E., Shanks, W.E., 1968, Some toxic effects of dimethyl sulfoxide in salmon and trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 12, 156 - 158.
- Bluzat, R., Jonot, O., Lespinasse, G.; Seuge, J., 1979, Chronic toxicity of acetone in the fresh snail *Lymnea stagnalis*. *Toxicol* 14, 179 - 190.
- Brown, R.J., Rundle, S.D., Hutchinson, T.H., Williams, T.D., Jones, M.B., 2003, A copepod life - cycle test and growth model for interpreting the effects of lindane. *Aquatic Toxicology* 63, 1 - 11.
- Costa, J.B., Espíndola, E.L.G., 2000, Avaliação ecotoxicológica da água e sedimento em tributários do reservatório de Barra Bonita (Médio Tietê Superior, SP). In: ESPÍNDOLA, E.L.G.; Paschoal, C.M.R.B.; Rocha, O.; Bohrer, M.B.C.; Oliveira - Neto, A.L. (Editores). *Ecotoxicologia-Perspectivas para o Século XXI*. Editora Rima, São Carlos, p. 75 - 93.
- González - Doncel, M., Okihiro, M.S., Torija, C.F, Tarazona, J.V., Hinton, D.E., 2008, An artificial fertilization method with the Japanese medaka: Implications in early life stage bioassays and solvent toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69 95 - 103.
- Hallare, A.V, Köhler, H. - R. Triebskorn, R., 2004 Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere* 56 659 - 666.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977, Trimmed Spearman - Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environment Science Technology*. N. 11 p. 714 - 719.
- Harris, C.A, Santos, E.M, Janbakhsh, A., Pottinger, T.G., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 2001, Nonyl phenol affects gonadotropin levels in the pituitary gland and plasma of the female rainbow trout. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2909 - 2916.
- JAY, A.E., 1996, Toxic effects of organics solvents on the growth of *Chorella pyrenoidosa* and *Selenastrum capricornutum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57, 191 - 198.
- Jianyi, M., Jianmeng, C., 2005, How to accurately assay the algal toxicity of pesticides with low water solubility. *Environ. Pollution* 136, 267 - 273.

- Mozeto, A.A., Zagatto, P.A., 2006, Introdução de agentes químicos no ambiente. In: Zagatto, P.A.; Bertoletti, E. *Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações*. São Carlos: RiMa Editora.
- Nascimento, I.A, Sousa, E.C.P.M., NIPPER, M., 2002, Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda.
- OECD (Organization For Economic Cooperation And Development), 1992, OECD guidelines for testing of chemicals. Section 2. Guidelines 210, Fish early - life stage toxicity test. OECD Environment Directorate, Paris.
- Parra, L.A., Yhebra, R.S., Sardiñas, G.I, Buela, I.L., 2001, Comparative study of the assay of the *Artemia salina* L. and estimate of the medium lethal dose (ld50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plants extracts. *Phytomedicine* 8 (5), 395 - 400.
- Pollard, S.J., ADAMS, J.A., 1988, Artificially induced metamorphosis by acetone in *Acris gryllus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 419 - 428.
- Sánchez - Fortún, S., Sanchez F., Barahona, M.V., 1996, Acute Toxicity of Organophosphorus Insecticides and Protection by Cholinergic Antagonist and 2 - PAM on *Artemia salina* larvae. *Archives of Environmental Contaminations and Toxicology* 31, 391 - 398.
- Veiga, L.F. & Vital, N., 2002, Teste de toxicidade aguda com microcrustáceo *Artemia* sp. In: Nascimento, I.A.; Sousa, E.C.P.M, Nipper, M. *Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil*. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda.