

## **Toxicologia de embriões e larvas de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000)**

Ghisa Carpanezi Toresin

### **INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas o ambiente aquático tem sofrido vários impactos, em especial aos de origem petrolífera (Silva 2013). Os efeitos biológicos e toxicológicos destes compostos estão relacionados com a forma com que o petróleo está disponível (nível de craqueamento) (Sandrini Neto 2015), por sua persistência no ambiente (CETESB 2005), da capacidade em que cada organismo tem em acumular e reagir a esses compostos (Pinto 2013), além do tempo de exposição.

Os peixes, em geral, são considerados bons bioindicadores da qualidade ambiental (Akaishi 2012), o que resulta na sua utilização em estudos ecotoxicológicos, principalmente sobre os efeitos de substâncias tóxicas na mitigação da qualidade do ambiente aquático natural (Lins, Kirschnik et al. 2010). Apesar do crescente número de estudos na área, pouco se sabe sobre os efeitos dos derivados de petróleo sobre peixes continentais. Uma das razões é que há um número extenso de produtos e compostos originados a partir do craqueamento do petróleo cru, apresentando cada um, uma toxicidade diferente.

Desse modo, não é possível descrever se ou quando os processos naturais serão capazes de restabelecer seu completo equilíbrio após a exposição aguda ou crônica a agentes tóxicos (ITPOF 2012). Essa capacidade de restabelecimento das condições é denominada “resiliência ambiental” (Odum and Barrett 2007).

Os estudos na área de toxicologia aquática, com foco nas espécies nativas de valor comercial, são de grande importância para a compreensão dos processos de biomonitoramento ambiental e valoração dos danos após acidentes em ambientes aquáticos naturais (Dal Pont 2012). Os peixes são considerados bons indicadores da saúde ambiental e, segundo Silva (2013), são ainda mais susceptíveis aos xenobiontes quando em fases iniciais de

ontogenia quando comparados a indivíduos adultos (Ramos, Cabral et al. 2015).

O presente trabalho tem como objetivo definir a concentração letal ( $CL_{50}$ ) da fração solúvel em água (FSA) da gasolina, sobre embriões e larvas do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA), do GIA, localizado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Brasil.

### **1. OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES E LARVAS**

Machos e fêmeas de *A. altiparanae* foram selecionados de um banco de reprodutores mantido no próprio GIA. Foram usados dois machos para cada fêmea, de acordo com características morfológicas que indicam o adequado estágio de maturação gonadal: machos, pela textura áspera na nadadeira anal e fêmeas, pelo ventre abaulado e poro urogenital avermelhado. Após selecionados, os animais receberam uma dose única (0,15ml para as fêmeas e para os machos) de gonadotrofina coriônica humana, para a indução à ovulação e espermição. Após a aplicação do hormônio, os indivíduos foram acondicionados em aquários de 28 litros, com água mantida a 26°C, até a liberação dos gametas e fertilização dos óvulos.

### **2. SUBSTÂNCIA CONTAMINANTE**

A substância-teste utilizada foi a FSA da gasolina, obtida de acordo com Anderson et al. (1974), que consiste na lenta agitação de nove partes de água e uma parte de óleo por 24 horas, e posterior separação do sobrenadante.

### **3. BIOENSAIO**

Foi determinado o teor de álcool na gasolina, de acordo com a Portaria nº 75, de 5 de março de 2015, do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA) e Resolução nº 1, de 4 de março de 2015, do Conselho Interministerial do Açúcar e do Alcool (CIMA).

Para determinar o teor de álcool na gasolina foi realizado o teste da proveta, que consiste em misturar lentamente 50ml de gasolina com 50ml de uma solução aquosa de cloreto de sódio e manter em repouso por 15 minutos. Em seguida, efetua-se o cálculo necessário.

Para determinar a concentração de efeito da gasolina nos peixes, foi adotada a metodologia descrita por OECD (2013) com modificações. Para essa avaliação foi utilizado, dentre outras, a avaliação de concentrações que causam a mortalidade de 50% dos organismos expostos após um período agudo de 24, 48, 72 e 96 horas, conhecido como teste de concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>). Esse procedimento consiste em criar um gradiente de mortalidade entre as diferentes concentrações utilizadas, ou seja, obter desde concentrações de gasolina não-letais (0% de mortalidade) até 100% de letalidade dos animais expostos.

O bioensaio foi executado segundo as normas internacionais descritas pela OECD (1994): controle negativo (CN), composto apenas por água; concentração teste (CT), composto pelas concentrações 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5% da FSA. Para isso, foram acondicionados embriões de *A. altiparanae* em placas de cultivo de 06 poços (KASVI K12-006, China), na proporção de um embrião/poço, totalizando 18 concentrações em duplicata (n= 216). As placas foram posteriormente acondicionadas em uma estufa vertical do tipo DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (ADAMO, Brasil).

A água utilizada foi previamente clorada (com cloro 10%); neutralizada (com tiosulfato de sódio), filtrada (através de filtro bag de 50 µm, e através de filtro de carvão ativado) e permaneceu dentro da incubadora pelo tempo necessário para atingir os 25°C.

#### **4. QUALIDADE DA ÁGUA**

Os seguintes parâmetros físico-químicos da água foram analisados diariamente como rotina durante o experimento: pH, através de peagâmetro digital (AZ-86505, Taiwan); oxigênio dissolvido (OD) e percentual de saturação

de oxigênio (OD), por meio de oxímetro digital (YSI Pro20, EUA); alcalinidade mensurada por titulometria com ácido sulfúrico 0,02N (APHA., 2005); e concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) mensurada por titulometria com hidróxido de sódio 0,02N (APHA., 2005); concentração de nitrogênio na forma de amônia total [N-AT= NH<sub>3</sub> +NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ] obtida pelo método do indofenol (APHA., 2005) e nitrito (APHA, 1995) seguido de leitura das amostras em espectrofotômetro de bancada (Spectronic 20 Genesys, EUA).

Amostras diárias da fração solúvel da gasolina e da água dos experimentos foram analisadas pelo Departamento de Química – UFPR, para quantificação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), obtida seguindo procedimentos recomendados por U.S.EPA (1996).

## **5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O banco de dados gerado foi organizado através do uso do software Excel<sup>®</sup> (Microsoft Office Professional Plus 2016). A concentração letal (CL<sub>50</sub>) mediana foi estimada através do programa estatística Trimmed Spearman-Kärber “LC50 Programs JSPear Test”. As demais análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Statsoft StatisticaMR versão 12.0<sup>®</sup>.

## **RESULTADOS**

Como pode ser observado na Tabela 1, há uma tendência de queda nas concentrações de pH, oxigênio dissolvido, nível de saturação de oxigênio, concentração de dióxido de carbono e alcalinidade em relação a água utilizada na renovação diária (reposição) e a água dos poços de cultivo dos diferentes tratamentos. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas concentrações dos compostos nitrogenados (amônia e nitrito), tanto no controle, quanto nas demais concentrações. Não houve diferença significativa entre a água dos tratamentos e do grupo controle.

Tabela 1 – Parâmetros de qualidade de água observados durante os bioensaios com diferentes concentrações da fração solúvel em água da gasolina em embriões e larvas de *Astyanax altiparanae*.

(FSA)	Parâmetro						
	pH	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	OD (%)	N-AT (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	Alcalinidade (mg.L <sup>-1</sup> )
Reposição	7,56 <sup>a</sup>	6,73 <sup>a</sup>	79,40 <sup>a</sup>	0,01	0,01	0,28 <sup>a</sup>	67,00 <sup>a</sup>
0	(7,48-7,65)	(6,61-6,91)	(75,60-88,50)	(0,01-0,01)	(0,01-0,01)	(0,22-0,32)	(60,80-68,00)
	6,54 <sup>b</sup>	4,60 <sup>b</sup>	52,65 <sup>b</sup>	0,02	0,02	0,48 <sup>b</sup>	38,95 <sup>b</sup>
	(5,96-6,88)	(4,07-5,01)	(47,80-61,00)	(0,02-0,04)	(0,02-0,04)	(0,33-0,68)	(31,00-45,80)
0,5	6,57 <sup>b</sup>	4,62 <sup>b</sup>	56,05 <sup>b</sup>	0,02	0,02	0,62 <sup>b</sup>	37,75 <sup>b</sup>
	(6,00-6,71)	(4,07-5,07)	(50,20-63,00)	(0,02-0,04)	(0,02-0,04)	(0,42-0,73)	(30,80-45,80)
1,0	6,48 <sup>b</sup>	4,74 <sup>b</sup>	55,70 <sup>b</sup>	0,02	0,02	0,68 <sup>b</sup>	40,80 <sup>b</sup>
	(5,96-6,74)	(4,43-5,06)	(50,40-63,00)	(0,02-0,04)	(0,02-0,03)	(0,49-0,73)	(31,80-41,80)
1,5	6,16 <sup>b</sup>	5,01 <sup>b</sup>	56,65 <sup>b</sup>	0,02	0,02	0,61 <sup>b</sup>	35,25 <sup>b</sup>
	(5,86-6,72)	(4,45-5,07)	(52,90-68,00)	(0,01-0,03)	(0,02-0,04)	(0,57-0,67)	(30,80-42,20)
2,0	6,48 <sup>b</sup>	4,68 <sup>b</sup>	51,20 <sup>b</sup>	0,02	0,03	0,67 <sup>b</sup>	40,30 <sup>b</sup>
	(5,96-6,88)	(4,29-5,06)	(47,80-63,00)	(0,01-0,03)	(0,01-0,04)	(0,43-0,73)	(35,60-43,50)
2,5	6,16 <sup>b</sup>	4,80 <sup>b</sup>	56,85 <sup>b</sup>	0,02	0,02	0,65 <sup>b</sup>	40,60 <sup>b</sup>
	(5,96-6,78)	(4,43-5,20)	(50,40-61,50)	(0,01-0,03)	(0,02-0,04)	(0,59-0,71)	(32,20-42,20)
3,0	6,74 <sup>b</sup>	4,69 <sup>b</sup>	50,80 <sup>b</sup>	0,02	0,03	0,60 <sup>b</sup>	40,60 <sup>b</sup>
	(5,79-6,74)	(4,43-4,80)	(47,20-63,60)	(0,02-0,03)	(0,02-0,04)	(0,43-0,71)	(31,00-41,80)
3,5	6,33 <sup>b</sup>	4,68 <sup>b</sup>	51,20 <sup>b</sup>	0,02	0,03	0,68 <sup>b</sup>	40,00 <sup>b</sup>
	(5,98-6,78)	(4,43-4,80)	(47,20-63,60)	(0,01-0,03)	(0,01-0,04)	(0,43-0,72)	(35,60-43-50)
4,0	6,47 <sup>b</sup>	4,73 <sup>b</sup>	52,50 <sup>b</sup>	0,02	0,03	0,68 <sup>b</sup>	36,30 <sup>b</sup>
	(5,96-6,78)	(4,20-4,80)	(47,80-63,00)	(0,01-0,03)	(0,02-0,04)	(0,42-0,69)	(32,20-43,50)
4,5	6,48 <sup>b</sup>	4,68 <sup>b</sup>	51,20 <sup>b</sup>	0,02	0,03	0,63 <sup>b</sup>	38,15 <sup>b</sup>
	(5,96-6,88)	(4,43-5,01)	(47,80-63,00)	(0,02-0,03)	(0,02-0,04)	(0,43-0,72)	(35,60-43,50)
5,0	6,42 <sup>b</sup>	4,68 <sup>b</sup>	55,55 <sup>b</sup>	0,02	0,03	0,67 <sup>b</sup>	38,60 <sup>b</sup>
	(5,98-6,78)	(4,29-5,20)	(50,20-63,60)	(0,01-0,03)	(0,02-0,04)	(0,59-0,73)	(32,20-42,20)

(FSA)	Parâmetro						Alcalinidade (mg.L <sup>-1</sup> )
	pH	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	OD (%)	N-AT (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NO <sup>2-</sup>	CO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	
5,5	6,08 <sup>b</sup> (5,79-6,74)	4,63 <sup>b</sup> (4,33-4,80)	50,70 <sup>b</sup> (47,70-63,00)	0,02 (0,02-0,03)	0,03 (0,02-0,04)	0,63 <sup>b</sup> (0,43-0,71)	40,60 <sup>b</sup> (31,00-41,80)
6,0	6,53 <sup>b</sup> (5,96-6,88)	4,60 <sup>b</sup> (4,43-5,00)	50,10 <sup>b</sup> (47,80-63,60)	0,02 (0,02-0,03)	0,03 (0,02-0,03)	0,60 <sup>b</sup> (0,43-0,72)	40,00 <sup>b</sup> (35,60-43,50)
6,5	6,59 <sup>b</sup> (5,96-6,80)	4,69 <sup>b</sup> (4,17-4,80)	50,20 <sup>b</sup> (48,80-65,00)	0,02 (0,02-0,02)	0,02 (0,02-0,03)	0,55 <sup>b</sup> (0,46-0,71)	36,15 <sup>b</sup> (32,20-43,50)
7,5	6,64 <sup>b</sup> (5,79-6,76)	4,44 <sup>b</sup> (4,16-4,85)	50,80 <sup>b</sup> (47,80-63,00)	0,02 (0,02-0,03)	0,03 (0,01-0,04)	0,68 <sup>b</sup> (0,37-0,71)	35,85 <sup>b</sup> (31,00-41,80)
8,0	6,35 <sup>b</sup> (5,80-6,74)	4,49 <sup>b</sup> (4,23-4,80)	50,80 <sup>b</sup> (47,20-63,60)	0,02 (0,02-0,03)	0,02 (0,02-0,04)	0,65 <sup>b</sup> (0,43-0,70)	38,60 <sup>b</sup> (30,80-42,80)
8,5	6,48 <sup>b</sup> (5,96-6,88)	4,38 <sup>b</sup> (4,09-4,66)	51,20 <sup>b</sup> (47,70-63,00)	0,02 (0,01-0,03)	0,03 (0,01-0,04)	0,65 <sup>b</sup> (0,43-0,72)	40,30 <sup>b</sup> (35,60-43,50)
Valores	apresentados		como		mediana		(mínimo-máximo).

Não foram observadas larvas com deformações ou edemas logo após a eclosão.

Concentrações inferiores a 2,5% da FSA da gasolina não resultaram em mortalidade de animais até o período de 48 horas (

Figura 1). Concentrações inferiores a 1,5% não resultaram em mortalidade de animais até o período de 72 horas de exposição. Demais concentrações não apresentaram efeitos na sobrevivência durante as primeiras 24h horas de exposição.

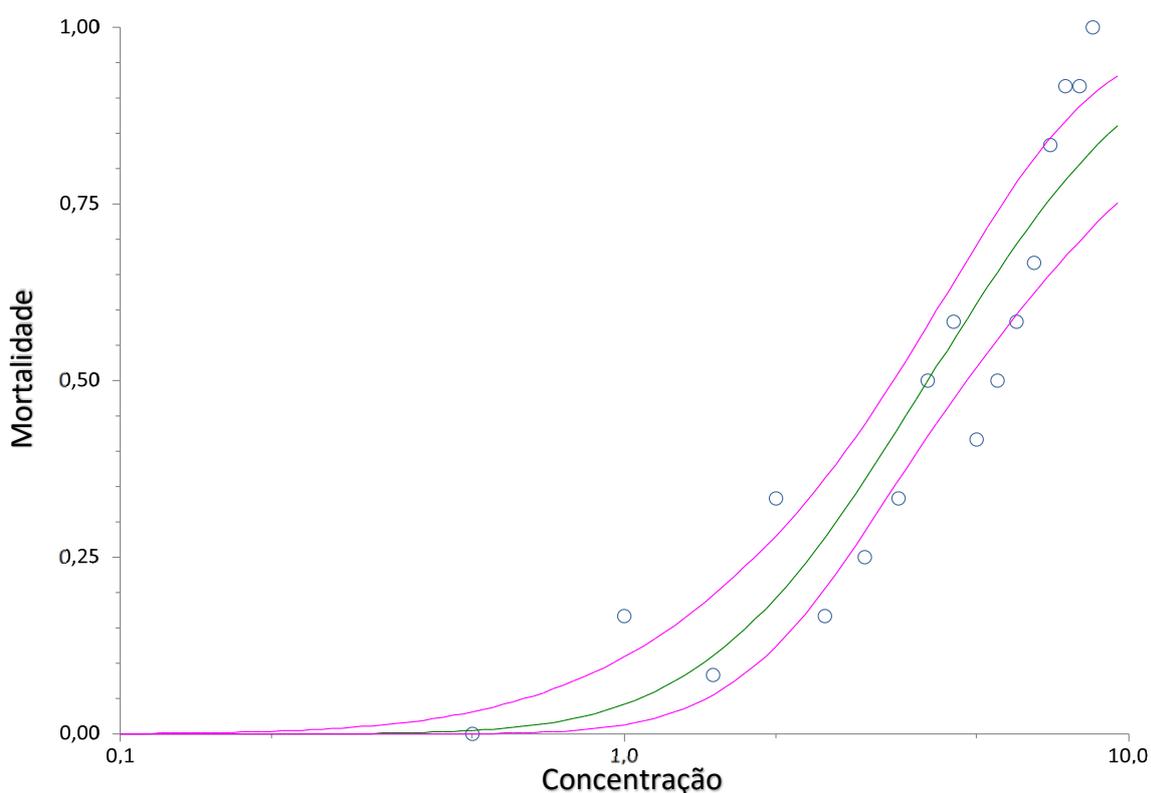


Figura 1 – Curva resposta da concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) obtida para embriões e larvas de *Astyanax altiparanae* durante a exposição com a fração solúvel em água da gasolina ( $p > 0,05$ ).

Não houve mortalidade de nenhum exemplar no grupo controle durante o período de 96 horas. A maior concentração testada (8,5%) resultou em 100% de mortalidade ao final do período de exposição. A concentração letal mediana obtida foi de 4,00% (3,37-4,68%) da FSA da gasolina.

## DISCUSSÃO

Observou-se que a qualidade da água nas soluções-teste e no grupo controle apresentou uma redução quanto à maioria dos parâmetros avaliados, mas não apresentando diferença significativa para os compostos nitrogenados, como no caso da amônia e nitrito. Isso ocorreu, de fato, pelo curto período em que a água permaneceu nos poços de cultivo (24 horas) e logo era renovada. As concentrações observadas para os compostos nitrogenados não interferiram nas taxas de sobrevivência de peixes, visto que os mesmos valores foram observados no grupo controle, que se manteve em 100% ao final do período de exposição.

De acordo com o estudo realizado por Galvan (2015), a FSA da gasolina em *A. altiparanae* foi capaz de induzir efeitos tóxicos, tanto na exposição aguda (96 horas) quanto em tratamentos de duração crônica (15 dias). Na ocasião o autor encontra valores tóxicos mesmo em baixas concentrações (1,5%), porém para adultos da espécie. Concentrações baixas com efeitos tóxicos também foram observados neste trabalho, mas o que se diferencia neste caso, é a exposição de animais em fases iniciais de vida, que são muito mais susceptíveis que em fases adultas, e que se mostraram ainda mais resistentes quanto a concentração máxima tolerada.

Para organismos aquáticos, a exposição à compostos tóxicos afeta diversos fatores (van der Oost, Beyer et al. 2003). É notório, independente da concentração da FSA testada, que os exemplares apresentaram alterações comportamentais em relação ao grupo controle, na ocasião com maiores e contínuas movimentações.

Segundo Dal Pont (2012), os efeitos encontrados para a mesma espécie em fase adulta, porém com a FSA do diesel, foram ainda mais evidenciados logo no início dos testes de exposição, chegando a um valor mediano de concentração letal em 25,21%. O autor relata o aumento contínuo de toxicidade da FSA do diesel conforme o período de exposição. O mesmo fato foi observado neste trabalho, porém já é possível observar mortalidade no período proposto com concentrações acima de 0,5%, mostrando que a FSA da gasolina tende a ter uma maior toxicidade em relação à FSA do diesel, além de que se trabalhou com fases de desenvolvimento diferentes.

Segundo Dal Pont (2012), a toxicidade de óleos combustíveis, aparentemente, é maior em organismos de água doce. Rodrigues (2009),

define em 5,48% a concentração letal mediana da FSA da gasolina em larvas do peixe-rei *Odontesthes argentinensis*, em um estudo onde se compara a FSA da gasolina e do petróleo (óleo cru) brasileiro. Albers (2003), relata que a fração solúvel de derivados combustíveis apresentam maior toxicidade do que a FSA do óleo cru. Nota-se que valor encontrado para o petróleo cru para uma espécie de águas marinhas se assemelha ao aqui encontrado para a gasolina em uma espécie de águas continentais.

Embriões e larvas do lambari-do-rabo-amarelo se mostraram tolerantes a pequenas concentrações da FSA da gasolina, mantendo-se vivos durante o período de exposição aguda. A concentração letal mediana observada para a espécie se assemelha a outras larvas de peixes, possibilitando o uso da espécie no biomonitoramento da saúde ambiental.

## REFERÊNCIAS

Akaishi, F. M. (2012). "Aplicação de biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo."

Albers, P. H. (2003). Petroleum and Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Handbook of Ecotoxicology. D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton and J. Cairns. New York, Lewis Publishers: 1315.

CETESB (2005). CETESB-Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. CETESB-Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB.

Dal Pont, G. (2012). Toxicidade do óleo diesel para o peixe *Astyanax altiparanae*. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Curitiba/PR, Universidade Federal do Paraná. **Mestrado em Ciências Veterinárias: 112.**

Galvan, G. L. (2015). "Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo e gasolina: integrando relevantes organismos e biomarcadores."

ITPOF (2012). The International Tanker Owners Pollution Federation Limited - Handbook 2010/11: 54.

Lins, J., et al. (2010). "Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático." Rev. Acad. Ciên. Agrár. Ambient **8**: 469-484.

Odum, E. P. and G. W. Barrett (2007). Fundamentos de Ecologia, Pioneira Thomson.

Pinto, E. D. C. P. (2013). "Toxicidade de petróleo bruto sobre microcrustáceo *Daphnia similis* em água de rio e água de produção de petróleo."

Ramos, S., et al. (2015). "Do fish larvae have advantages over adults and other components for assessing estuarine ecological quality?" Ecological Indicators **55**: 74-85.

Rodrigues, R. V. (2009). "Efeito agudo e avaliação histopatológica de larvas do peixe-rei marinho *Odontesthes argentinensis* expostas à fração solúvel do petróleo, diesel e gasolina em água."

Sandrini Neto, L. (2015). "Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos em distintos níveis de organização biológica."

Silva, S. C. F. (2013). "Sensibilidade ambiental ao derrame de biocombustível e óleo: uma análise da estrutura genética populacional do Curimba (*Prochilodus lineatus*)."

van der Oost, R., et al. (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**(2): 57-149.