



MÉTODO MULTIGERAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE POLUENTES SOBRE A REPRODUÇÃO DE CARÁMUJOS DE ÁGUA DOCE

Eduardo C. Oliveira-Filho¹; B. R. Geraldlino²; C. K. Grisolia³ & F. J. R. Paumgartten²

¹Embrapa Cerrados, Rod. BR 020, Km 13, CEP 73301-970, Planaltina-DF - Brasil

²Laboratório de Toxicologia Ambiental, ENSP/FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ - Brasil

³Laboratório de Genética IB/UnB, Brasília-DF - Brasil

INTRODUÇÃO

Os testes de ecotoxicidade aquática foram elaborados para fornecer dados qualitativos e quantitativos sobre os efeitos adversos de substâncias químicas sobre organismos aquáticos e vem se mostrando muito úteis para orientar decisões de pesquisadores, indústrias e agências ambientais, voltadas para evitar ou minimizar os impactos da poluição hídrica. Os ensaios rotineiramente empregados fundamentam-se em exposições agudas ou subcrônicas, com destaque para os tradicionais testes rápidos de reprodução e desenvolvimento, que podem ser inadequados para detectar aspectos mais sutis da toxicidade, tais como disfunções reprodutivas depois de exposições prolongadas.

Desse modo, para avaliar a competência dos métodos existentes na identificação e priorização do perigo, torna-se necessária a geração de dados definitivos de efeitos sobre a reprodução de populações cronicamente expostas (Arcand-Hoy & Benson, 1998), e nesse ponto torna-se um requisito fundamental o desenvolvimento de métodos de ensaio multigeração.

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho é descrever o protocolo multigeração desenvolvido para gastrópodes aquáticos, utilizando como espécie-teste o caramujo *Biomphalaria tenagophila* (Figura 1); e comparar os resultados obtidos com outros de clássicos testes rápidos de efeitos sobre reprodução e desenvolvimento.



Cedida por Pananese e Corría

MATERIAIS E MÉTODOS

Organismo-teste - Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são amplamente estudados no Brasil. Por se tratar de uma espécie hermafrodita, o experimento foi elaborado com a exposição individual de 10 organismos sexualmente maduros (10 réplicas), com aproximadamente 3 meses de idade, por 8 semanas, a cada uma das concentrações das substâncias testadas.

Exposição e Manutenção dos Organismos - A definição do tempo de duração da exposição da geração F0 (8 semanas) foi baseada nos dados de Andrade & Carvalho (1972). Como recipientes-teste foram utilizados copos de vidro, com capacidade de 300 ml. Para evitar a fuga dos caramujos expostos, os copos foram cobertos com fina malha de tecido. Durante o período de exposição, realizou-se, semanalmente, duas renovações da solução-teste. A cada renovação era fornecida a alimentação e inspecionavam-se os copos para o registro do número de ovos e de desovas por indivíduo. Visando a otimizar a reprodução e o crescimento dos organismos, foi oferecido, a cada renovação de solução, o alimento, consistindo em 0,20 mg de ração composta (Tabela 1) e cerca de 1 cm² de alface fresca.

Substâncias-teste - As substâncias selecionadas para serem incluídas neste estudo são poluentes previamente documentados no ambiente aquático (Bennie, 1999; Laabs et al., 2002), são suspeitas de terem atividade desreguladora do sistema endócrino e já foram relatadas por afetar adversamente a reprodução de outras espécies. O endossulfan é um inseticida do grupo químico ciclodienoclorado, registrado no Brasil para uso agrícola e como preservante de madeira. O produto utilizado no presente estudo foi o endossulfan grau técnico, com 98,7% de pureza, fornecido pela empresa Hoeschst-Agrevo. Os nonilfenol etoxilados são componentes de várias formulações químicas incluindo detergentes, tintas, cosméticos, agrotóxicos, produtos têxteis, entre outros (Muller & Schlatter, 1998), e seu uso resulta em grande contaminação de corpos hídricos, principalmente, via descarga de esgoto urbano (Bennie, 1999). Vários estudos têm demonstrado os efeitos adversos desses compostos em ambientes aquáticos (Servos, 1999). No presente estudo foi utilizado o nonilfenol com 9,5 unidades etoxiladas, conhecido comercialmente como RENEX 95, e fornecido pela empresa BASF S.A.

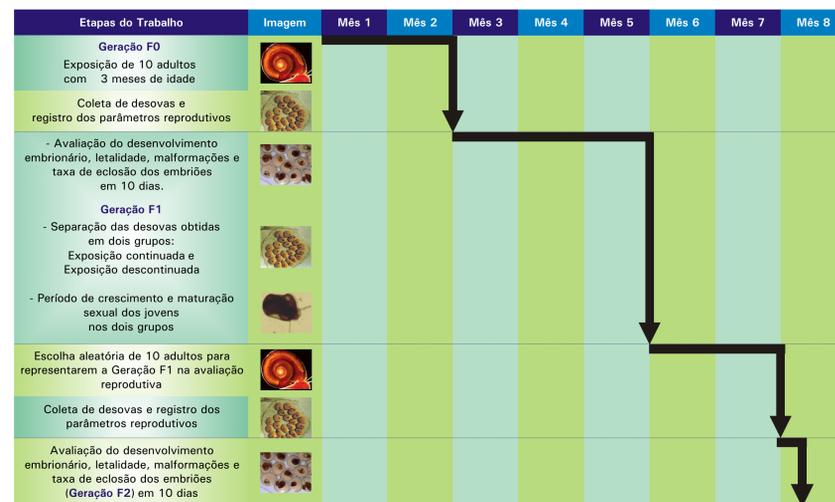
Diluições - Todas as concentrações testadas nos ensaios foram preparadas com a água mole sintética, padronizada pela ABNT para ensaios de toxicidade com organismos aquáticos, com pH entre 7,2 e 7,6 e dureza na faixa de 40 a 48 mg/L em CaCO₃ (ABNT, 1993). Neste estudo foram empregadas concentrações nominais das substâncias, obtidas por meio de diluições seriadas. Como solvente para a diluição do endossulfan, foi utilizado o álcool etílico marca VETEC, com 99% de pureza. O etanol foi testado na concentração de 0,0025% v/v, por ser esta a concentração presente na maior diluição do endossulfan.

Análises Estatísticas - Para o cálculo da toxicidade aguda (CL₅₀ 95%) foi utilizado o método *Trimmed Spearman Karber*. Com vistas à realização de comparações entre o desempenho reprodutivo dos organismos testados e determinação da Concentração sem Efeito (CENO), efetuou-se a análise ANOVA seguida pelo Teste de Dunnett.

Desenvolvimento do Método - A toxicidade aguda em sistema estático e 96 horas de exposição para organismos adultos, foi obtida visando à escolha das concentrações a serem utilizadas no ensaio de reprodução. Assim, determinou-se a concentração de efeito letal não observado (CELNO), e essa foi estabelecida como a mais alta concentração do teste definitivo. As outras duas diluições do teste definitivo foram obtidas a partir da divisão da CELNO/10 e da CELNO/100. Durante oito semanas, registrou-se o número de ovos por indivíduo, o número de desovas por indivíduo e o número de ovos por desova. Ao final das oito semanas determinou-se a embriotoxicidade, e os descendentes vivos foram mantidos até três meses de idade para o amadurecimento sexual e início do estudo reprodutivo da geração F1, que foi registrado tal como em F0. Ao final das oito semanas de observação da F1, determinou-se a toxicidade sobre os embriões F2. O tempo total de experimento relativo a cada substância ficou em torno de 20 semanas (Quadro 1).

COMPONENTES	QUANTIDADE
Leite em pó	171,88 g
Terra esterilizada (90) e enriquecida com bicarbonato de sódio	326,25 g 80,00 g
Germen de trigo	228,30 g
Carbonato de cálcio em pó	87,00 g
Alfafa seca e triturada	106,22 g
Vitamina E	0,35 g

Fonte: Freitas et al., 1997.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos mostram que o endossulfan apresentou efeito inibitório sobre a reprodução da geração F0 na maior concentração testada (0,1 mg/L) e sobre o número de ovos por desova na concentração intermediária (0,01 mg/L). Esse efeito se pronunciou como uma inibição ou retardo significativo da eclosão dos ovos de F0 (indivíduos F1) na concentração de 0,01 mg/L. Conseqüentemente, a partir das concentrações testadas pode-se dizer que a concentração nominal máxima de endossulfan em que não se observou efeito (CENO) foi 0,001 mg/L (1 g/L ou 1 ppb). Com o nonilfenol etoxilado foi observada redução na fecundidade da geração F0 entre os grupos expostos às duas maiores concentrações (0,1 e 1,0 mg/L) delimitando uma CENO de 0,01 mg/L ou 10 g/L em oito semanas. Na observação do desempenho reprodutivo da geração F1, os resultados foram semelhantes aos da geração F0, todavia, houve um claro retardo na eclosão dos embriões gerados pelos indivíduos F1 (geração F2) na concentração de 0,01 mg/L, impedindo assim a determinação da CENO depois de 29 semanas, pois seu valor ficou abaixo da menor concentração testada.

Nas tabelas 2 e 3, os resultados são comparados com os de clássicos testes de efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento. Em relação ao endossulfan (Tabela 2), observa-se que a CENO obtida foi uma das mais baixas, sendo superior apenas à obtida para redução no crescimento do peixe *Pimephales promelas*. Sobre o nonilfenol etoxilado, observa-se na Tabela 3, que a CENO obtida foi a mais baixa. Os resultados apresentados com o etanol, na concentração de 0,025% v/v, não foram significativamente diferentes do grupo controle, tanto na F0 quanto na F1/F2.

Nesse contexto, verifica-se que o estudo multigeração proposto mostrou-se sensível para detectar agravos não letais causados por substâncias químicas e que esse tipo de estudo com caramujos pode vir a ser uma interessante alternativa para a predição dos efeitos crônicos de poluentes em ecossistemas aquáticos.

Nonilfenol (NP)	Organismo-teste	Efeito e Duração	CENO	Referência
NP9	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Inib. Cresc. (96 horas)	8000	Dorn et al., 1993
NP	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Inib. Cresc. (96 horas)	92	Servos, 1999
NP9	<i>Daphnia magna</i>	Inib. Cresc. (7 dias)	10000	Dorn et al., 1993
NP	<i>Daphnia magna</i>	Inib. Reprod. (21 dias)	100	Servos, 1999
NP	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inib. Reprod. (7 dias)	89	Servos, 1999
NP9	<i>Pimephales promelas</i>	Letal. e Inib. Cresc. (7 dias)	1000	Dorn et al., 1993
NP9,5	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Reprod. e Desenv. Embrion. (8 semanas) F0 (25 semanas) F1	10 < 10	Presente Estudo

Tabela 2 Comparação entre a CENO para o endossulfan, obtida na presente proposta, e valores obtidos nos tradicionais testes rápidos de efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento. Valores expressos em g/L.

Organismo teste	Efeito e Duração	CENO	Referência
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inib. Cresc. (96 horas)	130	DeLorenzo et al., 2002
<i>Daphnia magna</i>	Inib. Reprod. (21 dias)	150	Fernández-Casalderrey et al., 1993
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inib. Reprod. (14 dias)	10	Sunderam et al., 1994
<i>Pimephales promelas</i>	Letal. e Inib. Cresc. (7 dias)	0,2	USEPA, 2002
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Reprod. e Desenv. Embrion. (8 semanas) F0 (20 semanas) F1	1 1	Presente Estudo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 1993. Água. Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). NBR 12713. Rio de Janeiro: ABNT.

Arcand-Hoy, L.D. & Benson, W.H., 1998. Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 49-57.

Andrade, R.M. & Carvalho, O.S., 1972. Alimentação e fecundidade de planorbídeos criados em laboratório. I: *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). *Rev. Bras. Biol.*, 32: 225-233.

Bennie, D.T., 1999. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada*, 34: 79-122.

DeLorenzo, M.E., Taylor, L.A., Lund, S.A., Pennington, P.L., Storzler, E.D. & Fulton, M.H., 2002. Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural pesticide endossulfan in phytoplankton and zooplankton. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 173-181.

Dorn, P.B., Salanito, J.P., Evans, S.H. & Kravetz, L., 1993. Assessing the aquatic hazard of some branched and linear nonionic surfactants by biodegradation and toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1751-1762.

Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M.D. & Andreu-Moliner, E., 1993. Effects of endossulfan on survival, growth and reproduction of *D. magna*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106: 437-441.

Freitas, J.S., Paula, D.P. & Cariello, M.O., 1997. The influence of self-fertilization performance and copulation behavior in reproduction by cross-fertilization in groups of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92: 739-743.

Laabs, V., Amelung, W., Pinto, A.A., Wantzen, M., Silva, C.J. & Zech, W., 2002. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. *J. Environ. Qual.*, 31: 1636-1648.

Muller, S. & Schlatter, C., 1998. Oestrogenic potency of nonylphenol *in vivo* - a case study to evaluate the relevance of human non-occupational exposure. *Pure Appl. Chem.*, 70: 1847-1853.

Servos, M.R., 1999. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual. Res. J. Canada*, 34: 123-177.

Sunderam, R.I.M., Thompson, G.B., Chapman, J.C. & Cheng, D.M.H., 1994. Acute and chronic toxicity of endossulfan to two Australian cladocerans and their applicability in deriving water quality criteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 27: 541-549.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2002. Reregistration eligibility decision for endossulfan. Julho 2003. <http://www.epa.gov/opprrd1/REDs/endossulfan_red.pdf>.