



Método Multigeração para Avaliação dos Efeitos de Poluentes Sobre a Reprodução de Caramujos de Água Doce

E. C. OLIVEIRA-FILHO,^{1*} B. R. GERALDINO,²
C. K. GRISOLIA³ & F. J. R. PAUMGARTTEN²

¹Laboratório de Ecotoxicologia – Embrapa Cerrados, Rod. BR 020 km 18, CEP 73310-970, Planaltina, DF

²Laboratório de Toxicologia Ambiental – ENSP/FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ

³Laboratório de Genética – IB/UnB, CEP 70910-900, Brasília, DF

RESUMO

Testes de ecotoxicidade têm sido úteis para nortear ações regulatórias voltadas à prevenção de danos a ecossistemas aquáticos. Os ensaios de rotina são baseados em exposições agudas ou subcrônicas e podem ser inadequados para detectar uma disfunção reprodutiva após prolongadas exposições a baixas concentrações de poluentes. Nesse contexto, propõe-se um método multigeração para avaliar os efeitos de substâncias químicas sobre a reprodução do caramujo *Biomphalaria tenagophila*. As substâncias testadas incluem dois poluentes ambientais: o agrotóxico endossulfan e o componente químico industrial nonilfenol etoxilado. Caramujos adultos (10 por concentração) foram individualmente expostos a concentrações não agudamente letais por duas gerações. Os efeitos avaliados incluem: sobrevivência, fecundidade e desenvolvimento embrionário. Os resultados obtidos mostram que alguns efeitos adversos sobre a reprodução foram observados somente após a exposição contínua por mais de uma geração. Uma comparação com resultados dos clássicos testes crônicos de curta duração mostra que o estudo multigeração proposto parece ser uma abordagem sensível para avaliar efeitos crônicos de poluentes ambientais.

Palavras-chave: ecotoxicologia aquática, caramujos, testes de toxicidade, poluição das águas, toxicologia reprodutiva.

ABSTRACT

Multigeneration method to evaluate effects of pollutants on the reproduction of freshwater snails

Ecotoxicity tests have been useful to guide regulatory decisions for pollution control to prevent adverse effects on aquatic ecosystems. Routine assays are based on acute or sub-chronic exposures and may be inadequate for detecting a reproductive impairment after long-term exposure to low concentrations of pollutants. To help address this gap was proposed a multigeneration method to evaluate the effects of chemicals on the reproduction of *Biomphalaria tenagophila* snail. Chemicals tested include two environmental pollutants, the pesticide endosulfan and the industrial chemical nonylphenol ethoxylate. Adult snails (10 per concentration) were individually exposed to non acutely lethal concentrations for two generations. Endpoints evaluated include: survival, fecundity and embryonic development. Results showed that some adverse effects on reproduction were observed only after continuous exposure lasting longer than one generation. A comparative analysis with results of classic short-term chronic tests show that the multigeneration study designed seems to be a sensitive approach to evaluate chronic effects of environmental pollutants.

Key words: aquatic ecotoxicology, snails, toxicity tests, water pollution, reproductive toxicology.

*Corresponding author: Eduardo C. Oliveira-Filho, e-mail: cyrino@cpac.embrapa.br.

INTRODUÇÃO

O controle da poluição das águas é um dos grandes desafios da população humana na atualidade, visto que as previsões de escassez desse recurso natural vêm gerando preocupação em vários setores da sociedade. Nesse contexto, além das determinações químicas e análises de parâmetros físico-químicos, os testes de ecotoxicidade aquática foram elaborados para fornecer dados qualitativos e quantitativos sobre os efeitos adversos de substâncias químicas em organismos aquáticos e vêm 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, como disfunções reprodutivas após 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 pré-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*, e comparar os resultados obtidos com outros de clássicos testes rápidos de efeitos sobre reprodução e desenvolvimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Organismo-teste – O organismo utilizado no presente estudo é o molusco gastrópode da espécie *Biomphalaria tenagophila*. Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são amplamente estudados no Brasil, porque três das suas espécies são hospedeiras intermediárias do *Schistosoma mansoni*, trematódeo parasita causador da esquistossomose mansônica. Por se tratar de uma espécie hermafrodita, os experimentos têm início 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), que demonstraram, num acompanhamento da *B. tenagophila* por 20 semanas, que a oitava semana foi uma das que apresentaram maior pico reprodutivo para a espécie mantida no laboratório. 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 realizaram-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, era oferecido, a cada renovação de solução, o alimento, consistindo em 0,20 mg de ração composta (Freitas *et al.*, 1997) 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. Embora apresente baixa solubilidade em água (0,3 mg/L), contamina ecossistemas aquáticos em virtude, principalmente, da lixiviação de campos agrícolas e via despejo em rios próximos a áreas industrializadas onde ocorrem fabricação e formulação do inseticida (WHO, 1984). 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). A solubilidade aquosa do nonilfenol aumenta conforme o tamanho da cadeia, e os compostos acima de seis unidades etoxiladas são altamente solúveis (EHCH, 2001). No presente estudo foi utilizado o nonilfenol com 9,5 unidades etoxiladas, conhecido comercialmente como RENEX 95, fornecido pela empresa BASF S.A.

Diluições – Todas as concentrações testadas nos ensaios foram preparadas com a água mole sintética, padronizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas 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*, disponível em programa para computador. Com vistas à realização de comparações entre o desempenho reprodutivo dos organismos testados e a determinação da Concentração sem Efeito (CENO), efetuou-se a análise ANOVA seguida do Teste de Dunnett, disponível em programa para computador na Versão 1.5.

Desenvolvimento do Método – A toxicidade aguda em sistema estático de exposição e em 96 horas de exposição para organismos adultos foi obtida visando à escolha das concentrações a serem utilizadas no ensaio de reprodução. Com base nesses resultados determinou-se a concentração de efeito letal não observado (CELNO), e esta 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. Escolhidas as concentrações a serem utilizadas no ensaio reprodutivo, dez indivíduos adultos (Geração F0) foram individualmente expostos, por concentração, às substâncias testadas, e duas vezes por semana, na ocasião de renovação da solução, durante oito semanas, registraram-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.

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 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 µg/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 µg/L em oito semanas. Na observação do desempenho reprodutivo da geração F1, os resultados foram semelhantes aos da geração F0, todavia, houve 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 20 semanas, pois seu valor está abaixo da menor concentração testada.

Nas Tabelas 1 e 2 os resultados são comparados com os de clássicos testes de efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento. Em relação ao endossulfan (Tabela 1), 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 2, que a CENO obtida foi a mais baixa. Os resultados apresentados com o etanol 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.

Tabela 1 — 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 µg/L.

Organismo-teste	Efeito e duração	CENO	Referência
<i>Pseudokirchneriella subcapitatum</i>	Inib. cresc. (96 horas)	130	DeLorenzo <i>et al.</i> , 2002
<i>Daphnia magna</i>	Inib. reprod. (21 dias)	150	Fernández-Casalderrey <i>et al.</i> , 1993
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inib. reprod. (14 dias)	10	Sunderam <i>et al.</i> , 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)	1	Presente estudo

Tabela 2 — Comparação entre a CENO para o nonilfenol etoxilado, obtida na presente proposta, e valores obtidos nos tradicionais testes rápidos de efeitos sobre a reprodução e o desenvolvimento com diferentes formas do nonilfenol. Valores expressos em µg/L.

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 (20 semanas) f1	10 < 10	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. ABNT, Rio de Janeiro.
- ARCHAND-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., STROZIER, E. D. & FULTON, M. H., 2002, Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural pesticide endosulfan in phytoplankton and zooplankton. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 173-181.
- DORN, P. B., SALANITRO, 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.
- ECHC (Environment Canada and Health Canada), 2001, *Priority substances list assessment report – nonylphenol and its ethoxylates*. Canadian Environment Protection Act, 1999. 97p.
- FERNÁNDEZ-CASALDERREY, A., FERRANDO, M. D. & ANDREU-MOLINER, E., 1993, Effects of endosulfan 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 endosulfan to two Australian cladocerans and their applicability in deriving water quality criteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 27: 541-545.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2002, *Reregistration eligibility decision for endosulfan*. Julho 2003. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrd1/REDS/endosulfan_red.pdf>.
- WHO (World Health Organization), 1984, *Endosulfan*. Report of WHO Expert Committee. WHO Environmental Health Criteria 40, WHO, Geneva, 64p.