



SETAC – Brazil

Comparação de Testes Ecotoxicológicos com *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Daphnia magna* (Straus, 1820) Utilizando Remazol Brilliant Blue R e Água de Arroio Urbano

R. LANZER,* M. MÜLLER, M. DUMCKE & K. RASERA

Laboratório de Toxicologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul,
C.P. 1352, CEP 95020-972, Caxias do Sul, RS, Brasil

(Received August 16, 2006; Accepted October 5, 2006)

RESUMO

O estudo visa comparar os efeitos do corante Remazol Brilliant Blue R e da água de arroio receptor de despejos mistos no desenvolvimento embrionário de *Biomphalaria tenagophila* e na reprodução de *Daphnia magna*. Posturas de *B. tenagophila* e jovens de *D. magna* foram expostos ao corante nas concentrações de 10 e 25 mg L⁻¹ e em água do arroio no estado bruto e diluição de 50%. O corante não teve efeito na taxa de eclosão, desenvolvimento e mortalidade dos embriões ($p > 0,05$). Quanto à reprodução de *D. magna*, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no número de neonatos em relação ao controle em ambas as concentrações do corante. As águas do arroio, em ambos os estados, provocaram mortalidade dos embriões entre 10 e 12 dias de exposição. Em *D. magna* houve diferença significativa no número de neonatos e na mortalidade, em relação ao controle, somente na exposição à água bruta. Os resultados indicam maior sensibilidade dos embriões de *B. tenagophila* à mistura de despejos domésticos e industriais presente em arroios urbanos, demonstrando sua utilidade no biomonitoramento da toxicidade aquática.

Palavras-chave: arroio urbano, *Biomphalaria tenagophila*, corante, desenvolvimento embrionário, reprodução de *Daphnia magna*, toxicidade crônica.

ABSTRACT

Comparative toxicological assays with *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) and *Daphnia magna* (Straus, 1820) using Remazol Brilliant Blue R and water from urban stream

The aim of this study was to compare the effects of Remazol Brilliant Blue R (RBBR) and polluted urban streams on the *Biomphalaria tenagophila* embryonic development test, in comparison to the *Daphnia magna* reproduction test. Eggs of *B. tenagophila* and *D. magna* neonates have been exposed to RBBR (10 and 25 mg L⁻¹ coloring concentrations) and 50% diluted and not diluted stream water. The dye was ineffective in alter the hatching rate, development and embryo mortality ($p > 0.05$). The reproduction of *D. magna* showed significant difference ($p < 0.05$) compared to control in both coloring concentrations. The stream water caused embryo mortality between 10 and 12 days in both cases. The neonates number and the mortality of *D. magna* differed significantly from the control only in the exposed undiluted stream water. The results from this study indicated that *B. tenagophila* embryos were more susceptible to complex mixtures in freshwater than *D. magna*, proving its usefulness as biological indicator in aquatic toxicity biomonitoring.

Key words: *Biomphalaria tenagophila*, coloring, *Daphnia magna* reproduction, embryonic development, toxicity chronic, urban stream.

*Corresponding author: Rosane Lanzer, e-mail: rlanzer@ucs.br.

INTRODUÇÃO

A predição realista do impacto ambiental em níveis subletais de compostos tóxicos individuais e, mais relevante, de misturas de substâncias tóxicas é o maior desafio da pesquisa na toxicologia ambiental (Rittschof & McClellan-Green, 2005).

As análises químicas são imprescindíveis na identificação e na quantificação de compostos químicos específicos no ambiente, mas aqueles não cobertos pela técnica analítica são negligenciados (Fent, 2003). Ensaios biológicos permitem verificar o efeito de todas as substâncias contidas na água que estão biologicamente disponíveis, assim como avaliar a resultante de seus efeitos sinérgicos e antagônicos (Marschner, 1999). A ação de poluentes nos ecossistemas naturais pode ser medida por seus efeitos no processo reprodutivo de espécies-chave do ecossistema (Tripathi & Singh, 2004). Assim, a avaliação dos parâmetros que comprometem a manutenção de populações naturais é de extrema relevância na pesquisa ecotoxicológica.

Vários milhões de compostos químicos coloridos têm sido sintetizados nos últimos cem anos, dos quais cerca de 10.000 são produzidos em escala mundial (Guarati & Zaroni, 2000). As indústrias têxteis geram grande quantidade de resíduos com baixos níveis de degradação, e cerca de 15% dos corantes utilizados no processo de tingimento são perdidos no efluente (Dellamatrice & Monteiro, 2006).

Pela importância à saúde humana, espécies do gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910) são bastante investigadas, o que favorece seu uso como organismo-teste, tendo sido publicados, no ano de 2005, cerca de 12.300 estudos sobre o gênero. Ensaios toxicológicos empregando espécies de *Biomphalaria* têm evidenciado sua importância como bioindicador na identificação da toxicidade aquática (Nakano *et al.*, 2003; Salice & Miller, 2003; Oliveira-Filho *et al.*, 2005). Com o objetivo de avaliar a sensibilidade da resposta do desenvolvimento embrionário de *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) à mistura de substâncias presentes em arroios urbanos e a uma única substância, foi feita a comparação com *Daphnia magna* (Straus, 1820), organismo amplamente utilizado em testes de toxicidade aquática. O estudo visa contribuir com a elaboração de ensaios com novas espécies para verificar toxicidade crônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e regime de manutenção

Exemplares de *D. magna* foram obtidos a partir da cultura no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Caxias do Sul, conforme norma estabelecida (NBR 12713, 2004). Os organismos foram mantidos em sala climatizada (23°C) com fotoperíodo de 16:8 horas (claro:escuro), luminosidade em torno de 2.000 Lux, em béqueres de 2000 mL. Os crustáceos foram alimentados uma vez por dia com algas clorofíceas, principalmente *Scenedesmus subspicatus* (10⁷ cels/cm³). *B.*

tenagophila foi trazida de tanques de cultivo, com 200 L de água natural, mantidos em estufa. Em laboratório, os moluscos foram aclimatados em mesmo meio e condições de *D. magna*, sendo alimentados com alface orgânica (*ad libitum*), complementada com ração para peixe.

Tratamento experimental

Posturas de *B. tenagophila* com menos de 24 horas foram cuidadosamente retiradas das paredes de béqueres, sendo contado o número de ovos e examinados os embriões ao estereomicroscópio. As massas de ovos de *B. tenagophila* e neonatos de *D. magna* foram expostos ao corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) nas concentrações de 10 e 25 mg L⁻¹ e à água de arroio poluído por despejos domésticos e industriais no estado bruto e na diluição de 50% em meio de cultivo. Os controles foram mantidos no meio de cultivo. Foram utilizadas quatro réplicas por meio, sendo duas séries experimentais para cada ensaio. A água foi coletada no arroio Tega, na região urbana de Caxias do Sul, RS. A cada dois dias, o meio foi substituído e os embriões de *B. tenagophila* foram observados quanto ao estágio de desenvolvimento, mortalidade e número de ovos eclodidos em 14 dias, pois a eclosão ocorre entre 9 e 16 dias (Santini, 2004). A taxa de mortalidade tolerada no controle foi de até 20%. Neonatos de *D. magna*, com idade entre 6 e 24 horas, foram aleatoriamente selecionados, sendo expostos cinco indivíduos nas concentrações testadas, as quais eram trocadas a cada 48 horas. O número de neonatos foi observado a partir da primípara e a mortalidade dos adultos, a cada 48 horas durante 21 dias. O número mínimo de nascimentos, que ocorre a partir de sete dias de exposição, foi em média 20 indivíduos por prole (NBR 12713, 2004), mantido o mesmo fotoperíodo do cultivo, em temperatura ambiente.

Amostras testadas:

1. Corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR)

O RBBR é um corante reativo do grupo antraquinona que apresenta como característica alta solubilidade em água e o estabelecimento de ligação covalente entre o corante e a fibra, cuja ligação confere maior estabilidade da cor do tecido tingido, sendo empregado na indústria na concentração de 50 mg L⁻¹ (Rasera, 2006) e utilizado nas concentrações de 10 e 25 mg L⁻¹.

2. Água de arroio

O arroio Tega (Caxias do Sul, RS), com extensão de aproximadamente 33 km, é usado como fonte de escoamento de esgotos domésticos e industriais. As análises físico-químicas e biológicas realizadas em 2003 e 2004 (Santini, 2004) e os estudos de Reis (2002) evidenciaram a baixa qualidade da água e a presença de metais pesados como cobre, alumínio, chumbo, cromo, zinco e prata em níveis elevados, desconhecendo-se as concentrações de compostos orgânicos nocivos.

Análise estatística

A não normalidade na distribuição dos dados foi determinada pelo teste Kolmogorov-Smirnov e a significância das diferenças estatísticas, pelo teste de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$), utilizando o programa SPSS versão 11.5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sistemas aquáticos relacionados ao meio urbano reúnem substâncias tanto de despejos domésticos como de efluentes industriais, constituindo misturas complexas. Santini (2004) avaliou a toxicidade da água dos arroios Tega e Pinhal, na cidade industrial de Caxias do Sul, no desenvolvimento embrionário de *B. tenagophila*, verificando retardo no desenvolvimento, presença de malformações e alta mortalidade dos embriões. O efeito de uma única substância sobre os organismos difere entre espécies e níveis de organização biológica e tem sido alvo de muitos estudos (Radix *et al.*, 2000; Tsui & Chu, 2003; Oliveira-Filho *et al.*, 2005). Para avaliar a sensibilidade da resposta dos embriões de *B. tenagophila*, este ensaio foi comparado ao teste de reprodução de *D. magna*, que é amplamente empregado no monitoramento da toxicidade (Laitano & Matias, 2006).

Os embriões de *B. tenagophila*, quando expostos ao corante RBBR, apresentaram retardo no desenvolvimento embrionário, redução na taxa de eclosão dos ovos e maior mortalidade dos embriões relacionados ao aumento da concentração (Tabela 1). Entretanto, não se constata diferença significativa dos resultados em relação ao controle ($p > 0,05$). Em *D. magna*, o número de neonatos sofreu redução de cerca de 50% em 10 mg L⁻¹ e de 75% em 25 mg L⁻¹, diferindo significativamente em relação ao controle e entre as duas concentrações (Figura 1). A mortalidade apresentou diferença estatística somente em uma das séries experimentais ($p < 0,05$).

Tóxicos orgânicos degradáveis são convertidos em outros compostos via série complexa de produtos intermediários, os

quais frequentemente escapam à análise, e a degradação não pode ser sempre interpretada como destoxificação (Admiraal *et al.*, 2000). Nas exposições à água do arroio Tega, os embriões de *B. tenagophila* apresentaram alta mortalidade, sendo que entre 85% e 91% deles não ultrapassaram o estágio de trocófora na água em estado bruto (Tabela 2). Na água diluída do arroio, até 56% atingiram o hipo-estádio, mas não houve eclosão dos ovos. As diferenças entre as exposições à água do arroio e o controle foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$), não havendo diferença entre a água em estado bruto e a diluída. Nos ensaios com *D. magna*, exposta à água do arroio Tega, observa-se diferença significativa em relação ao controle somente na água em estado bruto ($p < 0,05$) (Figura 2). A mortalidade foi significativa na segunda série de testes entre o controle e a exposição à água bruta e entre esta e a água diluída do arroio ($p < 0,05$).

O desenvolvimento embrionário de gastrópodes límnicos tem sido empregado com sucesso para detectar efeitos tóxicos de metais (Gomot, 1998) e compostos orgânicos (Tate *et al.*, 1997; Lanzer *et al.*, 1999). Oliveira-Filho *et al.* (2005), por outro lado, encontraram que caracóis recém-eclodidos de *B. tenagophila* foram mais suscetíveis ao endossulfano, nonilfenol e etanol do que os embriões e adultos. A divergência entre os autores deve estar no *end point* escolhido. Enquanto Oliveira-Filho *et al.* (2005) testam a toxicidade aguda (mortalidade) em exposições até 96 horas, Tate *et al.* (1997) e Lanzer *et al.* (1999) avaliam a toxicidade crônica (reprodução). O uso de dados da toxicidade crônica é essencial para a avaliação ecotoxicológica de substâncias químicas (Radix *et al.*, 2000).

O ensaio com o desenvolvimento embrionário de *B. tenagophila* mostrou-se mais sensível que o teste de reprodução de *D. magna* na determinação da toxicidade crônica de misturas presentes em arroios poluídos por despejos domésticos e industriais. O estudo enfatiza a necessidade de testes com espécies e níveis de organização biológica distintos na predição do risco ambiental.

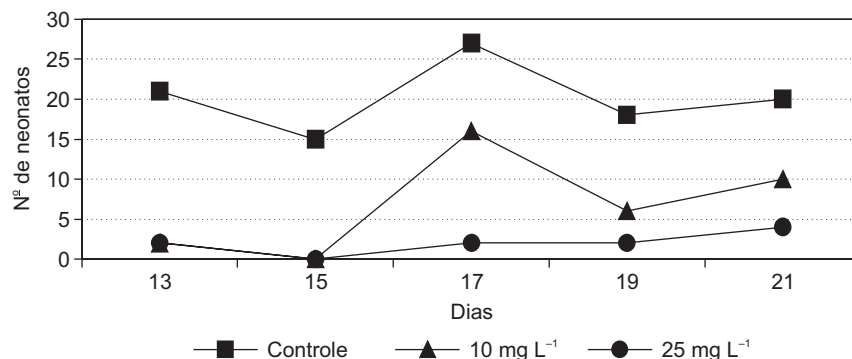


Figura 1 – Número médio de neonatos de *D. magna* exposta ao corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) nas concentrações de 10 e 25 mg L⁻¹ e controle.

Tabela 1 – Desenvolvimento embrionário de *B. tenagophila* exposta ao corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR). A – Controle; B – 10 mg L⁻¹ do corante; C – 25 mg L⁻¹.

A						
Estágios/dias	Mórula	Trocófora	Véliger	Hipo-estágio	Eclosão	Mortalidade
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	0%	100%	0%	0%	0%	0%
4	0%	6%	94%	0%	0%	0%
6	0%	0%	3%	94%	0%	3%
8	0%	0%	0%	96%	0%	4%
10	0%	0%	0%	96%	0%	4%
12	0%	0%	0%	52%	44%	4%
14					94%	6%

B						
Estágios/dias	Mórula	Trocófora	Véliger	Hipo-estágio	Eclosão	Mortalidade
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	35%	65%	0%	0%	0%	0%
4	4%	56%	40%	0%	0%	0%
6	2%	9%	49%	40%	0%	0%
8	0%	9%	0%	88%	0%	3%
10	0%	0%	0%	88%	0%	12%
12	0%	0%	0%	85%	0%	15%
14				50%	35%	15%

C						
Estágios/dias	Mórula	Trocófora	Véliger	Hipo-estágio	Eclosão	Mortalidade
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	0%	99%	0%	0%	0%	1%
4	0%	7%	90%	0%	0%	3%
6	0%	7%	0%	90%	0%	3%
8	0%	0%	0%	90%	0%	10%
10	0%	0%	0%	90%	0%	10%
12	0%	0%	0%	82%	7%	11%
14				60%	27%	13%

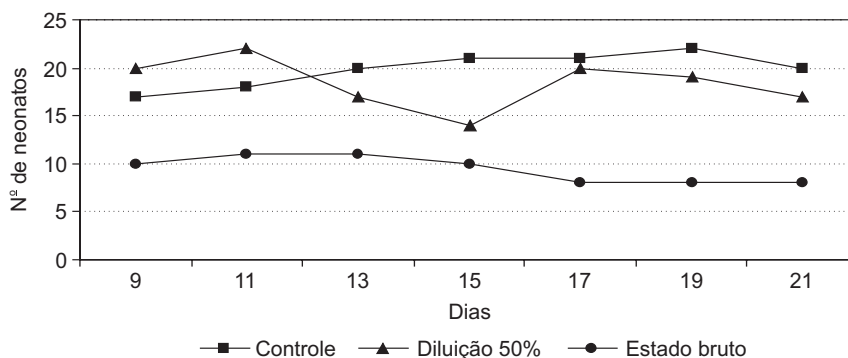


Figura 2 – Número médio de neonatos de *D. magna* exposta à água do arroio Tega, Caxias do Sul, RS, em estado bruto, diluída 50% e controle.

Tabela 2 – Desenvolvimento embrionário de *B. tenagophila* exposta à água do arroio Tega, Caxias do Sul, RS.
A – Controle; B – estado bruto; C – diluída 50%.

A						
Estágios/Dias	Mórula	Trocófora	Véliger	Hipo-estágio	Eclosão	Mortalidade
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	98%	0%	0%	0%	0%	2%
4	0%	96%	0%	0%	0%	4%
6	0%	0%	95%	0%	0%	5%
8	0%	0%	0%	95%	0%	5%
10	0%	0%	0%	87%	4%	9%
12	0%	0%	0%	44%	47%	9%
14					88%	12%
B						
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	97%	0%	0%	0%	0%	3%
4	13%	82%	0%	0%	0%	5%
6	0%	95%	0%	0%	0%	5%
8	0%	95%	0%	0%	0%	5%
10	0%	93%	0%	0%	0%	7%
12	0%	91%	0%	0%	0%	9%
14					0%	100%
C						
0	100%	0%	0%	0%	0%	0%
2	52%	47%	0%	0%	0%	1%
4	7%	58%	34%	0%	0%	1%
6	0%	32%	53%	14%	0%	1%
8	0%	32%	11%	56%	0%	1%
10	0%	32%	11%	56%	0%	1%
12	0%	32%	11%	56%	0%	1%
14					0%	100%

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMIRAAL, W., BARRANGUET, C., VAN BEUSEKOM, S. A. M., BLEEKER, E. A. J., VAN DEN ENDE, F. P., VAN DER GEEST, H. G., GROENENDIJK, D., IVORRA, N., KRAAK, M. H. S. & STULJFZAND, S. C., 2000, Linking ecological and ecotoxicological techniques to support river rehabilitation. *Chemosphere*, 41: 289-295.

DELLAMATRICE, P. M. & MONTEIRO, R. T. R., 2006, Toxicidade de resíduos têxteis tratados por microorganismos. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1: 63-66.

FENT, K., 2003, Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol. Lett.*, 140: 353-365.

GOMOT, A., 1998, Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotox. Environ. Safety*, 41: 288-297.

GUARATINI, C. C. I. & ZANONI, M. V. B., 2000, Corantes têxteis. *Química Nova*, 23: 71-78.

LAITANO, K. S. & MATIAS, W. G., 2006, Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1(1): 43-47.

LANZER, R., PFISTER, G., SCHRAMM, K-W. & KETTRUP, A., 1999, Evaluation of the toxicity of nonylphenol in the embryonic development of *Lymnaea stagnalis* (Linne). *Proceedings of SECOTOX 99, Fifth European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety*, Munich, Germany, GSF-Bericht 02/99, PF1, 4p.

MARSCHNER, A., 1999, Biologische Bodensanierung und ihre Erfolgskontrolle durch Biomonitoring. *In: J. Oehlmann & B. Markert, Ökotoxikologie, Landsberg. Ecomed.*, pp. 568-576.

NAKANO, E., WATANABE, L. C., OHLWILER, F. P., PEREIRA, C. A. B. & KAWANO, T., 2003, Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Mutat. Res.*, 536: 145-154.

NBR 12713, 2004, ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.

- OLIVEIRA-FILHO, E. C., GERALDINO, B. R., GRISOLIA, C. K. & PAUMGARTTEN, F. J. R., 2005, Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Bull. Environ. Contamin. and Toxicol.*, 75: 1185-1190.
- RADIX, P., LÉONARD, M., PAPANTONIOU, C., ROMAN, G., SAOUTER, E., GALLOTTI-SCHMITT, S., THIÉBAUD, H. & VASSEUR, P., 2000, Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotox. Environ. Safety*, 47: 186-194.
- RASERA, K., 2006, *Desenvolvimento de membranas com atividade de lacases por imobilização do extrato enzimático de Pleurotus sajor caju*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 90p.
- REIS, A. C. M., 2002, *Índice de qualidade do arroio Tega*. Monografia, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Caxias do Sul.
- RITTSCHOF, D. & McCLELLAN-GREEN, P., 2005, Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Mar. Poll. Bull.*, 50: 369-373.
- SALICE, C. J. & MILLER, T. J., 2003, Population-level responses to long-term cadmium exposure in two strains of a freshwater gastropod *Biomphalaria glabrata*: result from a life-table response experiment. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 22: 678-688.
- SANTINI, L. G., 2004, *Fertilidade e desenvolvimento embrionário de gastrópodes aquáticos como indicadores da toxicidade de arroios urbanos*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 97p.
- TATE, T. M., SPURLOCK, J. O. & CHRISTIAN, F. A., 1997, Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, 33: 286-289.
- TRIPATHI, P. K. & SINGH, A., 2004, Toxic effects of cypermethrin and alphasmethrin on reproduction and oxidative metabolism of the freshwater snail, *Lymnaea acuminata*. *Ecotox. Environ. Safety*, 58: 227-235.
- TSUI, M. T. K. & CHU, L. M., 2003, Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52: 1189-1197.