

Toxicidade Letal Aguda de Sulfato de Cobre em *Artemia* spp.

Maria João Moreira

Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências, Praça Gomes Teixeira,
4050 Porto, Portugal

Resumo

A *Artemia* spp. é utilizada desde os anos 80 em estudos de toxicidade, de várias substâncias tóxicas. Neste estudo foi determinada a concentração de sulfato de cobre letal para 50 % de nauplios de *Artemia* expostos ao final de 48 horas. Determinou-se que o sulfato de cobre é cerca de 1,5 vezes menos tóxico do que o dicromato de potássio (tóxico de referência), sendo necessário uma concentração letal de 17 mg/L suficiente para 50 % da população, relativamente a 11 mg/L dicromato de potássio.

Palavras - Chave: Ecotoxicologia, Bioensaio, Sulfato de Cobre, Toxicidade letal aguda, *Artemia* spp.

Introdução

Para o estudo dos efeitos nocivos de substâncias químicas no contexto ecológico, realizam-se ensaios de toxicidade, que consistem em avaliar o efeito adverso de determinadas substâncias químicas em organismos teste. Como organismos teste podem-se utilizar peixes, bactérias, algas, plantas, protozoários, invertebrados aquáticos e ainda a utilização de linhas celulares.

Neste estudo utilizou-se um microcrustáceo, braquiópoda, a *Artemia* spp. pertencente ao filo Arthropoda. A artemia possui mecanismos de adaptação que as tornam cosmopolitas, como a osmorregulação, a presença de pigmentos respiratórios como a hemoglobina permitindo a sua existência em condições abruptas de salinidade,

temperatura e oxigénio dissolvido (Bayly, 1972), a disponibilidade de alternativas reprodutivas facilitam a dispersão nível mundial e a perpetuação dessa espécie.

Habita normalmente em poços e pequenos lagos de água salgada. Por serem ricas em proteínas, vitaminas (caroteno) e sais minerais, são utilizadas em larga escala como alimento de peixes e camarões de aquacultura. É utilizada em estudos de toxicidade desde os anos 80 por apresentar características significativas como: os seus organismos adultos têm um grande potencial reprodutivo; são de fácil aquisição no mercado e manutenção em laboratório; os cistos são de fácil eclosão; os testes apresentam uma boa reprodutividade e pode ser utilizada em diferentes estágios de desenvolvimento (quisto ou ovo, náuplio, matanáuplio ou adulto) (Nunes, 2005).

Diversos ensaios de toxicidade têm sido realizados testando diferentes substâncias, em *Artemia* spp. (tanto nos diferentes estados evolutivos como na capacidade de eclosão) (Brix, 2006), como por exemplo, estudos de toxicidade de lixiviados de aterros sanitários (Svensson, 2005); pesticidas organofosforados e carbamatos (Varo, 2006, Barahona, 1999); antibióticos (Migliore, 1997), agentes antifouling (Castritsi-Catharios, 2007) entre outros (Nunes, 2006). Mendez-Hermida (2007), considera a *Artemia* um agente de transmissão de *Cryptosporidium* spp. em cultura de peixes, e Varó et al. (2000) considera-a um bioacumulador de contaminantes ambientais, uma vez que está na base da cadeia alimentar. Estudos de CL₅₀ em artemia e em ratinhos, mostram que a *Artemia* pode ser utilizada como ensaio preliminar (janela de acção tóxica) de químicos tóxicos em mamíferos (Nunes, 2006).

O objectivo deste estudo foi determinar concentração letal para 50% das *Artemias* às quais foi administrado um produto tóxico, sulfato de ferro (mg/l), num período de 48 horas (48h-CL₅₀).

Material e Métodos

- Organismo teste

Utilizaram-se ovos de *Artemia* devidamente preparados e embalados. Para a eclosão dos ovos utilizou-se um recipiente de plástico, com água salgada artificial a 35 ppm, ligado através de um tubo a uma bomba de ar de forma a manter a água sempre em movimento e oxigenada. A água com pH cerca de 8,0 foi mantida à temperatura ambiente 25°C e iluminada com um candeeiro de luz média/forte colocado por cima do

recipiente. No período entre 48 e 72 horas os ovos eclodirão, tendo-se utilizado os náuplios com 24 horas após eclosão.

- Solução Sulfato de Cobre

Preparou-se uma solução mãe (50000 mg/L) adicionando-se 250 mg de sulfato de cobre 5 ml de água autoclavada. Para as diluições utilizou-se água salgada artificial a 35 ppm.

- Solução de Dicromato de Potássio: Tóxico de Referência

Preparou-se a solução de dicromato de potássio (50000 mg/L), adicionando-se 250 mg a 5 ml de água autoclavada. Para as diluições utilizou-se água salgada artificial a 35 ppm.

- Metodologia dos Ensaio

Para os ensaios preliminares e definitivos utilizaram-se microplacas de cultura de células de 96 poços. Em cada poço, foi colocado 10 µl da solução de incubação com aproximadamente 5 náuplios, 80 µl de água salgada artificial a 35 ppm e 100 µl de solução de contaminação diluída de sulfato de cobre e de dicromato de potássio respectivamente. Nos poços de controlo substitui-se a solução de contaminação por água salgada artificial a 35 ppm. Para cada concentração repetiu-se seis vezes de maneira a ter um total de 30 artemias por concentração. Mantiveram-se as microplacas à temperatura ambiente 25 °C sem adição de alimento, durante 48 horas. A realização dos ensaios foi em sistema fechado, uma vez que não ocorreu renovação periódica do meio durante o período de exposição.

- Ensaio Preliminar

Para determinar a janela de acção tóxica das soluções de contaminação, procedeu-se à diluição de cada uma das soluções mãe em água salgada artificial a 35 ppm, obtendo-se as seguintes concentrações: 0,1;1,0;10;100 e 1000 mg/L. Foi

determinado o intervalo de concentração de sulfato de cobre e dicromato de potássio que provocaram 0 % e 100% de mortalidade das *Artemias* expostas, de maneira a serem utilizadas nos ensaios definitivos. Para a avaliação da mortalidade, após 48 horas de exposição, contaram-se o número total de *Artemias* móveis e imóveis por cada concentração. A *Artemia* é considerada morta quando não se observa nenhum movimento durante o período de 30 segundos (Castrits-Catharios, 2007). A percentagem de mortalidade determinou-se através da seguinte equação: $I_m = N_m/N_t \times 100$, onde N_m corresponde ao número de *Artemias* mortas e N_t corresponde ao número total de indivíduos.

- Ensaio Definitivo

Para a determinação da toxicidade letal aguda (48h-CL₅₀), repetem-se os mesmos passos do ensaio preliminar, utilizando agora uma gama de concentrações correspondente aos limites dentro dos quais se obteve taxa mortalidade das *Artemias* entre 0 % e 100%. Procedeu-se à diluição de cada uma das soluções mãe em água salgada artificial a 35 ppm, para as seguintes concentrações: 0; 10; 20; 40; 80 mg/L. As *Artemias* foram expostas a quatro concentrações de sulfato de cobre e dicromato de potássio e duas concentrações controle, com seis repetições com aproximadamente cinco *Artemias* por repetição num total de 30 *Artemias* por concentração. A avaliação da mortalidade e percentagem de mortalidade, após 48 horas de exposição, foi de acordo com o descrito para o teste preliminar.

- Teste Estatístico

A determinação da toxicidade letal aguda (48h-CL₅₀), foi estatisticamente analisada através do Logprobit. Para cada substância de contaminação foi determinada a 48h-CL₅₀ para o intervalo de confiança 95 %. Para $P > 0,05$ os valores obtidos não são significativo, são homogéneos.

Resultado

- Ensaio Preliminar

Ambas as soluções de contaminação provocaram mais de 50 % de mortalidade em náuplios de artemia, para concentrações entre 10 e 100 mg/L. Não se verificou nenhuma morte para os controlos de ambas as soluções a testar.

- Ensaio definitivo

- Solução Sulfato de Cobre

Tabela 1. – Resultado do logProbit

Probit Empirico	Log Dose
4,02075	1
5,33065	1,301
6,64056	1,602
7,95046	1,903

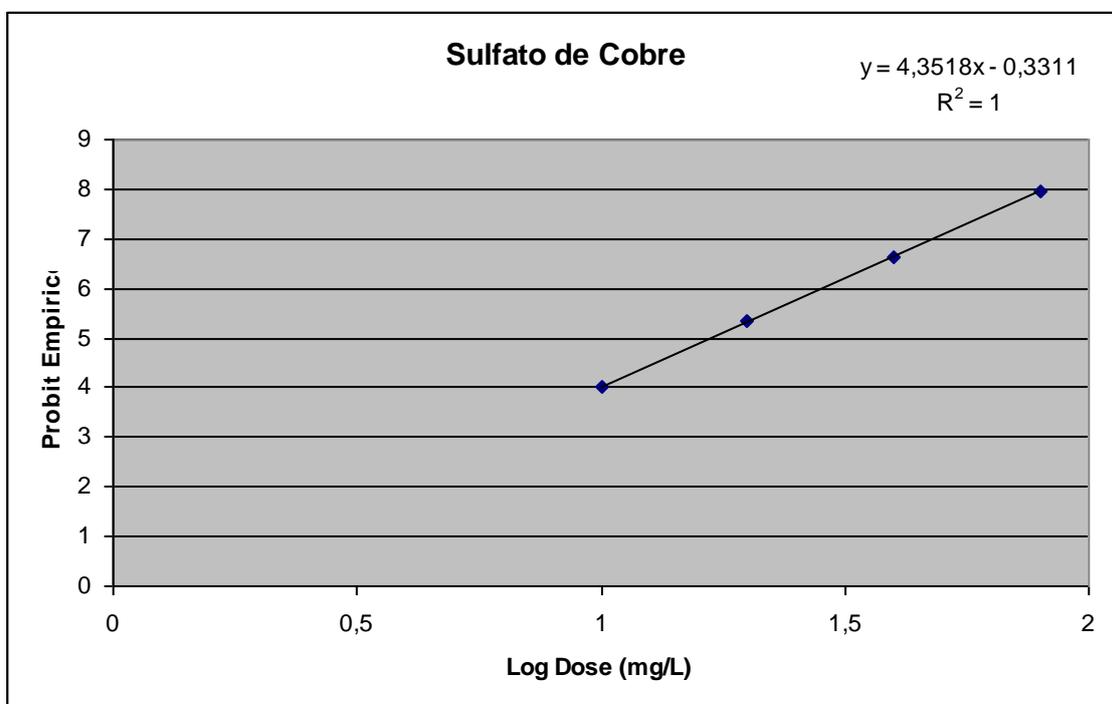


Gráfico 1 – Representação gráfica do logProbit

O $CL_{50} = 17 \text{ mg/l}$; $X^2 = 0,3$ e o $P > 0,05$

- Solução de Dicromato de Potássio: Tóxico de Referência

Tabela 2. – Resultado do logProbit

Probit Empirico	Log Dose
4,76887	1
6,49195	1,301
8,21504	1,602
9,93812	1,903

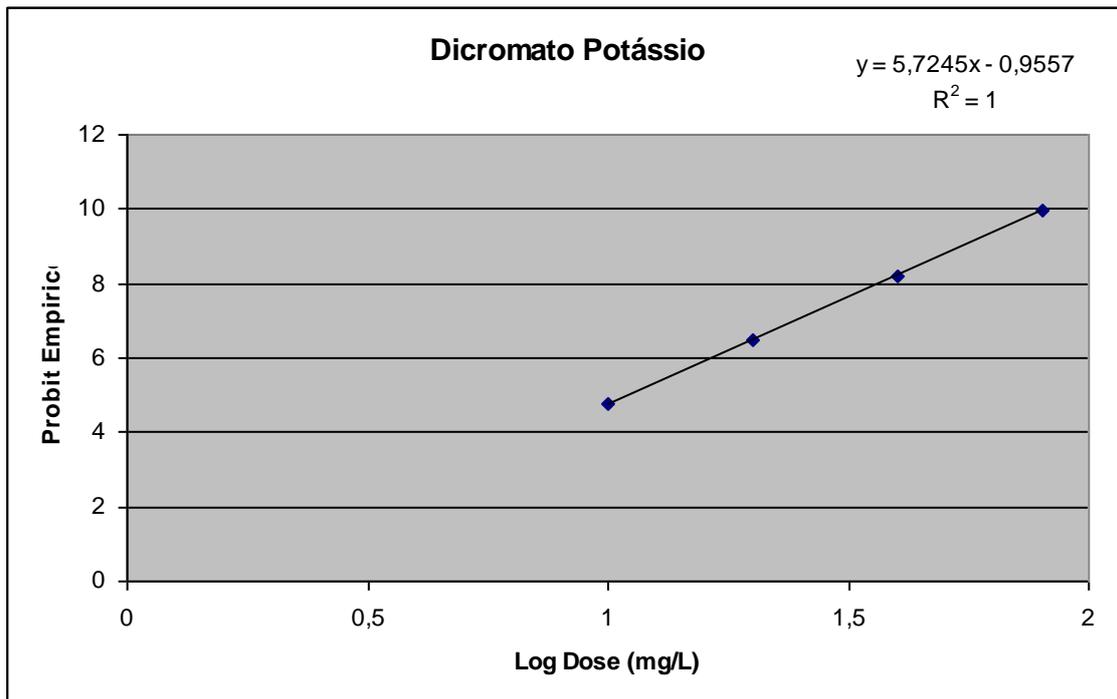


Gráfico 2 – Representação gráfica do logProbit

O $CL_{50} = 11 \text{ mg/l}$; $X^2 = 0,06$ e o $P > 0,05$

Conclusão e Discussão

O sulfato de cobre é cerca de 1,5 vezes menos tóxico que dicromato de potássio (tóxico de referência), uma vez que é necessário maior quantidade de sulfato de cobre para ter o mesmo efeito letal em 50 % dos organismos em estudo (artemia), nas mesmas condições experimentais.

O valor de sulfato de cobre ($CL_{50} = 17.000 \mu\text{g/l}$) é superior ao valor obtido por Verriopoulos et al. (1987), que obteve $CL_{50} = 485 \mu\text{g/l}$, também após 48 horas. Relativamente ao dicromato de potássio, o valor que obtivemos (11 mg/l) é inferior aos valores obtidos por outros estudos $CL_{50} = 17.75 \text{ mg/l}$ (Gaete, e tal. 1996) e $CL_{50} = 14.1 \text{ mg/l}$ (Persoone, e tal. 1989), no entanto estes valores foram determinados após 24 horas de exposição, ao contrário da nossa experiência (48 horas).

Referências

- Barahona, M.V., and S. Sánchez-Fortún. 1999. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environmental Pollution* 104:469-476.
- Brix, K.V., Gerdes, R.M., Adams, W.J. and Grosell, M. 2006. Effects of Copper, Cadmium, and Zinc on the Hatching Success of Brine Shrimp (*Artemia franciscana*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51:580-583.
- Castritsi-Catharios, J., Bourdaniotis, N. and G. Persoone. 2007. A new simple method with high precision for determining the toxicity of antifouling paints on brine shrimp larvae (*Artemia*): First results. *Chemosphere* 67: 1127-1132.
- Méndez-Hermida, F., Gómez-Couso and Ares-Mazás. Possible involvement of *Artemia* as live diet in the transmission of cryptosporidiosis in cultured fish. *Parasitol Res*
- Migliore, L., Civitareale, C., Brambilla, G. and G. D. Di Delupis. 1997. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. *Wat. Res.* 31(7): 1801-1806.

Nunes, B.S., Carvalho, D. F., Guilhermino, and V. G. Stappen. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution* 144:453-462.

Varó, I., Amat, F., Navarro, J.C., Barreda, M., Pitarch, E. and R. Serrano. 2006. Assessment of the efficacy of *Artemia* sp (Crustacea) cysts chorion as barrier to chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) exposure. Effect on hatching and survival. *Science of the Environment* 366: 148-153.

Verriopoulos, G., M. Moraitou-Apostolopoulou, and E. Milliou (1987). Combined Toxicity of Four Toxicants (Cu, Cr, Oil, Oil Dispersant) to *Artemia salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38(3):483-490.

Persoone, G., A. Van De Vel, M. Van Steertegem, and B. De Nayer (1989). Predictive Value of Laboratory Tests With Aquatic Invertebrates: Influence of Experimental Conditions. *Aquat. Toxicol.* 14(2):149-166.

Svensson, B.-M., Mathiasson, L., Martensson, L. and S. Bergstrom. 2005. *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. *Environmental Monitoring and Assessment* 102:309-321.