

# Sensibilidade de *Daphnia magna* às substâncias de referência $K_2Cr_2O_7$ e NaCl: uma comparação visando a gestão dos resíduos laboratoriais<sup>(1)</sup>

**Bruna Caroline Fraga<sup>(2)</sup>; Débora Monteiro Brentano<sup>(3)</sup>**

## Resumo Expandido

<sup>(1)</sup> Trabalho executado sob o Acordo de Cooperação Técnica ICMBio-IFSC 02/2011

<sup>(2)</sup> Acadêmica do curso Técnico Subsequente em Meio Ambiente; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Campus Florianópolis; Florianópolis, Santa Catarina; [brubsfraga@hotmail.com](mailto:brubsfraga@hotmail.com).

<sup>(3)</sup> Professora; Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Campus Florianópolis; [brentano@ifsc.edu.br](mailto:brentano@ifsc.edu.br)

**RESUMO:** Mensalmente a sensibilidade de organismos-teste que serão utilizados em testes de toxicidade deve ser avaliada por meio de um ensaio com uma substância de referência, sendo que tal avaliação periódica dos resultados dos ensaios resulta numa representação gráfica denominada carta-controle. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer carta-controle com substância de referência padrão ( $K_2Cr_2O_7$ ) e comparar com os resultados para substância alternativa (NaCl), verificando a correlação entre os resultados e a possibilidade de substituição da substância de referência padrão pela alternativa. O organismo-teste utilizado para realização dos testes (*Daphnia magna*) foi cultivado de acordo com a norma NBR 12.713. A média encontrada para o  $K_2Cr_2O_7$  foi de 0,83 mg.L<sup>-1</sup> e o intervalo no qual os organismos estão aptos para uso é de 0,5 a 1,2 mg.L<sup>-1</sup>. Já no caso da comparação entre o  $K_2Cr_2O_7$  e o NaCl encontrou-se para o  $K_2Cr_2O_7$  uma média provisória de 0,84 mg.L<sup>-1</sup> com um intervalo de 0,4 a 1,3 mg.L<sup>-1</sup> e para o NaCl a média provisória foi 5,86 g.L<sup>-1</sup> com um intervalo entre 5,5 e 6,3 g.L<sup>-1</sup> para os organismos aptos para uso. Há correspondência entre a carta controle de  $K_2Cr_2O_7$  para 20 resultados e apenas cinco. Contudo, com apenas cinco resultados não se observou correlação entre a toxicidade provocada pelo  $K_2Cr_2O_7$  e os efeitos do NaCl havendo necessidade de prosseguir os estudos para decidir-se sobre a substituição da substância de referência padrão no Laboratório de Ecotoxicologia do IFSC.

**Palavra Chave:** ecotoxicologia; organismo-teste; carta-controle

## INTRODUÇÃO

Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (PLAA, 1982; CAIRNS; NIEDERLEHNER 1995 *apud* ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos) (RIBO, 1997; DORNFELD, 2002 *apud* COSTA *et al.*, 2008).

Testes de toxicidade com invertebrados aquáticos fornecem um importante suporte na determinação de impactos químicos ao meio ambiente, principalmente ao seu ciclo de vida característico e a alta sensibilidade apresentada nas primeiras fases de desenvolvimento (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.*, 1990). O microcrustáceo de água doce, *Daphnia magna* tem sido amplamente utilizado como indicador biológico em estudos e controle da qualidade da água, e em testes de toxicidade na avaliação de efluentes (LAITANO *et al.*, 2006).

O conhecimento gerado sobre o uso de organismos-teste está baseado em testes de toxicidade sob ação de substâncias ou tóxicos de referência, os quais são aplicados para avaliar a sensibilidade relativa de uma população de organismos que será utilizada em testes de toxicidade, e também para estimar a precisão e confiabilidade dos dados produzidos em laboratório (ENVIRONMENT CANADA, 1992). Neste tipo de teste, os organismos são expostos a diversas concentrações de uma substância padrão, sendo que a sensibilidade da população é avaliada através da comparação com dados pré-existentes do laboratório (carta-controle de sensibilidade) e dados disponíveis na bibliografia (RESGALLA; LAITANO, 2002).

Mensalmente a sensibilidade do organismo-teste deve ser avaliada por meio de um ensaio com uma substância de referência, como cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre pentaidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), dodecil sulfato de sódio (DSS) e dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), contudo a escolha da substância de referência deve ser realizada com critério, levando em conta potenciais riscos à saúde humana e ao ambiente (ABNT, 2009).

Para Knie e Lopes (2004), o  $K_2Cr_2O_7$  é a substância mais utilizada, sugerida por muitas normas nacionais e internacionais, porém seu uso deve ser considerado muito crítico, por ser altamente tóxico por inalação, ter um potencial cancerígeno e mutagênico e ser classificado como

perigoso para o meio ambiente. O uso desta substância em laboratório gera um Resíduo Líquido Laboratorial (RLL).

Os RLLs são resíduos líquidos gerados em experimentos realizados para fins educacionais, pesquisas e exames. A quantidade de resíduos líquidos laboratoriais é mínima, por isto são recolhidos ao longo de períodos prolongados, ou derivados de várias fontes para obter-se uma adequada quantidade operacional (LOU; CHANG, 2007). A problemática é que tais resíduos são potencialmente perigosos, permanecendo estocados nos laboratórios até que sejam corretamente destinados para tratamento de alto custo econômico (HERRARA-MELIA *et al.*, 2000).

Dessa forma, é mais conveniente o uso de substâncias inofensivas (quanto ao manuseio), como o NaCl. Entretanto há necessidade de verificar se há correlação entre a sensibilidade apresentada ao  $K_2Cr_2O_7$  e ao NaCl, já que, no caso do último, seus efeitos não podem ser claramente diferenciáveis se fisiológicos-osmóticos ou tóxicos (KNIE; LOPES, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer carta-controle com substância de referência padrão ( $K_2Cr_2O_7$ ) e comparar com os resultados para substância alternativa (NaCl), verificando a correlação entre os resultados e a possibilidade de substituição da substância de referência padrão pela alternativa.

## METODOLOGIA

### Cultivo do organismo-teste *Daphnia magna*

*Daphnia magna* foi cultivada segundo a norma NBR 12.713 (ABNT, 2009). Utilizou-se o meio de cultura (meio M4) com pH entre 7,6 e 8,0, e dureza total entre 175 a 225mg  $CaCO_3/L$ , aerado por pelo menos 12h antes da sua utilização. A alga verde unicelular *Scenedesmus subspicatus* Chodat, 1942, foi utilizada como alimento, sendo fornecida diariamente *ad libitum*. Os organismos-teste foram cultivados em beckers de 2L, com uma densidade de 25 indivíduos/L, mantidos a  $20 \pm 2^\circ C$  e sob fotoperíodo de 16h de luz.

### Teste agudo de sensibilidade

Neonatos de 2 a 26h, de lotes que geraram pelo menos duas posturas, foram usados para execução dos testes de sensibilidade.

Para o preparo do teste utilizou-se soluções-mãe com as substâncias de referências Dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) e Cloreto de sódio (NaCl). Testaram-se cinco diferentes concentrações de  $K_2Cr_2O_7$  e seis diferentes concentração de NaCl, descritas na tabela 1. Preparou-se também um controle para cada teste e substância de referência, contendo somente água de diluição e os organismos-teste. Para cada diluição e controle foram adicionados 20 organismos, distribuídos em duas replicatas.

**Tabela 1** - Concentração das substâncias de referência Dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) e Cloreto de sódio (NaCl) utilizados nos testes de sensibilidade.

Dicromato de Potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) mg.L <sup>-1</sup>	Cloreto de Sódio (NaCl) g.L <sup>-1</sup>
0,6	3
0,7	4
0,8	5
0,9	6
1,0	7
-	8

O ensaio foi mantido entre  $20 \pm 2^\circ C$  por 24h, em ambiente escuro e sem alimentação dos organismos. Após esse período, foi realizada a leitura do teste, observando e registrando o número de organismos imóveis.

Os resultados foram expressos em concentração efetiva mediana ( $CE_{50_{24h}}$ ), concentração real da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio (ABNT, 2009).

A  $CE_{50_{24h}}$  foi calculada utilizando-se os métodos estatísticos Probit Method (WEBER, 1993) para dados paramétricos e Trimmed Sperman-Karber Method (HAMILTON *et al.*, 1977) para dados não paramétricos.

### Carta-controle

A carta-controle é a representação gráfica da avaliação periódica dos resultados do ensaio com uma determinada substância de referência (ABNT, 2009). Após elaboração desta, o valor obtido no ensaio de sensibilidade de novos lotes de *Daphnia magna* deve estar compreendido num intervalo de  $\pm 2$  desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos na carta-controle.

Elaborou-se uma carta-controle para a substância padrão  $K_2Cr_2O_7$ , com 20 testes, usando 20 diferentes lotes de *Daphnia magna*. Executaram-se também cinco testes, usando cinco diferentes lotes. Cada lote foi testado para as substâncias  $K_2Cr_2O_7$  e NaCl, visando a elaboração de outras duas cartas-controle objetivando a comparação da substância padrão e alternativa.

A carta-controle foi elaborada utilizando o programa Microsoft Office Excel 2010, após 20 resultados de ensaios de toxicidade, com substância de referência  $K_2Cr_2O_7$ , calculou-se o valor médio ( $\bar{x}$ ), o desvio-padrão ( $\sigma$ ) e o coeficiente de variação (CV) da  $CE_{50_{24h}}$ . No caso da comparação entre a  $CE_{50_{24h}}$  para  $K_2Cr_2O_7$  e NaCl, utilizou-se preliminarmente cinco resultados (ABNT, 2009), calculando também o valor médio ( $\bar{x}$ ), o desvio-padrão ( $\sigma$ ) e o coeficiente de variação (CV).

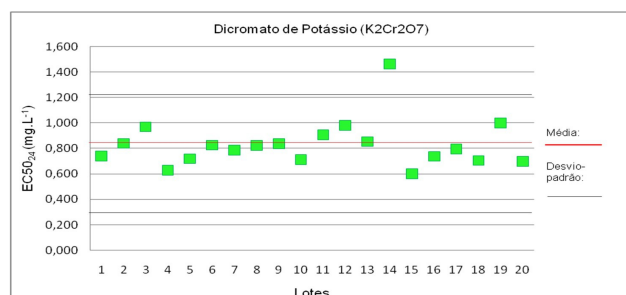
Calculou-se dois desvios-padrão ( $2\sigma$ ), superior e inferior a média obtida. Estes valores foram grafados na carta-controle através de linhas perpendiculares ao eixo que apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade.

Para verificar-se se há correspondência entre os resultados de sensibilidade de  $K_2Cr_2O_7$  e NaCl utilizou-se uma análise de correlação linear.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

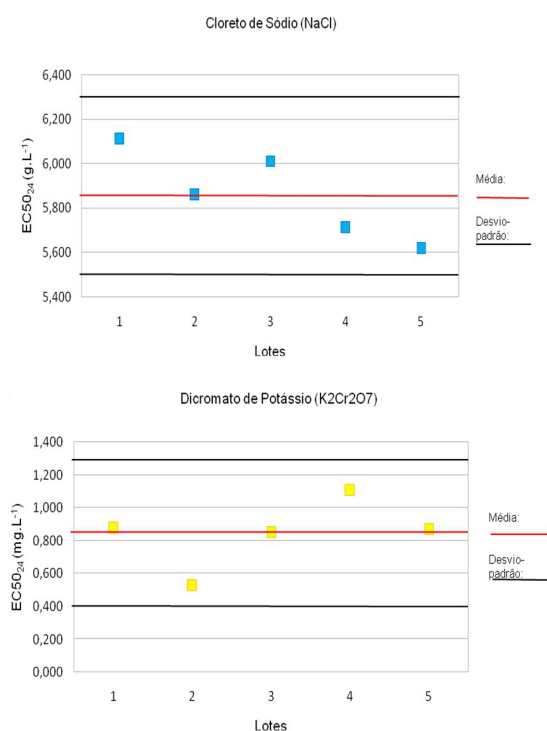
A média da  $CE_{50_{24h}}$  encontrada para o Dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) foi de  $0,83 \text{ mg.L}^{-1}$  e o intervalo no qual os organismos de lotes novos estão aptos para uso é de  $0,5$  a  $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$  (figura 1).

**Figura 1:** Carta-controle para o organismo-teste *Daphnia magna* usando como substância de referência  $K_2Cr_2O_7$ .



Já no caso da comparação entre o  $K_2Cr_2O_7$  e o NaCl, encontrou-se para o  $K_2Cr_2O_7$  uma média provisória de  $0,84 \text{ mg.L}^{-1}$  com um intervalo de  $0,4$  a  $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$  para organismos aptos para uso. A média da  $CE_{50_{24h}}$  para o NaCl estabeleceu-se provisoriamente em  $5,86 \text{ g.L}^{-1}$  com um intervalo entre  $5,5$  e  $6,3 \text{ g.L}^{-1}$  para os organismos aptos para uso (figura 2).

**Figura 2:** Carta-controle para o organismo-teste *Daphnia magna* usando como substâncias de referência  $K_2Cr_2O_7$  e NaCl.



O resultado da carta-controle para a solução padrão ( $K_2Cr_2O_7$ ) com 20 resultados e com cinco resultados é correspondente, mostrando que cinco resultados podem explicar provisoriamente a sensibilidade do organismo-teste.

Contudo, com apenas cinco resultados não se observou correlação ( $r=-0,2$ ) entre a toxicidade provocada pelo  $K_2Cr_2O_7$  e os efeitos do NaCl. Santos *et al.* (2007) conduziram um trabalho de dois anos para concluir sobre a possibilidade de troca da substância de referência para NaCl. Como o NaCl causa efeito osmótico, é necessário que seja dada continuidade aos teste até que se atinja os 20 resultados e então deverá ser avaliada esta relação para decidir-se sobre a substituição da substância de referência padrão no Laboratório de Ecotoxicologia do IFSC.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Bióloga Claudi'Ariane Gomes da Fonseca pelo auxílio em todas as etapas desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009. 23p.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova**, n. 7, v. 31, 1820-1830, 2008.

ENVIRONMENT CANADA. Biological test method: Acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods. **Report EPS1/RM/ 26-** Canada, 1992.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAUJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo. **CETESB: Série manuais**. v.6, 17pp

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for calculation of  $EC_{50}$  and  $LC_{50}$  values in bioassays. **Burlington research inc. fci. tecnol.** n. 11, v. 7, p. 114-119, 1977.

WEBER, C. I. **Method for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine organisms.** Cincinnati, Ohio: EPA, 1993. 253p.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289p.

LAITANO, K. S.; MATIAS, W. G.; FILHO, P. B.; PINTO, R. O. **Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB**, 2006.

SANTOS, M. A. P. F.; VICENSOTTI, J.; MONTEIRO, R. T. R.; Sensitivity os four test organisms (*Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* and *Pseudokirchenriella subcapitata*) to NaCl: an alternative reference toxicant. **J. Braz. Ecotoxicol.** v. 2, n. 3, 2007, 229-236.

REGALLA Jr, C.; LAITANO, K. S. Sensibilidade dos organismos-teste marinhos utilizados no Brasil. **NOTAS TÉCN. FACIMAR**, 6: 153-163, 2002.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos. 2006. 464p.

LOU, J. C; CHANG, C. K. Completely treating heavy metal laboratory waste liquid by an improved ferrite process. **Separation and Purification Technology** 57 (2007) 513–518

HERRERA-MELIA, J. A.; TELLO RENDO, N. E.; DONA RODRIGUEZ, J. M.; VIERA SUAREZ, A.; VALDES DO CAMPO, C.; PEREZ PENA, J.; ARANA MESA, J. Incidence of pretreatment by Potassium permanganate on hazardous laboratory waste photodegradability. **Wat. Res.** Vol. 34, No. 16, pp. 3967±3976, 2000