



## **ENSAIO DE TOXICIDADE COM *Artemia salina* EXPOSTAS AO FUNGICIDA AGRÍCOLA MANCOZEBE**

**\*Bunna Emanuely G. Ferreira<sup>1</sup>(IC) (be098emanuely098@gmail.com), Laís de Caldas Nascimento<sup>1</sup> (IC), Walter Dias Junior<sup>1</sup> (PQ)**

<sup>1</sup> Faculdade de Enfermagem - Universidade Estadual de Goiás – Unidade Universitária Ceres – Ceres, Goiás, Brasil.

Resumo: O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, por isso, é importante realizar uma análise dos impactos de baixas doses desses produtos consumidos a longo prazo sobre a saúde da população. Vários estudos associam o consumo e manejo de agrotóxicos a longo prazo a diversas patologias humanas. Deste modo um dos objetivos desse estudo foi avaliar a toxicidade de uma dose baixa de um fungicida de uso agrícola na sobrevivência de náuplios de *Artemia salina* L. Os cistos de artêmias foram colocados para eclosão em solução salina 3,5% com pH ajustado entre 8 e 9, continuamente aerada, iluminada e com temperatura entre 26 a 30°C, durante 24 horas. Após a eclosão, 10 náuplios foram transferidos para um poço de 400µL de uma placa de Elisa, para incuacão em solução com Mancozebe na dose da IDA/Anvisa e avaliação do número de sobreviventes em 24 e 48h. A dose referente a ingestão diária aceitável determinada pela Anvisa promoveu uma mortalidade de 15% nos náuplios incubados por 48h, mostrando que a dose de 0,03ppm de mancozebe a partir do produto comercial Dithane promove toxicidade à fase jovem dos microcrustáceos.

Palavras-Chave: Sobrevivência. Agrotóxico. Xenobiótico. Pesticida. Crustáceos

### **Introdução**

Tendo em vista que o Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, surge a necessidade de analisar esses impactos sobre a saúde da população, uma vez que, vários estudos associam o consumo e manejo de agrotóxicos a longo prazo a diversas patologias (ABRASCO, 2012).

O fungicida Mancozebe, em sua formulação comercial Dithane®NT-Dow Agrosience, tem ampla utilização na agricultura em nosso país e foi encontrado nos alimentos analisados pelo Programa de Análise de Resíduos de Alimentos (PARA) (ANVISA, 2019), além de ser uma das classes de xenobióticos mais empregadas na Região Centro-Oeste.

Seu princípio ativo é o etilenobisditiocarbamato (EBDC) (GRISOLIA, 2005), e a ANVISA o considera como um fungicida de classificação ambiental II, ou seja, é muito perigoso ao meio ambiente (GOLDONI, 2012).

A *Artemia salina* L. é um microcrustáceo da ordem Anostraca encontrado em





águas salgadas, e desde 1956 é utilizado em experimentos laboratoriais como bioindicador de toxicidade, devido seu baixo custo, alta sensibilidade e fácil manuseio (CAVALCANTE et al., 2000).

A letalidade desse organismo tem sido utilizada para identificação de repostas biológicas, cujas variáveis como a morte ou vida são as únicas envolvidas (MEYER et al., 1982; CARVALHO et al., 2009). O ensaio de toxicidade com *Artemia salina* consiste em avaliar a toxicidade aguda do composto testado e por isso é fator determinante em bioensaios.

Objetiva-se por meio do teste de toxicidade aplicados aos náuplios de *Artemia salina* confirmar se a Ingestão Diária Aceitável determinada pela ANVISA é realmente segura.

### Material e Métodos

Para eclosão, os cistos foram colocados em solução salina 3,5% (solução contendo 8,75g de NaCl – sal marinho marca Ocean Tech - completando volume para 250 ml de água destilada), 0,006mg de extrato de levedura, e pH entre 8 e 9.

A salina padronizada com os cistos ficaram em um funil de separação (artemilheiro), continuamente aerada, iluminada com uma lâmpada de 40W e com temperatura mantida entre 26 a 30°C, durante 24 horas, quando se tinha início a eclosão dos cistos.

#### *Bioensaio com Artemia salina*

Nesse teste, foi utilizada uma microplaca com 96 poços, nos quais eram colocados 400µL de solução teste (mancozebe), controle negativo (salina 3,5%) e controle positivo de  $K_2Cr_2O_7$  (0,0014M – 0,4mg/mL). A solução teste de mancozebe era composta de uma diluição do produto comercial Dithane®NT-Dow Agrosience no concentração de 0,03ppm (mg/L) de mancozebe, que é a dose correspondente à IDA (Ingestão Diária Aceitável) determinada pela Anvisa e publicada no Índice Monográfico/Anvisa (ANVISA, 2020).

Cada tratamento (controle positivo, negativo e agrotóxico) foi constituído de 6 repetições com 10 náuplios cada, de acordo com o recomendado pelo Teste 202 (OECD, 2004), totalizando 60 náuplios por tratamento. Após 24 e 48h de incubação foi realizada a contagem do número de náuplios mortos/imóveis para análise dos





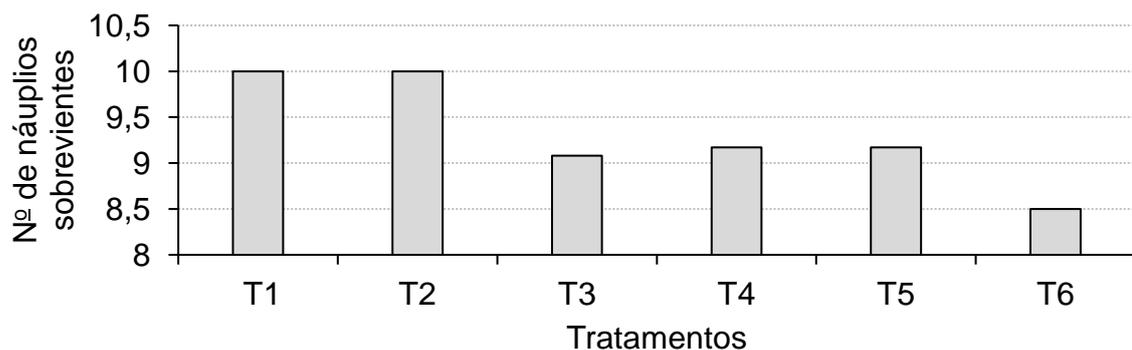
resultados. Para análise dos dados foi aplicado o Teste t com 5% de significância.

## Resultados e Discussão

### Teste de sobrevivência

Após várias tentativas de cultivo (Figura 1), os resultados dos testes de sobrevivência, com diferentes fontes de água e sal, correção de pH e ambiente de incubação, em que a sobrevivência dos náuplios ficou acima de 80%, estão apresentados na Figura 1. Conseguimos atingir uma sobrevivência de 100% após 48h de incubação com a utilização de sal marinho, adquirido em loja de materiais para aquários marinhos, e enriquecimento com extrato de levedura. Esses procedimentos foram adotados seguindo recomendações do Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves, do Campus Central, Sede Anápolis – CET, e são os procedimentos descritos na metodologia desse trabalho.

Figura 1: Número de náuplios sobreviventes no teste de sobrevivência nas condições do LFBTox. Teste considerou diferentes origens de água, tipo de NaCl, e ambiente de incubação. Estão apresentados somente os tratamentos que cuja sobrevivência foi maior ou igual a 8 náuplios (80%). T1: água destilada, sal marinho e placa de elisa 400uL; T2: Água do aquário, sal reagente, tubo de ensaio (10mL) e lodo do aquário; T3: Água do quário, NaCl reagente, tubo de ensaio (10mL); T4: Água destilada, NaCl reagente, tubo de ensaio (10mL) e vidraria pré-lavada com HCl; T5: Água mineral Crystal, NaCl reagente, tubo de ensaio (10mL); T6: Água destilada, sal marinho, tubo de ensaio (10mL). Cada teste foi realizado com 6 repetições e 10 náuplios por repetição.

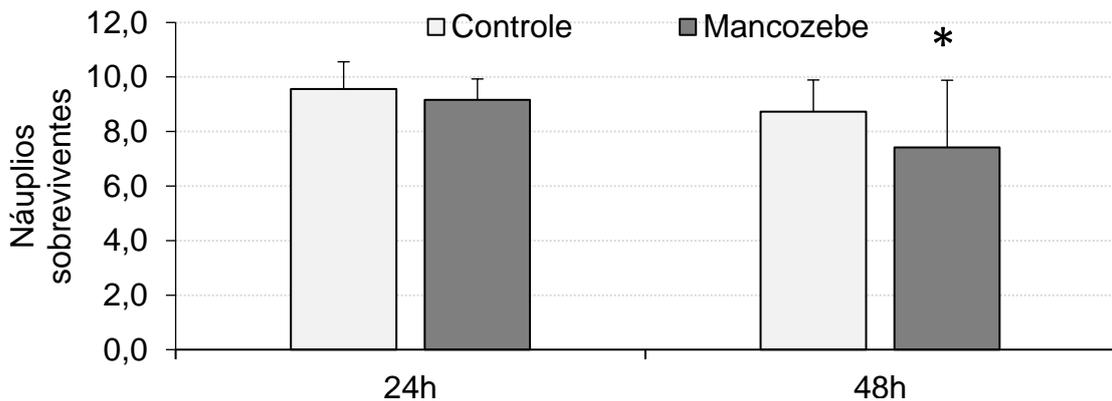


### Ensaio de toxicidade com agrotóxico mancozebe

Um teste preliminar realizado com o fungicida Dithane, mostrou um aumento de 15% na mortalidade dos náuplios após 48h de incubação (Figura 2).

Figura 2: Número de náuplios sobreviventes no teste de toxicidade com a formulação comercial Dithane na dose de 0,03ppm de mancozebe (IDA/Anvisa), incubados durante 24 e 48h. \*( $p < 0,05$ ) versus controle 48h.





Harwig e Scott (1971) estabeleceram um critério para classificação de toxicidade em estudos com *Artemia salina* usando somente o número de microcrustáceos, e concluíram que a substância que proporciona uma mortalidade abaixo de 0,9% é considerada não tóxica. Assim, de acordo com essa classificação de toxicidade de Harwing e Scott, a dose de mancozebe utilizada (0,03ppm), a partir do produto comercial Dithane, determinada como segura pela Anvisa, promove a mortalidade de 15% das artêmias, ou seja, pode ser considerada tóxica.

### Considerações Finais

A bibliografia não fornece os detalhes metodológicos completos para replicar os testes. Porém, conseguimos sobrevivência acima de 100% dos náuplios quando utilizamos sal marinho (adquirido em loja para aquários marinhos) e extrato de levedura nos meios de eclosão (artemilheiro) e de incubação (intoxicação), e microplaca com poços de 400 $\mu$ L.

Testes de toxicidade utilizando *Artemia salina* são confiáveis, práticos, baratos e rápidos, sendo uma eficiente metodologia que permite avaliação da toxicidade aguda letal, tornando-se um ensaio alternativo para utilização de animais, permitindo os pesquisadores a respeitar os 3R's (Redução, Refinamento e Substituição).

A Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0,03ppm determinada como segura pela Anvisa proporcionou uma mortalidade de 15% nos náuplios de artêmias em 48h de incubação, mostrando que ainda possui potencial tóxico.

### Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/UEG Edital nº 034/2020 e ao





Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Toxicológica da Unidade Ceres.

## Referências

- ANVISA (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Relatório das Amostras Analisadas no período de 2017-2018. Primeiro Ciclo Plurianual 2017-2020. Gerência Geral de Toxicologia. 136p. Brasília. Dez. 2019. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+%E2%80%93+PARA+2017-2018\\_Final.pdf/e1d0c988-1e69-4054-9a31-70355109acc9](http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+%E2%80%93+PARA+2017-2018_Final.pdf/e1d0c988-1e69-4054-9a31-70355109acc9) Acesso em: 08/06/2020.
- ANVISA (2020). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico–M02\226–Mancozebe a partir de 03.02.2020.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M02%2B%2BMancozebe.pdf/975fdd18-65fd-477c-ab85-217bcb9a0110> Acesso em: 25/03/2020.
- ABRASCO (2012). ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. **Dossiê ABRASCO** – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Carneiro, F. F.; Pignati, W.; Rigotto, R. M.; Augusto, L. G. S.; Rizzolo, A.; Faria, N. M. X.; Alexandre, V. P.; Friedrich, K.; Mello, M. S. C. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012. 88p. Disponível em: [http://www.abrasco.org.br/site/wp-content/uploads/2015/03/Dossie\\_Abrasco\\_01.pdf](http://www.abrasco.org.br/site/wp-content/uploads/2015/03/Dossie_Abrasco_01.pdf) Acesso em: 23/05/2020
- CARVALHO, C.A.; MATTA, S.L.P.; MELO, F.C.S.A.; ANDRADE, D.C.F.; CARVALHO, L.M.; NASCIMENTO, P.C.; SILVA, M.B.; ROSA, M.B. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.6, n.1, p.51-57, 2009. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/REF/article/view/5861/4561> Acesso em: 24/03/2020.
- CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R.; ECHEVAERRIA, A.; Síntese de 1,3,5-Triazinas Substituídas e Avaliação da Toxicidade frente a *Artemia salina* Leach-2000. **Química Nova**. v.23, n.1, p.20-22, 2000. Disponível em: [http://quimicanova.sbg.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=1401](http://quimicanova.sbg.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1401) Acesso em: 24/05/2020
- GRISOLIA, C.K.; Agrotóxicos: Mutações, Câncer, e Reprodução. Brasília: Editora UnB. 2005.
- GOLDONI, A.; SILVA, L.B.; Potencial mutagênico do fungicida mancozebe em *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae). **Bioscience Journal** Uberlândia, v. 28, n. 2, p. 297-301, Mar./Apr. 2012. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/11651/8491> Acesso em: 24/05/2020.
- HARWING, J.; SCOTT, P.M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied Microbiology**. v.21, n.6, p.1011-1016, 1971. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC377334/pdf/applmicro00116-0039.pdf> Acesso em: 03/11/2021
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, F.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A conveniente general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**. v.45, n.5, p.31-34, 1982. DOI: 10.1055/s-2007-971236. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2007-971236> Acesso em: 21/03/2020.
- OECD (2004), **Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>. ISSN: 20745761. Disponível em: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test\\_9789264069947-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en) Acesso em: 25/03/2020.

