

## Bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina*: fatores envolvidos em sua eficácia

Ariele Cardoso Bueno<sup>(1)</sup>; Marcel Piovezan<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Discente; Instituto Federal de Santa Catarina, Campus Lages; Lages, Santa Catarina; [arielecardoso@outlook.com](mailto:arielecardoso@outlook.com)

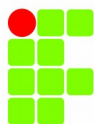
<sup>(2)</sup> Docente; Federal de Santa Catarina, Campus Lages; Lages, Santa Catarina; [marcel.piovezan@ifsc.edu.br](mailto:marcel.piovezan@ifsc.edu.br)

### RESUMO

A toxicologia estuda o efeito de determinadas substâncias em organismos vivos. O primeiro tipo de teste toxicológico a que são submetidos os compostos é o agudo-letal, que consiste de uma análise após curta exposição (24h – 48h) do composto com o organismo bioindicador. Em toxicologia, dose letal mediana (DL<sub>50</sub> ou LD<sub>50</sub>, do inglês *Lethal Dose*) é a dose necessária de uma dada substância ou tipo de radiação para matar 50 % de uma população em teste [normalmente medida em miligramas de substância por quilograma de massa corporal dos indivíduos testados (mg/kg =ppm)]. A letalidade da *Artemia salina* é utilizada para identificar respostas biológicas em diversas substâncias, nas quais as variáveis como a morte ou vida são as únicas envolvidas. O presente trabalho teve como principal objetivo realizar o bioensaio toxicológico com *Artemia salina* em diferentes substâncias. Utilizou-se a metodologia de Meyer e colaboradores (1982) adaptada. Entretanto, diversos fatores ambientais como luz, umidade, temperatura e concentração das substâncias influenciaram na eficiência dos resultados.

**Palavra Chave:** toxicologia; teste agudo-letal; DL<sub>50</sub>.

---



## INTRODUÇÃO

A toxicologia envolve diversas áreas, como, por exemplo, sociais, biológicas, químicas e forense. A toxicologia estuda o efeito de determinadas substâncias em organismos vivos. Muitas pessoas utilizam diversas substâncias sem ao menos ter conhecimento sobre as suas propriedades. Segundo Machado (2008), o conceito de substâncias tóxicas é bastante relativo, pois depende da dosagem e do indivíduo.

Os testes de toxicidade são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos e averiguar a toxicidade relativa das substâncias que são preponderantes na avaliação do ambiente (BAROSA, 2003). Dentre as várias técnicas existentes, sempre compreendem uma série de dados que podem ser obtidos por meio de microrganismos e animais de laboratório ou seres humanos, visando classificar a toxicidade de uma ou mais substâncias químicas. Em outras palavras trata-se de um bioensaio preliminar, mas essencial no estudo de substâncias com atividade biológica a fim de avaliar suas possíveis interações com o organismo (FREITAS DE OLIVEIRA, 2008).

O primeiro tipo de teste toxicológico a que são submetidos os compostos é o agudo-letal, que consiste de uma análise após curta exposição (24h – 48h) do composto com o organismo bioindicador, geralmente ratos ou coelhos. Mas, os testes que utilizam esses animais apresentam desvantagens, como a grande quantidade de amostras utilizadas e os custos elevados (RIOS, 1995; FREITAS DE OLIVEIRA, 2008; BAROSA, 2003). Em toxicologia, dose letal mediana (DL<sub>50</sub> ou LD<sub>50</sub>, do inglês *Lethal Dose*) é a dose necessária de uma dada substância ou tipo de radiação para matar 50 % de uma população em teste [normalmente medida em miligramas de substância por quilograma de massa corporal dos indivíduos testados (mg/kg =ppm)]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam DL<sub>50</sub> abaixo de 1000 ppm em *Artemia salina* (MEYER *et al.*, 1982).

A *Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, encontrado em águas salgadas (CARVALHO *et al.*, 2008). É utilizada como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos encontrados em lojas de aquaristas. Essa espécie de microcrustáceo marinho tem sido utilizada em experimentos laboratoriais como um bioindicador, sendo o seu grau de tolerância em relação a um fator ambiental reduzido e específico, de modo que apresenta uma resposta nítida frente a pequenas variações na qualidade do ambiente (ABEL, 1989). A letalidade desse organismo tem sido utilizada para identificação de repostas biológicas, nas quais as variáveis como a morte ou vida são as únicas envolvidas (MEYER *et al.*, 1982).

A *Artemia salina* (Figura 1) foi utilizada no projeto como o bioindicador. Ela é utilizada em testes de toxicidade aguda devido à sua capacidade para formar cistos dormentes, sua praticidade de manuseio e cultivo, por ser um método rápido e barato, aplicável como bioindicador em uma avaliação toxicológica pré-clínica (FREITAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2008; CARVALHO, C. A. de. *et al.* 2009).



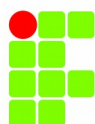
Figura 1. *Artemia salina*. Fonte: <http://goo.gl/Vz8l77>

Diversos ensaios de toxicidade têm sido realizados testando diferentes substâncias, em *Artemia* sp (FOGUEL, 2010). A cafeína é um fármaco, que pode ser descrito como um pó branco ou cristais aciculares que comporta-se como uma base fraca, pois seus sais dissociam-se facilmente na água (FARMACOPÉIA, 1996). A toxicidade e os efeitos adversos da cafeína têm sido objeto de intensos estudos. O açafão-da-terra é uma especiaria conhecida, cultivada e apreciada desde a antiguidade em toda a bacia mediterrânea, como corante, aromatizante e medicinal (FARMA, 2000). Em trabalho realizado por Pérez e colaboradora (2001) o valor do DL<sub>50</sub> para o dicromato de potássio foi de 12,5 mg L<sup>-1</sup>. O objetivo deste trabalho foi adaptar e aplicar um bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina* como bioindicador para avaliar a toxicidade da cafeína, do dicromato de potássio e do extrato aquoso de açafão-da-terra.

## METODOLOGIA

### Eclosão dos ovos

Foi utilizada a metodologia de Meyer e colaboradores (1982) adaptada. Preparou-se uma solução salina (com sal grosso e água mineral) na concentração de 30 gL<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado entre 8,0 – 9,0 adicionando-se gotas de uma solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH. Os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclo-



dir na solução salina, por 48 horas, com aeração constante e temperatura controlada de 25 °C em um aquário para eclosão (Figura 2). Após eclosão, os náuplios de artemia foram alimentados com solução de espirulina (fitoplâncton).



Após a eclosão dos ovos, cerca de dez larvas de *Artemia* salina foram transferidas com uma micropipeta para tubos de ensaio contendo a solução salina e amostras a serem testadas em diferentes concentrações (Tabela 1). O teste foi acompanhado de controle negativo para cada substância a ser testada. As substâncias testadas foram solução aquosa estoque 5000 ppm de: cafeína,  $K_2Cr_2O_7$  e açafreão-da-terra todos e. Para cada concentração testada foi realizada em triplicata. Todo material para realização do teste foram previamente lavadas e descontaminadas.

Figura 2. Aquário para eclosão dos ovos de *Artemia salina*.

Tabela 1. Concentração e volume das substâncias testadas, volume de solução salina e quantidade de *Artemia salina*.

Tubo de ensaio	Concentração das substâncias testadas (mg kg <sup>-1</sup> )	Volume de solução das substâncias testadas (mL)	Volume de solução salina (mL)	Quantidade de <i>Artemia</i> sp. (unidades)
Controle	0	0	10,0	10
1	125	0,25	9,75	10
2	250	0,5	9,5	10
3	500	1,0	9,00	10
4	1000	2,0	8,00	10
5	1500	3,0	7,00	10

A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24h (Tabela 2). A morte do microcrustáceo é evidenciada pela sua sedimentação. Por se tratar de um crustáceo ativo em água salina, a falta de movimento e sedimentação são os indicadores de morte do mesmo. Após a contagem, calculou-se a média e o desvio padrão de acordo com cada concentração e para os controles, seguido do cálculo de porcentagem. A LD<sub>50</sub> deveria ser estimada a partir da regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração dos compostos testados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 2. Média e porcentagem da quantidade de *Artemias salinas* mortas<sup>1</sup>

Tubo de ensaio	Concentração de substância testada (mg kg <sup>-1</sup> )	Média cafeína (unidades)	Média K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> (unidades)	Média açafreão (unidades)	cafeína (%)	K <sub>2</sub> CrO <sub>7</sub> (%)	açafreão (%)
Controle	0	7,3 ± 1,16	7,3 ± 1,16	7,7 ± 0,59	0	0	0
1	125	10	10	9,0 ± 1,4	36,9	36,9	16,8
2	250	9,7 ± 0,82	10	9,3 ± 0,59	32,8	36,9	21
3	500	10	10	8,7 ± 1,16	36,9	36,9	13
4	1000	10	10	8,7 ± 0,59	36,9	36,9	13
5	1500	10	10	9,3 ± 0,59	36,9	36,9	21

<sup>1</sup>Os valores de porcentagem foram obtidos descontando o valor da média das artemias mortas nos controles, através da fórmula: % mortas = (teste – controle)x100/controlado .

Obtendo-se o valor das porcentagens, construiu-se os gráficos de concentração vs porcentagem de artemias mortas para realizar os cálculos de LD<sub>50</sub>.

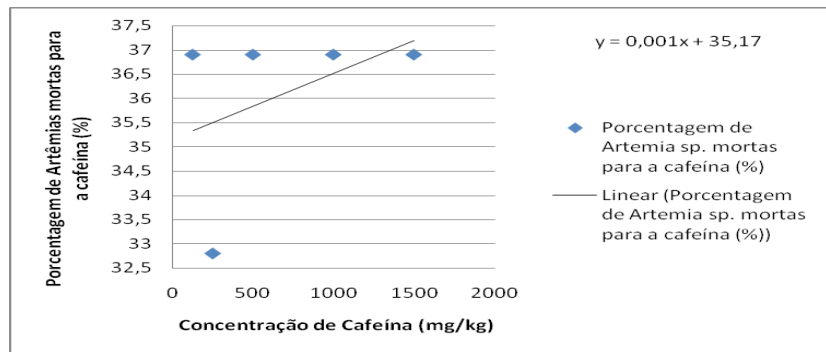
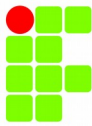


Figura 3. Concentração de cafeína vs artemias mortas

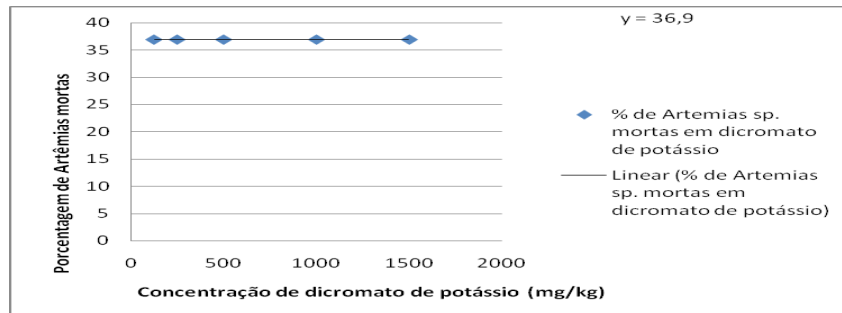


Figura 4. Concentração de dicromato de potássio vs artemias mortas

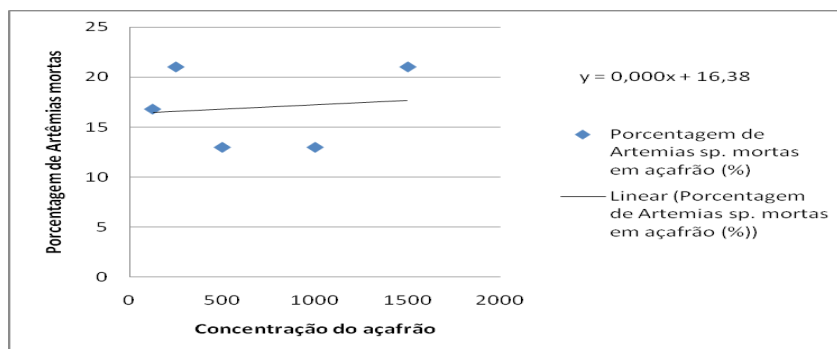


Figura 5. Concentração de açafraão vs artemias mortas.

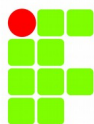
Tentou-se realizar os cálculos da  $DL_{50}$ , através da equação  $y = ax + b$ , substituindo  $y$  por 50%. Porém, os valores encontrados se mostraram distantes do esperado. Ao observar os gráficos, percebe-se que não houve linearidade, ou seja, não pode-se afirmar que à medida que aumenta-se a concentração da substância testada, aumenta o número de *Artemias* mortas.

Na cafeína, somente na concentração de 250 ppm houve menos mortes. Nas demais concentrações, todas as artemias morreram, algo inesperado, pois nessas concentrações a cafeína não é considerada tóxica, mas algumas alterações das propriedades podem ter acarretado o grande número de mortes.

No dicromato de potássio, todas as artemias que estavam no tubo morreram, algo esperado, pois o dicromato de potássio era a substância tóxica de referência.

No açafraão-da-terra, nas concentrações de 500 e 1000 ppm houve diminuição das mortes, mas nas demais concentrações, o número de mortes foi mais alto e praticamente igual.

Na tentativa de obter êxito no teste, o método foi realizado duas vezes. Na primeira tentativa de, todas as artemias morreram nos tubos, inclusive nos controles negativos, que só estavam com água salina. Vale ressaltar que, em outras duas tentativas anteriores, os ovos eclodiram, mas as artemias não sobreviveram. Por estas razões, na última realização do teste, todas as vidrarias a serem utilizadas foram previamente lavadas e descontaminadas. Além disso, as artemias foram alimentadas diretamente no aquário, não somente nos tubos de ensaio; utilizou-se água mineral, ao invés de utilizar água destilada e a temperatura de eclosão das artemias foi rigorosamente controlada (25°C) em uma incubadora. Entretanto, outros fatores, ainda não identificados, interferiram no teste de toxicidade com *Artemia salina* e desta forma ainda não foi possível determinar o valor de  $DL_{50}$  para as substâncias testadas.



Sorgeloos e colaboradores (1978) estudaram os efeitos de diferentes condições geográficas (San Francisco, Salt Lake City, Bulgária e China) na aplicação do teste de toxicidade utilizando artemia. Verificaram que a eclosão dos ovos é diferenciada, e influenciada pela temperatura e salinidade, pois geram náuplios em diferentes fases de desenvolvimento. Estas diferentes fases de desenvolvimento em estado mais avançado (apenas horas a mais) são mais susceptíveis à morte que os recém eclodidos.

Como sugestão para trabalhos futuros está a preparação da água de mar artificial seguindo fórmula de Dietrich & Kalle, que consiste em: para cada 1 L de água destilada, 23 g de NaCl, 11 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 4g de  $Na_2SO_4$ , 1,3 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  y 0,7 de KCl; ajustar o pH da solução a 9,0 com  $Na_2CO_3$ . As concentrações das substâncias testes devem ser reduzidas. Além disso, o preparo das soluções das amostras a serem testadas deve ser feito com água de mar artificial.

### CONCLUSÕES

Muitos fatores interferem no êxito do teste de toxicidade utilizando *Artemia salina*, como luz, temperatura, alimentação da *Artemia* sp., tempo de eclosão dos ovos, água utilizada no teste, contaminação das vidrarias e das substâncias.

Frente a todos os resultados, percebe-se a importância de pesquisar mais para descobrir quais fatores podem alterar os resultados dos testes de toxicidade, pois este teste utilizando *Artemia salina* é considerado eficiente por pesquisadores e, otimizado-o, pode ser uma alternativa aos testes de toxicidade que utilizam ratos e coelhos.

### AGRADECIMENTOS

À Deus; ao meu orientador, Prof° Dr. Marcel Piovezan, pela sua dedicação; aos animais, principalmente às artemias utilizadas no teste; à banca, por ter aceitado o convite; à minha família e a todos que contribuíram de alguma maneira para a execução deste projeto.

### REFERÊNCIAS

ABEL, P.D. Water Pollution Biology. Ellis Horwood Ltd, Publishers, Chichester, 1989.

BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. e SOUZA, I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – Poluição e ecotoxicologia marinha, Nov. 2003.

BRASILEIRA, Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia; Farmacopéia Brasileira. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 175-177.

CARVALHO, C. A. de. et al. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* miers- Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemis salina*. Revista Eletrônica de Farmácia Vol 6(1), 51-58, 2009.

FARMA, Via. 2000. Disponível em : <<http://viafarmanet.com.br/wp-content/uploads/2015/09/CURCUMA.pdf>> Acesso em 19/11/2015

FOGUEL, Aline Feltrin *et al.* 2010. Araras, SP. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS TEORES DE CAFEÍNA PRESENTE NOS DIFERENTES TIPOS DE CAFÉS INDUSTRIALIZADOS

MEYER, B.N. et al. A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v.45, p.31-34, 1982.

Peréz, Y. G.; Gilling, P. A. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. **Anuario Toxicología**.;1(1):104-8, 2001.

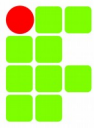
RIOS, F. J. B. **Digestibilidade in vitro e toxicidade de lectinas vegetais para náuplios de *Artemia* sp.** 1995. Dissertação (mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

SANTOS, E. F. ENSAIO DE TOXICIDADE COM *Artemia salina* DO HIDROLATO DE LARANJA

<http://www.sbpnet.org.br/livro/63ra/arquivos/jovem/42ensaiotox.pdf>

Secretaria de Saúde do Paraná. Disponível em:

<[http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses\\_intoxicacoes/Conceitos\\_Basicos\\_de\\_Toxicologia.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses_intoxicacoes/Conceitos_Basicos_de_Toxicologia.pdf)> Acesso em: 01/09/2015.



**INSTITUTO FEDERAL**  
**SANTA CATARINA**

---

Sorgeloos, P.; Van Der Wielen, C. R.; Persoone, G. The use of Artemia Nauplii for Toxicity Tests – A critical Analysis. **Ecotoxicology and**

**Environmental safety**, 2, 1978, 249 – 255.

