

2.10.01 - Farmacologia / Farmacologia Geral

**AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE DE EFLUENTES DE CAMAS DE FRANGO PROVENIENTE DE GRANJAS DE AVES NO MUNICÍPIO DE VIÇOSA-AL, UTILIZANDO O ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO MODELO EXPERIMENTAL.**

Carolina F. de Oliveira<sup>1\*</sup>, Thiago Barros C. da Silva<sup>2</sup>, Tiago R. dos Santos<sup>3</sup>, Jessica Taiane G. Gregório<sup>3</sup>, Jobson da S. Nascimento<sup>3</sup>, Alex A. Dantas<sup>4</sup>.

1. Discente do Curso de Medicina Veterinária na UFAL;
2. Orientador e Docente do Curso de Medicina Veterinária na UFAL;
3. Mestre em Ciência Animal pela UFAL;
4. Mestre em Química pela UFAL.

**Resumo**

A produção avícola é uma das principais atividades agropecuárias do Brasil, possuindo importância socioeconômica e política. Porém, os danos ambientais causados pelos seus resíduos, como a cama de frango, quando não manuseados corretamente, podem gerar impactos. Para analisar esse dano, foi utilizado o Zebrafish como modelo experimental. Assim, realizou-se um teste de bioensaio para determinar o grau na qual a cama de frango provoca mortalidade em metade dos organismos expostos (DL<sub>50</sub>) e as efeitos advindos dessa exposição. Foi coletado amostras de camas de frango advindas de aviários do município de Viçosa – AL, que foram transformadas em soluções com 5 diferentes concentrações para imersão dos embriões em uma placa de cultivo celular. Após o período-teste, os embriões foram analisados de acordo com os efeitos teratogênicos e sua dose letal. Este projeto teve por finalidade avaliar e mensurar a embriotoxicidade destes efluentes com o intuito de aumentar o conhecimento toxicológico.

**Autorização legal:** CEUA (protocolo de nº 16/2019).

**Palavras-chave:** Toxicologia., Embriões., Paulistinha.,

**Trabalho selecionado para a JNIC:** Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

**Introdução**

A ecotoxicidade é um processo que visa o conhecimento dos danos causados por substâncias químicas no meio ambiente e os efeitos que estas provocam no equilíbrio da população. Estes produtos químicos podem ser naturais, artificiais ou subprodutos de atividades carreadas por ações humanas, como a cama de frango.

A cama de frango é um subproduto da atividade avícola que apresenta como vantagem a adubação do solo e pastagem, além da alimentação para ruminantes, apesar de ser proibida de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com a Instrução Normativa nº 8 de 25/03/2004 (MAPA, 2004). No entanto, como forma de aproveitamento, a cama é recomendada na agricultura como adubo (AVILA et al., 1992), posteriormente a processos de neutralização (STAUB, 2017) a fim de evitar impactos relacionados a efluentes dessa atividade, que podem levar contaminação para lençóis de água ou para alimentos que forem adubados por ela. Desse modo, para avaliar esse dano, foi utilizado o Zebrafish, que é um peixe teleosteo de água doce, usado atualmente como modelo experimental para estudos científicos em diversas áreas como genética e toxicologia (HILL et al., 2005) por apresentar um baixo custo, rápido desenvolvimento, alta taxa de produção de ovos por fêmeas (TAVARES, 2013) e semelhança genética com os humanos, dado que 70% dos genes que codificam proteínas no genoma humano estão relacionados a genes encontrados no genoma do peixe (CAMPINAS, 2015).

Portanto, por Viçosa ser o 3º maior produtor na avicultura do estado de Alagoas com 745.237 mil aves em uma média de produção de 3,4 milhões de cabeças distribuídos em aproximadamente 45 mil estabelecimentos (IBGE, 2019), verificou-se a importância de ter um panorama da ecotoxicidade destes efluentes, permitindo o conhecimento sobre o impacto causado nestes ecossistemas quando utilizado a cama de frango como adubo após o processamento realizado pelas granjas.

Este projeto tem por objetivo avaliar e mensurar a embriotoxicidade de efluentes de camas de frango utilizando o teste da OECD-236 (OECD, 2013) com o intuito de aumentar o conhecimento toxicológico, além de subsidiar novos parâmetros e promover o desenvolvimento da região da Zona da Mata de Alagoas buscando melhorias de acordo com os resultados obtidos.

**Metodologia**

O delineamento experimental do estudo ocorreu em duas fases: Fase A e Fase B. A Fase A consistiu na coleta e identificação da “cama de frango” proveniente de granjas do município de Viçosa - AL para utilização no teste e a Fase B na obtenção de embriões de peixes zebra para realização do teste de toxicidade, proposto pela Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OECD - 236).

Todos os procedimentos foram realizados sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA - UFAL) com o número de protocolo 16/2019 e de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 34, de 27 de Julho de 2017.

**Fase A** - Retirou-se 1 kg de amostra por composteira do subproduto da produção avícola, após ser processado por compostagem como previsto pela IN-08/2004 do MAPA. Posteriormente, com 3 meses de composteira fechada, o produto foi misturado para ser destinado como adubo, separando-se 1 kg de cada composteira da mesma granja. Em laboratório, as amostras foram processadas seguindo o protocolo proposto por LUCCA et al. (2012), em que, para cada amostra analisada, adicionou-se dois fragmentos de cama de frango, acondicionando-as em recipientes estéreis homogêneos em uma quantidade de um pool de 50g de cama diluída em uma proporção semelhante de água destilada (50 ml), adicionando-se a 0,01% de DMSO para as soluções mais hidrossolúveis. Após um período de 10 minutos de agitação e 10 minutos de decantação, o sobrenadante foi coletado e filtrado em papel filtro 50 micras e utilizado como solução teste para avaliação da ecotoxicidade e determinação da DL<sub>50</sub> (dose letal em 50% da população).

**Fase B** - Os embriões foram provenientes do biotério de Zebrafish do laboratório de química. Os ovos de peixe-zebra recém-fertilizados foram separados dos demais. Foram utilizados 20 embriões por concentração teste em um total de 05 embriões por poço, em placas de cultivo celular com 24, contendo 2 ml de solução cada. Estes embriões foram expostos aos compostos, mantidos dentro de uma estufa sob temperatura de 26° ± 1° C e avaliados a cada 24 horas por um período de 48 horas, observando-se os fatores letais e subletais, respeitando as etapas do teste proposto pelo OECD 236. O teste incluiu 5 concentrações diferentes do efluente a ser testado (frações diluídas), além do controle negativo, nas quais constituía 1:1 (50% de água reconstituída e 50% substância teste); 1:2 (75% e 25%); 1:4 (87,5% e 12,5%); 1:8 (93,75% e 6,25%) e por fim, 1:16 (96,87% e 3,13%), respectivamente, totalizando 6 amostras.

As análises estatísticas dos testes de toxicidade em embriões foram realizadas com o teste *t* pareado de Student, X<sup>2</sup> de Pearson com o teste exato de Fisher como "post hoc". Para os parâmetros subletais, foram utilizados o teste de kruskal wallis seguido pelo teste de "dunn" com um *p* ajustado pelo método de "bonferroni" (*P* < 0,05) como test "post hoc". Valores de *p* < 5% foram considerados estatisticamente significantes.

## Resultados e Discussão

O principal parâmetro observado foi a mortalidade dos embriões verificada pela presença de pelo menos um dos quatro parâmetros subletais (coagulação dos ovos; ausência de batimentos cardíacos; não descolamento da cauda e não formação de somitos), visto que os embriões fertilizados após a exposição não ultrapassaram as 48 horas do bioensaio, as avaliações da toxicidade foram realizadas baseadas nestes parâmetros (forma de comunicação parcial). Do total de 120 embriões utilizados no experimento, os efeitos subletais observados foram: Edema de pericárdio – na qual 60,83% apresentaram o efeito de edema de pericárdio em até as 48 horas-; Edema de saco vitelínico; Deformidade de coluna; Deformidade de cauda e Atraso na eclosão. Outros resultados letais e subletais dispostos por concentração e período podem ser analisados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Efeitos teratogênicos avaliados em embriões de *Danio rerio* expostos a diferentes concentrações de efluentes de camas de frangos durante os períodos de 24 e 48 horas. Siglas: EP – edema de pericárdio; ESV – edema de saco vitelínico; DC – deformação na coluna; DCau – deformação na cauda; Coag – coagulação; FC – frequência cardíaca (bpm/min – batimentos por minuto/minuto); AE - atraso na eclosão; Nd - Não detectado.

Tempo		Controle		Amostras de Efluentes			
	Concentração (µg/ml)	0 ml	1 ml	25 ml	50 ml	75 ml	100 ml
24 h	Mortalidade (%)	5*	90*	85*	60	55	40*
	EP (%)	0 <sup>a</sup>	85 <sup>b</sup>	80 <sup>bc</sup>	80 <sup>bcd</sup>	60 <sup>de</sup>	30 <sup>e</sup>
	ESV (%)	0	80	50	50	30	20
	DC (%)	0	25	15	0	0	0
	Dcau (%)	0	5	0	0	0	0
	Coag (%)	0	25	15	15	15	5
	AE (%)	20	40	5	0	5	0
	FC (bpm/min)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
48 h	Mortalidade (%)	10*	95*	90	75	65	50*
	EP (%)	0 <sup>a</sup>	85 <sup>b</sup>	80 <sup>bc</sup>	80 <sup>bcd</sup>	70 <sup>cde</sup>	65 <sup>de</sup>
	ESV (%)	0	50	55	50	60	50
	DC (%)	0	85	25	25	5	5
	Dcau (%)	0	5	0	5	5	5
	Coag (%)	0	25	15	15	15	0
	AE (%)	15	35	20	0	5	0
	FC (bpm/min)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

**Nota.** \**P* < 0,05. a, b, c, d, e, f: letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças estatísticas pelo teste exato de Fisher. Letras iguais não diferem entre si significativamente entre as amostras. \*\* período de tempo acima de 48 horas causaram 100% de mortalidade nos embriões testados.

A função do cálculo proposta por Pacheco e Rabelo (2013) foi usada com sucesso para calcular os valores de DL<sub>50</sub> em embriões de Zebrafish expostos a amostras de camas de frango por 24 e 48 h: onde a DL<sub>50</sub> foi de 338, 27 mg e 222,79 mg respectivamente, com um intervalo de confiança de 95%. Observa-se que a concentração letal de exposição entre as 24 e 48 horas foi reduzido em aproximadamente 65,9% demonstrando que o valor de 222,79 mg indica que tal substância apresenta pouca toxicidade (Tabela 2), uma vez que a Norma brasileira de N°15088/2016 da Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT assegura que a toxicidade da substância está na classe de perigo ao ambiente aquático-agudo na categoria 3 ≤ 100mg/L com palavra de advertência (sem palavra de advertência) e a frase de efeito em “*Nocivo para os organismos aquáticos*” (ABNT, 2016).

**Tabela 2.** Concentração letal (µg/ml) das amostras de efluentes para exposição aguda de embriões de *Danio rerio* em 48 horas. DL<sub>50</sub> (IC 95%) – dose letal e intervalo de confiança em 95%; GL – grau de liberdade; X<sup>2</sup> – qui-quadrado; N: 120 animais por teste.

	CL	Concentração	Limite Inferior	Limite Superior	X <sup>2</sup>	P - valor	GL	
	24 h	0.5	338, 27 mg	224.25	452.29	127.83	1.251958e-09	1
<b>horas</b>	48 h	0.5	222,79 mg	112.03	333.54	117.1	3.303657e-10	1

### Conclusões

Por fim, a pesquisa abordou os aspectos da toxicidade de substâncias provenientes da cama de frango e seu impacto no meio aquático. Segundo a Norma Brasileira de N° 15088/2016, as amostras da cama de frango encontram-se, de acordo com classificação de toxicidade, como uma substância na classe de “perigo ao ambiente aquático-agudo” na categoria 3 (≤ 100mg/L), com palavra de advertência (-) e a frase de efeito “*Nocivo para os organismos aquáticos*”, corroborando para um potencial de efeito cardiotoxicó (edema de pericárdio). Assim, faz-se necessário estudos mais aprofundados acerca da utilização desta substância (cama de frango) próximo a ambientes aquáticos como leitos fluviais ou lençóis freáticos.

### Referências bibliográficas

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT. **NBR 15088**: Ecotoxicologia aquática: Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes (Cyprinidae). Dez. 2016, Rio de Janeiro.
- AVILA, V. S. de; MAZZUCO, H.; FIGUEIREDO, E. A. P. de. Cama de aviário: materiais, reutilização, uso como alimento e fertilizante. Concórdia, SC: **EMBRAPA-CNPASA**, 1992. 38p. (EMBRAPA-CNPASA. Circular Técnica, 16).
- CAMPINAS. Edmilson Montalti. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. ZEBRAFISH, UM PEIXINHO COM VOCAÇÃO PARA PESQUISAS GENÉTICAS E MUITO MAIS. **Boletim da FCM**: Um vitral de competências, Campinas, v. 10, n. 4, p.08-09, jul. 2015. Semestral. Disponível em: <https://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/images/user228/editorial.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2018.
- HILL, Adrian J. et al. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.6-19, 9 fev. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>. Acesso em: 24 nov. 2019.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2017 resultados Preliminares. **Galináceos**, Viçosa, Alagoas: IBGE, 2019. Disponível em: <https://censoagro2017.ibge.gov.br>. Acesso em: 24 nov. 2019.
- L. STAUB, T. V. SOUZA, A. P. S. TON. Manejos para reutilização da cama aviária. **Scientific Electronic Archives Issue ID: Sci. Elec. Arch.** Vol. 10 (5) October, 2017. Article link: <http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=v>. Acesso em: 24 nov. 2019.
- LUCCA, Walter et al. Efeito de diferentes tratamentos químicos em cama para aves de corte. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 4, n. 1, p. 25-31, abr. 2012.
- MAPA. **Instrução Normativa 8/2004**. 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-8-de-25-de-marco-de-2004.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2021.
- OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: test no. 236: fish embryo acute toxicity (FET) test. **OECD iLibrary**, Paris, p. 1-22, 26 jul. 2013. OECD. <http://dx.doi.org/10.1787/20745761>. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/>. Acesso em: 02 fev. 2020.
- PACHECO, Antonio Guilherme; REBELO, Mauro de Freitas. A simple R-based function to estimate lethal concentrations. *Marine Environmental Research*, [S.L.], v. 91, p. 41-44, out. 2013. **Elsevier BV**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres>. Acesso em: 03 Agosto 2019.

TAVARES, Barbara; LOPES, Susana Santos. A Importância do Peixe-Zebra na Investigação Biomédica. **Acta Médica**, Portugal, v. 5, n. 26, p.583-592, set. 2013. Disponível em : <https://research.unl.pt/files/297203/4628-7240-1-pb.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2020.