

Protocolo experimental

As Artémias também precisam de higiene diária?

Enquadramento Teórico

Ao longo dos tempos, a contaminação química de origem antropogénica tem vindo sucessivamente a aumentar nos ecossistemas naturais, incluindo nos aquáticos. No caso destes últimos, apesar dos esforços recentemente impostos pela Diretiva-Quadro da Água e a Diretiva-Quadro Estratégia Marinha para atingir um bom estado ecológico dos ecossistemas, milhares de químicos continuam a entrar nestes sistemas provenientes dos resíduos de atividades urbanas, agrícolas e industriais. Muitas das substâncias químicas que têm sido detetadas no ambiente aquático fazem parte de produtos que utilizamos regularmente no nosso dia a dia (e.g., medicamentos, filtros de UV, detergentes domésticos, produtos de higiene pessoal como champôs, pastas de dentes e géis de banho). Muitas delas são capazes de provocar efeitos tóxicos graves não só no Homem, mas também nos organismos aquáticos, mesmo em concentrações muito baixas, diminuindo a qualidade da água dos ecossistemas e a saúde das espécies que os constituem. A artémia é um pequeno crustáceo de 10 a 15 mm de comprimento bastante sensível à qualidade da água em que vive e às substâncias químicas em geral. Por esta razão é muito utilizada em avaliações de toxicidade.

Objetivos

Os objetivos específicos desta atividade são: realizar um ensaio de toxicidade com artémia e aprender a manusear e eliminar corretamente os detergentes domésticos minimizando as suas consequências para o ambiente. Este protocolo enquadra-se nas Áreas Curriculares de Ciências Naturais do 3º Ciclo do Ensino Básico e de Biologia (12º ano) do Ensino Secundário. No Ensino Secundário pode ser utilizado como um exercício interdisciplinar entre as áreas de Biologia e Matemática em que os alunos utilizam o método de regressão linear (com transformação de probite) para estimar o valor de concentração letal mediana teste.

Material

- Larvas de artémia com cerca de 2 semanas de vida (podem ser obtidas antecipadamente através da eclosão de quistos segundo os procedimentos indicados na atividade “E se a salinidade se alterar?”).
- Detergente líquido concentrado para lavar a louça à mão
- Sal marinho
- Placas de Petri ou tubos de ensaio (7 por cada réplica do ensaio / grupo de trabalho)
- Uma garrafa de plástico de 1.5 L
- Pipetas de Pasteur
- Pipetas graduadas de 2, 5 e 10 mL
- Marcador
- Água da torneira desclorada (água deixada em contacto com o ar, pelo menos 24 horas, para que o cloro evapore)
- 2 Gobelés de 100 mL

Procedimento

Discuta com os alunos qual o planeamento experimental mais adequado a seguir (quantas concentrações deverão testar, qual a necessidade de incluir tratamentos controlo, como deverão ser preparadas as soluções teste do grupo controlo, qual a necessidade de elaborar réplicas de concentração a testar. Neste ensaio são testadas 6 concentrações diferentes (100%, 64%, 40%, 26%, 17%, e 10%) de uma solução do detergente líquido concentrado em água de salinidade adequada à artémia. Será ainda incluído um controlo preparado apenas com a água salgada (0%). Devem efetuar-se pelo menos 3 a 4 réplicas do ensaio (i.e., da série de tratamentos testados). Para este efeito os alunos podem organizar-se em grupos ficando cada grupo responsável pela realização de uma réplica completa do ensaio.

1. Utilizando a garrafa de 1,5 L, preparar água salgada para o ensaio dissolvendo 25 g de sal marinho num 1 L de água da torneira desclorada.
2. Cada grupo deve preparar uma solução da amostra a testar misturando para o efeito 3,5 mL do detergente líquido concentrado a 50 mL da água preparada. A solução deve ser agitada gentilmente com uma pipeta de Pasteur de forma a obter uma mistura homogénea sem produzir espuma.

3. Cada grupo deve receber 7 placas de Petri ou tubos de ensaio e marcar cada um(a) com uma das seguintes condições a testar: 0% (controlo), 10%, 17%, 26%, 40%, 64% e 100%.
4. Encher cada placa ou tubo com a respetiva solução a testar, pipetando com as pipetas graduados de volume adequado, os volumes indicados na tabela 1.

Tabela 1. Volumes de água salgada e solução de detergente a pipetar para cada tratamento.

Concentração (%)	Solução com o detergente (mL)	Água salgada (mL)
0	0.0	10.0
10	1.0	9.0
17	1.7	8.3
26	2.6	7.4
40	4.0	6.0
64	6.4	3.6
100	10.0	0.0

5. Colocar 10 larvas de artémia em cada uma das placas, utilizando para o efeito as pipetas de Pasteur. Durante este passo, deve tentar-se levar a menor quantidade possível de água da cultura de larvas para as placas do ensaio. A colocação da última larva na última réplica da concentração mais elevada, marca o início do ensaio (zero horas). Os alunos devem assegurar-se de que todas as larvas colocadas nas placas estão vivas. Para que este tipo de ensaio possa ser considerado válido a mortalidade observada na totalidade das placas controlo não deve exceder os 10%.
6. Avaliar a mortalidade 30 e 45 minutos após o início do ensaio, contando quantas larvas estão mortas em cada tratamento testado e registando esses resultados. Em caso de utilização de tubos de ensaio, será mais fácil contar o número de larvas vivas, obtendo-se o total de larvas mortas pela subtração do número de vivos ao total de larvas expostas.
7. A partir dos resultados obtidos em todas as réplicas efetuadas, elaborar a curva de toxicidade (figura 1), determinando a partir desta qual a concentração em que se espera que ocorra 50% de mortalidade nas condições experimentais utilizadas (CL50).

Sugestões

Caso não disponha de placas de Petri, pode utilizar em alternativa tubos de ensaio. Em vez do detergente para lavagem de louça pode testar outros produtos como lixívia, vinagre ou acetona.

Análise dos resultados

Um dos parâmetros mais utilizados na avaliação do potencial tóxico de substâncias químicas para organismos aquáticos é a concentração letal mediana (CL₅₀), ou concentração da substância testada que provoca a morte de 50% dos organismos teste nas condições experimentais em que decorrem os ensaios. Este valor é determinado com base nos resultados de ensaio de toxicidade semelhantes ao realizado, a partir da curva de toxicidade ou curva concentração-resposta (figura 1). Esta curva relaciona a concentração do químico testado com a percentagem de animais que mostram o efeito medido.

Para a análise dos resultados do ensaio, devem somar-se os resultados de todas as réplicas considerando o total dos organismos expostos no ensaio. Por exemplo, no caso de a turma ter efetuado 4 réplicas do ensaio, deve considerar-se que em cada tratamento foram expostos um total de 40 larvas de artémia e somar o número total de larvas mortas em cada réplica. A partir destes resultados os alunos podem calcular as percentagens de mortalidade para elaborar a curva de toxicidade.

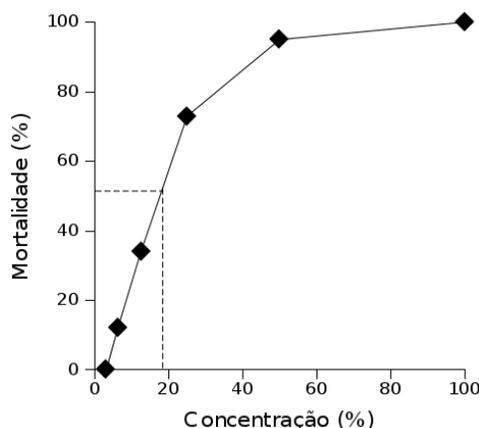


Figura 1. Curva de toxicidade de um detergente de lavagem de roupa para artémia. Determinação do valor de CL₅₀.

As Artémias também precisam de higiene diária?

Registo da experiência

1. Formula e indica a hipótese a testar nesta experiência.
2. Indica na tabela seguinte os resultados obtidos no ensaio que realizaste e calcula as respetivas percentagens de mortalidade.

Tabela 1: Resultados obtidos na totalidade do ensaio

Concentração (%)	Número total de larvas expostas por concentração	Larvas mortas por concentração		Percentagem de mortalidade	
		30min		45min	
		Nº	%	Nº	%
0					
10					
17					
26					
40					
64					
100					

3. Qual a percentagem de mortalidade registada no controlo? O que pode significar uma mortalidade nas placas controlo superior a 10%? Porque é que isso pode invalidar o ensaio?

4. Representa a curva de toxicidade no sistema de eixos apresentado, legenda os eixos do X e do Y e a figura que elaboraste. Determina graficamente o valor de CL₅₀.

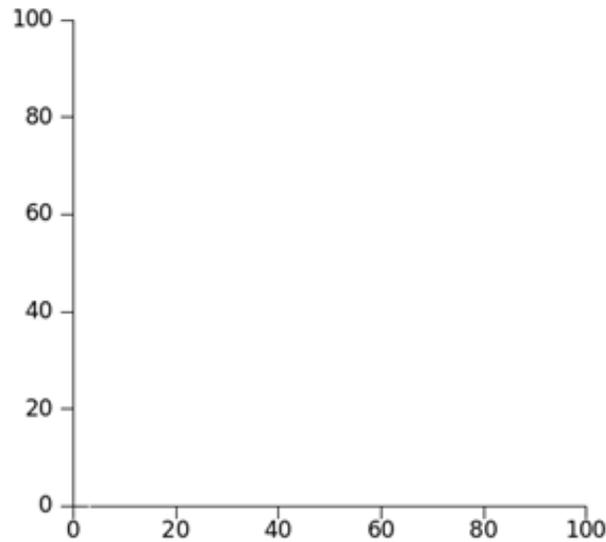


Figura 1.

5. Que conclusões tiras da experiência que realizaste?
6. Com base nas tuas conclusões, indica os principais cuidados que se devem ter na utilização de produtos domésticos de limpeza.