

## Análise de toxicidade aguda e determinação da dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) de efluente de curtume em camundongos Swiss

Raíssa de Oliveira Ferreira<sup>1</sup>, Abraão Tiago Batista Guimarães<sup>1</sup>, Bianca Costa e Silva<sup>1</sup>, Wellington Alves Mizaél da Silva<sup>1</sup>, Bruna de Oliveira Mendes<sup>1</sup>, Aline Sueli de Lima Rodrigues<sup>1</sup>, Sabrina Ferreira de Almeida<sup>1</sup>, Joyce Moreira de Souza<sup>1</sup>, Letícia Martins Rabelo<sup>1</sup>, Dieferson da Costa Estrela<sup>1</sup>, Guilherme Malafaia<sup>1,2</sup>

### RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a toxicidade aguda e determinar a dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) de efluentes de curtume, administrados pela via oral em fêmeas de camundongos da linhagem Swiss. Para isso, estabeleceu-se os seguintes grupos experimentais: grupo controle, o qual recebeu apenas água filtrada; grupo 20% de efluente de curtume diluído em água filtrada, 40%, 60%, 80% e 100%. Adotou-se procedimentos adaptados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para avaliação da toxicidade aguda. Observou-se que as concentrações de 100% e 80% de efluente de curtume promoveram a morte de todos os animais dos respectivos grupos. Por outro lado, a DL<sub>50</sub> correspondeu à concentração de 60% de efluente de curtume diluído em água. Para as demais doses (40% e 20%) não foi evidenciada a morte de nenhum dos animais. Acredita-se que este estudo possa subsidiar trabalhos futuros que venham investigar diferentes efeitos da exposição oral de camundongos a efluentes de curtume, possibilitando a elucidação dos mecanismos que relacionam os efeitos à esses xenobióticos.

**Palavras-chave:** *xenobióticos, modelo experimental, concentração letal, efluente.*

### Acute toxicity and median lethal dose (DL<sub>50</sub>) of the tannery effluent in Swiss mice

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the acute toxicity and to determine the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of tannery effluent, administered orally in Swiss mice females. For this, the following experimental groups were established: control group, which received only filtered water; group 20% of tannery effluent diluted in filtered water, 40%, 60%, 80% and 100%. It adopted appropriate procedures of the *Agência Nacional de Vigilância Sanitária* (Brazil) for evaluation of acute toxicity. It was observed that concentrations of 100% and 80% of tannery effluent promoted death of all animals of the respective groups. Moreover, the LD<sub>50</sub> corresponded to 60% of tannery effluent diluted in water. For other doses (40% and 20%) there was no evidence of any death of animals. It is believed that this study may subsidize future work that will investigate different effects of oral exposure of mice to tannery waste, enabling the elucidation of the mechanisms that relate the effects to these xenobiotics.

**Keywords:** *xenobiotics, experimental model, lethal concentration, effluent*

**Autor para correspondência:** Guilherme Malafaia  
Instituto Federal Goiano – Câmpus Urutaí, GO, Brasil.  
E-mail: guilhermeifgoiano@gmail.com

**Recebido em:** 12 nov. 2015

**Aceito em:** 07 dez. 2015

**Editor responsável:** Profa. Dra. Aline Sueli de Lima Rodrigues

<sup>1</sup>Instituto Federal Goiano – Câmpus Urutaí, GO, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Universidade Federal de Goiás, GO, Brasil.

## INTRODUÇÃO

Vários tipos de resíduos são diariamente gerados pelas mais diferentes atividades industriais. Um dos resíduos, produzidos em larga escala, o qual muitas vezes é descartado diretamente no ambiente sem tratamento prévio e considerado problema de saúde pública em países como Brasil, China, Paquistão e Índia, refere-se aos efluentes de curtume (Tare et al., 2003; Prabakaran et al., 2007). Tais resíduos, conforme discutido por Godecke et al. (2012), são produzidos em diferentes fases do processamento da pele bovina e apresentam consideráveis cargas orgânicas e inorgânicas, tais como ácidos, fenóis, sulfatos e sulfuretos, bem como elementos altamente tóxicos, como o cromo, cádmio, níquel, chumbo, dentre outros (Bhat, 2011; Isaac, 2013).

No campo experimental envolvendo a ecotoxicologia relacionada à efluentes de curtume, já demonstrou-se teratogenicidade em espécies de ouriço-do-mar, redução do crescimento de microalgas e uma variedade de efeitos tóxicos em micro crustáceos (Oral et al., 2005). Outros estudos envolvendo peixes, plantas e bactérias e exposição a efluentes de curtume também têm demonstrado efeitos prejudiciais (Tagliari et al., 2004; Matsumoto et al., 2006; Júnior et al., 2007; Tigini et al., 2011; Taju et al., 2012). Sabe-se que estes organismos são adequados para a determinação de letalidade, caracterizando-se bons modelos ecotoxicológicos. No entanto, outros organismos mais complexos como, por exemplo, os mamíferos, podem apresentar diferentes sinais ou sintomas não observados nos modelos ecotoxicológicos, necessitando, portanto, que novas investigações sejam realizadas. No entanto, raros são os estudos que avaliaram os efeitos dos efluentes em mamíferos, destacando-se apenas os trabalhos de Kumar et al. (2008), Siqueira et al. (2011), Moysés et al. (2014) e Silva et al. (2015), os quais trabalharam com ratos e camundongos.

Todos esses estudos são importantes e contribuem enormemente com a elucidação dos efeitos que a exposição dos efluentes de curtume pode causar nestes organismos. Porém, há grande dificuldade para reproduzir os efeitos humanos da ingestão de efluentes de curtume em um modelo experimental, devido aos distintos protocolos de exposição aos quais os animais são submetidos. O estudo de Siqueira et al. (2011) avaliou os efeitos da exposição dos animais à ingestão de 0,1% e 1% de efluente de curtume, diluídos em água, por um período de 21 dias. Já Moysés et al. (2014) estudaram ratos Wistar expostos à ingestão das concentrações de 0,1%, 1% e 5% de efluentes de curtume, também diluídas em água, por um período de 30 e 45 dias. Em ambos os estudos, os critérios

de escolha para essas concentrações são obscuros, fato este que abre perspectivas para a realização de novas investigações, não apenas para avaliação de efeitos desses efluentes em doses superiores, mas também para investigação de períodos e formas diversificadas de exposição aos efluentes diversificados.

Nesse sentido, considerando a enorme escassez de trabalhos envolvendo modelos experimentais mamíferos e exposição a efluentes de curtume, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda e determinar a dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) desses resíduos, administradas pela via oral, a fim de servir de subsídios para o desenvolvimento de investigações sobre os efeitos tóxicos desses resíduos, incluindo estudos sobre opções terapêuticas a serem utilizadas em casos de intoxicação por esses toxicantes.

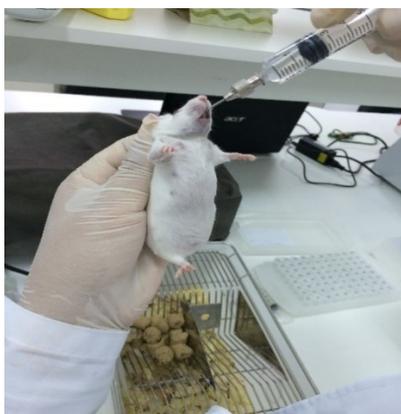
## MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas 24 fêmeas de camundongos da linhagem Swiss (35 a 45 dias), oriundos de matrizes do Biotério do Laboratório de Pesquisas Biológicas do Instituto Federal Goiano (IF Goiano) – Câmpus Urutaí (GO, Brasil). Todos os animais foram mantidos sob condições sanitárias de biotério convencional, com controle de temperatura (22 a 24°C) e luminosidade (12 h de ciclo claro). Os animais foram mantidos em caixas coletivas de polipropileno padrão para camundongos (30 x 20 x 13 cm) com tampas gradeadas de arame galvanizado com tratamento antioxidante, com no máximo 4 animais em cada caixa. As caixas eram limpas três vezes por semana, com troca da serragem e alimentação.

Após distribuição equitativa da massa corpórea dos animais, estes foram distribuídos em seis grupos experimentais (n=4, cada): grupo controle, o qual recebeu apenas água filtrada; grupo 20% de efluente de curtume diluído em água filtrada, 40%, 60%, 80% e 100%. A avaliação da toxicidade aguda foi realizada com base nos procedimentos adaptados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013) e da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD).

Cada animal recebeu seis aplicações de volume de 2 mL, cada, de água filtrada ou água filtrada contendo efluente de curtume nas concentrações acima expostas, durante um período de 24 h (dia 1: 7h, 11h e 15h e dia 2: 7h, 11h e 15h), conforme preconiza os procedimentos de toxicidade aguda preconizados pela ANVISA (2013). As aplicações ocorreram por meio de cânula orogástrica (gavagem) (Figura 1) diurnamente (três vezes ao dia – 2 mL em cada

aplicação) e em estado de restrição de comida e água no período noturno. A opção por aplicar o volume de 6 mL foi baseada em Chorilli et al. (2007), os quais descrevem que o consumo médio diário de água por camundongo é de 6 mL. Logo, os animais avaliados receberam no período de 24 h apenas o volume de líquidos que normalmente é ingerido pela espécie, diariamente. Por outro lado, a administração dos líquidos ocorreu em diferentes momentos do dia para que não houvesse extrapolação do volume pelo aparelho gástrico do animal, já que 6 mL é um volume muito elevado para a capacidade volumétrica do estômago do animal.



**Figura 1.** Imagem representativa do procedimento de gavagem realizado diariamente em cada animal dos diferentes grupos experimentais.

**Tabela 1.** Caracterização físico-química e química do efluente de curtume bruto utilizado no presente estudo<sup>#</sup>.

Parâmetros	Água potável	Efluente bruto
pH a 25°C (UpH)	7,20	4,05
Sólidos totais (mg/L)	80,00	37.380,00
Sódio total (mg/L)	5,25	9.690,00
Zinco total (mg/L)	0,03	0,30
Cálcio (mg/L)	4,00	601,20
Chumbo (mg/L)	<0,01	0,32
Arsênio (mg/L)	<0,01	<0,01
Magnésio (mg/L)	2,43	364,80
Cromo (mg/L)	<0,05	859,00
Cádmio (mg/L)	<0,001	0,095
Níquel (mg/L)	<0,01	0,55

<sup>#</sup>As análises da água e do efluente de curtume bruto foram realizadas de acordo com a metodologia preconizada pela *American Public Health Association* (APHA, 2005). Todas as análises foram realizadas em um laboratório comercial localizado em Goiânia, GO, Brasil.

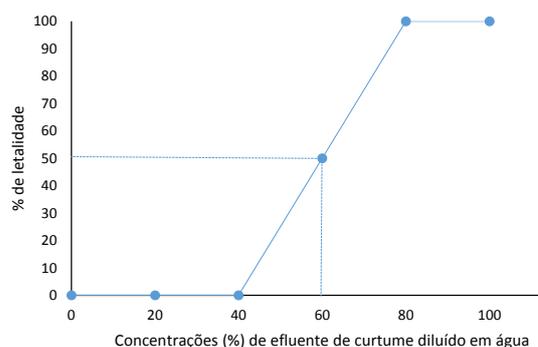
Para a determinação da dose letal mediana (DL<sub>50</sub>), os animais foram monitorados diariamente e, havendo morte, esta foi expressa como o

percentual do número total de animais que receberam os tratamentos. Simultaneamente às aplicações das crescentes concentrações de efluentes de curtume, procedeu-se a observação dos animais, de acordo com o teste hipocrático descrito.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode ser observado na Figura 2, as concentrações de 100% e 80% de efluente de curtume promoveram a morte de todos os animais dos respectivos grupos. As fêmeas que receberam a concentração de 100%, após a terceira aplicação (em período inferior a 4 h), apresentaram comportamentos pré-óbito semelhantes, com destaque para: falta de coordenação motora, com evidente ausência de resposta ao toque ou aperto da cauda; ausência de reflexo de endireitamento; ausência de tônus muscular nas patas, no corpo e ataxia, bem como prejuízos na atividade do sistema nervoso central, evidenciados por meio de hipnose, forte espasmo muscular seguido de morte. Comportamentos semelhantes foram observados em todas as fêmeas que receberam a concentração de 80% de efluente diluído em água; porém em período superior a 4 h após a terceira aplicação.

Por outro lado, a DL<sub>50</sub> correspondeu à concentração de 60% de efluente de curtume diluído em água (Figura 2), tendo sido evidenciado a morte de metade dos animais (n=2) após 15 h da última aplicação da referida concentração. Para as demais doses (40% e 20%) não foi evidenciada a morte de nenhum dos animais.



**Figura 2.** Dose letal mediana de efluente de curtume diluído em água e administrado em fêmeas de camundongos Swiss.

Esses dados demonstram o alto potencial tóxico agudo a partir de aplicações orais de elevadas concentrações de efluentes de curtume, diluídas em água filtrada no modelo experimental utilizado (camundongos Swiss), resultados estes nunca antes demonstrados. Na literatura, apenas dois trabalhos determinaram doses letais de efluente de curtume em camundongos (Silva et al., 2015; Lemos et al.,

2015). No estudo de Silva et al. (2015), camundongos C57Bl/6J fêmeas receberam, intraperitonealmente, por 5 dias consecutivos, injeções de concentrações de 100%, 75%, 50% e 25% de efluentes de curtume, diluídas em água e camundongos C57Bl/6J machos receberam pela mesma via de administração 44%, 38%, 32% e 26% de efluentes de curtume. Verificou-se que a concentração de 25% de efluentes de curtume administradas intraperitonealmente mostra-se inócua a fêmeas de camundongos C57Bl/6J e que doses de até 44% de efluentes de curtume, não evidenciam sinais de toxicidade aguda em camundongos machos da mesma linhagem.

No trabalho de Lemos et al. (2015) fêmeas de camundongos BALB/c foram distribuídas em grupos que receberam, pela via intraperitoneal, duas doses fracionadas de efluentes de curtume (*wet blue*), diluídos em água (11,25%, 22,5% e 45%). O grupo controle recebeu apenas água filtrada. Os dados do referido estudo não apontam para qualquer alteração física na massa corpórea dos animais, tampouco nas massas relativas do fígado, baço, timo e rins. Além disso, nenhuma mudança comportamental pelo *screening* hipocrático foi observada nos animais, com exceção de um animal do grupo 45% que foi a óbito no 3º dia de avaliação, o que corresponde para essa dose uma concentração de efluente de curtume que mata 16,66% dos animais, não sendo possível calcular da DL<sub>100</sub> ou DL<sub>50</sub>.

Assim, nota-se que a DL<sub>50</sub> não foi possível de ser determinada em nenhum dos estudos supramencionados. Além disso, ao comparar os estudos existentes sobre dose letal de efluente de curtume e o presente trabalho, é possível notar grandes diferenças nos procedimentos metodológicos utilizados e entre as linhagens de camundongo investigadas. Enquanto em Silva et al. (2015) e Lemos et al. (2015) foram investigados camundongos isogênicos (C57Bl/6J e BALB/c, respectivamente), no presente trabalho, utilizou-se uma linhagem heterogênea (camundongos Swiss). Além disso, Silva et al. (2015) e Lemos et al. (2015) administraram conteúdo de efluente de curtume pela via intraperitoneal e não oral. Assim, essas diferenças podem explicar as discrepância entre os resultados obtidos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo representa um avanço no conhecimento, considerando ser o primeiro estudo a determinar DL<sub>50</sub> relativa à ingestão de efluente de curtume, diluído em água. Demonstramos que concentrações de 40% e 20% de efluentes de curtume, diluídas em água administradas pela via oral mostram-se inócua a fêmeas de camundongos

Swiss e que a dose de 60% representa a DL<sub>50</sub>. Acredita-se que este estudo possa subsidiar trabalhos futuros que venham investigar diferentes efeitos da exposição oral de camundongos a efluentes de curtume, possibilitando a elucidação dos mecanismos que relacionam os efeitos à esses xenobióticos.

## REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013). Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+-+vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 28/04/2015.
- Bhat, B. A. (2011). Cleaner processing or technology vis-à-vis convectional Technologies. *Journal of Indian Leather Technologist's Association*, 111, 729-747.
- Chorilli, M., Michelin, D. C., Salgado, H. R. N. (2007). Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28(1), 11-23.
- Gödecke, M. V., Rodrigues, M. A. S., Naime, R. H. (2012). Resíduos de curtume: estudo das tendências de pesquisa. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 7, 1357-1378.
- Isaac, P. C. G. (2013). *Waste Treatment: Proceedings of the Second Symposium on the Treatment of Waste Waters*. Elsevier: 490, 2013.
- Júnior, H., Silva, J., Arenzon, A., Portela, C., Ferreira, I. (2007). Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. *Chemosphere*, 67(6), 1211.
- Kumar, V., Majumdar, C., Roy, P. (2008). Effects of endocrine disrupting chemicals from leather industry effluents on male reproductive system. *Journal of Steroid Biochemistry*, 111(3), 208-216.
- Lemos, D. C. S., Silva, B. C., Souza, J. M., Silva, W. A. M., Estrela, D. C., Oliveira, R. F., et al. (2015). Toxicidade aguda em camundongos BALB/c expostos a efluentes de curtume. *Multi-Science Journal*, 1(3), 53-63.
- Malone, M. H. & Robichaud, R. C. (1962). A Hippocratic screening for pure or drug materials. *Lloydia*, 25, 23-53.
- Matsumoto, S. T., Mantovani, M. S., Malagutti, M. I. A., Dias, A. L., Fonseca, I. C. (2006). Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29(1), 148-158.
- Moysés, F. S., Bertoldi, K., Spindler, C., Sanches, E. F., Elsner, V. R., Rodrigues, M. A. S., et al. (2014). Exposition to tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats. *Physiology & Behavior*, 129, 160-166.

Oral, R., Meriç, S., De Nicola, E., Petruzzelli, D., Della, R. C., Pagano, G. (2005). Multi-species toxicity evaluation of a chromium-based leather tannery wastewater. *Desalination*, 211(1), 48-57.

Prabakaran, M., Binuramesh, C., Steinhagen, D., Michael, R. D. (2007). Immune response in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* on exposure to tannery effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68, 372-378.

Silva, B. C., Lemos, D. C. S., Sá, B. F., Ferreira, R. O., Souza, J. M., Menezes I. P. P., et al. (2015). Determination of lethal doses tannery wastewater in C57Bl/6J mice. *Multi-Science Journal*, 1(2), 45-49.

Siqueira, I. R., Vanzella, C., Bianchetti, P., Rodrigues, M. A. S., Stülz, S. (2011). Anxiety-like behaviour in mice exposed to tannery wastewater: the effect of photoelectrooxidation treatment. *Neurotoxicology and Teratology*, 33, 481-484.

Tagliari, K. C., Cecchini, R., Rocha, J. A. V., Vargas, V. M. F. (2014). Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 561(1), 101-117.

Taju, G., Majeed, S., Nambi, K., Sarath, B. V., Vimal, S. (2012). Comparison of in vitro and in vivo acute toxicity assays in *Etroplus suratensis* (Bloch, 1790) and its three cell lines in relation to tannery effluent. *Chemosphere*, 87(1), 55-61.

Tare, V., Gupta, S., Bose, P. (2003). Case studies on biological treatment of tannery effluents in India. *Journal of the Air & Waste Management Association. Assoc*, 53, 976-982.

Tigini, V., Giansanti, P., Mangiavillano, A., Pannocchia, A., Varese, G. (2011). Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 866-873.