

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE REPELENTES COMERCIAIS PARA ORGANISMOS DE DIFERENTES NÍVEIS TRÓFICOS

Felipe de Brito Menezes, Jéssica Dutra Ferreira, Cristiane dos Santos Vergílio

Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Biológicas, Alto Universitário, s/n, Guararema 29500-000, Alegre - ES, Brasil. felipe.menezes.03@edu.ufes.br, jessicadutra017@gmail.com, cristiane.vergilio@ufes.br

Resumo

Atualmente existem diversos produtos com ação repelente disponíveis no mercado. Os mais estudados compostos ativos com ação de repelência contra insetos são o DEET, icaridina e EBAAP (IR3535®). Mesmo que em baixas concentrações, há um risco de toxicidade desses compostos para a biota, até para os níveis tróficos mais elevados. Nesse sentido, se faz necessárias maiores investigações visto que não existem muitas informações sobre as suas consequências ecotoxicológicas. O presente estudo visa avaliar a toxicidade aguda dos repelentes comerciais (DEET) para organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos. A exposição ao DEET induziu toxicidade crônica para microalga *Raphidocelis subcapitata* a partir da concentração de 0,1 µg/L. No entanto não foram observada toxicidade aguda para o microcrustáceo *Daphnia similis* e larvas de peixe *Danio rerio*.

Palavras-chave: Peixes, DEET, Contaminantes Emergentes.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Ecologia

Introdução

Os mosquitos são uma grande preocupação em todo o mundo, especialmente durante os meses de verão. Em muitas áreas os mosquitos são um grande incômodo, mas de muito maior significado são aqueles que representam uma ameaça direta à saúde em função da sua capacidade de transmissão de doenças (Linthicum et al., 2006). Particularmente no Brasil, devido às doenças transmitidas por mosquitos nos últimos tempos (dengue, zika, chicungunha, febre amarela, dentre outras) espera-se um aumento no uso de repelentes como medida profilática.

Repelentes sintéticos de insetos são compostos aplicados em superfícies para repelir os insetos, principalmente mosquitos. Como alguns destes repelentes foram repetidamente detectados em águas superficiais em concentrações significativas, foi observado que esses compostos também podem exercer efeitos repelentes em organismos aquáticos não-alvo (Fink et al., 2017).

O ingrediente mais comum de repelentes de insetos é o DEET (N,N-dietil-m-toluamida, CAS nº 134-62-3). Apesar de ser o repelente de insetos mais utilizado no mundo, nunca foram testadas quais as consequências que sua introdução no ambiente aquático, pois foi originalmente registrado para uso interno (Costanzo et al., 2007). A concentração máxima de repelentes contra insetos que contenham DEET como princípio ativo, em crianças entre 2-12 anos é de 10% do composto com aplicação restringida em três vezes por dia. No entanto, para indivíduos acima de 12 anos permite-se concentrações acima de 10%. Já para crianças abaixo dos 2 anos, não deve ser utilizado repelente que contenha a substância (ANVISA, 2015).

A demanda por repelentes alternativos aumentou na década de 1980, sendo as duas alternativas mais comuns em relação ao DEET são: EBAAP (IR3535®) e a Icaridina. Em testes com produtos comerciais, os resultados de Semmler et al. (2011) sugerem que os produtos que contêm Icaridina e EBAAP são mais eficazes do que aqueles que contêm DEET, o que vem aumentando a procura por produtos à base dessas formulações.

Após o uso, parte dos resíduos desses compostos atinge os ecossistemas aquáticos, o que vem permitindo a determinação desses resíduos em águas superficiais e subterrâneas. O DEET foi detectado em águas subterrâneas e superficiais em concentrações de até 3 µg L⁻¹ na Europa e até 33 µg L⁻¹ nos EUA (Nendza et al., 2013). Por outro lado, ainda são poucos os relatos sobre os níveis de Icaridina e EBAAP em águas superficiais, mas baixas concentrações (µg L⁻¹) de Icaridina foram

observadas em lagos e rios europeus (Knepper, 2004). No entanto, uma avaliação temporal é necessária considerando o aumento do uso desses compostos em repelentes comerciais.

A presença dos resíduos desses compostos de forma isolada e suas misturas podem induzir efeitos tóxicos nos organismos. Com isso, faz-se necessárias maiores investigações, pois não há informações suficientes sobre as suas consequências ecotoxicológicas para diferentes organismos não-alvo.

Metodologia

O presente estudo foi realizado conforme as diretrizes de ética e os métodos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Alegre da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-ALEGRE) com o número de protocolo 029/2019.

Os efeitos do DEET em concentrações ambientalmente relevantes foram avaliados em organismos de diferentes níveis tróficos (algas, microcrustáceos e larvas de peixes). Para o ensaio do primeiro nível trófico, preparou-se as culturas iniciadas de *Raphidocelis subcapitata* inoculando uma alga de células algáceas (de uma placa de ágar) em 100 mL de meio LC Oligo em frascos de Erlenmeyer para obter culturas exponenciais. O teste de inibição do crescimento foi realizado de acordo com a ABNT NBR 12648. Para controle (apenas com meio LC Oligo) e concentrações testadas, dez réplicas foram preparadas em frascos estéreis. Uma alíquota de células de 1×10^5 células/mL foi adicionada a cada replicado tratado com as concentrações (1000, 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 $\mu\text{g/L}$). As soluções foram mantidas em uma incubadora BOD com luz fluorescente branca contínua a 23 ° C e 27 ° C por 72 h. No final do teste, uma alíquota de cada amostra (controle e tratadas) foi contada sob um microscópio óptico com uma câmara Neubauer sob uma objetiva 40X.

Para o ensaio toxicológico do segundo nível trófico, foi realizado o teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* de acordo com a ABNT NBR 1271328, onde dez réplicas com cinco recém-nascidos de 6 a 24 horas de idade serão expostos a 10 mL de amostras tratadas com as concentrações (1000, 100, 10, 1, 0,1 e 0,01 $\mu\text{g/L}$) por 48 horas em condições estáticas a 20 ± 2 ° C no escuro. Manteve-se as amostras de controle apenas com meio MS. Após a exposição, os organismos foram imobilizados e contados.

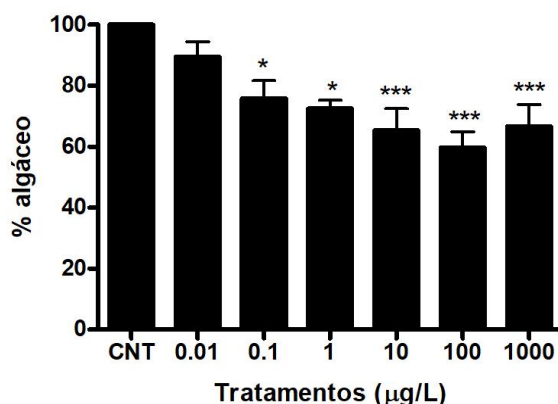
O teste de toxicidade aguda de terceiro nível trófico foi realizado de acordo com a ABNT NBR15499. Dez organismos em estágio larval de *Danio rerio* serão expostos a formulações comerciais do repelente à base de DEET. Os organismos foram expostos a diferentes concentrações (1000, 100, 10, 1,0, 0,1 e 0,01 $\mu\text{g/L}$), sendo o controle mantido apenas com água desclorada por 96 h como um teste semi-estático, com renovação da solução de teste a cada 48 h. O efeito observado foi a letalidade em comparação com o controle nas mesmas condições.

Para todos os três ensaios, preparou-se inicialmente a solução mais concentrada, sendo retirada a alíquota correspondente a partir do repelente comercial contendo 6,79% de DEET. A partir dessa solução, foram realizadas diluições sucessivas para obtenção das demais soluções teste. Realizou-se também a aferição dos parâmetros ambientais pH, condutividade e quantidade de oxigênio dissolvido para cada concentração testada incluindo o controle sendo duas réplicas para cada parâmetro.

Resultados

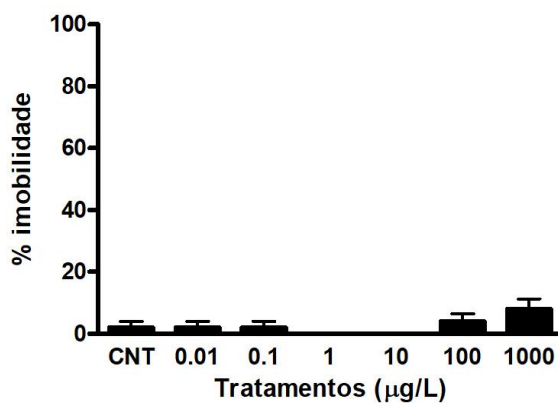
O ensaio de toxicidade crônica com microalga *Raphidocelis subcapitata* demonstrou o potencial tóxico (inibição do crescimento algáceo) do repelente comercial à base de DEET a partir da concentração de 0,1 $\mu\text{g/L}$ (Figura 1). No entanto não foram observados efeitos no ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Daphnia similis* – segundo nível trófico (Figura 2) e no ensaio de toxicidade crônica de curta duração com larvas de peixe *Danio rerio* – terceiro nível trófico (Figura 3).

Figura 1 – Percentual de algas *R. subcapitata* expostas a diferentes concentrações do repelente comercial contendo 6,79% de DEET.



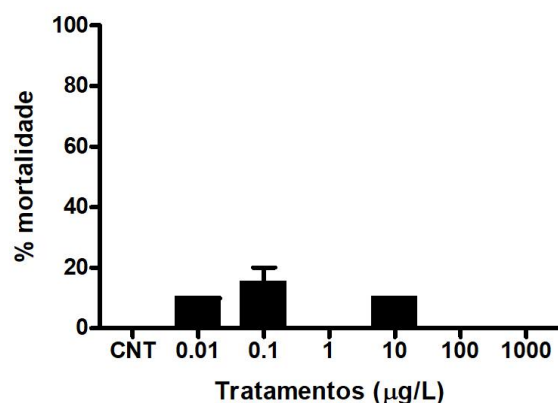
Fonte: Autor.

Figura 2 - Percentual de imobilidade de *Daphnia similis* expostas a diferentes concentrações do repelente comercial contendo 6,79% de DEET.



Fonte: Autor.

Figura 3 - Percentual de letalidade de larvas de *Danio rerio* expostas a diferentes concentrações do repelente comercial contendo 6,79% de DEET.



Fonte: Autor.

Discussão

Os dados do presente estudo demonstram que as formulações comerciais de repelente à base de DEET podem desempenhar efeito biológico, em especial em níveis inferiores da cadeia trófica (produtores primários). Apesar dos níveis superiores (microcrustáceos e larvas de peixe) não terem sido diretamente, impactos ambientais nos produtores primários podem afetar a sobrevivência de outros níveis da cadeia trófica.

As algas desempenham um papel crítico como produtores primários, e sua sensibilidade a compostos químicos pode ter consequências significativas para todo o ecossistema aquático. A inibição do crescimento das algas pode reduzir a disponibilidade de alimentos para organismos de níveis tróficos superiores e afetar a dinâmica de todo o ecossistema (Bellás et al., 2016).

Costanzo et al. (2007) demonstrou que 75 mg/L de DEET trazem impacto toxicológico em *Daphnia magna* expostas por 48h causando efeitos de imobilização nos organismos. Comparando com dados do presente estudo com *D. similis* observa-se que as concentrações foram inferiores, porém, mais realísticas, sendo próximas das concentrações encontradas nas águas superficiais. De acordo com Nendza et al. (2013), o DEET foi detectado em águas subterrâneas e superficiais em concentrações de até 3 µg L⁻¹ na Europa, dentro da faixa avaliada no presente estudo.

Embora as larvas de peixe-zebra sejam sensíveis a muitos contaminantes, o DEET, nas concentrações testadas, parece não ser suficientemente tóxico para causar mortalidade aguda. No entanto, efeitos subletais, como mudanças comportamentais ou impacto na reprodução a longo prazo, ainda podem ocorrer e precisam de investigação mais detalhada (Seeland et al., 2012).

Conclusão

Embora os efeitos agudos do DEET pareçam ser mínimos para organismos aquáticos em concentrações ambientais, o estudo ressalta a necessidade de investigações mais aprofundadas. Sugere-se a realização de testes adicionais que considerem diferentes condições ambientais e organismos em diferentes estágios de desenvolvimento. Além disso, avaliar os efeitos crônicos, subletais e as misturas de diferentes compostos químicos presentes nos repelentes comerciais pode proporcionar uma compreensão mais abrangente dos riscos ecotoxicológicos.

Referências

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 12648:2018. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). 27p, 2018.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713:2016. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). 27p. 2016.

Costanzo, S.D., Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W., Sandstrom, M.W. 2007. **Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments?**. Science of the Total Environment 384, 214–220.

Fink, P., Moelzner, J. Ruediger Berghahn, J. R., von Elert, E., 2017. **Do insect repellents induce drift behaviour in aquatic non-target organisms?**. Water Research 108, 32-38.

Knepper, T.P., 2004a. **Analysis and fate of insect repellents**. Water Sci. Technol. 50(5), 301-308.

Linthicum, K.J., Allan, S., Barnard, D.R., Becnel, J.J., Bernier, U.R., Carlson, D.A., Clark, G.C., Geden, C.J., Hogsette, J.A., Kline, D.L., 2006. **The Center for Medical, Agricultural, and Veterinary Entomology: developing new mosquito surveillance and control products**. In: Proceedings and Papers of the Mosquito and Vector Control Association of California – Conference, pp. 83–88, vol. 74.

Nendza, M., Klaschka, U., Berghahn, R., 2013. **Suitable test substances for proof of concept regarding infochemical effects in surface waters**. Environ. Sci. Eur. 25 (1), 1-10.