

II-153 AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS NO SOLO - TESTE DE FUGA COM *E. crypticus*

Marta Siviero Guilherme Pires* - martasiv@unicamp.br, Karolyne Enir Serafim-k254005@dac.unicamp.br, Isabelle Nogueira Balieiro da Silva- i253981@dac.unicamp.br, Laura Veloso Devesa- l239041@dac.unicamp.br, Bruna de Jesus Moreira- b234926@dac.unicamp.br

Faculdade de Tecnologia – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Endereço: R. Paschoal Marmo, 1888 - Jardim Nova Itália, Limeira - SP, 13484-332

RESUMO

Poluentes emergentes, incluindo fármacos, foram recentemente identificados como uma ameaça significativa ao meio ambiente devido ao uso extensivo e manejo inadequado de resíduos. Compostos como a Aspirina (ácido acetilsalicílico) e a Dexametasona têm sido detectados em diversas matrizes ambientais e estão associados a efeitos adversos, como resistência bacteriana a antibióticos e impactos negativos na fauna edáfica. Este estudo teve como objetivo analisar o efeito toxicológico dos anti-inflamatórios Aspirina e Dexametasona em *Enchytraeus crypticus*, organismo da fauna edáfica, através de testes de fuga em solo artificial tropical (SAT). Os experimentos foram realizados conforme a norma ISO 17512-2:2020. As concentrações de 10, 20, 40, 80 e 160 mg ASP kg⁻¹ de solo para Aspirina e 1, 2, 4, 8 e 16 mg DEX kg⁻¹ de solo para Dexametasona foram determinadas a partir de testes preliminares com sementes e utilizadas neste trabalho. Os resultados foram submetidos estatisticamente com o teste de Shapiro-Wilk, seguido por ANOVA, que indicou variação significativa entre as amostras ($p < 0.05$). As concentrações de Efeito Não Observado (CENO) e de Efeito Observado (CEO) foram determinadas pelo teste de Dunnett, juntamente com a Concentração de Inibição de 50% (CE50). A Aspirina teve CE50 foi de 80,12 mg ASP kg⁻¹ de solo, concentração menor do que já encontrada biodisponível no meio ambiente, nas condições de 10 a 160 mg ASP kg⁻¹ de solo o fármaco não apresentou efeito toxicológico aos organismos da fauna edáfica, logo, surge um interesse científico em averiguar a presença de efeito toxicológico do fármaco em concentrações superiores. Em relação à dexametasona, as concentrações estudadas, 1 a 16 mg DEX kg⁻¹ de solo, não causaram efeito toxicológico no organismo *E. crypticus* no solo.

PALAVRAS-CHAVE: Poluentes emergentes; Fármacos; Ecotoxicologia; *Enchytraeus crypticus*; Teste de fuga; Solo artificial tropical.

INTRODUÇÃO

Poluentes emergentes são aqueles que foram introduzidos recentemente no meio ambiente e que podem representar riscos, ou compostos cujos impactos foram descobertos apenas recentemente (Kumar et al., 2023). Dentre as classes de poluentes emergentes se encontram os fármacos, que representam grande risco ao meio ambiente devido ao seu uso em larga escala (Araújo et al., 2019). As principais fontes de emissão desses poluentes são o manejo inapropriado de resíduos gerados pela indústria farmacêutica, as águas residuárias e o lodo gerado nas plantas de tratamento de água (Gworek et al., 2021).

A utilização de água de reuso para irrigação e do lodo de esgoto como fertilizante pode levar ao acúmulo de fármacos no solo (Gworek et al., 2021). Apesar destes compostos poderem ser removidos durante o tratamento de esgotos, poucas estações realizam por completo sua remoção durante o tratamento de efluentes (Gworek et al., 2021).

Há estudos que identificaram diversos efeitos negativos advindos da biodisponibilidade destes compostos, tais como resistência bacteriana aos antibióticos, e efeitos negativos na reprodução e mortalidade de organismos da fauna edáfica *Eisenia fetida*. Por isso, os efeitos que estes compostos podem gerar no meio ambiente não podem ser ignorados (Oliveira et al., 2023; Drzymala; Kalka, 2023).



Durante anos, fármacos têm sido detectados em diversas matrizes ambientais, sendo os anti-inflamatórios e os analgésicos os com maior taxa de detecção (Drzymala; Kalka, 2023). A aspirina (ASP) um anti-inflamatório não esteroideal (AINEs) com produção de 216 milhões de comprimidos por dia, e que foi identificado em quatro ETE na Coreia com concentrações entre 0,374 - 367 mg kg⁻¹ (Ekpeghere et al., 2017). E o anti-inflamatório esteroideal Dexametasona encontrado em concentrações máximas de 6957.8 ng L⁻¹ e média 213.1 ng L⁻¹ em estudo realizado em 8 estações de tratamento de esgoto em Minas Gerais-Brasil (Alves et al., 2022).

Os invertebrados do solo são sensíveis a substâncias químicas e alterações no ambiente. Por isso, o seu uso como ferramenta para a análise de toxicidade de contaminantes é capaz de fornecer resultados mais realistas sobre os efeitos das variáveis ambientais, informações que não poderiam ser obtidas por meio de análises químicas (Mincarelli et al., 2023; Niva; Brown, 2019).

Tendo em vista as complexidades apresentadas, esta pesquisa teve como objetivo a análise do efeito toxicológico da Aspirina (ácido-acetilsalicílico) e do Dexametasona no invertebrado do solo *Enchytraeus crypticus* a partir de teste de fuga em solo artificial tropical.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia de Solos (LAECOS) da UNICAMP, seguindo as diretrizes determinadas pela ISO 17512-2:2020 Soil quality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior.

3.1 Concentrações para contaminação do SAT

Para determinar as concentrações dos fármacos a serem utilizadas nos testes, foram realizados testes preliminares com sementes. Dessa forma, foi determinado que as concentrações finais para o teste de fuga com *Enchytraeus crypticus* fossem de 10; 20; 40; 80 e 160 mg ASP kg⁻¹ de solo para Aspirina e 1; 2; 4; 8 e 16 mg DEX kg⁻¹ de solo para a Dexametasona.

3.2 Preparação do solo artificial (SAT)

A preparação do SAT teve início com a lavagem, peneiragem e secagem da areia a 60°C por 48h. Em seguida, misturou-se 70% de areia, 25% de caulim e 5% de fibra de coco, de acordo com a norma ISO 17512-2:2020. Finalmente, a mistura foi homogeneizada e armazenada por 48h para correção da umidade de 20%.

3.3 Contaminação do solo

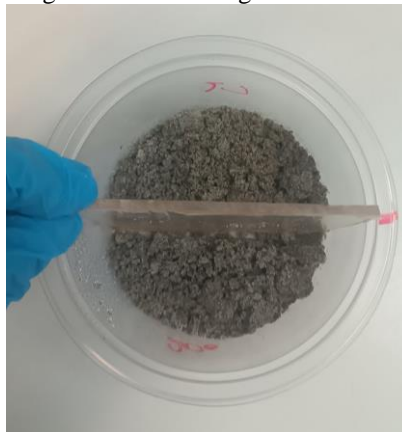
Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de cada fármaco, a partir de fórmula comercial, 96% do ativo ácido acetilsalicílico - EMS e ativo dexametasona - 96% BAYER. Em seguida, essas soluções foram diluídas para obter as respectivas concentrações. Logo após, o solo foi contaminado em sacos atóxicos e deixado estocado por 48h para estabilização do fármaco. Por fim, mediu-se o pH inicial.

3.4 Ensaio de toxicidade - teste de fuga

O teste foi realizado com cinco concentrações e quatro réplicas, acrescido do controle com quatro réplicas, de acordo com o preconizado pela Norma ISO 17512-2:2020. Em cada recipiente, foram adicionados 30g de solo previamente contaminado e 30g de solo controle, separados com um divisor vertical de acrílico (Figura 1), formando uma linha divisória. Em sequência, o divisor foi removido e 10 organismos clitelados *E. crypticus* foram adicionados na linha divisória de cada recipiente.

Os recipientes foram mantidos em 20°C ± 2 por 48h. Após esse período, a divisória foi colocada novamente no centro, e com auxílio de uma espátula, o solo foi removido e inserido em um novo recipiente, para que o solo fosse corados com Rosa de Bengala, além da adição de 20 ml de álcool 70%. Em seguida, os organismos de cada lado foram contados e o pH final foi determinado. Por fim, a classificação dos fármacos, o pKa, o peso e a fórmula molecular de cada composto estão disponíveis na Tabela 1.

Figura 1: Montagem do teste de fuga em SAT com *E. crypticus*



Autoria própria, 2023.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos fármacos

Composto	Classificação do fármaco	Fórmula molecular	Peso molecular (g mol ⁻¹)	PKa
Aspirina	Agente anti-inflamatório, analgésico e antipirético	C ₉ H ₈ O ₄	180,16	3,48
Dexametasona	Glicocorticóide	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	392,46	1,89 e 6,18

Autoria própria, 2023.

RESULTADOS

O tratamento estatístico dos dados obtidos nos testes realizados com os dois fármacos avaliados deu-se pelo teste de Shapiro-Wilk no software Statística 7.0, com $p > 0.05$, indicando uma distribuição normal. Em seguida, prosseguiu-se para a Análise de Variância (ANOVA), resultando em $p < 0.05$, indicando variação significativa entre as médias amostrais para ambos os fármacos. Além disso, foram obtidas a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e Concentração de Efeito Observado (CEO) pelo teste de Dunnett, juntamente com a Concentração de Inibição de 50% (CE50) no Rstudio. Vale ressaltar que a norma ISO 17512-2:2020 indica a condição de fuga superior a 70% como ocorrência de efeito toxicológico.

Os resultados obtidos nos dois testes estão apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 2 e Figura 3.

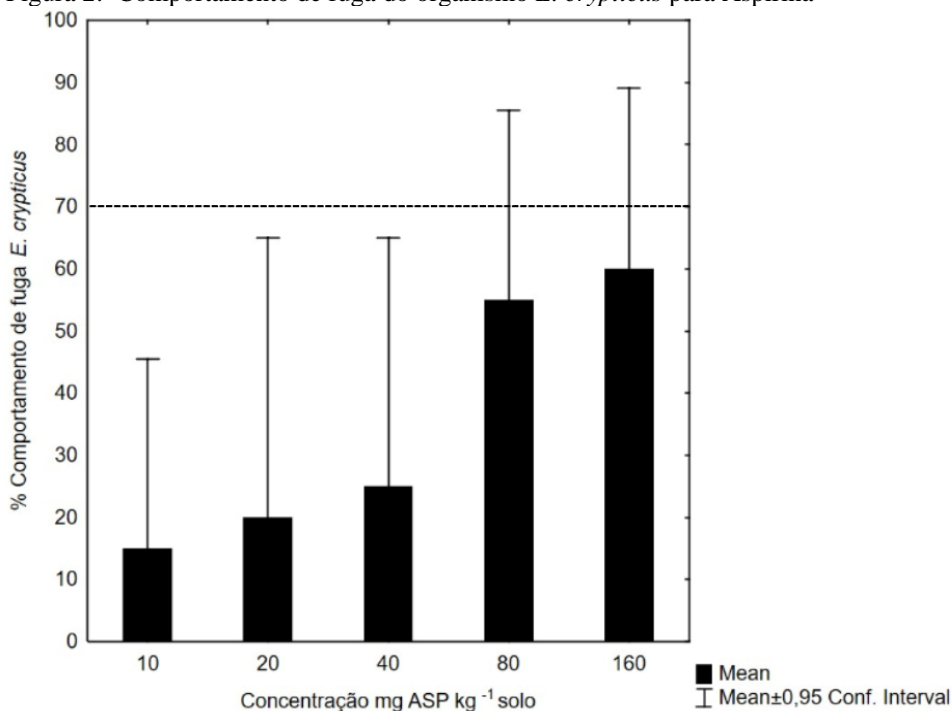
Tabela 2: CENO, CEO e CE50 obtidos nos testes de toxicidade - teste de fuga em SAT exposto aos fármacos Aspirina e dexametasona com o *E. crypticus*



Fármaco	CENO	CEO	CE50	p < 0,05
	mg kg ⁻¹			
Aspirina	40	80	80	0,007671
Dexametasona	8	16	n.d	0,000451

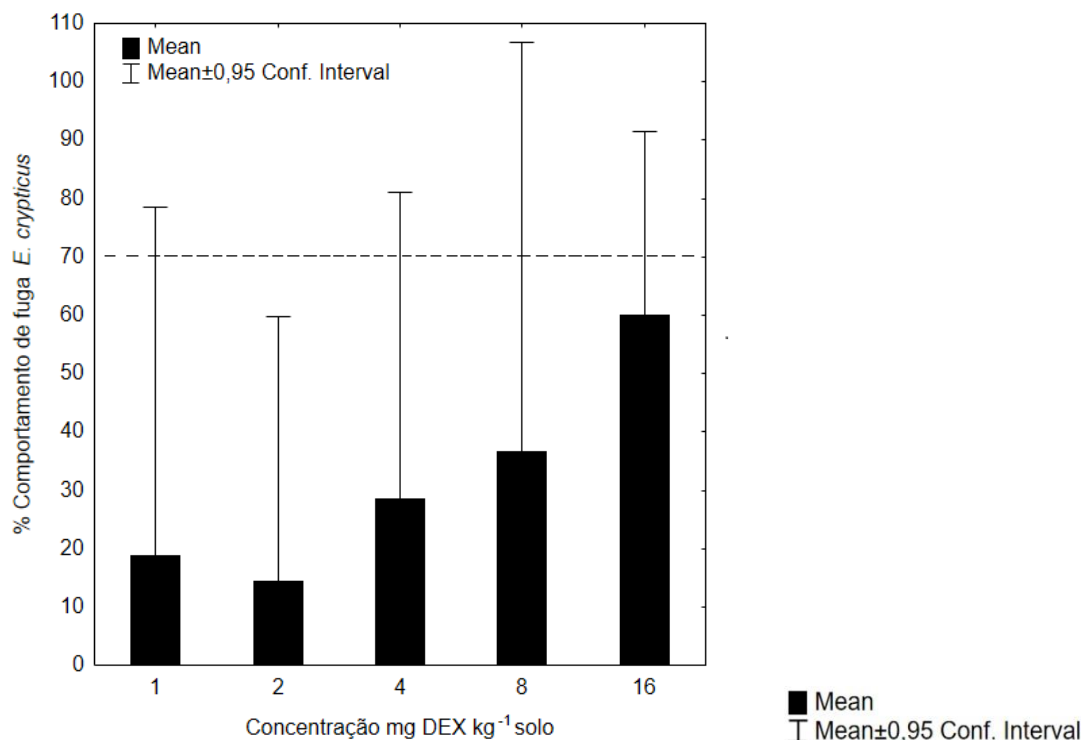
n.d* = não determinado

Figura 2: Comportamento de fuga do organismo *E. crypticus* para Aspirina



Fonte: Autoria própria, 2023

Figura 3: Comportamento de fuga do organismo *E. crypticus* para Dexametasona



Fonte: Autoria própria, 2023

Conforme a Norma ISO 17512-2:2020, fuga superior a 70% indica a condição de fuga, sendo assim, ocorrência de efeito toxicológico. As concentrações de CENO, CEO e CE50 para a Aspirina em foram de 40, 80 e 80,12 mg ASP kg⁻¹ de solo, respectivamente, enquanto o percentual de fuga foi de 60%. Sendo assim, a concentração máxima testada de aspirina neste estudo, não apresentou efeito toxicológico sob os organismos. Observa-se que com o aumento das concentrações do fármaco analisado, o comportamento de fuga também aumenta.

Em discussão com o estudo de Ekpeghere et al., (2017) que foram encontradas concentrações de até 367 mg ASP kg⁻¹ no lodo de sistemas municipais de quatro Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) na Coreia (Ekpeghere et al., 2017) e esse lodo pode ser aplicado em áreas agrícolas para fertilização do solo. Sugere-se que essas concentrações possam trazer risco à fauna edáfica, uma vez que a concentração máxima encontrada em lodo é superior a concentração que causou comportamento de fuga próximo a 70%.

Um estudo de fuga, também realizado com organismo da fauna edáfica, *E. fetida*, exposto aos anti-inflamatórios ibuprofeno e diclofenaco, observou-se CE50 de 64,8 90,49 mg kg⁻¹ respectivamente. Os resultados mostraram-se superiores às concentrações encontradas destes fármacos em águas residuais, sugerindo que os efeitos agudos observados nos organismos edáficos nas concentrações detectados em ETEs não causariam efeito de fuga em microrganismos *E. fetida* (Pino et al., 2017). Destaca-se que essa afirmação não se aplica à Aspirina, cujo CE50 é quatro vezes menor que as concentrações encontradas nas ETEs da Coreia.

Referente a dexametasona, as concentrações CENO e CEO foram de 8 e 16 mg DEX kg⁻¹ de solo respectivamente, com a CE50 não determinada dentro da faixa de concentração estudada. O percentual de fuga média máximo foi de 58%. Desta forma, a concentração máxima testada de dexametasona, assim como o outro fármaco testado aspirina neste estudo, não apresentou efeito toxicológico sob os organismos.

De acordo com o estudo desenvolvido por Kovačević et al. (2021) a dexametasona induz o mecanismo de resistência multi-xenobiótica nos enquitreídeos, *E. crypticus* e *E. albidus*. Este mecanismo é responsável pela proteção dos organismos contra a contaminação ambiental, ele age expelindo os compostos da célula,



impedindo que se acumulem e causem efeitos tóxicos no organismo. Por dificultar a bioacumulação de compostos este mecanismo pode aumentar a tolerância dos organismos ao estresse causado pelo composto. O que pode explicar a ausência de comportamento de fuga apresentada.

Ademais, a maior concentração de dexametasona encontrada por Alves et al. (2022) em estações de tratamento de água em Minas Gerais foi de 6249 ng L⁻¹, ou seja, inferior ao CENO obtido no teste de fuga. Por isso, podemos concluir que o composto não representa riscos para a função habitat do solo. No entanto, no trabalho desenvolvido por Kovačević et al. (2021) a dexametasona pode ter efeito letal em concentrações maiores, por isso é necessário o aprofundamento acerca dos efeitos gerados pelo composto no organismo *E. crypticus*.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por meio dos testes de fuga com *E. crypticus* revelaram os índices de toxicidade para os anti-inflamatórios Aspirina e Dexametasona, seguindo os critérios da norma ISO 17512-2:2020. No caso da Aspirina, o CE50 foi de 80,12 mg ASP kg⁻¹ de solo, concentração menor do que já encontrada biodisponível no meio ambiente. Nas condições de 10 a 160 mg ASP kg⁻¹ de solo o fármaco não apresentou efeito toxicológico aos microrganismos da fauna edáfica, logo, surge um interesse científico em averiguar a presença de efeito toxicológico do fármaco em concentrações superiores.

Em relação à dexametasona, as concentrações estudadas, 1 mg DEX kg⁻¹ a 16 mg DEX kg⁻¹ de solo, não causaram efeito toxicológico no organismo *E. crypticus*. Além disso, o CENO obtido foi de 8 mg DEX Kg⁻¹ o que sugere que concentrações ambientais encontradas, não representam riscos de fuga para a função habitat do organismo *E. crypticus* no solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, M.C.P. et al. Occurrence and removal of drugs and endocrine disruptors in water supply systems in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais State, Brazil). *Environ Monit Assess*, v.194, n.473, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10661-022-10130-8>>. Acesso em: 19 dez. 2023.
2. ARAÚJO, R. WOLFF, D. CARISSIMI, E. Fármacos em águas residuárias: efeitos ambientais e remoção em wetlands construídos. *DAE*, São Paulo, v. 67, n. 21B, p. 137-155, jul/set. 2019. Disponível em: < <http://revistadae.com.br/downloads/edicoes/Revista-DAE-218.pdf#page=137>>. Acesso em: 7 dez. 2023.
3. DRZYMAŁA, J., KALKA, J. Effects of diclofenac, sulfamethoxazole, and wastewater from constructed wetlands on *Eisenia fetida*: impacts on mortality, fertility, and oxidative stress. *Ecotoxicology*, v.32, p. 858–873, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10646-023-02690-3>>. Acesso em: 10 dez. 2023.
4. EKPEGHERE, K. LEE, J. KIM, H. SHIN, S. OH, J. Determination and characterization of pharmaceuticals in sludge from municipal and livestock wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.077>>. Acesso em: 20 dez. 2023.
5. GONZÁLEZ, R. SHARMA, A. SALDÍVAR, R. MENDOZA, R. BILIAL, M. IQBAL, H. Decontamination of emerging pharmaceutical pollutants using carbon-dots as robust materials. *Hazardous Materials*. 2022. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389421021130/pdf>>. Acesso em: 7 dez. 2023.
6. GWOREK, B. et al. Pharmaceuticals in the Soil and Plant Environment: a Review. *Water Air Soil Pollut*, v.232, n.145, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11270-020-04954-8>> Acesso em: 9 dez. 2023



SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO
DE ENGENHARIA SANITÁRIA
E AMBIENTAL



7. KOVAČEVIĆ, M. et al. Measurement of multixenobiotic resistance activity in enchytraeids as a tool in soil ecotoxicology. *Chemosphere*, v.279, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130549>>. Acesso em: 06 jan. 2023.
8. KUMAR, M; MOHAPATRA, S; WEBER, K. *Emerging Aquatic Contaminants*. Elsevier, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/C2021-0-02438-X>>. Acesso em: 30 abr. 2023.
9. MINCARELLI, L. et al. Evaluation of gene expression of different molecular biomarkers of stress response as an effect of copper exposure on the earthworm *Eisenia Andrei*. *Ecotoxicology*, v.28, p.938–948, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10646-019-02093-3>>. Acesso em: 13 dez. 2023.
10. NIVA, C. C; BROWN, G. G. *Ecotoxicologia Terrestre Métodos e aplicações dos testes com oligoquetas*. Brasília: Embrapa, 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1115956/ecotoxicologia-terrestre-metodos-e-aplicacoes-dos-testes-com-oligoquetas>>. Acesso em: 02 maio. 2023.
11. OLIVEIRA, V. DONATO, M. LIMA, C. FREITAS, C. SANTOS, I. LEAL, T. ALMEIDA, T. Impactos ambientais e toxicológicos pela contaminação de fármacos, principalmente antibióticos em ambientes aquáticos: revisão da literatura. *Ibero - Americana de Humanidades*, São Paulo, v.9, n.7, p. 838 - 850, jul. 2023. Disponível em: <<https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/10620/4444>>. Acesso em: 20 dez, 2023.
12. SANTOS, A. V. et al. Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in water supply systems in Brazil. *Science of The Total Environment*, v. 746, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141011>>. Acesso em: 10 dez. 2023.

Agradecimentos:

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia - PPGT - FT UNICAMP – Código de Financiamento 001”.