



Ensaio de toxicidade com *Enchytraeus crypticus* e sementes avaliando o diclofenaco sódico no solo

Palavras-Chave: Fármaco, Ecotoxicidade, Qualidade do Solo

Autoras:

Ana Carolina Giatti Callegaro – Faculdade de Tecnologia

Prof.^a Dr.^a Marta Siviero Guilherme Pires – Faculdade de Tecnologia

INTRODUÇÃO:

A qualidade dos solos é essencial para sobrevivência dos seres humanos, animais e plantas. A poluição pode ocorrer por diversos fatores relacionados com as atividades antrópicas, sendo um deles a contaminação com fármacos que são descartados no meio ambiente.

A contaminação das águas superficiais pode se dar com o despejo do efluente nos rios e no caso do solo, a contaminação pode ocorrer se o lodo de esgoto for destinado ao uso agrícola e da utilização dos dejetos de animais medicados como fertilizantes. Além disso, o descarte incorreto de fármacos vencidos ou não utilizados em lixos comuns e descargas de vasos sanitários podem contaminar os solos e as águas pluviais. A geração e produção de efluentes industriais farmacêuticos e efluentes rurais também aumentam a quantidade de fármaco encontrado no solo e nas águas.

O fármaco que vem sendo consumido em larga escala é o diclofenaco, anti-inflamatório do grupo não esteroide. Os tratamentos convencionais em ETE removem em torno de 15% a 25% de diclofenaco dependendo do tipo de cloro utilizado no tratamento (RIGOBELLO, 2012).

Na região metropolitana de Campinas, um estudo apontou concentrações de diclofenaco em torno de 41,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ no lodo de esgoto (SANTANA, 2016). Visto que foram encontradas quantidades do medicamento em lodo de esgoto, é importante a realização de testes de toxicidade do fármaco no solo, considerando que este poderá ser contaminado caso tal resíduo o atinja.

METODOLOGIA:

O organismo da fauna edáfica *Enchytraeus crypticus* e as sementes de mostarda e rúcula foram escolhidos para a realização do teste de toxicidade com o diclofenaco sódico. Foram realizados dois testes para avaliar o efeito do fármaco nos organismos.

No teste 1 foram utilizadas as concentrações 10, 50, 100, 150 e 200 mg kg^{-1} de diclofenaco sódico, mais o controle com solo natural e solo artificial tropical (SAT). Após obter os resultados

do teste 1, foi necessário aumentar as concentrações do teste 2 para 200, 400, 800, 1200 e 1600 mg kg⁻¹ de diclofenaco sódico, tendo em vista que não foram observados efeitos para o organismo *E. crypticus* no teste 1.

Para realizar a contaminação do solo com as soluções de diclofenaco sódico, foram pesados 200 gramas de solo natural para cada concentração e despejadas as soluções nos solos que estavam armazenados em sacos plásticos atóxicos. E por fim, o solo foi homogeneizado para promover melhor distribuição do contaminante. Esse solo foi utilizado para realização dos ensaios com os organismos edáficos e as sementes.

Tanto para as concentrações do teste 1 quanto para o teste 2, foram pesadas 30 gramas de solo contaminado com o diclofenaco sódico e colocado nos recipientes de amostra. Foram inseridos 10 organismos com clitelo visível nos recipientes com solo. Os organismos foram alimentados com farinha de aveia e pesados cada recipiente. Após a pesagem, os recipientes foram colocados em bandeja e levados a estufa BOD com temperatura e iluminação controladas, por 21 dias. A temperatura foi de 20 ± 2 °C e um fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro. Os organismos foram alimentados uma vez por semana, e corrigido a umidade de acordo com o peso do recipiente inicial (ABNT ISO 16387, 2012). Todas as concentrações foram realizadas em quatro réplicas.

Decorridos 21 dias, foi adicionado álcool até cobrir todo o solo e gotas de rosa de bengala (3 a 5 gotas). Em seguida, agitado com cuidado e após 24 horas deu início à leitura do teste. No início e no final do teste foram realizadas as leituras do pH (ABNT ISO 16387, 2012).

A leitura do teste foi realizada colocando uma quantidade de solo em uma bandeja e contando todos os organismos que ficaram corados com o rosa de bengala.

O teste de fitotoxicidade com as sementes, iniciou com a lixiviação do solo previamente contaminada nas concentrações 200, 400, 800, 1200 e 1600 mg kg⁻¹ de diclofenaco sódico. Em garrafas de vidro foram adicionados o solo e água destilada para o preparo do extrato aquoso. As garrafas foram colocadas no equipamento Tumbler e deixadas em agitação por 22h ± 2h. Após a agitação, foi despejado o extrato em cones Imhoff e aguardado 40 minutos até decantar o solo (MATTHEWS e HASTINGS, 1987).

O teste foi realizado em triplicata, sendo necessário identificar todas as placas de Petri e colocar o papel filtro. Em cada placa, foi pipetado 4 mL da amostra contaminada com diclofenaco sódico e colocadas 20 sementes com a ajuda de pinças. O controle desse teste foi feito com o solo natural sem a adição de fármacos (USEPA, 1996).

As placas foram espalhadas sobre a bandeja e deixadas por 120 horas (5 dias) na ausência de luz com temperatura de 22 ± 2 °C. Após os 5 dias foram realizadas as leituras dos tamanhos das radículas e observadas as germinações das sementes (USEPA, 1996).

O tratamento estatístico para a obtenção da concentração de efeito em 50% dos organismos (CE₅₀) foi feito a partir do número de organismos encontrados em cada concentração. Usando o software Statistica 7 ® e a equação de dose-resposta, foi possível encontrar os valores

de CE_{50} . Também foi possível encontrar a concentração que não provocou efeito nos organismos (NOEC) e a concentração que provocou efeito nos organismos (LOEC) através do teste de Dunnet.

O tratamento dos dados das sementes foi realizado utilizando o software Excel, sendo possível encontrar os valores de germinação relativa das sementes, alongamento relativo da raiz e índice de germinação, respectivamente. O cálculo do CE_{50} foi realizado de acordo com a equação da reta traçada a partir dos resultados do alongamento relativo da raiz através da regressão exponencial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A Tabela 1 mostra o número médio de *E. crypticus* em cada concentração de diclofenaco sódico nos dois testes realizados.

Concentração de diclofenaco sódico ($mg\ kg^{-1}$)	Teste 1		Teste 2	
	Número médio de organismos	Coefficiente de variação (%)	Número médio de organismos	Coefficiente de variação (%)
Controle Solo Artificial Tropical	860,3	11,7	678,8	3,9
Controle Solo Natural	708,3	20,4	578,3	19,3
10	862	10,4	664,8	20,4
50	1045,8	13,1	412,5	26,4
100	969,3	8,8	314	22,5
150	1075,8	9,4	130,3	26,5
200	885,5	13,9	8,5	24,5

Tabela 1. Número médio de organismos (*E. crypticus*) de acordo com cada concentração de diclofenaco sódico.

Como pode observar o *E. crypticus* não apresentou sensibilidade ao diclofenaco sódico nas concentrações do teste 1. O teste foi validado, pois os coeficientes de variação ficaram abaixo de 50%, no entanto não foi possível observar toxicidade para os organismos avaliados. Durante os 21 dias de teste, não houve alteração do pH, mantendo-se na faixa de 5,3 a 5,4.

A partir dos resultados obtidos no teste 1 foram então definidas as novas concentrações com valores mais altos do fármaco diclofenaco sódico e as concentrações usadas no teste 2 foram 200, 400, 800, 1200 e 1600 $mg\ kg^{-1}$, tanto para o organismo da fauna edáfica quanto para as sementes.

Com o aumento da concentração, foi possível encontrar através de estudos estatísticos que a concentração que causou 50% da inibição dos organismos (CE_{50}) foi de 697 $mg\ kg^{-1}$. A maior dose que não provocou efeito nos organismos (NOEC) foi 400 $mg\ kg^{-1}$ e a menor dose que

provocou efeito nos organismos (LOEC) foi 800 mg kg⁻¹. Os valores de pH inicial e final ficaram na faixa de 5,2 a 5,7. O teste 2 foi validado, pois os coeficientes de variação ficaram abaixo de 50%.

O solo artificial tropical (SAT) apresentou um número maior de organismos comparado com o solo natural. Isso ocorre devido o SAT ser preparado com quantidades de nutrientes padronizadas para que os organismos tenham condições ideais de reprodução ao longo do teste de toxicidade, além de eliminar qualquer interferente externo.

O teste de toxicidade com as sementes permitiu determinar o Índice de Germinação (IG) e o Alongamento Relativo da Raiz (ARR). A Figura 1 mostra o ARR para as sementes de rúcula e a Figura 2 mostra o ARR para as sementes de mostarda.

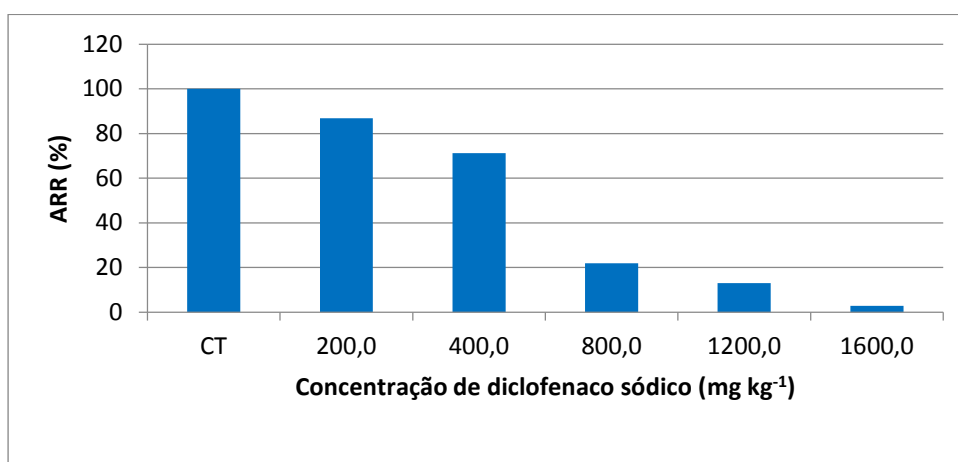


Figura 1. Alongamento Relativo da Raiz das sementes de rúcula no teste 2 – diclofenaco sódico. Fonte: Autor, 2020.

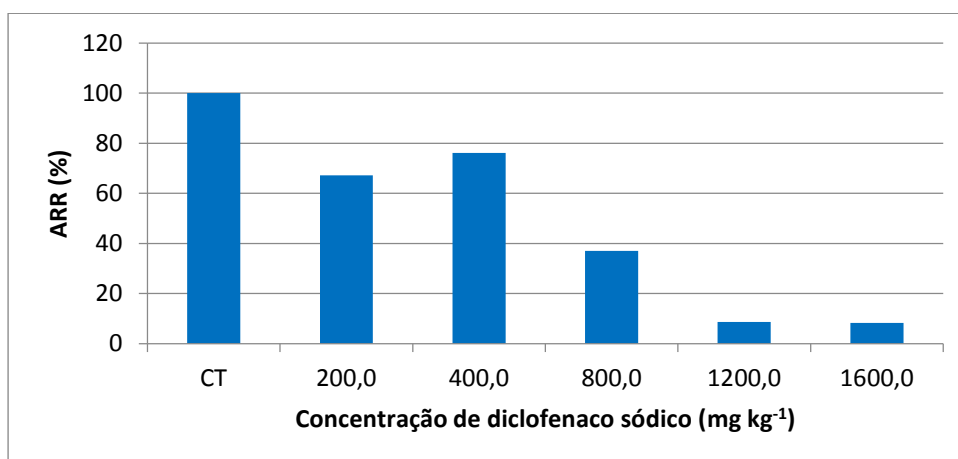


Figura 2. Alongamento Relativo da Raiz das sementes de mostarda no teste 2 – diclofenaco sódico. Fonte: Autor, 2020.

Com os valores obtidos do ARR, foi possível encontrar o valor de CE₅₀ para as sementes de rúcula de 489 mg kg⁻¹. Os valores do IG mostram a relação entre a porcentagem de germinação e o alongamento da raiz. No caso da rúcula, a germinação foi de aproximadamente 100% em todas as concentrações, já o alongamento da raiz diminui conforme a concentração foi aumentando, resultando na queda do IG.

Para as sementes de mostarda o valor de CE_{50} foi de 402 mg kg^{-1} . O ARR foi pequeno nas maiores concentrações, com observação para 400 mg kg^{-1} que teve aumento em relação a concentração anterior. No IG também ocorreu o mesmo aumento na concentração 400 mg kg^{-1} , por estar relacionado com o alongamento relativo da raiz. Mesmo com esse aumento, as maiores concentrações demonstraram queda tanto no ARR quanto no IG

CONCLUSÕES:

Os testes ecotoxicológicos resultaram que o *E. crypticus* é um organismo sensível e bom bioindicador para o fármaco diclofenaco. Já os testes com as sementes mostraram que a mostarda foi mais sensível do que a rúcula, pois apresentou um valor menor de CE_{50} .

Foi observado o aumento de toxicidade do fármaco aos organismos avaliados devido aos efeitos causados como a redução na reprodução dos organismos e a diminuição do tamanho da radícula das sementes, conforme a concentração foi aumentando. Portanto, devem-se continuar os estudos com esse fármaco, pois o mesmo afeta a qualidade do solo.

As concentrações encontradas em solos e águas no mundo, não superam as concentrações que causam efeitos tóxicos aos organismos testados, mas o aumento do consumo e a disposição inadequada dos fármacos podem elevar as concentrações encontradas em solos e águas ao longo do tempo.

BIBLIOGRAFIA

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **ABNT NBR ISO 16387. Qualidade do solo - Efeitos de poluentes em Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) - Determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência.** Rio de Janeiro, 2012.

MATTHEWS, J.E.; HASTINGS, L. **Evaluation of Toxicity Test Procedure for Screening Treatability Potencial of Waste in Soil.** Toxicity Assessment: An Internation Quaterly, 1987.

RIGOBELLO, E. S. **Avaliação da remoção de diclofenaco e formação de subprodutos em tratamento de água.** 2012. 259 f. São Carlos, Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2012.

SANTANA, J. M. **Qualidade de lodos oriundos de estações de tratamento de efluentes sanitários visando a reciclagem agrícola: compostos orgânicos persistentes, inorgânicos e fármacos.** Limeira, Faculdade de Tecnologia - Unicamp, 2016.

USEPA United States Environmental Protection Agency. **Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4200 – Seed germination / Root Elongation Toxicity Test.** Washington D.C., 1996.