



Toxicidade da cafeína em composto para *Enchytraeus crypticus* e sementes *Lactuca sativa* e *Eruca sativa*

Palavras-chave: Poluentes emergentes; solo; fauna edáfica, fitotoxicidade; cafeína

Autoras:

Palloma Renovato de Oliveira [FT-UNICAMP]

Bruna de Jesus Moreira [FT-UNICAMP]

Marcela Ravanelli Martins [FT-UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Marta S. G. Pires (Orientadora) [FT-UNICAMP]

1. INTRODUÇÃO

Devido ao amplo consumo de fármacos e suplementos se observa um aumento da contaminação de efluentes por princípios ativos presentes em sua formulação. A cafeína é um composto psicoativo que pertence ao grupo das xantinas, é utilizada como suplemento, como princípio ativo de diversos fármacos e é considerada um poluente emergente devido a sua alta disponibilidade em crescimento no meio ambiente, principalmente em áreas de maior densidade populacional, onde são descartados no esgoto doméstico (EDWARDS, 2015). Além disso, o poluente requer processos avançados para sua remoção, os quais não são contemplados em tratamentos convencionais em Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs).

A fim de determinar as concentrações que causam efeito toxicológico desse poluente no solo, a presente pesquisa realizou testes toxicológicos de comportamento de fuga e teste de reprodução com *Enchytraeus crypticus*, conforme a norma ABNT ISO 16387 (2012). O organismo *E. crypticus* foi adotado por ser um organismo da fauna edáfica comumente utilizado em testes e por ser bom bioindicador (NIVA, 2019). Ensaios de fitotoxicidade também foram realizados com sementes de *Lactuca sativa* (alface lisa) e *Eruca sativa* (rúcula), conforme a USEPA, 1996, para avaliar o índice de germinação e o alongamento da raiz após a exposição à cafeína. As sementes foram adotadas a partir das recomendações da EPA, pois possuem grau médio a alto de sensibilidade à exposição de poluentes químicos. (OPPTS 850.4200/1996).

Haja vista a pouca disponibilidade de pesquisas sobre o efeito da cafeína combinada ao solo e sua permanência no meio ambiente (LIU et al., 2023), bem como à necessidade de diversificação em relação aos organismos-testes utilizados, o poluente emergente e seus efeitos em organismos da fauna edáfica e flora resultou no objetivo geral deste trabalho.

2. METODOLOGIA

As atividades experimentais foram realizadas a partir de uma solução mãe de água destilada e 200mg de cafeína anidra, obtida em composto comercial, da qual se realizaram cinco diluições até obter as concentrações desejadas. A solução foi diluída em um Becker, com auxílio de agitador de vibração e elevação de temperatura. Tais equipamentos e vidrarias são parte do laboratório de Ecotoxicologia de solos (LAECOS), localizado na Faculdade de Tecnologia da Unicamp (FT- Unicamp), campus de Limeira.

2.1 Teste de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* e *Eruca sativa*

Os testes de fitotoxicidade com sementes de alface lisa e rúcula foram realizados em quadruplicata, acrescido do controle para cada espécie de semente. A montagem foi realizada em placas de Petri nas quais foi alocado um papel de filtro e pipetado 4mL de cada concentração e adicionado 20 sementes. Após montagem, as placas foram colocadas em bandejas e, para não ocorrer perda de umidade, permaneceram armazenadas em um saco plástico atóxico escuro a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ausência de luz por 5 dias (USEPA, 1996). Os resultados foram gerados por cálculos de Índice de Alongamento Relativo (IRAR) e Índice de Germinação Relativa (IGR).

2.2 Testes de toxicidade com organismo *E. crypticus* - Fuga

Os testes de comportamento de fuga, realizados em quadruplicata acrescido do controle, foram montados em recipientes plásticos de 250 mL com 60g de solo artificial tropical (SAT), sendo 30g solo controle e 30g de solo contaminado divididos por uma placa de acrílico marcando no centro do recipiente. Após isto, dez organismos adultos e clitelados foram colocados no centro do recipiente, entre os solos. O teste foi mantido em incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D.) com controle de iluminação e temperatura por 48 horas. Após este período, o teste foi encerrado com adição de 20 mL de álcool 70% e corados com Rosa bengala para facilitar a leitura de resultados.

2.3 Testes de toxicidade com organismo *E. crypticus* - Reprodução

O teste de reprodução foi realizado em recipientes plásticos com pesagem de 30g de SAT contaminado com cafeína, em quadruplicata por concentração, nos quais foram adicionados 10 organismos clitelados. Cada pote foi alimentado com farinha de aveia e água destilada. Após a pesagem, os recipientes foram alocados em bandeja e mantidos em B.O.D. a $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ e iluminação controlada, por 21 dias. Os organismos foram alimentados a cada sete dias e a umidade corrigida conforme o peso do recipiente inicial. Passados 21 dias, o teste foi finalizado com a adição de 20 mL de álcool 70% e 3 mL de rosa bengala. Além disso, o pH foi aferido no início e no final do teste (ABNT ISO 16387, 2012).

2.4 Análise estatística

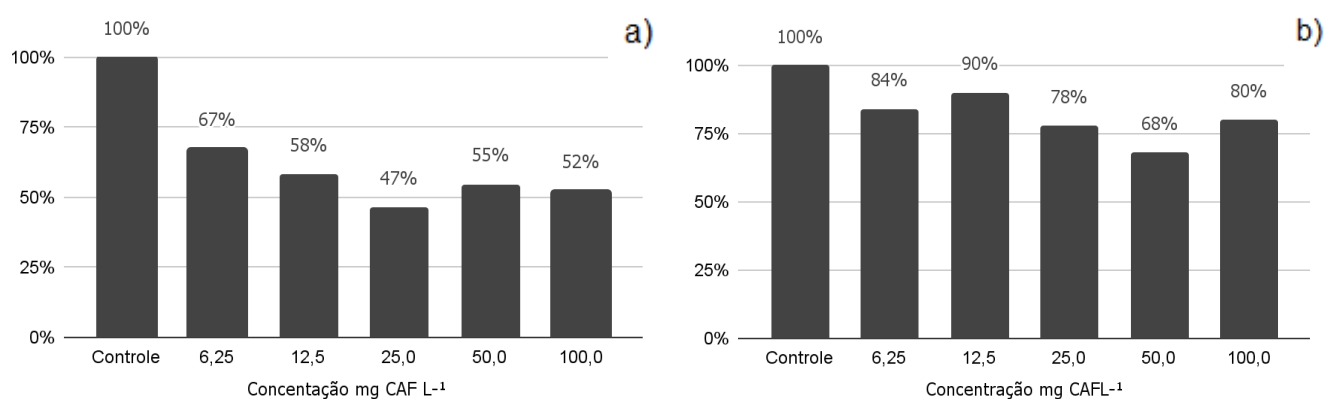
Os dados gerados foram submetidos a tratamento estatístico aplicando a Análise de Variância unidirecional (ANOVA), teste de Dunnett para determinação da Concentração de Efeito Não Observado

(CENO) e da Concentração de Efeito Observado (CEO). As Concentrações de Efeito de 20 e 50% observado (CE20 e CE50) dos organismos *E. crypticus* foram determinadas a partir do modelo de ajuste de curva logística III (dose-resposta) e as CE20 e CE50 das sementes foram determinadas a partir do modelo de ajuste de curva logística IV (dose-resposta). Os softwares matemáticos utilizados foram R Studio e Statistica 7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

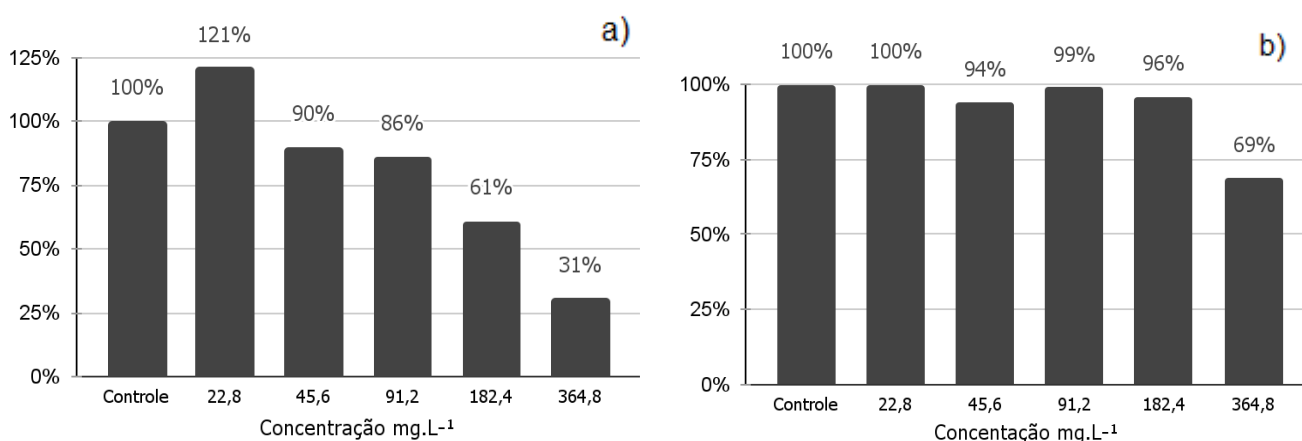
Os resultados e discussões dos testes com organismos da fauna edáfica, assim como os de fitotoxicidade com sementes, são apresentados a seguir. A Figura 1 expressa os resultados obtidos para as sementes de alface e a Figura 2 para as sementes de rúcula.

FIGURA 1: (a) IRAR e (b) IGR da semente de alface exposta a diferentes concentrações de cafeína



Fonte: Autora, 2023

FIGURA 2: (a) IRAR e (b) IGR da semente de rúcula exposta a diferentes concentrações de cafeína



Fonte: Autora, 2023

Verificada a parametrização dos dados através do teste Shapiro que apresentou $p > 0.05$, e a ANOVA $p < 0.05$, evidenciando diferença estatística presente no teste, foi possível determinar a CENO, CEO, CE20 e CE50, apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1: Resultados obtidos por modelagem matemática

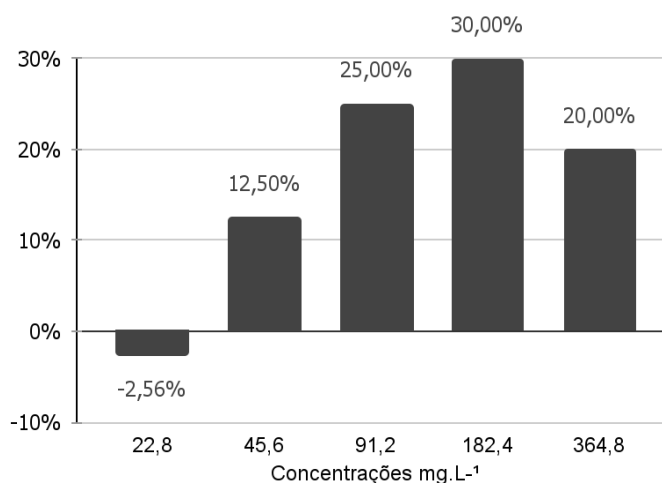
Tipo Semente	CENO	CEO	mg.L ⁻¹		ANOVA
			CE20	CE50	
Alface	6,25	12,5	não determinado	não determinado	0,000027
Rúcula	91,2	182,4	89,29	206,74	0,000001

Fonte: Autora, 2023

Em relação aos testes de fitotoxicidade foi observado que em sementes da mesma família *sativa*, houve diferença de sensibilidade às concentrações de exposição de cafeína, visto os valores de CENO e CEO determinados para ambas sementes. Conforme a Tabela 1, a rúcula apresentou CEO de 182,4 mg.L⁻¹ enquanto a alface 12,5 mg.L⁻¹, ou seja, a alface apresentou maior sensibilidade à exposição à cafeína.

Foi possível observar que a semente de alface teve maior sensibilidade quando observado o IRAR do que a semente de rúcula. Por fim, a germinação entre as sementes não foi menor do que 68%, mesmo na maior concentração. Ou seja, a cafeína não interfere na germinação, dentro dessa faixa de concentração, porém, pode afetar o alongamento da raiz.

A Figura 3 apresenta o Índice de Fuga (IF) resultante do teste de comportamento de fuga realizado em solo artificial com organismos da fauna edáfica *E crypticus*.

FIGURA 3: Índice de Fuga do *E crypticus* exposto a diferentes concentrações de cafeína em solo artificial

Fonte: Autora, 2023

Vista a ISO 17512-2/ 2020, para ser considerado que houve efeito toxicológico, o comportamento de fuga dos organismos à cafeína deveria ser superior a 80%, o que não ocorreu no experimento no SAT. Neste experimento, a permanência de *E. crypticus* na parte contaminada do solo por apenas 48 horas resultou em sua fragmentação, clareamento e enfraquecimento do clitelo acrescido de uma resistência à coloração com

corante Rosa de bengala após a finalização do teste. O que tornou pertinente a realização do teste de reprodução, para avaliar os efeitos da cafeína a longo prazo.

Quanto ao teste de reprodução com *E. crypticus*, não foi apresentado resultado, pois o teste está em finalização, sendo garantida a apresentação e discussão do mesmo ao final desta pesquisa.

4. CONCLUSÕES:

Foi possível concluir que apesar das concentrações estudadas serem superiores ao encontrado no meio ambiente, as concentrações de exposição do solo à cafeína podem impactar processo de alongamento de raiz das sementes, porém, não causou comportamento de fuga expressivo nos organismos da fauna edáfica estudado.

Ainda assim, nota-se a importância de testes de ecotoxicidade, dadas as diferenças entre controle e organismos expostos à cafeína, como as diferenças morfológicas constatadas no teste de fuga realizado durante essa pesquisa, Sendo assim, foi possível observar que a cafeína pode causar efeito toxicológico em organismos após exposição a esse poluente, tornando pertinente o estudo sobre a cafeína e seus impactos no meio ambiente.

5. REFERÊNCIAS:

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.

EDWARDS, Q. A., et al. Caffeine in surface and wastewaters in Barbados, West Indies. **Springerplus**. 2015. v. 4, p.57, 25729634, PMC4339322. Disponível em: ><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4339322/#CR32><. Acesso em 24 jul. 2023.

LIU, W. et al. Effects of Shellfish and Organic Fertilizer Amendments on Soil Nutrients and Tea Yield and Quality. *Toxics*, v. 11, n. 3, p. 262, 2023.

NIVA, C. C.; BROWN, G. **Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

USEPA (United States Environmental Protection Agency) - **Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4200 – Seed germination / Root Elongation Toxicity Test**. P.a. T. S. Prevention. Washington D.C., USEPA: 6, 1996. Disponível em: <<https://www.epa.gov/>>. Acesso em: 24 jul. 2023.