USO DA *ARTEMIA SALINA* COMO BIOINDICADOR NA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLOGICA DO FÁRMACO CLORIDRATO DE CIPROFLOXACINA EM SOLUÇÃO SINTÉTICA TRATADA POR PROCESSO DE ELETROCOAGULAÇÃO

Ariádine Reder Custódio de Souza (*), Patricia Simões Carraro de Souza, Fernando Rodolfo Espinoza-Quiñones, Aparecido Nivaldo Módenes
* Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), ariadinesouza@msn.com.

RESUMO

A presença de resíduos fármacos no meio ambiente os tornou um potencial poluidor dos ecossistemas devido aos efeitos deletérios por eles causados como, toxicidade aquática, genotoxicidade e distúrbios endócrinos. A ciprofloxacina é um antibiótico bastante prejudicial ao meio ambiente por causar toxicidade sobre bactérias e por possuir persistência ambiental. Desta forma aplicou-se o processo de eletrocoagulação (EC) em condições otimizadas para a degradação do cloridrato de ciprofloxacina CIP(HCl) em solução sintética, a qual teve sua concentração acompanhada por análises cromatográficas HPLC. Amostras da solução sintética de CIP(HCl) tratadas por diferentes tempos de tratamento EC, foram submetidas a testes de ecotoxicidade com o bioindicador *Artemia salina*, visando identificar-se a presença de toxicidade do composto ou dos subprodutos de degradação gerados durante o tratamento. Para realização do teste levou-se em consideração a quantidade de organismos testes que morreram ou perderam a mobilidade após 24 horas de exposição nas amostras testadas. Por meio da análise HPLC notou-se que a partir de 40 minutos de tratamento a degradação da CIP(HCl) atingiu aproximadamente 98%. O teste de toxicidade indicou que as amostras tratadas com tempos de eletrólise inferior a 40 minutos apresentam alta carga tóxica, evidenciando que o tratamento de EC não é eficaz para a degradação da CIP(HCl) em curtos tempos de tratamento. Portanto, devido ao alto nível de toxicidade presente nas soluções estoque e com tempo de tratamento inferior a 40 min., onde há formação de subprodutos de degradação tóxicos, o processo EC não é adequado para ser usado como um único tratamento de efluentes em curtos períodos de tempo.

PALAVRAS-CHAVE: Ecotoxicidade, *Artemia salina*, ciprofloxacina, eletrocoagulação, toxicidade aquática.

INTRODUÇÃO

A constante presença de resíduos fármacos, com concentração permanente no meio ambiente, os tornou um potencial poluidor dos ecossistemas. Efeitos deletérios causados por resíduos fármacos incluem toxicidade aquática, genotoxicidade e distúrbios endócrinos (KUMMERER *et al.*, 2004). Tais efeitos são indicadores do seu elevado potencial poluidor tornando grave sua presença em corpos hídricos, prevendo no futuro o surgimento de doenças na biota devido a processos fisiológicos anormais na reprodução de espécies animais e vegetais, o aumento da incidência de câncer, o desenvolvimento de bactérias anômalas, dentre outros fatores agravantes (NOGUEIRA & JARDIM, 1998).

Os antibióticos representam uma grande parte dos fármacos consumidos, uma vez que são eficazes no combate de inúmeros tipos de infecções, porém seu elevado consumo os tem tornado os principais fármacos contaminantes ambientais. Os antibióticos são divididos em famílias, sendo a de maior relevância ambiental as fluoroquinolonas, dentre os quais se inclui a ciprofloxacina (CIP). A CIP atua contra uma ampla gama de bactérias auxiliando no controle de diversas infecções, porém a CIP tem demonstrado ser um dos antibióticos mais prejudiciais ao meio ambiente devido aos efeitos tóxicos que exerce sobre as bactérias. Estudos tem relatado a presença de CIP em águas residuárias, águas superficiais, solos e efluentes hospitalares (ARTHIKEYAN & MEYER, 2006; GITHINJI *et al*., 2011; LINDBERG *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2009). A permanência da CIP no meio ambiente pode ser atribuída a baixa biodegradabilidade de sua molécula. Face ao risco ambiental oferecido pela CIP, é fundamental a inserção de um tratamento prévio, por tecnologias físico-químicas, antes de seu descarte no meio ambiente. Novas tecnologias ou processos não convencionais têm sido propostos como alternativas, eficientes e confiáveis na tarefa de remover ou degradar os contaminantes tanto orgânicos como inorgânicos presentes em efluentes industriais e/ou domésticos, dentre os quais se pode citar o processo de eletrocoagulação.

A aplicação de tratamentos alternativos para tratamentos de resíduos poluidores ambientais traz consigo a necessidade de que seja avaliado o potencial tóxico formado após o tratamento. A associação de respostas químicas às respostas biológicas em organismos de diferentes níveis tróficos complementa os estudos ambientais, pois este tipo de estudo

pode mostrar respostas quanto o genotóxico ser um agente poluente a uma cadeia de organismos ou até mesmo ao ser humano. A toxicidade é um parâmetro de extrema importância e que deve ser cuidadosamente avaliado, pois em alguns casos nos processos de degradação, podem ser formados subprodutos de reação com elevada toxicidade que tornam a solução tratada mais tóxica que sua composição inicial (MANENTI, 2013). Os organismos vivos são quase sempre expostos a agentes ambientais que podem afetá-los tanto em nível celular quanto molecular, possuindo efeitos genotóxicos. Um maior entendimento sobre o potencial genotóxico de algumas substâncias é importante, pois possibilita prevermos o impacto que certos agentes podem causar às populações animal, vegetal e humana.

Artemia salina (camarões de água salgada) são microcrustáceos que se desenvolvem muito bem em condições hipersalinas. Podem ser observados a olho nu, ou com auxílio de microscópio. São organismos que habitam em lagos ou lagoas salgadas, mares e tanques de salinas. Alimentam-se de microalgas disponíveis, matéria orgânica e fungos. A *Artemia salina* pode ser obtida em casas de pesca e os cistos podem ser armazenados sem perder a viabilidade por no mínimo seis meses, em condições anaeróbias e ambiente seco. Para a eclosão dos cistos basta que os mesmos sejam hidratados e em poucas horas as membranas rompem-se para o nascimento de um náuplio livre natante. Neste estágio de seu ciclo de vida, as *Artemias* são utilizadas para o teste de toxicidade aguda. O efeito tóxico analisado neste bioensaio esta baseado na mortalidade ou perda de mobilidade dos organismos teste após 48 horas de exposição nas amostras a serem analisadas. Para que o teste tenha resultados confiáveis é necessário que as larvas sejam mantidas em condições ótimas de crescimento, como temperatura aproximadamente em 30 °C, pH em torno de 8,0 e 35% de salinidade. A importância deste ensaio de toxicidade deve-se ao fato de que alguns estudos correlacionam a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades anticancerígena, antifúngica e antimicrobiana (MEYER *et al*., 1982; MACRAE *et al.*, 1988; SAHPAZ *et al.*, 1994).

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, preparou-se uma solução sintética contendo 25 mg de cloridrato de ciprofloxacina (CIP(HCl)) por litro de água destilada, a qual foi tratada pelo processo eletrocoagulação (EC), utilizando um reator laboratorial de bancada, com uma série de eletrodos de alumínio. Por meio de um planejamento experimental completo com três variáveis (densidade de corrente elétrica, pH inicial da solução e o tempo de eletrólise) em três níveis, a máxima degradação do fármaco indicada pelo teor de CIP(HCl) medido por HPLC (Shimadzu, Série 20A) foi alcançada na condição operacional da EC: densidade de corrente 18 Am^{-2} , tempo de eletrólise de 75 min e pH>8. No entanto, foram realizados testes toxicológicos utilizando a *Artemia salina*, como bioindicador, em diferentes de tempos de operação do reator, mantendo fixos os melhores parâmetros de trabalho encontrados, visando encontrar o melhor tempo de eletrólise com menor impacto toxicológico proveniente da CIP(HCl) ou dos produtos de degradação formados durante o tratamento de EC.

Para realização dos testes foi seguida a metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982), a qual recomenda o preparo de uma solução nutritiva no intuito de eclodir os cistos de *Artemia salina*. Em um balão volumétrico solubilizou-se 23 g de cloreto de sódio (NaCl), 11 g de cloreto de magnésio hexa-hidratado ($MgCl_2.6H_2O$), 4 g de sulfonato de sódio (Na_2SO_4), 1,3 g de cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2.2H_2O$) e 0,7 g de cloreto de potássio (KCl), em 1000 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 9,0 com solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 1 M). Entre todos os cistos eclodidos (1 gL^{-1}) foram escolhidos mais resistentes, separando-os por migração através de uma divisória plástica perfurada instalada no béquer que contem a solução de Meyer. Os cistos foram colocados para eclodir de um lado da divisória enquanto o outro lado da solução de Meyer estava sob a incidência direta de luz. A solução foi mantida a temperatura média de 28°C. Desta forma, após 48 horas, os microcrustáceos mais resistentes migraram para o outro lado da parede, aproximando-se da luz. Estes microcrustáceos foram então utilizados para as análises. Na Figura 1 está representado o sistema acima descrito.

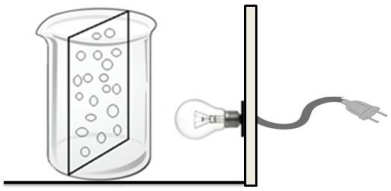

Figura 1. Sistema montado para a eclosão dos cistos de *Artemia salina.* Fonte: Autor do Trabalho.

Pelo método de Meyer, objetivou-se encontrar o nível de toxicidade da concentração residual de CIP(HCl) na solução sintética tratada pela EC para qual haja uma sobrevivência de pelo menos 50 % dos organismos. Para tanto, foram preparadas amostras diluídas da solução de CIP(HCl) antes e após o tratamento de EC, a partir da solução de Meyer. Foram feitas 5 diluições diferentes para cada amostra nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100%, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Diluições das amostras da solução de CIP(HCl) para os testes de toxicidade com *Artemia salina*.

	% da amostra				
Solução	20	40	60	80	100
Amostra (mL)	1	2	3	4	5
Solução de Meyer (mL)	4	3	2	1	0

Em tubos de ensaio com o fundo chato foram adicionados 5 mL de cada solução preparada, adicionando-se em cada uma, 10 larvas de *Artemia salina*. Os recipientes foram mantidos em temperatura ambiente e sob presença constante de luz, durante 24 horas, dentro de uma capela de fluxo laminar a fim de evitar qualquer contaminação do meio. Decorridas 24 horas, fez-se a contagem do número de organismos que permaneceram vivos e com mobilidade inalterada. Desta forma, pode-se calcular a dose letal (DL_{50}) das amostras, ou seja, a concentração de amostra necessária para causar a morte de pelo menos 50% dos organismos. Os valores da DL_{50} foram estimados através do programa Trimmed Spearman-Karber Method, versão 1.5.

RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

Os testes de ecotoxicidade com *Artemia salina* foram realizados visando avaliação dos efeitos tóxicos em sistemas biológicos do reino animal, causados pela solução sintética de CIP(HCl) tratada por EC. Assim, realizaram-se várias diluições (20, 40, 60, 80 e 100%) dos efluentes brutos e tratados para se verificar a influência das diluições dos efluentes, assim como, dos tratamentos dos mesmos na mortalidade das *Artemias*. No caso da solução contendo CIP(HCl) a toxicidade com *Artemia salina* pode ser muito eficaz, pois apresenta respostas referentes aos componentes tóxicos, mas não aos íons comuns presentes, sendo mais seletiva em relação às espécies de interesse (produtos não mineralizados).

As soluções expostas ao teste foram a solução sintética e as soluções obtidas na cinética de reação do presente estudo, ou seja, soluções onde aplicou-se tratamento com as condições ótimas dos POR, em diversas faixas de tempo, visando acompanhar o desempenho da toxicidade no decorrer do tempo de EC. Como na análise cinética obteve-se que em 40 minutos de tratamento a degradação da CIP(HCl) chegou a valores superiores a 95%, preparou-se uma solução contendo 5% da solução de CIP(HCl), para identificar se esta concentração baixa mantém a toxicidade da CIP(HCl). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Na solução contendo 5% de CIP(HCl) a mortalidade foi ausente, indicando que se houver toxicidade nas soluções tratadas a partir de 40 minutos, a mesma não é proveniente da CIP(HCl), mas sim de subprodutos de degradação. Na condição toxicológica extrema, ou seja, 100% de CIP(HCl) tanto com tratamento a qualquer tempo (5-120 min) ou sem tratamento, observou-se uma elevada mortalidade de quase 100% da espécie *Artemia salina*. Além disso, foi constatado que essa elevada mortalidade tende a decrescer a medida que as soluções de CIP(HCl) residuais - obtidas com tempos de eletrólise acima de 40 min – forem diluídas. Entretanto, para tempos de eletrólise de até 30 min e em todas as diluições feitas (20-80%), percebeu-se que praticamente todos os organismos morreram ou perderam mobilidade, indicando que a solução de CIP(HCl) residual, incluindo a solução de CIP(HCl) sem tratamento, é altamente tóxica, devido a que o tratamento de EC não é eficiente em baixos tempos.

Nas amostras onde o tempo de tratamento foi maior que 40 minutos e em diluições de 20 a 80%, a população de *Artemias salinas* que não conseguiu sobreviver nessas condições foi menor que 30% do total, como mostrado na Figura 2, não indicando níveis de toxicidade de acordo à dose letal média (DL_{50}) calculada para cada caso. A quase aniquilação das populações de organismos para as condições muito tóxicas leva a uma falta de estatística na obtenção da DL_{50} no intervalo de confiança de 95%, motivo pelo qual não foi calculada. Por outro lado, nas condições menos tóxicas, os valores da DL_{50} e dos intervalos de confiança (IC) estimados para os demais bioensaios são apresentados na Tabela 2. Os valores da DL_{50} e dos IC estimados para os bioensaios foram obtidas utilizando o método Trimmed Spearman-Karber.

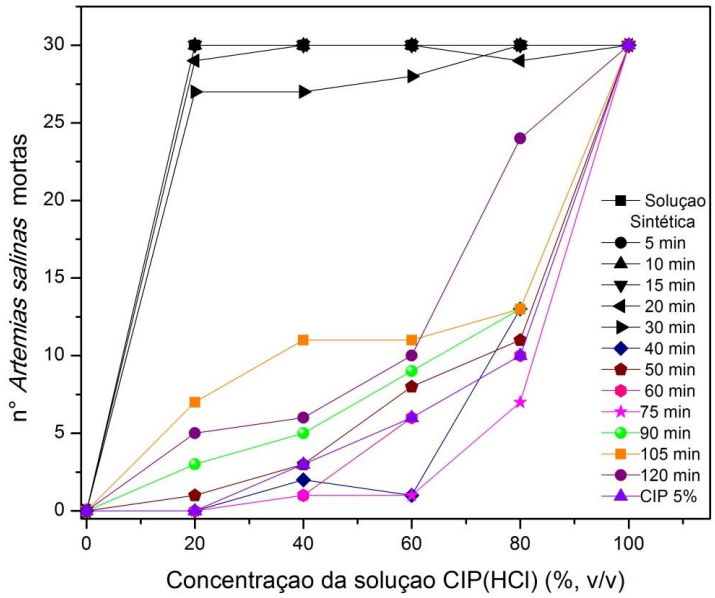

Figura 2. População de *Artemias salinas* totais mortas conforme as diluições feitas nas amostras. Fonte: Autor do trabalho.

Tabela 2. DL_{50} obtidos a partir do teste de toxicidade com *Artemia salina* utilizando 30 larvas.

Tratamento	DL50	Intervalo Confiança (95%)
EC 40	76,56	(71;82)
EC 50	71,72	(64;80)
EC 60	75,25	(69;81)
EC 75	81,79	(77;87)
EC 90	69,64	(60;80)
EC 105	63,13	(49;81)
EC 120	62,31	(52;74)

As soluções de CIP(HCl) tratadas a partir de 40 minutos de eletrólise, não apresentaram toxicidade como evidenciado pelo teste utilizando *Artemia salina*. Segundo a Organização Mundial de Saúde, são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de DL_{50} inferiores a 0,1 % em *Artemia salina* (MEYER et al., 1982). Portanto, devido ao alto nível de toxicidade presente nas soluções estoque e com tempo de tratamento inferior a 40 min, onde há formação de subprodutos de degradação tóxicos, o processo EC não é adequado para ser usado como um único tratamento de efluentes em curtos períodos de tempo. No entanto, em períodos de tempos superiores a 40 minutos de eletrólise, o processo EC providenciou simultaneamente um excelente remoção da CIP(HCl) e ausência de carga tóxica advinda de subprodutos, os quais possivelmente também foram degradados, sugerindo que este processo eletroquímico pode ser usado com eficiência no tratamento de resíduos de CIP(HCl).

CONCLUSÕES

A utilização do processo de eletrocoagulação para o tratamento de soluções contendo o antibiótico CIP(HCl) se mostrou eficiente frente a sua capacidade de degradar o composto sem apresentar toxicidade advinda da CIP(HCl) ou dos subprodutos de degradação. Desta forma, entende-se que a eletrocoagulação pode ser utilizada para o tratamento da CIP(HCl) quando aplicado tratamento em períodos superiores a 40 minutos de eletrólise, onde a solução não apresenta níveis de toxicidade aos organismos vivos. O organismo bioindicador *Artemia salina* foi bastante eficaz na análise da toxicidade da CIP(HCl) por trazer informações referentes aos componentes tóxicos, mas não aos íons comuns presentes, sendo mais seletiva em relação às espécies de interesse produtos não mineralizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Githinji, Leonardo J.M.; Musey, Michael K.; Ankumah, Ramble O. Evaluation of the fate of ciprofloxacin and amoxicillin in domestic wastewater. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 219, p. 191-201, 2011.

2. Karthikeyan, K.G.; Meyer, Michael T. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science Total Environmental*, v. 361, p. 196-207, 2006.
3. Kummerer, Klaus; Alexy, Radka; Huttig, Jana; Scholl, Alice. Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bactéria. *Water Research*, v. 38, p. 2111-2116, 2004.
4. Lindberg, Richard H.; Olofsson, Ulrika; Rendahl, Per; Johansson, Magnus I.; Tysklind, Mats; Andersson, Barbro A.V. Behavior of Fluoroquinolones and Thrimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. *Environmental Science Technology,* v. 40, p.1042-1048, 2006.
5. Macrae, W. D.; Hudson, J. B.; Towers, G. H. N. Studies on thepharmacological activity of amazonian Euphorbiaceae. Journal of Ethnopharmacology, v. 22, p. 143-72, 1988.
6. Manenti, Diego Ricieri (2013). Tratamento de efluente têxtil utilizando os processos eletrofloculação, foto-fenton e biológico integrados. Maringá, Universidade Estadual de Maringá, Tese (Doutorado).
7. Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; Mclaughlin, J.L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, v. 45, p. 35–36, 1982.
8. Nogueira, Raquel F. P.; Jardim, Wilson. F. A fotocatálise heterogênea e sua aplicação ambiental. *Química Nova*, v. 21, p. 69-72, 1998.
9. Sahpaz, Sevser; Boris, C. H.; Loieau, P. M.; Cortes, D.; Hacquemiller,R.; Laurens, A.; Cavé, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from Annonasenegalensis seeds. Planta Médica, v.60, p.538-40, 1994.
10. Vasconcelos, Tibiriça G.; Kummerer, Klaus; Henriques, Danielle M.; Martins, Ayrton F. Ciprofloxacin in hospital effluente: Degradation by ozone and photoprocesses. Journal of Hazardous Materials, v. 169, p. 1154-1158, 2009.