

EFEITO DA IRRADIAÇÃO COM FEIXE DE ELÉTRONS NA DEGRADAÇÃO E REMOÇÃO DE TOXICIDADE DA MISTURA BINÁRIA DE FÁRMACOS: CIPROFLOXACINA E FLUOXETINA

DOI: <http://dx.doi.org/10.55449/congea.14.23.IX-025>

Flavio Kiyoshi Tominaga, Daniel Lebre, Thalita Tiekso Silva, Vanessa Silva Granadeiro Garcia, Sueli Ivone Borrely (*)

* Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Tecnologia das Radiações – IPEN-CNEN/SP, São Paulo, SP, Brasil. Email: sborrely@ipen.br

RESUMO

Fármacos são compostos biologicamente ativos que têm sido frequentemente detectados em várias matrizes ambientais em baixas concentrações (ng/L a µg/L), apresentando potencial para afetar a qualidade da água e impactar em ecossistemas e na saúde pública. Dentre os diferentes ingredientes ativos, a fluoxetina (antidepressivo) e a ciprofloxacina (antibiótico) tem atraído atenção especialmente devido ao alto risco ecológico e ao desenvolvimento de resistência microbiana, respectivamente. A irradiação por feixe de elétrons tem sido apresentada como uma tecnologia alternativa e ecológica para o tratamento de misturas complexas, podendo neutralizar, quase que instantaneamente, os poluentes com risco biológico. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar a aplicação da irradiação por feixe de elétrons na degradação e redução de toxicidade de uma mistura binária de fluoxetina e ciprofloxacina. As irradiações ocorreram em um acelerador industrial de elétrons, sendo avaliadas as doses de 1,0 e 2,5 kGy. A avaliação da toxicidade dos subprodutos formados foi realizada com organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos (microcrustáceo *Daphnia similis*, alga *Raphidocelis subcapitata* e bactéria *Vibrio fischeri*). Degradação superior a 98% foram verificados em todas as doses aplicadas para ambos os compostos em mistura. Em relação aos ensaios biológicos, os resultados de toxicidade aguda com o microcrustáceo *D. similis* (48h de exposição) não demonstraram diferenças significativas após os tratamentos (de $2.07 \pm .18$ UT para 3.30 ± 0.31 UT em 1.0 kGy e 3.11 ± 0.06 UT em 2.5 kGy). Para os ensaios de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri* (15 minutos de exposição), foi demonstrado um aumento da inibição da bioluminescência em 1.0 kGy kGy (de $12,99 \pm 3,52\%$ a $41,88 \pm 6,23\%$), seguida e redução em 2,5 kGy ($30,74 \pm 7,02\%$), indicando, assim, que as bactérias foram mais sensíveis aos produtos de degradação. Em contrapartida, os ensaios de toxicidade crônica com a alga *R. subcapitata* mostraram elevada remoção de toxicidade (superior a 98%). A toxicidade reduziu de $119,55 \pm 30,01$ para $1,77 \pm 0,18$ UT (1,0 kGy) e $0,88 \pm 0,18$ (2,5 kGy). Desta forma, a irradiação por feixe de elétrons tem se apresentado como uma alternativa interessante para degradação e remoção de toxicidade de misturas de fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: Acelerador Industrial, Fármacos, Feixe de elétrons, Radiação ionizante, Toxicidade

INTRODUÇÃO

Os medicamentos possuem um papel central na medicina moderna, visto que são essenciais para promover a saúde pública e preservar a qualidade de vida. Atualmente, inúmeros ingredientes ativos são amplamente empregados na abordagem terapêutica (tratamento ou prevenção) de doenças humanas e animais (GRENNI et al., 2018). Entretanto, o constante crescimento na produção, prescrição e consumo tem resultado na contaminação de diversos ecossistemas por resíduos destes produtos. Os fármacos são substâncias biologicamente ativas, que representam o principal componente da formulação de medicamentos e são responsáveis pelo efeito terapêutico. Essas substâncias têm sido progressivamente liberadas no meio ambiente, sendo detectadas em concentrações de ng/L e µg/L, apresentando potencial para causar impactos na qualidade dos recursos hídricos, afetando ecossistemas e na saúde humana. Parte considerável destes compostos apresenta metabolização incompleta, sendo excretados parcialmente na forma inalterada, além de não serem completamente removidos pelos processos convencionais (GODOY e KUMMROW, 2017).

A recente pandemia do COVID-19 causou um impacto na saúde mental da população, levando a um elevado aumento do número de transtornos psicológicos como o estresse pós-traumático, insônia e ansiedade entre os profissionais de saúde e a população em geral, e em diferentes países (HOLMES et al., 2020), conseqüentemente, levando a um aumento do consumo de medicamentos como ansiolíticos, antidepressivos, dentre outros. A fluoxetina é um medicamento amplamente prescrito e vendido no Brasil (FULONE et al., 2015). Este composto tem atraído atenção devido aos elevados riscos que possui para a biota aquática (DE SOUZA et al., 2021).

Atualmente, a resistência antimicrobiana também é considerada como uma ameaça significativa para os sistemas de saúde pública globais, visto que a infecção por organismos resistentes pode levar a doenças graves, internações

hospitalares prolongadas, aumentando os custos de saúde e em medicamentos de segunda linhas, além de falhas no tratamento (DADGOSTAR, 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a resistência microbiana aos antibióticos como um problema global com impacto na saúde global, meios de subsistências e desenvolvimento sustentável devido ao crescente número de doenças infecciosas que estão ficando cada vez mais difíceis de tratar devido à redução da eficácia destes medicamentos (WHO, 2021). A ciprofloxacina é um representante importante das quinolonas, sendo amplamente consumida na medicina humana e veterinária para o tratamento contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (KELLY e BROOKS, 2018). Diante desse panorama, é imprescindível considerar os antibióticos dentre os poluentes emergentes.

Uma das diversas ações essenciais para a gestão adequada para os diferentes tipos de contaminantes, envolve a adequação e desenvolvimento de tecnologias de tratamento de efluentes. A irradiação com feixe de elétrons é uma tecnologia alternativa e sustentável que se baseia na transformação química de poluentes, induzido por meio da radiação ionizante. Esta tecnologia tem sido desenvolvida e pode ser promissora para o tratamento de misturas contendo diversos micropoluentes (TOMINAGA et al., 2023), sendo também aplicada à efluentes complexos (CHANGOTRA et al., 2019), com importante eficiência na degradação e detoxificação. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo propor a radiação ionizante com feixe de elétrons como uma tecnologia alternativa para o tratamento da mistura binárias do antidepressivo fluoxetina e do antibiótico ciprofloxacino, avaliando a eficiência de degradação e remoção de toxicidade.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o emprego da irradiação por feixe de elétrons como uma tecnologia alternativa para degradação e redução de toxicidade de uma mistura binária contendo o antidepressivo cloridrato de fluoxetina e o antibiótico ciprofloxacino utilizando os organismos aquáticos de níveis tróficos distintos: *Vibrio fischeri* (bactéria), *Daphnia similis* (cladocera) e *Raphidocelis. subcapitata* (algae).

METODOLOGIA

Fármacos

Ciprofloxacino [$C_{17}H_{18}FN_3O_3$, MM = 331,34 g/mol; 1-ciclopropil- ácido 6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-ilquinolina-3-carboxílico; CAS 85721-33-1] foi adquirido da Sigma aldrich (>98%). Cloridrato de fluoxetina [$C_{17}H_{18}F_3NO.HCl$; MM = 309,33 g/mol; metil[(3S)-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propil]amina]; CAS 54910-89-3] foi obtido da Divis Pharmaceuticals Pvt. Ltd. (98,8 %). Os fármacos foram diluídos com água ultrapura (Millipore Milli-Q) na concentração de 5 ppm para cada composto.

Irradiação com feixe de elétrons

A irradiação das misturas de fármacos ocorreu em um acelerador industrial de elétrons (modelo Dynamitron[®]) localizado no Centro de Tecnologia das Radiações (CETER/IPEN). Durante os experimentos, a energia do acelerador foi fixada em 1,4 MeV e a potência em 37,5kW, variando apenas a corrente.

As amostras foram acondicionadas em recipiente de vidro de borossilicato, com volume de 246 mL, visando garantir a espessura de 4,0 mm de espessura para atingir a máxima penetrabilidade do feixe. Durante a irradiação, os recipientes contendo as amostras foram posicionados em esteira automática com velocidade fixada em 6,72 m/min. Os recipientes passaram duas vezes pelo feixe de elétrons, recebendo metade da dose em cada passagem. Visando reduzir o custo operacional, foram avaliadas as doses de 1,0 e 2,5 kGy.

Métodos analíticos

A quantificação dos fármacos nas amostras brutas e irradiadas ocorreu por meio da cromatografia líquida. O equipamento utilizado foi um HPLC da Agilent modelo 1290 acoplado a Sciex QTrap modelo 3200. A coluna empregada foi uma Restek Ultra Aqueous (150 × 2,1 mm × 3,0 μm). As condições de separação foram: fase móvel (A) H₂O + 0,1% de ácido fórmico, (B) acetonitrila + ácido fórmico a 0,1%. O volume de injeção da amostra de 5,0 μL.

Ensaio ecotoxicológicos

Os ensaios toxicidade aguda e crônica para a avaliação da redução de toxicidade foram desenvolvidos com organismos aquáticos pertencentes a níveis tróficos distintos. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ensaio Biológicos e Ambientais (LEBA) do Centro de Tecnologia das Radiações (CETER/IPEN).

Os ensaios de toxicidade foram realizados de acordo com os protocolos descritos na literatura. Os ensaios de toxicidade aguda com a bactéria *Vibrio fischeri* foi realizado conforme a ABNT NBR 15411-2:2021. Os ensaios consistiram na exposição da bactéria por 15 minutos a uma amostra, verificando a inibição da emissão da bioluminescência. As bactérias empregadas nos experimentos foram adquiridas na forma liofilizada (Biolum[®]). O equipamento empregado foi o analisador de fotoluminescência Microbics[®] (M500 Toxicity Analyzer). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição (%) foi calculada através da equação 1 conforme descrito na ISO 11348-3:

$$\text{INH}\% = 100 - 100 \times (\text{IT}_{15} \times \text{IC}_0) / (\text{IT}_0 \times \text{IC}_{15}) \quad \text{equação (1)}$$

onde:

IC₀ - leituras iniciais das intensidades de bioluminescência do controle,

IT₀ - leituras iniciais das intensidades de bioluminescência das amostras,

IC₁₅ - leituras das intensidades de bioluminescência do controle após 15 minutos de exposição

IT₁₅ - leituras das intensidades de bioluminescência das amostras após 15 minutos de exposição

Os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* foram conduzidos conforme a ABNT NBR 12713:2022. Vinte neonatas (jovens com 6–24 h) foram expostas a uma série de diluições das amostras durante 48 h à 20°C ± 2, sem alimentação e sem fotoperíodo. Ao final dos ensaios, o efeito observado foi a imobilidade dos organismos. Os resultados foram expressos em CE50%, calculado por meio da análise de dados brutos da imobilidade da dafnia (%) em função das concentrações, obtidos pelo método Trimmed Spearman-Kärber com auxílio de programa computacional.

Os ensaios de toxicidade crônica com a alga *Raphidocelis subcapitata* foi realizado conforme Berrebaan et al., (2017) adaptado para microplacas de 24 poços. Em cada poço foi adicionado 2 mL de solução de teste e 25 µL do inóculo de algas. Após 96h, foi realizada a leitura das absorvâncias em 450 nm. A partir dos resultados obtidos foi calculada a concentração inibitória mediana (IC50) pelo modelo Hill.

Os resultados de toxicidade para *D. similis* e *R. subcapitata* foram expressos em unidades de toxicidade (TU = 100/E(IC50)). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a significância das diferenças entre os valores dos tratamentos dos controles e os valores experimentais. Quando a ANOVA revelou diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05), um teste post hoc de Tukey foi realizado.

RESULTADOS

A irradiação por feixe de elétrons foi eficiente para a remoção de ambos os fármacos com baixas doses (1,0 kGy), conforme apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Eficiência de degradação da fluoxetina e da ciprofloxacina em misturas binárias após tratamento com irradiação por feixe de elétrons. Fonte: Autor do Trabalho

Fármacos	Eficiência de degradação (%)	
	1,0 kGy	2,5 kGy
Fluoxetina	98,40	99,47
Ciprofloxacino	98,83	99,72

Em relação aos ensaios de toxicidade aguda para a mistura de fármacos não tratada, foi observado que a bactéria *V. fischeri* apresentou a menor sensibilidade, tendo em vista que não foi possível estimar a CE50% devido ao baixo efeito inibitório causado pela amostra (13%), conforme tabela 2. Para *D. similis* foi possível estimar um CE50% de 35,36 ± 1,80. Os ensaios de toxicidade crônica demonstraram elevada toxicidade para a alga *R. subcapitata*, sendo estimado um IC50% de 0,86 ± 0,22.

Com relação ao tratamento por feixe de elétrons, foi observado a formação de subprodutos mais tóxicos apenas para bactéria *V. fischeri* (tabela 2). Foi demonstrado um aumento na inibição da bioluminescência em 1,0 kGy (de 12,99 ± 3,52% para 41,88 ± 6,23%), seguido de uma redução de toxicidade (inibição de 30,74 ± 7,02%) em 2,5 kGy. Em relação a *D. similis*, não foi observado aumento significativa da toxicidade aguda após as irradiações (p > 0,05). Em contrapartida, os ensaios crônicos com *R. subcapitata* mostraram remoção significativa de toxicidade após o tratamento (p < 0,05). Eficiência de remoção de 98,5 % e 99,3% foram observados em 1,0 e 2,5 kGy, respectivamente.

Tabela 2. Toxicidade das misturas de fármacos brutas e tratadas com feixe de elétrons para diferentes organismos. Fonte: Autor do Trabalho



Doses (kGy)	Organismos		
	<i>Vibrio fischeri</i> (Inibição, %)	<i>Daphnia similis</i> (TU)	<i>Raphidocelis subcapitata</i> (TU)
0.0	12,99 ± 3,52%	2,83 ± 0,14	119,55 ± 30,01
1.0	41,88 ± 6,23%	3,30 ± 0,31	1,77 ± 0,18
2.5	30,74 ± 7,02%	3,11 ± 0,06	0,88 ± 0,18

CONCLUSÕES

O aumento da complexidade das amostras ambientais tem impulsionado o desenvolvimento de tecnologias alternativas para o tratamento de poluentes persistentes. A irradiação por feixe de elétrons se demonstrou eficiente para a degradação de misturas de fármacos mesmo em baixas doses, reduzindo, assim, o custo operacional.

Os resultados de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos pertencente a classes distintas, indicaram que a toxicidade tanto da mistura, quanto a eficiência de remoção de toxicidade, variaram de acordo com a espécie exposta. Por meio dos resultados obtidos, é possível obter informações importantes para uma adequação dos tratamentos, permitindo uma melhor gestão para o descarte de efluentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grenni, P.; Ancona, V.; Caracciolo, A. B. **Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review.** *Microchemical Journal*, v. 136, p. 25-39, 2018.
2. Godoy, A. A.; Kummrow, F. **What do we know about the ecotoxicology of pharmaceutical and personal care product mixtures?** *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 47, n. 16, p. 1453-1496, 2017.
3. Holmes, E.A.; O'connor, R.C.; Perry, V.H.; Tracey, I.; Wessely, S.; Arseneault, L.; Ballard, C.; Christensen, H.; Cohen Silver, R.; Everall, I.; Ford, T.; John, A.; Kabir, T.; King, K.; Madan, I.; Michie, S.; Przybylski, A. K.; Shafran, R.; Sweeney, A.; Worthman, C.M.; Yardley, L.; Cowan, K.; Cope, C.; Hotopf, M.; Bullmore, E. **Multidisciplinary research priorities for the COVID-19 pandemic: a call for action for mental health science.** *The Lancet Psychiatry*, v. 7, n. 6, p. 547-560, 2020.
4. Fulone, I.; Barberato-Filho, S.; Dos Santos, M. F.; De Lima Rossi, C.; Guyatt, G.; Lopes, L. C. **Essential psychiatric medicines: wrong selection, high consumption and social problems.** *BMC public health*, v. 16, n. 1, p. 52, 2015.
5. De Souza, R. C.; Godoy, A. A.; Kummrow, F.; Dos Santos, T. L.; Brandão, C. J.; Pinto, E. **Occurrence of caffeine, fluoxetine, bezafibrate and levothyroxine in surface freshwater of São Paulo State (Brazil) and risk assessment for aquatic life protection.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 16, p. 20751-20761, 2021.
6. Dadgostar, P. **Antimicrobial resistance: implications and costs.** *Infection and drug resistance*, v. 12, p. 3903, 2019.
7. Organização Mundial da Saúde (WHO). **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2021.** 2021. Disponível em <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240027336>. Acesso: 14 de setembro de 2023.
8. Kelly, K. R.; Brooks, B. W. **Global Aquatic Hazard Assessment of Ciprofloxacin: Exceedances of Antibiotic Resistance Development and Ecotoxicological Thresholds.** *Progress in molecular biology and translational science*, v. 159, p. 59-77, 2018.
9. Tominaga, F. K.; Boiani, N. F.; Silva, T. T., dos Santos, J. G., Lebre, D. T., Leo, P., & Borrelly, S. I. **Electron beam irradiation applied for the detoxification and degradation of single ciprofloxacin aqueous solution and multiclass pharmaceutical quaternary mixture.** *Separation and Purification Technology*, v. 307, p. 122818, 2023.
10. Changotra, R.; Rajput, H.; Guin, J. P.; Varshney, L.; Dhir, A. **Hybrid coagulation, gamma irradiation and biological treatment of real pharmaceutical wastewater.** *Chemical Engineering Journal*, v. 370, p. 595-605, 2019.
11. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri*.** Rio de Janeiro, ABNT NBR 1541, 2021.
12. International Organization for Standardization. **Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria.** ISO 11348-3, 2007.
13. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade Aguda- Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera).** Rio de Janeiro, ABNT NBR 12713, 2022.

14. Berrebaan I, Montassir L, Said B, Mustapha E, Bessi H. **Evaluation of ecotoxicity of ibuprofen and paracetamol on the freshwater green microalgae “*Pseudokirchneriella subcapitata*”**. Engineering And Technology Journal, v. 2, p. 303-309, 2017.