



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 0921

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido
para o Edital 04/2022

Título do projeto: Análise fitotoxicológicas de contaminação de ambientes aquáticos por antibióticos Quinolonas utilizando semente de *Sinapis alba* (mostarda-branca) como bioindicador

Área do conhecimento do projeto: Química Ambiental

Sumário

1 Resumo	1
2 Introdução e Justificativa	2
3 Objetivos	4
4 Metodologia	5
6 Viabilidade	6
5 Cronograma de atividades	6
Referências	Erro! Indicador não defi

1 Resumo

As novas dimensões científicas para a preservação ambiental colocaram em pauta uma nova classe de contaminantes classificados como Poluentes de Interesse Emergente (PIEs) que trouxeram questões de como alguns produtos utilizados no cotidiano possuem uma capacidade contaminadora quando em contato com o meio ambiente. Dentre esses contaminantes destacam-se os antibióticos utilizados no campo medicinal e veterinário. Devido ao aumento do consumo de antibiótico, ocorre, por consequência, o aumento na eliminação desses compostos pelo organismo, na qual após isso dirige-se a três possíveis locais: primeiro em redes de esgotos e Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), seguido pelo despejo em ambientes aquáticos e, por fim, Estações de Tratamento de Água (ETAs). Sendo assim a proposta de pesquisa descrita no presente projeto tem como base o estudo das dinâmicas que os antibióticos realizam em ambientes aquáticos, a partir da criação de sistemas experimentais controlados. Desse modo, este projeto de Iniciação Científica tem como objetivo a avaliação da fitotoxicidade dos antibióticos quinolonas empregando como bioindicador a germinação de sementes de *Sinapis alba* (mostarda-branca). A pesquisa baseia-se no ramo da ecotoxicologia, ciência responsável pelo estudo do nível de toxicidade que os contaminantes apresentam para certos organismos, sendo a fitotoxicologia o âmbito responsável pelas análises em plantas. Ensaio fitotoxicológicos utilizando sementes de *S. alba* tornaram-se relevantes cientificamente por fornecerem classificações quanto ao nível de toxicidade com rápida execução, baixo custo, independência de aparelhos sofisticados e com facilidade de obtenção de sementes em comércio local.

Palavras-chave do projeto: Antibióticos; Ecossistemas Aquáticos; Ecotoxicologia; Estações de Tratamento de Esgoto; Índice de germinação.

2 Introdução e Justificativa

A introdução da ciência moderna possibilitou a abertura de uma nova fronteira para a produção de conhecimento que contribui para o desenvolvimento social. Nesse contexto, uma forma visível de demonstrar como esse tipo de conhecimento trouxe consigo benefícios à sociedade pode ser descrita na forma de manipulação de compostos químicos para a produção de substâncias, cujo objetivo seja o combate de patologias, no intuito de aumentar a qualidade e expectativa de vida da população mundial (PEREIRA; VEIGA; DZIEDZIC, 2013). Por outro lado, o advento dessas substâncias também possibilitou a construção de um novo tipo de olhar, principalmente acerca de como elas têm a capacidade de impactar o meio ambiente (SILVA, 2022).

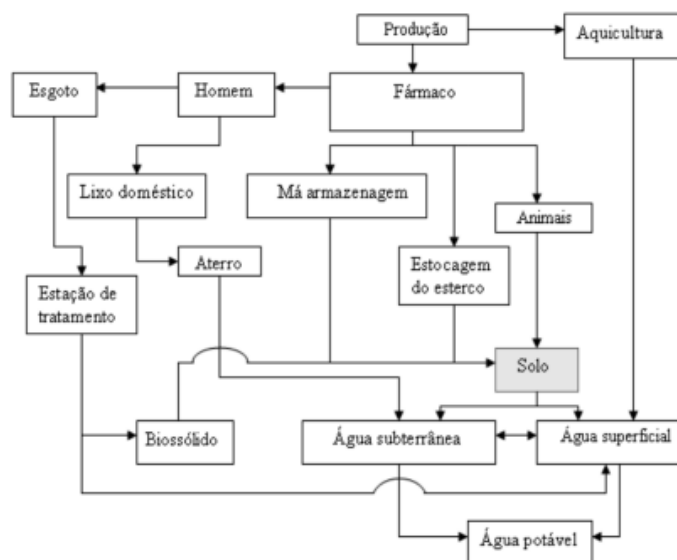
Sabe-se que, atualmente, elevadas quantidades dessas substâncias são descartadas de forma incorreta, ou até de forma indireta, como a excreção pela urina e fezes. Além disso, em ambientes urbanizados, a ocupação do solo influencia diretamente na qualidade da água por meio dos resíduos e rejeitos gerados nesses ambientes que, quando mal gerenciados, chegam até os corpos d'água sem tratamento prévio (SNSA, 2016), agregando níveis de princípios ativos de medicamentos, cosméticos, fertilizantes e agrotóxicos, entre outros. Conceitualmente, esses compostos são denominados Poluentes de Interesse Emergente (PIE), isto é, substâncias químicas liberadas ao meio ambiente em decorrência do estilo de vida da sociedade mundial (descarte inadequado, excreção pelo organismo animal, e outros eventos), mas que não constam como indicadores em programas de monitoramento ou tem poucas informações sobre efeitos adversos ao ambiente (FARTO, 2021). Nesse cenário, surge o questionamento: como identificar, compreender e tratar desses PIE e os possíveis impactos ambientais que apresentam? Assim, essa proposta de pesquisa tem como foco o estudo dos PIE, sobretudo sob a análise da incidência de antibióticos Quinolonas no meio ambiente, assim como sua dinâmica em ecossistemas aquáticos, após sua eliminação pelo organismo, tanto o humano quanto pelas suas aplicações na medicina veterinária, atribuindo-se de interpretações que permitam entender como o fator ecotoxicológico desses poluentes tem a capacidade de impactar a vida, seja vegetal ou animal, nesses ambientes (BOLLINGER et al., 2021).

Inicialmente, ao tratar-se de antibióticos, deve-se primeiro compreender um pouco de suas propriedades. Esses medicamentos são produzidos com a intenção de combater doenças causadas por agentes biológicos, como as bactérias, com elevada propensão de alterar o equilíbrio interno do organismo, além de terem uma degradação lenta ou não ter degradação, na intenção de preservar suas características químicas (SILVA, 2022), então mesmo com sua ingestão e as reações com o metabolismo animal, é possível que ele ainda esteja em sua forma natural e, quando lançados ao meio ambiente, interagem com os componentes do meio por ainda terem capacidades bioativas (REGITANO, 2010). As Quinolonas são compostas por antibióticos sintéticos importantes, efetivos e amplamente utilizados em humanos, na pecuária e na aquicultura (BOLLINGER et al., 2021). Dentre as principais vantagens dessa classe estão o largo espectro antimicrobiano, boa absorção oral e o seu baixo custo, indicadas no tratamento clínico de trato genito-urinário, trato gastrointestinal, trato respiratório e osteomielite, fatores determinantes que resultam a cada ano no aumento de seu consumo para o tratamento de diversas doenças (WANG et al., 2021). Atualmente é uma das classes de antibióticos mais utilizadas mundialmente para o tratamento de infecções bacterianas.

Com isso, esses compostos podem afetar diretamente organismos não marcados, isto é, aqueles que não se tinha a intenção de impactar, como a própria vida nesses ambientes, além de causar consequências em longa duração nesses ecossistemas, uma vez que a baixa degradação faz com que a taxa de entrada nesse novo ambiente seja maior que a taxa de saída, recebendo assim nomenclatura de substâncias persistentes ou pseudo-persistentes. Um outro ponto, segundo estimativas feitas por Polianciuc (2020), o consumo de antibióticos Quinolonas no território brasileira tem a propensão de quase dobrar até 2030, o que aumentará a liberação desses poluentes emergentes em ambientes aquáticos.

Pensando sobre a excreção pelo organismo humano, este processo não metaboliza toda a quantidade de antibiótico ingerida, fazendo com que uma porcentagem dessas substâncias, algo entre 40% e 90% (POLIANCIUC, 2020), de modo que sejam excretadas em sua forma original, na qual eles vão parar em redes de esgotos e, conseqüentemente, em Estações de Tratamento de Esgoto, isso quando não são despejados em ambientes aquáticos diretamente. O primeiro passo, portanto, para lidar com esse tipo de contaminantes é em ETEs, de forma que uma vez não tratado, ou quando tratado ainda existir uma deficiência para a remoção dessas dessas substâncias. A dinâmica que essas substâncias podem realizar no meio aquático é diversa, mas, na maioria dos casos, apresentam-se como um fator negativo que pode impactar e gerar consequências à biota. A Figura 1 apresenta uma adaptação das possíveis rotas dos fármacos no meio ambiente:

Figura 1. Possíveis Rotas dos Antibióticos no Meio Ambiente.



Fonte: adaptado de Pereira et al. (2012).

Entretanto, a liberação de antibióticos da classe das Quinolonas acontece em baixas concentrações, em torno de ng/L e µg/L, o que faz com que haja deficiência em sua detecção por técnicas analíticas (REGITANO, 2010). A preocupação com os efeitos, ainda pouco detalhados, que a introdução desse poluente no meio ambiente, seja por lixiviação, descarte inadequado, contaminação de esgoto doméstico ou até mesmo por meio dos excrementos animais, pode gerar, está para além da aceleração da resistência microbiana, isso porque, se pouco se sabe sobre as rotas

dos fármacos nesse meio, menos se conhece quais os organismos que podem ser afetados e em quais graus. Ainda de acordo com Bila e Dezotti (2002), os efeitos do antibiótico Quinolona adicionado a um sistema terrestre com 3 espécies de plantas, o crescimento e a bioacumulação do fármaco nas plantas evidenciaram seu potencial poluente, observando ainda, alteração na comunidade bacteriana e inibição do mecanismo natural de descontaminação que possuíam.

Sendo a fitotoxicologia a área preocupada com o estudo de efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais ou sintéticos, sobre os constituintes vegetais dos ecossistemas, a aplicação de ensaios fitotóxicológicos é, por tanto, um método sensível, simples, rápido e de baixo custo, capaz de analisar o potencial tóxico dessas substâncias no meio ambiente, por meio de ensaios utilizando sementes, onde se avalia seu processo de germinação e desenvolvimento das raízes (MUNZUROGLU; GECKIL, 2002). Os ensaios fitotóxicológicos se baseiam, portanto, nos índices de crescimento radicular e germinação, obtidos a partir do teste de germinação, o qual é padronizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento desde 1967, com o uso do “RAS” – Regras para Análise de Sementes, onde são estabelecidos critérios para serem adotados nos fatores externos, como temperatura, e exposição ou ausência de luz, permitindo sua reprodutibilidade (BRASIL, 2009).

Isso porque em condições favoráveis, essas sementes tornam-se altamente sensíveis ao estresse ambiental, tendo seu metabolismo e fisiologia ativados. Assim, os bioensaios de fitotoxicidade com sementes, como a *Sinapis alba* tem sido utilizado como um dos mais simples métodos para estudar os efeitos da presença dessas substâncias no meio ambiente (KOHATSU et al., 2018). Portanto, reconhecer a fitotoxicidade dos antibióticos mais consumidos e manipulados no mundo todo, como as Quinolonas na germinação de sementes proporcionará, não só maior compreensão sobre a dinâmica desses poluentes no meio ambiente, mas também a projeção de possíveis problemas que poderão afetar todos os setores da nossa sociedade, considerando a necessidade de reavaliarmos a relação que temos com os recursos que utilizamos. Portanto, a partir dos referenciais teóricos, assim como o estudo laboratorial que serão realizados na UFABC, este projeto busca compreender a dinâmica de um PIE da classe das Quinolonas, cuja a utilização encontra-se dentro dos parâmetros da medicina para uma melhor qualidade de vida e combate de patologias envolvendo bactérias nocivas ao organismo humano.

3 Objetivos

Verificar a possível relação tóxica entre a ocorrência de antibióticos Quinolonas no meio ambiente com a germinação e crescimento de constituintes vegetais, através de bioensaios de fitotoxicidade.

- a) Compreender e definir os efeitos contaminantes causados pela dinâmica de antibióticos Quinolonas presentes em ambientes aquáticos;
- b) Avaliar a possível interferência dos antibióticos Quinolonas nas sementes, por meio do nível de germinação, de crescimento das raízes e em aspectos morfológicos;
- c) Investigar a significância dos resultados encontrados.

4 Metodologia

O processo metodológico deste projeto visa estudar as relações existentes entre a água contaminada proveniente de redes de esgotos sem tratamento, ou que passaram por Estações de Tratamento de Esgoto, mas não foram suficientes para a remoção completa dos contaminante, com uma classe específica de poluente de interesse emergente: os antibióticos.

A priori, todas as relações criadas por este estudo irão estipular meios que, através de estudos de toxicologia e ecotoxicologia, permitam a interpretação dos efeitos causadores por essa espécie química, o qual detém altas capacidades de contaminação ambiental, tais como a alteração metabólica de crescimento e de maturação de organismos vegetais, quando em contato com a água contaminada provenientes dos locais citados anteriormente. Inicialmente, a metodologia compreende-se, de forma geral, da criação de dois sistemas que serão usados para análise: o primeiro será feito expondo uma quantidade determinada de sementes de *Sinapis alba* à água contaminada em níveis próximos encontrados em redes de esgotos não tratados, e um outros sistema que levará em conta o crescimento natural desses organismos, livre da presença de antibióticos. De forma geral, ambos serão usados para a interpretação dos efeitos na germinação de sementes através da exposição ou não de antibióticos presentes na água.

Nesse sentido, estipulando os parâmetros a serem realizados ao longo da pesquisa, têm-se:

- a) Revisão Bibliográfica;
- b) Estudo sobre o processo de tratamento de água em Estações de Tratamento de Esgoto;
 - i) uso de métodos analíticos para medir testes toxicológicos e ecotoxicológicos para avaliar a concentração de antibióticos na água contaminada, para avaliar as propriedades físico-químicas (cálculo de concentração, equilíbrio-químico, coeficiente de solubilidade) que eles vão apresentar em um dado meio reacional;
- c) Criação de um ambiente controlado, o qual leve em consideração o item anterior e que simule a emergência de água contaminada por antibióticos em ambientes aquáticos, com o desenvolvimento de ensaios ecotoxicológicos;
 - i) esses ensaios serão desenvolvidos a partir de soluções contendo amostras de antibióticos Quinolonas nos dados índices de concentração;
- d) Relação dos dados obtidos com as possíveis interferências causadas pela exposição da água contaminada por antibiótico nos seres vegetais, tais como: possíveis mudanças na coloração do vegetal, perda acelerada de folhas;
- e) Após quantificar as sementes germinadas e comprimento da raiz, será desenvolvida a porcentagem de germinação absoluta (%GA) através da Equação (1), e a porcentagem do crescimento relativo das radículas (%CRR), pela Equação (2), conforme descrito por Peduto, Jesus e Kohatsu (2019)

(1)

$$\%GA = 100 \times \frac{\text{Média aritmética das sementes germinadas no controle}}{\text{Média aritmética das sementes germinadas no controle neutro}} \quad (1)$$

$$\%CRR = 100 \times \frac{\text{Média aritmética do comprimento das radículas no controle}}{\text{Média aritmética do comprimento das radículas no controle neutro}} \quad (2)$$

A partir desses dois resultados, será construído o Índice de Germinação, de acordo com a Equação (4), que, juntamente ao Crescimento Relativo da Radícula (CRR), presente na Equação (3), permitirá que seja mensurado o grau de toxicidade que apresentado pelos fármacos sobre as sementes utilizadas.

$$CRR = \frac{\%CRR}{100} \quad (3)$$

$$IG = \frac{\%GA \times \%CRR}{100} \quad (4)$$

A compreensão dos resultados obtidos a partir dos cálculos, tanto de CRR, quanto de IG, será desenvolvida a partir da comparação com as Tabelas (1) e (2).

Tabela 1. Efeitos a partir do Crescimento Relativo da Radícula (CRR).

FAIXA DE CRESCIMENTO RELATIVO DA RADÍCULA (CRR)	EFEITO
$0 < CRR < 0,8$	Inibição no crescimento da raiz
$0,8 \leq CRR \leq 1,2$	Nenhum efeito significativo
$CRR > 1,2$	Estímulo do crescimento da raiz

Fonte: Lumbaque *et al.*, 2016.

Tabela 2. Classificação a partir do Índice de Germinação (IG).

ÍNDICE DE GERMINAÇÃO (IG)	CLASSIFICAÇÃO
<30	Muito fitotóxico
30 - 60	Fitotóxico
60 - 80	Moderadamente fitotóxico
80 - 100	Não fitotóxico
> 100	Potencializa a germinação

Fonte: Belo, 2011.

- f) Sistematização e Análise dos dados obtidos.
- i) Relacionar as diferenças entre o sistema exposto à contaminação de antibióticos com aquele que não foi exposto, avaliando e considerando a os resultados de ecotoxicidade;
 - ii) Avaliar os efeitos produzidos através de métodos estatísticos, levando em conta quais foram os níveis de mudanças causadas nos seres vegetais contaminados em suas estruturas morfológicas, com a germinação natural das sementes que não contaminadas com a solução produzida;

5 Cronograma de atividades

Atividades a serem realizadas dentro do intervalo de 01/09/2022 a 31/08/2023.

1. Encontros com a Orientadora
2. Revisão Bibliográfica
3. Estudo teórico sobre o funcionamento de Estação de Tratamento de Esgoto
 - a. processos físicos-químicos de separação de mistura
 - b. procedimentos analíticos para a medição de concentração de antibióticos na água proveniente de rede de esgotos
4. Desenvolvimento dos sistema para análise
 - a. preparo de soluções que simulem a água contaminada de redes de esgotos, contento
 - b. separação de dois sistemas contendo quantidade de plantas de uma mesma espécie (toma
 - c. exposição de antibióticos (solução criada) em um dos sistema
5. Coleta de dados
 - a. análise e interpretação dos dados obtidos nos dois sistemas
 - b. categorização estática dos dados com os referencias teóricos
6. Escrita Parcial do Projeto
 - a. Relatório Parcial
7. Escrita da Versão Final do Projeto
 - a. Relatório Final
 - b. Publicação dos Resultados

Tabela 1 - Cronograma da execução das atividades do Projeto de Pesquisa

Etapa	Mês											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X							
3.a.	X	X	X									
3.b.	X	X	X									
4.a.			X	X	X							
4.b.			X	X	X							
4.c.			X	X	X							
5.a						X	X	X	X			
5.b						X	X	X	X			
6.a.								X	X			
7.a									X	X	X	X
7.b.									X	X	X	X

Referências

BELO, S.R.S. Avaliação de Fitotoxicidade Através de *Lepidium sativum* no Âmbito de Processos de Compostagem. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) - Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2011.

BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BISOGNIN, Ramiro Pereira; WOLFF, Delmira Beatriz. **Revisão sobre fármacos no ambiente**. 2017.

BOLLINGER, E. et al. Antibiotics as a silent driver of climate change? A case study investigating methane production in freshwater sediments. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, [s. l], v. 228, n. 11, p. 1-10, 25 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes (RAS). Brasília: MAPA/Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. 399 p.

FARTO, C. D., Athayde Júnior, G. B., Sena, R. F., & Rosenhaim, R. **Contaminantes de preocupação emergente no Brasil na década 2010-2019 – Parte I: ocorrência em diversos ambientes aquáticos**. *Revista de Gestão de Água da América Latina*, 18, e6. 2021.

KOHATSU, MARCIO YUKIHIRO ; PEIXOTO, DAMÁRIS CRISTINA ; HUNTER, COLIN ; POCCIA, GEOVANA TOGNELLA ; JESUS, TATIANE ARAÚJO . Fitotoxicidade de água superficial da Região Metropolitana de São Paulo utilizando bioensaio com Sinapis alba. Acta Brasiliensis, v. 2, p. 58-62, 2018.

LUMBAQUE, E.C.; GOMES, F.M.; CARVALHO, V.S.; FREITAS, A.M.; TIBURTIUS, E.R.L. Degradation and ecotoxicity of dye Reactive Black 5 after reductive-oxidative process. Environmental Science and Pollution Research, v. 24, p. 6126-34, 2016.

MAHMOOD, Ansam R. *Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, Iraq. Department of Biology, College of Science for Women, University of Baghdad, Baghdad. 2019.*

MUNZUROGLU, O.; GECKIL, H. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in Triticum aestivum and Cucumis sativus. Arch. Environ. Contam. Toxicol., v. 43, p.203-213, 2002.

PEREIRA, Paulo Sérgio; VEIGA, Bruno Victor; DZIEDZIC, Maurício. Avaliação da Influência do Fósforo e do Nitrogênio no Processo de Eutrofização de Grandes Reservatórios: Estudo de Caso: Usina Hidrelétrica Foz do Areia. Revista Brasileira de Recursos Hídricos, Paraná, v. 18, n. 1, p.43-52, mar. 2013.

PEREIRA, Leandro Alves et al. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. Química Nova, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 159-169, 2012.

POLIANCIUC, Svetlana Iuliana; GURZAU, Anca Elena. *Antibiotics in the environment: causes and consequences.* 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7418837/#:~:text=Once%20in%20the%20environment%2C%20antibiotic,causes%20the%20development%20and%20For>. Acesso em: 20 jun 2022.

SECRETARIA Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: diagnóstico do manejo de resíduos sólidos urbanos, 2014. Brasília: MCIDADES. SNSA, 2016, 154 p. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnostico-residuos-solidos>. Acesso em: 16 jun. 2022.

SHIGEI, Makoto; ASSAYED, Almoayied. *Pharmaceutical and Antibiotic Pollutant Levels in Wastewater and the Waters of the Zarqa River, Jordan. Department of Earth Sciences, Uppsala University. 2021.*

SILVA, Valdemir Fonseca. **Contaminação de efluentes por amoxicilina: consequências ambientais e métodos de remoção.** Universidade Federal de Santa Maria. 2022

SOUZA, Cássia Cabral. **Ensaio toxicológicos aplicados à análise de águas contaminadas por fármacos.** 2020.

WANG, Han et al. Determination of quinolones in environmental water and fish by magnetic metal organic frameworks based magnetic solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal Of Chromatography A, [S.L.], v. 1651, p. 462286, ago. 2021.