

Centro Universitário UNA

Ana Clara Muniz Pimenta

Mariana Fernanda Babeto Gonçalves

Sarah Rezende Martins

Implementação do ensaio de ecotoxicidade com
***Artemia salina* (Linnaeus, 1758)**

Belo Horizonte

2021

Centro Universitário UNA

Ana Clara Muniz Pimenta

Mariana Fernanda Babeto Gonçalves

Sarah Rezende Martins

**Implementação do ensaio de ecotoxicidade com *Artemia salina*
(Linnaeus, 1758)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à
Atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso” do
Curso de Ciências Biológicas, como Requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Dr. Marcos Paulo Gomes Mol

Orientador

Ms. Paula Ladeira Ortolani

Ms. Paula von Randow Cardoso

Co-orientadoras

Belo Horizonte

2021

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), no período de julho a novembro de 2021. O projeto é financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

O ambiente aquático, por possuir alta diversidade e complexidade, pode ser afetado de forma significativa pela presença de medicamentos, e, por meio de estudos de ecotoxicidade é possível avaliar os efeitos tóxicos de agentes químicos e físicos em comunidades aquáticas. Dentre os organismos-teste mais utilizados e confiáveis para estudos de ecotoxicologia, destaca-se a espécie de microcrustáceo *Artemia salina*, de água salgada. O presente estudo visou implementar o teste de ecotoxicidade utilizando a *A. salina*, e procedimentar o método para futuros estudos de avaliação de impactos de medicamentos e suas classes no meio ambiente. Foram realizados experimentos no laboratório do Serviço de Ecotoxicologia/ DCI/ FUNED, com o medicamento antirretroviral, tenofovir, utilizado no tratamento de Hepatite B crônica e HIV. Os bioensaios foram adaptados para as condições do laboratório de acordo com a Norma ABNT 16530-2016. Esse teste consistiu na exposição de náuplios em fase II e III a várias concentrações da amostra durante um período de 24h para se observar o efeito de imobilidade nos organismos-teste. Por meio dos ensaios realizados no presente estudo, foi possível estabelecer os parâmetros ideais para o cultivo de *A. salina*, e destacar a importância da utilização de grupos controles, para identificar possíveis variações no experimento.

Palavras-chave: ecotoxicologia, *artemia salina*, tenofovir.

INTRODUÇÃO

A presença de medicamentos em ambientes onde ocorre a descarga de estações de tratamento de esgoto (ETE), assim como qualquer lançamento de dejetos gerados pela população, vem preocupando cada vez mais os pesquisadores sobre os possíveis efeitos ecológicos na fauna e flora aquática devido ao seu uso excessivo e sua complexidade química. No Brasil, apenas 38% do esgoto doméstico recebe tratamento, sem considerar a parcela que possui sistema de coleta, e, ainda assim, não há um tratamento de esgoto efetivo prévio ao seu lançamento em águas superficiais. Os recursos hídricos podem ser contaminados pela descarga de águas residuárias de forma direta, sem o tratamento necessário, de origem hospitalar, doméstica ou industrial, assim como por efluentes de estações com eficiência de remoção baixa ou moderada (BRAUSCH et al., 2012; LIMA et al., 2017; SILVA, 2020).

No Brasil, a Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011), define regras para o controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano, assim como seu padrão de potabilidade, no entanto, não inclui os fármacos e disruptores endócrinos. Além disso, o estudo de revisão realizado por Lima et al. (2017), mostra que a maioria dos fármacos encontrados no Brasil podem ser obtidos de forma direta pela população, sem necessidade de prescrição médica ou limite de quantidade. Apesar da recente implementação de políticas voltadas ao recolhimento de fármacos vencidos, na prática, essa política tem se apresentado pouco efetiva, o que contribui para o aumento do descarte ambiental e, conseqüentemente, a presença dos mesmos nos efluentes (LIMA et al., 2017).

O ambiente aquático compreende vários ecossistemas diferentes, sendo eles, os rios, oceanos, mares, estuários e lagos. Sendo assim, ele possui uma diversidade muito grande e complexa que pode ser afetada significativamente pela presença de produtos químicos, dependendo de alguns fatores como concentração no meio, persistência e suas propriedades físico-químicas. Dentre os principais problemas associados aos resíduos ambientais de fármacos, evidenciam-se a bioacumulação na cadeia alimentar e o risco iminente à biota aquática (COSTA et al., 2008; SILVA, 2020).

Investigações realizadas nas últimas décadas sobre os efeitos que a exposição a produtos farmacêuticos podem causar em organismos, revelaram que o etilestradiol, contribuiu para a feminização de peixes machos em rios onde desembocam muitos efluentes (KUSTER e ADLER, 2014). Esses desreguladores endócrinos também podem causar diversas alterações, como efeitos e danos na produção de esperma dos machos e declínio na capacidade de reprodução. Os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprima, quando descartados no meio ambiente, podem induzir a resistência aos antibióticos em bactérias patogênicas (LIMA et al., 2017).

Dentre os medicamentos que causam efeitos ambientais negativos, pode-se citar o Fumarato de Tenofovir Desoproxila (FT), um antirretroviral da classe dos análogos de nucleotídeos, muito utilizado para o tratamento de pessoas infectadas pelo HIV. Ele atua inibindo a enzima transcriptase reversa, interrompendo a replicação do vírus HIV (SILVA, 2020). Segundo o estudo de Ncube et al. (2018), cerca de 5,49 toneladas de FT são liberados no ambiente diariamente, o que resulta em uma média global de $2,35 \text{ ngL}^{-1}$ em águas superficiais. As concentrações residuais não são uniformes, sofrendo variações dependendo de questões demográficas, condições sanitárias, dentre outras. Segundo Wood et al. (2015), foram identificadas concentrações de 145-243 ngL^{-1} de FT nos rios da África do Sul.

É possível identificar a toxicidade de um medicamento por meio da realização de testes toxicológicos em laboratório, onde organismos-teste são expostos a diferentes concentrações de um mesmo medicamento e são registrados e quantificados os efeitos tóxicos observados durante um período determinado de tempo. Recomenda-se que o efeito tóxico de uma amostra seja observado em mais de uma espécie representativa da biota aquática, e, segundo o artigo 18, parágrafo 1 da Resolução CONAMA nº430/11, é necessário utilizar organismos aquáticos de dois níveis tróficos diferentes (BRASIL, 2011; COSTA et al., 2008).

Em algas, frequentemente utilizadas em testes de toxicidade, pode-se observar o efeito de inibição de crescimento, comparando o crescimento com a presença do agente tóxico e o crescimento normal sem o agente. O efeito mais facilmente observado em testes de toxicidade com microcrustáceos é a imobilidade, e, em experimentos com peixes, geralmente utilizado como a primeira etapa na avaliação da toxicidade de um produto químico, o efeito observado é a mortalidade (COSTA et al., 2008; ZAKRZEWSKI, 2002).

A inibição do crescimento e a mortalidade não são os únicos efeitos que podem ser avaliados no estudo de toxicologia. A bactéria bioluminescente, *Aliivibrio fischeri* diminui sua emissão de luz em função da inibição de processos metabólicos, por exemplo. Dessa forma, na presença de substâncias tóxicas, como metais pesados, fenóis, tensoativos e outros compostos orgânicos tóxicos, a bioluminescência diminui, sendo a quantidade de perda de luz proporcional à toxicidade da amostra (SILVA, 2020; ZAKRZEWSKI, 2002).

As espécies selecionadas para testes de ecotoxicidade devem apresentar algumas características específicas como: representatividade de seu nível trófico; uniformidade e estabilidade genética nas populações; elevadas disponibilidade e abundância; facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório; ampla distribuição e importância comercial; significado ambiental em relação a área de estudo; e seletividade constante e elevada dos contaminantes. Também é recomendável que

sejam espécies de fisiologia, genética e comportamento conhecidos, para facilitar a interpretação dos resultados (COSTA et al., 2008).

A *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada da ordem Anostraca que pode ser utilizada para alimentar outros seres vivos, como peixes, e é comumente utilizada como espécie ornamental. De acordo com o estudo realizado por Salgueiro et al. (2018), a coloração da *A. salina* pode variar de acordo com sua alimentação. São animais filtradores, que se alimentam bombeando a água do ambiente em que estão para dentro de seu organismo, sendo essa característica, uma das que a tornam um bom bioindicador. Um dos efeitos utilizados para avaliar a toxicidade da espécie é a mobilidade, por apresentar um complexo sistema enzimático para permitir sua locomoção, que é sensível à presença de substâncias exógenas (SILVA, 2020).

Durante seu ciclo de vida, a *A. salina* pode passar por quatro estágios (Figura 1), o de ovo ou cisto, náuplios (larvas), jovem (com até seis dias de idade) e, por último, a fase adulta (quando o indivíduo atinge 10 dias de idade). Sua reprodução pode acontecer por oviparidade ou ovoviviparidade (SALGUEIRO et al., 2018).



Figura 1: Ciclo de vida da *A. salina*. (MARTÍN, 2014).

Dentre os principais organismos-teste utilizados para estudos de ecotoxicidade, a *A. salina* é muito utilizada graças a resistência de seus ovos, que podem ser mantidos por seis meses em ambiente seco; rapidez dos testes; fácil manuseio em laboratório; bom custo-benefício; é um dos modelos mais confiáveis de ecotoxicidade e é amplamente utilizado (COSTA et al., 2008; CUNHA, 2011; RAJABI, et al., 2015; VANHAECKE et al., 1981).

É imprescindível que estudos de ecotoxicologia continuem documentando o perigo e potencial risco de fármacos liberados em ambientes aquáticos, descrevendo suas toxicidades aguda e crônica, para que haja uma melhoria na tecnologia e eficiência das ETEs, assim como o direcionamento de políticas públicas que regulamentem o lançamento de dejetos nos corpos d'água, com a criação de punições aos lançadores, e, por consequência, conter a entrada de medicamentos indesejáveis em ambientes aquáticos e remover ao máximo os poluentes persistentes.

OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem como objetivo geral implementar o teste de ecotoxicidade utilizando *Artemia salina* no laboratório do Serviço de Ecotoxicologia, da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e proceder o método para futuros estudos de avaliação de impactos de medicamentos e suas classes no meio ambiente.

Objetivos específicos

- Avaliar a possível interferência de parâmetros críticos do ensaio, como tempo de eclosão, pH, temperatura e iluminação;
- Determinar as melhores condições de cultivo baseadas nos parâmetros críticos: presença ou ausência de iluminação artificial, tempo de eclosão dos cistos (24h ou 48h), controle de temperatura, solução salina com cloreto de sódio (NaCl) ou solução salina com sal marinho, ajuste de pH da água e ponteiras adequadas para separação da *A. salinas*;
- Determinar valores de CE_{50} - 24h (valor que expressa a concentração da amostra que causa o efeito de imobilização em 50% dos organismos-testes em 24h de teste) encontrados nos trabalhos de referência para o Fumarato de Tenofovir.

METODOLOGIA

De julho a novembro de 2021, foram realizados experimentos de ecotoxicidade com *Artemia salina*, no laboratório do Serviço de Ecotoxicologia da Pesquisa e Desenvolvimento da FUNED, utilizando o antirretroviral Fumarato de Tenofovir Desoproxila (FT) com o objetivo de implementação do teste no laboratório.

Os testes foram adaptados para as condições do laboratório de acordo com a Norma ABNT 16530-2016. Esse teste consistiu na exposição de náuplios em fase II e III (Figura 2) a várias concentrações da amostra durante um período de 24h para se observar o efeito de imobilidade nos organismos-teste.

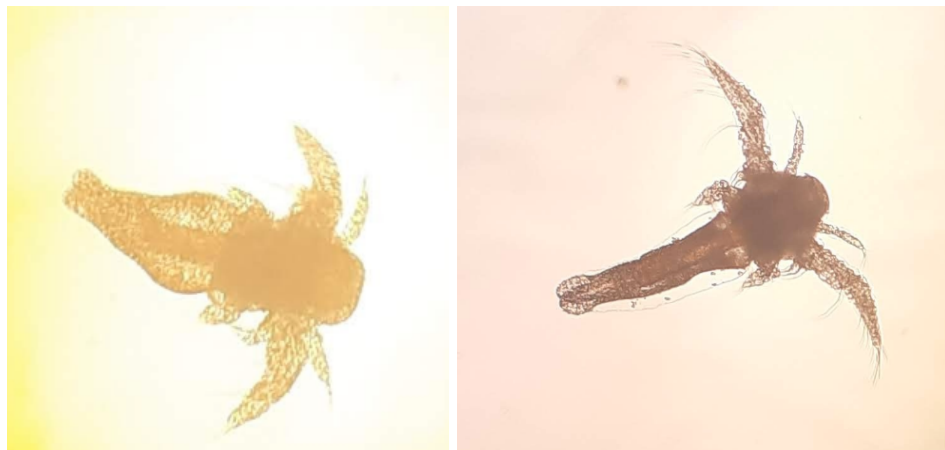


Figura 2: *A. salina* na fase II (esquerda) e fase III (direita). Fotos autorais.

Os cistos de *A. salina* foram colocados para eclodir em solução de sal marinho e em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 35 g/L (Figura 3) e, após 24h começaram a eclodir. Os detalhes da eclosão serão explorados durante a determinação dos parâmetros críticos e condições de cultivo.



Figura 3: Béquer com cistos de artêmia para eclosão em solução salina. Foto autoral.

Para preparar a solução de FT foi realizada a pesagem de 100 mg do antirretroviral e feita a diluição em 10 mL de água salina (Figura 4).

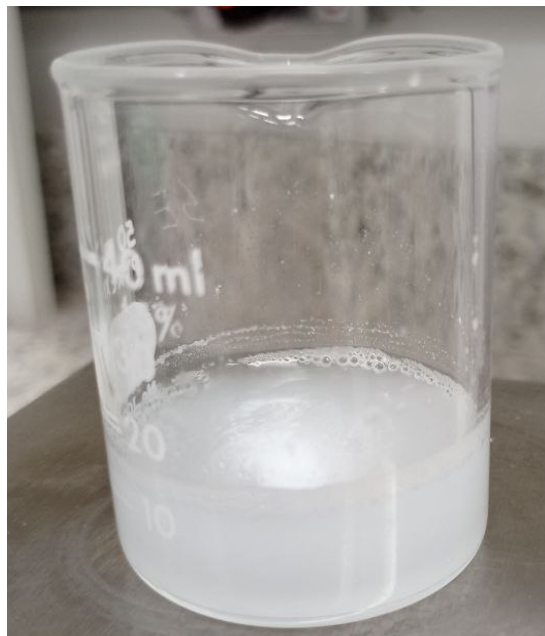


Figura 4: Preparo da solução de Fumarato de Tenofovir. Foto autoral.

O teste consistiu na separação aleatória de 10 indivíduos de *A. salina* em cada tubo de polietileno contendo a solução teste. Os recipientes dos testes foram mantidos em temperatura entre 23°C e 27°C durante 24h. Após esse período, foi feita a contagem dos indivíduos que estavam imóveis.

Para a determinação dos parâmetros críticos

A solução salina (SS) foi preparada com 17,5 g do sal cloreto de sódio (NaCl) diluído em 500 mL de água destilada. Foram adicionados 2,5 mg de cistos de *Artemia salina* na solução salina e deixados para eclodir em cima da bancada na presença de luz, em temperatura ambiente e pH entre 6,7 e 8,5. Após 24h, os indivíduos estavam prontos para o início dos testes (Figura 5).

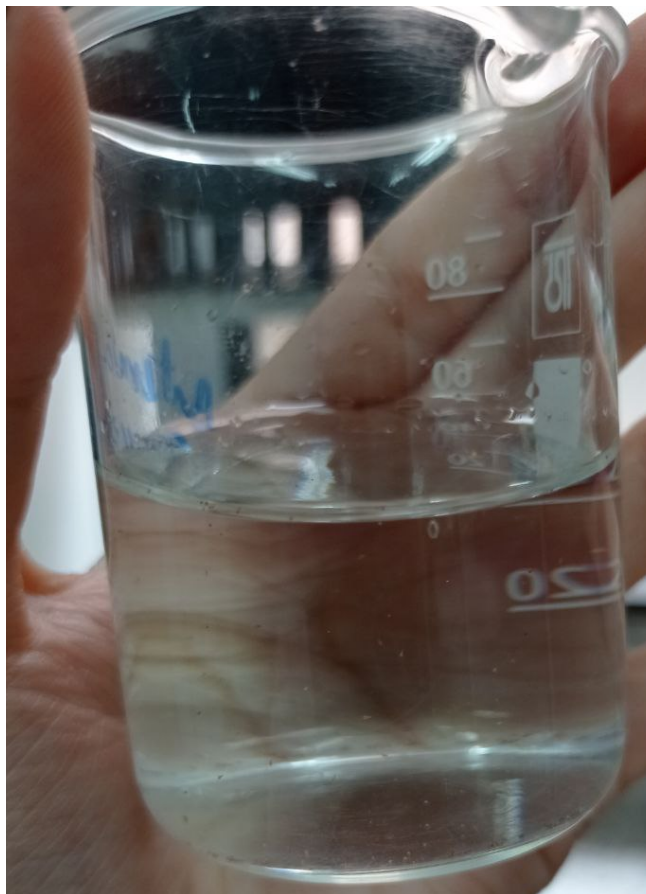


Figura 5: Béquer com artêmias eclodidas em Solução Salina. Foto autoral.

Para a determinação das condições de cultivo

Nos Experimentos 1, 2 e 3, os cistos de artêmia foram colocados em um béquer de vidro de 100 mL com solução salina (SS) de NaCl 35 g/L para eclodir. No Experimento 4 foram preparadas SS de 35 g/L e 75g/L de NaCl e de 35 g/L e 75 g/L de sal marinho.

Experimento 1

Após 24 horas da eclosão, os tubos de ensaio de polietileno foram separados, e neles, foi adicionada a quantidade previamente calculada de SS e FT. Os volumes utilizados em cada tubo foram: 30 mg/L = 4885 uL SS + 15 uL FT; 60 mg/L = 4870 uL SS + 30 uL FT; 90 mg/L = 4855 uL SS + 45 uL FT; 120 mg/L = 4840 uL SS + 60 uL FT; 150 mg/L = 4825 uL SS + 75 uL FT; 180 mg/L = 4810 uL SS + 90 uL FT. As artêmias foram adicionadas aos tubos com o auxílio de uma pipeta de 10-100 uL, regulada para 10 uL, com o auxílio de luz artificial, que atrai as artêmias, facilitando a captura. A leitura do teste foi feita após 24h.

Experimento 2

No Experimento 2, foi avaliada a possibilidade da ponteira de 10-100 uL (Figura 6) provocar alguma lesão física nos indivíduos durante o processo de retirada do béquer e adição nos tubos de ensaio. Os cistos de artêmia foram colocados para eclodir em SS de NaCl, e, após 48 horas foi feita a transferência dos dez indivíduos de artêmia para cada tubo de ensaio. As variáveis observadas foram: ponteira normal, ponteira cortada, temperatura ambiente e temperatura controlada a 25°C. A leitura do teste foi feita após 24h.

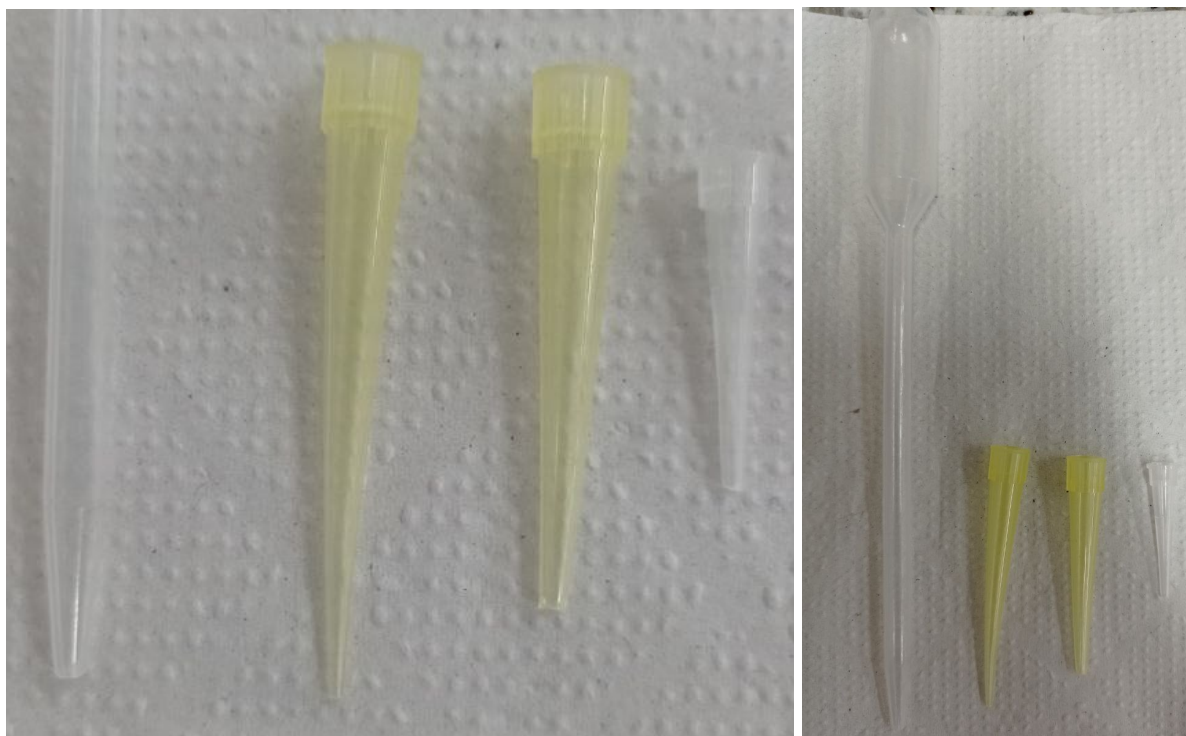


Figura 6: Ponteiras testadas. Fotos autorais.

Experimento 3

No Experimento 3, foi avaliado se o volume final dos tubos de polietileno influenciavam na sobrevivência dos indivíduos. Os cistos foram colocados para eclodir em SS de NaCl, e, após 48h foi feita a transferência dos dez indivíduos de artêmia para cada tubo de ensaio com volume final de 10 mL em cada um. A leitura do teste foi feita após 24h.

Experimento 4

No Experimento 4, as variáveis observadas foram: temperatura, luz e SS. Neste teste, foi definido que as soluções com os cistos de *A. salina* ficariam em dois ambientes diferentes: bancada (temperatura ambiente) e incubadora (25°C), sendo que para cada

ambiente analisou-se a eclosão na presença e ausência de luz. Foram preparadas SS de 35 g/L e 75g/L de NaCl e de 35 g/L e 75 g/L de sal marinho. As condições de cada béquer foram:

- Béquer 1: Bancada, sem luz, com SS de 35 g/L de NaCl com 2,5 mg/L de *Artemia*
- Béquer 2: Bancada, sem luz, com SS de 35 g/L de sal marinho com 2,5 mg/L de *Artemia*
- Béquer 3: Incubadora, sem luz, com SS de 35 g/L de NaCl com 2,5 mg/L de *Artemia*
- Béquer 4: Incubadora, sem luz, com SS de 35 g/L de sal marinho com 2,5 mg/L de *Artemia*
- Béquer 5: Incubadora, com luz, com SS de 35 g/L de NaCl com 2,5 mg/L de *Artemia*
- Béquer 6: Incubadora, com luz, com SS de 35 g/L de sal marinho com 2,5mg/L de *Artemia*
- Béquer 7: Bancada, sem luz, com SS de 75 g/L de NaCl com 2,5 mg/L de *Artemia*
- Béquer 8: Bancada, sem luz, com SS de 75 g/L de sal marinho com 2,5mg/L de *Artemia*
- Béquer 9: Incubadora, sem luz, com SS de 75 g/L de NaCl com 2,5 mg/L de *Artemia*
- Béquer 10: Incubadora, sem luz, com SS de 75 g/L de sal marinho com 2,5mg/L de *Artemia*
- Béquer 11: Incubadora, com luz, com SS de 75 g/L de NaCl com 2,5 mg/L de *Artemia*
- Béquer 12: Incubadora, com luz, com SS de 75 g/L de sal marinho
- Béquer 13: Bancada, sem luz, com SS de 35 g/L de sal marinho com 5 mg/L de *Artemia*
- Béquer 14: Incubadora, sem luz, com SS de 35 g/L de sal marinho com 5 mg/L de *Artemia*.

Após 48h de eclosão foi feito o preparo dos tubos de ensaio e a adição das artêmias. A leitura do teste foi feita após 24h.

Todos os parâmetros avaliados estão dispostos na Tabela 1, em relação a cada experimento realizado.

Tabela 1: Parâmetros avaliados em função dos testes.

Experimento	Parâmetros testados	Data
1	Tempo de eclosão dos cistos, 24h ou 48h.	14/07
2	Ponteiras amarela normal, ponteira amarela cortada, ponteira branca cortada e pipeta de pasteur.	22/07
3	Volume de 10mL no final de cada tubo.	29/07
4	Temperatura, presença ou ausência de luz e solução salina de sal marinho e NaCl.	05/08

Realização dos testes

Para a realização dos ensaios foram preparados três tubos de controle para cada teste realizado (tubos que receberam apenas SS e as artêmias, para garantir que nenhum fator externo tenha influenciado na morte dos indivíduos), e foram feitas três réplicas para cada concentração, adicionando dez indivíduos por réplica (Figura 7).



Figura 7: Tubos preparados com suas respectivas concentrações. Foto autoral.

O cálculo das concentrações de 30 mg/L, 60 mg/L, 90 mg/L, 120 mg/L, 150 mg/L e 180 mg/L de FT ($C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$), foi feito considerando o volume final de cada tubo de ensaio (5 mL) e o volume de 10 uL por artêmia (100 uL por tubo de ensaio). As concentrações foram determinadas de acordo com os testes realizados pela doutora Sandra Regina Silva em sua tese de doutorado (SILVA, 2020).

Em todos os testes, a leitura foi realizada após 24 horas, com o auxílio de um microscópio e luz artificial. A mortalidade foi observada por meio da contagem de indivíduos móveis (vivos) e imóveis (mortos).

RESULTADOS

Determinação dos parâmetros críticos

As artêmias eclodiram na solução salina de NaCl. Entretanto, o pH dessa solução não se manteve estável, caindo de 8,5 para 6,7. Uma das hipóteses seria o fato do NaCl não ser um tampão o que pode explicar essa instabilidade do pH. No momento da retirada dos indivíduos do béquer, foi observado que os indivíduos estavam muito pequenos, dificultando sua captura. A taxa de mortalidade dos indivíduos manteve-se acima de 30% em todos os tubos. Não foram feitos tubos de controle nesse primeiro teste (06/07/2021 e 07/07/2021).

Determinação das condições de cultivo

Após a realização do Experimento 1, foi possível perceber que a taxa de mortalidade dos indivíduos manteve-se acima de 30%, o que invalida o teste, visto que não há maneiras de se constatar que a morte dos indivíduos foi causada pela presença do medicamento nos tubos de teste, podendo ter sido influenciada por fatores externos. Observou-se que os testes deveriam começar após 48h da eclosão dos cistos de *A. salina* para que todos os indivíduos pudessem eclodir e facilitar sua captura. (13/07/2021 e 14/07/2021).

Tabela 2 - Resultados da leitura do Experimento 1.

Resultados - Experimento 1		
Tubos	Móveis	Imóveis
CONTROLE	2	8
CONTROLE	2	8
CONTROLE	2	8
30 mg/L Tenofovir	2	8
30 mg/L Tenofovir	2	8
30 mg/L Tenofovir	2	8
90 mg/L Tenofovir	1	9
90 mg/L Tenofovir	0	10
90 mg/L Tenofovir	3	7
150 mg/L Tenofovir	0	10
150 mg/L Tenofovir	0	10
150 mg/L Tenofovir	1	9
210 mg/L Tenofovir	0	10
210 mg/L Tenofovir	0	10
210 mg/L Tenofovir	0	10

Após a leitura do Experimento 2, foi possível observar que a mortalidade ainda manteve-se acima de 30%, excluindo a possibilidade de as ponteiros estarem machucando os indivíduos durante a sua separação. A temperatura também não teve influência durante esse teste (Tabela 3). A pipeta de Pasteur não apresentou ser uma boa escolha para fazer a separação das artêmias por não possibilitar o controle da quantidade de solução salina a ser pipetada junto com os microcrustáceos, interferindo no volume final dos tubos, e consequentemente, na concentração final do medicamento em cada tubo (21/07/2021 e 22/07/2021).

Tabela 3 - Resultados da leitura do Experimento 2.

Resultados - Experimento 2		
Tubos	Móveis	Imóveis
Ponteira Branca Cortada (PBC)	3	7
Ponteira Branca Cortada (PBC)	1	7
Ponteira Branca Cortada (PBC)	2	8
Ponteira Amarela Cortada (PAC)	2	8
Ponteira Amarela Cortada (PAC)	0	10
Ponteira Amarela Cortada (PAC)	1	9
Ponteira Amarela Cortada - Quente (PAC-Q)	0	10
Ponteira Amarela Cortada - Quente (PAC-Q)	0	9
Ponteira Amarela Cortada - Quente (PAC-Q)	0	10
Ponteira Amarela Normal (PAN)	3	7
Ponteira Amarela Normal (PAN)	2	8
Ponteira Amarela Normal (PAN)	3	7
Ponteira Amarela Normal - Quente (PAN-Q)	1	8
Ponteira Amarela Normal - Quente (PAN-Q)	1	8
Ponteira Amarela Normal - Quente (PAN-Q)	1	9
Pipeta de Pasteur Cortada (PPC)	1	9
Pipeta de Pasteur Cortada (PPC)	0	10
Pipeta de Pasteur Cortada (PPC)	2	8

No Experimento 3, muitos indivíduos ficaram presos nas ponteiros das pipetas, não sendo possível retirá-los, fazendo com que fossem descartados posteriormente junto com as ponteiros. Diante disso, o teste só foi realizado até a concentração de 60 mg/L pois não havia mais indivíduos viáveis para utilização nas demais concentrações. Foi possível observar que as artêmias agarraram no fundo do tubo de ensaio e na ponteira, mas não agarraram no béquer. A quantidade de 10 mL de solução salina também dificultou a leitura do teste no microscópio.

Apesar de haver uma quantidade maior de indivíduos vivos nos tubos controle, o teste não pôde ser validado pois a taxa de mortalidade dos indivíduos ainda foi alta (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados do Experimento 3, considerando um volume final maior (10 mL) nos tubos.

Resultados - Experimento 3		
Tubos	Móveis	Imóveis
CONTROLE 1	6	3
CONTROLE 1	6	4
CONTROLE 1	4	5
CONTROLE 2	3	6
CONTROLE 2	3	5
CONTROLE 2	3	7
CONTROLE 3	1	8
CONTROLE 3	2	7
CONTROLE 3	3	7
TF 30 mg/L	5	5
TF 30 mg/L	5	5
TF 30 mg/L	2	8
TF 60 mg/L	4	6
TF 60 mg/L	5	5
TF 60 mg/L	6	4

No Experimento 4, pode-se observar que nos tubos com sal marinho, havia uma maior quantidade de indivíduos vivos e ativos, e, nos tubos de NaCl, não foi possível visualizar a mesma intensidade de movimentação e muitos indivíduos de *A. salina* encontravam-se nos fundos dos tubos de ensaio.

Nos béqueres de 75 g/L de Sal marinho (Béqueres 8 e 10) houve a eclosão tardia das artêmias, portanto, o teste não foi realizado. Nos béqueres de 75 g/L com NaCl não houveram nenhuma eclosão. Foram preparadas novas SS de sal marinho, pois não havia quantidade suficiente para todos os tubos. Os tubos com as artêmias do béquer 10 receberam a SS preparada no dia 02/08 e os tubos com as artêmias do béquer 8 receberam a SS nova preparada no dia do teste.

No caso dos tubos de ensaio com SS de Sal marinho, não houve a necessidade de se utilizar o microscópio para fazer a leitura do teste. Foi feita a transferência das artêmias do tubo para uma placa de petri e a observação foi feita a olho nu. Nos casos em que não foi possível notar movimentação do indivíduo a olho nu, a leitura foi realizada com a utilização do microscópio. Os indivíduos que ficaram na SS de NaCl apresentaram

maior mortalidade quando comparados com os que ficaram na SS de Sal Marinho (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da leitura do Experimento 4.

Resultados - Experimento 4			
	Tubos (Triplicata 1)	Móveis	Imóveis
1	Incubadora, com luz, 35 g/L Sal marinho, 2,5 mg de A	9	0
	Incubadora, com luz, 35 g/L Sal marinho, 2,5 mg de A	10	0
	Incubadora, com luz, 35 g/L Sal marinho, 2,5 mg de A	10	0
2	Incubadora, com luz, 35 g/L NaCl, 2,5 mg de A	2	8
	Incubadora, com luz, 35 g/L NaCl, 2,5 mg de A	1	8
	Incubadora, com luz, 35 g/L NaCl, 2,5 mg de A	3	7
3	Incubadora, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 2,5 mg de A	10	0
	Incubadora, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 2,5 mg de A	10	0
	Incubadora, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 2,5 mg de A	9	0
4	Incubadora, sem luz, 35 g/L NaCl, 2,5 mg de A	2	8
	Incubadora, sem luz, 35 g/L NaCl, 2,5 mg de A	0	10
	Incubadora, sem luz, 35 g/L NaCl, 2,5 mg de A	3	6
5	Incubadora, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 5 mg de A	9	0
	Incubadora, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 5 mg de A	10	0
	Incubadora, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 5 mg de A	10	0
6	Bancada, sem luz, 35 g/L NaCl, 2,5 mg de A	0	9
	Bancada, sem luz, 35 g/L NaCl, 2,5 mg de A	0	10
	Bancada, sem luz, 35 g/L NaCl, 2,5 mg de A	2	7
7	Bancada, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 2,5 mg de A	10	0
	Bancada, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 2,5 mg de A	10	0
	Bancada, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 2,5 mg de A	10	0
8	Bancada, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 5 mg de A	10	0
	Bancada, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 5 mg de A	9	1
	Bancada, sem luz, 35 g/L Sal marinho, 5 mg de A	9	0

No Experimento 5, todos os indivíduos de *A. salina* sobreviveram, independente da concentração de TF. Uma das hipóteses para esse ocorrido, é que o ácido usado para correção do pH da solução de Tenofovir possa ter degradado as moléculas de TF,

fazendo com que o medicamento não apresentasse efeito sobre os indivíduos de *A. salina*.

Tabela 6 - Resultados da leitura do Experimento 5.

Resultados Teste <i>Artemia salina</i> 12/08			
	Tubos	Móveis	Imóveis
1	BRANCO	10	0
	BRANCO	10	0
	BRANCO	10	0
	BRANCO	9	1
2	30 mg/L	10	0
	30 mg/L	10	0
	30 mg/L	10	0
	30 mg/L	10	0
3	60 mg/L	10	0
	60 mg/L	10	0
	60 mg/L	10	0
	60 mg/L	10	0
4	90 mg/L	10	0
	90 mg/L	10	0
	90 mg/L	10	0
	90 mg/L	10	0
5	120 mg/L	10	0
	120 mg/L	10	0
	120 mg/L	10	0
	120 mg/L	10	0
6	150 mg/L	10	0
	150 mg/L	10	0
	150 mg/L	10	0
	150 mg/L	10	0
7	180 mg/L	10	0
	180 mg/L	10	0
	180 mg/L	10	0
	180 mg/L	10	0

DISCUSSÃO

Por meio dos experimentos realizados no laboratório com a espécie *Artemia salina*, foi possível a confirmação de variáveis importantes para a realização de testes de ecotoxicidade com a espécie.

Apesar da alta mortalidade do Experimento 1, quando comparado o resultado com o valor de dose-resposta obtido no estudo de Silva (2020), observa-se o mesmo padrão, onde nos tubos com menor concentração de tenofovir (30 mg/L e 90 mg/L) as artêmias apresentaram maior mobilidade em relação aos tubos com maior concentração (150 mg/L e 210 mg/L).

No Experimento 2, pôde-se concluir que o método de captura utilizado (micropipeta) não estava interferindo na realização dos experimentos, e, quando comparados os resultados de testes que utilizam diferentes métodos de captura, não se observou interferência na sobrevivência das mesmas. Porém, houve momentos em que indivíduos de artêmias ficaram presos nas ponteiras e nos tubos, como observado no Experimento 3. No entanto, não foi identificado o motivo e não foi encontrado nenhum estudo de referência que mencionasse o ocorrido.

Com o Experimento 4, foi possível identificar a interferência do NaCl na sobrevivência das artêmias, o que explicaria a alta taxa de mortalidade dos grupos controle. Os tubos com a solução salina de sal marinho não apresentaram mortalidade. Em outros estudos de ecotoxicidade com *A. salina*, foi possível encontrar a solução salina preparada seguindo a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), onde: para cada 1 L de água destilada, foram adicionados 23 g de cloreto de sódio (NaCl), 11 g de cloreto de magnésio hexa-hidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 4 g de sulfonato de sódio (Na_2SO_4), 1,3 g de cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2$) e 0,7 g de cloreto de potássio (KCl); sendo que o ajuste de pH é feito para 9,0 com solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 1M). Acredita-se que a eficiência do uso dessa solução esteja relacionado à sua similaridade com o habitat natural das artêmias.

Diferente do Experimento 1, o Experimento 5 não seguiu os padrões observados no estudo de Silva 2020, onde os indivíduos passaram a demonstrar uma imobilidade a partir das concentrações de 90 mg/L. Vale ressaltar que no Experimento 1, a solução salina utilizada foi feita com NaCl, e no Experimento 5, a solução salina foi preparada com sal marinho. Uma das hipóteses é que no Experimento 5 houve a adição de 30 µL de ácido clorídrico (HCl) na solução de Tenofovir para melhorar a solubilidade deste fármaco em água, portanto o ácido pode ter quebrado as moléculas do Tenofovir, fazendo com que o fármaco perdesse sua atividade.

Ao comparar o Experimento 5 com outros estudos de ecotoxicidade com *A. salina*, notou-se que Cunha (2011) e Oliveira et al. (2014) utilizaram sal marinho artificial para

o preparo da solução salina e seus resultados foram positivos. Ambos optaram por aerar o ambiente de eclosão das artêmias, proporcionando maior oxigenação, ao contrário de Palácio et al. (2012), que optaram pelo preparo da solução salina seguindo o método de Meyer et al. (1982), previamente descrito, e não promoveram a aeração no ambiente de eclosão.

Destaca-se a semelhança com Palácio et al. (2012) na escolha de manter os tubos de experimento em temperatura ambiente e na presença de luz por 24h. No estudo de Cunha (2011), os frascos foram cobertos com plástico filme e incubados por 48h (foi avaliada a toxicidade crônica), assim como no Experimento 5, onde os tubos também foram cobertos.

CONCLUSÃO

Os parâmetros ideais para o cultivo dos indivíduos de *A. salina* foram estabelecidos a partir dos ensaios realizados neste trabalho. Entretanto, diversas variáveis afetaram os resultados dos testes realizados, não sendo possível determinar os valores de CE_{50} . Portanto, faz-se necessária a realização de mais experimentos para que o teste de ecotoxicidade com *Artemia salina* seja implementado no laboratório.

Destaca-se a importância da utilização de grupos controles, para que seja possível identificar variações no experimento, visto que, com a ausência dos mesmos, não seria possível identificar relação entre o efeito observado e o fármaco.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e força que nos deu para chegar até o final. Aos pais e familiares, que nos apoiaram em meio às dificuldades. Aos professores e colegas que acreditaram em nosso potencial.

A Fundação Ezequiel Dias – Funed, por apoiar a realização da pesquisa. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo incentivo financeiro.

REFERÊNCIAS

BLAISE, C.; GAGNÉ, F.; EULLAFFROY, P.; FÉRARD, J. **Ecotoxicity of selected pharmaceuticals of urban origin discharged to the Saint-Lawrence river (Québec, Canada): A review.** Disponível em: <<https://doi.org/10.14210/bjast.v10n2.p29-51>>

Acesso em: 30 de julho, 2021.

BLANKENSTEIN, G. M. P.; JUNIOR, A. P. **O descarte de medicamentos e a política nacional de resíduos sólidos: uma motivação para a revisão das normas sanitárias.** Universidade de São Paulo. 2008. Disponível em:

<<https://www.revistas.usp.br/rdisan/article/download/148124/141736/299622>> Acesso em: 20 de setembro, 2021.

BRAUSCH, J.; CONNORS, K.; BROOKS, B.; RAND, G. **Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Review of Recent Toxicological Studies and Considerations for Toxicity Testing.** Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, v. 218, p. 1-99. 2012. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3137-4_1> Acesso em: 30 de julho, 2021.

BRASIL. CONAMA. Resolução n. 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do CONAMA. **Diário Oficial da União:** República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 92, 16 maio 2011. p. 89.

Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiare.cfm?codegi=646>> .

Acesso em: 03 de novembro de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 2.914, de 12 de dezembro de 2011. **Normas e padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano.** Brasília. 2011.

COSTA, C.; OLIVI, P.; BOTTA, C.; ESPINDOLA, E. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação.** Química Nova, ed. 31 (7), 2008.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>> Acesso em: 30 de julho, 2021.

CUNHA, B. M. da. **Avaliação ecotoxicológica de distintos tipos de efluentes mediante ensaios de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina* e *Lactuca sativa*.**

Inst. de Química UFRS. 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/32773>>

Acesso em: 30 de julho, 2021.

KUSTER, A.; ADLER, N. **Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation.** Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v.369, p.1656, 2014. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0587>> Acesso em: 28 de setembro, 2021.

LIMA, D.R.S.; TONUCCI, M.C.; LIBÂNIO, M.; AQUINO, S.F. **Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção**. Engenharia sanitária e ambiental, v. 22 (6), p. 1043-1054, 2017. Disponível em: <[10.1590/s1413-41522017165207](https://doi.org/10.1590/s1413-41522017165207)> Acesso em: 30 de outubro, 2021.

MARTÍN, N. *Artemia salina*. **Zootecnia Doméstica**. 10 de nov. 2014. Disponível em: <<https://www.zootecniadomestica.com/artemia-salina/>> Acesso em: 18 de novembro, 2021.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTMAN, 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. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17396775/>> Acesso em: 16 de novembro, 2021.

NCUBE, S.; MADIKIZELA, L. M.; CHIMUKA, L.; NINDI, M. M. **Environmental fate and ecotoxicological effects of antiretrovirals: A current global status and future perspectives**. Water Res, v.145, p. 231-247, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.017>> Acesso em: 28 de setembro, 2021.

OLIVEIRA, E. A. de.; CARRA, M. L.; CHALUPE, V. C.; SAMPAIO, F. G.; JONSSON, C. M. **Avaliação da toxicidade da sulfametazina em organismos aquáticos**. Em: Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 8., 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1006621/avaliacao-da-toxicidade-da-sulfametazina-em-organismos-aquaticos>> Acesso em: 18 de novembro, 2021.

PALÁCIO, S. M.; NOGUEIRA, D. A.; MANENTI, D. R.; MÓDENES, A. N.; QUIÑONES, F. R. E.; BORBA, F. H. **Estudo da toxicidade de efluente têxtil tratado por foto-fenton artificial utilizando as espécies *Lactuca sativa* e *Artemia salina***. Engenvista, v. 14, n. 2, p. 127-134, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.22409/engevista.v14i2.382>> Acesso em: 18 de novembro, 2021.

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. ***Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles**. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. Disponível em: <[10.1186/s40199-015-0105-x](https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x)> Acesso em: 30 de julho, 2021.

SALGUEIRO, A. C. F.; GOULART, A. S.; VIÇOSA, D. L.; VIÇOSA, C. S. C. L.; FOLMER, V. **Resolução de problemas no ensino de Ciências: utilização de *Artemia salina* como modelo experimental para o estudo de plantas medicinais na escola básica**. Revista de Ensino de Bioquímica, v. 16, n. 2, p. 31-47, 2018. Disponível em: <[10.16923/reb.v16i2.814](https://doi.org/10.16923/reb.v16i2.814)> Acesso em: 20 de setembro, 2021.

SILVA, S. R. **Toxicidade ambiental e degradação do antirretroviral fumarato de tenofovir desoproxila**. Tese (Doutorado) - Curso de Medicamentos e Assistência Farmacêutica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

VANHAECKE, P.; PERSOONE, G. ; CLAUS, C.; SORGELOOS, P. **Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii***. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 5(3), p. 382–387. 1981. Disponível em: <[10.1016/0147-6513\(81\)90012-9](https://doi.org/10.1016/0147-6513(81)90012-9)> Acesso em: 30 de julho, 2021.

WOOD T. P.; DUVENAGE, C. S. J.; ROHWER, E. **The occurrence of anti-retroviral compounds used for HIV treatment in South African surface water**. Environ. Pollut., 199 (2015), pp. 235-243. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25681819/>> Acesso em: 28 de setembro, 2021.

ZAKRZEWSKI, S. F. **Environmental Toxicology**. Oxford University Press, Review of Pharmacologic Concepts. 3 ed, 2 cap, p. 19-30. 2002.