

Avaliação preliminar do efeito ecotoxicológico da dipirona sódica utilizando bioindicadores

Preliminary assessment of the ecotoxicological effect of sodium dipyrone using bioindicators

RESUMO

É de conhecimento popular que a água é um recurso essencial para a existência da vida na terra e ainda assim a cada ano, aumenta a ocorrência de diversos tipos de contaminantes que ameaçam a sua qualidade. Os fármacos são uma das principais substâncias danosas ao ambiente. Suas propriedades intrínsecas como o propósito de realizar atividade biológica afetam diretamente os organismos que habitam os locais contaminados, causando a eles problemas fisiológicos, genéticos, metabólicos e a morte. A dipirona sódica é amplamente utilizada no Brasil e no mundo, principalmente por sua fácil aquisição uma vez que é vendida a baixo custo e sem prescrição médica. Objetivou-se por meio deste trabalho investigar as seguintes concentrações ambientalmente relevantes: 4,9µg/L; 8,9µg/L; 23,7µg/L e 36,4µg/L. Até o momento foi constatado que essas concentrações não causam efeito agudo em *Daphnia magna*. Contudo, para este projeto está previsto a realização de outros ensaios de caráter genotóxico e mutagênico utilizando os organismos bioindicadores *Daphnia magna* e *Allium cepa*, para que assim, seja determinada a real toxicidade da dipirona sódica para esses organismos.

PALAVRAS-CHAVE: Tóxicologia ambiental. Contaminação aquática. Fármacos.

ABSTRACT

It is popular knowledge that water is an essential resource for the existence of life on earth and yet every year, the occurrence of several types of contaminants that threaten its quality increases. Drugs are one of the main substances harmful to the environment. Its intrinsic properties such as the purpose of carrying out biological activity directly affect the organisms that inhabit the contaminated sites, causing physiological, genetic, metabolic problems and death. Sodium dipyrone is widely used in Brazil and worldwide, mainly for its easy acquisition since it is sold at low cost and without medical prescription. The objective of this work was to investigate the following environmentally relevant concentrations: 4.9µg / L; 8.9µg / L; 23.7µg / L and 36.4µg / L. So far it has been found that these concentrations do not have an acute effect on *Daphnia magna*. However, for this project, other genotoxic and mutagenic tests are expected to be carried out using the bioindicator organisms *Daphnia magna* and *Allium cepa*, so that the real toxicity of sodium dipyrone for these organisms is determined.

KEYWORDS: Environmental toxicology. Aquatic contamination. Drugs.

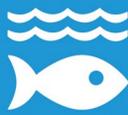
Paloma Pucholobek Panicio
Palomapanicio@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Wanessa Algarte Ramsdorf
wanessa6@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Centenas de compostos, oriundos de fontes antrópicas ou naturais, são considerados contaminantes emergentes. A literatura já destaca o risco que a presença de tais compostos podem ocasionar ao meio aquático, mesmo com concentrações detectadas na ordem de picogramas por litro ou nanogramas por litro (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Os produtos farmacêuticos fazem parte desta categoria de contaminantes devido à ineficiência da sua remoção e o constante aumento do seu uso. Uma vez administrados, os fármacos passam pelo processo de metabolização, que pode ocorrer de forma total ou parcial. Sendo assim, o organismo pode excretar tanto o medicamento na sua forma inalterada quanto seus metabólicos (GHISELLY 2006).

Essas substâncias são desenvolvidas com objetivo de exercer atividade biológica e que sejam dificilmente biodegradáveis. Tais características favorecem os fenômenos de bioacumulação e biomagnificação oferecendo assim, um risco a toda cadeia trófica (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Já que a presença destes compostos no ambiente é inevitável, devido ao seu amplo uso pela medicina humana e veterinária, se faz necessário conhecer o grau de toxicidade dessas substâncias. Para isso é possível utilizar os conceitos entendidos pela ecotoxicologia, a fim de se manter um efetivo monitoramento ambiental e a preservação dos organismos não-alvo.

O presente estudo tem o objetivo de identificar os efeitos ecotoxicológicos oriundos da Dipirona Sódica, sob concentrações ambientalmente relevantes. Como organismos bioindicadores, foi escolhido o microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* e a espécie vegetal *Allium cepa*, a fim de avaliar o potencial letal (ensaio agudo com *D.magna*) e genotóxico (ensaio cometa com *D.magna* e citológico com *A. cepa*) proveniente dessas concentrações relatadas na literatura.

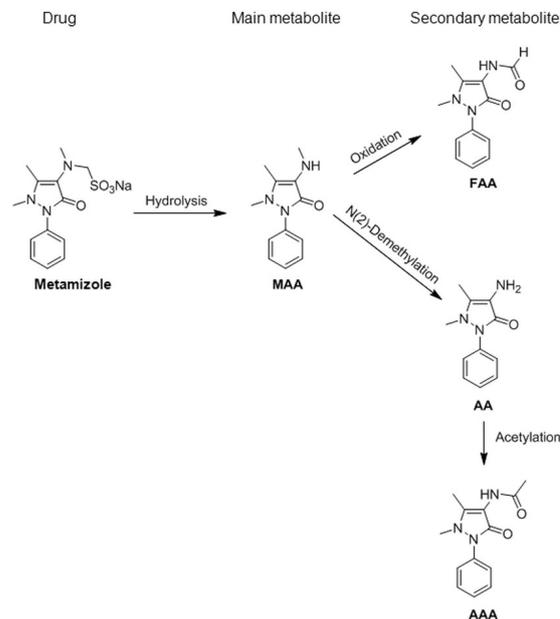
METODOLOGIA

DIPIRONA SÓDICA

A dipirona também conhecida como metamizol ou metanossulfonato é derivado do pirazolônico e possui propriedades analgésicas e antipiréticas. Se apresenta como principal princípio ativo de diversos medicamentos analgésicos amplamente utilizados no Brasil, onde cerca de 80% da sua comercialização ocorre sem prescrição médica e com custo acessível (SQUIBOLA; RODRIGUES, 2019).

Sua metabolização pode formar quatro metabólitos conhecidos, sendo eles o 4- Metilaminoantipirina (MAA), 4-Aminoantipirina (AA), 4- Formilaminoantipirina (FAA) e 4-Acetilaminoantipirina (AAA), como mostra a figura 1. Seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido, contudo, sabe-se que os metabólitos MAA e AA são os responsáveis pelo seu efeito analgésico ao passo que os metabólitos FAA e AAA possuem pouca atividade farmacológica (PASSONI, 2017).

Figura 1 – Biotransformação da dipirona em humanos



Fonte: Ariza et al., 2016

Ainda é escasso o número de investigações que indiquem os malefícios causados pela dipirona sódica em organismos não-alvo. Um estudo mostrou indícios de toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade em ensaios com *Artemia salina* e *Allium cepa* (BOLETIM INFORMATIVO GEUM, 2015). Pamplona (2011) evidenciou danos ao DNA em níveis ultraestruturais após a exposição em rins de *Rhamdia quelen* (jundiá).

Estão sendo avaliadas neste estudo, quatro concentrações ambientalmente relevantes relatadas na literatura. Algumas dessas foram detectadas em esgoto bruto e outras em esgoto tratado, são elas: 36,4 µg/L e 23,7 µg/L (GHISELLY 2006); 8,9µg/L (SOUZA, 2011) e 4,9 µg/L (GÓMEZ; et. al, 2007).

A dipirona sódica utilizada nos ensaios foi adquirida pelo laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR. Possui certificado de análise com controle de qualidade realizado pelo laboratório da Importadora Química Delaware. Apresenta-se como um pó cristalino branco solúvel em água e matanol.

ENSAIO AGUDO COM *DAPHNIA MAGNA*

Ensaio ecotoxicológicos agudos promovem a exposição de organismos-teste num intervalo de tempo de 24-48h. Neste trabalho foi considerado o prazo de 48 h. A realização do teste seguiu a norma NBR 12713 (2016). Buscou-se avaliar inicialmente a imobilização dos organismos para posterior cálculo por meio de análise estatística da Concentração Efetiva Mediana (CE50), que expressa a concentração na qual 50% dos organismos expostos sobrevivem. Para parâmetro de validação do ensaio, usa-se um controle negativo contendo apenas água de diluição e um controle positivo contendo sulfato de zinco (ZnSO₄) 50 mg/L.

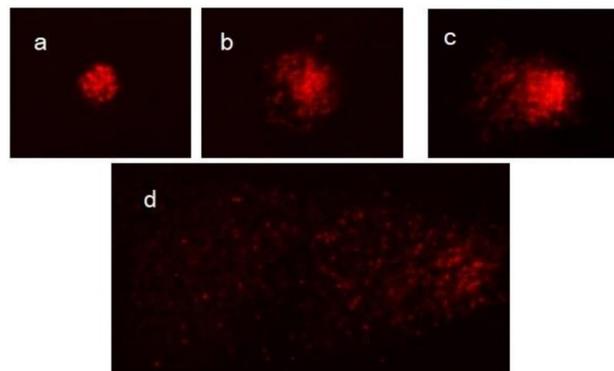
A exposição é feita em triplicatas, onde 10 organismos são colocados em cada béquer com 20 ml das concentrações. A incubação é feita em B.O.D, sem fotoperíodo e os organismos não são alimentados.

A cada novo ensaio foi feito uma nova solução mãe de 0,1 g/L de dipirona para que a partir desta, fossem feitas as diluições até as concentrações já citadas.

ENSAIO COMETA COM *DAPHNIA MAGNA*

A técnica utilizada é descrita por Singh et al. (1988) com algumas alterações segundo Knapik e Ramsdorf (2020). São expostos 30 neonatos de *D.magna* em duplicata para cada concentração pré-determinada por 48 h. Para parâmetro de validação é feito um controle negativo contendo apenas água de diluição e um controle positivo testado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), 20 µg/L. Após a exposição esses neonatos são homogenizados em microtubos de centrifugação para obtenção de uma suspensão celular. Em outros microtubos, paralelamente, são adicionados agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e a suspensão celular. Em seguida, essa solução é posta sobre lâminas previamente cobertas com agarose, essas então, são expostas a uma solução de lise a fim de se conseguir o rompimento das membranas celulares e a exposição do material genético. Posteriormente é feito a corrida eletroforética para que ocorra a migração do material genético fragmentado. Todo procedimento ocorre na ausência de luz para evitar danos ao material genético. Em seguida as lâminas são neutralizadas e fixadas com etanol. No momento da análise, é feito a coloração das lâminas com brometo de etídeo para a análise visual, em microscópio de epifluorescência, dos danos ao material genético sob o aumento de 400x. A figura 2 exemplifica os tipos de danos.

Figura 2 – Classificação dos danos ao material genético



Fonte: KNAPIK (2017)

Onde: a – dano 0; b – dano 1; c – dano 2; d – dano 3.

A análise estatística é feita para cada lâmina a partir do cálculo de escore de acordo com a expressão 1:

$$SCORE = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) \quad (1)$$

Considerando de n_0 à n_3 o número de cometas em cada uma das classes de 0 à 3 previamente definidas. Posteriormente é feita a verificação das diferenças significativas entre os grupos estudados por meio da análise estatística de Kruskal-Wallis com auxílio do programa BioEstat® 5.0.

ENSAIO DE GENOTOXICIDADE COM *ALLIUM CEPA*

Allium cepa é um excelente sistema-teste vegetal para realização de biomonitoramento com potencial de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Além de ser amplamente utilizado para avaliação de aberrações cromossômicas (VENTURA, 2004).

O protocolo utilizado neste ensaios foi estabelecido por Daniela Leme (2010) com algumas alterações. Para a exposição, placas de Petri são separadas em triplicatas e forradas com papel-filtro umedecidos com cada um das concentrações pré-determinadas, onde são depositadas 20 sementes para germinação. Para parâmetros de comparação e validação existe um controle negativo com água de osmose e um controle positivo com metil metanosulfonato (MMS) 10 mg/L. A incubação se dá em B.O.D até que as raízes atinjam 2 cm de comprimento. Após esse período, as raízes passam por fixação, hidrólise ácida e coloração. Em seguida é feita a extração apenas da parte meristemática da raiz para montagem das lâminas. Sobre ela é adicionado uma gota de carmim acético 2% e uma lamínula limpa, que deve ser pressionada cuidadosamente até que se forme uma pequena mancha de células espalhadas. As lâminas são mergulhadas em nitrogênio líquido por cerca de 15 segundos e deixadas para secar sem a lamínula. Após 24 h é adicionado uma gota de resina sintética sobre o material e recoberto por outra lamínula limpa e deixada descansar por mais 24 h. E só então, pode ser realizada as análises com auxílio de um microscópio de luz com objetiva de 40X (vezes). Em cada campo deve-se fazer a contagem das células totais, número de células em interfase e as em processo de divisão mitótica independente de haver ou não alguma anormalidade, em seguida deve-se identificar e contabilizar as células portadoras de anormalidades ou em processo de morte celular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ENSAIO AGUDO COM *DAPHNIA MAGNA*

Após o período de exposição de 48 h, foi feito inicialmente a análise e contagem dos organismos imóveis em cada uma das réplicas. Foi observado no entanto, que não houve imobilidade em nenhuma das concentrações analisadas, e isso foi um padrão para todas as três repetições do ensaio. Sendo assim, é possível dizer que essas concentrações ambientalmente relevantes não causam efeito tóxico agudo em se tratando do bioindicador *Daphnia magna*.

CONCLUSÃO

Este estudo foi interrompido devido à ocorrência da pandemia causada pelo novo coronavírus que ocasionou a suspensão das atividades presenciais. Até o atual momento, constatamos que a dipirona sódica em concentrações

ambientalmente relevantes, não causa efeitos agudos para *D.magna*. Entretanto, é de extrema relevância a continuidade deste projeto, que buscará identificar possíveis danos genotóxicos e mutagênicos provocados por esse medicamento. Uma vez que, os danos causados pelas exposições reais podem ir muito além de apenas efeitos de mortalidade dos organismos não-alvo, frequentemente, tais danos estão associados a modificações fisiológicas, genéticas ou metabólicas.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná por disponibilizar toda estrutura necessária para realização desta pesquisa e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro. Agradeço a minha orientadora prof.^a Wanessa por todo suporte e a todos os meus colegas do laboratório de ecotoxicologia.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12713.**

Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016.

Avaliação da toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade da dipirona sódica e do paracetamol em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. (2015, out/dez). Boletim Informativo Geum, v. 6, n. 4, p. 7-15. – Universidade Federal do Piauí.

Ariza, Adriana & Garcia-Martin, Elena & Salas, María & Montañez, Maria & Mayorga, Cristobalina & Blanca-Lopez, N. & Andreu, Inmaculada & Perkins, James & Blanca, Miguel & Agúndez, José & Torres, María. **Pyrazolones metabolites are relevant for identifying selective anaphylaxis to metamizole.** 2016 Scientific Reports 6. 23845. 10.1038/srep23845. DOI:[10.1038/srep23845](https://doi.org/10.1038/srep23845)

GHISELLI, Gislaíne. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (EI) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP).** 2006. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

Gómez MJ, Martínez Bueno MJ, Lacorte S, Fernández-Alba AR, Agüera A. **Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast.** 2007. *Chemosphere*. 2007;66(6):993-1002. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.051

KNAPIK, L. **Ecotoxicidade do inseticida malathion e seus efeitos sobre biomarcador genético ensaio cometa em *Daphnia magna*,** 2017. Dissertação

(Mestrado em Ciências e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

Knapik, L.F.O., Ramsdorf, W. **Ecotoxicity of malathion pesticide and its genotoxic effects over the biomarker comet assay in *Daphnia magna***. 2020 *Environ Monit Assess* 192, 264 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8235-0>

LEME, Daniela Morais. **Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de misturas comerciais de diesel e biodiesel puras e em simulações de vazamento em água e solo**. 2010. 207 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.

Montagner, Cassiana C. Vidal, Cristiane. Acayaba, Raphael D. **Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios**. 2017 *Química Nova*, Vol. 40, No. 9, 1094-1110, 2017.

PAMPLONA, J.H. OBA, E.T. DA SILVA, T.A. RAMOS, L.P. RAMSDORF, W.A. CESTARI, M.M. SILVA DE ASSIS, H. C. **Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen***. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.74, n.3, p.342-349, 2011.

PASSONI, Marcella Tapias. **Efeitos da dipirona na esteroidogênese e nas atividades (anti)androgênicas mediadas por receptores in vitro e in vivo**. 2017. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

SINGH, N. P. MACCOY, M. T. TICE, R. R. SCHNEIDER, E. L. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells**. 1988 *Experimental Cell Research*. v. 175, p. 184-191, 1988.

SOUZA, Neyliane Costa de. **Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SQUIBOLA, Guilherme; RODRIGUES, Emanuel Carlos. **Estudo da degradação de dipirona sódica comercial por meio de luz ultravioleta e visível**. 2019. – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Barretos, 2019.

VENTURA, Bruna de Campos. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida Atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2004. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2004.