

EFEITO DA CAFEÍNA NOS ORGANISMOS *Chironomus sancticaroli* (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) e *Daphnia magna* (CLADOCERA: DAPHNIIDAE)

Limnologia e ecotoxicologia

Aline Christine Bernegossi^{a,*}, Juliano José Corbi^{a,**}

^aDepartamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP)

São Carlos, Brasil

* aline.bernegossi@usp.br

** julianocorbi@usp.br

INTRODUÇÃO

A poluição dos corpos hídricos no mundo vem aumentando como consequência do crescimento populacional e do uso desordenado dos recursos naturais. A relação entre qualidade de água, saúde ambiental, saúde pública e qualidade de vida é estreita e, portanto, estudos relacionando esses temas vêm ganhando visibilidade e relevância (ALMEIDA, 2003). Nesse contexto, os contaminantes emergentes, que são substâncias naturais, sintéticas ou microrganismos que apresentam suspeitas de serem potencialmente tóxicos ao ambiente e/ou aos seres vivos, vem sendo objeto de estudo (CANELA et al., 2014). Entre os contaminantes emergentes, a cafeína (1,3,7 – trimetilxantina) está presente no cotidiano das pessoas desde o tradicional café até como constituinte de medicamentos, moderadores de apetite e estimulantes de metabolismo.

A presença da cafeína nos corpos d'água vem sendo documentada mundialmente como indicador da contaminação por esgoto doméstico. A Tabela 1 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta as concentrações de cafeína encontradas em diferentes localidades.

Tabela Erro! Nenhum texto com o estilo especificado foi encontrado no documento. – Síntese da concentração média de cafeína detectada em águas superficiais

Concentração média ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Amostra analisada	Literatura
1,0000 a 17,0000	Rio Atibaia, SP – BR	(GHISELLI, 2006)
35,3000 a 106,0000	Ribeirão Anhumas, SP – BR	(GHISELLI, 2006)
0,2000 a 16,9000	Rio Atibaia, SP – BR	(RAIMUNDO, 2007)
3,3000 a 127,0000	Ribeirão Anhumas, SP – BR	(RAIMUNDO, 2007)
0,5000 a 16,9000	Rio Capivari, SP – BR	(RAIMUNDO, 2007)
0,0013 a 0,3480	São Paulo (águas superficiais), BR	(CANELA et al., 2014)
0,0030 a 0,5990	Belo Horizonte (águas superficiais), MG – BR	(CANELA et al., 2014)
0,0030 a 0,2670	Vitória (águas superficiais), ES – BR	(CANELA et al., 2014)
0,0510 a 0,1330	Belém (águas superficiais), PA – BR	(CANELA et al., 2014)
0,0020 e 0,0080	Recife (águas superficiais), PE – BR	(CANELA et al., 2014)
0,1220 e 2,769	Porto Alegre (águas superficiais), RS – BR	(CANELA et al., 2014)
0,0042 e 0,1670	Curitiba (águas superficiais), PR – BR	(CANELA et al., 2014)
0,0080 e 0,0380	Brasília (águas superficiais), DF – BR	(CANELA et al., 2014)
0,0040 e 0,0700	Goiânia (águas superficiais), GO – BR	(CANELA et al., 2014)
0,0020 a 0,0161	Escócia (panorama da costa)	(WEIGEL; KUHLMANN; HÜHNERFUSS, 2002)
0,0150 a 0,1850	Baía de Boston, EUA	(CANTWELL et al., 2016)
0,1000 a 6,9000	Barbados, West Indies	(EDWARDS; KULIKOV;

0,0012 a 0,2248

Missouri (água superficiais), EUA

GARNER-O'NEALE, 2015
(WANG et al., 2011)

Fonte dos dados: organização dos Autores.

De acordo com o levantamento na literatura cerca de 90% dos locais avaliados apresentaram concentrações de cafeína abaixo de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo observado concentrações acima de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ em apenas duas localidades, ambas no estado de São Paulo, Brasil.

Os testes de ecotoxicidade são ensaios laboratoriais realizados em condições específicas e controladas, que servem como ferramenta na avaliação de qualidade de água e sedimento, auxiliando na tomada de decisão, em pesquisa de avaliação de efeitos de contaminantes na biota aquática e para auxiliar na seleção de substâncias usadas na indústria farmacêutica e de aditivos agrícolas. As espécies indicadas para serem utilizadas como organismo-teste devem apresentar características como sensibilidade constante à uma diversidade de agentes químicos garantindo repetitividade e reproduzibilidade dos resultados; facilidade de cultivo e manutenção em laboratório e ciclos de vida curtos. Entre os organismos-teste para água doce recomenda-se o uso das espécies de alga *Scenedesmus subscapicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, de microcrustáceos *Daphnia magna*, *Daphnia similis*, *Cerodaphnia dubia*, de insetos *Chironomus sp.* e de peixes *Danio rerio* e *Poecilia reticulata* (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008).

O macroinvertebrado aquático bentônico *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) é amplamente utilizado em testes ecotoxicológicos por possuir tolerância à poluição e ser de fácil obtenção e manutenção. A espécie possui ciclo de vida curto, sendo os quatro estágios do organismo (ovo; instares larvais - I instar, II instar, III instar e IV instar; pupa e adulto) desenvolvido em cerca de 13 dias (FONSECA, 1997). Já o microcrustáceo filtrador *Daphnia magna* (Cladocera: Daphniidae), representativo do zooplâncton, é recomendado em ensaios ecotoxicológicos e avaliação da qualidade da água por apresentar sensibilidade à pequenas mudanças de qualidade e ser um organismo partenogenético, ou seja, com estabilidade genética.

Os ensaios de ecotoxicidade podem ser divididos em dois grupos: agudo e crônico. O teste de toxicidade aguda considera a frequência das respostas dos organismos de uma mesma população quando expostos a uma concentração definida de uma substância. Enquanto, o teste de toxicidade crônica tem como objetivo definir, dentre as concentrações analisadas, aquelas que não causam impacto de importância biológica sobre o *endpoint* (sobrevivência, reprodução, crescimento, dentre outros) (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Assim, no âmbito de avaliar se a cafeína em concentrações encontradas no meio ambiente (ng.L^{-1} e $\mu\text{g.L}^{-1}$) apresenta caráter tóxico agudo no ambiente aquático, foram realizados ensaios ecotoxicológicos com os organismos *D. magna* (espécie exótica representativa de clima temperado, adquiridos em laboratório) e *C. sancticaroli* (espécie representativa de clima tropical, adquiridos tanto em laboratório como em campo).

METODOLOGIA

A execução deste projeto foi realizada conforme detalhado a seguir e a síntese dos procedimentos realizados estão expostos na Figura 1, sendo que os testes de ecotoxicidade foram realizados no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.



Figura 1 - Fluxograma das etapas do projeto
Fonte dos dados: os Autores.

Para realização dos testes ecotoxicológicos, a cafeína (produto comercial em pó) foi adquirida pela Sigma-Aldrich® e armazenada ao abrigo de luz. O critério utilizado para determinar as diluições utilizadas como solução-teste foi a distribuição das concentrações de cafeína nos corpos d'água. Foram estabelecidas as concentrações 5, 15 e 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a fim de abranger a faixa de concentrações comumente encontradas, seguida da concentração de 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$, maior concentração encontrada em rios brasileiros e, 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, concentração provável em um cenário no qual o lançamento de esgotos domésticos é presente, havendo uma entrada contínua dessa substância nos recursos hídricos. Para o organismo-teste *C. sancticaroli*, a temperatura do ambiente foi controlada entre $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e o fotoperíodo definido para 12h luz/12h escuro. Os testes com esse organismo utilizaram as mesmas condições do cultivo, composto por água deionizada, areia e alimento (TRIVINHO-STRIXINO, 1980). Para o organismo-teste *D. magna* foi utilizado incubadora BOD (Incubadora BOD com fotoperíodo modelo SL-224, do fabricante SOLAB), com temperatura controlada entre $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h luz/ 8h escuro.

Além dos organismos cultivados em laboratório, foi realizado um teste preliminar com uma amostra de *C. sancticaroli* coletada em um matadouro de frango, localizado no município de São Carlos, São Paulo, Brasil. Para realização dos testes, os organismos foram aclimatizados durante cerca de um mês, e o teste foi realizado a partir das larvas provenientes de uma desova gerada em laboratório e desenvolvida no meio aquoso coletado em campo.

Os testes agudos para *C. sancticaroli* foram realizados em triplicata seguindo a metodologia adaptada de Fonseca (1997), com proporção de sedimento/solução-teste de 1:5. Os testes foram realizados em potes plásticos de 500 mL contendo a solução-teste de cafeína feita com água deionizada, areia e 4,8 mg de ração de peixe Tetramin® triturada. Os potes não foram aerados ou realimentados no período de 96 h. Os testes com *D. magna* foram realizados seguindo protocolo adaptado da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (2016), com a quantidade mínima de réplicas, contendo 10 organismos em cada e volume de solução de 100 mL. Portanto, os testes agudos foram realizados em bêqueres de 100mL contendo 100mL da solução-teste feita com água reconstituída ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 73,5 g.L^{-1} , KCl - 5,8 g.L^{-1} , NaHCO_3 - 64,8 g.L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 123,3 g.L^{-1} diluídos em água deionizada) e sem adição de alimento. Os bêqueres ficaram cobertos por filme plástico transparente a fim de evitar a evaporação da água. O monitoramento das variáveis condutividade elétrica e pH foi realizado com o intuito de verificar se houve mudanças no padrão da ecotoxicidade da cafeína nos organismos.

Tabela 2 – Parâmetros utilizados para a realização dos testes ecotoxicológicos agudos

	Teste agudo <i>C. sancticaroli</i>	Teste agudo <i>D. magna</i>
Solução-teste	250 mL	100 mL
Areia	50 g	-
Quantidade de organismos	6 larvas III ou IV instar	10 neonatos com menos de 24h de vida
Exposição	96 h	48 h
Número de réplicas	3	2

Fonte: FONSECA (1997), ABNT (2016)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante os testes de ecotoxicidade aguda estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Índice de mortalidade médio (%) dos organismos quando expostos à cafeína no ensaio agudo.

Concentração de cafeína ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Índice mortalidade (%)		
	<i>D. magna</i> (n=6)	<i>C. sancticaroli</i> (laboratório – n=6))	<i>C. sancticaroli</i> (campo – n=3)
0 (controle)	0	0	0
5	0	0	0
15	0	6,8	0
30	0	10,2	0
127	0	11,1	0
200	0	19,5	11

Fonte dos dados: os Autores.

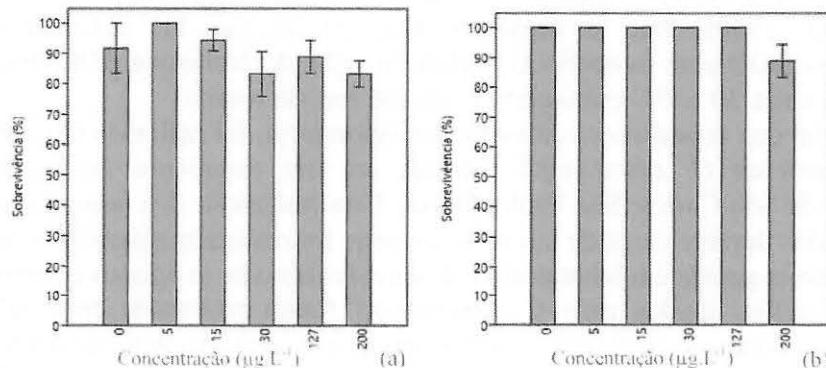


Figura 2 - Porcentagem de sobrevivência dos organismos *C. sancticaroli* (a) laboratório e (b) campo expostos à cafeína e seus devidos erros padrões

Fonte dos dados: os Autores.

Os testes de ecotoxicidade aguda com *C. sancticaroli* cultivados em laboratório mostraram que a cafeína nas concentrações de 5, 15, 30 e 127 $\mu\text{g.L}^{-1}$ podem ser consideradas não tóxicas, enquanto para a concentração 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pode ser considerado indício de toxicidade. Os organismos *D. magna* e *C. sancticaroli* (amostrados do campo) não apresentaram imobilidade/mortalidade à cafeína nas concentrações utilizadas em nenhuma réplica, sendo observado 100% de sobrevivência com exceção à concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

O teste de Tukey foi aplicado com o auxílio do software Past a fim de avaliar diferenças estatísticas entre os resultados obtidos para os organismos *C. sancticaroli* obtidos em campo e cultivado em laboratório. O fator “local de obtenção dos organismos” se mostrou diferente entre si ($p=0,000602$), enquanto para o fator “concentração”, apenas a concentração

de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentou diferença estatística quando comparado ao controle, 5 e $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ ($p=0,001695$, $0,001695$ e $0,01024$, respectivamente).

Essa diferença entre organismos da mesma espécie obtidos de diferentes locais pode ser explicada pelo nível de sensibilidade dos mesmos, que é controlada a partir de testes com uma substância de referência, no caso, o cloreto de potássio (KCl). Para os períodos em que os testes foram desenvolvidos os organismos coletados em campo apresentaram taxa de sensibilidade inferior àqueles cultivados no laboratório, podendo justificar a sobrevivência dos mesmos.

CONCLUSÃO

Esse estudo sugere com base às respostas agudas dos organismos que para as concentrações de cafeína usualmente encontradas nos corpos hídricos não foi observado efeito de imobilidade nos neonatos de *D. magna* ou mortalidade nas larvas de *C. sancticaroli* coletados em campo. Por outro lado, foram observadas baixas taxas de mortalidade a partir da concentração de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ para as larvas de *C. sancticaroli* cultivados em laboratório. Apesar de baixas, do ponto de vista ecológico, a morte de 20% de organismos (concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$) pode causar um desequilíbrio local da biodiversidade presente nos corpos hídricos.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713:** ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* ssp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2016.

ALMEIDA, G. A. de. **Identificação de poluentes orgânicos na represa Billing - São Paulo.** 2003. 256 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

CANELA, M. C. et al. **Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil/ Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas.** São Carlos: Editora Cubo, 2014.

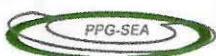
CANTWELL, M. G. et al. Caffeine in Boston Harbor past and present, assessing its utility as a tracer of wastewater contamination in an urban estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 108, n. 1–2, p. 321–324, 2016.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** 2^ªed. São Carlos: RiMa, 2008. p. 486.

EDWARDS, Q. A.; KULIKOV, S. M.; GARNER-O'NEALE, L. D. Caffeine in surface and wastewaters in Barbados, West Indies. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 57, 2015.

FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água da Bacia do rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados.** 1997. 220 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 1997.

GHISELLI, G. **Avaliação das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP).** 2006. 181 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2006.



XVI Simpósio
do Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Engenharia Ambiental
29 a 31 de Outubro de 2018.
EESC - São Carlos-SP - Brasil

RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia.** 2007. 55 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2007.

WANG, C. et al. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Water Research**, v. 45, n. 4, p. 1818–1828, 2011.

WEIGEL, S.; KUHLMANN, J.; HÜHNERFUSS, H. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: Occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. **Science of the Total Environment**, v. 295, n. 1–3, p. 131–141, 2002.

TRIVINHO-STRIXINO, S. **Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlensis* sp. n. (Diptera: Chironomidae).** 1980. 182 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1980.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações.** 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008.

FONTE FINANCIADORA

Esse estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).