

Efeito da cetamina na fauna edáfica: ensaios de fuga e reprodução com *Eisenia fetida*

Effect of ketamine on edaphic fauna: behaviour and reproduction assay with *Eisenia fetida*

Mariana Silva¹, João Ricardo Sousa^{1,2,*}, Ondina Ribeiro^{1,2}, João Ferreira¹, Cláudia Ribeiro^{3,4},
M.E. Tiritan^{3,4,5}, Tiago Natal-da-Luz⁶ & João Soares Carrola^{1,2}

¹ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

² Centro de Investigação e Tecnologias Agroambientais e Biológicas (CITAB), UTAD, Vila Real, Portugal

³ TOXRUN-Unidade de Toxicologia, Instituto Universitário de Ciências da Saúde, CESPU, CRL, 4585-116 Gandra, Portugal

⁴ Centro Interdisciplinar de Pesquisas Marinhas e Ambientais (CIMAR), University of Porto, Edifício do Terminal de Cruzeiros do Porto de Leixões, Matosinhos, Portugal

⁵ Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal

⁶ Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

(*E-mail: jricardo@utad.pt)

<https://doi.org/10.19084/rca.28700>

RESUMO

A utilização crescente de cetamina para fins terapêuticos e recreativos tem motivado preocupações ao nível ambiental. Esta substância tem sido detetada em efluentes, devido à ineficiência das técnicas aplicadas nas estações de tratamento de águas residuais. Sendo que parte destes efluentes podem ser usados como águas para reutilização em práticas agrícolas, importa perceber os efeitos que a cetamina apresenta em organismos edáficos como as minhocas, facto que constitui o objetivo deste trabalho. Várias concentrações de cetamina (0, 25, 250 e 2500 µg/kg) foram testadas e avaliados os efeitos, através de testes de fuga e reprodução, usando como modelo biológico as minhocas *Eisenia fetida*, tendo como *endpoints* o comportamento de fuga e a reprodução, de acordo com as normas da ISO e OECD. Os resultados indicaram ausência de diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as concentrações estudadas. Em média, a cetamina promoveu a fuga e a diminuição do número de juvenis na ordem dos 11% e 26%, respetivamente, comparativamente ao tratamento controlo. Estes resultados parecem indicar que as concentrações estudadas não promovem efeitos negativos quer no comportamento como na reprodução, pelo que importa ponderar a realização de mais estudos, nos quais sejam consideradas concentrações superiores às aplicadas no presente trabalho, de modo a definir níveis de risco em ambiente edáfico.

Palavras-chave: cetamina, *Eisenia fetida*, fuga, poluição, solo.

ABSTRACT

The increasing use of ketamine for therapeutic and recreational purposes has increased the environmental concerns. This substance has been detected in treated effluents, due to the inefficiency of treatments applied in wastewater treatment plants. Since part of these effluents can be used as water for reuse in agricultural practices, it is important to understand the effects of ketamine on edaphic organisms such as earthworms, which is the objective of the present work. Various concentrations of ketamine (0, 25, 250 and 2500 µg/kg) were tested and the effects evaluate by avoidance and reproduction tests, using *Eisenia fetida* as a biological model, considered the avoidance behaviour and reproduction as *endpoints*, according to ISO and OECD guidelines. The results indicated no significant differences ($p > 0.05$) between the concentrations studied. On average, ketamine promoted an escape and a decrease in the number of juveniles in the order of 11% and 26%, respectively, compared to the control treatment. These results seem to indicate no negative effects of the studied concentrations on behaviour and reproduction of earthworms. More studies are needed, with higher concentrations than those applied in the present work in order to define risk levels in edaphic environment.

Keywords: ketamine, *Eisenia fetida*, behaviour, pollution, soil.

INTRODUÇÃO

O solo, como parte do ecossistema, tem um importante papel em termos ambientais. Mais recentemente são vários os exemplos associados à presença de contaminantes de preocupação emergente no solo, como o caso da cetamina, que poderão diminuir a respetiva capacidade de fornecer serviços ao ecossistema (Sara, 2018).

A cetamina é um anestésico usado em medicina humana e veterinária, sendo excretada maioritariamente na sua forma conjugada. Este composto poderá permanecer biologicamente ativo nos ambientes aquáticos e edáficos, devido à ineficiência dos sistemas de tratamento de afluentes (Li *et al.*, 2017), que geram águas para reutilização e lamas que podem ter como destino final o solo, contribuindo para a contaminação e, conseqüente, redução da qualidade deste recurso.

A utilização de organismos da fauna edáfica, como o caso das minhocas, em testes de fuga ou reprodução, poderão fornecer informações importantes para a compreensão dos efeitos dos contaminantes na qualidade do solo. Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito de diferentes concentrações de cetamina no comportamento de fuga e reprodução da *Eisenia fetida*, de modo a estimar potenciais riscos da sua presença no solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Na realização do trabalho foram aplicadas as normas para o estudo de substâncias químicas (ISO, 2008). Para o efeito, foi preparado um solo artificial com base na mistura turfa, caulino e areia na proporção de 10, 20 e 70% (peso seco) (ps), respetivamente. A capacidade máxima de retenção de água (CMRA) da mistura foi determinada e ajustado o teor de humidade para valores de 40% da CMRA. O valor de pH inicial foi corrigido para valores de $6,0 \pm 0,5$, através da adição de CaCO_3 (pa).

Como bioindicador foi usada a espécie *Eisenia fetida*, devido à elevada sensibilidade e fecundidade, menor tempo de geração e maior facilidade de manutenção em condições laboratoriais. Cerca de 300 indivíduos adultos, com clitelo bem desenvolvido, com uma biomassa entre os 300 e 600 mg, foram

selecionados e colocados em solo artificial, durante 24 a 48 horas antes de serem usados nos ensaios, para efeitos de aclimação.

Nos ensaios de fuga e reprodução (Figura 1), foram estudadas quatro concentrações (tratamentos) de cetamina, equivalentes a 0, 25, 250 e 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sendo incluídas três repetições para cada concentração. A cetamina foi adquirida na forma comercial do medicamento NIMATEK®, para uso veterinário, sendo aplicada na forma de solução aquosa.

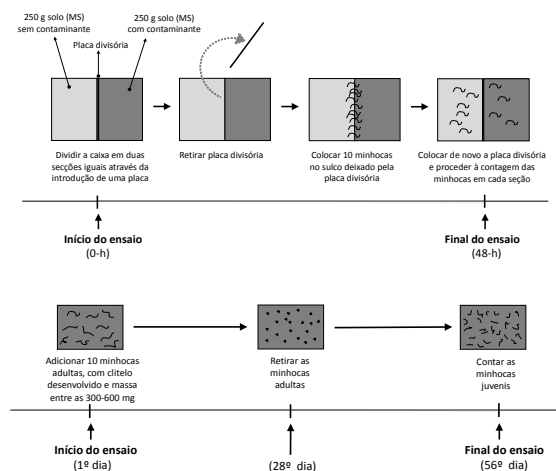


Figura 1 - Ensaios de incubação com *Eisenia fetida*: (a) fuga e (b) reprodução.

Para cada ensaio, de acordo com os tratamentos e repetições testadas, foram usadas 12 caixas de PVC (24*30*5 cm) como recipiente-teste, perfuradas para facilitar trocas gasosas e tapadas para retenção da humidade. Ambos os ensaios foram realizados sob idênticas condições laboratoriais de temperatura (20 ± 2 °C), fotoperíodo (16-h de luz e 8-h de escuro), intensidade de luz, arejamento e humidade.

No ensaio de fuga (Figura 1.a), em cada recipiente-teste, foi colocada uma placa divisória e cada seção preenchida com 250 g de solo artificial (ps) a 40% da CMRA, com cetamina à concentração estudada (solo-teste) ou sem cetamina (solo-controlo). Após remoção da placa 10 minhocas foram colocadas na linha divisória entre seções e deixadas em contato durante um período de 48-h. No final do ensaio, a placa divisória foi recolocada na zona central, procedendo-se à contagem do número de organismos em cada seção, com e sem cetamina, e

determinada a percentagem de fuga (x) de acordo com a equação 1:

$$x (\%) = [(n_c - n_t) / N] * 100 \quad (\text{Eq.1})$$

em que n_c , n_t e N são referentes ao número de minhocas no solo-controlo, solo-teste e número total de minhocas por recipiente-teste, respetivamente.

No ensaio de reprodução manteve-se o delineamento experimental, aumentando o período de exposição à cetamina para 56 dias. Em cada recipiente-teste colocaram-se 500 g de solo artificial (ps), a 40% CMRA, com uma solução de cetamina a concentração variável, de acordo com o tratamento estudado (Figura 1.b). Um tratamento controlo, sem cetamina, foi também incluído, no qual foi adicionado igual volume de água destilada. Dez minhocas, previamente aclimatadas, depuradas, foram colocadas por recipiente-teste e expostas às concentrações de cetamina estudadas. A cada 7 dias, procedeu-se ao controlo gravimétrico do teor de humidade e alimentação, com aveia biológica moída (1 g) e esterilizada em camara UV. Ao fim de 28 dias de incubação foram retiradas as minhocas adultas e os juvenis e casulos foram mantidos por mais 28 dias, ao fim dos quais foi realizada a contagem de juvenis, em cada tratamento e repetição.

Os dados obtidos em cada teste foram sujeitos a uma análise para avaliar a normalidade na distribuição e a homogeneidade de variâncias, pelos testes de Shapiro-Wilk e Barlett, respetivamente. Posteriormente, os dados foram sujeitos a uma ANOVA a um factor, seguida do teste de Dunnett para um grau de probabilidade de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para o teste de fuga, relativos à distribuição dos indivíduos nas secções em cada recipiente teste, para as concentrações de cetamina estudadas, são apresentados na Figura 2. A presença de cetamina não influenciou o comportamento das minhocas, não sendo observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as respetivas secções, com e sem cetamina, em todas as concentrações estudadas. Para a percentagem de fuga (x), as concentrações de 25 e 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ revelaram valores de 13% e a concentração de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ cerca de 6%.

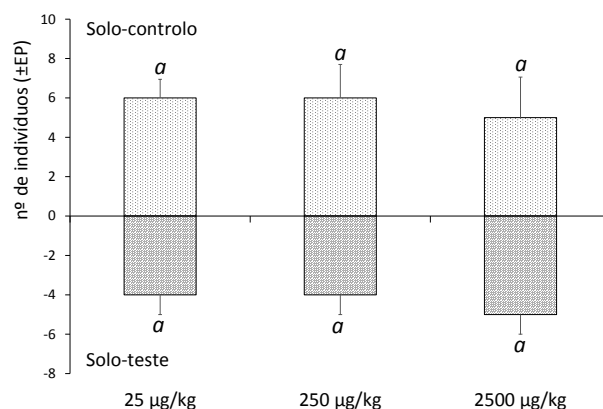


Figura 2 - Ensaio de fuga: distribuição dos indivíduos (média±EP), pelas secções com solo teste e controlo, em cada recipiente-teste, para as concentrações estudadas. (barras, relativas a cada concentração de cetamina, com a mesma letra em cada secção, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Dunnett, para 5% de probabilidade).

No teste de reprodução manteve-se a tendência observada no teste de fuga, com as concentrações de cetamina a não afetar de forma significativa a capacidade reprodutiva das minhocas (figura 3). Ainda assim, comparativamente ao grupo controlo, é observada uma tendência de redução do número de juvenis em todos os tratamentos com cetamina que, em termos médios, apresentou uma redução de 26% em relação ao controlo.

A coerência dos resultados obtidos nas metodologias testadas sugere que a presença de cetamina, para as concentrações estudadas, não altera a qualidade do solo ou induz efeitos de toxicidade

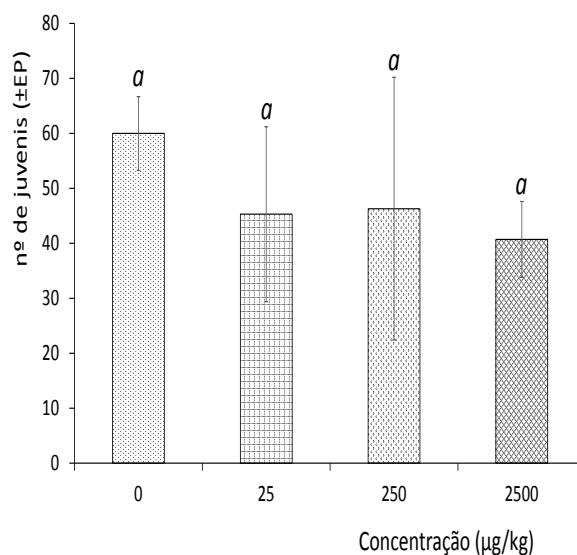


Figura 3 - Ensaio de reprodução. (barras, relativas a cada concentração de cetamina, com a mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Dunnett, para 5% de probabilidade).

na *E. fetida*. Lin *et al.* (2020), em estudos com cetamina em meio aquoso, com *Daphnia magna*, observaram efeitos negativos a partir de concentrações 10 vezes superiores à concentração máxima testada no presente trabalho (2500 µg/kg). A ausência de efeito da cetamina poderá estar relacionada com o efeito tampão induzido pela matriz de suporte usado no trabalho (De Silva *et al.*, 2009). Compostos constituintes, como húmus e argilas do tipo 1:1, são responsáveis por fenómenos de adsorção e complexação, que podem mitigar os efeitos da presença e concentração de cetamina no solo artificial.

As menores quantidades de cetamina biodisponível como o menor tempo de exposição nos ensaios de fuga (48-h) não permitem um efeito bioacumulativo, limitando o nível de reposta e, desta forma, condicionando o comportamento de fuga da *E. fetida* (Demuyne *et al.*, 2016). Todavia, o maior tempo de exposição no ensaio de reprodução, não se revelou suficiente para detetar efeitos nas concentrações estudadas ao nível da reprodução, apesar da tendência de diminuição do número de juvenis na presença de cetamina, facto que poderá estar associado ao gasto energético usado na remoção do contaminante, limitando a energia disponível para processos biológicos, como o crescimento ou diferenciação (Spurgeon & Hopkin, 1996).

Apesar de Donker *et al.* (1993) referir o número de juvenis como um parâmetro de maior sensibilidade neste tipo de estudos, ambos os testes apresentam uma elevada correlação (Figura 4), com o teste de fuga a explicar mais de 99% da variância observada no teste de reprodução. A correlação negativa revela uma diminuição do nº de juvenis com o aumento da percentagem de fuga por parte

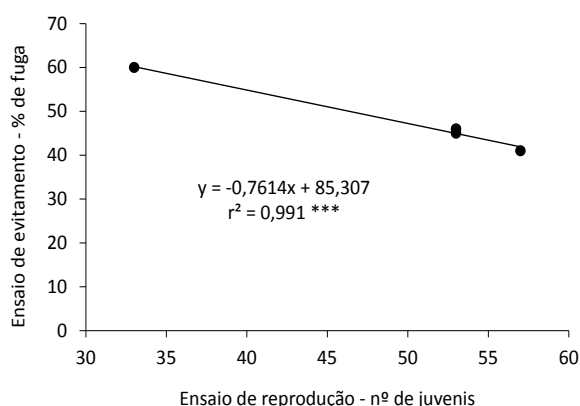


Figura 4 - Regressão entre os testes de fuga e reprodução realizados para as diferentes concentrações estudadas. (***) altamente significativo para um nível de probabilidade <0,001).

das minhocas, corroborando os pressupostos sugeridos por Spurgeon & Hopkin (1996). Estes resultados permitem, ainda, referir que neste tipo de testes, em que o objetivo é realizar uma avaliação preliminar ou complementar da degradação e habitabilidade do solo na presença de contaminantes, o teste de fuga parece ser mais adequado devido à sua maior exequibilidade, rapidez e até, como certos autores defendem (Hund-Rinke & Wiechering, 2001), sensibilidade.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos não revelaram efeitos negativos da presença de cetamina comparativamente ao solo controlo pelo que, para as concentrações estudadas, podemos concluir que não existe riscos para a *Eisenia fetida*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Silva, P.M.C.S.; Pathiratne, A. & Van Gestel, C.A.M. (2009) - Influence of temperature and soil type on the toxicity of three pesticides to *Eisenia andrei*. *Chemosphere*, vol. 76, n. 10, p. 1410-1415. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.006>
- Demuynck, S.; Lebel, A.; Grumiaux, F.; Pernin, C.; Leprêtre, A. & Lemièrre, S. (2016) - Comparative avoidance behaviour of the earthworm *Eisenia fetida* towards chloride, nitrate and sulphate salts of Cd, Cu and Zn using filter paper and extruded water agar gels as exposure media. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 129, p. 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.013>
- Donker, M.; Zonneveld, C. & Van Straalen, N. (1993) - Early reproduction and increased reproductive allocation in metal adapted populations of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Oecologia*, vol. 96, p. 316-323. <https://doi.org/10.1007/BF00317500>
- Hund-Rinke, K. & Wiechering, H. (2001) - Earthworm avoidance test for soil assessments. An alternative for acute and reproduction test. *Journal of Soils and Sediments*, vol. 1, p. 15-20. <https://doi.org/10.1007/BF02986464>
- ISO (2008) - *Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour-Part 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*. ISO 17512-1. International Organization for Standardization, Genève.
- Li, S.-W.; Wang, Y.-H. & Lin, A.Y.-C. (2017) - Ecotoxicological effect of ketamine: Evidence of acute, chronic and photolysis toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 143, p. 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.040>
- Lin, Y.-C.; Hsiao, T.-C. & Lin, A.Y.-C. (2020) - Urban wastewater treatment plants as a potential source of ketamine and methamphetamine emission to air. *Water Research*, vol. 172, art. 115495. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115495>
- Sara, B. (2018) - *Soil ecosystem services: a overview*. In *Managing Soil health for Sustainable Agriculture* (pp 1-22). Burleigh Dadds Science Publishing Limited. USDA-ARS and University of Minnesota, USA.
- Spurgeon, D.J. & Hopkin, S.P. (1996) - The effects of metal contamination on earthworm populations around a smelting works: quantifying species effects. *Applied Soil Ecology*, vol. 4, n. 2, p. 147-160. [https://doi.org/10.1016/0929-1393\(96\)00109-6](https://doi.org/10.1016/0929-1393(96)00109-6)