

Avaliação do efeito tóxico da metafedrona em minhocas da espécie *Eisenia fetida* usando os ensaios de fuga e de reprodução

Evaluation of the toxic effect of metaphedrone on earthworms of the species *Eisenia fetida* using avoidance and reproduction tests

Ondina Ribeiro^{1,2,3,4}, Vera Pinto¹, Tiago Natal-da-Luz⁴, João Ricardo Sousa^{1,2}, Cláudia Ribeiro³ e João Soares Carrola^{1,2,*}

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

² Centro de Investigação e Tecnologias Agroambientais e Biológicas (CITAB), Instituto de Inovação, Capacitação e Sustentabilidade da Produção Agroalimentar (Inov4Agro), Vila Real, Portugal

³ Unidade de Investigação em Toxicologia & Uma Só Saúde (1H-TOXRUN), Instituto Universitário de Ciências da Saúde (IUCS), CESPU, CRL, Gandra, Portugal

⁴ CFE-Centro de Ecologia Funcional – Ciências para as pessoas e para o Planeta, Laboratório Associado TERRA, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

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

<https://doi.org/10.19084/rca.33463>

Recebido/received: 2023.07.31

Aceite/accepted: 2023.10.16

RESUMO

O aumento do consumo de substâncias psicoativas (SPAs) tem gerado preocupação ambiental, devido ao consequente aumento de SPAs nos ecossistemas de água doce e terrestre. A metafedrona (3-MMC) é uma catinona sintética excretada na urina após o seu consumo, podendo chegar ao ambiente. Devido à presença das SPAs no solo, torna-se importante estudar os efeitos que podem ter nos organismos edáficos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos da 3-MMC em minhocas da espécie *Eisenia fetida*. Foram testadas diferentes concentrações (25, 250 e 2500 µg kg⁻¹) no comportamento de fuga e na reprodução de *E. fetida* ao longo de 48 horas e 56 dias, respetivamente. As diferentes concentrações testadas não induziram efeitos significativos na percentagem de fuga ou no número de juvenis eclodidos. Estes resultados mostram que esta SPA não afeta os parâmetros estudados, no entanto pode ser relevante realizar estudos mais prolongados, testar exposição a misturas de SPAs, assim como avaliar os efeitos desta substância noutros invertebrados edáficos com papel relevante na ecologia dos solos agrícolas.

Palavras-chave: Metafedrona, *Eisenia fetida*, ensaio de evitamento, reprodução, solo.

ABSTRACT

The increased consumption of psychoactive substances (PAS) has generated environmental concern, due to the consequent increase of SPAs in freshwater and terrestrial ecosystems. Methaphedrone (3-MMC) is a synthetic cathinone excreted in the urine after consumption and may reach the environment. Due to the presence of SPAs in the soil, it is important to study the effects they may have on soil organisms. Thus, the objective of this work was to evaluate the possible toxic effects of 3-MMC on earthworms of the species *Eisenia fetida*. Different concentrations (25, 250 and 2500 µg kg⁻¹) were tested on avoidance behaviour and reproduction of *E. fetida* over 48 hours and 56 days, respectively. The different concentrations tested did not induce significant effects on the avoidance percentage or the number of hatched juveniles. These results show that this SPA does not affect the parameters studied, however, it may be relevant to carry out longer studies, test exposure to mixtures of SPAs, as well as to evaluate the effects of this substance on other edaphic invertebrates with a relevant role in the ecology of agricultural soils.

Keywords: Metaphedrone, *Eisenia fetida*, avoidance, reproduction, soil.

INTRODUÇÃO

Os solos agrícolas são fundamentais na produção de alimentos, e apresentam uma importância cada vez mais vital tendo em conta o aumento da população mundial e as necessidades alimentares crescentes (Silver *et al.*, 2021). A aplicação de lamas das estações de tratamento de águas residuais (ETARs) em solos agrícolas é uma prática que visa compensar a perda de fertilidade dos solos, contribuir para o aumento da matéria orgânica e de nutrientes vegetais para as plantas, e resolver o problema da gestão de resíduos das lamas como um excedente. No entanto, esta aplicação pode levar ao aumento da concentração de diversos contaminantes no solo tais como as substâncias psicoativas (SPAs) e de outros compostos bioativos como fármacos, uma vez que estes compostos podem ser adsorvidos nas lamas (Álvarez-Ruiz *et al.*, 2015). Desta forma, a aplicação de lamas contaminadas nas parcelas agrícolas pode representar uma ameaça para o solo e para os diversos organismos terrestres (Langford, 2011) e as suas funções ecológicas, bem com algum risco para o Homem.

O aumento do consumo de SPAs para fins recreativos tem gerado preocupação porque estes compostos, uma vez consumidos, são excretados na sua forma original ou como metabólitos, chegando às ETARs. Devido às suas propriedades biológicas, as SPAs podem causar efeitos adversos nos organismos expostos (Carter *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2023), sendo considerados poluentes pseudopersistentes (Gualano *et al.*, 2014) mas podem também afetar diversos serviços do ecossistema envolvidos mesmo em concentrações muito baixas (Santana-Viera *et al.*, 2023).

A metafedrona (3-MMC) é uma catinona sintética pertencente à classe das feniletilaminas, com efeitos psicoestimulantes (Ferreira *et al.*, 2019). Este contaminante emergente chega aos ecossistemas aquáticos através da excreção pela urina ou descarte inapropriado, e conseqüentemente aos solos (Subedi & Kannan, 2015) podendo causar efeitos adversos nos organismos edáficos e na ecologia do solo.

As minhocas são organismos importantes para a estrutura, fertilidade e ecologia do solo, sendo facilmente afetadas pelos diversos tipos de

contaminação do solo. Deste modo, as minhocas da espécie *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* apresentam uma série de vantagens como bioindicadores relevantes sendo recomendados nos ensaios ecotoxicológicos padronizados pelas entidades internacionais (OECD, 1984).

Apesar da crescente contaminação dos ecossistemas com SPAs (Santana-Viera *et al.*, 2023), a avaliação dos efeitos potenciais destas substâncias nos organismos do solo é escassa. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi estudar os potenciais efeitos da 3-MMC no comportamento de fuga e reprodução da *E. fetida*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A 3-MMC foi adquirida na LGC Standards (Wesel, Alemanha). Para a realização dos ensaios foram seguidas as diretrizes para o estudo de substâncias químicas usando o ensaio de fuga (ISO, 2008) e o ensaio de reprodução (ISO, 2012; OECD, 2016). Para isso, foi preparado um solo artificial constituído por 70 % de areia de silício (0,7 mm, Axton), 20% de caulino em pó (MIBAL, Portugal) e 10 % de turfa seca (SIRO 100), com base no peso seco (*ps*). Posteriormente, foi determinada a capacidade máxima de retenção de água (CMRA) e o valor de humidade foi ajustado para valores de 40% da CMRA. Adicionalmente, o valor de pH inicial do solo artificial foi corrigido para valores de $6,0 \pm 0,5$ através da adição de CaCO_3 (Labsolve, Portugal).

Antes do início dos ensaios, foram pesadas e selecionadas cerca de 300 minhocas adultas da espécie *E. fetida* (com clitelo bem desenvolvido) com biomassa compreendida entre as 300 e 600 mg, e colocadas em solo artificial durante 24 a 48 horas para se aclimatarem. Para os ensaios de fuga e de reprodução, foram testadas três concentrações de 3-MMC, 25, 250 e 2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (de forma a incluir as concentrações encontradas nas águas de superfície e residuais (Mwenesongole *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2017)) e um controlo, sendo realizadas três réplicas por controlo e cada concentração estudada.

De acordo como design experimental, foram utilizadas 12 caixas de PVC, como recipiente-teste para cada ensaio (controlo, exposição), com as respetivas tampas devidamente furadas, para possibilitar as

trocas gasosas, mas impedir a saída das minhocas. Os ensaios decorreram sob condições laboratoriais constantes de temperatura (20 ± 2 °C), fotoperíodo (16h luz/8h escuro), intensidade de luz, arejamento e humidade.

Para a realização do ensaio de fuga (Figura 1), foi colocada uma placa divisória (separador) a meio de cada recipiente-teste, e posteriormente cada secção foi preenchida com 250 g de solo artificial (equivalente a *ps*) a 40% da CMRA, ao qual foi adicionado 3-MMC nas diferentes concentrações selecionadas e um solo controlo. Depois da remoção da placa divisória, foram inseridas 10 minhocas na linha central entre as duas secções de solo e deixadas a incubar durante 48 horas. Posteriormente, a placa divisória foi inserida novamente na linha central, procedendo-se à contagem do número de organismos em cada secção, de forma a determinar a percentagem de fuga (x) de acordo com a seguinte equação:

$$x (\%) = \frac{n_c - n_t}{N} \times 100$$

em que n_c representa o número de minhocas presentes no solo controlo, n_t representa o número de minhocas presentes no solo teste e N o número total de minhocas por recipiente-teste.

Para o ensaio de reprodução (Figura 2) foram colocadas 500 g de solo (equivalente a *ps*), a 40% de CMRA com a respetiva concentração de 3-MMC. Também foi realizado um tratamento controlo, sem a adição de 3-MMC ao solo. De seguida, foram

colocadas 10 minhocas adultas em cada recipiente-teste, previamente aclimatadas e depuradas, e adicionou-se 1 g de aveia biológica moída e previamente esterilizada numa câmara de luz ultravioleta. A cada 7 dias, procedeu-se ao controlo gravimétrico do teor de humidade e à alimentação. Após 28 dias de exposição, as minhocas adultas foram retiradas dos recipientes-teste e os casulos foram mantidos por mais 28 dias, ao fim dos quais foi realizada a contagem dos juvenis eclodidos em cada tratamento e replica.

Os resultados obtidos no ensaio de fuga foram analisados pelo teste exato de Fisher, como descrito em Natal-da-Luz *et al.* (2004). Este procedimento estatístico permite comparar a distribuição dos organismos em relação a uma distribuição esperada assumindo a inexistência de uma resposta de fuga a um determinado tipo de solo (hipótese nula). Foi utilizado um teste unicaudal no qual a hipótese nula assume que metade dos organismos permanece no solo que está a ser avaliado, não havendo fuga. Para os testes duais, foi testado um teste bicaudal, no qual a hipótese nula assume uma distribuição igual dos organismos em ambas as secções do recipientes-teste. As hipóteses nulas foram rejeitadas para probabilidades iguais ou inferiores a 0,05.

Os dados da reprodução foram sujeitos a uma análise de normalidade na distribuição e homogeneidade de variâncias, pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respetivamente. Posteriormente, os dados foram sujeitos a uma ANOVA de 1 fator, seguida do teste de Dunnett para um grau de probabilidade de $p \leq 0,05$.

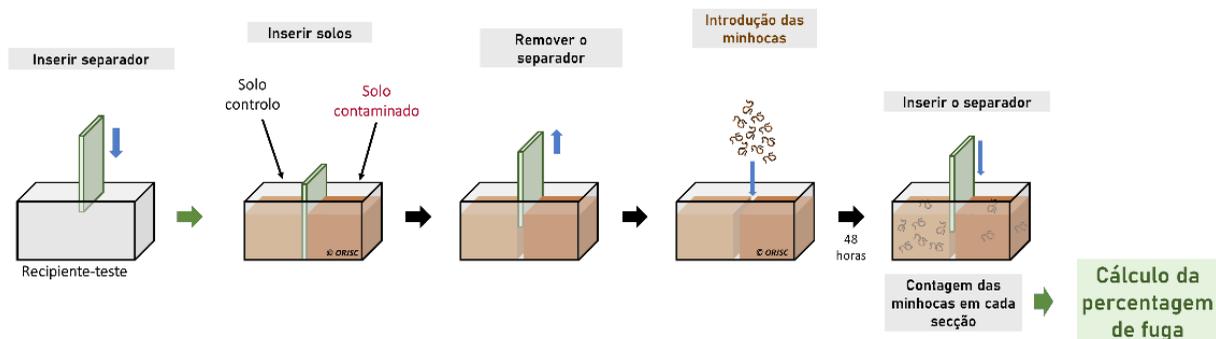


Figura 1 - Esquema do delineamento experimental do ensaio de comportamento realizado com minhocas adultas (autores Ondina Ribeiro e João Soares Carrola, adaptado de Stander *et al.* (2019)).

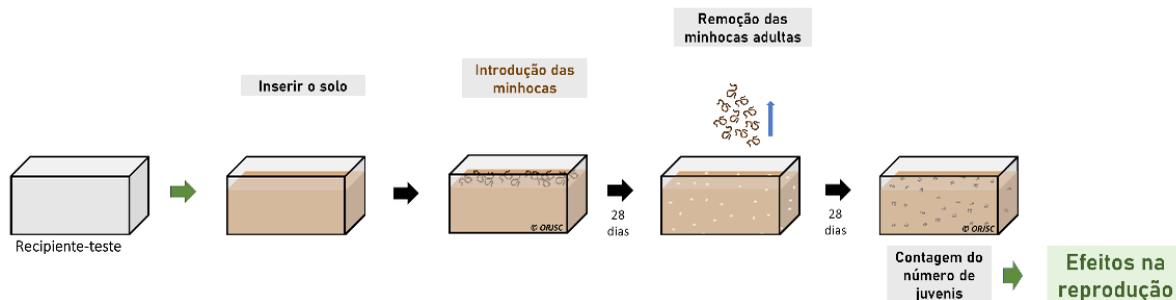


Figura 2 - Esquema do delineamento experimental do ensaio de reprodução realizado com minhoca (autores *Ondina Ribeiro e João Soares Carrola*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados para o ensaio de fuga, relativos à distribuição das minhocas adultas em cada uma das secções, são apresentados na Figura 3. A presença de 3-MMC no solo não induziu um comportamento de fuga nas minhocas para todas as concentrações de substância testada, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os resultados do solo controlo *vs.* solo teste ($p > 0,05$). Para a concentração de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ observou-se uma percentagem de fuga de 40%, enquanto que para as concentrações mais elevadas (250 e $2500 \mu\text{g kg}^{-1}$) observou-se uma percentagem de fuga de 6,67% em relação ao controlo. Apesar da percentagem de fuga ser mais elevada na

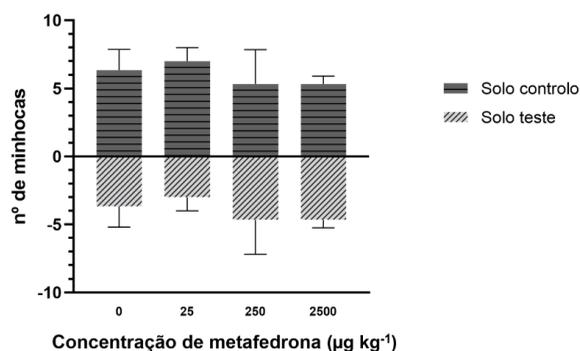


Figura 3 - Resultados do ensaio de fuga das minhocas (*E. fetida*), que mostram o número de minhocas em função da concentração testada (valores representados em forma de médias e desvio-padrão; $n=3$).

concentração mais baixa, este comportamento não foi significativo ($p = 0,084$), nem muito evidente ou consistente com o aumento das concentrações.

Relativamente ao ensaio de reprodução verificou-se que as diferentes concentrações de 3-MMC não afetam significativamente ($p > 0,05$) a capacidade reprodutiva das minhocas à semelhança do ensaio de fuga, tal como apresentado na Figura 4.

Analisando os resultados obtidos para os dois ensaios realizados, estes sugerem que a 3-MMC não induz toxicidade na espécie *E. fetida* nem altera a qualidade da matriz do solo. Carter *et al.* (2016) observaram que a exposição de minhocas (*E. fetida*) a diferentes fármacos, como carbamazepina,

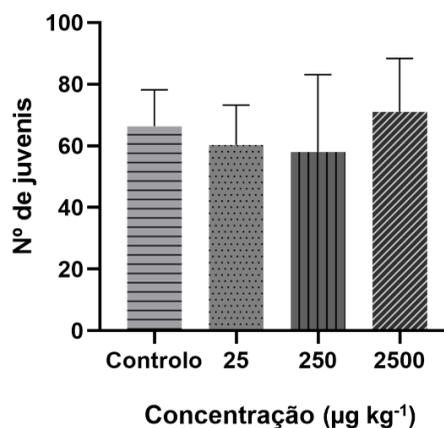


Figura 4 - Resultados do ensaio de reprodução com minhocas da espécie *E. fetida* após 56 dias de exposição de (valores expressos sob a forma de média \pm desvio-padrão, $n=3$).

diclofenac, fluoxetina e orlistato em concentrações de 26, 25, 28 e 44 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respetivamente, não induziram efeitos no comportamento de escavação dos organismos expostos. No entanto, a exposição ao antibiótico lasalocida induziu uma resposta de fuga significativa com o aumento das concentrações testadas em minhocas da espécie *E. andrei* (Žižek & Zidar, 2013).

Uma vez que o ensaio de fuga é de curta duração (48 horas), isso pode limitar o nível de resposta das minhocas e não ser suficiente para se observar os efeitos adversos da substância testada. Desta forma, foi realizado o ensaio de reprodução (ensaio crónico, 28 + 28 dias) para possível avaliação do risco uma vez que a 3-MMC fica mais tempo biodisponível. No entanto, este maior tempo de exposição não foi suficiente para se detetar efeitos tóxicos da 3-MMC na reprodução desta espécie.

Apesar desta SPA poder induzir efeitos adversos em organismos aquáticos (Ferreira *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2023), a sorção de SPAs não depende apenas da sua lipofilicidade mas também da solubilidade, temperatura, pH e conteúdo da matéria orgânica do solo (Santana-Viera *et al.*, 2023), o que pode alterar a sua toxicidade nos organismos do solo. Assim, a ausência da toxicidade da 3-MMC presente no solo pode estar relacionada com os fenómenos de adsorção e complexação que os constituintes do solo (matéria orgânica e argilas) exercem no composto. Pode ainda existir um efeito tampão que diminui a biodisponibilidade da 3-MMC (Silva & van Gestel, 2009) e mitiga os efeitos adversos nos organismos expostos.

CONCLUSÕES

Os estudos sobre os efeitos de SPAs em minhocas são escassos e até ao momento não foi encontrado

nenhum trabalho que avalie o efeito tóxico da 3-MMC na espécie *E. fetida* o que mostra a importância e inovação deste trabalho.

Os resultados obtidos mostram que a 3-MMC não induz efeitos tóxicos na espécie *E. fetida*, para a gama de concentrações testadas (25, 250 e 2500 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Estes dados preliminares indicam que a 3-MMC não interfere no comportamento de evitamento nem na reprodução da *E. fetida* mesmo na concentração mais alta.

No entanto, é importante realizar mais estudos para complementar estes dados, desde avaliar a possível degradação destas substâncias no solo, estudar os efeitos desta substância isolada ou de misturas de várias SPAs nas minhocas e também noutros invertebrados edáficos (com papel relevante na ecologia dos solos agrícolas) bem como investigar a sua bioacumulação ao longo da cadeia alimentar.

Assim, torna-se importante a realização de mais estudos para uma avaliação do risco potencial mais completa e rigorosa para as populações de minhocas e de outros organismos terrestres bem como para a saúde do solo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por Fundos Nacionais da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal, no âmbito do projeto PTDC/CTA-AMB/6686/2020 (ENANTIOTOX) e UIDB/04033/2020 (CITAB/Inov4Agro).

Ondina Ribeiro agradece à bolsa de investigação no âmbito do projeto PTDC/CTA-AMB/6686/2020 (ENANTIOTOX).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Ruiz, R.; Andrés-Costa, M.J.; Andreu, V. & Picó, Y. (2015) - Simultaneous determination of traditional and emerging illicit drugs in sediments, sludges and particulate matter. *Journal of Chromatography A*, vol. 1405, p. 103-115. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.062>
- Carter, L.J.; Ryan, J.J. & Boxall, A.B. (2016) - Effects of soil properties on the uptake of pharmaceuticals into earthworms. *Environmental Pollution*, vol. 213, p. 922-931. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.044>

- Carter, L.J.; Williams, M. & Sallach, J.B. (2020) - Uptake and Effects of Pharmaceuticals in the Soil-Plant-Earthworm System. In: Pérez Solsona, S.; Montemurro, N.; Chiron, S. & Barcelò, D. (Eds.) - *Uptake and effects of pharmaceuticals in the soil-plant-earthworm system. Interaction and Fate of Pharmaceuticals in Soil-Crop Systems: The Impact of Reclaimed Wastewater*. p. 175-220. Springer.
- Ferreira, B.; da Silva, D.D.; Carvalho, F.; de Lourdes Bastos, M. & Carmo, H. (2019) - The novel psychoactive substance 3-methylmethcathinone (3-MMC or metaphedrone): A review. *Forensic Science International*, vol. 295, p. 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.11.024>
- Gao, T.; Du, P.; Xu, Z. & Li, X. (2017) - Occurrence of new psychoactive substances in wastewater of major Chinese cities. *Science of the Total Environment*, vol. 575, p. 963-969. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.152>
- Gualano, M.R.; Bert, F.; Mannocci, A.; La Torre, G.; Zeppegno, P. & Siliquini, R. (2014) - Consumption of antidepressants in Italy: recent trends and their significance for public health. *Psychiatric Services*, vol. 65, n. 10, p. 1226-1231. <https://doi.org/10.1176/appi.ps.201300510>
- ISO (2012) – *ISO 11268-2: Soil quality - effects of pollutants on earthworms - Part 2: Determination of effects on reproduction of Eisenia fetida/Eisenia andrei*. Genève, p. 24
- Langford, K.H.; Reid, M. & Thomas, K.V. (2011) - Multi-residue screening of prioritised human pharmaceuticals, illicit drugs and bactericides in sediments and sludge. *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 13, n. 8, p. 2284-2291. <https://doi.org/10.1039/C1EM10260E>
- Mwenesongole, E.M.; Gautam, L.; Hall, S.W.; Waterhouse, J.W. & Cole, M.D. (2013) - Simultaneous detection of controlled substances in waste water. *Analytical Methods*, vol. 5, n. 13, p. 3248-3254. <https://doi.org/10.1039/C3AY40655E>
- Natal-da-Luz, T.; Ribeiro, R. & Sousa, J.P. (2004) - Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 23, n. 9, p. 2188-2193. <https://doi.org/10.1897/03-445>
- OECD (1984) - *Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264496-en>
- OECD (2016) - *Test No. 222: Earthworm, Reproduction Toxicity Tests*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070042-en>
- Ribeiro, O.; Ribeiro, C.; Félix, L.; Gaivão, I. & Carrola, J.S. (2023) - Effects of acute metaphedrone exposure on the development, behaviour, and DNA integrity of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 30, p. 49567-49576. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25233-z>
- Santana-Viera, S.; Pintado-Herrera, M.G.; Sosa-Ferrera, Z. & Santana-Rodríguez, J.J. (2023) - Analysis of psychoactive substances and metabolites in sludges, soils, sediments and biota: a review. *Environmental Chemistry Letters*, vol. 21, p. 2311-2335. <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01586-2>
- Silva, P.M.C. & van Gestel, C.A. (2009) - Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. *Chemosphere*, vol. 77, n. 11, p. 1609-1613. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.034>
- Silver, W.; Perez, T.; Mayer, A. & Jones, A. (2021) - The role of soil in the contribution of food and feed. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 376, n. 1834, art. 20200181. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0181>
- Stander, A.H.; le Roux, A. & Otomo, P.V. (2019) - Can Local Enhancement in Earthworms Affect the Outcome of the Standard Earthworm Avoidance Test? *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 103, n. 6, p. 776-782. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02738-3>
- Subedi, B. & Kannan, K. (2015) - Occurrence and fate of select psychoactive pharmaceuticals and antihypertensives in two wastewater treatment plants in New York State, USA. *Science of the Total Environment*, vol. 514, p. 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.098>
- Žižek, S. & Zidar, P. (2013) - Toxicity of the ionophore antibiotic lasalocid to soil-dwelling invertebrates: Avoidance tests in comparison to classic sublethal tests. *Chemosphere*, vol. 92, n. 5, p. 570-575. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.007>