

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,**  
**MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA**  
**POR FÁRMACOS UTILIZANDO ANÁLISES**  
**ECOTOXICOLÓGICAS**

**Raquel Sampaio Jacob**

**Belo Horizonte**  
**2017**

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA  
POR FÁRMACOS UTILIZANDO ANÁLISES  
ECOTOXICOLÓGICAS**

**Raquel Sampaio Jacob**

**Raquel Sampaio Jacob**

# **AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA POR FÁRMACOS UTILIZANDO ANÁLISES ECOTOXICOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Meio Ambiente

Linha de pesquisa: Caracterização, prevenção e controle da poluição.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liséte Celina Lange

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia da UFMG  
2017

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”*

*Fernando Teixeira de Andrade*

## AGRADECIMENTOS

Parafrazeando Blaise Pascal, escrevi este texto longo, porque não tive tempo de fazê-lo curto. Agradecer é algo tão sublime que não pude ceder à tentação de fazer isso da forma tradicional. Permanecendo o vício pelos grandes pensadores, evoco Antoine de Saint Exupéry, que em sua célebre citação disse “Cada um que passa na nossa vida passa sozinho, mas não vai só... Leva um pouco de nós mesmos. E deixa-nos um pouco de si mesmos. Há os que levam muito, mas não há os que não deixam nada. Esta é a mais bela realidade da Vida... A prova tremenda de que cada um é importante e que ninguém se aproxima por acaso...”. Por confiar nessas palavras agradeço a cada um que passou pela minha vida, não apenas durante a pós-graduação, mas desde os primeiros anos de existência. Agradeço àqueles que lerão esse texto, mas também àqueles que sequer se lembram do meu nome.

Sou especialmente grata aos meus pais e à Norma, que dos primeiros passos até as aflições da vida adulta, acompanharam minha trajetória – o que faz com que sejam notadamente dignos de reconhecimento e carinho. Minha gratidão também aos meus irmãos e parentes, que de longe ou de perto acompanharam minha caminhada. Aos colegas e professores do Santo Agostinho também muito obrigada, lá adquiri a base de que tanto me orgulho. Também menciono com amor amigos como Laila, Paula, Diva e Thaís que alegam meus dias, do outro canto da América ou quase do lado da minha casa, com programas sempre extasiantes. Um agradecimento muito especial à minha grande amiga e confidente, Elis, que dividiu medos, tensões, gargalhadas, faltas de juízo e conselhos, dona de um espaço insubstituível em minha vida.

É necessário que eu também agradeça aos meus professores na PUC, mestres de uma ciência que eu amo e que me conduziram ao doutorado e à docência, sendo também responsáveis pela minha paixão pela carreira acadêmica. Ao Prof. Raul e ao amigo Carlos agradeço em especial, uma vez que me acompanharam não apenas como aluna, mas também como profissional, lembraram-me incansavelmente de que eu poderia ser uma doutoranda, uma professora ou qualquer coisa que eu desejasse, desde que eu me esforçasse para isso.

Como não só de passado vive um homem, é necessário que eu brinde o presente. Eu inicio os salamaleques com a minha querida orientadora, Profa. Liséte Celina Lange, que me assegurou que guiaria meus primeiros passos trôpegos pela vida acadêmica, com todo o carinho e dedicação que lhe são peculiares. Sou muito grata a ela por me orientar, de fato, e por me

demonstrar cotidianamente que a orientação não precisa ser acompanhada por rudeza e prepotência, que insistem em rondar as academias de todo o mundo. Prossigo agradecendo àqueles que, extraoficialmente, foram também meus orientadores, tão pacientes com minhas intermináveis dúvidas: sou grata a Lucilaine Valéria de Souza Santos, em especial, e também a Mirna Maciel D'Auriol Souza, ao Erico Soares e ao Gabriel Marques. Aprofundando ainda mais, consigo perceber que foram vários os meus orientadores: Profa. Mônica Leão, me ensinou sobre o esforço, a dedicação e a importância de estar ao lado daqueles com quem se partilha um ideal; Profa. Silvia Côrrea, que jamais me preveniu de um sorriso, que nunca negou um favor e que me fez mais responsável diante da necessidade de não decepcionar a confiança de alguém tão fabulosa. Também agradeço muito a Profa. Miriam Amaral, por todo acompanhamento em meu desenvolvimento acadêmico e nos estudos laboratoriais. Agradeço, ainda, a Ana Flávia Souza, Bruna Pereira, Carolina Oliveira e Jennifer Lana, queridas alunas de iniciação científica. Agradeço a elas que, entre fármacos, macrófitas, incubadoras e bactérias liofilizadas, me ensinaram e me ensinam muito. Enfim, agradeço a todos que trocaram sorrisos e gentilezas comigo pelo Departamento: nos corredores, nas salas de estudo, no laboratório. Agradeço, ainda, aos funcionários, pelo insubstituível papel que cumprem, mas que muitas vezes permanecem anônimos.

Lembro-me daqueles que me ajudaram fora da UFMG: a Profa. Odete Rocha, Prof. Evaldo Espíndola, Profa. Daniele Bila e a Iara Almeida, agradeço por terem aceitado dividir um pouco do que conhecem comigo e, assim, terem me tornado uma pessoa melhor. Ainda, registro uma gratidão especial a Aline Godoy, pesquisadora da USP, e ao Cristiano Venícius Araújo, pesquisador da universidade de Coimbra, meus parceiros no desenvolvimento do doutorado, que compartilham seus conhecimentos e pesquisa comigo, solicitudes inestimáveis sem as quais decisões importantes não poderiam ter sido tomadas.

Por fim, agradeço com muito carinho ao meu grande companheiro, Erick Barbosa. Ele que já me acompanha há nove anos e topou dividir os sonhos e o futuro comigo, que suporta minha ansiedade infinita com uma felicidade genuína e um amor imensurável.

Finalmente, peço desculpas àqueles que não tiveram seu nome mencionado, mas a quem sou grata por compartilharem a existência comigo. E mesmo àqueles que me trouxeram dificuldades, eu agradeço, porque são as adversidades que me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole e a perseverança.

***ESSA PÁGINA SERÁ EXCLUÍDA APÓS IMPRESSÃO***

## RESUMO

Grande quantidade de fármacos de diferentes classes é consumida anualmente em todo o mundo. Após o uso, esses compostos são parcialmente metabolizados e excretados e, subsequentemente, entram nas estações de tratamento de esgoto. Esses fármacos muitas vezes permanecem estáveis após os tratamentos, podendo alcançar fontes de água potável. Pelo exposto, propõe-se pesquisa com objetivo de avaliar a contaminação aquática por fármacos de diferentes classes, tendo como foco análises ecotoxicológicas. Buscando facilitar a apreciação dos dados, a tese será dividida em cinco capítulos. Dessarte, o desenvolvimento do capítulo II consistiu em selecionar dez fármacos que foram testados quanto a sua toxicidade aguda para *Aliivibrio fischeri* em três formulações: genérico, similar e referência. Já no capítulo III, fármacos selecionados a partir dos resultados do capítulo II - metformina, sinvastatina, diazepam e omeprazol - foram submetidos às análises de toxicidade aguda com o *Aliivibrio fischeri*, toxicidade crônica com *Pseudokirchneriella supcapitata* e teste de fuga com *Cyprinus carpio*. Com relação ao capítulo IV, todas as onze misturas possíveis entre os fármacos escolhidos tiveram a toxicidade aguda estudada. A partir de tal análise, buscou-se avaliar possíveis efeitos sinérgicos e antagônicos. Finalmente, através dos capítulos I e V pretende-se introduzir e encerrar a tese, respectivamente, em uma abordagem integradora. Através desse trabalho, confirmou-se que não apenas fármacos, mas também excipientes, podem ser capazes de gerar desequilíbrio ambiental ao resultarem em efeitos agudos, crônicos e, ainda, provocarem evasão de indivíduos. Adicionalmente, esclareceu-se a imprevisibilidade da interação de fármacos quando em misturas, situação em que uma gama de fenômenos pode ocorrer, tais como hormesis, sinergismo e antagonismo. Em termos de toxicidade aguda, todos os compostos geraram algum dano em *Aliivibrio fischeri*. Já nos testes de toxicidade crônica, a sinvastatina não se apresentou tóxica, enquanto o omeprazol foi o medicamento capaz de causar efeitos deletérios em mais baixas concentrações, seguido da metformina e diazepam. Finalmente, com relação aos testes de fuga, os fármacos omeprazol e, sobretudo, sinvastatina induziram resposta de evitamento nos peixes. Nesse sentido, não restam dúvidas de que a presença dos contaminantes emergentes em matrizes aquosas não deve ser negligenciada. Em que pese o assunto ser relevante tema de pesquisa, é preciso que a dimensão do problema atinja as entidades gestoras, capazes de adotar medidas efetivas para reversão de um cenário de tamanha complexidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ecotoxicidade; *Aliivibrio fischeri*; *Chlorophyceae*; testes de fuga; fármacos; contaminantes emergentes.



## ABSTRACT

Considerable quantities of different classes of drugs are consumed annually worldwide. After use, these compounds are partially metabolized and excreted. The drugs, once disposed of in a sewage treatment plant, can remain stable even after conventional or advanced treatments, often reaching drinking water sources. Hence, this study aims to evaluate water contamination by pharmaceuticals of different classes, focusing on ecotoxicological analyses. In order to facilitate data appreciation, the thesis is developed in five chapters. Thus, the development of chapter 2 consists of selecting ten pharmaceuticals which had their acute toxicity tested for *Aliivibrio fischeri* in three formulations (generic drug, similar drug, and brand name drug). In Chapter 3, pharmaceuticals selected from the results of chapter 2 - metformin, simvastatin, diazepam and omeprazole - were submitted to acute toxicity analyses with *Aliivibrio fischeri*, chronic toxicity with *Pseudokirchneriella supcapitata* and avoidance test with *Cyprinus carpio*. With regard to chapter 4, in order to assess synergic and antagonistic effects, the eleven possible mixtures of pharmaceutical compounds had their acute toxicity tested. Finally, chapters 1 and 5 intend to respectively introduce and close the thesis with an integrative approach. Through this work, it has been confirmed that not only pharmaceuticals, but also excipients may be capable of generating environmental imbalance, for those result in acute and chronic effects and incite evasion of individuals. In addition, unpredictability of pharmaceutical interaction when in mixtures has been clarified, a situation in which a range of phenomena may occur, such as *hormesis*, synergism and antagonism. In terms of acute toxicity, all compounds generated some damage in *Aliivibrio fischeri*. In chronic toxicity tests, simvastatin was not toxic, whereas omeprazole was the drug capable of causing deleterious effects at lower concentrations, followed by metformin and diazepam. Finally, about the avoidance test, the drugs omeprazole and especially simvastatin induced an avoidance response in *Cyprinus carpio*. In light of this, there is no doubt that the presence of the emerging contaminants in water matrices should not be neglected. Although the subject matter is a relevant research topic, it is necessary that the dimension of the problem reaches the managing bodies, duly capable of adopting effective measures to reverse a scenario of such complexity.

**KEYWORDS:** Ecotoxicity; *Aliivibrio fischeri*; *Chlorophyceae*; avoidance test; pharmaceuticals; emerging contaminants.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	VII
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	X
<b>LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	XI
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1 Justificativa.....	3
1.1.1 Relevância da pesquisa proposta .....	3
1.1.2 Originalidade do trabalho .....	4
1.2 Hipóteses .....	5
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	6
2.1 Objetivo geral.....	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
<b>3. ESTRUTURA DA TESE</b> .....	7
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	8
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
3.1 Fármacos .....	14
3.2 A questão dos excipientes .....	15
3.3 Caracterização de efluentes contaminados com fármacos.....	17
3.4 Testes ecotoxicológicos.....	27
3.4.1 Tipos de testes ecotoxicológicos.....	27
3.4.1.1 Teste de toxicidade aguda .....	28
3.4.1.2 Teste de toxicidade crônica.....	30

3.4.1.3	Testes de toxicidade de fuga .....	30
3.4.2	Escolha do organismo teste .....	32
3.4.2.1	Teste de toxicidade com <i>Aliivibrio fischeri</i> .....	33
3.4.2.2	Testes de toxicidade com algas, especificamente do gênero <i>Chlorophyceae</i> .....	34
3.4.2.3	Testes de toxicidade com <i>Cyprinus carpio</i> .....	35
3.4.3	Relação dose-resposta .....	36
3.5	Ensaio ecotoxicológicos: aspectos legislados e práticas vigentes .....	38
3.5.1	Aspectos legislados .....	38
3.5.2	Práticas vigentes .....	39
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1	Seleção de fármacos .....	43
4.2	Condições de preparo para análises dos fármacos .....	44
4.3	Seleção e condições de preparo para análise dos excipientes .....	44
4.4	Testes de toxicidade aguda com <i>Aliivibrio fischeri</i> .....	45
4.5	Seleção dos princípios ativos a serem utilizados nos próximos capítulos dessa tese .....	47
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
5.1	Testes de toxicidade aguda com as formulações farmacêuticas .....	48
5.2	Testes de toxicidade aguda com os excipientes farmacêuticos .....	54
5.3	Seleção dos princípios ativos a serem utilizados nos próximos capítulos dessa tese .....	55
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>68</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>70</b>
2.1	Objetivo geral .....	70
2.2	Objetivos específicos .....	70
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>71</b>
3.1	Levantamento de dados relacionados aos fármacos em estudo .....	71
3.1.1	Sinvastatina .....	71
3.1.2	Cloridrato de metformina .....	71
3.1.3	Diazepam .....	72

3.1.4	Omeprazol.....	73
3.2	Efeitos tóxicos provocados pelos fármacos no meio ambiente.....	74
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
4.1	Condições de análise dos fármacos .....	77
4.2	Testes ecotoxicológicos.....	78
4.2.1	Testes de toxicidade aguda .....	78
4.2.2	Testes de toxicidade crônica .....	78
4.2.3	Testes de fuga .....	80
4.2.3.1	Tratamento de dados gerados nos testes de fuga.....	82
4.3	Análises no equipamento HPLC-MS .....	83
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>84</b>
5.1	Testes de toxicidade aguda.....	84
5.2	Testes de toxicidade crônica.....	85
5.3	Testes de toxicidade de fuga.....	86
5.3.1	Testes de fuga com cloreto de sódio .....	86
5.3.2	Testes de fuga com os princípios ativos em estudo .....	88
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>92</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>94</b>
	<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>98</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>99</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>100</b>
2.1	Objetivo geral.....	100
2.2	Objetivos específicos.....	100
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>101</b>
3.1	Potencial toxicológico de misturas de substância dispostas no meio ambiente.....	101
3.2	Efeito sinérgico e antagonico de misturas de substâncias .....	102
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>105</b>
4.1	Condições de análise das misturas entre os fármacos.....	105
4.2	Testes de toxicidade aguda com <i>Aliivibrio fischeri</i> .....	106
4.3	Metodologia para a análise das misturas: sinergismo e antagonismo.....	107

4.4	Metodologia para análises no equipamento HPLC-MS.....	108
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>109</b>
5.1	Efeitos ecotoxicológicos das misturas entre os fármacos .....	109
5.2	Identificação da formação de produtos de transformação nas misturas e a sua relação com a toxicidade .....	112
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>116</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
	<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>120</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>121</b>
<b>2.</b>	<b>ANÁLISE DE RESULTADOS.....</b>	<b>122</b>
2.1	Avaliação integradora dos resultados apresentados nos capítulos anteriores .....	122
2.2	Verificação das hipóteses da pesquisa.....	125
<b>3.</b>	<b>CONCLUSÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>127</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>129</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> - Concentração de fármacos em esgoto tratado (a) e águas superficiais (b) na Alemanha .....	18
<b>Figura 2.2</b> - Aparato utilizado para ensaios de fuga onde os organismos não são dotados de mecanismos de locomoção ativo e, por esse motivo, utilizam a correnteza para movimentação .....	32
<b>Figura 2.3</b> - Carpa comum ( <i>Cyprinus carpio</i> ) .....	36
<b>Figura 2.4</b> - Curva de dose-resposta hipotética para um efluente qualquer em que concentração do efluente é dada pela porcentagem de diluição da amostra do efluente na solução-teste. A linha contínua representa a resposta nas primeiras 24 horas e a linha pontilhada após 48 horas de exposição .....	37
<b>Figura 2.5</b> - Etapas do desenvolvimento metodológico .....	43
<b>Figura 2.6</b> - Bactéria marinha <i>Aliivibrio fischeri</i> exibindo potencial de luminescência.....	46
<b>Figura 3.1</b> - Estrutura molecular do fármaco sinvastatina .....	71
<b>Figura 3.2</b> - Estrutura molecular do fármaco cloridrato de metformina .....	72
<b>Figura 3.3</b> - Estrutura molecular do fármaco diazepam.....	73
<b>Figura 3.4</b> -Estrutura molecular do fármaco omeprazol .....	74
<b>Figura 3.5</b> - (a) Toxicidade aguda de 24 fármacos, expressada em valores de $CE_{50}$ ou $CL_{50}$ para diferentes tipos de organismos. (b) Toxicidade crônica de 10 fármacos, expressada em valores de Concentração de Efeito Não Observado (NOEC) e Concentração de Efeito Observado (LOEC). .....	76
<b>Figura 3.6</b> - Etapas do desenvolvimento metodológico .....	77
<b>Figura 3.7</b> - Algas da espécie <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , gênero <i>Chlorophyceae</i> .....	78
<b>Figura 3.8</b> - Esquema de montagem de testes de fuga .....	80
<b>Figura 3.9</b> - Diagrama esquemático do sistema montado, esclarecendo as medidas de um dos compartimentos (Adaptado de ARAÚJO <i>et al</i> , 2014a). .....	81
<b>Figura 3.10</b> - Resposta de fuga em peixes da espécie <i>Cyprinus carpio</i> induzida ao longo da concentração de NaCl em teste com 4 horas de duração .....	86
<b>Figura 3.11</b> - Resposta de fuga em peixes da espécie <i>Cyprinus carpio</i> induzida ao longo da concentração de sinvastatina em teste com 4 horas de duração.....	88

<b>Figura 3.12</b> - Resposta de fuga em peixes da espécie <i>Cyprinus carpio</i> induzida ao longo da concentração de omeprazol em teste com 4 horas de duração.....	89
<b>Figura 3.13</b> - Resposta de fuga em peixes da espécie <i>Cyprinus carpio</i> induzida ao longo da concentração de metformina em teste com 4 horas de duração .....	90
<b>Figura 4.1</b> - Etapas do desenvolvimento metodológico .....	105

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> - Princípios ativos mais utilizados na Itália, Reino Unido e Estados Unidos em ordem decrescente .....	15
<b>Tabela 2.2</b> - Exemplos da ocorrência de fármacos em amostras ambientais .....	19
<b>Tabela 2.3</b> - Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade .....	29
<b>Tabela 2.4</b> - Normas da ABNT que normalizam a realização de teste ecotoxicológicos .....	40
<b>Tabela 2.5</b> - Manuais CETESB para padronização de testes ecotoxicológicos .....	41
<b>Tabela 3.1</b> - Solubilidades máximas dos fármacos em estudo.....	77
<b>Tabela 3.2</b> - Composição do meio L. C. Oligo para cultivo e análises ecotoxicológicas com algas do gênero <i>Chlorophyceae</i> .....	79
<b>Tabela 3.3</b> - Gradiente de concentração estabelecido no aparato para cada princípio ativo testado .....	82
<b>Tabela 3.4</b> - Toxicidade aguda expressa em CE (mg/L) para <i>Aliivibrio fischeri</i> dos fármacos metformina, diazepam, sinvastatina e omeprazol.....	84
<b>Tabela 3.5</b> - Toxicidade crônica expressa em CI (mg/L), CENO (mg/L) e CEO (mg/L) para <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> dos fármacos metformina, diazepam, sinvastatina e omeprazol.....	85
<b>Tabela 3.6</b> - Condutividade (mS/cm) antes e após realização de testes de fuga com 4 horas de duração, utilizando organismos da espécie <i>Cyprinus carpio</i> .....	87
<b>Tabela 3.7</b> - Distribuição de peixes da espécie <i>Cyprinus carpio</i> induzida ao longo da concentração de diazepam em teste com 4 horas de duração .....	91
<b>Tabela 4.1</b> - Efeito gerado (%) para o organismo <i>Aliivibrio fischeri</i> em teste de 30 minutos em diversas concentrações .....	110
<b>Tabela 4.2</b> - Efeito identificado nos testes de toxicidade aguda com <i>Aliivibriofischeri</i> com amostras de mistura de fármacos, inibição prevista pelos modelos CA e IA e, ainda, valores de proporções residuais de efeito (ERR) .....	110
<b>Tabela 4.3</b> - Produtos de transformação após mistura entre princípios ativos em termos de razão entre massa e carga (m/z), massa fragmentada dois ( $MS^2$ ), tempo de residência (TR), erro, SIGMA multiclasse (msSIGMA), fórmula química, bem como anéis e duplas ligações (rdb).....	113



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 2.1</b> - Alguns dos fármacos mais consumidos no Brasil, com respectivos números de venda dos genéricos e similares preferidos pelo consumidor brasileiro (2014) .....	44
<b>Quadro 2.2</b> - Solubilidade dos excipientes em estudo de acordo com a Farmacopéia brasileira.....	45
<b>Quadro 2.3</b> - Dados de massa molar, fórmula química, solubilidade, toxicidade aguda ( $CE_{50}$ ) em 30 minutos para <i>Aliivibrio fischeri</i> , apresentação e excipientes dos fármacos testados ....	49
<b>Quadro 2.4</b> - Levantamento bibliográfico de trabalhos que avaliaram a toxicidade dos fármacos selecionados para essa pesquisa.....	56
<b>Quadro 5.1</b> – Resultados de análises de toxicidade aguda, crônica e de fuga dos fármacos metformina, sinvastatina, omeprazol e diazepam.....	122
<b>Quadro 5.2</b> - Quadro resumo contendo o modo de ação dos fármacos diazepam, sinvastatina, omeprazol e diazepam em seres humanos .....	124

## LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>ABNT</b>	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<b>CA<sub>50</sub></b>	Concentração que gera “ <i>Avoidance</i> ” 50%
<b>CA</b>	Adição de contração
<b>AI</b>	Ação independente
<b>CE</b>	Concentração Efetiva Média
<b>CENO</b>	Concentração de Efeito Não Observado
<b>CEO</b>	Concentração de Efeito Observado
<b>CERH</b>	Conselho Estadual de Recursos Hídricos
<b>CETESB</b>	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
<b>CI</b>	Concentração de Inibição Média
<b>CL</b>	Concentração Letal Média
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional de Meio Ambiente
<b>COPAM</b>	Conselho Estadual de Política Ambiental
<b>D.N.</b>	Deliberação Normativa
<b>DESA</b>	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose Letal Média
<b>EFS</b>	Extração em Fase Sólida
<b>ERR</b>	Proporção residual de efeito
<b>ETA</b>	Estação de Tratamento de Água
<b>ETE</b>	Estação de Tratamento de Esgoto
<b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography</i>
<b>hs</b>	Horas
<b>ICSU</b>	<i>Committee of International Council of Scientific Unions</i>
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
<b>L</b>	Litros
<b>m<sup>3</sup></b>	Metro cúbico
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetro
<b>ng</b>	Nanograma
<b>OECD</b>	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>

<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PET</b>	Politereftalato de Etileno
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>S</b>	Segundo
<b>SDI</b>	<i>Strategic Diagnostics Inc.</i>
<b>SMA</b>	Secretaria de Meio Ambiente
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>USEPA</b>	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
<b>µg</b>	Micrograma

# Capítulo 1

---

## Introdução e contextualização

# 1. INTRODUÇÃO

Fármacos são um grande e diverso grupo de compostos orgânicos utilizados em quantidades muito elevadas ao redor do mundo. Durante diversas décadas, a produção e consumo de medicamentos elevou-se rapidamente, graças ao célere desenvolvimento das ciências médicas (SIM *et al.*, 2011). Existem no mercado milhares de compostos utilizados com finalidades terapêuticas e a produção anual excede bilhões de toneladas (SIM *et al.*, 2011; CALISTO e ESTEVES, 2009, KÜMMERER, 2009).

Ainda que os benefícios do uso de fármacos na saúde e bem-estar humano e animal sejam reconhecidos, sabe-se que se tratam de importantes contaminantes ambientais. Os primeiros achados científicos reportando, especificamente, a remoção incompleta dos referidos compostos em estações de tratamento de esgoto (ETEs) foram publicados entre os anos de 1960 e 1970 (STUMM-ZOLLINGER e FAIR, 1965; HIGNITE e AZARNOFF, 1977). Ainda que essas primeiras pesquisas tenham indicado os fármacos como potenciais contaminantes ambientais, esse assunto não atraiu significativo reconhecimento até os anos de 1990, quando se descobriu que eram substâncias capazes de causarem efeitos negativos nos ecossistemas em concentrações tão reduzidas como nanogramas por litro (PURDOM *et al.*, 1994; DESBROW *et al.*, 1998; ROUTLEDGE *et al.*, 1998). Desde então, como consequência de frequentes publicações tratando da presença de fármacos nos ecossistemas (TERNES, 1998; KOLPIN *et al.*, 2002), bem como do aumento na produção e diversidade desses compostos (BROWN *et al.*, 2006 e SEBASTINE; WAKERMAN, 2003), a presença de fármacos e seus metabólitos no ambiente passou a ser considerada uma das maiores preocupações das ciências ambientais (CALISTO e ESTEVES, 2009).

Nesse contexto, surge a necessidade de cauteloso monitoramento da contaminação por medicamentos, através de parâmetros eficazes, como os testes ecotoxicológicos. O uso da toxicologia aplicado às questões ambientais remonta ao século XIX, em que a ciência foi utilizada em função de eventos de intoxicação aguda no meio ambiente (KÖHLER e TRIEBSKORN, 2013). Atualmente, tratam-se de análises desenvolvidas com frequência crescente, objetivando não tratar a contaminação exclusivamente sob o viés físico-químico.

Haja vista o exposto, apresenta-se tese de doutorado através da qual objetiva-se tratar da contaminação de alguns fármacos no meio ambiente em uma abordagem holística, utilizando-se como parâmetros testes de toxicidade diversos.

## **1.1 Justificativa**

### **1.1.1 Relevância da pesquisa proposta**

Fármacos são projetados para atuarem em vias metabólicas e moleculares específicas de humanos e animais, frequentemente exibindo efeitos colaterais importantes (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). Eis o principal motivo que justifica a abordagem toxicológica da questão da contaminação por fármacos; tratar essa problemática tão somente pelo viés físico-químico significa abordar o assunto de forma inacabada e dissociada de todo o plexo ambiental que o cerca.

Também na esteira de uma abordagem holística, que pretende explorar o assunto da forma mais completa possível, surge a iniciativa de se trabalhar com a mistura dos fármacos, e não apenas com cada um individualmente considerado. Essa abordagem justifica-se uma vez que essa não é a situação de fato, porquanto as substâncias já dispostas em um dado ambiente estarão sujeitas a interações e modificações por e com outros compostos.

Além do apresentado, um dos pontos de maior relevância do trabalho são os testes de fuga. Testes de fuga em meio aquoso são uma modalidade de testes ecotoxicológicos inovadores, praticamente não realizados no Brasil ou na América Latina. Feitos geralmente no solo (GARCIA-SANTOS, G.; KELLER-FORRER, K., 2011; LOUREIRO, S. *et al.*, 2009), os testes de fuga são experimentos que procuram definir a concentração a partir da qual determinado organismo evade um determinado ambiente, isso é, migra para outro ecossistema ou habitat. A grande relevância dessa análise mimética é que, na natureza, quando os organismos são expostos a determinado tóxico, muito antes da letalidade, tradicionalmente estudada nos ensaios ecotoxicológicos, os organismos fogem daquele local. Importante ressaltar que, do ponto de vista do equilíbrio de um ecossistema, a morte e a fuga representam o mesmo problema nas ciências ambientais (ARAÚJO *et al.*, 2014).

Salienta-se, ainda, a existência de uma dimensão social, ambiental e econômica no desenvolvimento dessa tese. A contaminação por fármacos em matrizes aquosas é tema de consistente relevância no atual cenário ambiental e tratar a questão é de importância econômica para a indústria e estados. Por esse motivo, é um assunto profundamente explorado pelo grupo de pesquisa de que faz parte a autora dessa tese, sendo tema passível de publicação em periódicos de ponta.

### 1.1.2 Originalidade do trabalho

O trabalho demonstra consistente originalidade como um todo. São ações inovadoras os testes ecotoxicológicos apresentados, bem como a própria pesquisa da contaminação ambiental por fármacos nos moldes propostos. Pouco se produz sobre esses temas no Brasil e no mundo. Cabe ressaltar, ainda, que no momento da escolha dos medicamentos que integraram essa pesquisa, um dos critérios levado em consideração foi o ineditismo do trabalho, isto é, buscou-se fármacos que, a despeito de seu amplo consumo, ainda não foram investigados ou são pouco investigados.

No entanto, o maior ineditismo desse trabalho consiste nos testes ecotoxicológicos de fuga. Em verdade, esse tipo de estudo é incipiente em todo o mundo. Giza-se que não foi encontrado qualquer trabalho que procurou investigar o comportamento de fuga frente a contaminação por fármacos em matrizes aquosas. A grande maioria dos artigos que trazem os testes de fuga como tema central enfoca a contaminação no solo.

Outra fundamental fonte de inovação nesse trabalho é a comparação da toxicidade de fármacos em suas diferentes formulações: genérico, similar e referência. A partir disso, pretende-se verificar a variação na toxicidade dos medicamentos em função dos diferentes excipientes utilizados nas diversas formulações. Já existe uma série de investigações nesse sentido quanto aos pesticidas, que evidenciam que os excipientes e solventes (chamados ingredientes inertes) são, muitas vezes, mais tóxicos que os ingredientes ativos em si (BEGGEL *et al.*, 2010; COX; SURGAN, 2006; SURGAN *et al.*, 2010; GRISOLIA *et al.*, 2004).

Por último, com relação à toxicidade crônica, os experimentos são igualmente acanhados. São raros os trabalhos que buscam identificar os efeitos principais da exposição de fármacos a longo prazo ou suas consequências nos diferentes estágios do ciclo de vida dos organismos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). Existe uma série de contaminantes que não se apresentam tóxicos em testes de toxicidade aguda, porém o são em testes de toxicidade crônica (CALABRESE, 2008; CHAPMAN, 2002; FORBES, 2000), exigindo maior acuidade da academia para a realização desses testes.

## **1.2 Hipóteses**

A seguir, apresentam-se as hipóteses testadas nesse trabalho:

- Princípios ativos não são os únicos compostos a atribuírem toxicidade às formulações farmacêuticas;
- Fármacos de diferentes classes são tóxicos para distintos organismos presentes no ecossistema, sendo assim, sua presença enquanto contaminante interfere na homeostase ambiental;
- Misturas entre princípios ativos de fármacos distintos podem exibir comportamento sinérgico ou antagônico de acordo com os modelos de adição de concentração e ação independente.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 *Objetivo geral***

Avaliar a contaminação de alguns fármacos em matrizes aquosas em uma abordagem holística, utilizando-se variáveis toxicológicas.

### **2.2 *Objetivos específicos***

- Comparar a toxicidade aguda de fármacos selecionados em três formulações: genérico, similar e referência;
- Contrastar, em termos de toxicidade crônica, aguda e de fuga, a toxicidade de princípios ativos de fármacos selecionados;
- Investigar a toxicidade aguda de todas as misturas possíveis entre os princípios ativos de fármacos selecionados.

### 3. ESTRUTURA DA TESE

Buscando facilitar a apreciação dos dados, a tese será dividida em cinco capítulos: I) Introdução e contextualização; II) Toxicidade aguda de fármacos em diferentes formulações; III) Toxicidade aguda, crônica e de fuga de princípios ativos de fármacos; IV) Toxicidade aguda da mistura de fármacos; V) Discussão de resultados e conclusão final. Aponta-se que os capítulos II, III e IV referem-se, respectivamente, aos objetivos específicos apontados no item anterior.

Esclarece-se que através do capítulo I pretende-se introduzir a situação problema em que se insere essa tese, bem como apresentar as hipóteses e objetivos norteadores. Já o desenvolvimento do capítulo II, consiste em selecionar e testar dez fármacos a serem avaliados quanto à sua toxicidade aguda para *Aliivibrio fischeri* em três formulações: genérico, similar e referência. Em seguida, no capítulo III, apresenta-se os princípios ativos de fármacos pré-selecionados, que passaram por análises de toxicidade aguda com *Aliivibrio fischeri*, toxicidade crônica com *Chlorophyceae* e teste de fuga com *Cyprinus carpio*. Com relação ao capítulo IV, todas as misturas possíveis entre fármacos indicados tiveram as toxicidades agudas medidas, através das quais pretende-se avaliar possíveis ocorrências de efeitos sinérgicos e antagônicos. Finalmente, no capítulo V, busca-se apresentar a discussão dos resultados expostos nos capítulos anteriores, em uma abordagem integradora que permite expor as conclusões finais dessa pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, C. V. M. *et al.* Avoidance response of *Danio rerio* to a fungicide in a linear contamination gradient. *Science of the Total Environment*, v. 484, p.36-42, 2014.

BEGGEL, S; WERNER, I; CONNON, R E.; GEIST, J. P. Sublethal toxicity of comercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Science of Total Environmental*, v. 408, p.3169-3175, 2010.

BROWN K.D., KULIS J., THOMSON B., CHAPMAN T.H., MAWHINNEY D.B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, v.366, p.772-783, 2006.

CALABRESE, E. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* V.27. n. 7. P.1451-1474. 2008.

CALISTO, V.; ESTEVES, V.I. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere*, v. 77, p.1257-1274, 2009.

CHAPMAN, P. Ecological risk assessment (ERA) and hormesis. *The science of the total environmental*. 288. 131-140. 2002.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. *Environmental health perspectives*, V.114, N.12, p. 1803-1806, 2006.

DESBROW, C. *et al.* Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.*, v. 32, p. 1549–1558, 1998.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122–159, 2006.

FORBES, V. Is hormesis an evolutionary expectation? *Functional Ecology*, v.14. p.12-24. 2000.

GARCÍA-SANTOS, G.; KELLER-FORRER, K. Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. *Chemosphere*, v. 84, p. 651-656, 2011.

GRISOLIA, A. K.; BILICH, M. R.; FORMIGLI, L. M. A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactante nonylphenol ethoxylate. *Ecotoxicology and environmental safety*, v.59, n. 1, p. 123-126, 2004.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D.L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants – chlorophenoxyisobutyrate and salicylic-acid in sewage water effluent. *Life Sci.*, v. 20, p.337–341, 1977.

- KÖHLER, H.; TRIEBSKORN, R. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond? *Science*, v. 341, p.759-765, 2013.
- KOLPIN, D. W. *et al.* Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of the Total Environment*, v. 328, p. 119–130, 2002.
- KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I. *Chemosphere*, v. 75, p.417-434, 2009.
- LOUREIRO, S.; AMORIM, M. J. B.; CAMPOS, B.; RODRIGUES, S. M. G. SOARES, A. M. V. M. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and *Porcellionides pruinosus* (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 625–636, 2009.
- PURDOM, C.E. *et al.* Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.*, v. 8, p. 275–285, 1994.
- ROUTLEDGE, E.J. *et al.* Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.*, v. 32, p. 1559–1565, 1998.
- SEBASTINE, I. M.; WAKERMAN, R. J. Consumption and Environmental Hazards of Pharmaceutical Substances in the UK. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 81, p. 229-235, 2003.
- SIM, W. *et al.* Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere*, v. 82, n. 2, p.179-186, 2011.
- STUMM-ZOLLINGER, E.; FAIR, G.M. Biodegradation of steroid hormones. *J. Water Pollut. Control. Fed.*, v. 37, p.1506–1510, 1965
- SURGAN, M.; CONDON, M.; COX, C. Pesticide Risk Indicators: Unidentified Inert Ingredients Compromise Their Integrity and Utility. *Environmental management*, v. 45, n.4, p. 834-841, 2010.
- TERNES, T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.*, v. 32, n. 11, p. 3245–3260. 1998.

# Capítulo 2

---

Toxicidade aguda de medicamentos em  
diferentes formulações

## 1. INTRODUÇÃO

Grande quantidade de fármacos de diferentes classes é consumida anualmente em todo o mundo. Estes compostos farmacêuticos incluem anti-inflamatórios, analgésicos, reguladores lipídicos, antidiabéticos, anti-hipertensivos, antibióticos, antidepressivos, agentes quimioterápicos, contraceptivos e outros mais. Após o uso, esses compostos são parcialmente metabolizados e excretados na urina e fezes e, subsequentemente, entram nas estações de tratamento de esgoto, onde são tratados, juntamente com outros constituintes orgânicos e inorgânicos do efluente (TAMBOSI, 2008). De acordo com Gebhardt e Schröder (2007), esses fármacos, uma vez dispostos ou excretados, tanto em sua forma original quanto em forma de metabólitos, muitas vezes permanecem estáveis após os tratamentos convencionais ou mesmo avançados. Portanto, ainda que alguns desses fármacos altamente polares e móveis possam ser parcialmente removidos por meio da sorção, degradação biótica/abiótica ou tecnologias com membranas – como a osmose inversa ou nanofiltração –, eles podem eventualmente alcançar corpos d'água superficiais e subterrâneos, sabidas fontes de água potável (GEBHARDT; SCHRÖDER, 2007; TAMBOSI, 2008).

A referida contaminação de corpos d'água por fármacos, pode advir em grande parte de esgotos domésticos e hospitalares; no entanto, a contribuição de efluentes e resíduos industriais também é significativa (STACKELBERG *et al.*, 2004). A indústria farmacêutica exerce grande influência nesse cenário (LARRSON; PEDRO; PAXEUS, 2007), onde os efluentes gerados são contaminados por fármacos e podem ser, em geral, caracterizados por uma fração orgânica rapidamente biodegradável e compostos refratários, que não são removidos por tratamentos biológicos tradicionais (ALMEIDA *et al.*, 2004). A suinocultura e a bovinocultura também contribuem para a contaminação de corpos d'água. Estudos evidenciam que em criações de bovinos e suínos não apenas os efluentes estão contaminados por antibióticos, como também as águas subterrâneas próximas (BARTELT-HUNT; SNOW; DAMON-POWELL, 2010).

Nesse sentido, a ecotoxicologia aquática é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento desses problemas de contaminação de corpos d'água por compostos tóxicos, tais como fármacos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Seus instrumentos de análise são capazes de responder preditivamente à toxicidade de compostos químicos, sinalizando potenciais toxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos. A inserção dos ensaios ecotoxicológicos como instrumento de avaliação ambiental é de fundamental

importância, pois alguns fatores não são avaliados por variáveis abióticas, vide a biodisponibilidade e a interação entre os efeitos dos poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Mesmo diante desse cenário, os trabalhos que abordam a contaminação de efluentes por fármacos não são muito frequentes na literatura (GEBHARDT; SCHRÖDER, 2007), sobretudo, os que analisam a importância de análises ecotoxicológicas nesse contexto. Um dos motivos que explica essa situação é o fato de que a investigação extensiva da ocorrência de fármacos no ambiente iniciou-se apenas na década de 1990, com o aprimoramento dos métodos analíticos que possibilitaram determinar fármacos em concentrações de ng/L ou µg/L em matrizes aquosas, tais como esgotos, efluentes industriais, águas superficiais, subterrâneas e mesmo potável (LÖFFLER *et al.*, 2005).

Haja vista o exposto, nesse capítulo apresenta-se os testes de toxicidade aguda para *Aliivibrio fischeri* de trinta fármacos. Foram avaliados medicamentos de dez diferentes princípios ativos, cada um deles em três formulações distintas: genérico, similar e referência. A partir disso, pretende-se verificar a variação na toxicidade dos medicamentos em função dos diferentes excipientes utilizados nas diversas formulações. O objetivo dessa etapa é, sobretudo, avaliar a contribuição de outros compostos, que não os princípios ativos, para a toxicidade observada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Comparar a toxicidade aguda de fármacos selecionados em três formulações: genérico, similar e referência.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Selecionar os fármacos a serem estudados durante todo o desenvolvimento da pesquisa;
- Contrastar os diferentes resultados de toxicidade obtidos a partir de análises de toxicidade aguda com *Aliivibrio fischeri*;
- Verificar a possível existência diferença de toxicidade entre as distintas formulações disponíveis nas farmácias.



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 *Fármacos*

Fármacos são substâncias químicas que, graças às suas propriedades medicinais, garantem cuidados para com a saúde através da melhoria de desempenho da vida humana. A sintetização dessas substâncias tem que ser confiável e de alta qualidade, acontecendo em laboratórios adequados, que utilizam alta tecnologia (TURKIYE, 2013).

Nesse sentido, existe grande correlação entre expectativa de vida e o uso de medicamentos. Desde a Segunda Guerra mundial, o aumento da expectativa de vida foi elavado em muitos países desenvolvidos. No Canadá, por exemplo, a estimativa aumentou em cerca de 12 anos durante o período de 1950-2006: de 70,8 para 83,0 anos em mulheres e de 66,3 para 78,4 anos em homens (BEAUDET, 2005; CANADÁ, 2008). Cutler, Deaton e Lleras-Muney (2006) esclarecem que esses dados se devem a avanços na tecnologia médica e farmacêutica. Há crescente número de evidências de que novos fármacos, em particular, são responsáveis por este aumento. A partir de séries temporais nos Estados Unidos, Lichtenberg (2003) estima que um ano adicional de expectativa vida pode ser conquistado por US\$ 926 investidos em pesquisa e desenvolvimento na indústria farmacêutica. Nesse contexto, no Canadá foi constatado que um aumento de 1% de gastos da indústria farmacêutiuca é capaz de aumentar a expectativa masculina em 0,015% (LICHTENBERG,2003).

Pelos motivos supracitados, o consumo de fármacos de diversas classes terapêuticas é crescente. Também ascendente é a prática de automedicação, que varia culturalmente, mas está presente em todo o mundo (JIMÉNEZ-RUBIO; HERNÁNDEZ-QUEVEDO, 2010). Na tabela 2.1, apresenta-se alguns dos princípios ativos mais utilizados ao redor do mundo. Os antibióticos, por exemplo, tiveram seu consumo anual estimado entre 100.000 e 200.000 t já no ano de 2003 (KÜMMERER, 2003). Nos Estados Unidos, mais de 20.000 t de antibióticos são produzidos por ano, dos quais 60% são utilizados para tratamento humano e 40% para uso veterinário (BROWN *et al.*, 2006). Os altos valores de produção repetem-se para outras classes terapêuticas e em outros países, no Reino Unido o co-codamol (sulfato de codeína + paracetamol) possui produção anual de 444,34 t, o paracetamol é sintetizado na quantidade de 403,11 t, produz- se 336,21 t de co-proxamol (dextropropoxifeno + paracetamol), 205,79 t do cloridrato de metformina e 162,91 t de ibuprofeno (SEBASTINE; WAKERMAN, 2003).

**Tabela 2.1** - Princípios ativos mais utilizados na Itália, Reino Unido e Estados Unidos em ordem decrescente

<b>Itália (2001)</b>	<b>Reino Unido (2000)</b>	<b>Estados Unidos (2005)</b>
Omeprazol	Paracetamol	Azitromicina
Amlodipina	Metformina	Amoxicilina
Enalapril	Ibuprofeno	Furosemida
Sinvastatina	Amoxicilina	Hidroclorotiazida
Epoetina alfa	Vaproato de sódio	Amlodipina
Claritromicina	Sulfassalazina	Lisinopril
Nitroglicerina	Mesalazina	Alprazolam
Amoxicilina + Ácido	Carbamazepina	Sertralina
Clavulânico	Sulfato de Ferro III	Albuterol
Atrovastatina cálcica	Cloridrato de ranitidina	Metoprolol
Doxazosina	Cimetidina	Sinvastatina
Ranitidina	Naproxeno	Estrogênio conjugado
Celecoxibe	Atenolol	Lansoprazol
Ceftriaxona	Oxitetraciclina	Cetirizina
Hidroclorotiazida +	Eritromicina	Ibuprofeno
Enalapril	Diclofenaco	Levotiroxina
Nimesulida		

**Fonte:** Adaptado de BOTTONI *et al* (2010).

Apesar das reconhecidas vantagens no uso de medicamentos no que tange a qualidade de vida humana e animal, estudos esclarecem que o crescente consumo de fármacos traz consequências ao meio ambiente, o que pode ser demonstrado através da presença de diferentes produtos farmacêuticos em efluentes e águas superficiais (DAUGHTON E TERNES, 1999; SACHER *et al*, 2008 e ROIG, 2010). A existência desses compostos em matrizes aquosas deu origem a preocupação quanto aos riscos para a saúde ecológica e humana, conforme será discutido de forma mais detalhada ao longo desse documento.

### **3.2 A questão dos excipientes**

O recente interesse a respeito de fármacos dispostos no meio ambiente está focado nos princípios ativos dos mesmos (BACKHAUS e GRIMME, 1999; NUNES *et al.*, 2005; MUÑOZ *et al.*, 2008; NEUPARTH *et al.*, 2014). No entanto, para atribuir aos medicamentos as propriedades desejáveis, tais como taxa de liberação e absorção, estabilidade, volume, textura e cor, são adicionados excipientes (PIFFERI *et al.*, 1999; WASAN, 2001; WILLIAMS e BARRY, 2004; GURSOY e BENITA, 2004; DANNENFELSER *et al.*, 2004). Excipientes comumente utilizados são solventes, surfactantes, lubrificantes, emulsificantes e conservantes (CARLSSON *et al.*, 2006). Ainda, muitos deles são adicionados em outros produtos, tais como pesticidas, alimentos, cosméticos e itens de higiene pessoal. Embora esses compostos já tenham sido identificados em amostras ambientais (DAUGHTON e TERNES, 1999;

KOLPIN *et al.*, 2002; STACKELBERG *et al.*, 2004), a probabilidade de os excipientes atingirem o meio ambiente e proporcionarem efeitos tóxicos é pouco discutida.

Carlsson e colaboradores (2006) realizaram trabalho a respeito de cinco excipientes utilizados comumente na indústria farmacêutica, o clorocresol, docusato de sódio, metilparabeno, polissorbato 80 e laurilsulfato de sódio. Para as substâncias citadas, descobriu-se elevada toxicidade para organismos bentônicos, de água superficial e solo.

Em outra pesquisa, em que buscou-se avaliar o potencial tóxico de excipientes farmacêuticos, Silva e colaboradores (2014) testaram a fluoxetina em cinco diferentes formulações e encontraram valores de  $CE_{50}$  entre 0,25 a 15 mg/L para o organismo aquático *Chlorella vulgaris*. Comparativamente, os valores correspondentes testando-se a toxicidade isolada da substância ativa, o hidrocloreto de fluoxetina, são aproximadamente dez vezes mais baixos para o mesmo organismo, apontando para as propriedades tóxicas dos excipientes.

A situação discutida não se aplica apenas aos fármacos. Uma série de trabalhos propõe investigações nesse sentido quanto aos pesticidas e evidenciam que os excipientes e solventes são, frequentemente, mais tóxicos que os princípios ativos (GRISOLIA *et al.*, 2004; SURGAN *et al.*, 2010; BEGGEL *et al.*, 2010; COX; SURGAN, 2006). A situação agrava-se frente ao fato de que, em pesticidas, os ingredientes inertes e excipientes chegam a representar 90% do volume total das formulações (BEGGEL *et al.*, 2010). Nesse sentido, Cowles e colaboradores (2000) avaliaram a toxicidade do surfactante trisiloxan, considerado ingrediente inerte na formulação de pesticidas. Descobriu-se que o composto é capaz de gerar perturbações em importantes processos fisiológicos de ácaros e insetos, promovendo o sufocamento desses organismos. Em avaliação semelhante, Beggel e colaboradores (2010) apresentam estudo que compara a toxicidade crônica de dois pesticidas, o bifentrina piretróide e o fenilpirazol fipronil, com a de suas formulações comerciais, Talstar® e Termidor®. Os resultados encontrados esclarecem que para ambos os casos a formulação comercial mostrou-se mais tóxica que o princípio ativo, sugerindo que o aumento da toxicidade se deve a presença dos excipientes.

Conclui-se que são necessários dados mais precisos sobre a utilização, geração, destinação final e efeitos de excipientes, a fim de obter avaliações de riscos confiáveis e que proporcionem definições de estratégias que reduzam perigos e garantam melhor gestão dessas substâncias (CARLSSON *et al.*, 2006). Trata-se de um cenário inalterado até a atualidade.

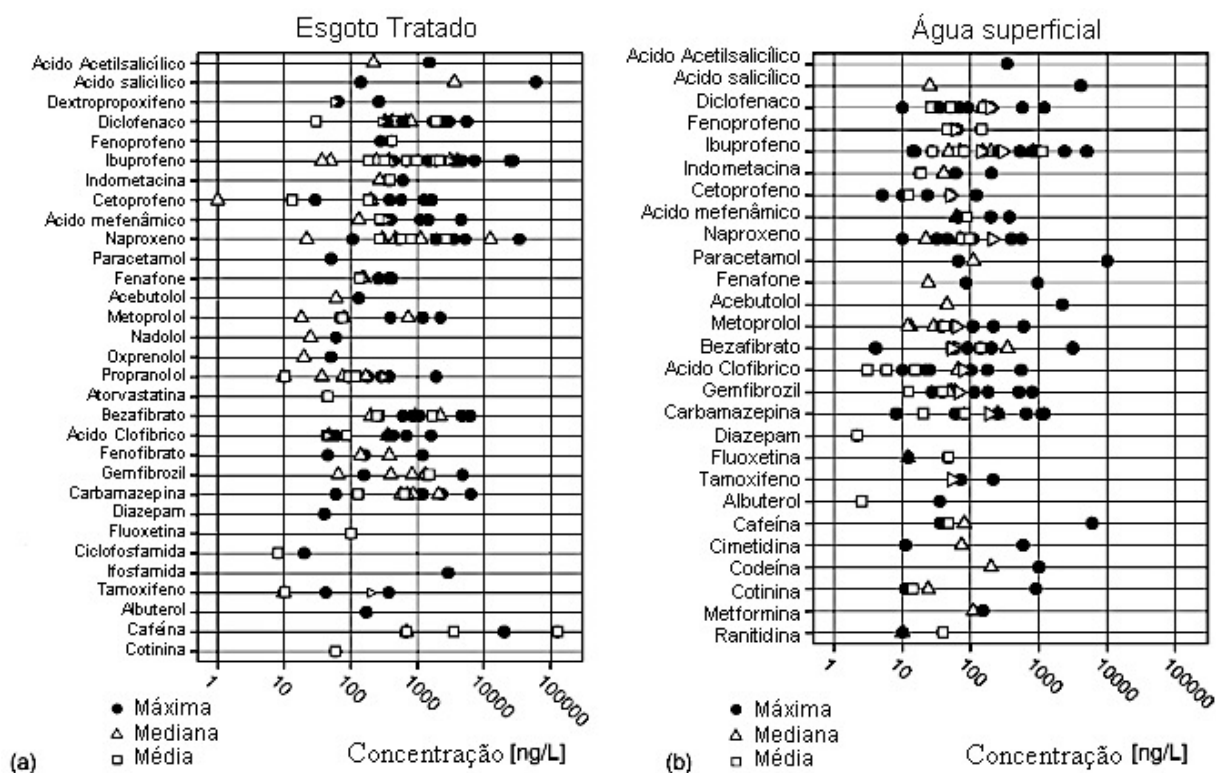
### **3.3 Caracterização de efluentes contaminados com fármacos**

O lançamento de carga proveniente de efluentes diretamente em lagos e rios é motivo de crescente preocupação. Medicamentos são frequentemente detectados em efluentes em níveis que variam de 1 ng/L até g/L. Dentre os efeitos causados por este nível de contaminação, citam-se a feminização de peixes, em função da presença de hormônios; efeitos negativos na reprodutividade e sobrevivência de organismos em função da exposição em laboratório a propranolol, diclofenaco, gemfibrozil, ibuprofeno e fluoxetina; além do aparecimento de bactérias resistentes à antibióticos (LARRSON; PEDRO; PAXEUS, 2007).

Esses compostos químicos são desenvolvidos para apresentarem um modo muito específico de ação e muitos deles são altamente persistentes no ambiente. Dentre os diversos fármacos usualmente encontrados em rios, lagoas, efluentes sanitários tratados, água subterrânea e mesmo água potável (Figura 2.1), os mais frequentemente listados são antiinflamatórios não-esteroidais, como o ácido acetilsalicílico e o diclofenaco, além da metformina, antibióticos, reguladores de colesterol e carbamazepina (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). Fent; Weston e Caminada (2006) citando Ternes (1998) exemplificam tal situação através de trabalho que encontrou 32 (trinta e dois) diferentes tipos de medicamentos em esgoto sanitário tratado, rios e lagoas na Alemanha.

Com relação aos antibióticos, Lindberg e colaboradores (2005) relataram que as fluorquinolonas são os antibióticos mais frequentemente detectados em efluentes e que, na maioria das vezes, estão acima do limite de quantificação. Em outro estudo realizado por Lindberg e colaboradores (2006), os antibióticos norfloxacino e ciprofloxacino foram detectados em 97% e o ofloxacino em 50% das amostras analisadas.

**Figura 2.1** - Concentração de fármacos em esgoto tratado (a) e águas superficiais (b) na Alemanha



**Fonte:** Adaptado de FENT; WESTON & CAMINADA (2006).

Procurando esclarecer a dimensão da contaminação ambiental por fármacos, Godoy (2014), em sua dissertação de mestrado, propôs tabela (Tabela 2.2) em que estão compilados trabalhos de diversos autores que discutiram a presença de fármacos em matrizes aquosas. Percebem-se diversas pesquisas de 2003 a 2011 que apontaram a presença de medicamentos, de diferentes classes, inclusive na água subterrânea, fonte mais protegida de eventuais contaminações.

**Tabela 2.2** - Exemplos da ocorrência de fármacos em amostras ambientais

Classes/Fármacos	CAS nº	Amostra	País	Concentração relatada ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Referência
<b>ANTIMICROBIANOS</b>					
Ciprofloxacina	85721331	Efluente de ETE industrial	Índia	28000-31000	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Ciprofloxacina	85721331	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,044-1,1	Fick <i>et al.</i> (2009)
Enrofloxacina	93106606	Efluente de ETE industrial	Índia	780-900	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Enrofloxacina	93106606	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,023-0,067	Fick <i>et al.</i> (2009)
Enoxacina	74011588	Efluente de ETE industrial	Índia	150-300	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Enoxacina	74011588	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,080-0,8	Fick <i>et al.</i> (2009)
Eritromicina	114078	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,01-0,07	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Eritromicina	114078	Efluente hospitalar	Espanha	0,01-0,03	Gómez <i>et al.</i> (2006)
Eritromicina	114078	Efluente de ETE	Reino Unido	0,13-0,18	Hilton e Thomas (2003)
Eritromicina	114078	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	0,057-1,00	Hilton e Thomas (2003)
Eritromicina	114078	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,071-0,141	Roberts e Thomas (2006)
Eritromicina	114078	Efluente final de ETE	Reino Unido	0,145-0,290	Roberts e Thomas (2006)
Eritromicina	114078	Água rio Tyne	Reino Unido	<0,004-0,070	Roberts e Thomas (2006)
Lomefloxacina	98079528	Efluente de ETE industrial	Índia	150-300	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Norfloxacino	70458967	Efluente de ETE industrial	Índia	390-420	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)

Norfloxacino	70458967	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,021-0,031	Fick <i>et al.</i> (2009)
Ofloxacino	82419361	Efluente de ETE industrial	Índia	150-160	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Ofloxacino	82419361	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,19-8,77	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Ofloxacino	82419361	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,026-0,48	Fick <i>et al.</i> (2009)
Sulfametoxazol	7234662	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,03-11,92	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Sulfametoxazol	7234662	Efluente de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Sulfametoxazol	7234662	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Sulfametoxazol	7234662	Afluente de ETE	Suécia	0,02	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Sulfametoxazol	7234662	Efluente de ETE	Suécia	0,07	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Sulfametoxazol	7234662	Água do rio Høje	Suécia	0,01	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Sulfametoxazol	7234662	Águas subterrâneas	Estados Unidos	Até 0,17	Fram e Belitz (2011)
Trimetoprima	738705	Efluente de ETE	Reino Unido	0,083-0,27	Hilton e Thomas (2003)
Trimetoprima	738705	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,010-0,039	Hilton e Thomas (2003)
Trimetoprima	738705	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,02-0,47	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Trimetoprima	738705	Efluente hospitalar	Espanha	0,01-0,03	Gómez <i>et al.</i> (2006)
Trimetoprima	738705	Afluente hospitalar	Suécia	0,08	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Trimetoprima	738705	Efluente hospitalar	Suécia	0,04	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Trimetoprima	738705	Água do rio Høje	Suécia	<0,001-0,02	Bendz <i>et al.</i> (2005)

Trimetoprima	738705	Efluente bruto	Reino Unido	0,213-0,300	Roberts e Thomas (2006)
Trimetoprima	738705	Efluente final	Reino Unido	0,218-0,322	Roberts e Thomas (2006)
Trimetoprima	738705	Água rio Tyne	Reino Unido	0,004-0,019	Roberts e Thomas (2006)
Trimetoprima	738705	Águas subterrâneas	Estados Unidos	Até 0,018	Fram e Belitz (2011)
Trimetoprima	738705	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,017-0,021	Fick <i>et al.</i> (2009)

#### ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS

Acetaminofeno	103902	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,06-2,42	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Acetaminofeno	103902	Efluente hospitalar	Espanha	0,5-29	Gómez <i>et al.</i> (2006)
Acetaminofeno	103902	Efluente de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Acetaminofeno	103902	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Acetaminofeno	103902	Bacia do rio Atibaia	Brasil	0,84	Sodré <i>et al.</i> (2007)
Acetaminofeno	103902	Reservatório Billings	Brasil	0,0003-0,0103	Almeida e Weber (2005)
Acetaminofeno	103902	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,069570-6,924	Roberts e Thomas (2006)
Acetaminofeno	103902	Efluente final de ETE	Reino Unido	<0,020	Roberts e Thomas (2006)
Acetaminofeno	103902	Águas subterrâneas	Estados Unidos	Até 1,89	Fram e Belitz (2011)
Ácido acetilsalicílico	50782	Bacia do rio Atibais	Brasil	4,15	Sodré <i>et al.</i> (2007)
Ácido mefenâmico	61687	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,01-0,04	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Ácido mefenâmico	61687	Efluente de ETE	Reino Unido	0,72-1,1	Hilton e Thomas (2003)
Ácido mefenâmico	61687	Águas superficiais	Reino Unido	<0,05-0,065	Hilton e Thomas (2003)
Ácido mefenâmico	61687	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,136-0,363	Roberts e Thomas (2006)



Ácido mefenâmico	61687	Efluente final de ETE	Reino Unido	0,290-0,396	Roberts e Thomas (2006)
Cetorolaco	74103074	Efluente hospitalar	Espanha	0,2-59,5	Gómez <i>et al.</i> (2006)
Diclofenaco	15307796	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,08-18,74	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Diclofenaco	15307796	Efluente hospitalar	Espanha	0,06-1,9	Gómez <i>et al.</i> (2006)
Diclofenaco	15307796	Efluente de ETE	Reino Unido	0,35-0,46	Hilton e Thomas (2003)
Diclofenaco	15307796	Águas superficiais	Reino Unido	<0,02-0,091	Hilton e Thomas (2003)
Diclofenaco	15307796	Afluente de ETE	Suécia	0,16	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Diclofenaco	15307796	Efluente de ETE	Suécia	0,12	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Diclofenaco	15307796	Águas rio Høje	Suécia	0,01-0,12	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Diclofenaco	15307796	Represa Billings	Brasil	0,0081-0,3945	Almeida e Weber (2005)
Diclofenaco	15307796	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,901-1,036	Roberts e Thomas (2006)
Diclofenaco	15307796	Efluente final de ETE	Reino Unido	0,261-0,598	Roberts e Thomas (2006)
Cetoprofeno	22071154	Afluente de ETE	Suécia	0,94	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Cetoprofeno	22071154	Efluente de ETE	Suécia	0,33	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Cetoprofeno	22071154	Águas do rio Høje	Suécia	0,01-0,07	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Cetoprofeno	22071154	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,16-2,71	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Ibuprofeno	79261497	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,16-9,89	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Ibuprofeno	79261497	Efluente hospitalar	Espanha	1,5-151	Gómez <i>et al.</i> (2006)
Ibuprofeno	79261497	Efluente de ETE	Reino Unido	1,7-3,8	Hilton e Thomas (2003)
Ibuprofeno	79261497	Águas superficiais	Reino Unido	<0,02	Hilton e Thomas (2003)
Ibuprofeno	79261497	Afluente de ETE	Suécia	3,59	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Ibuprofeno	79261497	Efluente de ETE	Suécia	0,15	Bendz <i>et al.</i> (2005)

Ibuprofeno	79261497	Águas do rio Høje	Suécia	0,01-0,22	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Ibuprofeno	79261497	Represa Billings	Brasil	0,010-0,0782	Almeida e Weber (2005)
Ibuprofeno	79261497	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,027979-7,741	Roberts e Thomas (2006)
Ibuprofeno	79261497	Efluente final de ETE	Reino Unido	1,979-4,239	Roberts e Thomas (2006)
Ibuprofeno	79261497	Água do rio Tyne	Reino Unido	0,144-2,37	Roberts e Thomas (2006)
Indometacina	53861	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,05-0,38	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Naproxeno	22204531	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,02-2,06	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Naproxeno	22204531	Afluente de ETE	Suécia	3,65	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Naproxeno	22204531	Efluente de ETE	Suécia	0,25	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Naproxeno	22204531	Águas do rio Høje	Suécia	0,09-0,25	Bendz <i>et al.</i> (2005)

#### ANTIHIPERTENSIVOS

Atenolol	60966510	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,05-0,67	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Atenolol	60966510	Efluente hospitalar	Espanha	0,1-122	Gómez <i>et al.</i> (2006)
Atenolol	60966510	Afluente de ETE	Suécia	0,03	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Atenolol	60966510	Efluente de ETE	Suécia	0,16	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Atenolol	60966510	Amostras do rio Høje	Suécia	0,01-0,06	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Atenolol	60966510	Represa Billings	Brasil	0,0009-0,0164	Almeida e Weber (2005)
Metoprolol	51384511	Efluente de ETE industrial	Índia	800-950	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Metoprolol	51384511	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,01-0,18	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Metoprolol	51384511	Afluente de ETE	Suécia	0,16	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Metoprolol	51384511	Efluente de ETE	Suécia	0,19	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Metoprolol	51384511	Águas do rio Høje	Suécia	0,03-0,07	Bendz <i>et al.</i> (2005)

Metoprolol	51384511	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,090	Fick <i>et al.</i> (2009)
Sotalol	959240	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,11-1,82	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)

#### AGENTES REDUTORES LIPÍDICOS

Ácido clofibrínico	882097	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,01-7,91	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Ácido clofibrínico	882097	Efluente de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Ácido clofibrínico	882097	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Ácido clofibrínico	882097	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	<0,020-0,651	Roberts e Thomas (2006)
Ácido clofibrínico	882097	Efluente final de ETE	Reino Unido	<0,020-0,044	Roberts e Thomas (2006)
Benzafibrato	41859670	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,03-15,06	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Benzafibrato	41859670	Represa Billings	Brasil	0,0012-0,0037	Almeida e Weber (2005)
Gemfibrozila	25812300	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,04-7,78	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Gemfibrozila	25812300	Afluente de ETE	Suécia	0,71	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Gemfibrozila	25812300	Efluente de ETE	Suécia	0,18	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Gemfibrozila	25812300	Águas do Rio Høje	Suécia	<0,001-0,17	Bendz <i>et al.</i> (2005)

#### ANTIDEPRESSIVOS

Citalopram	59729338	Efluente de ETE industrial	Índia	770-840	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Citalopram	59729338	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,076-1,4	Fick <i>et al.</i> (2009)
Lofepamina	23047258	Efluente de ETE	Reino Unido	<0,010	Hilton e Thomas (2003)

Lofepiramina	23047258	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,010	Hilton e Thomas (2003)
--------------	----------	--	-------------	--------	------------------------

#### ANTIEPILEPTICOS

Carbamazepina	298464	Efluente hospitalar	Espanha	0,03-0,07	Gómez <i>et al.</i> (2006)
Carbamazepina	298464	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,08-3,09	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Carbamazepina	298464	Afluente de ETE	Suécia	1,68	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Carbamazepina	298464	Efluente de ETE	Suécia	1,18	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Carbamazepina	298464	Águas do rio Høje	Suécia	<0,001-0,5	Bendz <i>et al.</i> (2005)
Carbamazepina	298464	Águas subterrâneas	Estados Unidos	Até 0,42	Fram e Belitz (2011)

#### ANSIOLÍTICOS

Diazepam	439145	Represa Billings	Brasil	0,0002-0,0048	Almeida e Weber (2005)
----------	--------	------------------	--------	---------------	------------------------

#### ANTI-HISTAMÍNICOS

Cetirizina	83881521	Efluente de ETE industrial	Índia	1300-1400	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
------------	----------	----------------------------	-------	-----------	--------------------------------

#### ANTI-ULCERATIVOS

Ranitidina	66357593	Efluente de ETE industrial	Índia	90-160	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Ranitidina	66357593	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,01-0,57	Ginebreda <i>et al.</i> (2010)
Ranitidina	66357593	Efluente hospitalar	Espanha	0,4-1,7	Gómez <i>et al.</i> (2006)

#### ANTI-NEOPLÁSICOS

Tamoxifeno	10540291	Efluente hospitalar	Reino Unido	<0,010	Hilton e Thomas (2003)
Tamoxifeno	10540291	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,010	Hilton e Thomas (2003)
Tamoxifeno	10540291	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,143-0,215	Roberts e Thomas (2006)

Tamoxifeno	10540291	Efluente final de ETE	Reino Unido	0,146-0,369	Roberts e Thomas (2006)
Tamoxifeno	10540291	Água do rio Tyne	Reino Unido	0,027-0,212	Roberts e Thomas (2006)

#### HORMÔNIOS SEXUAIS

17 $\alpha$ -etinilestradiol	57636	Bacia do rio Atibaia	Brasil	0,006-0,31	Sodré <i>et al.</i> (2007)
17 $\alpha$ -etinilestradiol	57636	Águas superficiais	Áustria	0,00033	Hohenblum <i>et al.</i> (2004)
17 $\alpha$ -etinilestradiol	57636	Águas subterrâneas	Áustria	0,00094	Hohenblum <i>et al.</i> (2004)
17 $\alpha$ -etinilestradiol	57636	Águas subterrâneas	França	0,003	Vulliet <i>et al.</i> (2008)
17 $\beta$ -estradiol	57636	Bacia do rio Atibaia	Brasil	0,038-2,51	Sodré <i>et al.</i> (2007)

#### AGENTES OPIÓIDES

Codeína	76573	Efluente hospitalar	Espanha	0,01-5,7	Gómez <i>et al.</i> (2006)
Codeína	76573	Águas subterrâneas	Estados Unidos	Até 0,214	Fram e Belitz (2011)

#### ANTIPARASITÁRIOS

Metronidazol	443481	Efluente hospitalar	Espanha	1,8-9,4	Gómez <i>et al.</i> (2006)
--------------	--------	---------------------	---------	---------	----------------------------

#### ANTIFÚNGICOS

Clotrimazol	23593751	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,031-0,033	Roberts e Thomas (2006)
Clotrimazol	23593751	Efluente final de ETE	Reino Unido	0,010-0,027	Roberts e Thomas (2006)
Clotrimazol	23593751	Água do rio Tyne	Reino Unido	0,006-0,034	Roberts e Thomas (2006)

**Fonte:** Adaptado de GODOY, A. (2014)

A partir da análise da tabela 2.2 depreende-se a presença de 36 (trinta e seis) princípios ativos de 14 (quatorze) distintas classes, os quais são encontrados em amostras de água de diversas procedências. Esses resultados permitem a conclusão de que há efetiva contaminação por compostos farmacêuticos em matrizes aquosas, a qual precisa ser avaliada, a partir de diversos métodos analíticos, permitindo estimativa de possíveis consequências.

### **3.4 Testes ecotoxicológicos**

O século XIX foi marcado pela segunda revolução industrial, distinta pelo notável crescimento da indústria química, petroquímica e metalomecânica, o que resultou em uma considerável atuação antrópica nas paisagens e no meio ambiente, perdurando até os dias atuais. A quantidade de substâncias químicas que passaram a compor a atmosfera, a água e o solo interferiram e interferem nos ecossistemas terrestres, sendo hodiernamente um dos assuntos mais debatidos na esfera pública, aliados a um considerável aumento populacional e acidentes industriais de repercussão internacional. Esse é o contexto que ensejou o chamado monitoramento ambiental, no qual insere-se a toxicologia ambiental ou ecotoxicologia.

O termo foi cunhado no ano de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU)*, em Estocolmo (TRUHAUT, 1977). Por ecotoxicologia, entende-se "ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado" (PLAA e HEWITT, 1982). Nesse sentido, os testes ecotoxicológicos são métodos utilizados para detectar e avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos danosos em organismos vivos.

Nos países da União Europeia, há normas que já exigem análises de ecotoxicidade para o monitoramento ambiental. Amplamente utilizado para diversos fins, esses testes levam em consideração o sinergismo ou antagonismo entre substâncias químicas, mensurando seus respectivos efeitos nos mais diversos ecossistemas (SILVA *et al.*, 2011).

#### **3.4.1 Tipos de testes ecotoxicológicos**

Os testes de toxicidade são divididos em duas modalidades: toxicologia global e específica. Na toxicologia global os efeitos avaliados fornecerão indicações mais generalizadas (não específicas sobre tecidos ou órgãos) de um impacto tóxico do produto testado sobre o organismo vivo. Nesse sentido, os testes que compuseram essa pesquisa fazem parte da toxicologia global e podem ser classificados em agudos, crônicos e de fuga. Essas análises diferem na duração e nas respostas finais avaliadas.

#### 3.4.1.1 Teste de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos a um estímulo que se manifesta, em geral, em um intervalo de 0 a 96 h (RAND; PATROCELLI, 1985), mas que pode variar de acordo com a expectativa de vida do ser vivo testado. Os efeitos tóxicos medidos em testes de toxicidade aguda incluem qualquer resposta exibida por um organismo-teste ou população resultante de um estímulo químico. Normalmente, o efeito observado é a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade (COSTA *et al.*, 2008).

A avaliação ecotoxicológica aguda constitui-se, geralmente, uma abordagem exploratória para evidenciar um problema de qualidade de corpos hídricos que recebem despejos industriais ou domésticos (BERTOLETTI; ZAGATO, 2006 *apud* MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Esse tipo de teste também pode ser aplicado para avaliar a sensibilidade relativa de organismos para um determinado agente tóxico isolado e as concentrações seguras de agentes químicos para preservação da vida e do ambiente (RASGALLA *et al.*, 2002 *apud* MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). São objetivos de testes de toxicidade aguda identificar a variabilidade das respostas ao agente entre as diferentes espécies, identificar a toxicidade comparativa e detectar contaminações agudas. De acordo com Magalhães e Ferrão Filho (2008), no Brasil, esses testes vêm sendo empregados com o intuito de auxiliar na gestão de impactos ambientais, avaliar a eficiência de estações de tratamento, bem como requisito para obtenção e manutenção de licenças junto aos órgãos ambientais de alguns estados.

Os testes de toxicidade aguda permitem que sejam determinados por métodos estatísticos, valores de Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>) e Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) (Tabela 2.3). Geralmente, os valores de concentrações efetivas e letais são expressos em relação a 50% dos organismos, uma vez que estas respostas são de fácil reprodução, podem ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (COSTA *et al.*, 2008).

**Tabela 2.3** - Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade

PARÂMETRO	DEFINIÇÃO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO
DL <sub>50</sub>	Dose Letal Média: dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e condições do teste.	24 a 96 h
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal Média: concentração de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 a 96 h
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva Média: concentração de amostra que causa um efeito agudo (imobilidade, por exemplo) a 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 ou 48 h
CENO	Concentração de Efeito Não Observado: maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 -21 dias
CEO	Concentração de Efeito Observado: menor concentração de agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 - 21 dias

**Fonte:** COSTA *et al.*, 2008

Exemplo da relevância de estudos de toxicidade aguda para a área de contaminação de efluentes foi verificado por Yoshimura e Endoh (2005), em que a toxicidade aguda de cinco fármacos (bitionol, pirimetamina, cloridrato de levamisol, cloridrato de ambroxol e triclorfon), empregados no campo da medicina veterinária, foi testada em *Oryzias latipes*, *Daphnia magna* e *Brachionus calyciflorus*. O objetivo do trabalho foi determinar a 24, 48, 72 e 96 h CL<sub>50</sub> para os três organismos, além dos valores de 24 e 48 h CE<sub>50</sub> para *D. magna* e 24 h CE<sub>50</sub> para *B. calyciflorus*. Dentre os fármacos pesquisados, o bitionol, seguido pela pirimetamina, foram os mais tóxicos e o cloridrato de ambroxol mostrou-se o menos nocivo. A exceção foi o resultado obtido com o crustáceo *D. magna*, que é mais sensível ao triclorfon.



#### 3.4.1.2 Teste de toxicidade crônica

Testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas por um período que pode abranger de 1/10 a todo o ciclo de vida do organismo-teste. O fato de uma substância química não produzir efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos em testes de toxicidade aguda não indica que ela não seja tóxica para eles (COSTA *et al.*, 2008). Testes de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações subletais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação.

Comparado aos testes agudos, essas análises são mais sensíveis à elevada diluição esperada em amostras ambientais (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). São, portanto, comumente utilizados quando os testes de toxicidade aguda são insuficientes para caracterizar um efeito tóxico mensurável.

Os resultados obtidos em testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>), Concentração de Efeito Não observado (CENO) ou Concentração de Efeito Observado (CEO) (Tabela 2.3).

Alguns trabalhos evidenciam a importância de realização de testes de toxicidade crônica em complementação aos de toxicidade aguda. Verificou-se que antibióticos em corpos d'água são capazes de trazer efeitos danosos significativos na reprodução de *Aliivibrio fischeri* e *Aliivibrio harveyi*, embora afetem pouco a bioluminescência desses organismos em testes produzidos em curto espaço de tempo (THOMULKA e MCGEE, 1993; BACKHAUS e GRIMME, 1999).

#### 3.4.1.3 Testes de toxicidade de fuga

Conforme já mencionado, os testes de fuga são experimentos que procuram esclarecer a concentração a partir da qual determinado organismo evade um determinado ambiente. A grande relevância dessa análise mimética é que, na natureza, quando os organismos são expostos a determinado tóxico, muito antes da letalidade, tradicionalmente estudada nos

ensaios ecotoxicológicos, os organismos fogem daquele local. Ressalta-se que, do ponto de vista do equilíbrio de um ecossistema, a morte e a fuga representam o mesmo problema nas ciências ambientais (ARAÚJO *et al.*, 2014a).

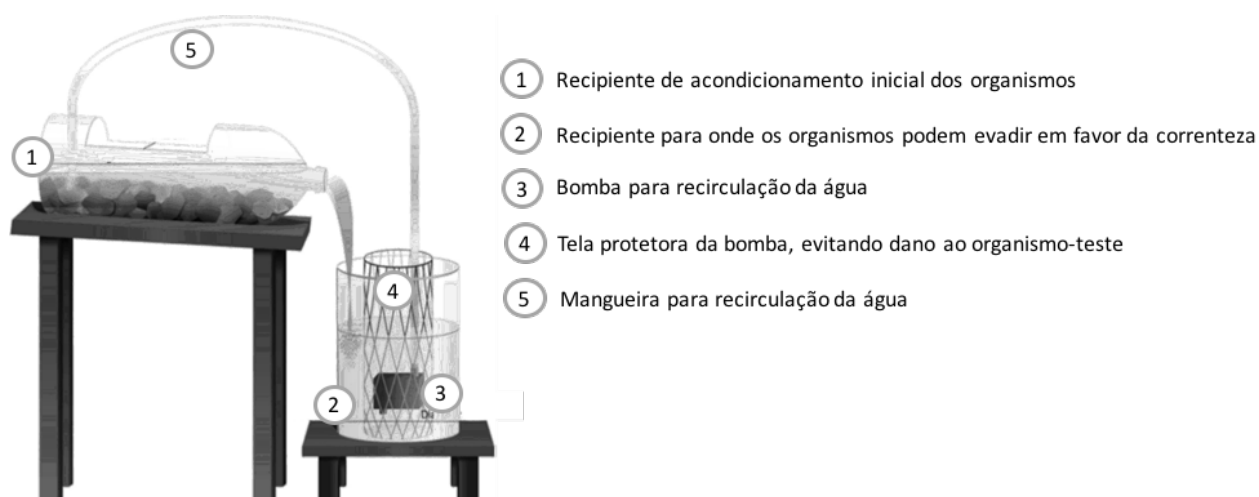
A partir da concepção acima apresentada, os testes de fuga têm demonstrado potencial em fornecerem informações a respeito da habilidade de organismos de evitarem a contaminação a partir da evasão, favorecendo, dessa forma, a compreensão da distribuição espacial de espécies em ecossistemas impactados (ARAÚJO *et al.*, 2012). Nesse contexto, Araújo e colaboradores (2014a) avaliaram a resposta de fuga de peixes da espécie *Danio rerio* frente a presença do fungicida purimetanil. Essa resposta foi medida através da utilização de um aparato composto por sete unidades, que garantiram a formação de um gradiente de concentração. Após exposição de 4 h, a evasão de peixes nas três maiores concentrações do fungicida variou entre 29% e 66%. O  $CA_{50}^1 - 4h$  (concentração na qual 50 % dos peixes evita o contaminante após 4 h de exposição) foi de 1,10 mg/L.

O modelo estático para medição de resposta de fuga supramencionado não é o único capaz de proporcionar essa avaliação (Figura 2.2), conforme proposto por Araújo e colaboradores (2013). Alguns organismos, como algas e insetos aquáticos, não possuem mecanismos ativos de locomoção, o que impediria uma eventual evasão de ambientes contaminados. No entanto, sabe-se que esses seres utilizam a própria correnteza de corpos d'água a fim de evitar ambientes desfavoráveis. Esse fenômeno é bem documentado em resposta à predação, densidade populacional, disponibilidade e qualidade dos alimentos e, ainda, propriedades químicas da água (BRITTAIN; EIKELAND, 1988; FLEKER, 1992). Nesse sentido, Araújo e colaboradores (2014b) realizaram pesquisa com o objetivo fundamental de avaliar a capacidade de grupos autóctones de insetos aquáticos (*Anomalocosmoecus palugillensis*) do Equador de evitarem concentrações do contaminante hidrocarboneto aromático policíclico, contido na fração solúvel de petróleo bruto. Os resultados da pesquisa apontam para o fato de que, em concentrações mais baixas, a principal causa de declínio populacional dos insetos foi a fuga.

---

<sup>1</sup> Não existe literatura brasileira suficiente abrangente de forma a permitir adotar uma tradução segura para o termo  $AC_x$  (*Avoidance concentration of x%*). Sendo assim, nesse documento, opta-se por tratar a concentração que gera fuga em x% dos organismos como  $CA_x$ .

**Figura 2.2** – Aparato utilizado para ensaios de fuga onde os organismos não são dotados de mecanismos de locomoção ativo e, por esse motivo, utilizam a correnteza para movimentação



Fonte: Adaptado de Araújo *et al.*, 2014b

### 3.4.2 Escolha do organismo teste

Observa-se que é corrente o uso de mais de um organismo nos testes ecotoxicológicos, com o intuito de se avaliar a cadeia alimentar do modo menos fragmentado possível (SILVA *et al.*, 2011; KÜSTER; DORUSCH; ALTENBURGER, 2005; MARQUES, 2011; MACKEN *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2005; MANFRA, 2007; KUNGOLOS *et al.*, 2004; PALMA *et al.*, 2008).

Em geral, esses testes são realizados com espécies de microcrustáceos (sendo comum as espécies do gênero *Daphnia*), decompositores (igualmente comum a bactéria *Aliivibrio fischeri*) e, em alguns casos, espécies de algas ou animais (BIAŁK-BIELIN'SKA *et al.*, 2011; SINHA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2011).

A escolha do organismo a ser utilizado no teste ecotoxicológico é importante, uma vez que a ausência de resposta de uma determinada espécie a certa substância pode traduzir apenas uma resistência específica, ainda que a substância em questão seja tóxica ou danosa ao ambiente analisado.

Magalhães e Ferrão Filho (2008) citando Rand e Petrocelli (1985) afirmam que, para a escolha do organismo teste, diversos critérios devem ser observados: abundância e disponibilidade; significativa representação ecológica na biocenose; cosmopolitismo da espécie; conhecimento prévio de sua fisiologia; biologia e hábitos; estabilidade genética e uniformidade populacional; sazonalidade; sensibilidade constante e apurada; importância

comercial; e facilidade de cultivo em laboratório. Esses quesitos dificultam a existência de um arquétipo ideal para exames toxicológicos. Portanto, exige-se uma padronização de espécies para cada ecossistema em estudo e, ademais, não se eximiria o uso de espécies encontradas no próprio ecossistema (espécies nativas). Os autores, ainda, observando o problema da inexistência de uma espécie que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema, recomendam utilizar três exemplares de diferentes níveis tróficos, aumentando a probabilidade de respostas tóxicas diferenciadas, através de organismos de maior ou menor sensibilidade a certas substâncias.

Exemplo dessa recomendação foi verificado por Palma e colaboradores (2008), que avaliaram a toxicidade aguda de pesticidas na região do Alentejo, em Portugal. Os resultados indicaram que a resposta a um determinado composto é fortemente dependente da sensibilidade àquela mesma substância. Também se constatou que as bactérias são notadamente menos resistentes a herbicidas e inseticidas do que são os crustáceos. Além disso, constatou-se que algumas espécies - no caso, o crustáceo *Thamnocephalus platyurus* -, apresentam melhores resultados em determinados exames, a despeito de espécies já amplamente utilizadas e divulgadas no meio científico, como *Daphnia magna*, *Daphnia carinata* e *Aliivibrio fischeri*.

Nesse mesmo sentido, Silva e colaboradores (2011) avaliaram a toxicidade de resíduos industriais que passaram pelo tratamento de estabilização-solidificação. Os testes com *Daphnia magna* mostraram-se mais sensíveis do que aqueles com o *Aliivibrio fischeri*, sendo ambos mais sensíveis que as algas do gênero *Scenedesmus subspicatus*.

Vale ressaltar que a seleção razoável de espécies, além da adequação e da melhor precisão, permite que se encontre novas alternativas para organismos em franco uso nos testes ecotoxicológicos que, notadamente, são de difícil cultivo. É o caso do *T. platyurus*, alternativa à *D. magna* em análises de certas substâncias encontradas em ambientes impactados, como os pesticidas atrazina, sulfato de endosulfan e cloropirifos (PALMA *et al.*, 2008) e certos metais traços, como zinco, cobre e dióxido de titânio (HEINLAAN *et al.*, 2008 *apud* PALMA *et al.*, 2008).

#### 3.4.2.1 Teste de toxicidade com *Aliivibrio fischeri*

O teste de toxicidade aguda por *Aliivibrio fischeri* é considerado uma alternativa eficiente devido à correlação que apresenta com outros bioensaios que utilizam peixes e invertebrados e pela rapidez de obtenção de resultados (KAISER, 1998). Estudos de correlação entre resultados de toxicidade com *Aliivibrio fischeri* e outros organismos aquáticos, inclusive de água doce, são bastantes numerosos, o que proporciona maior confiança na utilização desse microorganismo em testes ecotoxicológicos (KAISER e PALABRICA, 1991; MUNKTTRICK *et al.*, 1991; ZHAO *et al.*, 1993; KAISER *et al.* 1994).

Exemplo de pesquisa que utilizou análise com *Aliivibrio fischeri* e obteve sucesso é a de Białk-Bielin'ska e colaboradores (2011), em que se avaliou a toxicidade de doze sulfonamidas, buscando comparar a sensibilidade da bactéria marinha luminescente com a de outros organismos, tais como algas e plantas. Nesse estudo, verificou-se que os organismos *Lemna minor* e *Scenedesmus vacuolatus* são os mais sensíveis à contaminação por esse tipo de fármaco.

Outro trabalho que utiliza de forma exitosa a bactéria *Aliivibrio fischeri* é o de Kim e colaboradores (2007), em que os quatro fármacos mais utilizados na Coreia – acetaminofeno, carbamazepina, diltiazem e outras seis sulfonaminas – tem toxicidade testada para *Aliivibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Oryzias latipes*. Dentre esses organismos, o mais sensível a contaminação pelos fármacos supracitados foi a *Daphnia magna*.

#### 3.4.2.2 Testes de toxicidade com algas, especificamente do gênero *Chlorophyceae*

As clorófitas são a principal classe de algas verdes. Tratam-se de organismos de água doce, móveis ou não, predominantemente unicelulares, mas que frequentemente formam colônias. Apresentam, ainda, reprodução assexuada e são compostas, sobretudo, por celulose e clorofilas do tipo A e B (RAVEN *et al.*, 2007).

No que tange a toxicologia no contexto do estudo da bioquímica e fisiologia das plantas, um dos organismos teste mais adequados são as algas unicelulares do gênero *Chlorophyceae*, especialmente os organismos *Chlorella vulgaris* e *Pseudokirchneriella subcapitata*. Isso, em função do já consolidado manejo laboratorial, bem como pelo fato de as algas verdes serem evolutivamente as mais próximas das plantas vasculares. Isso é, seu metabolismo é mais estreitamente relacionado com o de plantas superiores, permitindo resultados mais correlatos

aos desses organismos, mesmo através de testes com uma única célula (PIETRYCZUK e CZERPAK, 2011).

Ainda, o uso de seres fotossintetizantes em testes ecotoxicológicos é relevante, uma vez que se tratam de organismos com importante função na cadeia alimentar, já que são produtores primários, reguladores do nível de oxigênio de corpos d'água e, ainda, responsáveis por parte da ciclagem bioquímica de elementos (SINHA *et al.*, 2005).

Nesse sentido, Pro e colaboradores (2003) utilizaram macrófitas e algas do gênero *Chlorophyceae* com sucesso ao testarem a toxicidade dos fármacos sulfaclopiridazina e tetraciclina. Os resultados encontrados na citada pesquisa apontaram para o fato de que os dois organismos respondem de forma significativamente distinta à contaminação por esses fármacos, sendo a macrófita mais sensível que a alga em ambos os casos.

#### 3.4.2.3 Testes de toxicidade com *Cyprinus carpio*

A carpa comum (Figura 2.3), *Cyprinus carpio*, possui distribuição cosmopolita. No México, por exemplo, a espécie foi introduzida em 80% dos corpos d'água, sendo um organismo de grande importância ecológica. Por se tratar de peixe sensível à contaminação e de fácil manejo em laboratório, a carpa comum é frequentemente utilizada em testes de toxicidade com êxito, sendo considerada uma espécie bioindicadora da qualidade da água (NAVA-ÁLVAREZ, 2014).

Com relação à importância econômica da carpa comum, informa-se que a produção mundial da espécie ultrapassa 20 milhões de toneladas por ano, correspondendo a 40% da produção global na aquicultura e 70% se considerada apenas a produção em água-doce (XU *et al.*, 2014). O uso extensivo da carpa na aquicultura favoreceu o desenvolvimento de técnicas de manejo do animal, o que facilita sua manutenção e cultivo em laboratório.

**Figura 2.3-** Carpa comum (*Cyprinus carpio*)



**Fonte:** COPASA

Pelo exposto, observa-se que se trata de espécie comumente utilizada para ensaios ecotoxicológicos. Objetivando avaliar a toxicidade crônica do inseticida piretóide cipermetrina, a espécie *Cyprinus carpio* foi testada por David e colaboradores (2004). As análises levaram a conclusão de que essa é uma substância tóxica para o peixe, com efeito nocivo sobre o seu metabolismo celular, proporcionando a sintetização de proteínas deficientes.

No contexto da toxicidade de fármacos, a carpa comum também foi testada. Nava-Álvarez e colaboradores (2014) discutiram a toxicidade dos fármacos diclofenaco e acetaminofeno sobre o organismo citado. Os medicamentos avaliados induziram estresse oxidativo em *C. Carpio*, tanto na forma isolada quanto misturados, além disso, o nível de danos gerados dependeu do órgão, do tipo de agente tóxico e da forma de exposição

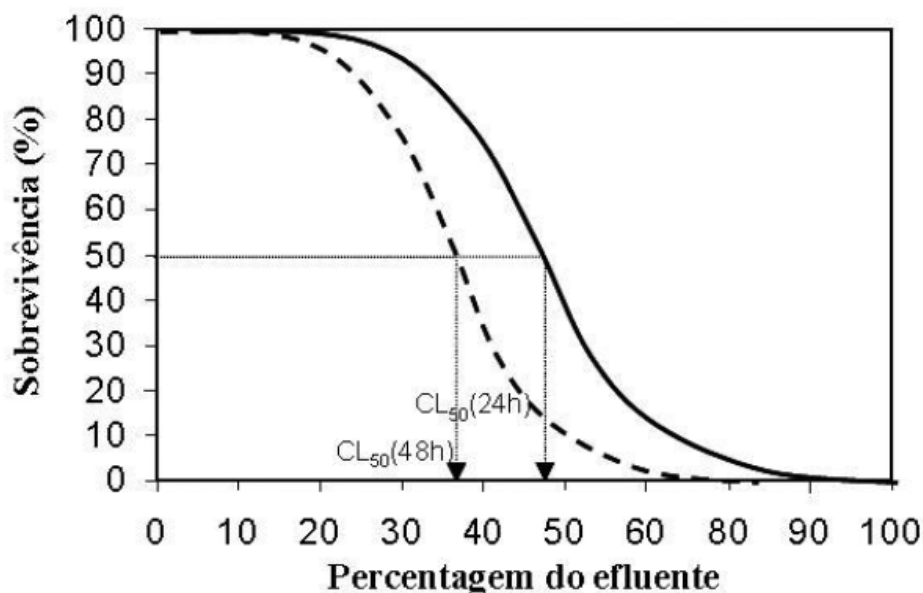
### **3.4.3 Relação dose-resposta**

A relação entre a concentração de uma substância química a qual é exposto um determinado organismo e o efeito nocivo que lhe é produzido, conhecida como relação dose-resposta, é um dos aspectos mais importantes da toxicologia aquática. A relação dose-resposta constitui a base fundamental para a avaliação do risco gerado pelas substâncias químicas no meio ambiente, porque permite quantificar a toxicidade aguda dessas substâncias. Com menos frequência, a expressão dose-efeito pode ser empregada. No entanto, em toxicologia os termos “efeito” e “resposta” se diferenciam (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Utiliza-se o

termo “efeito” para denominar uma alteração biológica e o termo “resposta” para indicar a proporção de uma população que manifesta um efeito definido.

Em geral, as curvas que representam a relação dose-resposta apresentam comportamento não-retilíneo do tipo sigmóide (Figura 2.4). Dois parâmetros importantes podem ser determinados a partir das curvas dose-resposta: a concentração ou dose, que resulta em 50% do efeito medido, ou seja, os valores de  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$  e o coeficiente angular da porção linear da curva que passa pelo ponto correspondente à  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$  (COSTA *et al.*, 2008). Os dois parâmetros são necessários para descrever precisamente a relação entre a concentração do agente químico e o efeito deletério provocado nos organismos-teste. Ainda de acordo com COSTA *et al.* (2008), diferentes substâncias químicas podem exibir diferentes valores de  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$ , mas podem apresentar os mesmos valores de coeficientes angulares. Valores similares de coeficientes angulares podem indicar que os modos de ação das substâncias químicas analisadas são similares.

**Figura 2.4** - Curva de dose-resposta hipotética para um efluente qualquer em que concentração do efluente é dada pela porcentagem de diluição da amostra do efluente na solução-teste. A linha contínua representa a resposta nas primeiras 24 horas e a linha pontilhada após 48 horas de exposição



Fonte: MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008

Uma forma de explicar variações de configuração em uma curva dose-resposta é dizer que cada indivíduo de uma população tem uma tolerância própria e requer determinada dose antes de responder com um efeito. Pode-se reconhecer uma região inicial, onde o efeito não se



apresenta, seguida de uma região intermediária, onde os efeitos desenvolvem-se rapidamente e uma região final, onde o efeito diminui assintoticamente.

Yu (2005) esclarece que um importante problema refletido nos valores  $CL_{50}$  e  $CE_{50}$  é que expressam concentrações ambientais de substâncias tóxicas referentes a um determinado tempo de exposição, estabelecido para cada teste. Assim, uma substância que se move lentamente nos tecidos, por exemplo, pode apresentar uma toxicidade menor no período do teste, simplesmente pelo fato de sua concentração no tecido alvo não ter atingido níveis suficientes para provocar efeito tóxico durante o intervalo de tempo considerado.

### **3.5 *Ensaio ecotoxicológicos: aspectos legislados e práticas vigentes***

Ensaio ecotoxicológicos com organismos aquáticos fazem parte das exigências da legislação federal e estadual na avaliação da qualidade ambiental visando à preservação da vida aquática. Estes ensaios também são utilizados no controle do lançamento de efluentes industriais e de materiais dragados, tanto em ambientes marinho, estuarino ou de água doce, para assegurar a manutenção das condições e padrões de qualidade previamente estabelecidos para um determinado corpo d'água.

#### **3.5.1 Aspectos legislados**

A Resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. A Resolução estabelece em seu artigo 34, parágrafo 1º, que efluentes líquidos não devem causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos para organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental. Ainda no artigo 34, parágrafo 2º esclarece-se que os critérios de toxicidade previstos no parágrafo 1º devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente. No entanto, de acordo com o parágrafo 3º, nos corpos de água em que as condições e padrões de qualidade previstos na Resolução não incluem restrições de toxicidade a organismos aquáticos, não se aplicam as exigências anteriormente mencionadas. Esta resolução faz uso dos ensaios ecotoxicológicos, portanto, para o estabelecimento de critérios de toxicidade para os corpos

d'água, de forma a garantir a preservação da biodiversidade dos corpos hídricos quando do lançamento de efluentes.

Vale mencionar que a Resolução CONAMA n° 430 de 13 de maio de 2011 (BRASIL, 2011), que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do CONAMA, não aborda explicitamente a questão dos testes ecotoxicológicos.

Para atender as exigências da legislação federal, o estado de Minas Gerais estabeleceu a Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG n° 01, de 05 de maio de 2008, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Essa Deliberação ratifica o estabelecido no artigo 34 da Resolução CONAMA 357/05 e, ainda, acrescenta em seu artigo 7, parágrafo 4° que as possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes listados ou não nesta Deliberação Normativa, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas, utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, análises de bioacumulação e efeitos endócrinos ou outros métodos cientificamente reconhecidos. Isso significa que, além do que já estava previsto na Resolução CONAMA 357/05, o estado de Minas Gerais exige a realização de testes ecotoxicológicos em efluentes, objetivando garantir que não haverá prejuízo ao ecossistema.

### **3.5.2 Práticas vigentes**

São importantes norteadoras das práticas de pesquisa e monitoramento no Brasil as Normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Fundada em 1940, a ABNT é o órgão responsável pela normalização e padronização técnica no país, fornecendo a base necessária ao desenvolvimento tecnológico brasileiro. A utilização de testes padronizados é vantajosa, principalmente, por permitir a reprodução de análises, além da seleção de um ou mais testes uniformes e úteis para uma variedade de laboratórios, facilitando a comparação dos dados e contribuindo para aumentar a utilização dos dados publicados (COSTA *et al.*, 2008). A ABNT possui doze normas tratando a respeito dos testes ecotoxicológicos, buscando estabelecer critérios para seleção de organismos-teste, bem como de amostragem e análise de resultados (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4**– Normas da ABNT que normalizam a realização de teste ecotoxicológicos

<b>NORMAS DA ABNT PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS</b>	
<b>ABNT. NBR 15469:</b> Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras.	<b>ABNT NBR 15088:2011</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes
<b>ABNT NBR 13373:2010</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com <i>Ceriodaphnia</i> spp (Crustacea, Cladocera)	<b>ABNT NBR 12713:2009</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com <i>Daphnia</i> spp (Crustacea, Cladocera)
<b>ABNT NBR 15499:2007</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes	<b>ABNT NBR 15470:2007</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade em sedimento - Método de ensaio com <i>Hyaella</i> spp (Amphipoda)
<b>ABNT NBR 15411-1:2006</b> Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de <i>Vibrio fischeri</i> (ensaio de bactéria luminescente)	<b>ABNT NBR 15411-2:2006</b> Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz <i>Vibrio fischeri</i> (ensaio de bactéria luminescente)
<b>ABNT NBR 15411-3:2006</b> Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de <i>Vibrio fischeri</i> (Ensaio de bactéria luminescente)	<b>ABNT NBR 15350:2006</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata:Echinoidea)
<b>ABNT NBR 15308:2005</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com misidáceos (crustacea)	<b>ABNT NBR 12648:2011</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)

A análise da tabela permite observar que os testes com os peixes, *Ceriodaphnia* sp., *Daphnia* sp., *Hyaella* sp., *Aliivibrio fischeri*, *Echinodermata*, *Chlorophyceae* e *Misidáceos* são regulamentados e, portanto, pode-se utilizar esses indivíduos como organismos-teste.

Ainda, pioneira nessa seara, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) utiliza a Resolução da SMA 03/2000 na elaboração de seus manuais relacionados à toxicologia ambiental (BERTOLETTI, 2009). Os manuais da CETESB (Tabela 2.5) fornecem informações que funcionam como um guia para realização de procedimentos que o órgão ambiental do estado de São Paulo julga mais adequados. Por esse motivo, esses documentos são indicativos das práticas usualmente empregadas e importantes para delimitação de uma metodologia mais adequada para realização de teste ecotoxicológicos.

**Tabela 2.5** - Manuais CETESB para padronização de testes ecotoxicológicos

	<b>Norma</b>	<b>Identificação</b>
<b>Manuais CETESB</b>	L5.018	Testes de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> Claus, 1879 ( <i>Cladocera</i> , <i>Crustacea</i> )
	L5.019	Teste de toxicidade aguda com peixes. Parte I: Sistema Estático. Parte II: Sistema Semi-estático. Parte III: Sistema de Fluxo Contínuo.
	L5.020	Teste de toxicidade com <i>Chlororella vulgaris</i> ( <i>Chlorophyceae</i> )
	L5.022	Avaliação de toxicidade crônica utilizando <i>Ceriodaphnia dubia</i> Richard, 1984 ( <i>Cladocera</i> , <i>Crustacea</i> )
	L5.227	Bioensaio de toxicidade aguda com <i>Photobacterium phosphoreum</i> (Sistema Microtox)
	L5.228	Teste de toxicidade aguda utilizando <i>Spirillum volutans</i>
	L5.250	Água do Mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com <i>Lytechinus variegatus</i> Lamarck, 1816 ( <i>Echinodermata</i> , <i>Echinoidea</i> )
	L5.251	Água do Mar - Teste de toxicidade aguda com <i>Mysidopsis juniae</i> Silva, 1979 ( <i>Mysidacea</i> , <i>Crustacea</i> )

Para corpos de água doce, a CETESB recomenda a realização simultânea dos ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*. No caso de reavaliação do limite de toxicidade, além dos dois ensaios já citados, sugere-se o ensaio crônico com uma espécie de peixe (BERTOLETTI, 2009).

Ainda de acordo com Bertoletti (2009), para efluentes lançados em ambientes marinhos ou estuarinos, a CETESB recomenda a execução simultânea dos ensaios de ecotoxicidade aguda com misidáceos ou *Aliivibrio fisheri* e do ensaio de ecotoxicidade crônica com ouriço-do-mar. Na reavaliação do limite de toxicidade de corpos d'água, devem ser apresentados os resultados dos três ensaios anteriormente citados.

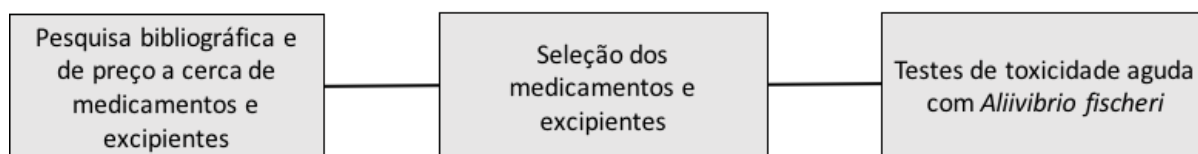
Além disso, a CETESB não recomenda o congelamento de amostras. Embora exista a indicação de congelamento na norma ABNT, para amostras que não possam ser processadas em até 48 horas após a coleta, os manuais USEPA (2002 a, b) orientam a realização do ensaio com amostra fresca em até 36 horas após a coleta e que, em nenhum caso, o intervalo entre a coleta e a primeira utilização da amostra deve ultrapassar 72 horas. Dados de literatura mostram que os componentes de resíduos sólidos (filtráveis e não filtráveis) da amostra se alteram com o congelamento e descongelamento (USEPA, 1982). Desta forma, quando não se conhece a interferência do congelamento na amostra (efluente ou água superficial) aconselha-se que seja adotado a refrigeração, considerado o melhor procedimento de preservação, uma vez que pouco altera as características da amostra.

Finalmente, com relação à apresentação de relatório de ensaios ecotoxicológicos, a CETESB exige que esteja acompanhado de selo do INMETRO (ou Declaração de Responsabilidade), devendo ser anexada a carta controle atualizada da sensibilidade dos organismos-teste, bem como o resultado do teste com substância de referência realizado na época dos ensaios das respectivas amostras. Devem, ainda, serem apresentados os valores, iniciais e finais, de pH e oxigênio dissolvido (BERTOLETTI, 2009).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Na figura 2.5 são apresentadas as etapas metodológicas referentes ao capítulo 2 dessa tese.

**Figura 2.5** – Etapas do desenvolvimento metodológico



### 4.1 Seleção de fármacos

Para a seleção dos fármacos que integraram a pesquisa, baseou-se nos seguintes critérios: disponibilidade e preço do produto; tempo disponível para análises; possibilidade de geração de resultados inéditos; consumo elevado no Brasil e mundo; bem como presença em águas residuárias e corpos d'água.

Primeiramente, foi realizado levantamento bibliográfico detalhado, de forma a apontar os medicamentos mais utilizados no mundo (Tabela 2.1) e presentes em corpos d'água e esgotos (Tabela 2.2 e Figura 2.1). Tal levantamento foi explorado no item de revisão de literatura desse capítulo. O principal objetivo, em um primeiro momento, foi identificar, com base na frequência de uso e contaminação, as classes a serem estudadas e, dentro dessas classes, qual fármaco seria selecionado.

Ainda, a partir da análise dos dados supracitados, buscou-se encontrar coincidências entre os fármacos mais consumidos no mundo e no Brasil. Após essa etapa, foi possível pré-selecionar os compostos que seriam testados em um primeiro momento e que, então, integram os resultados desse capítulo do trabalho.

Essa pré-seleção gerou como produto 10 (dez) princípios ativos de algumas das classes mais consumidas no território brasileiro (Quadro 2.1). Procedeu-se, ainda, com a investigação das formulações genérica e similar mais vendidas nas drogarias do país no ano de 2014 (IMS HEALTH, 2015), bem como os medicamentos referências desses fármacos (Quadro 2.1).

**Quadro 2.1** - Alguns dos fármacos mais consumidos no Brasil, com respectivos números de venda dos genéricos e similares preferidos pelo consumidor brasileiro (2014)

Princípio ativo	Referência	Genérico mais vendido	Nº de vendas	Similar mais vendido	Nº de vendas
Hidroclorotiazida	Clorana	Cimed	1.416.035	Hidroless	69.719
Nimesulida	Nisulid	Biossintética	269.650	Cimelid	321.307
Diazepam	Valium	Neoquímica	213.985	Dienpax	3.836
Fluoxetina	Prozac	Teuto	193.325	Daforin	86.508
Omeprazol	Losec	Teuto	580.284	Novoprazol	758.339
Glibenclamida	Daonil	Novaquímica	207.706	Gliconil	564.700
Metformina	Gligafe	Teuto	1.069.507	Triformin	178.220
Ibuprofeno	Advil	Prati-donaduzzi	241.590	Buprovil	422.690
Dexclorfeniramina	Polaramine	Neoquímica	149.136	Histamin	1.806.165
Sinvastatina	Zocor	Sandoz	1.541.563	Sinvasmax	1.383.237

**Fonte:** IMS Health, 2015.

## **4.2 Condições de preparo para análises dos fármacos**

Nesse capítulo foram comparadas as toxicidades de um mesmo fármaco em diferentes formulações, sendo elas: genérico, referência e similar. Os genéricos e similares selecionados para teste foram aqueles mais vendidos no Brasil no ano de 2014 de acordo com a IMS Health (2015). Para desenvolvimento das análises, os fármacos foram adquiridos das farmácias e diluídos em água ultrapura. Para cada uma das formulações, foi diluído 1 (um) comprimido ou cápsula em 100mL de água e avaliado o sobrenadante. No caso de fármacos compostos pelo mesmo princípio ativo, porém em dosagens diferentes, foram diluídos mais de um comprimido ou cápsula por 100 mL de água, de forma a padronizar a quantidade de princípio ativo presente em solução.

Buscando mimetizar o que ocorre com os medicamentos no meio ambiente, para a sua diluição, os comprimidos ou cápsulas foram devidamente macerados e misturados em 100 mL de água ultrapura. Após essa etapa, essas soluções foram submetidas a centrifugação por 15 minutos, na rotação de 4.000 RPM e 25°C. A centrífuga utilizada foi a Heraeus de modelo 2.0.

## **4.3 Seleção e condições de preparo para análise dos excipientes**

Objetivando possibilitar a discussão mais profícua dos resultados de toxicidade dos medicamentos disponíveis nas farmácias, optou-se por também selecionar alguns excipientes

para teste. A intenção foi a de verificar se esses compostos eram capazes de contribuir para a toxicidade de formulações farmacêuticas.

Nesse sentido, especialmente em função de limitação financeira, foram avaliadas 3 (três) substâncias dentre as mais frequentemente presentes nos medicamentos testados, sendo elas: celulose microcristalina; manitol; e dióxido de titânio. A celulose microcristalina possui função de diluente, desagregante, lubrificante e secante em formulações farmacêuticas. Já o manitol, é um diluente. Finalmente, o dióxido de titânio é um agente de revestimento. Salienta-se que os excipientes foram adquiridos das indústrias farmacêuticas embrafarma, henrifarma e genini, respectivamente, com grau de pureza acima de 99%.

Com relação às condições de preparo para a análise, todos os excipientes foram solubilizados em água ultrapura, na maior concentração possível, para imediatamente em seguida realizar as diluições que permitiram encontrar a toxicidade dos compostos para o organismo teste. Nesse sentido, apresenta-se no quadro 2.2 as solubilidades dessas substâncias de acordo com análise em espectrofotômetro de massa BrukerMicroTOF QII com ionização eletrospray (ESI-MS) a uma resolução de 1200 m/z.

**Quadro 2.2** - Solubilidade dos excipientes em estudo de acordo com a Farmacopéia brasileira

<b>Excipientes</b>	<b>Solubilidade (mg/L)</b>
Celulose microcristalina	0,1 mg/L
Manitol	167 mg/L
Dioxido de titânio	10 mg/L

#### **4.4 Testes de toxicidade aguda com *Aliivibrio fischeri***

Foram submetidos ao teste toxicológico todos os excipientes (Quadro 2.2) e os 10 (dez) fármacos (Quadro 2.1) nas três formulações disponíveis: referência, similar e genérico. Apresenta-se o modelo selecionado para medição de toxicidade.

O teste toxicológico agudo foi realizado com a bactéria marinha luminescente *Aliivibrio fischeri*, antiga *Vibrio fischeri* (URBANCZYC *et al.*, 2007), utilizando o equipamento MICROTOX<sup>®</sup> modelo 500 Analyzer (SDI). Os testes foram realizados de acordo com a norma ABNT NBR 15411-3: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio Fischeri* (ABNT, 2006)) e seguindo o



protocolo estabelecido pelo *software* (MICROTOX<sup>®</sup> Omni Software, versão 4.1) do próprio equipamento MICROTOX<sup>®</sup>. As bactérias liofilizadas utilizadas foram, igualmente, obtidas da SDI e ficaram armazenadas na temperatura de -20°C (Figura 2.6). Cada ampola de bactéria contém uma cultura de 10<sup>8</sup> células. A toxicidade aguda (CE<sub>50</sub>) foi determinada a partir de nove diluições, em medições da luminescência da bactéria em 30 minutos. Para determinar o efeito tóxico, o *software* realiza comparação, em função da luz emitida, entre a amostra em suas diversas diluições e a solução controle. Quanto menos luz emitida, maior a toxicidade da amostra. Logo, a toxicidade relativa da amostra é expressa como a porcentagem de inibição comparada ao controle (STOLTE *et al.*, 2012). Esse valor é dado pela porcentagem da diluição inicial (% v/v) da matriz aquosa analisada.

**Figura 2** Erro! Nenhum texto de estilo especificado no documento. **6** - Bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* exibindo potencial de luminescência



Antes da realização dos ensaios, as amostras foram submetidas a ajuste de pH entre 6,0-8,5 com HCl ou NaOH e diluição com solução NaCl 2%, chamada diluente. Em função dessas diluições, a concentração máxima inicial do ensaio definitivo foi 81,9%, de acordo com o demonstrado por Fulladosa e colaboradores (2005) e Higa (2008).

Além disso, a salinidade das amostras foi verificada com auxílio de Refratômetro de Alta Resolução para Salinidade Instrutherm RTS-101ATC. Aquelas amostras que apresentam valores de salinidade abaixo do estipulado (22%), devem receber adição de solução de ajuste osmótico para a realização do teste. Nesse trabalho, todas as amostras apresentaram valor de salinidade abaixo de 22%. Da mesma forma, não foi necessário proceder com ajuste de turbidez, já que as amostras pesquisadas possuíam turbidez bastante baixa.

Ainda, buscando-se padronizar e garantir a veracidade e uniformidade das análises, a norma NBR 15411-3 (ABNT, 2006) estabelece a necessidade de realização de teste de sensibilidade com cada lote de bactéria utilizado. Ou seja, antes de iniciar os ensaios com as amostras de

interesse, faz-se necessário garantir que as bactérias com as quais se está trabalhando gerarão resultados confiáveis. Esse teste de sensibilidade é realizado com a substância de referência sulfato de zinco heptahidratado ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) e os ensaios apresentam valores de efeito gama e porcentagem de inibição de luz da bactéria. A NBR 15411-3 (ABNT, 2006) estabelece que o gama precisa estar entre 0,6 e 1,8 no controle e o efeito de inibição entre 20 e 80% para a substância de referência. Para todos os lotes de bactérias utilizados durante essa pesquisa, foram realizados testes de sensibilidade com resultados que atenderam a regra descrita.

#### **4.5 Seleção dos princípios ativos a serem utilizados nos próximos capítulos dessa tese**

Ainda, um dos objetivos dessa etapa é selecionar os princípios ativos que serão alvo de estudo nos capítulos III e IV dessa tese. Tal empreitada justifica-se frente à limitação temporal e financeira, que torna impossível desenvolver todos os capítulos com os 10 (dez) fármacos já citados. Nesse sentido, acreditou-se que, selecionando 4 (quatro) compostos, seria possível reduzir custos e, ainda assim, gerar resultados relevantes nos capítulos subsequentes.

Sendo assim, para a seleção desses 4 (quatro) princípios ativos foram avaliados os resultados das análises de toxicidade aguda com a bactéria *Aliivibrio fischeri*, os quais serão discutidos a seguir, buscando-se encontrar aqueles que apresentavam algum indício de toxicidade para esse organismo-teste. Ainda, procurou-se escolher aqueles mais estáveis e solúveis em água e, portanto, com os quais não seria necessário o uso de solventes químicos durante as análises de toxicidade. Esses solventes, além de serem potencialmente tóxicos, podem atuar sinérgica ou antagonicamente com os fármacos, causando mais ou menos prejuízo aos organismos-teste. Além disso, priorizou-se o estudo de compostos que gerariam trabalhos inéditos e, portanto, passíveis de publicações em periódicos internacionais de ponta.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Testes de toxicidade aguda com as formulações farmacêuticas

Os testes de toxicidade aguda com a bactéria *Aliivibrio fischeri* avaliando as três formulações (referência, similar e genérico) dos 10 (dez) princípios ativos selecionados (Quadro 2.1) estão dispostos no Quadro 2.3. Além dessas análises, apresentam-se os valores de massa molar e solubilidade dos princípios ativos, obtidos da Farmacopéia Brasileira (2010), bem como os excipientes presentes nos medicamentos, os quais foram informados pelos fabricantes dos mesmos (Quadro 2.3).

Os resultados encontrados apontam para o potencial toxicológico relacionados aos excipientes dos fármacos e não obrigatoriamente aos princípios ativos, conforme será discutido a seguir, após apresentação da tabela. Salienta-se que a toxicidade desses excipientes pode estar relacionada não apenas a eles próprios, mas a maneira como eles interferem na absorção do princípio ativo pelos organismos, maximizando a toxicidade desses. Outros autores também sugerem e apontam o potencial nocivo relacionado aos excipientes dos fármacos (CARLSSON *et al.*, 2006; CAMINADA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014), frequentemente negligenciados pela literatura. A escassez de dados é tamanha que dificulta a discussão dos resultados encontrados nessa pesquisa.

**Quadro 2.3** - Dados de massa molar, fórmula química, solubilidade, toxicidade aguda ( $CE_{50}$ ) em 30 minutos para *Aliivibrio fischeri*, apresentação e excipientes dos fármacos testados

PRINCÍPIO ATIVO	MM e fórmula	FORMULAÇÕES		SOLUBILIDADE EM ÁGUA*	TOXICIDADE ( $CE_{50}$ -30min)	APRESENTAÇÃO E EXCIPIENTES**
Diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$ e $284.73 \text{ g mol}^{-1}$	Referência	Valium	0,05mg/mL	Não tóxico	<b>Comprimido 10 mg:</b> lactose, amido de milho, óxido de ferro amarelo e estearato de magnésio.
		Genérico	Neo Química		39,58%	<b>Comprimido 10mg:</b> amido, lactose, celulose microcristalina, amidoglicolato de sódio, dióxido de silício, estearato de magnésio, corante amarelo sicovit 10-basf.
		Similar	Dienpax		Não tóxico	<b>Comprimido 10 mg:</b> lactose monoidratada, estearato de magnésio, corante amarelo tartrazina, amido de milho, amido de milho pré-gelatinizado.
Fluoxetina	$C_{17}H_{18}F_3NO$ e $309.32 \text{ g mol}^{-1}$	Referência	Prozac	14mg/mL	2,50%	<b>Cápsula 20 mg:</b> amido em pó e amido em pó com 5% de silicone q.s.p.
		Genérico	Teuto		4,23%	<b>Cápsula 20 mg:</b> amido e óleo vegetal hidrogenado.
		Similar	Daforin		3,68%	<b>Cápsula de 20mg:</b> celulose microcristalina, estearato de magnésio.
Omeprazol	$C_{17}H_{19}N_3O_3S$ e $345.4 \text{ g/mol}^{-1}$	Referência	Losec	0,001 a 0,0001 mg/mL	44,93%	<b>Comprimido revestido 20mg:</b> Monoestearato de glicerila, hiprolose, hipromelose, óxido férrico marrom-avermelhado, estearato de magnésio, polimetacrílicocopolíacrilato de etila, celulose microcristalina, parafina, macrogol 6000, polissorbato, crospovidona, estearil fumarato de sódio, sacarose, talco, dióxido de titânio, citrato de trietila e hidróxido de sódio.
		Genérico	Teuto		0,67%	<b>Capsulas 20mg:</b> Manitol, sacarose, fosfato de sódio dibásico, laurilsulfato de sódio, carbonato de cálcio, hipromelose, copolímero do ácido metacrílico, dietilfitalato, dióxido de titânio, talco e água de osmose inversa.
		Similar	Novoprazol		0,72%	<b>Cápsulas 20mg:</b> hipromelose, ftalato de hipromelose, manitol e sacarose.
Glibenclamida	$C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ e $494.004 \text{ g/mol}^{-1}$	Referência	Daonil	0,001 a 0,0001 mg/mL	Não tóxico	<b>Comprimido 5mg:</b> lactose monoidratada, amido de milho, talco, estearato de magnésio e dióxido de silício.
		Genérico	Nova química		4,21%	<b>Comprimido 5 mg:</b> croscarmelose sódica, lactose monoidratada, estearato de magnésio, amido pré-gelatinizado, dióxido de silício, laurilsulfato de sódio.
		Similar	Gliconil		Não tóxico	<b>Comprimido 5 mg:</b> amido, talco, lactose monoidratada, dióxido de silício e estearato de magnésio.

(...)

(...)

PRINCÍPIO ATIVO	MM e fórmula	FORMULAÇÕES		SOLUBILIDADE EM ÁGUA*	TOXICIDADE (CE <sub>50</sub> -30min)	APRESENTAÇÃO E EXCIPIENTES**
<b>Metformina</b>	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> e 129.16 g mol <sup>-1</sup>	Referência	Glifage	Mais de 1mg/mL	Não tóxico	<b>Comprimido 1g:</b> estearato de magnésio, hipromelose, povidona, macrogol.
		Genérico	Teuto		19,43%	<b>Comprimido 500mg:</b> celulose microcristalina, dióxido de silício, estearato de magnésio, álcool etílico, povidona, óleo vegetal hidrogenado, talco e água de osmose inversa.
		Similar	Triformin		Não tóxico	<b>Comprimido 500 mg:</b> celulose microcristalina, talco, estearato de magnésio, crospovidona, povidona, sorbitol, amidoglicolato de sódio.
<b>Maleato de dexclorfeniramina</b>	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> e 274.788 g/mol <sup>-1</sup>	Referência	Polaramine	Mais de 1mg/mL	Não tóxico	<b>Comprimido 2 mg:</b> lactose monoidratada, amido, estearato de magnésio, corante FDC amarelo nº 6, corante Ponceau 4R, polividona, hipromelose, hidroxipropil celulose e macrogol.
		Genérico	Neoquímica		Não tóxico	<b>Comprimido 2mg:</b> lactose, celulose microcristalina, corante laca vermelho, eritrosina, F.D.&.C.nº3, estearato de magnésio.
		Similar	Histamin		Não tóxico	<b>Comprimido 2 mg:</b> lactose, celulose microcristalina, lactose monoidratada, croscarmelose sódica, amido de milho pré-gelatinizado, óleo vegetal hidrogenado, dióxido de titânio, hipromelose, macrogol, álcool etílico, água purificada.
<b>Ibuprofeno</b>	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> e 206.27 g mol <sup>-1</sup>	Referência	Advil	0,001 a 0,0001 mg/mL	2,22%	<b>Comprimido revestido 200mg:</b> croscarmelose sódica, celulose microcristalina, corante marrom, corante marom, corante preto, corante regular, álcool, dióxido de silício, laurilsulfato de sódio, amido de milho, amido, amido pré-gelatinizado, ácido estearico, sacarose e cera de abelha.
		Genérico	Prati-donaduzzi		11,73%	<b>Comprimido revestido 600 mg:</b> dióxido de silício, lactose, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, povidona, estearato de magnésio, polímero do ácido metacrílico, dióxido de titânio e macrogol.
		Similar	Buprovil		7,20%	<b>Comprimido revestido 600 mg:</b> dióxido de silício, celulose microcristalina, lactose monoidratada, croscarmelose sódica, amido de milho pré-gelatinizado, óleo vegetal hidrogenado, dióxido de titânio, hipromelose, macrogol, álcool etílico e água purificada.

(...)

(...)

PRINCÍPIO ATIVO	MM e fórmula	FORMULAÇÕES		SOLUBILIDADE E EM ÁGUA*	TOXICIDADE (CE <sub>50</sub> -30min)	APRESENTAÇÃO E EXCIPIENTES**
Nimesulida	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S e 308.311 g/mol <sup>-1</sup>	Referência	Nisulid	0,001 a 0,0001 mg/mL	Não tóxico	<b>Comprimidos 100 mg:</b> lactose monoidratada, estearato de magnésio, celulose microcristalina, docusato de sódio, amidoglicolato de sódio, hiprolose e óleo vegetal hidrogenado.
		Genérico	Biossintética		10,48%	<b>Comprimidos 100 mg:</b> lactose monoidratada, estearato de magnésio, celulose microcristalina, docusato de sódio, amidoglicolato de sódio, hiprolose e óleo vegetal hidrogenado.
		Similar	Cimelid		1,68%	<b>Comprimidos 100 mg:</b> laurilsulfato de sódio, dióxido de silício coloidal, lactose, celulose microcristalina, estearato de magnésio e croscarmelose sódica.
Hidrocloro-tiazida	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> ClO <sub>4</sub> S <sub>2</sub> e 297,741 g/mol <sup>-1</sup>	Referência	Clorana	0,001 a 0,0001 mg/mL	Não tóxico	<b>Comprimidos 25 mg:</b> lactose monoidratada, amido de milho, amido de milho pré-gelatinizado e estearato de magnésio.
		Genérico	Cimed		3,22%	<b>Comprimido 25 mg:</b> laurilsulfato de sódio, croscarmelose sódica, amidoglicolato de sódio, lactose, celulose microcristalina, estearato de magnésio e dióxido de silício.
		Similar	Hidroless		Não tóxico	<b>Comprimido 25 mg:</b> amido de milho, estearato de magnésio, manitol, talco, croscarmelose sódica, álcool etílico e povidona.
Sinvastatina	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>5</sub> e 418.54 g/mol <sup>-1</sup>	Referência	Zocor	0,03 mg/mL	33,29%	<b>Comprimido 20mg:</b> hidroxianizolbutilado, ácido ascórbico, ácido cítrico, celulose microcristalina, amido, estearato de magnésio, lactose, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxipropilcelulose, dióxido de titânio, talco, óxido férrico amarelo e óxido férrico vermelho.
		Genérico	Sandoz		35,74%	<b>Comprimido 40 mg:</b> lactose monoidratada, celulose microcristalina, amido, butil-hidroxianisol, ácido ascórbico, ácido cítrico monoidratado, estearato de magnésio, hipromelose, dióxido de titânio, talco e óxido férrico vermelho.
		Similar	Sinvasmax		Não tóxico	<b>Comprimido 40mg:</b> ácido ascórbico, ácido cítrico, amido glicolato de sódio, lactose monoidratada, celulose microcristalina, dióxido de silício, estearato de magnésio, talco, butil-hidroxotolueno, dióxido de titânio, óxido de ferro vermelho, álcool polivinílico, macrogol e água purificada.

\* Os dados de solubilidade foram obtidos da Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010).

\*\* Dados fornecidos pelos fabricantes dos fármacos.

No caso do diazepam, por exemplo, a única das formulações testadas tóxica é a genérica e apenas ela possui os excipientes celulose microcristalina, amidoglicolato de sódio, dióxido de silício e corante amarelo sicovit 10-basf, sugerindo que a toxicidade esteja relacionada a algum desses compostos ou suas combinações, uma vez que a quantidade de princípios ativo testada foi idêntica. Nunes e colaboradores (2005), ao testarem a toxicidade do diazepam para os organismos aquáticos *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* e *Tetraselmis chuii*, encontraram valores de  $CE_{50}$  e  $CI_{50}$  variando entre 12,2 mg/L e 16,5 mg/L. Levando em consideração os dados fornecidos pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010), a concentração testada de diazepam foi equivalente à 50 mg/L, sugerindo que o organismo *Aliivibrio fischeri* é mais resistente que aqueles testados por Nunes e colaboradores em 2005. No entanto, essa confirmação apenas seria possível se o princípio ativo fosse testado isoladamente, uma vez que podem haver efeitos antagônicos relacionados a presença de excipientes (YANG *et al.*, 2008; GOMEZ-EYLES *et al.*, 2009; JONKER *et al.*, 2005).

Os resultados encontrados ao testar-se o hidrocloreto de fluoxetina esclarecem que as três formulações avaliadas são tóxicas, o Prozac apresenta toxicidade discretamente superior às demais. Se considerados os dados de solubilidade da fluoxetina (BRASIL, 2010) poder-se-ia dizer que quantidade correspondente a 5 mg/L da substância é capaz de causar efeito em mais que 50% dos indivíduos. No entanto, quaisquer conclusões relacionadas às concentrações são duvidosas por haverem as misturas com diversos excipientes. Em pesquisa similar, Silva e colaboradores (2014) testaram o mesmo fármaco em cinco diferentes formulações, incluindo o Prozac, e encontraram valores de  $CE_{50}$  entre 0,25 a 15 mg/L para o organismo aquático *Chlorella vulgaris*. Os valores correspondentes testando-se a toxicidade isolada da substância hidrocloreto de fluoxetina são aproximadamente dez vezes mais baixos para o mesmo organismo.

Com relação ao omeprazol, para os medicamentos genérico e similar foram encontradas as mais altas toxicidades dentre todos os fármacos testados. A literatura esclarece que o omeprazol é um princípio ativo tóxico para *Aliivibrio fischeri* com  $CE_{50}$  de 1,76 mg/L em teste de 15 minutos (GARCÍA *et al.*, 2014). Ainda assim, existe uma grande diferença de toxicidade entre as formulações do medicamento. Mais especificamente o Losec (referência), apresenta toxicidade expressivamente inferior às demais. Uma vez que a quantidade de princípio ativo testada foi idêntica, infere-se que essa distinção de resultados acontece em função dos excipientes, que não são coincidentes. Chama-se atenção, ainda, para o fato de que o princípio ativo apresenta baixa solubilidade (BRASIL, 2010), informação que corrobora com a hipótese de que a presença de toxicidade se deve também aos excipientes. Nota-se, ainda, que ambas as formulações com alta toxicidade levam em sua composição

o excipiente manitol. Nessa pesquisa, todos os medicamentos que contém manitol apresentaram-se tóxicos na análise com o organismo *Aliivibrio fischeri*.

Já a glibenclamina, apenas apresentou-se tóxica na formulação genérica. Essa formulação é a única dentre as demais que apresenta como excipientes os compostos croscarmelose sódica e laurilsulfato de sódio. Esse fato, aliado à baixa solubilidade do princípio ativo, leva à conclusão de que a toxicidade do medicamento se deve a presença desses excipientes ou a combinação deles com outras substâncias da formulação.

O mesmo pode-se dizer a respeito da metformina, em que novamente apenas a formulação genérica é tóxica. Essa formulação é a única dentre as demais que apresenta como excipientes os compostos dióxido de silício, álcool etílico e óleo vegetal hidrogenado. Os dados de solubilidade da metformina (BRASIL, 2010) esclarecem que a concentração testada do princípio ativo foi igual ou superior a 1 g/L. Como duas entre as três formulações não são tóxicas para *Aliivibrio fischeri*, conclui-se que a metformina nessa concentração não é capaz de causar efeito em 50% das bactérias. Portanto, esses organismos são bastante resistentes à contaminação pela substância. Dados de toxicidade de metformina para outros seres aquáticos apontam para sensibilidades superiores, com  $CE_{50}$  equivalentes a 64 mg/L, 320 mg/L e 110 mg/L para *D. magna*, *D. subspicatus* e *Lemna minor*, respectivamente (CLEUVERS, 2003).

O ibuprofeno é outro fármaco com altos valores de toxicidade para *Aliivibrio fischeri* em todas as formulações. Os resultados encontrados entre os medicamentos não são muito discrepantes, no entanto o advil e o buprovil são os que apresentam-se mais tóxicos. Salienta-se que ambos possuem em sua composição maior número de excipientes que a versão genérica. Embora a literatura reporte o ibuprofeno como um princípio ativo tóxico para *Aliivibrio fischeri* com  $CE_{50}$  de 16,49 mg/L em teste de 15 minutos (GARCÍA et al, 2014), a concentração testada nesse trabalho não excedeu 1mg/L (BRASIL, 2010).

No caso do nimesulida, duas das formulações testadas são tóxicas, a similar e a genérica. Por esse motivo, aliado à baixa solubilidade do princípio ativo (BRASIL, 2010), supõe-se que a toxicidade dos medicamentos se deva aos excipientes e não ao princípio ativo em si. A formulação similar (Cimelid), única que conta com os excipientes laurilsulfato de sódio, dióxido de silício coloidal e croscarmelose sódica, apresenta-se especialmente tóxica.



Já a hidroclorotiazida apenas apresentou-se tóxica na formulação genérica. Essa formulação é a única dentre as demais que possui como excipientes os compostos laurilsulfato de sódio, amidoglicolato de sódio, lactose, celulose microcristalina e dióxido de silício. Supõe-se, novamente, que a toxicidade se deva à presença dessas substâncias ou a combinação de alguma delas com as demais.

Com relação à sinvastatina, duas formulações testadas são tóxicas, a referência e a genérica. Essas formulações apresentam compostos que não estão presentes no medicamento similar, são eles: hidroxianizolbutilado, hidroxipropilmetilcelulose, hidroxipropilcelulose e hipromelose. Como acontece com outros fármacos estudados nesse trabalho, pouco é conhecido a respeito da toxicidade da sinvastatina. Sabe-se que o composto afeta o crescimento de anfíbios (NEUPARTH *et al.*, 2014) e que apresenta elevada toxicidade crônica para copépodos, com valores de  $CE_{50}$  equivalentes de 0,16 até 1,6  $\mu\text{g/L}$  (DAHL *et al.*, 2006)

Finalmente, o maleato de dexclorfeniramina é o único medicamento atóxico em todas as formulações avaliadas. Supõe-se, portanto, que os excipientes, bem como o princípio ativo na concentração de 20  $\text{mg/L}$ , não são capazes de causar efeito em 50% das bactérias *Aliivibrio fischeri*.

Esclarece-se que, teoricamente, seria possível avaliar a toxicidade dos medicamentos de forma a selecionar os excipientes que, quando presentes, sempre geram toxicidade. No entanto, trata-se de uma análise muito limitada, por não prever eventuais fenômenos de sinergismo e antagonismo em termos de toxicidade. Por esse motivo, optou-se por não realizar esse tipo de discussão.

## **5.2 Testes de toxicidade aguda com os excipientes farmacêuticos**

Dentre os 3 (três) excipientes testados, o manitol é o mais tóxico e o único a apresentar valor de  $CE_{50}$ , sendo esse de 35,43  $\text{mg/L}$ . Conforme discutido no item anterior, todos os medicamentos em que o manitol esteve presente são tóxicos, sugerindo a toxicidade desse mesmo excipiente, a qual foi confirmada ao testá-lo isoladamente.

Com relação ao dióxido de titânio, composto presente em oito dos medicamentos testados, nota-se que em sua máxima concentração em matrizes aquosas, 10  $\text{mg/L}$ , ele é capaz de gerar efeito de 20% de redução de luminosidade em *Aliivibrio fischeri*. Isto é, embora haja efeito tóxico, não existe valor de  $CE_{50}$  para essa substância. De forma análoga, Zhang e colaboradores (2015) reportam que, embora o dióxido de titânio seja largamente produzido e reconhecido como biologicamente inerte, há indícios de toxicidade para diversos organismos, o que suscita preocupação sobre seu uso na área da saúde.

Já a celulose microcristalina não gera efeitos tóxicos para os organismos *Aliivibrio fischeri*. Supõe-se que sua baixa solubilidade pode estar relacionada à ausência de toxicidade para organismos aquáticos. Ainda, salienta-se que esse composto esteve presente em 17 (dezesete) das formulações testadas, sendo o mais frequente entre os excipientes.

De forma similar, Carlsson e colaboradores (2006) compilaram dados de toxicidade dos excipientes docusato de sódio, metilparabeno, polisorbato 80 e lauril sulfato de sódio para os organismos alga, *D. magna* e peixe, tendo encontrado valores de  $CE_{50}$  que variaram de 100 a 0,19 mg/L. O mais danoso entre os compostos foi o docusato de sódio para peixes.

### **5.3 Seleção dos princípios ativos a serem utilizados nos próximos capítulos dessa tese**

Os resultados apresentados esclarecem que a metade dos princípios ativos avaliados é pouco solúvel, dificultando seu manejo em laboratório (Quadro 2.3). Com relação à toxicidade, conforme discutido no item 5.1 desse capítulo, chamam à atenção a fluoxetina, o omeprazol e o ibuprofeno, em que todas as formulações testadas são tóxicas. Em contrapartida, as análises com o diazepam, glibenclamida, metformina, nimesulida, hidroclorotiazida e sinvastatina, em que nem todas as formulações são nocivas à bactéria *Aliivibrio fischeri*, apontam para o potencial toxicológico relacionado aos excipientes dos fármacos e não obrigatoriamente aos princípios ativos em si.

Conforme justificado no item 4.5, buscou-se avaliar a produção científica já existente a respeito dos fármacos testados. Para tal, foram levantados artigos que apresentavam resultados de toxicidade para esses medicamentos, conforme exposto no Quadro 2.4.

**Quadro 2.4** - Levantamento bibliográfico de trabalhos que avaliaram a toxicidade dos fármacos selecionados para essa pesquisa

<b>PRINCÍPIO ATIVO</b>	<b>ANÁLISE DA LITERATURA DISPONÍVEL</b>
<b>Diazepam</b>	Não foram encontrados muitos trabalhos. Citam-se artigos que discutiram a toxicidade aguda para cnidário (PASCOE <i>et al.</i> , 2003), o impacto sobre ciclo de vida de seres vivos (MUÑOZ <i>et al.</i> , 2008) e toxicidade aguda em três organismos (NUNES <i>et al.</i> , 2005)
<b>Fluoxetina</b>	Existem muitos trabalhos sobre a fluoxetina. Citam-se estudos que exploram a toxicidade de excipientes nas diferentes formulações da fluoxetina (SILVA <i>et al.</i> , 2014) e outro que propõe comparação de toxicidade de alguns anti-depressivos (POI <i>et al.</i> , 2014).
<b>Omeprazol</b>	Pouquíssimos trabalhos a respeito da toxicidade desse fármaco. Cita-se pesquisa a respeito da toxicidade aguda para <i>Aliivibrio fischeri</i> , comparando com outros fármacos (GARCÍA <i>et al.</i> , 2014).
<b>Glibenclamida</b>	Não foram encontrados quaisquer trabalhos a respeito da toxicidade desse fármaco.
<b>Metformina</b>	Não são muitos os trabalhos que se dedicam a tratar da toxicidade da metformina. Cita-se relevante pesquisa que tratou da toxicidade aguda da metformina combinada com outros fármacos para três organismos teste, incluindo <i>Lemna minor</i> (CLEUVERS, 2003).
<b>Dexclorfeniramina</b>	Não foram encontrados quaisquer trabalhos a respeito da toxicidade desse fármaco.
<b>Ibuprofeno</b>	Grande quantidade de trabalhos dedicam-se exclusivamente à toxicidade do ibuprofeno. Citam-se alguns dos disponíveis: um que trata da toxicidade aguda em cnidário (PASCOE <i>et al.</i> , 2003) e outro a respeito da toxicidade aguda para <i>Aliivibrio fischeri</i> , comparando com outros fármacos (GARCÍA <i>et al.</i> , 2014).
<b>Nimesulida</b>	Não foram encontrados quaisquer trabalhos a respeito da toxicidade desse fármaco.
<b>Hidroclorotiazida</b>	Não são muitos os trabalhos discutindo a toxicidade desse fármaco. Cita-se pesquisa que discutiu a citotoxicidade para células de peixes (CAMINADA <i>et al.</i> , 2006) e, ainda, outra discutindo a toxicidade da classe de anti-hipertensivos (SANDERSON <i>et al.</i> , 2004).
<b>Sinvastatina</b>	Observa-se certa quantidade de trabalhos tratando da toxicidade do fármaco. Cita-se artigo que discute a consequência do anti-hipertensivo para reprodução e sobrevivência de anfíbio (NEUPARTH <i>et al.</i> , 2014), outros dois a respeito da toxicidade para células de peixes (ELLESAT <i>et al.</i> , 2011; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2015) e, ainda, outro que trata da toxicidade crônica para copépodos (DAHL <i>et al.</i> , 2006).

Em função das discussões e resultados apresentados, selecionaram-se para integrarem às demais fases desse trabalho os seguintes fármacos: a sinvastatina, um anti-hipertensivo; a metformina, um antidiabético; o diazepam, um antidepressivo; e, finalmente, o omeprazol, medicamento regulador do pH gástrico. Embora outros fármacos tenham apresentado resultados igualmente importantes e relevantes, espera-se alcançar maior ineditismo e melhor manejo laboratorial com os fármacos supracitados.

## 6. CONCLUSÕES

Foram testadas as toxicidades agudas de trinta fármacos para a bactéria *Aliivibrio fischeri*. Avaliaram-se medicamentos com dez diferentes princípios ativos, cada um deles em três formulações distintas: genérico, similar e referência. A partir dessa análise, mantendo-se constante as concentrações do princípio ativo, pode-se estudar a participação dos excipientes como substâncias capazes de atribuir toxicidade a formulações farmacêuticas. Além disso, buscando aprofundar essa discussão, foi também avaliada a toxicidade de três dos excipientes presentes nas formulações farmacêuticas em estudo.

Dentre os dez fármacos avaliados, apenas um deles, o maleato de dexclorfeniramina, não se apresentou tóxico em todas as formulações. Em nenhuma outra situação encontrou-se toxicidade idêntica para os três tipos de medicamentos de um mesmo princípio ativo. Para alguns fármacos, como o diazepam, glibenclamida, metformina, nimesulida, hidroclorotiazida e sinvastatina, apenas uma ou duas das três formulações testadas foi tóxica para *Aliivibrio fischeri*. Igualmente relevante é o fato de dois dos excipientes avaliados serem tóxicos para esse organismo teste. Isso é, os resultados apontam e comprovam o potencial toxicológico relacionados aos excipientes dos fármacos e não obrigatoriamente aos princípios ativos.

Como já trazido à baila, literatura reporta em abundância a necessidade de um monitoramento da contaminação do meio ambiente por medicamentos. No entanto, os excipientes e seu potencial tóxico são constantemente negligenciados. Esse capítulo traz à lume a conclusão fundamental de que os excipientes e ingredientes inertes podem, muitas vezes, serem mais tóxicos do que os ingredientes ativos *per se*.

Esclarece-se a necessidade de testar-se os princípios ativos isoladamente, bem como as diversas possibilidades de misturas entre esses compostos químicos. Tais análises permitiriam uma discussão mais vasta sobre a toxicidade de formulações farmacêuticas, bem como a avaliação dos reais efeitos nocivos de compostos químicos dispostos no meio ambiente, levando-se em consideração as substâncias conseqüências. Em função disso, os próximos capítulos dessa tese tratarão dessas avaliações complementares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. NBR 12648: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com algas (Chlorophyceae)*. Rio de Janeiro, 2011.
- ABNT. NBR 12713: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Daphnia spp. (Crustacea, Cladocera)*. Rio de Janeiro, 2009.
- ABNT. NBR 13373: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com Ceriodaphnia spp. (Crustacea, Cladocera)*. Rio de Janeiro, 2010.
- ABNT. NBR 15088: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Peixes*. Rio de Janeiro, 2011.
- ABNT. NBR 15308: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com misidáceos (Crustacea)*. Rio de Janeiro, 2005.
- ABNT. NBR 15350: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica de Curta Duração – Método de Ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15411-1: *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15411-2: *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15411-3: *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15469: *Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras*. Rio de Janeiro, 2007.
- ABNT. NBR 15470: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade em Sedimento – Método de Ensaio com Hyalella spp. (Amphipoda)*. Rio de Janeiro, 2007.
- ABNT. NBR 15499: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica de Curta Duração – Método de Ensaio com peixes*. Rio de Janeiro, 2007.
- ALMEIDA, E.; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A.; DURÁN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. *Quím. Nova*, São Paulo, v.27, n.5, 2004.
- ALMEIDA, G.A.; WEBER, R.R. Fármacos na Represa Billings. *Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal*, v.6, n.2, p.7-13, 2005.
- ARAÚJO, C. V. M. *et al.* Avoidance response of *Danio rerio* to a fungicide in a linear contamination gradient. *Science of the Total Environment*, v. 484, p.36-42, 2014a.

- ARAÚJO, C. V. M. *et al.* Contaminants as habitat disturbers: PAH-driven drift by Andean paramo stream insects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 108, p. 89–94, 2014b.
- ARAÚJO, C. V. M.; BLASCO, J.; MORENO-GARRIDO, I. Measuring the avoidance behaviour shown by the snail *Hydrobia ulvae* exposed to sediment with a known contamination gradient. *Ecotoxicology*, v. 21, p. 750-758, 2012.
- ARAÚJO, C. V. M.; ROMERO-ROMERO, S.; LOURENÇATO, L. F.; MORENO-GARRIDO, I.; BLASCO, J. Going with the Flow: Detection of Drift in Response to Hypo-Saline Stress by the Estuarine Benthic Diatom *Cylindrotheca closterium*. *Plos one*, v. 8, 2013.
- BACKHAUS, T.; GRIMME L.H. The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, v. 38, p.291-301. 1999.
- BARTELT-HUNT, S.; SNOW D. D.; DAMON-POWELL T. Occurrence of steroid hormones and antibiotics in groundwater impacted by livestock waste control facilities. In: World Environmental and Water Resources Congress: Challenges of Change, 2010, Rhode Island. *Anais...* Rhode Island: American Society of Civil Engineers, p.1052-1061, 2010.
- BEAUDET, M. P; TULLY, P; ST-ARNAUD, J. Life expectancy. *Health Rep*, v. 17, p.43-47, 2005.
- BEGGEL, S; WERNER, I; CONNON, R E.; GEIST, J. P. Sublethal toxicity of comercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Science of Total Environmental*, v. 408, p.3169-3175, 2010.
- BENDZ, D. *et al.* Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, v. 122, p. 195-204, 2005.
- BERTOLETTI, E. *Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo*. Série Manuais. São Paulo: CETESB, 2009. 36p.
- BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Aplicação dos ensaios ecotoxicológicos e legislação pertinente. P. 347-379. In: ZAGATTO, P. A; BERTOLETTI E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima. São Paulo. São Carlos. 2006. 478 p.
- BIAŁK-BIELIN'SKA, A.; STOLTE, S.; ARNING, J.; UEBERS, U. BOSCHEN, A.; STEPNOWSKI, P.; MATZKE, M. Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. *Chemosphere*, v.85, p.928-933, 2011.
- BOTTONI, P.; CAROLI, S.; BARRA CARACCILO, A. Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicological & Environmental Chemistry*, v.92, n.3, p.549-565. 2010.
- BRASIL. CONAMA. Resolução 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 17 de março de 2005, edição n.53, seção 1, p.58-63.
- BRASIL. CONAMA. Resolução 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 Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 13 de maio de 2011.

BRASIL. *Farmacopéia Brasileira*. 5. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p. 1 v.

BRITTAI, J. E.; EIKELAND, T.J. Invertebrate drift – a review. *Hydrobiologia*, v.166, p. 77-93.1988

BROWN K.D.; KULIS J.; THOMSON B.; T.H., MAWHINNEY D.B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, v.366, p.772-783, 2006.

CAMINADA S.M.L.; BORRELY S.I.; PONEZI A.N. Fluoxetine hydrochloride toxicity assessment by *Vibrio fischeri* luminescence interference. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v. 26, 2010.

CANADA. *Life Expectancy, Abridged Life Table, at Birth and at Age 65, by Sex, Canada, Provinces and Territories, Annual (Years)*. Statistics Canada, Ottawa, Canada, 2008.

CARLSSON, C. *et al.* Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Parte II: Environmental risk assessments of selected pharmaceutical excipients. *Science of the Total Environment*, v. 364, p.88-95, 2006

CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, v. 142, p. 185-194, 2003.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova*, v. 31, n. 7, p.1820-1830, 2008.

COWLES, R. S; COWLES, E. A; MCDERMOTT, A. M; RAMOUTAR, D. “Inert” Formulation Ingredients with Activity: Toxicity of Trisiloxane Surfactant Solutions to Twospotted Spider Mites (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 93, p.180-188, 2000.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. *Environmental health perspectives*, V.114, N.12, p. 1803-1806, 2006.

CUTLER, D.; DEATON, A.; LLERAS-MUNEY, A. The determinants of mortality. *J. Econ. Persp*, v. 3, p. 97-120, 2006.

DAHL, U. *et al.* Application of growth related sublethal endpoints in ecotoxicological assesement using harpacticoid copepod. *Aquatic Toxicology*, v. 77, p. 433-438, 2006.

DANNENFELSER, R.M.; HE, H., JOSHI; Y., BATEMAN; S., SERAJUDDIN, A.T. Development of clinical dosage forms for a poorly water soluble drug: I Application of polyethylene glycol-polysorbate 80 solid dispersion carrier system. *J Pharm Sci*, v. 93, 2004

DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health and Perspectives*, v. 107, p. 907-938, 1999.

DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health and Perspectives*, v. 107, p. 907-938, 1999.

DAVID, M *et al.* Response of *Cyprinus carpio* (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolic profiles. *Chemosphere*, v. 56, p.347–352, 2004.

- ELLESAT, K. S.; YAZDANI, M.; HOLTH, T. F, HYLLAND, K. Species-dependent sensitivity to contaminants: An approach using primary hepatocyte cultures with three marine fish species. *Marine Environmental Research*, v. 72, p. 216-224, 2011.
- FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122–159, p.991-1009, 2006.
- FICK, J. *et al.* Contamination of surface, ground and drinking water from pharmaceutical production. *Environment Toxicology and Chemistry*, v. 28, n. 12, p. 2522-2527, 2009.
- FLECKER, A. S. Fish predation and the evolution of invertebrate drift periodicity: evidence from neotropical streams. *Ecology*, v. 73, p. 438-448, 1992.
- FRAM, M.S.; BELITZ, K. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. *Science of the Total Environment*, v. 409, p. 3409-3417, 2011.
- FULLADOSA, E.; MURAT, J.C.; MARTÍNEZ, M.; VILLAESCUSA, I. Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere* 60, p. 43-48, 2005
- GARCÍA, S. A. O. *et al.* Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. *Ecotoxicology*, v. 23, p. 1517–1533, 2014.
- GEBHARDT W.; SCHRÖDER H.F. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *J. Chromatogr. A*, v.1160,p.34-43, 2007.
- GINEBREDA, A. *et al.* Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environment International*, v. 36 , p. 153-162, 2010.
- GODOY, A. A. Avaliação ecotoxicológica dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica, em ação individual e combinada, na macrófita *Lemna minor* L. (1753). Dissertação de Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL. Poços de Caldas-MG, 2014.
- GOMEZ-EYLES, J. L; SVENDSEN, C.; LISTER, L.; MARTIN, H.; HODSON, M. E.; SPURGEON, D. J. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, p.71-79, p. 71-79.
- GÓMEZ, M.J. *et al.* Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A*, v. 1114, p. 224-233, 2006.
- GRISOLIA, A. K; BILICH, M. R.; FORMIGLI, L. M. A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactante nonylphenol ethoxylate. *Ecotoxicology and environmental safety*, v.59, n. 1, p. 123-126, 2004.



- GURSOY, R. N.; BENITA, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother*, v. 58, 2004.
- HEINLAAN, M.; IVASKA A.; BLINOVA I.; DUBOURGUIER H.C.; KAHRU A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*; v. 71, p.1308–1316, 2008.
- HIGA, M.H. *Aplicação de ensaios de toxicidade na avaliação da eficiência da radiação ionizante e da adsorção em zeólitas para o tratamento de efluentes coloridos*. Dissertação de Mestrado em Ciências na Área Tecnologia Nuclear. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares -USP. São Paulo-SP, 2008.
- HILTON, M.J.; THOMAS, K.V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1015, p. 129-141, 2003.
- HOHENBLUM, P. *et al.* Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. *Science of the Total Environment*, v. 333, p. 185-193, 2004.
- HOLM J. V.; RUGGE K.; BJERG P. L., CHRISTENSEN T. H. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill, Grindsted, Denmark. *Envir on Sci Techno*; v. 29, n. 5, p. 1415, 1995.
- IMS HEALTH. *IMS word review executive™ 2014*. Londres, 2015. 202p.
- JIMÉNEZ-RUBIO, D.; HERNÁNDEZ-QUEVEDO, C. Explaining the demand for pharmaceuticals in Spain: Are there differences in drug consumption between foreigners and the Spanish population? *Health policy*, v. 97, p. 217-224, 2010.
- JONKER, M. J. *et al.* Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 24, 2005, p. 2701-2713.
- KAISER, K; MCKINNON, M.; FORT, F.; Interspecies toxicity correlations of rat, mouse and *Photobacterium phosphoreum*. *Enviromental toxicity and chemistry*, v.13, p. 1599-1606, 1994.
- KAISER, K; PALAPRICA, V.; *Photobacterium phosphoreum* toxicity data index. *Water Pollution Research Journal of Canada*, v.26, n. 3, p.363-431, 1991.
- KAISER, K.; Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data of other organisms. *Environmental Heath Perspectives Supplements*. v. 106, n. 2, p.583-591, 1998.
- KIM, Y.; CHOI, K.; JUNG, J.; PARK, S.; KIM, P.; PARK, J. Aquatic toxicity of cetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, v.33, p.370–375, 2007.
- KOLPIN, D. W. *et al.* Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of the Total Environment*, v. 328, p. 119–130, 2002.

- KOLPIN, D. W. *et al.* Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of the Total Environment*, v. 328, p. 119–130, 2004.
- KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. *Journal Antimicrob Chemother*, v. 52, p.5-7, 2003.
- KUNGOLOS, A. *et al.* Toxic properties of metals and organotin compounds and their interactions on *daphnia magna* and *vibrio fischeri*. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 4, p.101–110, 2004.
- KÜSTER, E.; DORUSCH, F.; ALTENBURGER, R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus Vacuolatus* and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, n.10, p. 2621–2629, 2005.
- LARRSON, D. G. J.; PEDRO C.; PAXEUS N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of hazardous materials*, v.148, p. 751-755, 2007.
- LICHTENBERG, F. R. The effect of new drug approvals on HIV mortality in the US. *Econ. Hum. Bio*, v.1, n. 2, p. 259-266, 2003.
- LINDBERG, R.H.; WENNBERG, P.; JOHANSSON, M.I.; TYSKLIND, M.; ANDERSSON, B.A.V. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environmental Science & Technology* 39 (10), 3421-3429, 2005.
- LÖFFLER, D. *et al.* Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/ Sediment Systems. *Environmental Science Technology*., v.39, p.5209-5218, 2005.
- LOPES, I.; BAIRD, D. J.; RIBEIRO, R. Avoidance of copper contamination by field populations of *Daphnia longispina*. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.23, p.1702–1708, 2004.
- MACKEN, A. A test battery approach to the ecotoxicological valuation of cadmium and copper employing a battery of marine bioassays. *Ecotoxicology*, v.18, p.470–480, 2009.
- MADUREIRA, T. V. *et al.* Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). *Science of the Total Environment*, v. 408, p.5513–5520, 2010.
- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A S. A ecotoxicologia como ferramenta para o biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* v.13, n.3, p.355-381, 2008.
- MANFRA, L. *et al.* Metal Content and Toxicity of Produced Formation Water (PFW): Study of the Possible Effects of the Discharge on Marine Environment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.53, p.183–190, 2007.
- MARQUES, C. R. *et al.* Ecotoxicological effects of MIKADO and VIPER on *Algae* and *Daphnids*. *Environmental Toxicology*, Março 2011.
- MINAS GERAIS. Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº 01, de 05 de maio de 2008. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário do Executivo*, Secretaria de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, MG, 05 de Maio de 2005.

- MOREIRA-SANTOS, M.; DONATO, C.; LOPES, I.; RIBEIRO, R. Avoidance tests with small fish: determination of the median avoidance concentration and of the lowest-observed-effect gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.27, p.1576-1582, 2008.
- MUNKTTRICK, K.; POWER, E.; SERGY, G. The relative sensitive oh Microtox, daphnid, rainbow trout and fathead minnow acute lethality test. *Toxicity Assays*, v.6, p. 35-62, 1991.
- MUÑOZ, I. *et al.* Ranking potencial impacts of priority and emerging pollutants in urban wastewater through life cycle impact assessment. *Chemosphere*, v. 74, p. 37-44, 2008.
- NAVA-ÁLVAREZ, R. *et al.* Oxidative Stress Induced by Mixture of Diclofenac and Acetaminophen on Common Carp (*Cyprinus carpio*) *Water Air Soil Pollut*, v. 5, p. 225-230, 2014.
- NEUPARTH, T. *et al.* Hypocholesterolaemic pharmaceutical simvastatin disrupts reproduction and population growth of the amphipod *Gammarus locusta* at the ng/L range. *Aquatic Toxicology*, v. 155, p. 337-347, 2014.
- NUNES, B; CARVALHO, F.; GUILERMINO, L. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica*, and *tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 16, p. 413-419, 2005.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. 221. *Lemna sp.* Growth Inhibition Test. In: Guidelines for the testing of chemicals, 2006.
- PALMA, P. *et al.* Acute Toxicity of Atrazine, Endosulfan Sulphate and Chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, Relative to Their Concentrations in Surface Waters from the Alentejo Region of Portugal. *Bull Environ Contam Toxicol*, v.81, p.485–489, 2008.
- PARK, G. S. *et al.* Ecotoxicological Evaluation of Sewage Sludge Using Bioluminescent Marine Bacteria and Rotifer. *Ocean Science Journal*, v. 40, N. 2, p.91-100, 2005.
- PASCOE, D; KARNTANUT, W.; MULLER, C. T. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, v. 51, p. 521-528, 2003.
- PIETRYCZUK, A.; CZERPAK, R. Effect of traumatic acid on antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Growth Regul.*, v. 65, n. 2, p. 279-286, 2011.
- PIFFERI, G; SANTORO, P.; PEDRANI, M. Quality and functionality of excipients. *Farmaco*, v. 54, p. 1-14, 1999.
- PLAA, G.L.; HEWITT W.R. Toxicology of the liver. *Raven Press*, New York, p.103-210, 1982.
- POI, C. *et al.* Toxicity of five antidepressant drugs on embryo–larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ Sci Pollut Res*, v. 21, p. 13302–13314, 2014.
- PRO, J. *et al.* Effect Assessment of Antimicrobial Pharmaceuticals on the Aquatic Plant *Lemna minor*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, v. 70. p. 290–295, 2003.
- RAND, G. M. & S.R. PETROCELLI. *Fundamental of aquatic toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington. 666p, 1985.

- RASGALLA JR. C.; NOLDIN, J.A.; SANTOS, A. L.; SATO, G. EBERHARDT, D. S. Toxidade aguda de herbicidas e inseticida utilizados na cultura de arroz irrigado sobre juvenis de carpas (*Cyprinus carpio*). *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 12, p. 59-68, 2002.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*, 7<sup>a</sup>. ed. Coord. Trad. J. E. Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2007.
- RIBEIRO, S. *et al.* Toxicity screening of Diclofenac, Propranolol, Sertraline and Simvastatin using *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus* embryo bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 114, p. 67-74, 2015.
- ROBERTS, P.H.; THOMAS, K.V. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of the Total Environment*, v. 356, p. 143-153, 2006.
- ROIG, B. *Pharmaceuticals in the environment—current knowledge and need assessment to reduce presence and impact*. IWA, London, Reino Unido, p. 198, 2010
- ROSA, R.; MATERATSKI, P.; MOREIRA-SANTOS, M.; SOUSA, J. P.; RIBEIRO, R. A scaled-up system to evaluate zooplankton spatial avoidance and the population immediate decline concentration. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.31, n. 6 , p.1301-1305, 2012.
- SACHER, F.; EHMANN, M.; GABRIEL, S.; GRAF, S.; BRAUCH; H. J. Pharmaceutical residues in the river Rhine—results of a one-decade monitoring programme. *J Environ Monit*, v.10 , p. 664–670, 2008.
- SANDERSON, H *et al.* Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. *Toxicology*, v. 203, p. 27–40, 2004.
- SEBASTINE, I. M.; WAKERMAN, R. J. Consumption and Environmental Hazards of Pharmaceutical Substances in the UK. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 81, p. 229-235, 2003.
- SILVA, A. SANTOS, L. H. M. L. M.; DELERUE-MATOS, C.; FIGUEIREDO, S. A. Impact of excipientes in the chronic toxicity of fluoxetine on the alga *Chrolorella vulgaris*. *Environmental Technology*, v. 35, n. 24, p.3124-3129, 2014
- SILVA, B. F. *et al.* Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere*, v.85, p.1331–1339, 2011.
- SILVA, M.A.R *et al.* Environmental impact of industrial sludge stabilization/solidification products: Chemical or ecotoxicological hazard evaluation? *J. Hazard. Mater.* v.192, n.3, p.1108-1113, 2011.
- SODRÉ, F. F. *et al.* Ocorrência de Interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 2, p. 187-196, 2007.
- STACKELBERG, P. E. *et al.* Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of the Total Environment*, v.329, p.99–113, 2004.

STOLTE, S.; STEUDT, S.; AREITIOAURTENA, O.; PAGANO, F. THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P.; IGARTUA, A. Ionic liquids as lubricants or lubrication additives: An ecotoxicity and biodegradability assessment. *Chemosphere*, 89, 1135–1141, 2012

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. Polar Drug Residues in Sewage and Natural Waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science Total Environmental*, v. 225, n. 1-2, p. 135-141, 1999.

SURGAN, M.; CONDON, M.; COX, C. Pesticide Risk Indicators: Unidentified Inert Ingredients Compromise Their Integrity and Utility. *Environmental management*, v. 45, n.4, p. 834-841, 2010.

TAMBOSI, J. L. *Remoção de fármacos e avaliação de seus Produtos de degradação através de Tecnologias avançadas de tratamento*. 141f. Tese (Doutorado) -Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

TERNES, T.A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.*, v. 32, n. 11, p. 3245–3260. 1998.

THOMULKA K.W.; MCGEE D.J. Detection of biohazardous materials in water by measuring bioluminescence reduction with the marine organism *Vibrio harveyi*. *Environ Sci Health*, v. 28, p. 53-66. 1993.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspective. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.1, p.151-173, 1977.

TURKIYE, K. J. Analyzing the Consumption of Various Pharmaceuticals in Turkey: A Panel Approach. *Biostat*, v. 5, n. 2, 2013.

TURNER K. S., HARDY M. A., TAPPER R. J. Water-quality reconnaissance of the perimeter of the Rolling Knoll landfill near Green Village, New Jersey, and electromagnetic survey of the parts of the landfill within the Great Swamp National Wildlife Refuge. *US Geological Survey Open-File*, p.92-153, 1993.

U.S.EPA. *Handbook for sampling and sample preservation of water and wastewater*. Cincinnati, Ohio: U.S.EPA, 402p., 1982.

U.S.EPA. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 5 ed. Washington, D.C.: U.S.EPA, 266p., 2002a.

U.S.EPA. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 4 ed. Washington, D.C.: U.S.EPA, 335p., 2002b.

URBANCZYC H., AST J.; HIGGINS M.; CARSON J., DUNLAP P. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., . comb. nov., *Aliivibrio logei* com. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.57, p. 2823–2829, 2007.

VULLIET, E. et al. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1210, p. 84-91, 2008.

- WASAN, K.M. Formulation and physiological and biopharmaceutical issues in the development of oral lipid-based drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*, v. 27, p.267–76, 2001.
- WILLIAMS, A.C., BARRY, B. W. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*, v.56, p. 603-621, 2004
- XU, P. *et al.* Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nature Genetics*, v. 5, 2014
- YANG, *Let al.* Growth-inhibition effects of 12 antibacterial agents and their mistures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 27, n.5, p. 1201-1208, 2008.
- YOSHIMURA, H. & ENDOH, Y. R. Acute Toxicity to Freshwater Organisms of Antiparasitic Drugs for Veterinary Use. *Environ. Toxicol.*, v. 20, p. 60-66. 2005.
- YU, M.H. *Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants*, 2nd ed., CRC Press: Boca Raton, 2005.
- ZHANG, X. *et al.* Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. *Archives of Toxicology*, v. 89, n.12, p. 2207-2217, 2015.
- ZHAO, I.; WHANG, L.; ZHANG, Z. Quantitative structure-activity relationships. Relationship between toxicity of organic chemicals to fish and to *Photobacterium phosphoreum*. *Chemosphere*, v.26, p.1971-1979, 1993.

# Capítulo 3

---

Toxicidade aguda, crônica e de fuga de fármacos

## 1. INTRODUÇÃO

O rápido aperfeiçoamento da instrumentação analítica automatizada no final do século XX fez com que um grande número de substâncias, previamente não detectáveis, emergissem como contaminantes ambientais (TAYLOR e SENAC, 2014). Dentre essa classe dos denominados contaminantes emergentes, encontram-se os fármacos, os quais são extensivamente usados na medicina humana e veterinária, prolongando consideravelmente a vida de seres vivos.

Dentre os fármacos mais consumidos, podem-se citar antipiréticos, analgésicos, reguladores lipídicos, antibióticos, antidepressivos, agentes quimioterápicos, antidiabéticos, reguladores de pH gástrico e drogas contraceptivas. Essas substâncias, além de fazerem parte dos esgotos, estão presentes em corpos d'água (TAMBOSI, 2008).

Nesse sentido, o consumo elevado de medicamentos, aliado a presença deles no meio ambiente, gera preocupação quanto às consequências dessa questão, uma vez que esses compostos são bioativos e, portanto, capazes de causarem efeitos em sistemas vivos (GINEBREDA *et al.*, 2010). Além disso, muitas dessas substâncias são projetadas para exibirem persistência em organismos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006), agravando as possíveis consequências da presença de fármacos no meio ambiente.

Tais preocupações foram ratificadas a partir dos dados apresentados no capítulo 2 dessa tese, que apontam para o potencial toxicológico relacionado não apenas aos fármacos, mas também aos excipientes farmacêuticos. Neste capítulo, pretende-se complementar a investigação iniciada através do estudo de toxicidade dos princípios ativos isoladamente, isso é, sem a presença de excipientes.

Apresenta-se, portanto, o capítulo 3 desse trabalho, em que se objetiva avaliar a toxicidade crônica por *Chlorophyceae*, aguda por *Aliivibrio fischeri* e de fuga por *Cyprinus carpio* dos princípios ativos sinvastatina, cloridrato de metformina, diazepam e omeprazol.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 *Objetivo geral***

Avaliar, em termos de toxicidade crônica, aguda e de fuga, a toxicidade dos princípios ativos sinvastatina, cloridrato de metformina, diazepam e omeprazol.

### **2.2 *Objetivos específicos***

- Contrastar o efeito gerado em diferentes organismos quando em presença de princípios ativos de fármacos em diferentes concentrações e em diferentes tempos de exposição;
- Comparar o potencial toxicológicos dos fármacos frente a diferentes efeitos, sendo eles reprodução, fuga e morte.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Levantamento de dados relacionados aos fármacos em estudo

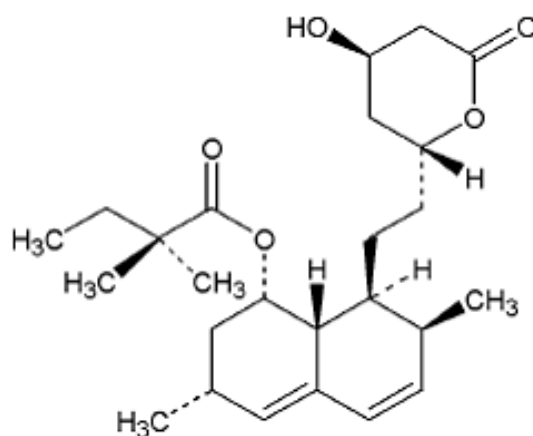
A seguir, apresenta-se informações disponíveis na literatura a respeito dos fármacos pesquisados nesse trabalho, são eles: sinvastatina, cloridrato de metformina, diazepam e omeprazol.

##### 3.1.1 Sinvastatina

A hipercolesterolemia é conhecida por ser o principal fator de risco relacionado a doenças cardíacas (CEJKA *et al.*, 2003). A função da sinvastatina no corpo humano é combater esse problema. De acordo com Cejka e colaboradores (2003), a atuação desse e de outros fármacos semelhantes ocorre na via metabólica do organismo humano responsável pela sintetização de mais de 50% do colesterol, inibindo a atuação da enzima HMG-Co (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima). Os originais inibidores da citada enzima foram isolados de fungos, mas agora uma grande variedade de estruturas sintéticas e semi-sintéticas está disponível do mercado, a exemplo da sinvastatina (ENDO e HASUMI, 1993).

A molécula da sinvastatina pode ser visualizada na Figura 3.1. Trata-se de estrutura quase isoestrutural se comparada com o fármaco lovastatina. Além disso, sua conformação geral está intimamente relacionada com as estruturas de cristais relatadas em outros fármacos do tipo estatina.

**Figura 3.1** - Estrutura molecular do fármaco sinvastatina

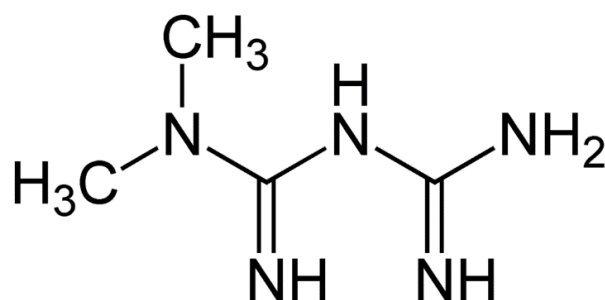


##### 3.1.2 Cloridrato de metformina

O cloridrato de metformina (Figura 3.2) é um fármaco sintetizado nos anos de 1970 do século XX para o tratamento de pacientes com diabetes mellitus não-insulino-dependentes. Apenas após mais de uma década de experiências clínicas realizadas na Europa, Canadá e outros países, aprovou-se a

comercialização da metformina nos Estados Unidos (LUCIS, 1983; BAILEY, 1993). O excesso de zelo relacionado à liberação do medicamento para vendas, deve-se à semelhança química entre a metformina e a fenformina, um fármaco amplamente utilizado na década de 1960, mas removido do mercado americano em 1977, em função da excessiva ocorrência de acidose láctica em pacientes (OSCAR; CROFFORD, 1995). Oscar e Crafford (1995) reportam que a ocorrência de acidose láctica em pacientes que utilizaram a metformina por mais de 10 (dez) anos foi baixa, 64 casos a cada 100.000 pacientes por ano.

**Figura 3.2** -Estrutura molecular do fármaco cloridrato de metformina



Stumvoll e colaboradores (1995) esclarecem que os principais efeitos metabólicos da metformina são a inibição da gluconeogênese, a redução da produção hepática de glicose e, ainda, a manutenção de baixas concentrações de glicose no sangue durante o jejum. Clinicamente, o último efeito é aquele ideado, uma vez que a concentração de glicose no sangue em jejum define o controle glicêmico durante todo o dia.

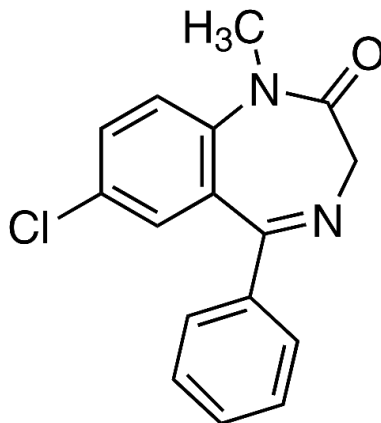
### 3.1.3 Diazepam

O primeiro benzodiazepínico a ser sintetizado foi o clordiazepóxido, desenvolvido por Leo Sternbach da empresa farmacêutica Hoffmann-LaRoche e comercializado como Librium® a partir de 1960. Desde essa descoberta, benzodiazepínicos tornaram-se medicamentos comumente prescritos para o tratamento da insônia, ansiedade e convulsões, como relaxantes musculares e, ainda, como anestésicos (STERNBACH, 1979; MAHJOUB e STAUB, 2000). Eles são o grupo de medicamentos para o controle da ansiedade mais frequentemente prescritos (DE PAULA *et al.*, 2015).

O dizepam (Figura 3.3) é um dos benzodiazepínicos mais consumidos no mundo (IMS Health, 2015). O mecanismo de ação do fármaco consiste em modular a função do sistema GABAérgico por meio do reforço de íons cloreto através de fluxo de receptores GABA-A na região límbica do cérebro (CALDJI *et al.*, 2003, GONZALEZ *et al.*, 1996). Existem diversas evidências clínicas de que

disfunções no sistema GABAérgico são as principais responsáveis por transtornos de ansiedade em seres humanos (MILLAN, 2003).

**Figura 3.3** - Estrutura molecular do fármaco diazepam

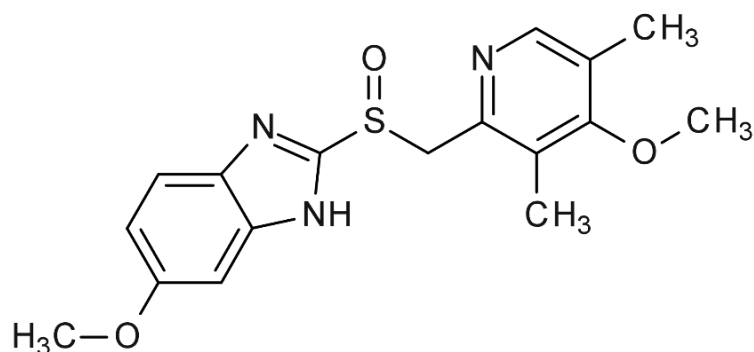


#### 3.1.4 Omeprazol

O omeprazol (Figura 3.4) é o primeiro representante de uma classe de fármacos produzidos a partir dos anos 1980 do século XX e que inibem a secreção gástrica, alterando a atividade da enzima H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (SACHS, G. 1986; SACHS, G. *et al.*, 1988; WALLMARK, B. 1989). Essa enzima está relacionada a etapa final da secreção ácida em células parietais gástricas.

A descoberta do omeprazol levou a novas evidências sobre o mecanismo de secreção gástrica, a gênese de certos tumores gastrointestinais e o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças ácido-pépticas (OATES, J. *et al.*, 1991). Ainda de acordo com Oates e colaboradores (1991), nos Estados Unidos, o omeprazol foi inicialmente aprovado apenas para utilização a curto prazo, em pacientes com esofagite de refluxo e em pacientes com a síndrome de Zollinger-Ellison, devido a preocupações relacionadas aos resultados de estudos de longo prazo envolvendo toxicidade em animais. Hoje, o omeprazol é amplamente consumido em todo mundo (IMS Health, 2015), representando grande ajuda terapêutica nas enfermidades gastrointestinais.

**Figura 3.4** -Estrutura molecular do fármaco omeprazol



### **3.2 Efeitos tóxicos provocados pelos princípios ativos dos fármacos no meio ambiente**

Os fármacos são projetados para atuarem em vias metabólicas e moleculares específicas de humanos e animais, mas freqüentemente exibem efeitos colaterais importantes. Quando introduzidos no meio ambiente, podem afetar tanto aqueles organismos que tenham bioestrutura similar aos humanos como os organismos com estruturas distintas, em que os mecanismos de ação desses químicos são desconhecidos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

Nesse sentido, Quinn; Gagné e Blaise (2008) avaliaram o potencial tóxico de onze fármacos sobre o cnidário *Hydra attenuata*, um microrganismo invertebrado existente nas águas doces da Europa, da Ásia e nas Américas. Os autores observaram que a regeneração do microrganismo foi inibida nas concentrações de 0,1; 5 e 1 mg L<sup>-1</sup> de genfibrozil, ibuprofeno e naproxeno, respectivamente, e a altas concentrações de 50 mg L<sup>-1</sup> para bezafibrato e trimetropim. Por outro lado, a carbamazepina e os antibióticos sulfapiridina e oxitetraciclina estimularam a regeneração da cnidária quando aplicados em concentrações de 25, 5 e 50 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

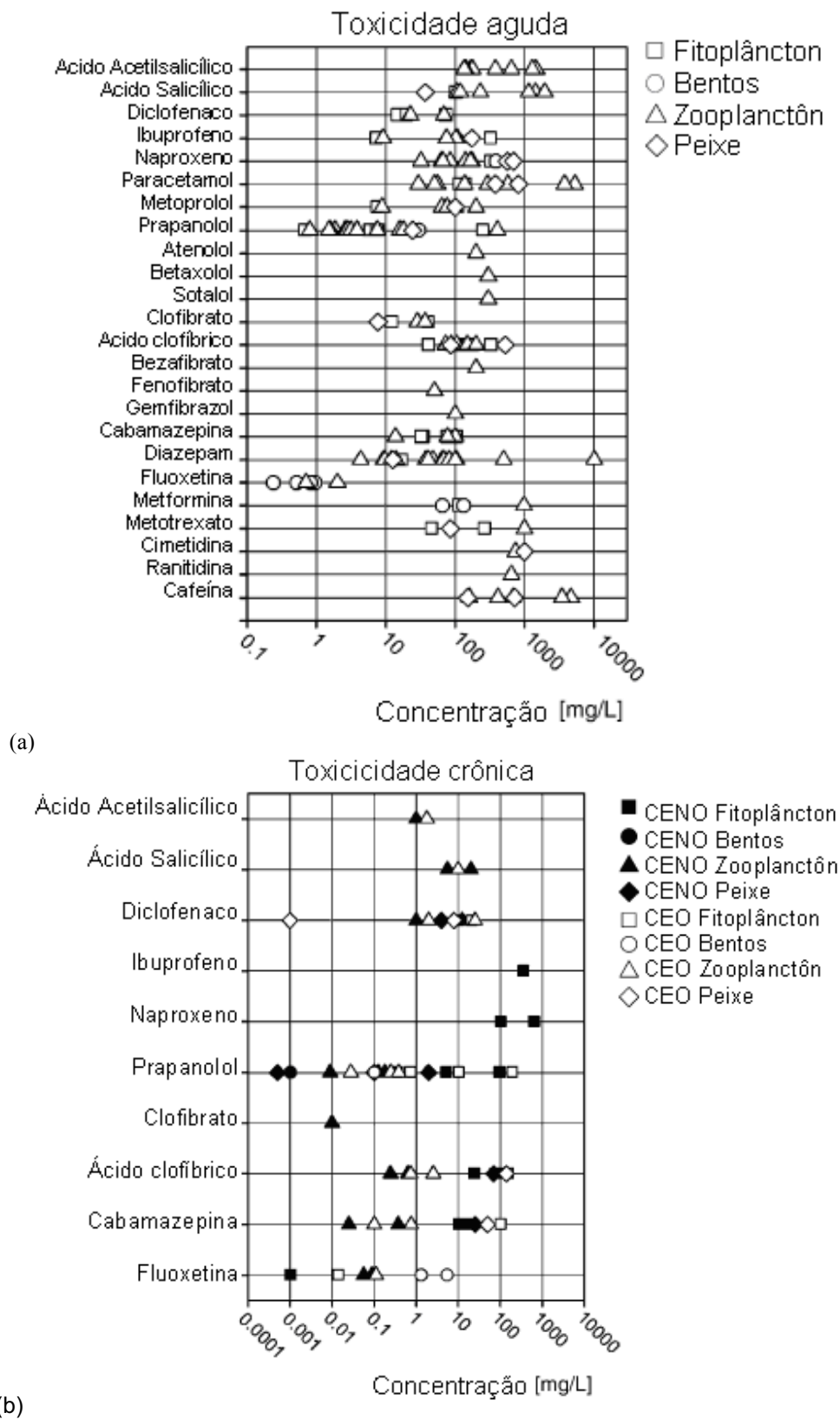
Dados que corroboram com os citados são os de Gunnarsson e colaboradores (2009), que avaliaram o efeito de exposição de efluente industrial altamente diluído (1:500) na espécie de peixe Truta Arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os resultados mostraram influência na expressão gênica e atividade enzimática do animal, como também na função hepática e renal, na atividade do citocromo P450 1A e alteração nos níveis de fosfato no plasma sanguíneo.

Precisamente, os testes ecotoxicológicos se assentam com essa tentativa de elucidar os efeitos de certos medicamentos em diferentes organismos no meio ambiente. De acordo com Webb (2001) citado por Fent; Weston e Caminada (2006), testes de toxicidade aguda que comparam diferentes níveis tróficos sugerem que algas são mais sensíveis ao contato com fármacos que a *Daphnia magna*,

seguidos pelos peixes. Os mesmos estudos demonstram, ainda, que as classes mais tóxicas de fármacos são os antidepressivos, antibióticos e antipsicóticos. No entanto, a ação desses compostos apresenta efeitos muito variáveis entre os diversos filos. Já com relação à toxicidade crônica, os experimentos são escassos. São raros os trabalhos que buscam identificar os efeitos principais da exposição de fármacos a longo prazo ou conseqüências nos diferentes estágios do ciclo de vida dos organismos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). Na figura 3.5 estão dispostos dados de toxicidade crônica e aguda compilados por Fent; Weston e Caminada (2006).

A figura 3.5 permite observar o amplo espectro de variação do efeito dos fármacos entre indivíduos de espécies diferentes. Evidencia, ainda, a elevada toxicidade de fármacos como a fluoxetina, que em concentrações inferiores ou próximas a 1 mg/L é capaz de causar efeito deletério em testes de toxicidade aguda com fitoplâncton, zooplâncton, organismos bentônicos e peixes.

**Figura 3.5** - (a) Toxicidade aguda de 24 fármacos, expressada em valores de  $CE_{50}$  ou  $CL_{50}$  para diferentes tipos de organismos. (b) Toxicidade crônica de 10 fármacos, expressada em valores de Concentração de Efeito Não Observado (NOEC) e Concentração de Efeito Observado (LOEC).

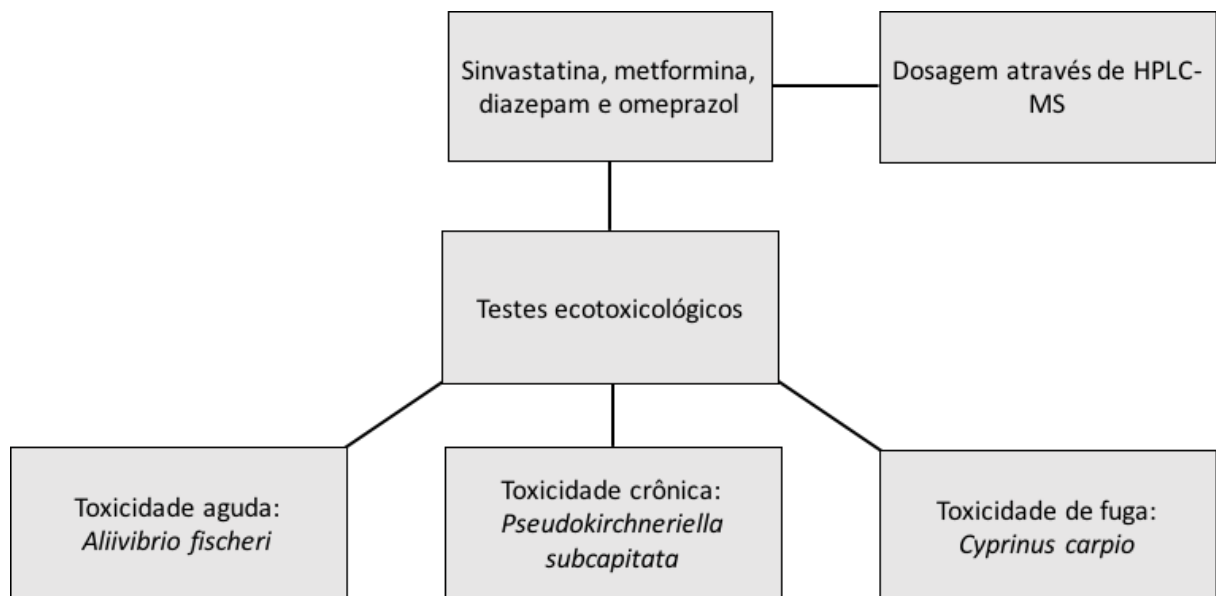


**Fonte:** Adaptado de FENT; WESTON & CAMINADA (2006).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Na figura 3.6 são apresentadas as etapas metodológicas referentes ao capítulo 3 dessa tese.

**Figura 3.6** – Etapas do desenvolvimento metodológico



### 4.1 Condições de análise dos fármacos

Para a realização das análises, foram preparadas soluções contendo os fármacos em estudo diluídos em água ultrapura. Os princípios ativos foram todos adquiridos da empresa alemã Sigma-Aldrich contendo grau de pureza superior a 99%.

O objetivo, nessa etapa, foi solubilizar a maior quantidade possível de cada fármaco em água ultrapura para, imediatamente em seguida, realizar as diluições que permitiriam encontrar os valores de toxicidade ou concentrações de efeito (CE) nos testes. Nesse sentido, informa-se na tabela 3.1 as solubilidades máximas dos fármacos em estudo, identificadas a partir de análise com o equipamento HPLC marca Shimadzu acoplado com espectrômetro de massa QTOF da marca Bruker.

**Tabela 3.1-** Solubilidades máximas dos fármacos em estudo

Fármaco	Solubilidade (mg/L)
Sinvastatina	0,07
Metformina	1063,24
Diazepam	69,35
Omeprazol	0,34



Menciona-se que os valores de solubilidade encontrados foram distintos daqueles apontados pela literatura e apresentados no capítulo anterior. Acredita-se que isso se deva a diferenças de métodos analíticos empregados, sendo o utilizado nessa pesquisa (HPLC-MS) de elevada precisão.

## 4.2 Testes ecotoxicológicos

### 4.2.1 Testes de toxicidade aguda

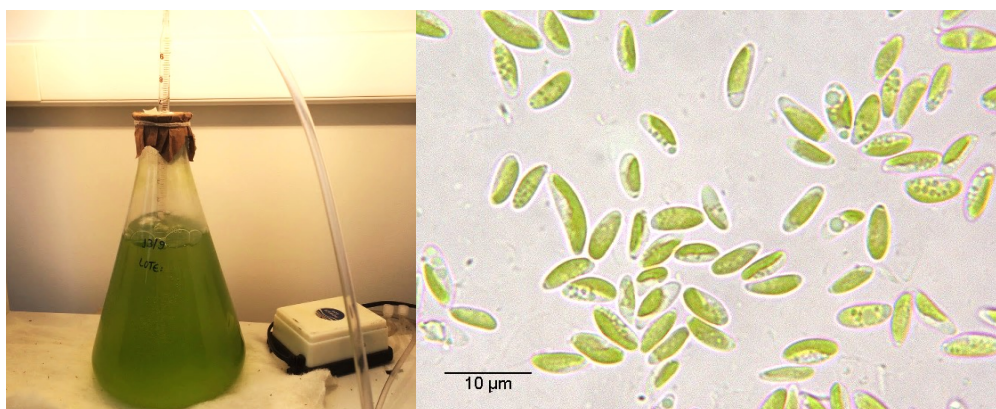
Os princípios ativos supracitados foram submetidos ao teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha luminescente *Aliivibrio fischeri*.

O procedimento para realização das análises foi detalhado no capítulo 2 desse documento, especificamente no item 4.4. Conforme explicitado, a metodologia para condução dos testes de toxicidade aguda é aquela especificada pela ABNT NBR 15411-3 (ABNT, 2006) e pelo *software* (MICROTOX<sup>®</sup> Omni Software, versão 4.1) do próprio equipamento MICROTOX<sup>®</sup>.

### 4.2.2 Testes de toxicidade crônica

Os testes de toxicidade crônica foram realizados com algas da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*, gênero *Chlorophyceae* (Figura 3.7). As análises foram conduzidas no laboratório de ecotoxicologia do Centro de Inovação e Tecnologia SENAI FIEMG, seguindo as determinações da norma da ABNT NBR 12648 (2011).

**Figura 3.7** – Algas da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*, gênero *Chlorophyceae*



O cultivo e manutenção da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* foi realizado em meio L. C. Oligo (Tabela 3.2), conforme as especificações da norma ABNT NBR 12648 (2011). Além disso, os organismos foram mantidos em contínua aeração e luminosidade, bem como em temperatura entre 25°C e 26°C.

**Tabela 3.2** - Composição do meio L. C. Oligo para cultivo e análises ecotoxicológicas com algas do gênero *Chlorophyceae*

Solução	Concentração (mg/mL)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	40
KNO <sub>3</sub>	100
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	30
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40
CUSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,03
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,06
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,06
CoC <sub>12</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,06
Mn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,06
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SO <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,06
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,06
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,62
FeC <sub>13</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,625
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,625
NaHCO <sub>3</sub>	15

Para realização dos testes de toxicidade propriamente ditos, os organismos foram preliminarmente induzidos a entrar em fase exponencial de crescimento, possível ao mantê-los por três dias sob luminosidade constante de 4500 lux, contínua agitação a 130 RPM e temperatura de 25°C. Após esse período, foram montadas as unidades experimentais. Essas consistiram de erlenmeyers de vidro de 100 mL, preenchidos com distintas concentrações de cada um dos fármacos, totalizando cinco, solubilizadas em 100 mL de meio de cultivo. Em cada unidade, foram inoculadas colônias de *Pseudokirchneriella subcapitata* na concentração de 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> organismos por mL. Em seguida, as unidades experimentais foram dispostas aleatoriamente em um agitador em condições idênticas às adotadas para estabelecimento do crescimento exponencial.

Esclarece-se que os testes tiveram a duração de 72 horas e que, ao início e final das análises, as concentrações de organismos foram medidas. A comparação entre os valores iniciais e finais de biomassa permitiram o cálculo dos parâmetros de toxicidade para cada composto. Salienta-se que todas as medições de concentração da alga ocorreram com o auxílio de uma Câmara de Neubauer. Ainda, todas os testes foram conduzidos em triplicatas.

Após a realização das análises, foi possível determinar os valores de CI<sub>10</sub>, CI<sub>20</sub>, CI<sub>50</sub> e respectivos intervalos de confiança utilizando o software ICPIN versão 2. Além disso, através do software Toxstat versão 3.5 determinou-se o CENO e o CEO.

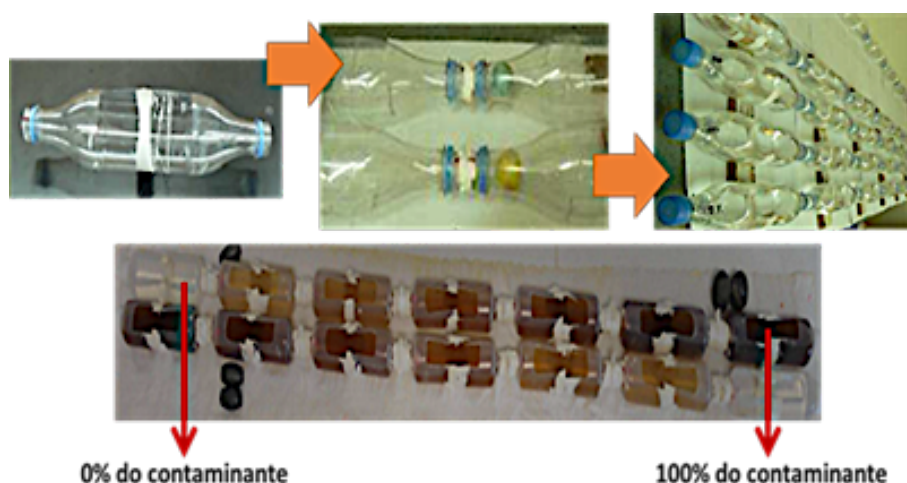
Finalmente, a sensibilidade da *Pseudokirchneriella subcapitata* cultivada foi avaliada, mensalmente, utilizando-se o cloreto de sódio (NaCl) como substância de referência nas concentrações 0,25; 0,5; 0,75; 1,5 e 3 g/L. As condições de realização dos testes de sensibilidade foram as mesmas utilizadas nas demais análises de toxicidade executadas. Esclarece-se que a realização desses testes se justifica na manutenção da uniformidade das análises, garantindo que cada lote utilizado esteja dentro de parâmetros homogêneos. Destaca-se, ainda, que diferenças superiores a 20% nas triplicatas, bem como crescimento de biomassa no controle inferior a 16 vezes ao longo dos testes, são circunstâncias que invalidam a análise, as quais foram obedecidas nesse trabalho.

#### 4.2.3 Testes de fuga

Os testes de fuga têm como princípio o fato de que quando os organismos de determinado ecossistema são submetidos à contaminação, eles fogem desse mesmo habitat, mesmo quando essa contaminação não chega a concentrações capazes de matá-los. Essa análise baseia-se, portanto, no deslocamento de determinado organismo de uma zona mais contaminada para uma outra menos contaminada, provocado pela presença de substâncias potencialmente tóxicas.

Os testes de fuga foram realizados com base nos estudos de LOPES *et al.*, 2004; MOREIRA-SANTOS *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2014a, que empregaram a metodologia com êxito. Através de um aparato simples, alevinos de *Cyprinus carpio* foram expostos à contaminação por fármacos por um período de quatro horas, tendo condições de se deslocar através de um gradiente de concentração que se estende por todo o aparelho. Apresenta-se, na figura 3.8, o esquema relacionado ao processo de montagem do aparato e dos testes de toxicidade.

**Figura 3.8** - Esquema de montagem de testes de fuga

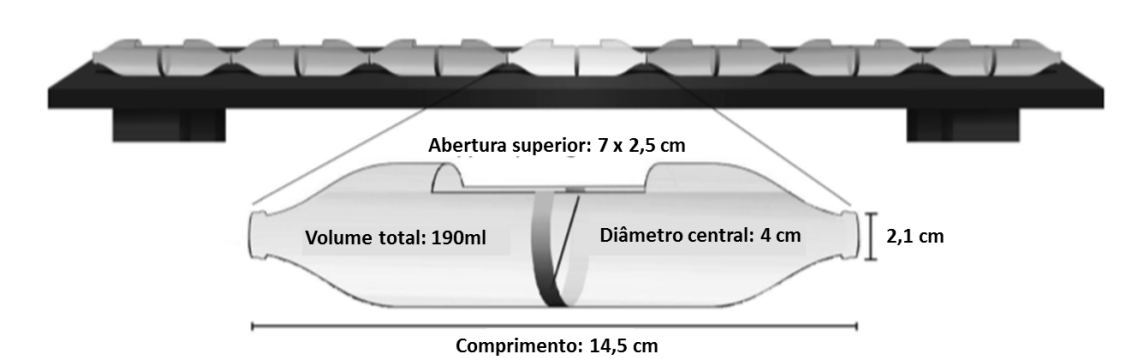


Esclarece-se que o tempo determinado para realização do teste, quatro horas, foi selecionado após outros autores (LOPES *et al.*, 2004; MOREIRA-SANTOS *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2014a) procederem com análises que evidenciaram se tratar de intervalo suficiente para que a resposta de fuga seja mensurada sem que haja mistura significativa entre as concentrações do aparato.

Já com relação aos alevinos utilizados para a realização dos citados testes, esses foram obtidos do estabelecimento GM Alevinos, localizado em Contagem/MG. Esses organismos permaneceram em aclimatação por uma semana, seguindo as orientações da norma da ABNT NBR15088 (2011). Os alevinos foram mantidos em aquário com capacidade para 74L, contendo água desclorada em contínua aeração e filtração. As condições de laboratório foram as ambientes, aproximadamente 25°C e 12/12hs de fotoperíodo. Os organismos foram alimentados duas vezes ao dia com a ração ALCON® até 24 horas antes dos testes. Para as avaliações de fuga, foram utilizados alevinos com  $5 \pm 1$  cm e  $1,2 \pm 0,3$  g de peso. Além disso, o lote de organismos apenas foi testado quando verificado mortalidade inferior a 10% nas 48 horas anteriores à análise.

O sistema para realização dos testes é composto por sete compartimentos, perfazendo um total de 100 cm (Figura 3.9). Para montagem do aparato, garrafas PET de 0,2 L tiveram o fundo removido e foram unidas através de silicone (Tytan® para aquários), possuindo cada compartimento volume aproximado de 200 ml, mas que foi preenchido com 180 ml da solução a ser testada diluída em água desclorada. Um total de dois peixes foi adicionado em cada um dos compartimentos, totalizando-se quatorze organismos por aparato. Esses alevinos foram mantidos no escuro durante as quatro horas de teste, sem quaisquer interferências humanas e com total liberdade de movimentação através do gradiente de concentração criado (Tabela 3.3). Ao final do teste, os organismos presentes em cada compartimento foram contados com auxílio de luz vermelha e a resposta de fuga foi medida. Todas as análises foram realizadas em triplicata e conjuntamente com um grupo controle ou branco, contendo água desclorada.

**Figura 3.9** - Diagrama esquemático do sistema montado, esclarecendo as medidas de um dos compartimentos (Adaptado de ARAÚJO *et al.*, 2014a).



**Tabela 3.3** - Gradiente de concentração estabelecido no aparato para cada princípio ativo testado

Fármaco	Concentração (mg/L)						
	Seção 1	Seção 2	Seção 3	Seção 4	Seção 5	Seção 6	Seção 7
Sinvastatina	0,07	0,058	0,046	0,035	0,023	0,012	0
Metformina	1063,24	882,49	701,74	531,62	350,87	180,75	0
Diazepam	69,35	57,56	45,77	34,67	22,8	11,79	0
Omeprazol	0,34	0,28	0,22	0,17	0,11	0,058	0

Ressalta-se que em função dos resultados encontrados para o fármaco metformina, os quais serão discutidos no item de resultados e discussões desse capítulo, foi necessário repetir a análise em concentrações mais baixas, quais sejam, 22,88 mg/L; 18,99 mg/L; 15,10 mg/L; 11,44 mg/L; 7,55 mg/L; 3,89 mg/L; e 0 mg/L.

Finalmente, esclarece-se que, procurando provar a permanência de um gradiente de concentração durante as quatro horas de duração dos testes, uma análise de calibração foi efetuada. Essa avaliação aconteceu no formato de um teste, sendo realizada nas mesmas condições mencionadas acima, porém em presença de NaCl em concentrações pré-estabelecidas (0; 17; 33; 50; 66; 83; e 100 mg/L). Para verificar a manutenção do gradiente de concentração, mediu-se a condutividade de cada um dos compartimentos no tempo zero e ao final a análise, isso é, após livre movimentação dos organismos teste (ROSA *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2014a).

Subsequentemente, conduziram-se análises estatísticas que permitiram avaliar a existência de diferença significativa entre os valores iniciais e finais de condutividade encontrados nos compartimentos ilustrados na Figura 3.9. Essas análises, Shapiro-Wilk seguido do teste T de Wilcoxon, foram conduzidas com o software Past versão 3.15.

#### 4.2.3.1 Tratamento de dados gerados nos testes de fuga

Com relação aos testes de fuga, foi necessário tratamento de dados que permitisse determinar porcentual de fuga por compartimento e o  $CA_{50}$  (Concentração do contaminante capaz de induzir a fuga de 50% dos organismos) de cada contaminante testado.

Inicialmente, estabeleceu-se o número de organismos fugitivos para cada compartimento através do cálculo da diferença entre o número de organismos esperado ( $N_e$ ) e o número observado ( $N_o$ ). O  $N_o$  representa o número de organismos encontrados no compartimento em questão somado àqueles

encontrados nos compartimentos com concentrações superiores de contaminante (MOREIRA-SANTOS *et al.*, 2008 e ARAÚJO *et al.*, 2014a):

$$\text{Fugitivos} = N_e - N_o \quad (3.1)$$

Salienta-se que  $N_e$  foi determinado considerando, no compartimento de maior concentração, número de peixes igual ao introduzido nele. Para as demais seções, supôs-se  $N_e$  como o valor de peixes introduzidos naquele compartimento somado ao esperado no compartimento adjacente de maior concentração. Sendo assim, o número de organismos esperados nas seções de 100% a 0% de concentração são, respectivamente, 2; 4; 6; 8; 10; 12; e 14. Essa metodologia foi descrita por Moreira-Santos e colaboradores (2008) e repetida por Araújo e colaboradores (2014a).

Já a porcentagem de fuga em cada um dos compartimentos, foi estabelecida conforme equação a seguir (MOREIRA-SANTOS *et al.*, 2008 e ARAÚJO *et al.*, 2014a):

$$\text{Porcentagem de fuga} = \frac{\text{Fugitivos}}{N_e} \times 100 \quad (3.2)$$

Finalmente, utilizou-se o software Pripobit para determinação da  $CA_{50}$  e intervalos de confiança.

### **4.3 Análises no equipamento HPLC-MS**

As dosagens dos fármacos foram realizadas utilizando o equipamento HPLC Shimadzu LC 20A acoplado ao espectrômetro de massa BrukerMicroTOF QII com ionização por Eletrospray (ESI-MS) a uma resolução de 12000 m/z.

Primeiramente, adotou-se procedimento que permitisse a quantificação da concentração real solubilizada de cada fármaco, o que reduz a imprecisão relacionada à pesagem e dissolução dos compostos. Tal procedimento consistiu na elaboração de uma curva de calibração a partir da injeção de padrões dos referidos fármacos, os quais continham metanol e água na proporção de 1:1 e distintas concentrações de princípio ativo, sendo elas 0,50; 1,0; 2,0; 10,0; e 20,0 mg/L. Após, foi possível a determinação da concentração real do composto solubilizado, uma vez que o equipamento compara amostras reais injetadas com a curva de calibração já gerada.

Salienta-se que o volume injetado das amostras no HPLC-MS foi de 20  $\mu$ L a uma temperatura de 20°C.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Testes de toxicidade aguda

Todos os fármacos testados nesse trabalho possuem algum grau de toxicidade para a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* em teste de 30 minutos, conforme tabela 3.4 a seguir.

**Tabela 3.4** - Toxicidade aguda expressa em CE (mg/L) para *Aliivibrio fischeri* dos fármacos metformina, diazepam, sinvastatina e omeprazol

	CE <sub>10</sub> (mg/L)	CE <sub>20</sub> (mg/L)	CE <sub>50</sub> (mg/L)
Metformina	870,79	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
Diazepam	8,69	24,8	ND <sup>1</sup>
Sinvastatina	0,0093	0,029	ND <sup>1</sup>
Omeprazol	0,0053	0,0065	0,015

<sup>1</sup>Não disponível: significa que não houve valor para essa amostra, isso é, a toxicidade encontrada foi menor que esse parâmetro

Observa-se que o mais tóxico dos princípios ativos é o omeprazol, seguido da sinvastatina, diazepam e, finalmente, a metformina. Nota-se, ainda, que a única concentração de efeito identificada em todos os fármacos é a CE<sub>10</sub>, motivo pelo qual esse foi o parâmetro selecionado como base para a etapa de análise de toxicidade de misturas (capítulo 4). Menciona-se que o omeprazol é o único dos fármacos que possui CE<sub>50</sub> (concentração de efeito mais comumente tratada pela literatura), com valor de 0,015mg/L.

Existem poucos trabalhos a respeito da toxicidade do omeprazol. Cita-se pesquisa a respeito do efeito agudo para o organismo *Aliivibrio fischeri*, comparando com outros medicamentos (GARCÍA *et al.*, 2014). García e colaboradores (2014) reportam que a toxicidade do omeprazol (CE<sub>50</sub>) para *Aliivibrio fischeri* é de 1,76 mg/L no teste de 30 minutos. Ressalta-se que, embora o presente trabalho e o de García e colaboradores (2014) tenham observado elevada toxicidade para o composto, os valores encontrados são distintos.

Com relação à toxicidade encontrada para a sinvastatina, alguns trabalhos apontam e discutem a consequência do anti-hipertensivo para reprodução e sobrevivência de anfíbios (NEUPARTH *et al.*, 2014), os danos causados para células de peixes (ELLESAT *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2015) e, ainda, a toxicidade crônica para copépodos (DAHL *et al.*, 2006).

Já sobre o diazepam, alguns artigos identificam o impacto sobre ciclo de vida de seres vivos (MUÑOZ *et al.*, 2008) e a toxicidade aguda para cnidário (PASCOE *et al.*, 2003). De acordo com Nunes e colaboradores (2005), o diazepam apresenta CE<sub>50</sub> de 12,7 mg/L, 12,2 mg/L e 16,5 mg/L para os organismos *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* e *Tetraselmis chuii*, respectivamente. Ressalta-se que são valores de toxicidade mais elevados que aqueles identificados para *Aliivibrio fischeri* nessa pesquisa.

## 5.2 Testes de toxicidade crônica

Três dos fármacos testados nesse trabalho possuem algum grau de toxicidade para a alga marinha *Pseudokirchneriella subcapitata* em teste de 72 horas, afetando seu padrão reprodutivo, conforme tabela 3.5 a seguir.

**Tabela 3.5** - Toxicidade crônica expressa em CI (mg/L), CENO (mg/L) e CEO (mg/L) para *Pseudokirchneriella subcapitata* dos fármacos metformina, diazepam, sinvastatina e omeprazol

	Resultado CI	Limites CI		Resultado CENO e CEO	Desvio padrão CENO e CEO
		Inferior	Superior		
<b>Metformina</b>	CI <sub>20</sub> = 0,4	0,14	0,5	CENO = 0,265	0,07
	CI <sub>50</sub> = 0,69	0,52	0,76	CEO = 0,531	0,14
<b>Diazepam</b>	CI <sub>20</sub> = 2,77	1,47	3,5	CENO = 1,387	0,37
	CI <sub>50</sub> = 8,73	5,82	10,19	CEO = 2,21	0,75
<b>Sinvastatina</b>	CI <sub>20</sub> = ND <sup>1</sup>	-	-	CENO = ND <sup>1</sup>	-
	CI <sub>50</sub> = ND <sup>1</sup>	-	-	CEO = ND <sup>1</sup>	-
<b>Omeprazol</b>	CI <sub>20</sub> = 0,05	0,01	0,06	CENO = 0,027	0,01
	CI <sub>50</sub> = ND <sup>1</sup>	-	-	CEO = 0,042	0,01

<sup>1</sup>Não disponível: significa que não houve valor para essa amostra, isso é, a toxicidade encontrada foi menor que esse parâmetro

Aponta-se que a sinvastatina não é um fármaco danoso para a reprodução da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, o que pode estar relacionado à sua diminuta concentração testada. Adicionalmente, observa-se que o fármaco capaz de causar efeitos deletérios em mais baixas concentrações é o omeprazol, em que CEO é de 0,042 mg/L, seguido pela metformina (CEO = 0,531 mg/L) e o diazepam (CEO = 2,21 mg/L). Essa é uma informação relevante por demonstrar que há efeito deletério relacionado à presença de fármacos, mesmo em concentrações ambientais. De acordo com Larrison e colaboradores (2007), medicamentos são freqüentemente detectados em efluentes em níveis que variam de 1 ng/L até g/L.

Esclarece-se, ainda, que os fármacos metformina e diazepam são capazes de gerar inibição de crescimento no organismo teste a níveis que chegam a 50%. No caso da metformina, mais



tóxica que o dizepam, o  $CI_{50}$  é de apenas 0,69 mg/L. Trata-se de elevada toxicidade se comparada a outros fármacos já estudados, como a ivermectina, o qual apresenta  $CI_{50}$  de 4 mg/L para a referida alga (GARRIC, J. *et al.*, 2007).

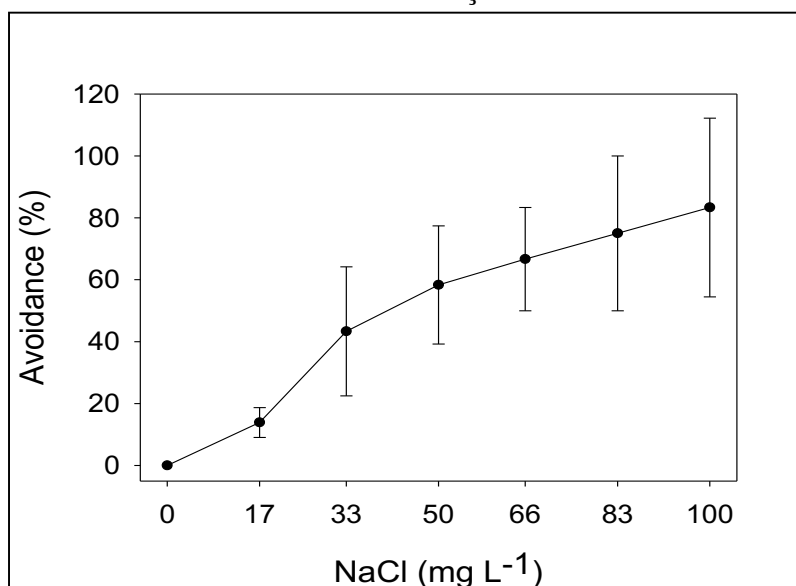
Outros testes realizados com o mesmo organismo, *Pseudokirchneriella subcapitata*, demonstram sensibilidade à contaminação por alguns fármacos, mas não de forma homogênea. Por exemplo, a alga não demonstra inibição de crescimento na presença de tamoxifeno, um medicamento usado no tratamento do câncer (ORIAS, F. *et al.*, 2015). Em contrapartida, em testes de inibição da alga na presença de diferentes antibióticos, demonstra-se sensibilidade à doxiciclina, florfenicol, oxitetraciclina, sulfamonometoxina, ciprofloxacino, metronidazol, ofloxacino, rifamicina, cefotaximina, amoxicilina e quinocetona (FU, L. *et al.*, 2017).

### 5.3 Testes de toxicidade de fuga

#### 5.3.1 Testes de fuga com cloreto de sódio

A primeira etapa da análise de fuga consistiu em realizar os testes com o composto cloreto de sódio, de forma a comparar os resultados desse trabalho com os de outros similares, realizados utilizando o mesmo aparato e condições operacionais. Observou-se que o referido sal gera resposta de fuga em peixes da espécie *Cyprinus carpio*. A Figura 3.10 permite verificar que a medida que aumenta a concentração do contaminante, aumenta também a resposta de fuga do organismo.

**Figura 3.10** - Resposta de fuga em peixes da espécie *Cyprinus carpio* induzida ao longo da concentração de NaCl em teste com 4 horas de duração



Esclarece-se que o  $CA_{50}$  do NaCl para *Cyprinus carpio* foi de 42,40 (39,25–45,52) mg/L ( $p>0,05$ ). Araujo e colaboradores (2014a), encontraram  $CA_{50}$  de 37,5 (30,4–44,2) mg/L ao avaliarem o mesmo composto em peixes da espécie *Danio rerio* em um teste de fuga com duração de 12 horas. Tal resultado, denota sensibilidade similar de *Danio rerio* se comparado à *Cyprinus carpio*, no entanto, essa comparação é dificultada pelo tempo de duração distinto entre os dois testes.

Adicionalmente, através do teste de fuga com NaCl, comprovou-se o fato de que se tratam de análises expressivamente mais sensíveis, se comparadas às tradicionais avaliações de toxicidade aguda e crônica. Estudos apontam que o  $CL_{50}$  de *Danio rerio* ao NaCl é próximo de 10000 mg/L em testes de toxicidade aguda (SANTOS, 2009; ANJOS, 2009) e de 2000 mg/L em testes de toxicidade crônica (ARENZON *et al.*, 2013). Isso significa que análises que meçam apenas a mortalidade ou indicativos dela são incompletas ao investigarem as complexas questões de contaminações ambientais.

Finalmente, apresentam-se os dados relacionados à manutenção de gradiente de concentração ao longo dos testes (Tabela 3.6). Observou-se tendência de aumento de condutividade ao final da análise, mesmo no aparato denominado branco, isso é, naquele onde não havia contaminação. Supõe-se que esse aumento se deva à excreção dos peixes no decorrer da análise, a qual acrescenta sólidos circulantes ao meio (GØRILL, 1992; MALLASEN *et al.*, 2008). Ainda, ressalta-se menor modificação de condutividade nos compartimentos onde houve maior concentração do NaCl, provavelmente em função da menor movimentação dos organismos neles ou da saturação iônica causada pelo sal em maior quantidade.

**Tabela 3.6** - Condutividade (mS/cm) antes e após realização de testes de fuga com 4 horas de duração, utilizando organismos da espécie *Cyprinus carpio*

	Concentração de NaCl (mg/L)						
	0	17	33	50	66	83	100
<b>Condutividade inicial</b>	98,6	122,4	144,2	161,3	188,6	207	261
<b>Condutividade final</b>	218	232,3	261,3	275	281	283	298
<b>Varição da condutividade (%)</b>	121	89	80	70,5	48,9	36,7	14,7
<b>Condutividade final (branco)</b>	160	159	158,8	170	160	160	162,2

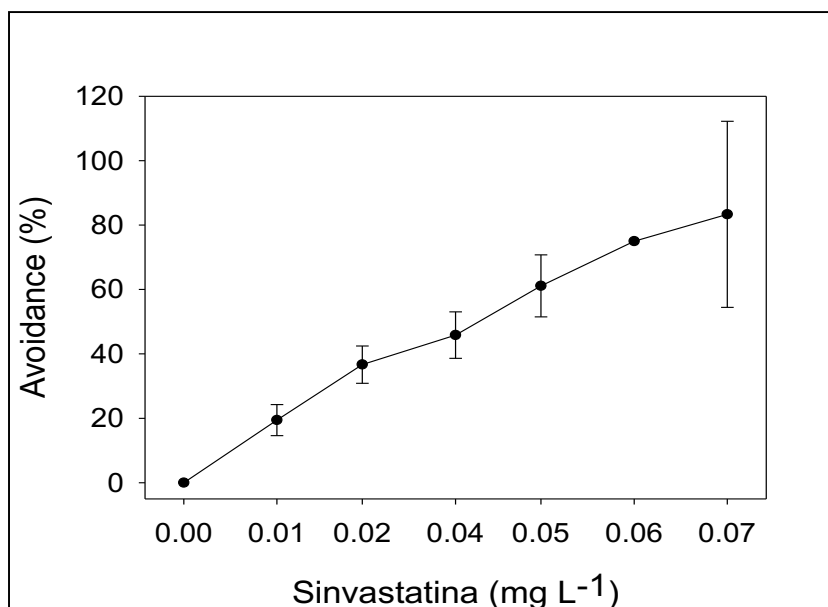
A análise dos resultados, utilizando o teste Shapiro-Wilk seguido de T de Wilcoxon, esclarece que os dados não têm distribuição normal ( $p>0,05$ ) e que há mudança significativa nos valores de condutividade se comparados os iniciais aos finais ( $p<0,05$ ). No entanto, manteve-

se diferença de concentração de NaCl entre os compartimentos durante as 4 horas de duração do procedimento, o que viabilizada e garante credibilidade ao teste de fuga. Ressalta-se que o mesmo resultado foi encontrado por Araújo e colaboradores (2014a) em teste de fuga com 4 e 12 horas de duração utilizando *Danio rerio*.

### 5.3.2 Testes de fuga com os princípios ativos em estudo

Dentre os fármacos testados, a sinvastatina é aquele que induz fuga de peixes da espécie *Cyprinus carpio* de maneira mais contundente (Figura 3.11). Em teste com 4 horas de duração, o CA<sub>50</sub> do composto foi de 31,98 (27,3–36,93) µg/L (p>0,05).

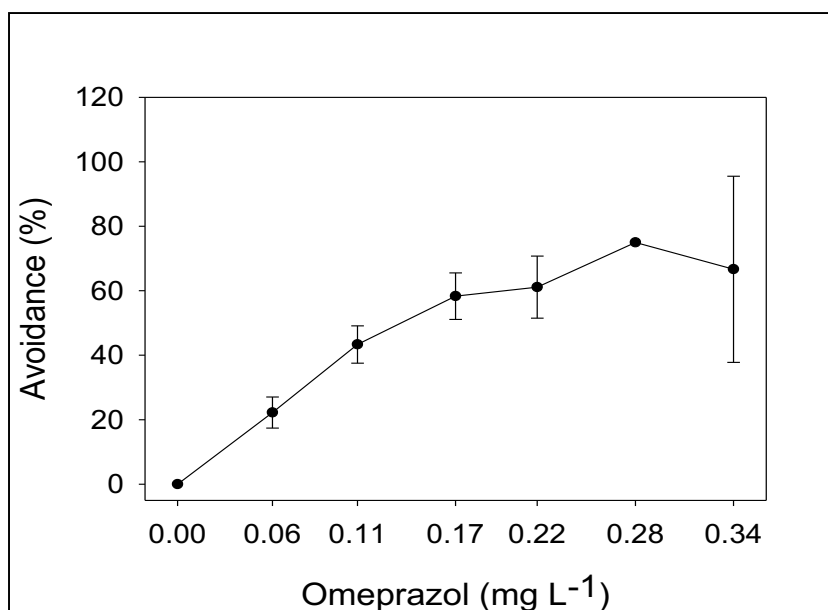
**Figura 3.11** - Resposta de fuga em peixes da espécie *Cyprinus carpio* induzida ao longo da concentração de sinvastatina em teste com 4 horas de duração



Observa-se que na mais alta concentração testada, 70 µg/L, a evasão dos indivíduos chega a 83,3%. Ainda, nota-se que mesmo na mais baixa concentração avaliada, 10 µg/L, há fuga de 19,4% dos organismos.

Resultado similar obteve-se ao analisar o fármaco omeprazol (Figura 3.12), o qual possui CA<sub>50</sub> para *Cyprinus carpio* de 144,41 (115,32–175,05) µg/L (p>0,05). Esse composto foi também capaz de induzir evasão a taxas de 75% em concentrações mais elevadas. Tal comportamento, assim como o observado na situação anterior, denota o potencial de desequilíbrio que fármacos – mesmo em baixas concentrações – podem causar em ecossistemas.

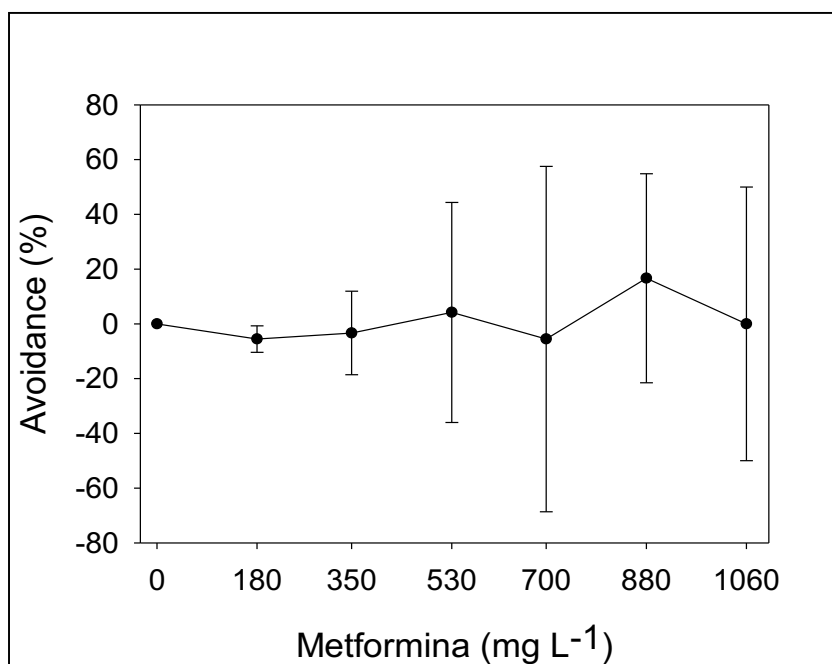
**Figura 3.12** - Resposta de fuga em peixes da espécie *Cyprinus carpio* induzida ao longo da concentração de omeprazol em teste com 4 horas de duração



Da mesma forma, outros autores observaram a tendência de evasão de organismos na presença de determinados compostos ao realizarem testes de fuga. Araujo e colaboradores (2014a) encontraram CA<sub>50</sub> de 1,1 mg/L do fungicida metanil para juvenis de *Danio rerio* em teste de 4 e 12 horas de duração. De forma similar, Rosa e colaboradores (2012) realizaram testes de fuga com o herbicida atrazina. Através dele, esclareceram que a mesma concentração do composto capaz de causar letalidade em 5% da população de *Daphnia magna* foi capaz de gerar evasão de 50% desses organismos, apontando para maior sensibilidade dos testes de fuga. Ainda, Araujo e colaboradores (2016) verificaram que mesmo baixas concentrações de cobre (0,1 a 1 µg/L) foram capazes de induzir evasão de 50% de larvas de *Litopenaeus vannamei* e de juvenis de peixes da espécie *Rachycentron canadum*.

Diferentemente do que foi observado ao analisar os fármacos sinvastatina e omeprazol, a metformina não induziu fuga de organismos, sendo impossível apontar eventual preferência dos mesmos ao final da análise (Figura 3.13). É relevante observar que dentre todos os compostos testados, a metformina foi a avaliada em maior concentração, em função da maior solubilidade do composto. Tal resultado aponta para o fato de que o potencial danoso de substâncias em organismos não tem relação direta com concentração, mas sobretudo com o modo de ação delas. Reforça esse apontamento o resultado supramencionado de que é a sinvastatina o princípio mais tóxico, sendo também ele o menos solúvel.

**Figura 3.13** - Resposta de fuga em peixes da espécie *Cyprinus carpio* induzida ao longo da concentração de metformina em teste com 4 horas de duração



Esclare-se que outros autores igualmente não reportaram resposta de fuga ao testarem substâncias químicas. Dornfeld e colaboradores (2009) não observaram qualquer evasão de larvas do inseto *Chironomus riparius*, mesmo em concentrações parcialmente letais de cobre. Ainda, em dois dos mais antigos trabalhos disponíveis envolvendo fuga, *Pygosteus pungitius* foi exposto ao álcool, clorofórmio, sulfato de cobre, formol, cloreto de mercúrico e sulfato de zinco (JONES, 1947) e *Gasterosteus aculeatus* foi exposto à amônia, sulfureto de sódio, nitrato de chumbo e sulfato de zinco (JONES, 1948), gerando resposta que variaram entre fuga, atração ao composto e, ainda, ausência de fuga.

Finalmente, o fármaco diazepam foi testado, resultando em uma resposta bastante distinta daquelas observadas anteriormente. Conforme especificado na metodologia desse capítulo, houve dois testes com o referido composto. O primeiro deles nas concentrações 69,35 mg/L; 57,56 mg/L; 45,77 mg/L; 34,67 mg/L; 22,8 mg/L; 11,79 mg/L; e 0 mg/L. Nessas condições, observou-se letalidade de todos os organismos, exceto aqueles nas concentrações de 11,79 e 0 mg/L. Haja vista essa resposta, optou-se pela realização de um novo teste em concentrações mais baixas, as quais foram 22,88 mg/L; 18,99 mg/L; 15,10 mg/L; 11,44 mg/L; 7,55 mg/L; 3,89 mg/L; e 0 mg/L.

Na segunda análise, também foi percebida mortalidade no sistema. Conforme Tabela 3.7, verificou-se distribuição bastante homogênea dos organismos nos distintos compartimentos

dos aparatos. Ao avaliar esse resultado, poder-se-ia supor tratar-se de um composto incapaz de gerar resposta de fuga, possivelmente até certa atração ao contaminante. No entanto, todos os alevinos presentes nas concentrações iguais ou superiores a 15,10 mg/L estavam mortos, correspondendo a 59,5% do total de indivíduos. Ainda, ao avaliar o teste durante sua realização, observou-se que no início do mesmo houve maciço deslocamento dos organismos para o compartimento com concentração nula de contaminante. No entanto, ao longo da análise, os peixes pareceram deixar de perceber o fármaco, deslocando-se aleatoriamente pelo aparato e morrendo naqueles pontos de mais alta concentração. Acredita-se que tal fenômeno se deva ao modo de ação do diazepam, relacionado à depressão de atividade do sistema nervoso central, através da ativação das sinapses gabaérgicas, as quais são inibitórias (BISWAS e CARLSSON, 1978). Aponta-se que, em função da concentração, essa ação inibitória se exacerba, levando ao óbito do animal.

**Tabela 3.7** – Distribuição de peixes da espécie *Cyprinus carpio* induzida ao longo da concentração de diazepam em teste com 4 horas de duração

	Concentração (mg/L)						
	0	3,89	7,55	11,44	15,1	18,99	22,88
<b>Organismos no tempo 0</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>Organismos ao final (réplica 1)</b>	2	2	0	1	4	3	2
<b>Organismos ao final (réplica 2)</b>	2	2	1	2	2	1	4
<b>Organismos ao final (réplica 3)</b>	2	2	1	0	1	2	6
<b>Total de organismos</b>	6	6	2	3	7	6	12
<b>Média de organismos</b>	2	2	0,67	1	2,33	2	4

Insta mencionar que outros autores observaram mortalidade em testes de fuga. Foi estudada a resposta de um copépodo equatoriano na presença de solução aquosa de óleo cru. Na pesquisa (ARAÚJO *et al.*, 2014b), demonstrou-se que a concentração de 19 µg/L do composto foi evitada por 30% dos organismos expostos, enquanto 25% deles exibiu letalidade. Nesse caso, demonstrou-se sensibilidade similar em termos de morte e fuga.

Por fim, salienta-se que conjuntamente com todas as análises realizadas, aconteceram testes (nas mesmas condições) em aparatos livres de qualquer contaminação, designados brancos. Nesses aparatos não foram observadas quaisquer respostas de mortalidade ou evasão dos organismos, os quais se distribuíram de forma uniforme. Esse fato confirmou ausência de interferência de fatores externos nos resultados obtidos, o que valida a pesquisa ao certificar que as respostas medidas deveram-se à presença dos fármacos, os quais foram capazes de influenciar no equilíbrio biológico dos alevinos.

## 6 CONCLUSÕES

Foram testadas as toxicidades aguda com *Aliivibrio fischeri*, crônica com *Pseudokirchneriella subcapitata* e de fuga com *Cyprinus carpio* dos fármacos metformina, diazepam, omeprazol e sinvastatina.

Em termos de toxicidade aguda, todos os compostos geraram dano em *Aliivibrio fischeri*. Nesse teste, o omeprazol apresenta-se o mais tóxico entre os princípios ativos, seguido da sinvastatina, diazepam e, finalmente, a metformina.

Já nos testes de toxicidade crônica, a sinvastatina não se apresentou tóxica, enquanto o omeprazol foi o medicamento capaz de causar efeitos deletérios em mais baixas concentrações, seguido da metformina e diazepam. Os dois últimos são capazes de gerarem inibições superiores a 50% no crescimento do organismo teste.

Finalmente, com relação aos testes de fuga, os fármacos omeprazol e, sobretudo, sinvastatina induziram resposta de evitamento nos peixes. Já com relação ao diazepam, em função do seu modo de ação, foi impossível medir a fuga dos referidos organismos. Por fim, a metformina, embora testada em concentrações mais altas, não induz fuga em *Cyprinus carpio*.

Uma discussão mais integradora dos resultados ora apresentados será realizada no último capítulo dessa tese. No entanto, menciona-se de antemão que o fármaco sinvastatina foi aquele que, de maneira em geral, gerou efeitos mais danosos. Já a metformina foi a que menos interferiu na sobrevivência e comportamento dos organismos analisados nos testes de toxicidade aguda, crônica e de fuga.

Reconhece-se, pois, o efeito toxicológico dos fármacos analisados diluídos em corpos d'água. O monitoramento da contaminação do meio ambiente por medicamentos é, portanto, aconselhável. Entretanto, muitos desafios se impõem a esse objetivo, um monitoramento completo é difícil devido ao excessivo número existente de fármacos e metabólitos, com diferentes estruturas químicas e propriedades físico-químicas. Além disso, o baixo poder de detecção dos métodos analíticos para substâncias presentes em pequena concentração dificulta a pesquisa na área.

Nesse sentido, os resultados dos estudos e ensaios ecotoxicológicos são de grande auxílio. Eles podem ser empregados como instrumentos de vigilância no acompanhamento contínuo das condições dos ecossistemas, podendo ser utilizados como marcadores cientificamente aprovados das alterações ambientais significativas. Podem convir, ainda, como instrumentos reguladores, permitindo a proibição ou liberação do uso e descarte de novos fármacos.

Adicionalmente, sabe-se que, embora sejam relevantes as análises com os princípios ativos e formulações farmacêuticas, apenas é possível uma abordagem holística ao analisar-se os efeitos de misturas. Isso é importante, uma vez que as substâncias nunca estão dispostas individualmente no ambiente.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. NBR 12648: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com algas (Chlorophyceae)*. Rio de Janeiro, 2011.

ABNT. NBR 15088: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Peixes*. Rio de Janeiro, 2011.

ABNT. NBR 15411-1: *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Rio de Janeiro, 2006.

ANJOS, K. M. G. *Investigation and Evaluation of the acute toxicity of the agricultural chemicals most used in the green belt of Natal (RN, Brasil) on the Zebra fish (Danio rerio Hamilton Buchanan-1822, Teleostei, Cyprinidae)*. Dissertação de Mestrado em Bioecologia Aquática. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Natal - RN, 2009

ARAÚJO, C. V. M. *et al.* Avoidance response of Danio rerio to a fungicide in a linear contamination gradient. *Science of the Total Environment*, v. 484, p.36-42, 2014a.

ARAÚJO, C.V.M. Contaminant as habitat disturbers: PAH-driven drift by Andean paramo stream insects. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 108, p. 89–94. 2014b.

ARAÚJO, C. V. M. *et al.* Predicting the effects of copper on local population decline of 2 marine organisms, cobia fish and whiteleg shrimp, based on avoidance response. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 35, p. 405–410, 2016.

ARENZON, A. *et al.* A determinação da toxicidade crônica para peixes baseada apenas na sobrevivência é suficiente? *Ecotoxicol. Environ. Contam.*, v. 8, n. 2, p. 65-68, 2013.

BAILEY, C.J. Metformin – an update. *Gen Pharmacol*, v. 24, p.1299-1309, 1993.

BISWAS, B.; CARLSSON, A. On the mode of action of diazepam on brain catecholamine metabolismo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 303, p. 73-78, 1978.

CALDJI, C.; DIORIO, J.; MEANEY, M. Variations in maternal care alter GABAA receptor subunit expression in brain regions associated with fear. *Neuropsychopharmacology*, v. 28, p. 1950-1959, 2003.

CEJKA, J *et al.* Simvastatin. *Acta Crystallographica*, v. 59, p. 428-430, 2003.

CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, v. 142, p. 185-194, 2003.

DAHL, U. *et al.* Application of growth related sublethal endpoints in ecotoxicological assesment using harpacticoid copepod. *Aquatic Toxicology*, v. 77, p. 433-438, 2006.

DE PAULA, N. C. P. *et al.* Biosynthesis of human diazepam and clonazepam metabolites. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, v. 25, p. 1026-1029, 2015.

- DORNFELD, C. B. *et al.* Do larvae and ovipositing *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) females avoid coppercontaminated environments? *Hum. Ecol. Risk Assess.*, v. 15, p. 63–75. 2009.
- ELLESAT, K. S.; YAZDANI, M.; HOLTH, T. F., HYLLAND, K. Species-dependent sensitivity to contaminants: An approach using primary hepatocyte cultures with three marine fish species. *Marine Environmental Research*, v. 72, p. 216-224, 2011.
- ENDO, A.; HASUMI, K. HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat. Prod. Rep.*, p. 541-550, 1993.
- FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122–159, 2006.
- FU, L. *et al.* Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action. *Chemosphere*, v. 168, p. 217-222, 2017.
- GARCÍA-SANTOS, G; KELLER-FORRER, K. Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. *Chemosphere*, v. 84, p. 651-656, 2011.
- GARRIC, J. *et al.* Effects of the parasiticide ivermectin on the cladoceran *Daphnia magna* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere*, v. 69, p. 903-910, 2007.
- GINEBREDA, A. *et al.* Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environment International*, v. 36 , p. 153-162, 2010.
- GONZALEZ, L.E.; ANDREWS, N.; FILE, S.E. 5-HT1A and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Res.*, v. 732, p. 145-153, 1996.
- GØRILL, K. Nitrogen and phosphorus excretion from the noble crayfish, *Astacus astacus* L., in relation to food type and temperature. *Aquaculture*, v. 102, p. 245-264, 1992.
- GUNNARSSON, L *et al.* Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Pharmaceutical Industry Effluent Diluted 1:500 Affects Global Gene Expression, Cytochrome P450 1A Activity, and Plasma Phosphate in Fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, n. 12, p.2639–2647, 2009.
- IMS HEALTH. *IMS word review executive™ 2014*. Londres, 2015. 202p.
- JONES, J.R.E. The reaction of *Pygosteus pungitius* L. to toxic solutions. *J Exp Biol*, v. 24, p. 110–122. 1947.
- JONES, J.R.E. A further study of the reaction of fish to toxic solutions. *J Exp Biol*, v. 25, p. 22–34. 1948.

- LARRSON, D. G. J.; PEDRO C.; PAXEUS N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of hazardous materials*, v.148, p. 751-755, 2007.
- LOPES, I.; BAIRD, D. J.; RIBEIRO, R. Avoidance of copper contamination by field populations of *Daphnia longispina*. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.23, p.1702–1708, 2004.
- LUCIS, O.J. The satatus of Metformin in Canada. *Can. Med. Assoc. J.*, v. 124, p. 24-26, 1983.
- MAHJOUB, A. E.; STAUB, C. Simultaneous determination of benzodiazepines in whole blood or serum by HPLC/DAD with a semi-micro column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 23, p.447-458, 2000.
- MALLASEN, M. *et al.* Produção de peixes em tanques-rede e a qualidade de água. *Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária*, v. 1, p. 47-51, 2008.
- MILAN, M.J. The neurobiology and control of anxious states. *Prog. Neurobiol.*, v. 70, p. 83-244, 2003.
- MOREIRA-SANTOS, M.; DONATO, C.; LOPES, I.; RIBEIRO, R. Avoidance tests with small fish: determination of the median avoidance concentration and of the lowest-observed-effect gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.27, p.1576-1582, 2008.
- NEUPARTH, T. *et al.* Hypocholesterolaemic pharmaceutical simvastatin disrupts reproduction and population growth of the amphipod *Gammarus locusta* at the ng/L range. *Aquatic Toxicology*, v. 155, p. 337-347, 2014.
- ÓRIAS, F. *et al.* Tamoxifen ecotoxicity and resulting risks for aquatic ecosystems. *Chemosphere*, v. 128, p. 79-84, 2015.
- OSCAR, B.; CROFFORD, M.D. Metformin. *The New England journal of medicine*, v. 333, p.588-589, 1995.
- QUINN, B., GAGNÉ, F., BLAISE, C. The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuate*. *Science of The Total Environment*, v. 402, p. 62-69, 2008
- RIBEIRO, S. *et al.* Toxicity screening of Diclofenac, Propranolol, Sertraline and Simvastatin using *Danio rerio* and *Paracentrotus lividus* embryo bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 114, p. 67-74, 2015.
- ROSA, R. *et al.* Scaled-up system to evaluate zooplankton spatial avoidance and the population immediate decline concentration. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.31, n. 6 , p.1301-1305, 2012.
- SACHS, G. *et al.* Gastric H.K-ATPase as therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 28, p. 269-284, 1988.
- SACHS, G. The parietal cell as a therapeutic target. *Scand. J. Gastroenterol. Supp.*, v. 118, p. 1-10, 1986.

SANTOS, P. I. M. *Avaliação da toxicidade aguda do inseticida metomil e o seu efeito sobre a atividade da acetilcolinesterase do peixe Danio rerio*. Dissertação de Mestrado em Bioecologia Aquática. Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN. Natal-RN, 2009

STERNBACH, L.H.; CROFFORD, M.D. The benzodiazepine story. *J. Med. Chem.*, v. 22, p. 1-7, 1979.

STUMVOLL, M. *et al.* Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engla. J. Med.*, v. 333, p. 550-554, 1995.

TAMBOSI, J. L. *Remoção de fármacos e avaliação de seus Produtos de degradação através de Tecnologias avançadas de tratamento*. 141f. Tese (Doutorado) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

TAYLOR, D.; SENAC, T. Human pharmaceutical products in the environment – The “problem” in perspective. *Chemosphere*, 2014.

WALLMARK, B. Omeprazole: mode of action and effect on acid secretion in animals. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl. Toxicol.*, v. 166, p. 12-18, 1989.

WEBB, S.F. A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals II: aquatic risk characterisation. In: Kummerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment*. Sources, Fate, Effects and Risks. Springer-Verlag, Berlin, p.319–343. 2001

# Capítulo 4

---

## Toxicidade aguda da mistura de fármacos

## 1. INTRODUÇÃO

Conforme já discutido em capítulos anteriores, os fármacos são substâncias largamente consumidas por humanos e animais e frequentemente atingem as ETEs e os corpos d'água. O comportamento e destino desses compostos e seus metabólitos no ambiente aquático ainda não é bem conhecido. A baixa volatilidade dos fármacos indica que sua distribuição no meio ambiente acontecerá principalmente por meio de transporte aquoso, mas também através da cadeia alimentar e dispersão (BILA; DEZOTTI, 2003).

Ora, relativamente escassos os dados científicos relacionados à contaminação de efluentes por fármacos, trabalhos que avaliam o sinergismo/antagonismo nesse contexto são ainda mais raros. Uma série de estudos exemplificam a importância de se avaliar as misturas entre as substâncias dispostas no ambiente (YANG *et al.*, 2008; GOMEZ-EYLES *et al.*, 2009; JONKER *et al.*, 2005), isso porque, embora as pesquisas geralmente se dediquem a analisar uma substância separadamente, essa não é a realidade ambiental. Compostos químicos estão sujeitos a interações e modificações, podem misturar-se e um é capaz de potencializar ou anular o efeito tóxico do outro. Em trabalho que exemplificou o potencial tóxico sinérgico/antagônico e individual de fármacos, Yang e colaboradores (2008) testaram a toxicidade de doze antibióticos: triclosan, triclocarban, roxitromicina, claritromicina, tylosin, tetraciclina, clortetraciclina, norfloxacino, sulfametazona, ciprofloxacino, sulfametazina e trimetropim; aqui dispostos em ordem crescente de toxicidade. As análises foram realizadas com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, de forma a avaliar a inibição em seu crescimento. Dentre os resultados, nota-se o importante efeito antagônico da combinação entre triclosan e norfloxacino, onde a mistura apresentou-se menos tóxica do que seus próprios componentes individualmente considerados.

Nos capítulos 2 e 3 desse trabalho foram avaliadas tanto as toxicidades dos medicamentos disponíveis na farmácia quanto dos princípios ativos desses medicamentos isoladamente considerados. Na esteira de uma abordagem holística, surge a iniciativa do capítulo 4, em que se dedicou a trabalhar com a toxicidade da mistura dos fármacos, e não apenas com cada um individualmente considerado.

## **2. OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivo geral***

Investigar a toxicidade aguda de todas as misturas possíveis entre os princípios ativos dos fármacos sinvastatina, cloridrato de metformina, diazepam e omeprazol.

### ***2.2 Objetivos específicos***

- Verificar se a mistura entre os fármacos em análise gera efeito tóxico sinérgico ou antagônico em testes de toxicidade aguda;
- Comparar o efeito tóxico das diferentes possibilidades de mistura entre os fármacos;
- Avaliar os subprodutos formados nas distintas possibilidades de mistura entre os princípios ativos em análise e discutir sua relação com os resultados de toxicidade encontrados.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.3 **Potencial toxicológico de misturas de substância dispostas no meio ambiente**

Pesquisas a respeito da toxicidade de misturas tem apresentado crescente alcance na academia. Tais pesquisas incluem estudos *in vitro* e *in vivo* (BOYD *et al.*, 2013; CEDERGREEN *et al.*, 2012 e COORS *et al.*, 2012), avaliação de toxicidade utilizando modelos de efeitos combinados (CRÉPET *et al.*, 2013, HERTZBERG *et al.*, 2013, MOSER *et al.*, 2012 e WEBSTER, 2013), análise de impactos ambientais (ALLAN *et al.*, 2012; LØKKE, 2010), estudos de avaliação de risco (JOHNSON *et al.*, 2013, LØKKE *et al.*, 2013, MEEK, 2013 e MOORE e TEED, 2013) e o exame da reatividade química no contexto de misturas complexas (GOEL *et al.*, 2013). Embora as especificidades dessas pesquisas variem, o objetivo comum é melhorar a capacidade de prever os efeitos da exposição às misturas de produtos químicos.

O interesse em pesquisar a toxicidade de misturas deve-se ao fato de que aproximadamente um terço da água doce disponível no mundo é utilizada para fins de descartes de agrícolas, industriais ou domésticos (ZITOVA *et al.*, 2009). Para o meio aquático, isto resulta no contínuo recebimento de águas residuais com diversos poluentes, o que afeta significativamente o ecossistema e a capacidade de autodepuração de corpos d'água (FARRÉ *et al.*, 2001). Nesse sentido, é importante analisar o potencial tóxico de misturas e não apenas dos contaminantes individualmente, de forma a mimetizar de forma mais fiel o que ocorre nos ecossistemas naturais.

Houtman e colaboradores (2014) realizaram pesquisa que comprovou a presença da mistura de 42 (quarenta e dois) fármacos em água potável e suas fontes na Alemanha. O conjunto de dados levantados permitiu a conclusão de que embora exista a contaminação e ela alcance a água potável, provavelmente não há riscos para saúde humana uma vez que a concentração é muito baixa. À essa mesma conclusão chegaram os autores Wen e colaboradores (2014) ao investigarem por 2 (dois) anos as águas do rio Huangpu, fonte de água potável na China. Embora a pesquisa tenha evidenciado a presença combinada dos fármacos ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ácido clofíbrico, não se acredita que haja riscos iminentes à saúde humana. Apesar do exposto, em ambos artigos consta a sugestão de que ocorram mais pesquisas que busquem esclarecer essa questão, que ainda é estudada de forma incipiente.



Embora haja dúvidas quanto aos riscos da combinação de fármacos presentes na água potável para humanos, uma série de estudos aponta para os potenciais danos relacionados às comunidades aquáticas. Buscando exemplificar essa situação, cita-se trabalho de Backhaus e colaboradores (2011), em que foi investigado o potencial tóxico para o perifíton dos fármacos fluoxetina, propranolol, triclosan, piritionato de zinco, clotrimazol e suas misturas. Foram identificados claros efeitos frente à presença da mistura dos medicamentos, mesmo quando todos os cinco componentes estavam presentes em suas concentrações de efeito não observado (CENO). Estes resultados esclarecem que, mesmo no que diz respeito as misturas de compostos química e funcionalmente diferentes, as análises de qualidade ambiental devem ser realizadas na tentativa de prever efeitos relacionados às misturas de substâncias químicas.

#### **2.4 Efeito sinérgico e antagônico de misturas de substâncias**

De acordo com Cleuvers (2005), dois diferentes conceitos são usados para prever a toxicidade de misturas e são chamados de adição de concentração (AC) e ação independente (AI). Tais conceitos, de acordo com Faust *et al.* (2003), representam hipóteses diferentes sobre a relação funcional entre a toxicidade das substâncias em ação individual e em ação combinada.

O conceito de adição de concentração parte do princípio limitado de que os componentes de uma mistura química compartilham de um mecanismo de ação comum, isto é, que cada componente apresenta a mesma interação específica com um alvo molecular no organismo-teste. De um ponto de vista mais geral, a ação similar poderia ser observada para todas as substâncias capazes de causar uma resposta toxicológica em comum, por exemplo, morte ou inibição da reprodução. De acordo com Cleuvers (2005), adição de concentração significa que substâncias aplicadas abaixo de sua concentração de nenhum efeito observado individual podem, todavia, contribuir para o efeito total da mistura. O conceito de adição de concentração pode ser descrito matematicamente por (BERENBAUM, 1985):

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{CEx_i} = 1 \quad (4.1)$$

Em que:  $c_i$  são as concentrações individuais das substâncias, em separado, presentes em uma mistura com um efeito total de  $x\%$  e  $CEx_i$  são as concentrações das substâncias, em separado, que, sozinhas, causariam o mesmo efeito  $x$  que foi observado para a mistura.

Já o conceito de ação independente, parte do princípio da ação diferente, não similar, entre os componentes de uma mistura, isto é, que os tóxicos interagem com alvos moleculares diferentes, resultando em uma resposta toxicológica comum por meio de cadeias de reações distintas em um organismo (CLEUVERS, 2003; FAUST *et al.*, 2003). Isso é, o efeito relativo de um dos tóxicos em uma mistura deveria permanecer imutável na presença de um outro. A equação que descreve o efeito de combinação que age segundo a ação independente para uma mistura binária é dada, de acordo com Cleuvers (2005), por:

$$E(c_{mis}) = 1 - [(1 - E(c_1))(1 - E(c_2))(1 - E(c_n))] \quad (4.2)$$

Em que:  $E(c_1)$ ,  $E(c_2)$  e  $E(c_n)$  são os efeitos das substâncias individuais e  $E(c_{mis})$  é o efeito total da mistura.

Esclarece-se que a mesma fórmula pode ser utilizada para misturas ternárias e quaternárias, bastando acrescentar mais termos à equação acima o que foi representado por  $E(c_n)$ .

Os modelos descritos fornecem um embasamento matemático inicial para a previsão do efeito de mistura, mas interações entre os compostos podem ocorrer. Essas interações podem levar ao desvio de um dos modelos, ou mesmo de ambos. Nesses casos, dir-se-ia que quando uma mistura de compostos químicos resulta em um efeito maior que o previsto por um dos dois modelos, essa mistura é sinérgica em relação à adição de concentração; em relação à ação independente; ou em relação a ambos os modelos. Por outro lado, se os efeitos combinados de dois compostos químicos são menores do que os preditos pelos modelos, esses efeitos são chamados de antagônicos. A metodologia para identificação de eventuais sinergismos e antagonismos foi proposta por Cedergreen em 2007.

Phyu e colaboradores (2011) avaliaram as consequências de diferentes misturas dos pesticidas atrazina, clorotalonil e permetrina para o organismo *Ceriodaphnia dubia*. Nessa pesquisa, a toxicidade da mistura clorotalonil mais atrazina resulta em efeito antagônico de acordo com o modelo de ação independente, enquanto a mistura entre a permetrina e o clorotalonil geram efeito sinérgico de acordo com o mesmo modelo. Já no que diz respeito o modelo de adição de concentração, as misturas binárias de clorotalonil mais atrazina e permetrina mais atrazina geram efeito antagônico, enquanto a mistura de clorotalonil mais permetrina gera efeito

sinérgico. De acordo com os autores, o uso do modelo de adição de concentração mostrou-se mais adequado para estimativa de toxicidade de pesticidas.

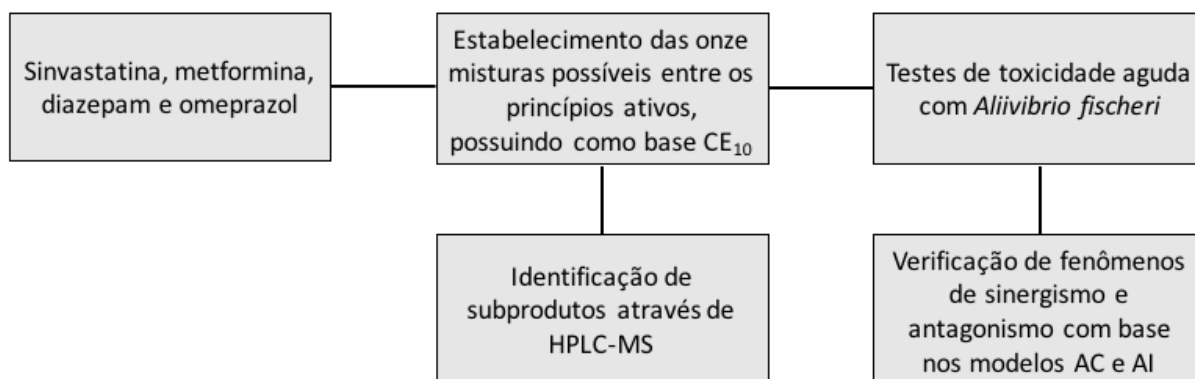
De forma similar, buscando avaliar o potencial tóxico individual e da mistura entre os fármacos ácido clofibríco, carbamazepina, propranolol, metoprolol, ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, captopril e metformina, Cleuvers (2003) realizou teste com os organismos *Daphnia magna*, *Desmodesmus subspicatus* e *Lemna minor*. Nessa pesquisa, as análises com várias combinações de produtos farmacêuticos revelaram efeitos mais tóxicos do que os esperados apenas medindo a toxicidade individual dos fármacos (sinergismo), apontando para o fato de que não é possível prever a toxicidade de misturas a partir de dados de toxicidade isolados.

Finalmente, ressalta-se a inexistência, na literatura, de trabalhos que abordem os mesmos fármacos investigados nesse trabalho. Esse fato aponta para a escassez de dados nessa seara, bem como relevância e ineditismo dessa tese de doutorado.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Na figura 4.1 são apresentadas as etapas metodológicas referentes ao capítulo 4 dessa tese.

**Figura 4.1** – Etapas do desenvolvimento metodológico



### 4.1 Condições de análise das misturas entre os fármacos

Objetivando testar eventuais efeitos sinérgicos ou antagônicos entre as misturas dos fármacos, procedeu-se com testes de toxicidade com todas as misturas possíveis entre os princípios ativos em estudo. Como são quatro os princípios ativos avaliados, existem onze possibilidades de misturas entre eles, sendo seis as possibilidades de misturas entre dois fármacos; quatro as possibilidades de misturas entre três fármacos; e uma única possibilidade de mistura entre os quatro fármacos.

Aponta-se que o teste de toxicidade selecionado foi o agudo com *Aliivibrio fischeri*, conforme será discutido a seguir. Essa escolha se deu haja vista a rapidez, facilidade e precisão da análise, possibilitando alcançar resultados confiáveis e adequados em curto espaço de tempo.

Para a avaliação de possível fenômeno de antagonismo e sinergismo, conforme será detalhado a seguir, as concentrações de misturas dos medicamentos variaram de acordo com o  $CE_{10}$  do princípio ativo para o organismo teste e do número de compostos a serem misturados (Cleuvers, 2005). Isso é, ao estabelecer-se a concentração de mistura entre dois fármacos foi utilizado o  $CE_{10}/2$  desses mesmos fármacos para o organismo teste. Da mesma forma aconteceu com as misturas entre mais compostos, em que se adotou a concentração para mistura de  $CE_{10}/3$  no caso da mistura entre três componentes e  $CE_{10}/4$  no caso da mistura entre todos eles. As diluições aconteceram em água ultrapura, imediatamente antes das análises de toxicidade.

Esclarece-se que  $CE_{10}$  significa a concentração capaz de causar efeito em 10% dos organismos. Insta esclarecer, ainda, que foi necessário realizar testes toxicológicos também com as substâncias separadamente em suas concentrações  $CE_{10/2}$ ,  $CE_{10/3}$  e  $CE_{10/4}$  para que fosse possível avaliar de forma adequada o efeito das misturas, elucidado a seguir.

#### **4.2 Testes de toxicidade aguda com *Aliivibrio fischeri***

As análises se dividiram em três etapas: a primeira delas destinada a encontrar a toxicidade dos fármacos individualmente à bactéria, a segunda com cada um dos fármacos nas suas concentrações  $CE_{10/2}$ ,  $CE_{10/3}$  e  $CE_{10/4}$  e a última com todas as misturas possíveis entre os compostos. Ainda, salienta-se que as segunda e terceira etapas foram realizadas em triplicatas.

Com relação à primeira etapa, ela foi conduzida da mesma forma que a apresentada nos capítulos 2 e 3. Isso é, o teste de toxicidade aguda foi realizado com a bactéria marinha luminescente *Aliivibrio fischeri* e de acordo com a metodologia especificada pela ABNT NBR 15411-3 (ABNT, 2006) e pelo *software* (MICROTOX<sup>®</sup> Omni Software, versão 4.1) do próprio equipamento MICROTOX<sup>®</sup>.

Já nas segunda e terceira etapas, o procedimento foi distinto, uma vez que o objetivo não foi encontrar uma concentração de efeito, mas o efeito proporcionado à bactéria em determinadas concentrações individuais ou em mistura. Nesse caso, fez-se uma adaptação do preconizado pela ABNT NBR 15411-3 (2006), ao deixar de testar várias concentrações de um mesmo composto. Nesse sentido, foi possível encontrar o efeito de uma dada concentração de substância utilizando-se as três equações que seguem. A primeira delas, permite calcular o fator de correção ( $f_{kt}$ ) a partir da intensidade luminosa medida, o qual corrige os valores iniciais de todas as amostras, antes de serem utilizados como valores de referência na determinação do decréscimo da luminescência causado, conforme segue:

$$f_{kt} = I_{kt}/I_0 \quad (1)$$

Em que  $f_{kt}$  representa o fator de correção,  $I_{kt}$  significa a intensidade da luminescência do controle após os períodos de exposição e  $I_0$  é a intensidade da luminescência da suspensão bacteriana do controle imediatamente antes da adição do diluente, em unidade relativa de luminescência

A segunda equação garante o estabelecimento dos valores corrigidos para cada uma das leituras, conforme segue:

$$I_{ct} = I_0 \times \bar{f}_{kt} \quad (4.3)$$

Em que  $\bar{f}_{kt}$  é a média de  $f_{kt}$  dos controles,  $I_0$  significa a intensidade da luminescência da suspensão bacteriana imediatamente antes da adição da amostra-teste, em unidade relativa de luminescência, e  $I_{ct}$  representa o valor de  $I_0$  corrigido.

Finalmente, o efeito da amostra sob a luminescência da bactéria pode ser calculado a partir da seguinte equação:

$$E_t = (I_{ct} - I_{kt} / I_{ct}) \times 100 \quad (4.4)$$

Em que  $E_t$  é o efeito inibitório da suspensão-teste após os períodos de exposição, expresso em porcentagem (%),  $I_{ct}$  representa o valor de  $I_0$  corrigido e  $I_{kt}$  significa a intensidade da luminescência da suspensão-teste após os períodos de exposição, em unidade relativa de luminescência.

#### **4.3 Metodologia para a análise das misturas: sinergismo e antagonismo**

De acordo com o proposto pela a literatura e discutido no item 3.2 desse capítulo, a identificação de possíveis fenômenos de sinergismo e antagonismo acontecerá a partir da comparação entre a realidade encontrada nos testes ecotoxicológicos e as repostas previstas pelos modelos AC (equação 4.1) e AI (equação 4.2). Essa é a metodologia sugerida por Cedergreen (2007) e replicada por diversos autores que buscaram estudar misturas, conforme será explorado no item de resultados e discussão e seguir.

Em seguida, a fim de se comparar os desvios dos efeitos observados na mistura em relação aos modelos de adição de concentração e de ação independente, foi utilizado o método da proporção residual de efeito (*effect residual ratio*, *ERR*), proposto por Wang e colaboradores (2010). Esse modelo foi definido como sendo uma proporção da diferença entre o efeito (E) previsto por um modelo de referência e aquele realmente observado, ambos em mesmas circunstâncias. A equação que descreve o modelo ERR é a seguinte (WANG *et al.*, 2010):

$$ERR = \frac{E_{prd} - E_{obs}}{E_{obs}} \times 100\% \quad (4.5)$$

Em que:  $E_{prd}$  e  $E_{obs}$  são, respectivamente, os valores de efeito predito pelo modelo de ação independente ou adição de concentração e os valores de efeito observado a um certo nível de concentração.

#### **4.4 Metodologia para análises no equipamento HPLC-MS**

As determinações analíticas foram realizadas utilizando o equipamento HPLC Shimadzu LC 20 A acoplado ao espectrômetro de massa Bruker Micro TOF QII com ionização por Eletrospray (ESI-MS) a uma resolução de 12000 m/z.

Utilizou-se o equipamento em tela para a verificação de eventuais subprodutos nas misturas já mencionadas (item 4.1) entre fármacos. Para tal, procedeu-se com a separação cromatográfica dos compostos utilizando a coluna de fase reversa C18 Shim-pack XR-ODS dimensões 2,0 x 50 mm. Esclarece-se que, para que os diversos compostos sejam isolados na coluna C18, há a necessidade de utilização de um solvente, no caso água (A) e metanol (B), bem como ácido fórmico a um fluxo de 0,15 mL/min. Ainda, houve a variação na composição desse solvente, objetivando-se isolar todos os compostos, mesmo que esses possuam características químicas distintas. Nesse sentido, iniciou-se a composição do solvente com 10% de B, sendo linearmente aumentada para 70% em 3 minutos, novamente linearmente aumentada para 95% em 6 minutos, permanecendo linear até 7 minutos. Após, foi linearmente diminuída até 10% de B em 10 minutos, e, finalmente, permaneceu em 10% de B até 15 minutos.

Salienta-se que, em todas as etapas mencionadas, o volume injetado das amostras no HPLC-MS foi de 20  $\mu$ L a uma temperatura de 20°C.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 *Efeitos ecotoxicológicos das misturas entre os fármacos*

De acordo com o já esclarecido na metodologia desse capítulo, é impossível discutir e avaliar os resultados de toxicidade de misturas sem testar as toxicidades individuais nas concentrações  $CE_{10}/2$ ,  $CE_{10}/3$  e  $CE_{10}/4$ , conforme tabela 4.1. Ainda, acrescentou-se na referida tabela as concentrações correspondentes ao  $CE_{10}$ , identificadas no capítulo 3 dessa tese, as quais são também necessárias para as discussões de resultados de toxicidade das misturas.

Pode-se observar que alguns dos testes dessa etapa indicaram um fenômeno denominado *hormesis*, isso é, um desvio positivo apresentado pelo organismo-teste na presença do contaminante. Ressalta-se que a detecção da *hormesis* não é sinal de que o contaminante seja benéfico ao organismo, ao contrário, pode-se estar diante de composto que se apresenta tóxico em testes de toxicidade crônica ou testes de toxicidade aguda em maior concentração (CALABRESE, 2008). Ainda segundo Calabrese (2008), a *hormesis* é considerada um mecanismo de evolução, pois trata-se de uma compensação ou resposta adaptativa dos organismos de forma a transpor um desequilíbrio provocado e evitar a extinção da espécie.

Após os testes preliminares concluídos, foi possível desenvolver as análises com as misturas, traçar as respostas previstas pelos modelos AC e AI, bem como identificar eventuais discrepâncias entre os modelos e a realidade (ERR). Os resultados estão compilados na tabela 4.2.



**Tabela 4.1** – Efeito gerado (%) para o organismo *Aliivibrio fischeri* em teste de 30 minutos em diversas concentrações

	CE <sub>10</sub>		CE <sub>10/2</sub>		CE <sub>10/3</sub>		CE <sub>10/4</sub>	
	Concentração (mg/L)	Efeito (%)	Concentração (mg/L)	Efeito (%)	Concentração (mg/L)	Efeito (%)	Concentração (mg/L)	Efeito (%)
<b>Metformina</b>	870,79	10	435,4	hormesis	290,26	hormesis	217,7	hormesis
<b>Diazepam</b>	8,69	10	4,35	6.5	2,9	4.4	2,17	hormesis
<b>Sinvastatina</b>	0,0093	10	0,005	2.7	0,0031	hormesis	0,0023	hormesis
<b>Omeprazol</b>	0,0053	10	0,003	8.3	0,0018	5.2	0,0013	hormesis

**Tabela 4.2** - Efeito identificado nos testes de toxicidade aguda com *Aliivibrio fischeri* com amostras de mistura de fármacos, inibição prevista pelos modelos AC e AI e, ainda, valores de proporções residuais de efeito (ERR)

Misturas	Efeito observado nos testes (%)	Efeito previsto pelo modelo CA (%)	ERR (%) para o modelo CA	Efeito previsto pelo modelo IA (%)	ERR (%) para o modelo IA
metformina+ sinvastatina	hormesis <sup>1</sup>	10	100	2,7	100
metformina + diazepam	hormesis <sup>1</sup>	10	100	6,5	100
metformina + omeprazol	hormesis <sup>1</sup>	10	100	8,3	100
sinvastatina + diazepam	17,13	10	41,62	9	47,46
sinvastatina + omeprazol	11,46	10	12,74	10,77	6,02
diazepam + omeprazol	14,96	10	33,15	14,26	4,68
metformina + sinvastatina + omeprazol	9,75	10	2,56	5,2	4,55
sinvastatina + omeprazol + diazepam	9,92	10	0,8	9,37	5,54
metformina + omeprazol + diazepam	10,76	10	7,06	9,37	12,92
metformina + sinvastatina + diazepam	14,06	10	28,87	4,4	68,7
sinvastatina + omeprazol + diazepam + metformina	16,23	10	38,39	0	100

<sup>1</sup> Para efeito de cálculo do ERR e do modelo AI, o fenômeno hormesis foi considerado como 0% de efeito

Com relação às misturas binárias, todas aquelas que contêm metformina geram o fenômeno *hormesis*. Salienta-se que o citado fármaco em concentração  $CE_{10}/2$  promove o mesmo efeito. Nesse sentido, pelo fato de o resultado estar abaixo do previsto pelos modelos matemáticos AC e AI, diz-se que há antagonismo. Godoy e colaboradores (2015) observaram que outra mistura binária com fármacos, propranolol e losartana potássica, comportou-se da mesma forma em testes com a macrófita *Lemna minor*.

As demais misturas binárias (sinvastatina + omeprazol, sinvastatina + diazepam e diazepam + omeprazol) apresentam toxicidade, sendo essas maiores que as previstas pelos modelos AC e AI, caracterizando sinergismo. Como nesse trabalho, Zou e colaboradores (2012) encontraram efeito sinérgico ao testarem misturas de sulfonamidas em contato com a bactéria luminescente *Photobacterium phosphoreum*. Salienta-se que a mistura entre sinvastatina e diazepam é aquela que gerou os mais altos efeitos de toxicidade para *Aliivibrio fischeri* nesse trabalho.

Já as misturas ternárias são todas tóxicas, com valores de efeito próximos aos previstos pelo modelo AC. Salienta-se que a mistura entre metformina + sinvastatina + diazepam é a que possui o mais alto valor entre as misturas ternárias, novamente colocando em evidência a interação entre sinvastatina e diazepam, que na mistura binária gerou alto efeito de toxicidade. A referida mistura ternária, bem como a amostra contendo metformina + omeprazol + diazepam, apresentam comportamento sinérgico para ambos os modelos. Já a combinação entre metformina, sinvastatina e omeprazol é sinérgica quanto ao modelo AI e correspondente ao previsto pelo AC. A última mistura ternária, sinvastatina + omeprazol + diazepam, comporta-se de forma similar ao previsto por ambos modelos matemáticos. Como nesse trabalho, Phyu e colaboradores (2011), ao testarem a toxicidade de misturas de pesticidas para o organismo *Ceriodaphnia dubia*, encontraram melhor adequação ao modelo AC em comparação ao AI e encorajaram o uso desse método sempre que houver similaridade de ação dos compostos testados.

Finalmente, apresenta-se a mistura quaternária, que gera um dos mais elevados efeitos de toxicidade desse trabalho ( $CE_{10}$  de 16,23%), mesmo que os quatro compostos presentes na amostra estejam em concentração abaixo daquela onde não há efeito observado (CENO). Ainda, essa mistura gera efeito sinérgico em comparação à ambos modelos, tal comportamento foi previsto por Cleuvers (2005), ao discutir os pressupostos do modelo AC e informar que substâncias aplicadas abaixo de sua concentração de nenhum efeito observado individual podem, todavia, contribuir para o efeito total da mistura. Resultado similar foi

encontrado por Backhaus e colaboradores (2011), em que foi investigado o potencial tóxico para o perifíton dos fármacos fluoxetina, propranolol, triclosan, piritionato de zinco, clotrimazol e suas misturas. Nesse trabalho, foram identificados claros efeitos frente à presença da mistura dos medicamentos, mesmo quando todos os cinco componentes estavam presentes em suas concentrações de efeito não observado (CENO).

Com relação à adequação dos resultados encontrados aos previstos pelos modelos AC e AI (ERR), os valores são, em maioria, próximos aos preditos, com exceção daqueles onde a mistura gera *hormesis* ou naquele onde a mistura é quaternária. A análise de dados esclarece que a grande maioria deles apresenta discrepância de apenas 0,8 a 12,92% do sugerido pelos modelos. Isso denota maior proximidade aos modelos que aquela encontrada por outros autores, como Godoy e colaboradores (2015), cujo os ERR chegam a 228%. Pode-se dizer, ainda, que os dados estão mais próximos aos previstos no modelo AC se comparado ao AI. A adequação ao modelo AC sugere que os componentes de uma mistura química compartilham de um mecanismo de ação comum, isto é, que cada componente apresenta similar interação específica com um alvo molecular no organismo-teste (BERENBAUM, 1985). Sabe-se, no entanto, que se trata de uma avaliação limitada, haja vista o fato de que mesmo havendo similitude no modo de ação dos compostos, eles podem atingir alvos moleculares em momentos distintos gerando efeitos dissonantes.

Ainda assim, nota-se que a adequação não é exata aos modelos. Isso significa que é impossível prever com precisão a toxicidade de misturas sem efetivamente realizar testes com amostras reais, dado que outros fatores, como a formação de subprodutos, podem afetar a toxicidade de misturas, conforme é descrito na literatura (CLEUVERS, 2003; YANG *et al.*, 2008; GODOY *et al.*, 2015).

Finalmente, destaca-se que o próprio NaCl, componente que gera sobrevivência e ativação do organismo teste, *Aliivibrio fischeri*, pode ter interagido com os fármacos analisados, participando em termos de antagonismo e sinergismo. Em verdade, o mesmo pode acontecer com quaisquer componentes de amostras, sejam eles sais, matéria orgânica, sólidos ou outros.

## **5.2 Identificação da formação de produtos de transformação nas misturas e a sua relação com a toxicidade**

Apresenta-se na tabela 4.3 os trinta e cinco produtos de transformação (doravante PTs) encontrados após todas as possibilidades de misturas dos fármacos.

**Tabela 4.3** – Produtos de transformação após mistura entre princípios ativos em termos de razão entre massa e carga (m/z), massa fragmentada dois (MS<sup>2</sup>), tempo de residência (TR), erro, SIGMA multiclasse (msSIGMA), fórmula química, bem como aneis e duplas ligações (rdb)

m/z	MS <sup>2</sup>	TR (minutos)	erro (ppm)	mSigma	Fórmula	rdb	Mistura
	109.0987						
109.1011	180.0898 138.1126	11.8	0	0.4	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub>	2.5	10
	122.5268						
129.0205	103.8713 91.8295	14.3	10.9	16.3	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O	3.5	6, 7
	132.0796						
149.0209	117.0552 105.0506	-10.5	5.2	15.7	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	2.5	4, 7
	135.031						
155.1046	115.0532 97.0563	12.1	-3.8	20.4	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>6</sub>	3.5	9
	117.0658						
158.1525	102.0914 92.0226	12.4	4.3	6.6	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> NO	0.5	1, 2, 7, 8
	157.0739						
171.1473	116.9694 94.0626	11	1.2	14.9	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O	1.5	1, 4
	166.1016						
180.1338	149.0206 92.0471	12.4	2.8	21.2	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	-0.5	1, 5, 6, 7, 8
	181.094						
183.0985	109.1062 98.9861	11.7	1.8	5.8	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>6</sub> O	4.5	2, 3, 9, 10
	121.0273						
185.112	98.9825 84.9573	10.91	3.7	3.2	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>6</sub> O	3.5	1
	186.9899						
193.1282	162.0789 120.0203 84.9652	11	1.7	29.5	C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	0.5	1, 3
	197.0251						
205.0802	148.9585 132.9619 96.9384	11	-4.9	13.5	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	3.5	1, 3
	109.1043						
211.0976	170.9429 205.944	12.4	-3.3	16.5	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	0.5	4, 8
	122.0577						
219.0985	182.0947 150.0289	16.2	1.6	3.4	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>6</sub> O	7.5	11
	250.0393						
223.0907	209.0689 186.9376	11.7	1.7	19.2	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>12</sub>	7.5	1, 2, 3, 9
	227.0221						
225.1941	143.1153 100.1092	14.3	4.9	15.8	C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O	2.5	4, 8
	204.9395						
239.1579	161.1593 105.0637	9.5	1.4	14.9	C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-0.5	4, 7
	202.0188						
245.0708	149.0207 121.0273	11.7	0.4	27.3	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O	13.5	1, 2, 9, 10

(1) Metformina + Sinvastatina, (2) Metformina + Diazepam, (3) Metformina + Omeprazol, (4) Sinvastatina + Diazepam, (5) Sinvastatina + Omeprazol, (6) Diazepam + Omeprazol, (7) Metformina + Sinvastatina + Omeprazol, (8) Metformina + Omeprazol + Diazepam, (9) Sinvastatina + Omeprazol + Diazepam, (10) Metformina + Sinvastatina + Diazepam, (11) Sinvastatina + Omeprazol + Metformina + Diazepam

m/z	MS <sup>2</sup>	TR (minutos)	erro (ppm)	mSigma	Fórmula	rdb	Mistura
247.1744	204.9395 165.0643 105.0637	8.5	1.8	14.3	C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	1.5	4, 5
273.1065	226.0341 181.0877 161.099	12.9	0.8	5.3	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N <sub>12</sub>	10.5	1, 7, 10
279.1566	149.0224 121.0284 98.4778	-0.9	3.8	16.3	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	6.5	4, 10
282.1989	121.0272 149.0234 219.0513	12.4	-4.7	8.2	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub>	8.5	1.5
283.1821	149.0197 121.0291 222.1071	15.5	-5.8	29.2	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O	8.5	6
284.3294	193.0865 149.0226 258.8499	-7.7	0.7	14.9	C <sub>14</sub> H <sub>42</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-4.5	, 5, 6, 7, 8, 1
287.1194	122.0591 257.0863 167.9967	16.3	1.3	17.7	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	0.5	7
293.1711	149.0218 167.034 121.0234	3.3	2.8	16.9	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	6.5	4, 7
307.1866	121.0278 148.0224 167.0316	13.6	-0.9	15.5	C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1.5	3.4
308.209	224.1167 132.0683 146.0697	11.8	-2.8	15.1	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	5.5	8
315.3136	312.3545 149.0172 227.8984	16.4	-0.7	9	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>12</sub>	10.5	9
317.1073	149.0197 121.0291 222.1071	16.5	1.5	16	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N <sub>14</sub> O	11.5	6
329.1682	296.2574 225.0427 149.0244	13.6	-0.4	15.7	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	5.5	3, 9
369.3746	324.3179 215.0959 251.1057	16.3	-0.2	11.1	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>12</sub>	0.5	7
398.2076	211.091 103.0403 195.0945	11.8	-0.5	12.3	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>12</sub>	10.5	8
453.3379	326.2745 210.1474 100.112	10.5	3.6	7.2	C <sub>19</sub> H <sub>45</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	0.5	8
475.3176	454.3377 337.2231 246.6455	10.5	-2	16.3	C <sub>27</sub> H <sub>43</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	7.5	8

(1) Metformina + Sinvastatina, (2) Metformina + Diazepam, (3) Metformina + Omeprazol, (4) Sinvastatina + Diazepam, (5) Sinvastatina + Omeprazol, (6) Diazepam + Omeprazol, (7) Metformina + Sinvastatina + Omeprazol, (8) Metformina + Omeprazol + Diazepam, (9) Sinvastatina + Omeprazol + Diazepam, (10) Metformina + Sinvastatina + Diazepam, (11) Sinvastatina + Omeprazol + Metformina + Diazepam

Observou-se o surgimento de subprodutos a partir das misturas em análise, muitos desses compostos comuns a várias dessas misturas. São exemplos o  $C_9H_{20}NO$ ,  $C_6H_{11}N_6O$ ,  $C_{16}H_9N_2O$ ,  $C_4H_7N_{12}$ , e, especialmente, o  $C_6H_{18}N_3O_3$  e  $C_{14}H_{42}N_3O_2$ . Essa similaridade é esperada, uma vez que os precursores das doze misturas foram os mesmos quatro fármacos. Baseando-se nesse resultado, esperar-se-ia resultados de toxicidade homogêneos, o que não aconteceu.

Uma possível explicação para os resultados de toxicidade bastante heterogêneos é a presença de PTs infrequentes, que se apresentaram em apenas uma ou duas amostras. Como se observa, foram encontrados quatorze insuetos que não se repetiram em quaisquer das outras amostras.

Por exemplo, as misturas sinvastatina + diazepam e metformina + omeprazol + diazepam apresentaram um aumento em sua toxicidade se comparado às substâncias isoladas. Tal fato pode ser explicado devido à presença do PT  $C_{13}H_{25}N_2O$ , que se apresentou em concentração significativa em ambas as amostras, e apenas nelas.

Outro exemplo é a mistura contendo metformina + sinvastatina + diazepam, que gerou os maiores resultados de toxicidade. Nessa amostra, foram encontrados os compostos  $C_8H_{13}$ ,  $C_8H_{15}$ ,  $C_6H_{11}N_6O$  e  $C_{16}H_9N_2O$ . Dentre esses, os subprodutos  $C_8H_{13}$  e  $C_8H_{15}$  somente foram encontrados nesta mistura, sugerindo possível correlação entre a presença desses compostos e o potencial tóxico da amostra em questão.

Finalmente, discute-se a mistura quaternária, que apresenta um dos maiores efeitos de toxicidade dentre as amostras avaliadas. Nessa mistura, foi observada a elevada presença de  $C_9H_{11}N_6O$ , somente identificado nesta amostra. Sendo assim, acredita-se que esse subproduto possa estar relacionado à toxicidade da mistura em questão.

Sabe-se que mais testes são necessários para a efetiva confirmação das razões pelas quais algumas misturas apresentam-se mais tóxicas que outras. Apesar disso, a identificação de subprodutos confirmada a partir desse trabalho esclarece que quando duas substâncias químicas são combinadas, outros compostos são gerados, os quais passam a interferir na sobrevivência de organismos vivos. Outros autores (HASSOLD e BACKHAUS, 2014; SANTOS *et al.*, 2014; LONG *et al.*, 2016) trazem a mesma discussão à lume, apontando para os efeitos tóxicos de subprodutos formados a partir de misturas ou de processos de degradação.

## 6 CONCLUSÕES

O efeito de toxicidade aguda dos fármacos diazepam, metformina, omeprazol e sinvastatina foram medidos para o organismo *Aliivibrio fischeri* em todas as suas misturas possíveis. Ao proceder com as análises, foram encontrados fenômenos como o sinergismo, antagonismo e *hormesis*. Ainda, uma série de produtos de transformação foram localizados nessas soluções, os quais podem interferir diretamente na toxicidade delas. Insta ressaltar que mesmo quando os compostos estão em concentração abaixo da concentração de efeito não observado (CENO), pode haver toxicidade da mistura.

Os resultados indicam que embora modelos matemáticos que prevejam a toxicidade de misturas sejam importantes ferramentas de gestão, eles são incompletos para tratar os mais diversos fenômenos possíveis, que ocorrem em função da formação de subprodutos de mistura e metabólitos. Esse capítulo aponta para a urgência de que mais estudos envolvendo misturas aconteçam, já que compostos químicos estão sujeitos a interações e modificações, podem misturar-se e um é capaz de potencializar ou anular o efeito tóxico do outro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, S. E.; SMITH, B. W.; TANGUARY, R. L.; ANDERSON, K. A. Bridging environmental mixtures and toxic effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 31, p.2877-2887, 2012.
- BACKHAUS, T. *et al.* Single-substance and mixture toxicity of five pharmaceuticals and personal care products to marine periphyton communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 30, p. 2030-2040, 2011.
- BERENBAUM, M. C. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *Journal of Theoretical Biology*, v. 114, p. 413-431, 1985.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v.26, n4, p.523-530, 2003.
- BOYD, J.; VRANA, J. A.; WILLIAM, H. N. In vitro approach to predict post-translational phosphorylation response to mixtures. *Toxicology*, v. 313, p. 113-121, 2013.
- CALABRESE, E. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* V.27. n. 7. P.1451-1474. 2008.
- CEDERGREEN, N. *et al.* Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 26, n. 1, p. 149-156, 2007.
- CEDERGREEN, N.; SØRENSEN, H.; SYENSEN, C.; ANDERSON, K. A. Can the joint effect of ternary mixtures be predicted from binary mixture toxicity results? *Sci. Total Environ.*, p.427-428, 2012.
- CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, v. 142, p. 185-194, 2003.
- CLEUVERS, M. Initial risk assessment for three  $\beta$ -blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere*, v. 59, p.199-205, 2005.
- COORS, A. *et al.* Mixture toxicity of wood preservative products in the fish embryo toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 31, p.1239-1248, 2012.
- CRÉPET, A. *et al.* The PERICLES research program: an integrated approach to characterize the combined effects of mixtures of pesticide residues to which the French population is exposed. *Toxicology*, v. 313, p.83-93, 2013.
- FARRÉ, M. *et al.* Toxicity assessment of organic pollution in wastewaters using a bacterial biosensor. *Analytica Chimica Acta*, v. 426, p.155-165, 2001.
- FAUST, M. *et al.* Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology*, v. 63, p. 43-63, 2003.
- GODOY, A. A. *et al.* Ecotoxicological evaluation of propranolol hydrochloride and losartan potassium to *Lemna minor* L. (1753) individually and in binary mixtures. *Ecotoxicology*, v. 21, p.1112-1123, 2015.



- GOEL, S. *et al.* Exposure profiling of reactive compounds in complex mixtures. *Toxicology*, v. 313, p.145-150, 2013
- GOMEZ-EYLES, J. L.; SVENDSEN, C.; LISTER, L.; MARTIN, H.; HODSON, M. E.; SPURGEON, D. J. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, p.71-79, p. 71-79.
- HASSOLD, E.; BACKHAUS, T. The predictability of mixture toxicity of demethylase inhibiting fungicides to *Daphnia magna* depends on life-cycle parameters, *Aquatic Toxicity*, v. 152, p. 205-2014, 2014.
- HERTZBERG, R. C. *et al.* A four-step approach to evaluate mixtures for consistency with dose addition. *Toxicology*, v. 313, p.133-144, 2013
- HOUTMAN, C. J. *et al.* Human health risk assessment of the mixture of pharmaceuticals in Dutch drinking water and its sources based on frequent monitoring data. *Science of the Total Environment*, v. 496, p. 54-62, 2014.
- JOHNSON, L. A. *et al.* Interactive effect of pesticide mixtures: predators and environmental regimes on the toxicity of two pesticides to red-eyed tree frog larvae. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 32, p. 2379-2386, 2013.
- JONKER, M. J. *et al.* Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 24, 2005, p. 2701-2713.
- LØKKE, H. Novel methods for integrated risk assessment of cumulative stressors—results from the NoMiracle Project. *Sci. Total Environ.*, v. 408, p.3719-3724, 2010.
- LØKKE, H.; RAGAS, M.J.; HOMSTRUP, M. Tools and perspectives for assessing chemical mixtures and multiple stressors. *Toxicology*, v. 313, p.73-82, 2013.
- LONG, X. *et al.* The mixture toxicity of environmental contaminants containing sulfonamides and other antibiotics in *Escherichia coli*: Differences in both the special target proteins of individual chemicals and their effective combined concentration, *Chemosphere*, v. 158, p. 193-203, 2016.
- MEEK, M. E. International experience in addressing combined exposures: increasing the efficiency of assessment. *Toxicology*, v. 313, p.185-189, 2013
- MOORE, D. R. F.; TEED, R. S. Risks of carbamate and organophosphate pesticide mixtures to salmon in the Pacific northwest. *Integr. Environ. Assess. Mgmt.*, v. 9, p.70-78, 2013
- MOSER, V. C. *et al.* Impact of chemical proportions on the acute neurotoxicity of a mixture of seven carbamates in preweanling and adult rats. *Toxicol. Sci.*, v. 129, p.126-134, 2012.
- PHYU, Y. L. *et al.* A comparison of mixture toxicity assessment: Examining the chronic toxicity of atrazine, permethrin and chlorothalonil in mixtures to *Ceriodaphnia dubia*. *Chemosphere*, v. 85, n. 10, p. 1568-1573, 2011.

SANTOS, L. V. S. *et al.* Evaluation of the aerobic and anaerobic biodegradability of the antibiotic norfloxacin, *Water Science and technology*, v. 70, p. 265-271, 2014.

WANG, L.J. *et al.* A new effect residual ratio (ERR) method for the validation of the concentration addition and independent action models. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 17, p. 1080-1089, 2010.

WEBSTER, T. F. Mixtures of endocrine disruptors: how similar must mechanisms be for concentration addition to apply? *Toxicology*, v. 313, p.94-102, 2013

WEN, Z. *et al.* Occurrence and human health risk of wastewater-derived pharmaceuticals in a drinking water source for Shanghai, East China. *Science of the Total Environment*, v. 490, p. 987-993, 2014.

YANG, L *et al.* Growth-inhibition effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 27, n.5, p. 1201-1208, 2008.

ZITOVA, A. *et al.* Toxicological profiling of chemical and environmental samples using panels of test organisms and optical oxygen respirometry. *Environmental Toxicology*, v. 24, p.116-127, 2009.

ZOU, X. *et al.* The joint effects of sulfonamides and their potentiators on *Photobacterium phosphoreum*: Differences between the acute and chronic mixture toxicity mechanisms. *Chemosphere*, v. 86, n. 1, p. 30-35, 2016.

# Capítulo 5

---

Discussão de resultados e conclusão final

# 1 INTRODUÇÃO

Antes da década de 90 do século passado, quaisquer esforços no intuito de detectar a presença de fármacos no meio ambiente encontrariam limitações relacionadas à insuficiência de instrumentos analíticos com eficiência que permitisse a identificação de compostos químicos ou outras substâncias em baixas concentrações (DAUGHTON; TERNES, 1999). Sendo assim, a investigação extensiva da ocorrência de fármacos no ambiente iniciou-se apenas na década de 1990, quando passou a ser possível a identificação desses compostos, que foram localizados em matrizes aquosas em concentrações de ng/L ou µg/L (LÖFFLER *et al.*, 2005). Atualmente, com o rápido desenvolvimento de instrumentos analíticos altamente sensíveis e automatizados, grande número de fármacos tem sido detectado em esgotos, efluentes industriais, águas superficiais, subterrâneas e mesmo potável (CARDOSO; PORCHER; SANCHEZ, 2014; HEBERER, 2002).

Em função do referido fato, motivador da tese, nos capítulos 2, 3 e 4 desse documento foram expostas técnicas que permitiram avaliar o potencial toxicológico dos fármacos sinvastatina, cloridrato de metformina, diazepam e omeprazol em contato com os organismos aquáticos *Aliivibrio fischeri*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Cyprinus carpio*. Esses fármacos foram avaliados de três formas: as formulações disponíveis na farmácia, os princípios ativos isolados e as diversas possibilidades de mistura desses princípios ativos. A partir dessa abordagem completa, pôde-se observar o quão complexas podem ser a presença e as consequências da presença desses compostos em corpos d'água e efluentes.

Nesse sentido, através desse capítulo busca-se resgatar os resultados expostos, apresentando a discussão dos mesmos em uma abordagem integradora, a qual permitirá expor as conclusões finais dessa pesquisa.

## 2 ANÁLISE DE RESULTADOS

### 2.1 Avaliação integradora dos resultados apresentados nos capítulos anteriores

Três dos capítulos anteriores dessa tese compuseram-se de itens onde houve discussões de resultados gerados. No capítulo 2, avaliaram-se dez medicamentos em três distintas formulações. Essas análises permitiram concluir que não são apenas os princípios ativos os compostos que influenciam na toxicidade de formulações farmacêuticas. Chegou-se a essa conclusão a partir do fato de que os potenciais danosos dos fármacos eram distintos, mesmo em situações onde a concentração do princípio ativo fosse a mesma.

A partir do referido capítulo, selecionaram-se os fármacos a serem detalhados, os quais foram estudados no restante da tese. Nesse sentido, os resultados relacionados aos compostos metformina, sinvastatina, omeprazol e diazepam estão compilados na Quadro 5.1.

**Quadro 5.1** – Resultados de análises de toxicidade aguda, crônica e de fuga dos fármacos metformina, sinvastatina, omeprazol e diazepam

<b>Fármaco</b>	<b>Toxicidade das formulações farmacêuticas</b>	<b>Toxicidade aguda</b> ( <i>Aliivibrio fischeri</i> )	<b>Toxicidade crônica</b> ( <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> )	<b>Resposta de fuga</b> ( <i>Cyprinus carpio</i> )
<b>Metformina</b>	Apenas uma, o genérico, é tóxica. CE <sub>50</sub> equivalente a 19,26% da concentração	CE <sub>10</sub> 870,79 mg/L	CI <sub>20</sub> 0,4 mg/L	Não induz fuga
<b>Sinvastatina</b>	Duas formulações, referência e genérico, tóxicas. CE <sub>50</sub> médio de 34,51% da concentração	CE <sub>10</sub> 0,0093 mg/L	Não tóxico	CA <sub>50</sub> 0,032 mg/L
<b>Omeprazol</b>	Todas as formulações tóxicas, com CE <sub>50</sub> médio de 15,44% da concentração	CE <sub>10</sub> 0,0053 mg/L	CI <sub>20</sub> 0,05 mg/L	CA <sub>50</sub> 0,144 mg/L
<b>Diazepam</b>	Apenas o genérico é tóxico, com CE <sub>50</sub> de 39,58% da concentração	CE <sub>10</sub> 8,69 mg/L	CI <sub>20</sub> 2,77 mg/L	Alta mortalidade

Os resultados expostos esclarecem que todos os fármacos estudados apresentam algum potencial danoso para organismos aquáticos, o que foi medido a partir de testes de toxicidade. Além dessa, outras conclusões importantes podem ser referidas, as quais serão citadas a seguir.

Os fármacos omeprazol e diazepam foram aqueles que geraram algum tipo de resposta em todos os testes efetuados, sobremaneira o omeprazol, em que as concentrações de efeito são ainda mais baixas que as observadas para o diazepam.

Ainda, há de se ressaltar a metformina, que embora não resulte em efeito expressivo, é um dos compostos que gera efeitos de toxicidade crônica em mais baixas concentrações. Vale mencionar que o referido fármaco é aquele que apresenta mais alta solubilidade, o que aponta para o fato de que, não obrigatoriamente os compostos mais solúveis serão aqueles a gerarem maior efeito danoso aos organismos aquáticos.

Finalmente, a sinvastatina foi a substância capaz de induzir fuga em *Cyprinus carpio* e, especialmente, gerar efeito agudo em *Aliivibrio fischeri* em mais baixas concentrações, embora não tenha resultado em dano de natureza alguma em teste de toxicidade crônica com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. A situação apontada é inusual, na medida em que testes de toxicidade crônica costumam ser mais sensíveis que os de toxicidade aguda (COSTA *et al.*, 2008). O mesmo com relação aos testes de fuga, em que se espera medir maior sensibilidade dos organismos (ARAÚJO *et al.*, 2014). Apesar disso, esclarece-se que efetuar comparações entre os três testes é ímprobo, já que se tratam de organismos distintos, os quais possuem sensibilidade diferente. Apenas seria possível efetivar tal contraposição caso a mesma espécie fosse testada nos três tipos de análise. Citando caso análogo ao observado com a sinvastatina, menciona-se o omeprazol, em que as concentrações mais baixas a gerarem efeito foram encontradas em testes de toxicidade aguda.

Adicionalmente, em uma abordagem comparativa, discutem-se os resultados gerados no capítulo 2, em que se confirmou o potencial tóxico de dois excipientes farmacêuticos, o dióxido de titânio e o manitol, em contato com a bactéria *Aliivibrio fischeri*. Ao comparar tais respostas às expostas no quadro 5.1 e àquelas dispostas no capítulo 3, nota-se que, enquanto o manitol é capaz de afetar a sobrevivência de 50% das bactérias em concentrações de 35,34 mg/L, os fármacos metformina, diazepam e sinvastatina não alcançam esse efeito. Sabe-se, ainda, que no que tange à sinvastatina e o omeprazol, isso pode estar relacionado à baixa solubilidade dos compostos se comparados ao manitol. Ainda assim, trata-se de resultado relevante, que aponta para o potencial nocivo de excipientes. Tal hipótese também foi confirmada em testes com o dióxido de titânio, o qual exibiu maior toxicidade que a metformina e o diazepam ao proporcionar 20% de efeito em *Aliivibrio fischeri* em

concentrações de 10 mg/L. Essas análises corroboram com o discutido no capítulo 2 e com o encontrado por outros autores, que compararam a toxicidade de princípios ativos com aquelas de excipientes em herbicidas, encontrando maior potencial nocivo nos primeiros (SURGAN *et al.*, 2010; BEGGEL *et al.*, 2010).

Complementarmente, a despeito dos dados evidenciados no quadro 5.1, destaca-se a imprevisibilidade de efeito de fármacos quando dispostos no meio ambiente, situação em que misturam-se entre si e com outros compostos, o que pode anular ou potencializar seus efeitos (YANG *et al.*, 2008). Esse fenômeno foi discutido no capítulo 4, quando se observou que em misturas binárias com a metformina, o efeito dos fármacos foi reduzido. Em contrapartida, ao combinar sinvastatina com diazepam, omeprazol com diazepam ou, ainda, todos os quatro fármacos, houve representativo aumento de efeito.

A partir da discussão exposta, sublinha-se o fato de que o comportamento desses fármacos não foi idêntico ou similar e gerou resultados distintos no contato com os diferentes organismos. Acredita-se que isso deva-se aos modos de ação desses compostos, os quais são apresentados no quadro 5.2.

**Quadro 5.2** – Quadro resumo contendo o modo de ação dos fármacos diazepam, sinvastatina, omeprazol e diazepam em seres humanos

<b>Fármaco</b>	<b>Toxicidade das formulações farmacêuticas</b>	<b>Referência</b>
<b>Metformina</b>	Altera o metabolismo energético da célula, inibindo a gliconeogênese e aumentando a sensibilidade ao hormônio insulina. Isso, através da inibição do glucagon e estímulo à ação das quinases.	PERNICOVA e BONOMITS, 2014.
<b>Sinvastatina</b>	Atuação na via metabólica responsável pela sintetização de mais de 50% do colesterol, inibindo a atuação da enzima HMC-Co (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima).	CEJKA <i>et al.</i> , 2003
<b>Omeprazol</b>	Inibe a secreção gástrica, alterando a atividade da enzima H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase, relacionada a etapa final da secreção ácida em células parietais gástricas.	SACHS, G. 1986; SACHS, G. <i>et al.</i> , 1988; WALLMARK, B. 1989
<b>Diazepam</b>	Depressão de atividade do sistema nervoso central, através da ativação das sinapses gabaérgicas. Gera decréscimo na renovação do neurotransmissor dopamina, precursor da adrenalina e noradrenalina.	BISWAS e CARLSSON, 1978; TAYLOR e LAVERT, 1969.

Salienta-se que os modos de ação expostos no quadro 5.2 são aqueles observados em humanos. Em outros organismos que possam ter contato com as substâncias em função da contaminação ambiental, os efeitos são imprevisíveis (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

Finalmente, destaca-se a relevância dessa pesquisa ao encontrar efeitos de toxicidade em concentrações ambientalmente relevantes. Lapworth e colaboradores (2012), bem como Löffler e colaboradores (2015), reportam que fármacos são encontrados em matrizes aquosas, tais como esgotos, efluentes industriais, águas superficiais, subterrâneas e mesmo potável, em concentrações de ng/L ou µg/L. Com relação à sinvastatina, por exemplo, o efeito agudo em 10% dos indivíduos foi observado na concentração de apenas 9 µg/L e, no caso do omeprazol, o mesmo foi encontrando em 5 µg/L.

Apesar do exposto, convida-se ao esclarecimento de que os fármacos pesquisados são encontrados no meio ambiente em concentrações ainda mais baixas que aquelas que geraram algum efeito tóxico nesse trabalho. A metformina, por exemplo, esteve presente em concentrações entre 122–141 µg/L em esgotos na Holanda (OOSTERHUIS *et al.*, 2013) e 56,8 µg/L em águas residuais alemãs (TRAUTWEIN e KÜMMERER, 2011). Quanto ao diazepam, ele foi encontrado na concentração de 9 ng/L em esgoto no Reino Unido (BAKER e KASPRZYK-HORDERN, 2013). Já o omeprazol teve seus metabólitos mensurados em esgotos na concentração de 0,06–6,27 ng/L (BOLEDA *et al.*, 2013; GRACIA-LOR *et al.*, 2014). Finalmente, cita-se a sinvastatina, encontrada na concentração de 1,26-1,56 µg/L em esgotos americanos (OTTMAR *et al.*, 2012). Ressalta-se que tais apontamentos não reduzem a importância das discussões efetuadas nesse documento, uma vez que o consumo de medicamentos é crescente e muitos países ainda não fizeram qualquer monitoramento dessa natureza em suas águas. Ademais, o objetivo dessa pesquisa não foi testar concentrações ambientalmente relevantes, mas fomentar o conhecimento acadêmico no que tange a toxicidade de fármacos.

## **2.2 Verificação das hipóteses da pesquisa**

Conforme apresentado no capítulo 1 desse trabalho, seguem as hipóteses dessa tese:



- Princípios ativos não são os únicos compostos a atribuírem toxicidade às formulações farmacêuticas;
- Fármacos de diferentes classes são tóxicos para distintos organismos presentes no ecossistema, sendo assim, sua presença enquanto contaminante interfere na homeostase ambiental;
- Misturas entre princípios ativos de fármacos distintos podem exibir comportamento sinérgico ou antagônico de acordo com os modelos de adição de concentração e ação independente.

Observou-se, portanto, que todas elas foram confirmadas. Através do capítulo 2, discutiu-se que mesmo quando os princípios ativos de determinado fármaco estão na mesma concentração em distintas formulações farmacêuticas, há diferença de toxicidade. Isso quer dizer que outros compostos também são capazes de interferir na sobrevivência de organismos. Essa avaliação foi referendada ao verificar-se que excipientes são tóxicos, a citar o dióxido de titânio e o manitol.

Já no capítulo 3, notou-se que fármacos de classes distintas foram capazes de gerar efeitos tóxicos agudos e crônicos e, ainda, provocarem evasão de indivíduos, interferindo, portanto, na homeostase ambiental. As classes avaliadas foram anti-diabético, anti-hipertensivo, ansiolítico e regulador de pH gástrico, as quais não se comportaram de forma igual nos testes, mas geraram interferências expressivas nos organismos em análise. Salienta-se que a influência em organismos tão distintos – produtores primários, decompositores e consumidores –, denota a amplitude de ação desse tipo de contaminação no meio ambiente.

Finalmente, o capítulo 4 confirma a última das hipóteses desse trabalho ao ratificar que fármacos quando em mistura podem exibir efeitos sinérgicos e antagônicos se comparados aos modelos matemáticos AC e IA. Ainda, discute-se que embora modelos que prevejam comportamento de mistura sejam valiosos para gestão ambiental, são incapazes de antecipar com exatidão o comportamento de substâncias em contato com as outras. Ainda, aponta-se que essa é a realidade dos ecossistemas, nos quais compostos interagem, podendo intensificar ou nulificar o efeito de outros.

### 3 CONCLUSÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

Uma série de trabalhos aponta a presença de fármacos de diversas classes em corpos d'água, esgotos e mesmo água potável ao redor do mundo. Mesmo países desenvolvidos, com reconhecida capacidade de depuração de efluentes, mostram-se incapazes de removerem medicamentos de águas residuárias. Essa contaminação, quantitativa e qualitativamente relevante, traz uma gama de consequências para o equilíbrio ambiental. Através desse trabalho, confirmou-se que não apenas fármacos, mas também excipientes, podem ser capazes de gerar desequilíbrio ao resultarem em efeitos agudos, crônicos e, ainda, provocarem evasão de indivíduos. Adicionalmente, esclareceu-se a imprevisibilidade da interação de fármacos quando em misturas.

Nesse sentido, não restam dúvidas de que a presença dos contaminantes emergentes em matrizes aquosas não deve ser negligenciada. Ainda, não basta que esse assunto seja tema de pesquisas, embora isso já seja relevante. É preciso que a dimensão do problema atinja as entidades gestoras, que serão capazes de adotar medidas efetivas para reversão desse cenário de tamanha complexidade.

Finalmente, ressalta-se a importância de que outras pesquisas, abrangentes como essa, sejam conduzidas. Nesse sentido, seguem algumas recomendações proporcionadas pela avaliação desse trabalho:

- Essa tese foi conduzida com quatro princípios ativos e dez diferentes tipos de formulações farmacêuticas. Sabe-se da infinidade de medicamentos e compostos disponíveis hoje no mercado, representando essa pesquisa uma pequena amostra da realidade. Nesse sentido, aponta-se a importância de que outros fármacos sejam avaliados quanto ao seu potencial de gerar efeitos tóxicos crônicos e agudos, sobretudo quando misturados;
- No que tange à seleção de organismos-teste, optou-se por avaliar o comportamento de alevinos, bactérias e algas, isso é consumidores, decompositores e produtores. Tratam-se de opções relevantes no cenário da ecotoxicologia, mas que representam algumas dentre as incontáveis possibilidades. Nesse sentido, sugere-se que análises como essa sejam realizadas com outros organismos e de outras classes;
- Os testes de fuga em meio aquoso representam uma modalidade inovadora e muito raramente realizada no ramo da ecotoxicologia. Sublinha-se a necessidade de que sejam

análises realizadas com mais frequência e com outros compostos, por tratar-se de uma abordagem bastante realista. Os organismos, em um ecossistema, fogem de condições adversas antes de morrerem. É importante que o meio acadêmico difunda que morte e evasão representam o mesmo problema do ponto de vista ambiental;

- Os resultados desse trabalho, no que tange à toxicidade de excipientes, ilustram o equívoco em testar-se apenas princípios ativos. É importante que outras formulações, como cosméticos e pesticidas, passem por mais pesquisas que permitam discutir o potencial tóxico não apenas dos componentes principais, mas também daqueles incorretamente denominados inertes ou secundários;
- Os resultados dessa tese evidenciaram a necessidade de investigação mais precisa da presença de fármacos em matrizes aquosas. É importante mensurar esses medicamentos em amostras ambientais, de forma a apontar sua presença e quantidade nos corpos d'água e efluentes. Enfatiza-se a grande quantidade de países que nunca tiveram suas águas submetidas a tal avaliação;
- Finalmente, é importante a condução de estudos que busquem esclarecer o comportamento de medicamentos ao passarem pelos processos de tratamento peculiares às estações de tratamento de água e esgoto. Tais processos geram metabólitos, que carecem de estudos do ponto de vista da ecotoxicologia, em uma abordagem completa do comportamento desses compostos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, C. V. M. *et al.* Avoidance response of *Danio rerio* to a fungicide in a linear contamination gradient. *Science of the Total Environment*, v. 484, p.36-42, 2014.
- BAKER, D. R.; KASPRZYK-HORDERN, B. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. *Science of the total environment*, v. 454, p. 442-456, 2013.
- BEGGEL, S; WERNER, I; CONNON, R E.; GEIST, J. P. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Science of Total Environmental*, v. 408, p.3169-3175, 2010.
- BISWAS, B.; CARLSSON, A. On the mode of action of diazepam on brain catecholamine metabolism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 303, p. 73-78, 1978.
- BOLEDA, M. R. *et al.* Validation and uncertainty estimation of a multiresidue method for pharmaceuticals in surface and treated waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 1286, p. 146–158, 2013.
- CARDOSO, O.; PORCHER, J.M.; SANCHEZ, W. Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: Review of evidence and need for knowledge. *Chemosphere*, 2014.
- CEJKA, J *et al.* Simvastatin. *Acta Crystallographica*, v. 59, p. 428-430, 2003.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova*, v. 31, n. 7, p.1820-1830, 2008.
- DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health and Perspectives*, v. 107, p. 907-938, 1999.
- FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122–159, 2006.
- GRACIA-LOR, E. *et al.* Investigation of pharmaceutical metabolites in environmental waters by LC-MS/MS. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v. 21, p. 5496–5510, 2014.
- LAPWORTH, D. J. *et al.* Emerging organic compounds in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.*, v. 163, p. 287-303, 2012.
- LÖFFLER, D. *et al.* Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/ Sediment Systems. *Environmental Science Technology.*, v.39, p.5209-5218, 2005.
- LÖFFLER, D. *et al.* Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/ Sediment Systems. *Environmental Science Technology.*, v.39, p.5209-5218, 2005.

- OOSTERHUIS, M. *et al.* Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. *Science of the total environment*, v. 442, p. 380-388, 2013.
- OTTMAR, K *et al.* Fate and transport of atorvastatin and simvastatin drugs during conventional wastewater treatment. *Chemosphere*, v. 88, p.1184-1189, 2012.
- PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and câncer. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 10, p. 143–156, 2014.
- SACHS, G. *et al.* Gastric H.K-ATPase as therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 28, p. 269-284, 1988.
- SACHS, G. The parietal cell as a therapeutic target. *Scand. J. Gastroenterol. Supp.*, v. 118, p. 1-10, 1986.
- SURGAN, M.; CONDON, M.; COX, C. Pesticide Risk Indicators: Unidentified Inert Ingredients Compromise Their Integrity and Utility. *Environmental management*, v. 45, n.4, p. 834-841, 2010.
- TAYLOR, K. M.; LAVERTY, R. The effect of chlordiazepoxide, diazepam and nitrazepam on catecholamine metabolism in regions of the rat brain. *European journal of pharmacology*, v. 8, p. 296-301, 1969.
- TRAUTWEIN, C.; KÜMMERER, K. Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. *Chemosphere*, v. 85, p. 765-773, 2011.
- WALLMARK, B. Omeprazole: mode of action and effect on acid secretion in animals. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl. Toxicol.*, v. 166, p. 12-18, 1989.
- YANG, L *et al.* Growth-inhibition effects of 12 antibacterial agents and their mistures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 27, n.5, p. 1201-1208, 2008.