

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS
MESTRADO EM ECOLOGIA

CAMILA RAMOS LOPES NUNES

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS FÁRMACOS 17 α ETINILESTRADIOL E
METFORMINA SOBRE A REPRODUÇÃO DO MEXILHÃO MARINHO *Perna*
***perna* (LINNAEUS, 1758)**

SANTOS/SP

2015

CAMILA RAMOS LOPES NUNES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS FÁRMACOS 17 α ETINILESTRADIOL E
METFORMINA SOBRE A REPRODUÇÃO DO MEXILHÃO MARINHO *Perna
perna* (LINNAEUS, 1758)**

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob a orientação do Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira.

SANTOS /SP

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

Nunes, Camila Ramos Lopes.
Avaliação dos efeitos dos fármacos 17 α etinilestradiol e metformina sobre a reprodução do mexilhão marinho *Perna perna* (LINNAEUS, 1758)/ Camila Ramos Lopes Nunes -- 2015.
48 p.

Orientador: Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2015.

1. 17 α -etinilestradiol. 2. Metformina 3. Ecotoxicologia 4. Avaliação de risco. 5. *Perna perna*. I. Pereira, Camilo Dias Seabra, orient. Avaliação dos efeitos dos fármacos 17 α -etinilestradiol e metformina sobre a reprodução do mexilhão marinho *Perna perna*.

Dedico este trabalho a todos que participaram do processo de todas as formas, seja com uma palavra de apoio, de consolo, de encorajamento ou de sabedoria.

AGRADECIMENTO

A Deus por me colocar no caminho que estou hoje com as pessoas que fazem parte dele.

Aos meus pais por sempre estarem ao meu lado me apoiando e me incentivando a ser cada dia melhor. Obrigada por todos os bons exemplos e pelo amor que sempre me deram. Amo vocês.

Ao meu namorado Paulo por aguentar todas as crises, pelo companheirismo e apoio incondicionais.

Aos meus amigos pelas risadas e momentos de relaxamento durante não só esse processo, mas durante a vida.

Aos professores do mestrado pelos muitos ensinamentos durante o curso.

Aos colegas do mestrado Giovanna, Laís, Fábio, Barbs, Mi, Gabi, Bia e Priscila pelos bons momentos nas horas de trabalhos, intervalos e descontração.

Aos amigos Wesley e Nelson, obrigada pelo apoio, pela ajuda, pelas ideias e pelas conversas.

Aos integrantes do laboratório de ECOTOX que fazem daquele ambiente um lugar incrível de trabalhar. Obrigada pela ajuda, pelos ensinamentos e por mostrarem que num lugar onde existe respeito e ajuda mútua fazem de tudo possível.

Ao meu orientador Camilo pela oportunidade de poder trabalhar com alguém tão competente. Obrigada pelos ensinamentos e pela paciência e por não deixar eu me desesperar com todo seu encorajamento.

Obrigado a todos que fizeram parte dessa jornada.

"A experiência humana não seria tão rica e gratificante se não existissem obstáculos a superar. O cume ensolarado de uma montanha não seria tão maravilhoso se não existissem vales sombrios a atravessar".

Helen Keller

RESUMO

Devido à crescente utilização de Fármacos e Produtos de Higiene e Cuidados Pessoais (FPHCPs), o interesse em estudar estes contaminantes emergentes vem aumentando. Os efluentes domésticos sem tratamento específico são a principal fonte de lançamento em ambientes aquáticos, causando contaminação e efeitos adversos à biota aquática. O 17 α -etinilestradiol é um hormônio estrogênio amplamente usado em pílulas anticoncepcionais. A metformina é um antidiabético oral da classe das biguanidas. Por serem compostos bioativos são capazes de interagir com organismos não-alvo e estudos pretéritos demonstraram ação perturbadora sobre o sistema endócrino. Nesse contexto, o presente estudo assume a hipótese da capacidade desses fármacos causarem efeitos adversos sobre a reprodução do mexilhão marinho. Para verificação dessa hipótese foram propostos dois objetivos: (i) avaliação dos efeitos do 17 α -etinilestradiol e metformina sobre a taxa de fertilização de gametas e o desenvolvimento embriolarval do mexilhão marinho *Perna perna*; (ii) determinação do risco ambiental desses compostos através da razão entre as concentrações ambientais e as concentrações de efeito agudo e crônico. Para tanto, foi utilizada uma metodologia escalonada composta pela identificação de concentrações ambientais em estudos pretéritos (TIER 0), determinação da toxicidade aguda (TIER I) e determinação da toxicidade crônica (TIER II). Nos ensaios agudos com o EE2 foi encontrada a CE₅₀ média de 4,70 mg.L⁻¹ e para a metformina não foi possível calcular a CE₅₀ até a concentração máxima testada de 1000 mg.L⁻¹. Nos ensaios de toxicidade crônica foram obtidas para o EE2 médias de CENO 0,3 mg.L⁻¹; CEO 0,56 mg.L⁻¹ e Cl₅₀ 0,91 mg.L⁻¹. Os valores médios para a metformina foram CENO 67,5 mg.L⁻¹, CEO 175,0 mg.L⁻¹ e Cl₅₀ 256,0 mg.L⁻¹. A partir desses resultados foi avaliado o risco ambiental desses compostos. Para o EE2 o risco foi caracterizado como médio e o composto como “muito tóxico”, enquanto para a metformina o risco foi caracterizado como baixo e o composto como “não tóxico”.

Palavras chave: 17 α -etinilestradiol. Metformina. Ecotoxicologia. Avaliação de risco. *Perna perna*.

ABSTRACT

Due to the crescent use of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), there is an increasing interest in studying these emergent contaminants. The domestic effluents that don't get proper treatment are the main source of entry in aquatic environments, causing contamination and adverse effects. 17 α -ethynylestradiol is an estrogen hormone widely used in birth control pills. Metformin is an oral antidiabetic that belongs to the class of biguanides. For being bioactive compounds they are capable of interacting with non target organisms. In this context, the present study hypothesizes these compounds capability to cause adverse effects on *Perna perna* marine mussels reproduction. To verify this hypothesis, two objectives were proposed: (i) evaluation of 17 α -ethynylestradiol and metformin effects on the fertilization rates of gametes and embryo-larval development of *Perna perna* marine mussel; (ii) ecological risk determination of these pharmaceuticals through the ratio between environmental concentrations and acute and chronic effect concentrations. For this purpose, a tiered methodology was used, which consists in the identification of environmental concentration in previous studies (TIER 0), acute toxicity determination (TIER I) and chronic toxicity determination (TIER II). On the acute essays with EE2 a mean EC₅₀ of 4,70 mg.L⁻¹ was found, and it was not possible to calculate EC₅₀ for metformin up to the maximum tested concentration of 1000 mg.L⁻¹. On the chronic toxicity essays it was possible to determinate mean values for CENO 0,3 mg.L⁻¹; CEO 0,56 mg.L⁻¹ and IC₅₀ 0,91 mg.L⁻¹ for EE2. The mean values for metformin were CENO 67,5 mg.L⁻¹, CEO 175,0 mg.L⁻¹ and IC₅₀ 256,0 mg.L⁻¹. From these results a evaluation of risk was made for the compounds. EE2 risk was characterized as "medium" and a "very toxic" compound, whilst for metformin the risk was considered "low" and a "non toxic compound".

Keywords: 17 α -ethynylestradiol. Metformin. Ecotoxicology. Risk evaluation. *Perna perna*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caracterização de Risco “TIER”	21
Figura 2. Estrutura química do 17 α -Ethinilestradiol.....	22
Figura 3. Estrutura química da Metformina.....	23
Figura 4. Mexilhão marinho <i>Perna perna</i> (Linnaeus, 1758)	24
Figura 5. Praia Toque Toque Grande – São Sebastião / SP.....	25
Figura 6. Fluxo contínuo.....	27
Figura 7. Fecundação dos óvulos.	31
Figura 8. Ensaaios agudos EE2 – taxa de fertilização..	35
Figura 9. Ensaio agudo Metformina – taxa de fertilização.....	36
Figura 10. Ensaaios crônicos 17 α -etinilestradiol.	38
Figura 11. Ensaaios crônicos Metformina.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ranking de risco.....	22
Tabela 2. Características físicas e químicas do 17 α -etinilestradiol.	23
Tabela 3. Características físicas e químicas da Metformina.....	24
Tabela 4. Parâmetros necessários para Ensaio de Fertilização.....	29
Tabela 5. Parâmetros necessários para o Ensaio Embriolarval.....	32
Tabela 6. Resultados das análises físico-químicas das soluções estoque.	34
Tabela 7. CE ₅₀ do 17 α -etinilestradiol.	36
Tabela 8. Concentrações de efeito e CENO (mg.L ⁻¹) obtidas nos ensaios crônicos do EE2..	39
Tabela 9. Concentrações de efeito e CENO (mg.L ⁻¹) obtidas nos ensaios crônicos de Metformina..	41
Tabela 10. Concentrações ambientais em diferentes localidades.....	41
Tabela 11. Quociente de Risco	42
Tabela 12. Toxicidade dos compostos baseado na classificação da Diretiva Europeia 93/67/EEC.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

CE₅₀ - Concentração efetiva (50% dos organismos expostos)

CEO - Concentração de Efeito Observado

CENO - Concentração de Efeito Não Observado

CI₅₀ - Concentração de inibição (50% dos organismos expostos)

EE2 - 17 α -etinilestradiol

ETA - Estação de Tratamento de Água

ETE - Estação de Tratamento de Esgoto

FPHCP's - Fármacos e Produtos de Higiene e Cuidados Pessoais

MEC - Concentração Ambiental Mensurada (Measured Environmental Concentration)

PNEC - Concentração Previsivelmente Sem Efeito (Predicted No Effect Concentration)

QR - Quociente de Risco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Avaliação de Risco Ambiental (TIER)	20
3.2 17 α -etinilestradiol.....	22
3.3 Metformina	23
3.4 Organismo-teste <i>Perna perna</i> (Mollusca, Bivalvia)	24
3.5 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS	26
3.5.1 Limpeza dos organismos e obtenção de gametas.....	26
3.6. Processamento TIER I	27
3.6.1. Preparo de concentrações-teste	27
3.6.2 Ensaio de toxicidade aguda (Fertilização) com mexilhão marinho <i>Perna perna</i> (Mollusca, Bivalvia)	28
3.7 Processamento TIER II – Efeitos crônicos	30
3.7.1 Preparo de concentrações-teste	30
3.7.2 Ensaio para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) com <i>Perna perna</i> (Mollusca, Bivalvia)	30
3.8 Análises Estatísticas	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Análises físico-químicas	34
4.2 TIER I – Ensaio de Toxicidade Aguda.....	34
4.2.1 17 α -etinilestradiol	34
4.2.2 Metformina	36
4.3 TIER II - Ensaio Crônico – Desenvolvimento Embriolarval	37
4.4 Avaliação do risco.....	41
4.4.1. Concentrações ambientais - Measured Environmental Concentration.....	41
4.4.2 Avaliação do Risco de acordo com EMEA (2006)	41
4.4.3 Avaliação do Risco de acordo a Diretiva Europeia 93/67/EEC.....	42
5. DISCUSSÃO	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

Contaminantes emergentes são substâncias que têm sido detectadas no ambiente, mas atualmente não estão incluídas em programas de monitoramento e que o destino, comportamento e efeitos ecotoxicológicos ainda não são bem compreendidos. Apesar dos potenciais efeitos adversos à saúde humana e ambiental, ainda não apresentam padrão regulatório (BOXAL, 2012).

Na última década, o interesse na presença de “poluentes emergentes” vem crescendo consideravelmente. Fazem parte desse grupo os fármacos e produtos de higiene pessoal (PPCPs) (NIEMUTH *et al.*, 2014). A presença de medicamentos no ambiente se tornou recentemente um tópico de pesquisa. Inicialmente, o problema começou a entrar em evidência nos Estados Unidos na década de 70 e quase uma década depois no Reino Unido. Mesmo assim, apenas nos anos 90, com o avanço das técnicas analíticas, conhecimento sobre a contaminação ambiental por fármacos começou a ser gerado. Com o avanço dessas técnicas, foi possível a detecção desses compostos em níveis de ng.L^{-1} (SANTOS *et al.*, 2010). Esses compostos vêm sendo detectados em efluentes domésticos, águas superficiais, águas subterrâneas e sedimento, devido ao aumento contínuo de seu uso e da ausência de disposição e tratamento adequados (VULLIET e CREN-OLIVÉ, 2011).

A ocorrência e destino de compostos farmacêuticos em ambientes aquáticos vêm sendo reconhecida como um dos problemas emergentes em química ambiental e tem sido publicada uma grande variedade de literatura nessa área. (GARCÍA *et al.*, 2014).

Toneladas de medicamentos são produzidas anualmente no mundo todo para serem consumidos por seres humanos ou animais. Eles são fabricados, a princípio, para ter um efeito pontual em algum mecanismo do organismo e resistir à inativação até que seu efeito terapêutico seja alcançado. Porém, essas mesmas propriedades são responsáveis pela bioacumulação e efeitos

tóxicos desses compostos nos ambientes terrestres e aquáticos (SANTOS *et al.*, 2010). O consumo de grandes quantidades de produtos químicos sintéticos, especificamente fármacos e produtos de higiene e cuidado pessoal (PPCPs), têm levado a detecção dessas substâncias com grande frequência em águas naturais, águas de esgoto e em sistemas de água potável (GARCÍA *et al.*, 2014). Isso acontece porque esses compostos são introduzidos no ambiente principalmente através de efluentes de esgoto de estações de tratamento, efluentes hospitalares e atividades pecuárias. Muitos deles são amplamente usados pelas pessoas e aplicados em vários campos, como fármacos, hormônios, produtos de limpeza, produtos de cuidado e higiene pessoal e resíduos industriais. Os efluentes de água, então, são lançados em rios e o lodo é espalhado no solo como fertilizantes (SHORE AND SHEMESH, 2003). Portanto, esses compostos podem alcançar vários tipos de compartimentos ambientais.

Relatórios e publicações científicas sobre resíduos farmacêuticos em águas superficiais e de consumo têm aumentado nos últimos anos. Entre as substâncias detectadas em rios, estão: os betabloqueadores, analgésicos, anti-inflamatórios, estrogênios, antibióticos, reguladores lipídicos e antiepiléticos. Pequenos riachos, represas, e demais corpos receptores que recebem quantidades relativamente altas de efluentes de água ou de esgoto tratados, são encontrados poluídos com concentrações de fármacos que chegam a ser maiores que 1,0 mg.L⁻¹. Os tratamentos convencionais (primários, secundários e terciários) de águas potáveis e efluentes domésticos diminuem os resíduos, mas não conseguem remover essas substâncias por completo (CLEUVERS, 2003).

O caminho mais comum para a contaminação ambiental por fármacos é através da sua excreção, sem nenhuma alteração em sua composição, na urina e nas fezes dos organismos, mas, outros mecanismos também contribuem para seu aporte no ambiente. São eles: metabólitos que são mais polares do que a substância inicial devido à biotransformação; descarte doméstico desses compostos, fórmulas tópicas ou medicamentos vencidos ou não utilizados; lodo proveniente de estações de tratamento, que é utilizado

como fertilizante na agricultura; e efluentes de fábricas que produzem esses compostos químicos, que são removidos em diferentes níveis de eficiência (SANTOS *et al.*, 2010 e NIEMUTH *et al.*, 2014). Apesar de deixarem as estações de tratamento em quantidades pequenas, análises de riscos e estudos em exposição de organismos a esses compostos tem aumentado a preocupação sobre seu efeito negativo no ambiente. Portanto, a contaminação do ambiente aquático não é dada apenas pelo composto original, mas também pelos seus metabólitos, que podem ou não ser mais tóxicos que o composto original (NUNES, 2010).

Devido ao seu modo de ação e afinidade com biomoléculas, são esperados efeitos adversos não apenas em mamíferos, mas também outros vertebrados e invertebrados.

Alguns dos compostos encontrados no ambiente podem interferir no funcionamento normal do sistema endócrino de humanos e outros seres vivos do ambiente tem gerado interesse na área de pesquisa. Esses químicos são conhecidos como compostos de desregulação endócrina (EDCs). Neste grupo são incluídos compostos produzidos naturalmente, como estrógenos naturais, ou compostos sintéticos produzidos pela indústria, incluindo medicamentos, hormônios e PCBs. Uns dos exemplos mais conhecidos são os contraceptivos utilizados nas pílulas anticoncepcionais (TERNES *et al.*, 1999).

O sistema endócrino é responsável por manter a homeostase do organismo, sua reprodução, desenvolvimento e comportamento. EDCs podem afetar o organismo por serem semelhantes a hormônios endógenos ou antagonizarem o efeito de hormônios endógenos e desregular o metabolismo do ser vivo (ARIS, 2014).

Como parte de um levantamento regional com o objetivo de avaliar o risco de populações a certas classes de substâncias, várias famílias de compostos farmacêuticos e hormônios foram investigadas em águas para beber, na região de Rhône-Alpes, na França. Nesse estudo, 11 dos 26 esteroides investigados foram detectados em águas superficiais e subterrâneas. Entre esses compostos estão a estrona e o 17 α -etinilestradiol. A

presença da estrona no ambiente não foi uma surpresa, pois é um hormônio natural excretado por mulheres e também é metabólito da biodegradação de estradiol. Foram encontrados 0.2 ng/L de 17 α em águas superficiais e 0.7ng/L em águas subterrâneas (VULLIET e CREN-OLIVÉ, 2011). No esgoto não tratado de Penha (Rio de Janeiro) foi detectado 0,021 μ g/L de estrona. Já nas estações de tratamento de esgoto da Alemanha e Canadá foram encontrados 0,001 μ g/L e 0,009 μ g/L respectivamente (TERNES *et al.*, 1999).

Muitas pesquisas recentes focaram no 17 α -etinilestradiol. Ele se tornou um problema em ambientes aquáticos devido a sua alta resistência ao processo de degradação, por se acumular em sedimentos e se concentrar na biota. Estudos anteriores relatam a capacidade do EE2 em afetar o sistema endócrino dos organismos, alterando o sexo, atrasando a maturidade sexual e diminuindo as características sexuais secundárias, mesmo em baixas concentrações (ARIS, 2014).

A metformina e a guanilurea, que é um derivado da metformina, entram no ambiente aquático através de esgoto doméstico. Ela pode potencialmente entrar no ambiente durante a sua produção e após a fase de consumo. As emissões de metformina durante a produção não são consideradas na Europa ocidental já que esse fármaco é manufaturado principalmente na Índia e na China (LARSSON *et al.*, 2007). Já a sua emissão após o consumo é relevante, pois a metformina tem uma meia vida de 6,2 horas no corpo humano e metformina não consumida e seu metabólito são excretada pela urina (TER LAAK E BAKEN, 2014). O consumo de metformina é considerado estável durante as estações e é esperado que aumentasse num futuro próximo. A dose terapêutica da metformina é de 1000 a 2550 mg por dia, administrados oralmente.

No estudo feito na região de Rhône-Alpes, na França, foram encontradas as seguintes concentrações da Metformina em águas superficiais e subterrâneas, respectivamente: 100,6 ng/L e 9,9 ng/L (VULLIET e CREN-OLIVÉ, 2011).

A metformina sensibiliza as células à insulina, afetando os caminhos regulados pela sinalização da insulina, um deles sendo a expressão do

citocromo P450. A relação entre a sinalização da insulina e a esteroidogênese indica o potencial de drogas antidiabéticas agirem como desreguladores endócrinos. No estudo feito por Niemuth *et al.*, 2014 mostra que a metformina causou a indução da expressão de vitelogenina no fígado de vairões, indicando desregulação endócrina.

Para entender melhor os problemas relacionados às PPCPs, a França, por exemplo, vem selecionando fármacos e colocando-os em uma lista de prioridades de acordo com sua importância, sendo levadas em consideração, seu consumo, concentrações ambientais previstas e dados ecotoxicológicos, farmacológicos e físico-químicos (BESSE AND GARRIC, 2004). Esta lista inclui esteróides naturais e seus metabólitos produzidos por humanos e pela pecuária, e também hormônios sintéticos que são amplamente usados como pílulas contraceptivas. O objetivo desta lista é primeiramente fornecer dados da ocorrência de fármacos e hormônios nos suprimentos de água franceses e também estimar o risco à saúde causado pela presença desses compostos (VULLIET e CREN-OLIVÉ, 2011).

Uma vez que organismos não-alvos são expostos a essas substâncias torna-se necessário avaliar os efeitos tóxicos sobre a biota. Para tanto, ensaios ecotoxicológicos são amplamente utilizados com vertebrados e invertebrados aquáticos. De acordo com Truhalt (1977), a ecotoxicologia é a ciência que tem como objetivo estudar os efeitos de compostos naturais ou sintéticos sobre organismos, populações e comunidades terrestres ou aquáticas, levando em consideração a interação das substâncias com o meio no qual os organismos vivem. Em 1984 a USEPA estabeleceu o uso de organismos para o biomonitoramento da qualidade das águas e a OECD estabeleceu uma série de protocolos de testes com organismos como algas, crustáceos e peixes.

A comunidade científica concorda que a possibilidade de efeitos adversos dessas substâncias pode ocorrer tanto para saúde humana quanto para organismos aquáticos. Alguns efeitos podem ser observados devido à exposição contínua de organismos aquáticos durante seu ciclo de vida, mesmo sendo concentrações pequenas. Esses efeitos vão se acumulando lentamente e se manifestam posteriormente de forma irreversível e são apenas notados

gerações depois, afetando as populações, e consequentemente, todo o ecossistema (GIRI e PAL, 2014).

Os riscos associados com a descarga de fármacos no ambiente não são apenas devido à sua ecotoxicidade aguda, mas também devido a sua genotoxicidade, desenvolvimento de resistência a patógenos e desregulação endócrina. Ensaio padrão de ecotoxicologia são uma forma de determinar alguns efeitos das PPCPs, como efeitos agudos e crônicos em organismos de diferentes níveis tróficos. É importante que seja possível prever o potencial de causar efeitos adversos desses compostos no ambiente antes que seus efeitos possam ser observados. A probabilidade de um composto causar efeitos indesejados no ambiente pode ser estimada por avaliações de risco ambiental (ERA). Resultados de pesquisas apontam que, 65.4% das PPCPs estudadas são classificadas entre “muito tóxicas” e “prejudiciais para organismos aquáticos”, o que mostra evidências preliminares que demonstram os efeitos negativos desses compostos no ambiente (GARCÍA *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade e o risco ambiental dos fármacos metformina e 17 α -etinilestradiol no ambiente marinho utilizando o molusco bivalve *Perna perna* como organismo teste.

2.2 Objetivos específicos

(i) Avaliação da toxicidade aguda e crônica da metformina e 17 α -etinilestradiol a partir de efeitos na taxa de fertilização de gametas e no desenvolvimento embriolarval do mexilhão marinho *Perna perna*;

(ii) Determinação do risco ambiental desses fármacos através da razão entre as concentrações ambientais dos compostos e concentrações de efeito encontradas em laboratório.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Avaliação de Risco Ambiental (TIER)

Em avaliações de risco são feitas as análises dos efeitos ecológicos adversos que possam ocorrer ou ocorrem como resultado da exposição a um composto que não são naturais daquele ambiente, podendo ser de origem biológica, física ou química.

Para a avaliação de risco ambiental foi utilizada a metodologia escalonada TIER. Nessa metodologia os resultados obtidos em cada etapa são essenciais para uma avaliação de risco mais adequada.

Neste trabalho foram propostos 3 níveis denominados TIER 0, I e II e o Quociente de Risco (QR) foi obtido seguindo as diretrizes propostas pela Comissão Europeia (EMEA, 2006).

Na etapa TIER 0, serão empregadas concentrações ambientais de trabalhos préteritos em ambientes aquáticos. Na etapa TIER-I são desenvolvidos ensaios ecotoxicológicos que tem como objetivo avaliar o efeito agudo do composto de interesse em um curto período de exposição. Nesta fase foi obtida a Concentração de efeito a 50% (CE_{50}) dos organismos expostos, através da análise da taxa de fecundação em 50 % das células reprodutivas tratadas. Na ultima etapa contemplada no presente trabalho, TIER-II, foi feita a análise de efeitos crônicos, durante um período maior de exposição contínua ao composto estudado. Foram feitos ensaios para analisar os estágios iniciais de vida, o desenvolvimento embriolarval do organismo. A partir desses ensaios foram determinadas as concentrações de efeito não observado (CENO) e da concentração de efeito observado (CEO).

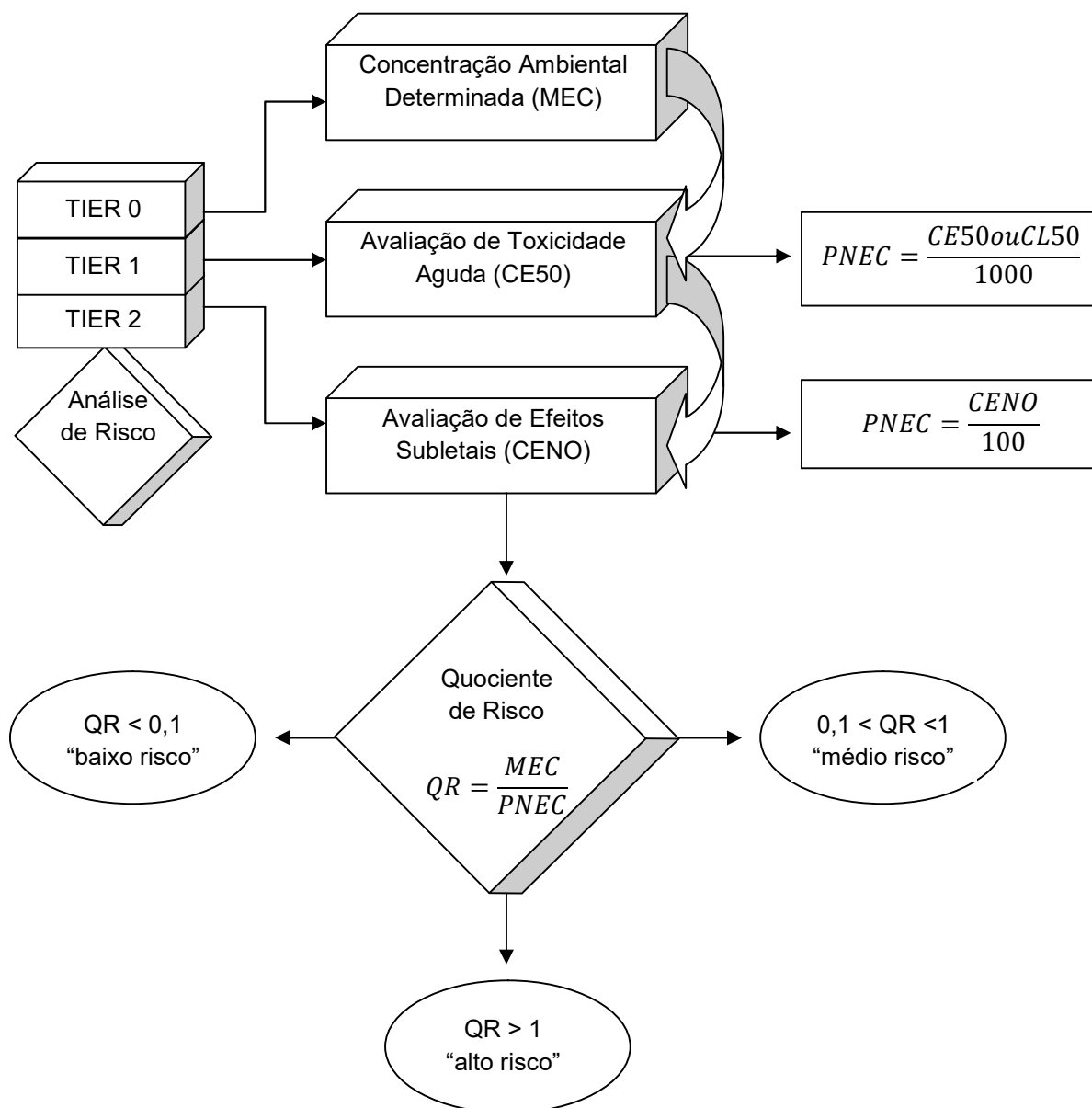


Fig. 1 Caracterização de Risco “TIER”.

Fonte: Adaptação de EMEA (2006)

Com a análise dos dados obtidos na metodologia TIER calculou-se o Quociente de Risco (QR) relacionando os efeitos obtidos nos ensaios com a concentração ambiental aferida (FIG 3). Para se determinar o QR, os valores de CE_{50} e CENO foram divididos por fatores de segurança, podendo assim obter uma Concentração Sem Efeito Previsto (*PNEC - Predicted no Effect Concentration*). Os fatores de segurança são aplicados devido a incertezas quanto à extrapolação dos resultados para o ambiente natural e na variação da sensibilidade intra e inter-espécies.

A PNEC para o TIER-I tem fator de segurança mais elevado devido ao efeito ocasionado ser irreversível e tratando-se da proposta de prevenção de efeitos o fator de segurança 1000 foi aplicado ao cálculo.

Os níveis de risco foram estabelecidos de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Ranking de Risco

Quociente de risco (QR)	Ranking
0,01 – 0,1	Baixo Risco
0,1 - 1	Médio Risco
> 1	Alto Risco

FONTE: EC, (1996); EMEA (2006); HERNANDO et al., (2006); SÁNCHEZ-BAYO et al., (2002)

3.2 17 α -etinilestradiol

O 17 α -Etinilestradiol (19-Norpregna-1,3,5(10)-Trien-20-yne-3,17-diol,(17 α -) (FIG.2) é um hormônio estrogênio muito usado em pílulas anticoncepcionais. Sua função se destaca em aumentar o nível da mucosa uterina, construindo um ambiente desconfortável aos espermatozóides e inibindo a síntese dos hormônios ovulatórios. (<http://www.drugs.com/estradiol.html>). O *kow* representa a afinidade do composto por substâncias polares ou apolares. O EE2 apresenta maior afinidade com substâncias apolares, tendo maior afinidade por sedimentos.

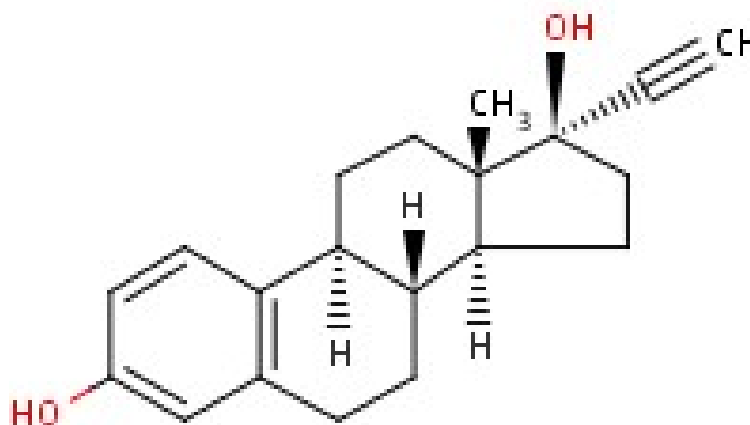


Figura 2. Estrutura química do 17 α -Etinilestradiol.

As principais características físicas e químicas do 17 α -Ethinilestradiol estão apresentados na Tabela1.

Tabela 2. Características físicas e químicas do 17 α -etinilestradiol

Fórmula Molecular	C ₂₀ -H ₂₄ -O ₂
Peso molecular	296,40 g/mol
Cor	Pó fino branco creme à pó cristalino branco
Ponto de fusão	142-146 ° C
Solubilidade em água	11,3 mg/L a 27 ° C
Log Kow	3,67
pKa	10,33
Meia-vida biológica	36 $\pm$ 13 horas

3.3 Metformina

A metformina (N,N-dimetilbiguanida) (FIG. 3) é um antidiabético oral da classe das biguanidas. É o medicamento de escolha no tratamento inicial do diabetes mellitus tipo 2, especialmente em pessoas obesas ou com sobrepeso e pessoas sem problemas renais. É o antidiabético mais usado no Brasil e nos Estados Unidos (onde foi prescrita quase 35 milhões de vezes em 2006 como genérico). No Brasil, faz parte do programa Farmácia Popular do Ministério da Saúde (International diabetes Federation, 2005; American diabetes Association, 2007; Gallego, 2005). Observando seu kow, é possível afirmar que a metformina tem maior afinidade por substâncias polares, como a água.

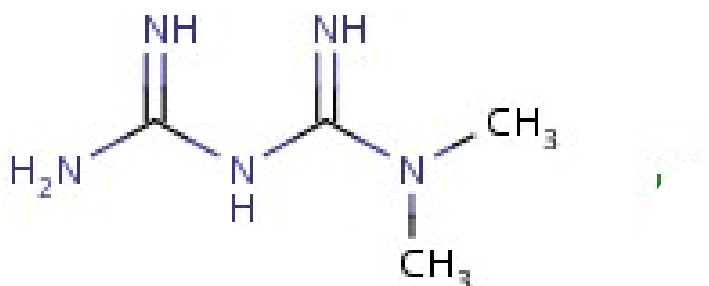


Figura 3. Estrutura química da Metformina.

As principais características físicas e químicas da Metformina estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Características físicas e químicas da Metformina

Fórmula Molecular	C ₄ -H ₁₁ -N ₅ .H-CL
Peso molecular	165,63 g/mol
Cor	Prismas de água
Ponto de fusão	218-220 ° C
Solubilidade em água	Solúvel em água
pKa	12,4
Log Kow	-0,92
Meia-vida biológica	3-6 horas

3.4 Organismo-teste *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia)

Bivalves são utilizados devido a sua natureza sésil, capacidade de filtração e bioacumulação de compostos orgânicos e inorgânicos. Ostras e mexilhões, por exemplo, se mostram úteis em estudos sobre a presença e quantidade de contaminantes em certos ambientes e também as respostas biológicas à exposição desses compostos (ARIS, 2014).

O mexilhão *Perna perna* (FIG 4) é nativo da costa brasileira, e também encontrado na Venezuela, no Uruguai, na Argentina e na África do Sul (RIOS, 1984). Ele é encontrado em costões rochosos no Sudeste do Brasil, formando colônias densas naturalmente as zonas entre marés e infra litorâneas. O *Perna perna* também tem sua importância econômica como fonte de proteína e de sustento para populações costeiras economicamente não privilegiadas. Além disso, cultivos de mexilhões tem se espalhado ao longo da costa brasileira, mais uma atividade econômica relacionada a esse organismo.



Figura 4. Mexilhão marinho *Perna perna* (Linnaeus, 1758).

Por ser um animal filtrador, ele pode bioacumular compostos os poluentes, por isso, mexilhões e outros bivalves são comumente chamados de organismos sentinelas, e por serem sésseis são apropriados para estudos de monitoramento ambiental, pois não são expostos a componentes de outras áreas, então, as respostas dadas por esses organismos serão em relação a qualidade ambiental de onde habitam.

Os exemplares do molusco bivalve (mexilhão) *Perna perna* empregados nos ensaios ecotoxicológicos neste estudo foram adquiridos de cultivos na praia da Toque Toque Grande – São Sebastião/SP (FIG 5). Os organismos foram transportados em caixa térmica até o laboratório de Ecotoxicologia “Prof. Caetano Belliboni” na Universidade Santa Cecília, onde foram mantidos em tanques com água do mar do local de origem, sob aeração constante e temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização dos ensaios.



Figura 5. Praia toque toque grande.

3.5 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

3.5.1 Limpeza dos organismos e obtenção de gametas

A preparação dos organismos-teste para os ensaios iniciou-se com sua limpeza, feita através da raspagem dos organismos incrustantes, seguido da lavagem dos mexilhões com água doce. Os organismos permaneceram fora da água, para que não ocorresse a liberação dos gametas antes da separação dos indivíduos.

Para a liberação dos gametas foi utilizado a técnica de indução termal junto com fluxo contínuo, procedimentos considerados adequados no trabalho realizado por Zaroni *et al.*, (2005). Cerca de 50 mexilhões foram colocados individualmente dentro de placas de Petri e o conjunto de placas dentro de uma bandeja plástica rasa, cheia de água do mar.

As bandejas com os mexilhões foram mantidas em geladeira por aproximadamente 30 minutos em temperatura de 4°C. Após este procedimento, as bandejas foram retiradas da geladeira e permaneceram vinte minutos sem água antes de serem novamente imersos em água do mar em temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) sob fluxo contínuo.

O fluxo contínuo foi montado com o auxílio de grades e bandejas sobrepostas de maneira com que a água escoe para a bandeja inferior até chegar ao tanque com ebulidor que mantém a temperatura adequada e com a bomba que manda novamente essa água para a bandeja mais alta, simulando assim uma cascata de fluxo contínuo (FIG 6).

O fluxo foi mantido até ocorrer à liberação dos gametas que pode ser detectada visualmente. O líquido espermático possui coloração branca e foi coletado com o mínimo de água possível com uma pipeta de Pasteur e mantido em um béquer envolto por gelo. Os óvulos possuem cor laranja, também coletado com uma pipeta e transferido para um béquer com água do mar filtrada.



Figura 6. Fluxo contínuo.

Em seguida, os óvulos foram lavados com auxílio de uma peneira com 75 μm de malha e recolocados em um béquer de capacidade maior com água do mar filtrada. Esse processo de lavagem dos óvulos se repetiu 3 vezes.

Foram obtidos lotes de 3 organismos diferentes (tanto machos quanto fêmeas) que foram misturados e posteriormente utilizado nos ensaios ecotoxicológicos agudos e crônicos da maneira como segue os procedimentos para cada qual.

3.6. Processamento TIER I

3.6.1. Preparo de concentrações-teste

Foram preparadas as soluções estoque de 17 α -etinilestradiol e Metformina nesta etapa. A partir das soluções estoque, foram geradas as concentrações a serem avaliadas. Como o DMSO (0,001%) foi utilizado para a diluição do 17 α -etinilestradiol, ele também foi analisado, para verificar se havia alguma influência do mesmo sobre o ensaio. O controle de água do mar foi preparado com a água filtrada utilizada na diluição das soluções estoque e das concentrações-teste.

A solução estoque de 17 α -etinilestradiol foi preparada a partir de 2,5 mg do composto, diluído primeiramente em 250 μ L de DMSO (0,001%) e posteriormente avolumado para 250 mL, obtendo-se a concentração 10 mg.L⁻¹

A partir dessa solução estoque foram preparadas as concentrações dos ensaios agudos. Para o ensaio 1, foram preparadas as concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 mg.L⁻¹. Para o ensaio 2, foram usadas as concentrações de 0,5; 1; 2; 4; 8 mg.L⁻¹, e para o ensaio 3 as concentrações utilizadas foram de 2; 3; 4,4; 6,6; 10 mg.L⁻¹. O DMSO (0,001%) utilizado na diluição também foi analisado com o intuito de verificar a influencia do mesmo sobre o ensaio. O controle de água do mar foi preparado com a água filtrada utilizada na diluição

Para o preparo da solução estoque de Metformina foram pesados 100 mg do composto, sendo avolumado para 100 mL de água, obtendo-se a concentração 1000 mg.L⁻¹. A partir dessa solução estoque foram preparadas as concentrações dos ensaios agudos (31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 mg.L⁻¹).

3.6.2 Ensaio de toxicidade aguda (Fertilização) com mexilhão marinho *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia)

O método usado foi uma adaptação do protocolo da USEPA (1991) feita por Zaroni et al., (2005) para a espécie do mexilhão marinho *Perna perna*.

O método consiste na exposição de espermatozóides de *Perna perna*, por um período de 1 hora, a diferentes concentrações de 17 α -etinilestradiol ou metformina e posteriormente foram adicionados os óvulos para avaliar se a capacidade motora dos espermatozóides foi prejudicada nesse período de tempo de exposição. Os parâmetros para realização desse ensaio encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros necessários para Ensaio de Fertilização.

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±1° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	1h:40min
Frasco-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15mL
Volume das soluções-teste	10mL
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	200 óvulos por mililitro
Efeito observado	Inibição da fertilização
Validade do ensaio	70 – 90 % de óvulos fecundados no controle

Após o processo de obtenção de gametas, preparou-se 25 mL de uma solução espermática, utilizando 0,5 mL de esperma + 24,5 mL de água do mar filtrada.

Foram retirados 100µL da solução espermática e inseridos em cada tubo de ensaio, permanecendo durante 1 hora em câmara de germinação a 25 ± 1 °C. Durante o período de exposição, foi feita a estimativa da densidade de óvulos utilizando uma câmara de Sedgwick-Rafter, assim os volumes utilizados continham cerca de 2000 óvulos. Transcorrida a exposição de 1 hora, o volume contendo aproximadamente 2000 óvulos foi adicionado aos frascos-teste. Quarenta minutos após a adição dos óvulos, o ensaio foi encerrado com a adição de 0,5 mL de formol (10%) tamponado com bórax em todas as réplicas.

Foram analisados os 100 primeiros óvulos de cada réplica utilizando a câmara de Sedgwick-Rafter, obtendo assim a proporção de óvulos fecundados e não fecundados. Foram considerados como fecundados aqueles que apresentaram membrana de fertilização, presença de corpúsculo polar ou clivagens.

3.7 Processamento TIER II – Efeitos crônicos

A fase do TIER 2 consiste na avaliação dos efeitos crônicos, sendo empregado nesse trabalho através do ensaio de desenvolvimento embrionário.

3.7.1 Preparo de concentrações-teste

A solução estoque de 17 α -etinilestradiol foi preparada a partir de 2,5 mg do composto, diluído primeiramente em 250 μ L de DMSO (0,01%) e posteriormente avolumado para 250 mL, obtendo-se a concentração 10 mg.L⁻¹. A partir dessa solução estoque foram preparadas as concentrações testadas nos ensaios crônicos. Para o ensaio 1, foram preparadas as concentrações de 0,001; 0,01; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 mg.L⁻¹. Para o ensaio 2, foram usadas as concentrações de 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2 mg.L⁻¹, e para o ensaio 3 as concentrações utilizadas foram de 0,185; 0,37; 0,75; 1,5; 3 mg.L⁻¹. O DMSO (0,01%) utilizado na diluição também foi analisado com o intuito de verificar a influência do mesmo sobre o ensaio. O controle de água do mar foi preparado com a água filtrada utilizada na diluição

Para o preparo da solução estoque de Metformina foram pesados 100 mg do composto, sendo diluído em 100 mL de água, obtendo-se a concentração 1000 mg.L⁻¹. A partir dessa solução estoque foram preparadas as concentrações testadas nos ensaios crônicos. Para o ensaio 1, foram preparadas as concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10; 100 mg.L⁻¹. Para o ensaio 2, foram usadas as concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250; 500 mg.L⁻¹, e para o ensaio 3 as concentrações utilizadas foram de 62,5; 125; 250; 500; 1000 mg.L⁻¹.

3.7.2 Ensaio para avaliação de efeito crônico (Desenvolvimento embrionário) com *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia)

Este método de ensaio foi realizado de acordo com o protocolo da ASTM (1992) com pequenas adaptações de Zaroni *et al.*, (2005). O procedimento de ensaio consistiu na exposição de ovos recém-fertilizados a diferentes concentrações dos compostos 17 α -etinilestradiol e metformina por um período de 48 horas, tempo o qual ocorre o desenvolvimento embrionário do organismo até o estágio de larva véliger, então avaliam-se retardos e/ou

anomalias nesse desenvolvimento. As condições necessárias para esse ensaio encontram-se na Tabela 5.

Após o processo de obtenção de gametas e lavagem dos óvulos, preparou-se 25 mL de uma solução espermática, utilizando 0,5mL de esperma + 24,5 mL de água do mar filtrada. No recipiente com os óvulos promoveu-se a fecundação através da adição gradual de 1-2 mL da solução espermática preparada (FIG 7) e sendo mantido sob frequente porém leve agitação. Com auxílio de uma câmara de Sedgwick-Rafter, foi estimada a densidade de óvulos fecundados e, cerca de 500 embriões foram colocados em cada frasco-teste, iniciando-se então o período de incubação em câmara de germinação com fotoperíodo (48 horas).

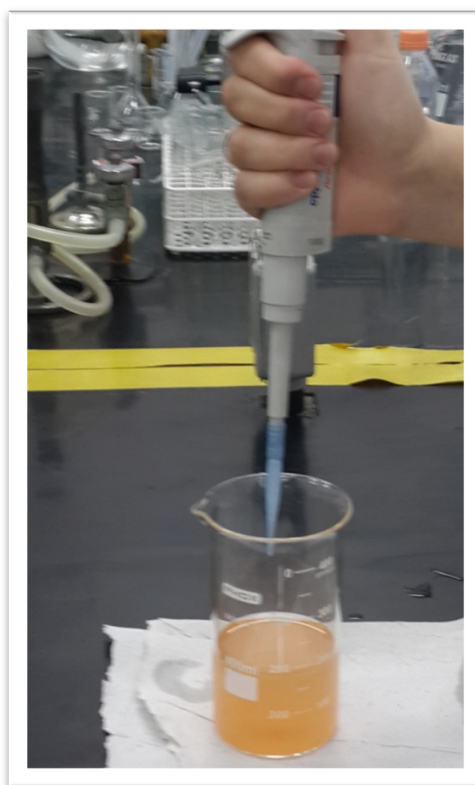


Figura 7. Fecundação dos óvulos.

Ao término do período de incubação foi feita a fixação com 0,5 mL de formol (10%) tamponado com bórax para contagem, onde os 100 primeiros organismos encontrados foram avaliados (Tab. 5).

Tabela 5. Parâmetros necessários para o Ensaio Embriolarval

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±1° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Fotoperíodo	12 a 16 horas de luz
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	48 h
Frasco-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15mL
Volume das soluções-teste	10mL
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	50 óvulos fecundados por mililitro
Idade do organismo-teste	Ovos recém fecundados
Efeito observado	Atraso ou anormalidade no desenvolvimento embriolarval
Validade do ensaio	Mínimo de 70% de larvas normais nos controles
Alimentação	Sem

Durante a contagem foi determinada a porcentagem de embriões normais (valvas simétricas fechadas e massa visceral presente na porção interna da concha) e/ou anormais (organismos que não se desenvolveram até larva “D”, que tenham atingido este estágio, mas com extravasamento de massa visceral e/ou com a concha aberta) nas diferentes concentrações testadas, em relação ao controle.

3.8 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas, sendo assim avaliados quanto à normalidade, homogeneidade de variância por meio do método Chi-quadrado e teste de Bartlett, respectivamente. Posteriormente, para identificar diferenças entre as médias das concentrações testadas com relação ao controle e identificar CENO e CEO, foi empregado o Teste de Dunnett. Para todas as análises, diferenças significativas foram determinadas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do programa TOXSTAT 3.5.

Para estipular a CE_{50} para os ensaios agudos foi utilizado o Trimmed Sperm Karber. Nos ensaios crônicos foi utilizado o ICP para calcular CI_{50} .

4. RESULTADOS

4.1 Análises físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas (TAB.6) permaneceram dentro dos parâmetros necessários para o desenvolvimento do ensaio, da mesma maneira que os controles de água do mar e DMSO não apresentaram toxicidade, portanto os efeitos observados nas concentrações testadas podem ser atribuídos aos fármacos analisados.

Tabela 6. Resultados das análises físico-químicas das soluções estoque

Solução estoque	OD(mg.L⁻¹)	pH	Salinidade
17α-etinilestradiol 10 mg.L⁻¹	6,2	7,88	35
17α-etinilestradiol 1 mg.L⁻¹	6,1	7,93	35
Metformina 200mg.L⁻¹	6,0	7,98	33

4.2 TIER I – Ensaios de Toxicidade Aguda

Os resultados dos ensaios agudos realizados estão apresentados nas Figuras 8 e 9.

4.2.1 17 α -etinilestradiol

No ensaio 1 foi possível observar uma diferença significativa entre o controle e as concentrações testadas a partir de 5 mg.L⁻¹. A partir desse ensaio foi possível determinar um intervalo entre as concentrações testadas que permitisse uma melhor determinação da CE₅₀. Nos ensaios 2 e 3 foi possível observar diferença significativa na taxa de fertilização a partir de 4 mg.L⁻¹ e 3 mg.L⁻¹, respectivamente. Todas as concentrações que apresentaram diferenças significativas do controle tiveram sua taxa de fertilização negativamente influenciada pelo EE2.

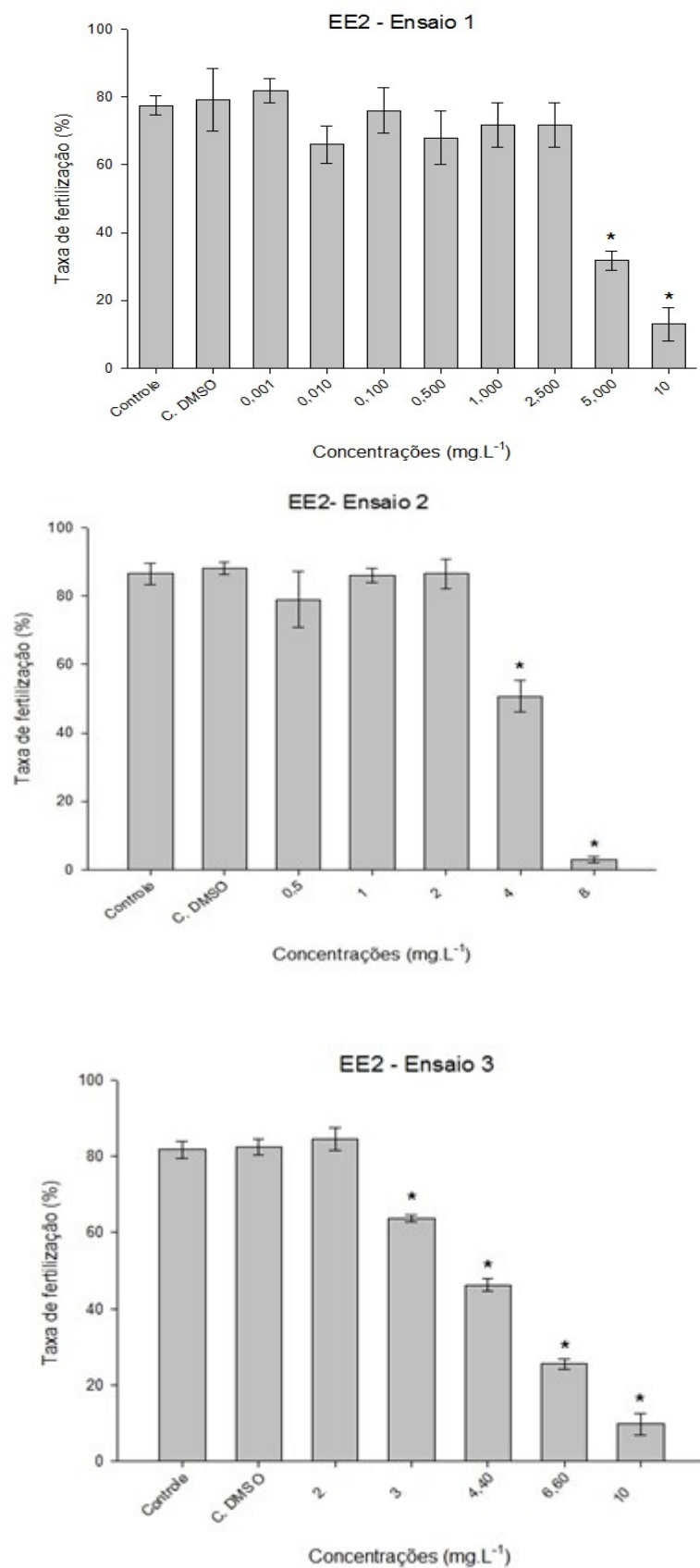


Figura 8. Ensaios agudos EE2 – taxa de fertilização. * significa diferença significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$).

A CE_{50} foi calculada para todos os ensaios e está representada na tabela 7. A CE_{50} média para os ensaios foi de 4.70 mg.L^{-1} .

Tabela 7. CE_{50} do 17α -etinilestradiol

Ensaio	CE_{50} 17α -etinilestradiol		LC Sup.
	$CE_{50}(\text{mg.L}^{-1})$	LC Inf.	
1	5.02	4.48	5.63
2	4.27	3.95	4.60
3	4.82	4.44	5.24
Média	4.70	-	-

4.2.2 Metformina

No ensaio agudo 1 da Metformina não foi possível observar nenhuma diferença significativa entre as concentrações testadas e o controle. Como a concentração mais alta testada não apresentou efeitos na taxa de fertilização, e as concentrações ambientais da Metformina de trabalhos pretéritos não são maiores do que 1000 mg.L^{-1} , não foram realizados outros ensaios agudos com esse fármaco.

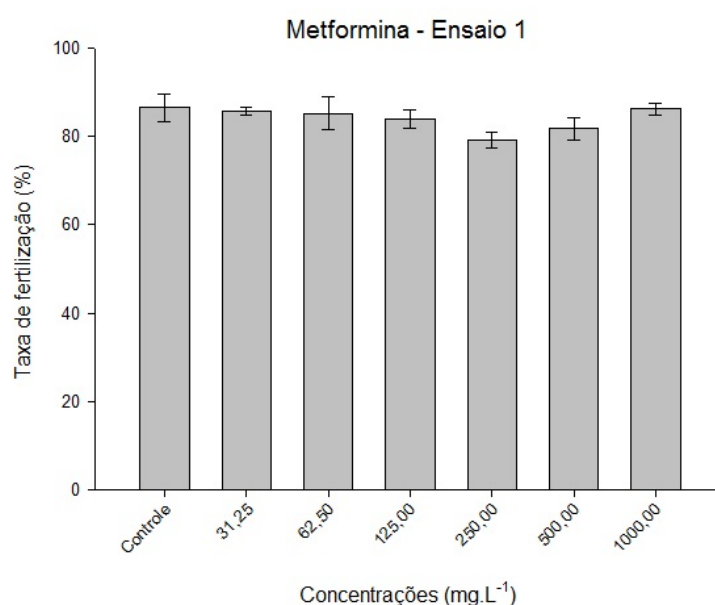


Figura 9. Ensaio agudo Metformina – taxa de fertilização.

4.3 TIER II - Ensaio Crônico – Desenvolvimento Embriolarval

Os resultados dos ensaios crônicos do 17α -etinilestradiol e da Metformina referentes ao desenvolvimento embriolarval do mexilhão *Perna perna* podem ser observados, respectivamente, nas figuras 10 e 11. Os valores de CENO, CEO e CI_{50} dos ensaios de cada um dos compostos constam nas Tabelas 8 e 9

A partir do ensaio 1 com EE2 foi possível determinar uma faixa mais estreita de concentrações para identificar uma CI_{50} com mais precisão nos ensaios posteriores. No ensaio 1 foi observada uma diferença significativa em comparação ao controle a partir de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. No ensaio 2 é possível observar diferença no desenvolvimento embriolarval a partir de 1 mg.L^{-1} , e no ensaio 3 a partir de $0,185 \text{ mg.L}^{-1}$. Todas as concentrações que apresentaram diferenças significativas do controle tiveram seu desenvolvimento embriolarval negativamente influenciada pelo EE2, apresentando conchas vazias, larvas com extrusão de material, concha deformada ou massa amorfa.

A partir dos ensaios preliminares com metformina foi possível determinar uma faixa mais estreita de concentrações para identificar uma CI_{50} com mais precisão nos ensaios posteriores. No ensaio preliminar foi observada uma diferença significativa em comparação ao controle a partir de 100 mg.L^{-1} . No ensaio 2 não foi possível observar diferença no desenvolvimento embriolarval, e no ensaio 3 foram observadas diferenças a partir de 250 mg.L^{-1} . Todas as concentrações que apresentaram diferenças significativas do controle tiveram seu desenvolvimento embriolarval negativamente influenciada pela metformina, apresentando conchas vazias, larvas com extrusão de material, concha deformada ou massa amorfa.

Foi calculada para o EE2 a CI_{50} média de $0,91 \text{ mg.L}^{-1}$ a partir dos ensaios e CENO e CEO médios de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,56 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. Para a metformina, foi calculada a CI_{50} média de 256 mg.L^{-1} e CENO e CEO médios de $67,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e 175 mg.L^{-1} , respectivamente, a partir dos ensaios 2 e preliminar.

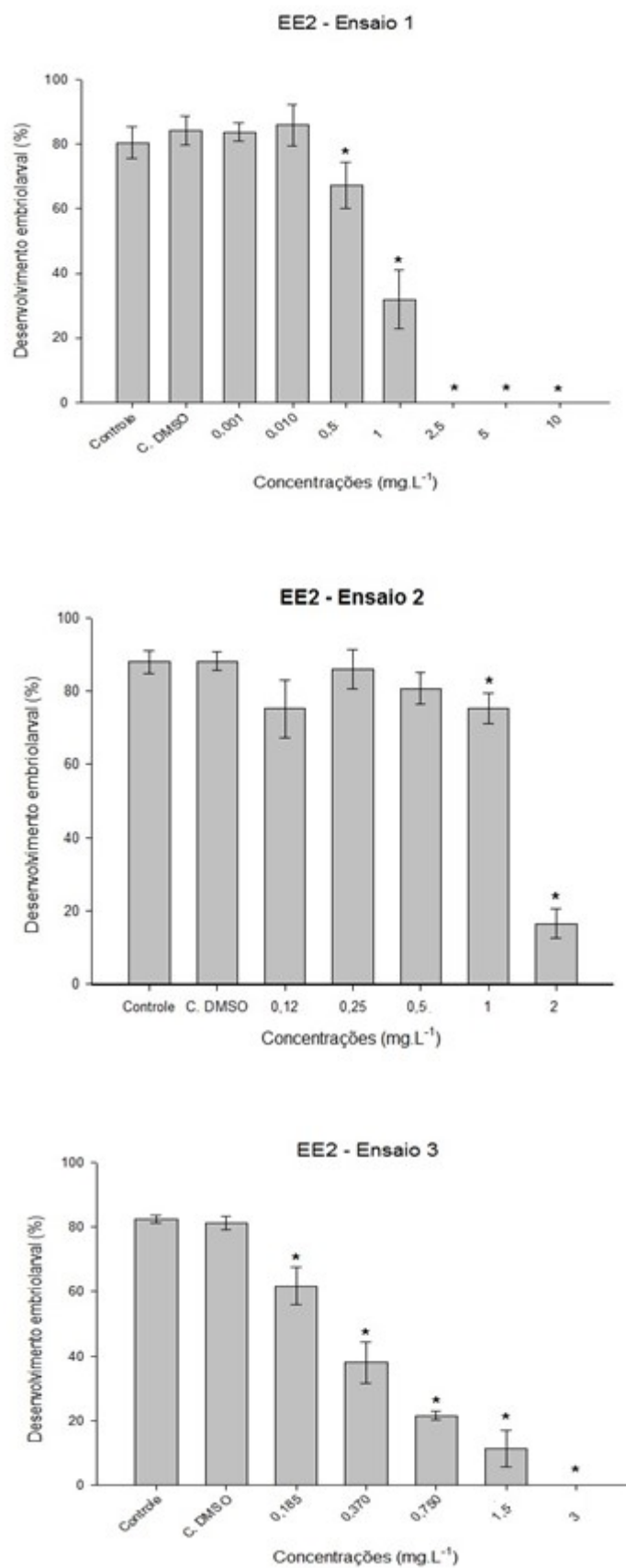


Figura 10. Ensaios crônicos 17 α -etinilestradiol. * significa diferença significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$).

Tabela 8. Concentrações de efeito e CENO (mg.L^{-1}) obtidas nos ensaios crônicos do EE2.

Ensaio	CENO	CEO	CI50	Desvio Padrão
1	0,01	0,5	0,87	± 0.0391
2	0,5	1,0	1,53	± 0.0226
3	-	0,185	0,34	± 0.0235
Média	0,3	0,56	0,91	-

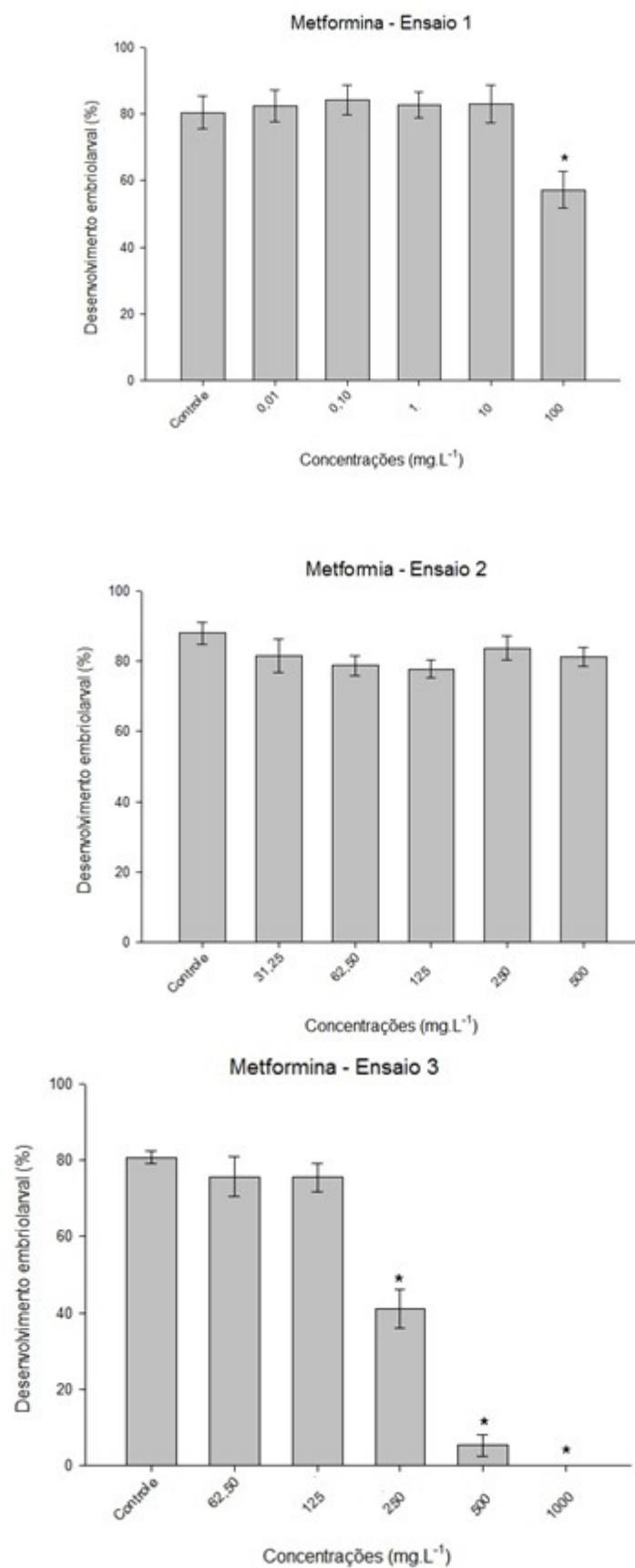


Figura 11. Ensaios crônicos Metformina. * significa diferença significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$).

Tabela 9. Concentrações de efeito e CENO (mg.L⁻¹) obtidas nos ensaios crônicos de Metformina.

Ensaio	CENO	CEO	CI50	Desvio Padrão
1	10,0	100,0	-	-
2	-	-	-	-
3	125,0	250,0	256,0	±12,31
Média	67,5	175,0	-	-

4.4 Avaliação do risco

4.4.1. Concentrações ambientais - Measured Environmental Concentration (MEC)

As concentrações ambientais de ambos os compostos encontrados em ambientes aquáticos estão apresentados na Tab. 10.

Tabela 10. Concentrações ambientais em diferentes localidades

Fármaco	MEC	Localização	Referência
EE2 (ng.L ⁻¹)	0,2	França	Vulliet e Cren-Olivé, 2011
	3,01–4,67	Estuário de Acushet, EUA	Zuo et al. (2006)
	<0,80–34,00	Lagoa Venice, baía fechada do mar Adriático	Pojana et al. (2007)
	n.d–25,00	Penha, RJ, Brasil. Água superficial	Sodré et al. (2010)
	1- 15	Efluentes de esgoto tratado - Alemanha	Ternes, 1999
	9-42	Efluentes de esgoto tratado - Canadá	Ternes, 1999
	7,00–24,00	Jiaozhou Bay, Qingdao, China	Zhou et al. (2011)
Metformina (µg.L ⁻¹)	0,1006	França	Vulliet& Cren-Olivé,2011
	1,82	Ootmarsum - Holanda	M. Oosterhuis et al. 2013
	1,22	Enschede - Holanda	M. Oosterhuis et al. 2013
	6,4	Efluentes de esgoto tratado no sul da Alemanha	C. Trautwein et al. 2014

4.4.2 Avaliação do Risco de acordo com EMEA (2006)

De acordo com o procedimento descrito no item 3.1, a Tabela 11 apresenta os resultados dos quocientes de risco conforme proposto por EMEA 2006.

Tabela 11. Quociente de Risco

Fármaco	MEC (mg.L ⁻¹)	PNEC (mg.L ⁻¹)	QR (MEC/PNEC)	Risco
EE2	0,000042 (TERNES, 1999)	0,0001	0,42	Médio
Metformina	0,0064 (C. TRAUTWEIN et al. 2014)	1,25	0,005	Baixo

4.4.3 Avaliação do Risco de acordo a Diretiva Europeia 93/67/EEC

Baseado nos resultados de CI50 dos ensaios crônicos de curta duração, e seguindo a Diretiva Europeia 93/67/EEC que classifica as substâncias de acordo com as concentrações de efeito, o EE2 foi classificado como muito tóxica, enquanto a metformina foi classificada como não tóxica. A Tabela 12 apresenta os resultados.

Tab. 12. Toxicidade dos compostos baseado na classificação da Diretiva Europeia 93/67/EEC.

Fármaco	Extremamente tóxico	Muito Tóxico	Tóxico	Perigoso	Não Tóxico
CI50 (mg.L ⁻¹)	<0,1	0,1-1	1-10	10-100	>100
EE2					
Metformina					

5. DISCUSSÃO

Existe uma preocupação crescente sobre os impactos de desreguladores endócrinos presentes no ambiente aquático, pois, são capazes de alterar as funções fisiológicas da vida selvagem e dos seres humanos. Efluentes de esgoto são a principal fonte desses químicos em corpos d'água, e sua presença vem sendo associada com uma gama de impactos reprodutivos, particularmente em peixes, incluindo a indução da troca de sexo desses animais, redução das taxas hormonais e a redução na produção de gametas e capacidade de fertilização (FOLMAR *et al.*, 1996). Além desses efeitos no desenvolvimento e funções reprodutivas, a exposição a águas tratadas tem sido associada com efeitos na saúde que vão além dos reprodutivos, incluindo danos nos genes, imunossupressão e redução no crescimento de seres vivos. Alguns desses efeitos aparecem mais em concentrações menores do que aquelas que causam a feminilização do sistema reprodutor.

O potencial das águas de esgoto tratado afetar a saúde dessas formas é de grande preocupação. A imunossupressão, por exemplo, pode levar a uma suscetibilidade maior de contrair doenças; danos nos genes podem causar maior mortalidade de embriões, desenvolvimento anormal ou câncer (DESBROW *et al.*, 1998).

Hoje em dia, existem evidências, provenientes do campo e do laboratório, que demonstram efeitos na reprodução de organismos expostos a esses efluentes que contém estrógenos, que são esteroides, tanto naturais quanto sintéticos. Um dos estrógenos que fazem parte desse grupo é o 17 α -etinilestradiol (FILBY *et al.*, 2014). A alta resistência do EE2 a degradação e sua grande biodisponibilidade no corpo humano são alguns dos motivos desse composto ser um eficiente contraceptivo (DELCLOS *et al.*, 2009). Porém, são essas mesmas características, que o tornam estável contra oxidação, permite que o EE2 entre no ambiente através de esgoto doméstico.

Nos ensaios de toxicidade aguda realizados no presente trabalho foram observadas diferenças significativas na fertilização do mexilhão *Perna perna* mesmo em baixas concentrações de EE2 (3 mg.L⁻¹) em relação ao controle, demonstrando potencial em causar efeitos adversos na reprodução desses organismos.

Nos ensaios crônicos de desenvolvimento embriolarval foram encontradas diferenças significativas na quantidade de larvas anômalas; sem conteúdo visceral, com extravasamento de material, retardo no desenvolvimento e deformidade de concha; nos tratamentos a partir da concentração de $0,185 \text{ mg.L}^{-1}$ (ensaio 2) de EE2 em relação ao controle, demonstrando que a partir dessa concentração já existem prejuízos na reprodução e desenvolvimento desse organismo.

Ensaios realizados por Leonard *et al.* (2014) empregaram mexilhões de água doce para avaliação do efeito do EE2 no metabolismo, comportamento e reprodução desses animais. A partir de 12 dias de exposição ao EE2 a 1000 ng.L^{-1} , houve um aumento significativo na mortalidade das larvas, demonstrando também a influência desse hormônio no desenvolvimento desses organismos, mesmo em baixas concentrações.

Existe uma ampla gama de estudos que mostram os efeitos do EE2 na reprodução e desenvolvimento de organismos terrestres e aquáticos. No trabalho feito por Hogan *et al.* (2008) foi observada a alteração entre a proporção entre os sexos da espécie *Rana pipiens*, durante seu desenvolvimento. Nesse estudo também foi observado um atraso de duas semanas para girinos chegarem ao clímax da sua metamorfose quando expostos ao EE2, e , quando girinos recém eclodidos foram expostos ao hormônio, a proporção entre os sexos mostrou uma tendência maior para o sexo feminino, comparado com o controle.

Em estudo *in vitro* com peixes feito por Colman *et al.* (2009), foi demonstrada a maior potência do efeito do EE2 no comportamento de corte e na agressividade de peixes-zebra em comparação ao estradiol e a estrona, que também são hormônios relacionados a reprodução.

No estudo feito por Filby *et al.*, (2014), foi demonstrado que estrogênios presentes em águas residuais contribuem para uma gama de efeitos subletais adversos, além da desregulação endócrina, como a redução de linfócitos, que indica imunossupressão e aumento de granulócitos e trombócitos no sistema circulatório de peixes expostos a um efluente com grande quantidade de estrógenos, sendo o EE2 um deles, indicando uma reação imunológica não específica. O EE2 não causou nenhum efeito administrado individualmente.

Também foram identificadas diferenças nos efeitos do EE2 em algumas respostas de peixes quando esse estrogênio é administrado como parte de um efluente complexo. Para os machos, houve dano genotóxico nas células gonadais e do sangue, nos grupos tratados ou com o EE2 isolado ou com o EE2 adicionado num efluente.

Em trabalho realizado por Caldwell *et al.* (2012), a partir de ensaios toxicológicos com peixes usando a metodologia de distribuição da sensibilidade de espécie, foram calculados os PNECs da estrona, estradiol, estriol e 17 α -etinilestradiol. São eles, respectivamente 6; 2; 60 e 0,1 ng.L⁻¹. No presente estudo foi calculado o valor de 0,0001 mg.L⁻¹ para a PNEC do EE2. As diferenças entre os PNECs calculados podem ter ocorrido devido às diferentes metodologias utilizadas em laboratório, por serem utilizados organismos diferentes ou em estágios da vida diferentes, não respondendo da mesma forma aos compostos.

O aumento de casos de diabetes e obesidade alcançou dimensões epidêmicas no século 21 e em 1995 foi estimado que 135 milhões de pessoas apresentassem casos de diabetes (KING *et al.*, 1998), e até o ano de 2013 é estimado que esse número aumente para 366 milhões, com aumento de diagnósticos em países em desenvolvimento. Esse aumento em países em desenvolvimento seria devido a melhora econômica e consequentemente a adoção de um estilo de vida que contribui para a evolução de um quadro de diabetes (WILD *et al.*, 2004), aumentando assim as prescrições de metformina, por ser o antidiabético mais conveniente para o tratamento da doença.

No trabalho realizado por Vulliet e Cren-Olivé (2011), foram pesquisados, em águas com destino ao consumo humano, uma série de fármacos na região de Rhône-Alpes. A metformina foi encontrada em 58% dessas águas, no caso de águas superficiais, quando se trata de águas subterrâneas, esse valor é de 10%. A entrada de metformina no sistema de águas para beber chega a 1470 ng.L⁻¹, o que corresponde a 0,0751 vezes a dose diária terapêutica prescrita para um adulto. Trautwein *et al.*, 2014 realizou estudos sobre a proporção entre as quantidades de metformina e guanilurea em estações de tratamento de esgoto e observou que a metformina era predominante nos afluentes e a guanilurea era predominante nos efluentes.

Para esses estudo de Vulliet e Cren-Olivé (2011), foi possível concluir que esses valores não indicam riscos para a população francesa. Nas avaliações de risco calculadas neste estudo, a metformina foi classificada com um quociente de risco baixo e não tóxica, concordando com o estudo feito na França e na Holanda, onde dados toxicológicos indicam que as concentrações de metformina em águas superficiais e em água de beber não representam risco à saúde humana, porém são insuficientes os dados ecotoxicológicos experimentais para excluir todos os riscos causados pelo fármaco (TER LAAK e BAKEN, 2014).

No presente trabalho não foi possível calcular a CE_{50} para Metformina. No entanto, os ensaios crônicos de desenvolvimento embrionaral apresentaram larvas com desenvolvimento anômalo ou retardado nos tratamentos a partir da exposição de 48 horas à concentração 100 mg.L^{-1} (ensaio 1).

Niemuth e Kapler (2015) encontraram diferenças significativas nas características sexuais de peixes entre um grupo controle e um grupo tratado com $14 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de metformina. Quando expostos durante todo o seu ciclo de vida à metformina, peixes machos apresentaram gônadas intersexo. Apesar disso, esses machos foram capazes de se reproduzir e produzir ovos viáveis, sugerindo que a metformina pode impactar o sistema endócrino através da sinalização da insulina, mas sem desregular a esteroidogênese.

Estudos anteriores feitos por Niemuth *et al.* (2014), demonstram a indução da expressão de vitelogenina no fígado de peixes devido a exposição à metformina, e o aumento do mRNA da vitelogenina demonstrou ser um biomarcador sensível para os peixes-zebra (MUNCKLE e EGGEN, 2006). A expressão dessa proteína é dada através de receptores de estrogênio no fígado, porém a metformina não se parece estruturalmente com hormônios desreguladores endócrinos e seu efeito pode não ser resultado de ligações com receptores de hormônios, mas resultado dos efeitos que a metformina tem na sinalização de insulina.

Cleuvers (2003) realizou bioensaios com *D. magna*, *D. subspicatus* e *Lemna minor* e calculou a CE_{50} para diferentes compostos, incluindo

Metformina. Para os três organismos, as CE_{50} encontradas foram 64 mg.L^{-1} , $>320 \text{ mg.L}^{-1}$ e 110 mg.L^{-1} , respectivamente e em estudos feitos por Crane et al. (2006), encontrou uma CE_{50} de 110 mg.Kg^{-1} para plantas. Cleuvers (2003) cita a necessidade de estudos posteriores com outras espécies como peixes e macroinvertebrados bentônicos, além de serem também necessários ensaios crônicos para avaliar o potencial tóxico dos compostos testados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos como este são importantes, pois eles podem dar respaldo a regulamentações futuras que podem servir de ferramenta para a gestão de ambientes aquáticos e para a criação de listas de compostos prioritários para o seu monitoramento nesses ambientes.

O EE2 apresentou efeitos agudos e crônicos sobre a reprodução de *P. perna*, evidenciando a interação desse composto sobre o metabolismo dessa espécie não-alvo e caracterizando o EE2 como “muito tóxico”. No entanto, as concentrações de efeito estão acima das reportadas para ambientes aquáticos, e o risco calculado foi considerado médio.

A metformina não causou efeito agudo a partir dos ensaios de fertilização, e toxicidade crônica foi observada em concentrações muito acima das matrizes ambientais, o que caracterizou esse fármaco como “não-tóxico” e o risco como baixo.

Estudos posteriores levando em consideração menores níveis de organização celular e exposições de longo prazo são recomendados para um melhor entendimento do mecanismo de ação desses compostos e do risco para ecossistemas marinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D. *et al.* *Physiological and Cellular Responses in Two Populations of the Mussel Perna perna Collected at Different Sites from the Coast of São Paulo, Brazil.* **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 217-225, mar, 2005.

ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, Aida Soraya; PRAVEENA, Sarva. *Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review.* **Environment International**, v. 69, p. 104-119, 2014.

BOXALL, A. *New and Emerging Water Pollutants arising from Agriculture.* **OECD Publishing**, Reino Unido, 49 p., 2012.

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

CALDEIRA, D. PIVATO, L. S. **Descarte de Medicamentos Domiciliares Vencidos:** O que a Legislação Preconiza e o que Fazer? f.10. Artigo (Graduação em Farmácia) – Curso de Farmácia, UNINGÁ, Unidade de Ensino Superior Ingá, Maringá, 2010.

CALDWELL, D.J. *et al.* *Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 β -estradiol, estriol, and 17 α -ethynylestradiol.* **Environment Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1396 – 1406, abr, 2012.

CALDWELL, D. J. *et al.* *An assessment of potential exposure and risk from estrogens in drinking water.* **Environment Health Perspective**, n. 118 v. 3, p. 338–344, 2010.

COLMAN, J. R. *et al.* *Effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethynylestradiol, on aggression and courtship behaviour in male zebrafish (Daniorerio).* **Aquatic Toxicology**, n. 91, p. 346–354, 2009.

DECLOS, K.B. *et al.* *Overlapping but distinct effects of genistein and ethynylestradiol (EE2) in female Sprague-Dawley rats in multigenerational reproductive and chronic toxicity studies.* **Reproductive Toxicology**, n. 27: p. 117–132, 2009.

DESBROW, C. *et al.* *Identification of estrogenic chemicals in STW effluent: Chemical fractionation and in vitro biological screening.* **Environment Science Technology**, n. 32, p. 1549-1558, 1998.

FERNANDO, M. *et al.* *Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments*. **Talanta**, n. 69, p. 334-342, nov, 2006.

FILBY, A. *et al.* *Health Impacts of Estrogens in the Environment, Considering Complex Mixture Effects*. **Environmental Health Perspectives**, Carolina do Norte, v. 115, n. 12, p. 1704-1710, dez, 2007.

FOLMAR, C.D. *et al.* *Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (Cyprinus carpio) captured near a major metropolitan wastewater treatment plant*. **Environmental Health Perspectives**, Carolina do Norte, n. 104, p. 1096-1107, 1996.

GARCÍA, S. *et al.* *Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants*. **Ecotoxicology**, Nova Iorque, n. 23, p. 1517-1533, jul, 2014.

GIRI, P.; PAL, C. *Ecotoxicological Aspects of Pharmaceuticals on Aquatic Environment*. **American Journal of Drug Discovery**, Delaware, v. 1, n. 1, p. 10-24, nov, 2014.

HERNANDO *et al.* *Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments*. **Talanta**, n. 69, p. 334-342, 2006.

JONES, O.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. *Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals*. **Water Research**, n. 36, p. 5013-5022, mai 2002.

LARSSON, D.G.J.; DE PEDRO, C.; Paxeus, N. *Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals*. **Journal of Hazardous Materials**, n. 148, p. 751-755, 2007.

MAGALHÃES, D.; FERRÃO FILHO, Aloysio. *A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos*. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 355-381, jul, 2008.

MICHAEL, I. *et al.* *Metabolites and Transformation Products of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment as Contaminants of Emerging Concern*. In: LAMBROPOULOU, Dimitra; NOLLET, Leo. *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment: Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks*. Ed. 1. Wiley, 2014. Capítulo 14, p. 425-469.

NIEMUTH, N. *et al.* *Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish*.

Environmental Toxicology and Chemistry, Hoboken, v. 34, n. 2, p. 291-296, out, 2014.

NIEMUTH, N.; KLAPER, R. *Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish*. **Chemosphere**, Milwaukee, v. 135, p. 38–45, set, 2015.

NUNES, B. Fármacos no ambiente: implicações ecotoxicológicas. **CAPTAR**, Aveiro, v. 2, n. 1, p. 9-20, 2010.

OECD. *Fish, prolonged toxicity test: 14-day study*. **OECD guidelines for testing chemicals Guideline**, n. 204, 9p, 1984.

OOSTERHUIS, M.; SANCHER, F; TER LAAK, T.L. *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**, n.442, p. 380-388, 2013

POJANA, P. *et al. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon*. **Environment International**, v. 33, p. 929-936, 2007.

RIVA, F.; ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S. *Prioritization and analysis of pharmaceuticals for human use contaminating the aquatic ecosystem in Italy*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 106,p. 71–78, mar, 2015.

SANTOS, L. *et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*. **Journal of Hazardous Materials**, n. 175, p. 45-95, out, 2010.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; BASKARAN, S.; KENNEDY, I. R. *Ecological relative risk (EcoRR): another approach for risk assessment of pesticides in agriculture*. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, n.91, p.37–57, 2002.

SODRÉ, F., *Pescara I.; Montagner Jardin WF. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. **Microchem**, n. 96, p. 92–98, 2010.

SMITAL, T. *et al. Emerging contaminants: pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms*. **Fundamental and molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2004. Disponível em: <<http://sciencedirect.com>>. Acesso em: 14 set. 2015.

TER LAAK, T.; BAKEN, K. *The occurrence, fate and ecological and human health risks of metformin and guanylurea in the water cycle - A literature review.* **KWR**, Nieuwegein, n. 2014.001, p. 1-26, 2014.

TERNES, A. *et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I: Investigations in Germany, Canada and Brazil.* **The Science of the Total Environment**, Carolina do Norte, n. 225, p. 81-90, 1999.

TRAUTWEIN, C. *et al. Occurrence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanylurea in several compartments of the aquatic cycle.* **Environment International**, n. 70, p. 203–212, 2014.

TRIBESS JR, A.; ZANCANARO, V. Descarte de medicamentos domiciliares e impacto ambiental: conscientização da população no município de Caçador/SC. **Revista Extensão em Foco**, Palotina, v. 1, n. 1, p. 54-58, dez, 2013.

TRUHAUT, R. *Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives.* **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, n. 2, p. 151-173, set, 1977.

USEPA. *Technical support document for water quality-based toxic control.* **EPA, Office of Water**. Washington, v. 1, 135 p., mar, 1984.

VULLIET, E; CREN-OLIVÉ, C. *Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption.* **Environmental Pollution**, Solaize, v. 159, n. 10, p. 2929-2934, out, 2011.

ZARONI, L. *et al. Toxicity Testing with Embryos of Marine Mussels: Protocol Standardization for Perna perna (Linnaeus, 1758).* **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, n. 74, p. 793-800, jan, 2005.

ZUO, Y.; ZHANG, K.; DENG, Y. *Occurrence and photochemical degradation of 17 α ethinylestradiol in Acushnet River Estuary.* **Chemosphere**, v. 63:, p.1583–1590, 2006;

ZHOU *et al. Distribution of estrogens along Licun River in Qingdao, China.* 2011 3rd international Conference on Environmental Science and Information Application Technology (ESIAT 2011). **Environmental Science: Process & Impacts**, v. 10,p. 876–1880, 2011.