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

MONIKE SILVA DE FREITAS REIS

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE MEDICAMENTOS TUBERCULOSTÁTICOS: CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS ESTIMADAS NO MUNÍCIPIO DE CUBATÃO (ETE LAGOA E CASQUEIRO) E EFEITOS BIOLÓGICOS EM *DAPHNIA SIMILIS* E *ECHINOMETRA LUCUNTER*

SANTOS
2021

MONIKE SILVA DE FREITAS REIS

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE MEDICAMENTOS TUBERCULOSTÁTICOS: CONCENTRAÇÕES AMBIENTAIS ESTIMADAS NO MUNÍCIPIO DE CUBATÃO (ETE LAGOA E CASQUEIRO) E EFEITOS BIOLÓGICOS EM *DAPHNIA SIMILIS* E *ECHINOMETRA LUCUNTER*

Dissertação apresentada a Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ecologia, sob a orientação do Profa. Dra. Luciana Lopes Guimarães e coorientação do Prof. Dr. Fabio Hermes Pusceddu.

SANTOS

2021

615.7040724 Reis, Monike Silva de Feitas.
R311a Avaliação ecotoxicológica de medicamentos tuberculostáticos: concentrações ambientais estimadas no município de cubatão (ete lagoa e casqueiro) e efeitos biológicos em *daphnia similis* e *echinometra lucunter*. / Monike Silva de Freitas Reis.
2021.
84 f.
Orientadora: Profa. Dra. Luciana Lopes Guimarães.
Coorientador: Prof. Dr. Dr. Fabio Hermes Pusceddu

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Santos, SP, 2021.

1. Isoniazida. 2. Pirazinamida. 3. Fármacos no meio ambiente. 4. Ecotoxicologia. 5. Concentração Ambiental Estimada. I. Guimarães, Luciana Lopes. II. Pusceddu, Fabio Hermes. III. Avaliação ecotoxicológica de medicamentos tuberculostáticos: concentrações ambientais estimadas no município de cubatão (ete lagoa e casqueiro) e efeitos biológicos em *daphnia similis* e *echinometra lucunter*.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

DEDICATÓRIA

Á minha mãe Lucy (in memoriam) que sempre vai ser o meu maior exemplo de como deixar um legado para as gerações seguintes.

À minha Vó Edna/Vô Mauro e Tia Jane que ajudaram financeiramente e emocionalmente para que este sonho pudesse ser concretizado.

Ao meu pai, Carlos de Freitas, que tanto acreditou (e acredita!) no meu potencial, sendo exemplo de determinação, persistência e bom humor.

Ao meu esposo, Adriano, que nos momentos mais difíceis esteve ao meu lado, aguentando as ausências e cansaço físico/mental, sempre disposto a ajudar.

Á minha irmã Michelle, que muitas vezes foi luz e alegria nos momentos certos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradecer a Deus pela oportunidade de estar concretizando mais um sonho com muita saúde, em um ano tão difícil como 2020.

Agradeço à minha família, que muitas vezes aguentaram as ausências, reclamações, choros etc., mas nunca desacreditaram do meu potencial. Pai, Michelle, Fernanda, Gustavo, Vó Edna, Vô Mauro, Tia Jane, Sogra, Sogro, Cunhadas.. essa conquista também é de vocês! Agradeço em especial aos meus sobrinhos, Helena e Théo, que durante este ano tão difícil nos agraciaram com os vossos nascimentos, onde muitas vezes foi a alegria que precisávamos nos momentos difíceis.

Ao meu esposo, Adriano, que sonhou junto comigo, foi meu companheiro na busca dos fármacos na USP, ajudou na formatação e principalmente, ajudou emocionalmente em todo esse processo. Considere-se um pseudo mestre!

Agradeço aos meus amigos e colegas, que fizeram tudo ser “mais leve”. Em especial, aos colegas do mestrado Juliana e Renato pela troca de informações e experiência.

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Luciana Lopes Guimarães, que tanto apoiou a minha entrada no mestrado desde a graduação. Agradeço as conversas, apoio, paciência, tempo disponibilizado, palavras de incentivo, estágio obrigatório e as cobranças realizadas da melhor forma possível. Ao meu coorientador Prof. Dr. Fábio Hermes Pusceddu, pelo apoio, paciência (dentro e fora do laboratório) e todo o conhecimento transmitido desde as aulas de toxicologia ambiental na graduação.

Ao Prof. Dr. Walber Toma por ter sido o primeiro incentivador da minha entrada ao mestrado; A Professora, colega de profissão e mestre em ecologia, Bárbara Del Rey, pelas conversas, apoio e troca de experiências.

A Prof. Nádia Araci Bou Chacra (USP), a Doutoranda Mirla Henostroza (USP) e o Sr. Gidel Soares (FURP) pelo fornecimento dos princípios ativos Etambutol e Rifampicina. Agradeço a Capitão-Tenente Carla Giordano Testa e a Dra. Carolina Drummond, ambas do Laboratório Farmacêutico da Marinha (RJ) pelo fornecimento dos princípios ativos Isoniazida e Rifampicina.

Agradeço à Andreia Quitéria e Danielle Fragoso, farmacêuticas da Vigilância Epidemiológica e do Programa de Tuberculose do município de Cubatão/SP, que forneceram os dados para o cálculo da CAE.

Agradeço a Universidade Santa Cecília, por fazer parte da minha vida e história desde o Ensino Médio, sendo a minha segunda casa durante anos, cedendo laboratórios, materiais e pela oportunidade da bolsa de estudo com o auxílio da CAPES. Agradeço ao Laboratório de Ecotoxicologia e ao Laboratório de Química (supervisão da Prof. Kátia) pelas portas abertas e confiança ao realizar os ensaios laboratoriais. Agradeço também, a Professora Ursulla, Sandra e Imaculada (secretaria) pela paciência, ajuda e conselhos na etapa final do mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Com o passar do tempo, o crescimento da produção de produtos farmacêuticos vem aumentando gradativamente e consequentemente, os resíduos destes produtos de forma inadequada no ambiente aquático também. Neste contexto, destaca-se a escassez de estudos Ecotoxicológicos sobre os medicamentos da classe dos tuberculostáticos no meio aquático. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar toxicidade ambiental dos fármacos tuberculostáticos utilizados como esquema padronizado pelo Ministério da Saúde para o tratamento de tuberculose, através do cálculo da concentração ambiental estimada em águas superficiais do município de Cubatão/SP, assim como foram avaliados os efeitos biológicos adversos nos organismos-testes *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter*. As concentrações ambientais previstas (CAE) foram calculadas entre os quatro fármacos tuberculostáticos (Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol) de acordo com a diretriz da Agência Europeia de Medicamentos (EMEA) (CHMP, 2006). Após, foram realizados ensaios de toxicidade em *D. similis* e *E. lucunter* com os fármacos Isoniazida e Pirazinamida. Os resultados das CAE para todos os fármacos tuberculostáticos incluídos no presente estudo apresentaram valores que superaram o limite máximo considerado pela EMEA de 0,01 $\mu g.L^{-1}$. Para o ensaio de toxicidade com D. *similis*, os fármacos Isoniazida e Pirazinamida apresentaram valores de CE_{50} respectivamente 69,97 $mg.L^{-1}$ e 44,49 $mg.L^{-1}$ sendo estes classificados como “nocivos” de acordo com a Diretiva da Comunidade Econômica Europeia (CEE) 93/67/CEE. Já para o ensaio de toxicidade com *E. lucunter*, os mesmos fármacos foram selecionados onde apresentaram valores de CI_{50}, classificando-os como “nocivos” de acordo com a Diretiva 93/67/CEE, são eles: Isoniazida (CI_{50} 23,66 $mg.L^{-1}$); Pirazinamida (CI_{50} 17,21 $mg.L^{-1}$). Os resultados desta pesquisa poderão servir como subsídios a novas legislações e a criação de programas governamentais que buscam soluções promovendo redução e até mesmo a eliminação de fármacos no ambiente aquático.

Palavras-Chave: Isoniazida. Pirazinamida. Fármacos no meio ambiente. Ecotoxicologia. Concentração Ambiental Estimada.

ABSTRACT

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF TUBERCULOSTATIC MEDICINES: PREDICTED ENVIRONMENTAL CONCENTRATIONS IN THE CUBATÃO (ETE LAGOA AND CASQUEIRO) AND BIOLOGICAL EFFECTS IN *DAPHNIA SIMILIS* AND *ECHINOMETRA LUCUNTER*

Over time, the growth in the production of pharmaceutical products is gradually increasing and, consequently, the residues of these products inappropriately in the aquatic environment as well. In this context, the scarcity of Ecotoxicological studies on drugs of the tuberculostatic class in the aquatic environment is highlighted. Thus, the present study aimed to assess the environmental toxicity of tuberculostatic drugs used as a standardized scheme by the Ministry of Health for the treatment of tuberculosis, by calculating the estimated environmental concentration in surface waters of the municipality of Cubatão / SP, as well as being recovered. the adverse biological effects on the testis organisms *Daphnia similis* and *Echinometra lucunter*. The predicted environmental conditions (CAE) were calculated among the four tuberculostatic drugs (Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamide and Etambutol) according to the European Medicines Agency (EMEA) Directive (CHMP, 2006). Afterwards, toxicity tests were carried out on *D. similis* and *E. lucunter* with the drugs Isoniazida and Pirazinamida. The results of the PPAs for all tuberculostatic drugs included in the present study evaluate values that exceeded the maximum limit considered by the EMEA of 0.01 $\mu g.L^{-1}$. For the toxicity test with *D. similis*, the drugs Isoniazid and Pyrazinamide values of EC_{50} values respectively 69.97 $mg.L^{-1}$ and 44.49 $mg.L^{-1}$, being classified as “harmful” according to the Directive of the European Economic Community (EEC) 93/67 / EEC. As for the toxicity test with *E. lucunter*, the same drugs were selected where higher IC_{50} values, classifying them as “harmful” according to Directive 93/67 / EEC, are: Isoniazid (IC_{50} 23.66 $mg.L^{-1}$); Pyrazinamide (IC50 17.21 $mg.L^{-1}$). The results of this research can serve as subsidies to new legislation and the creation of government programs that seek solutions promoting reduction and even elimination of drugs in the aquatic environment.

Keywords: Isoniazid. Pyrazinamide. Drugs in the environment. Ecotoxicological. Predicted Environmental Concentration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Níveis de organização biológica e respostas a poluentes..... 15
Figura 2 Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente..... 18
Figura 3 Localização do município de Cubatão na Região Metropolitana da Baixada Santista.... 20
Figura 4 Divisão de bairros do município de Cubatão/São Paulo..... 21
Figura 5 Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) existentes do município de Cubatão..... 22
Figura 6 Localização do sistema estuarino de Santos/SP..... 24
Figura 7 Canal de Piaçaguera inserido no sistema estuarino de Santos/SP, com ligação do município de Cubatão/SP..... 25
Figura 8 Incidência de casos de TB no Brasil por 100 mil habitantes..... 26
Figura 9 Expressão da imunidade protetora nos pulmões. Interação macrófago-linfócito e formação do granuloma da tuberculose..... 27
Figura 10 Transmissão e patologia do *M. tuberculosis*..... 28
Figura 11 Estrutura química do fármaco Rifampicina..... 31
Figura 12 Estrutura química do fármaco Isoniazida..... 32
Figura 13 Estrutura química do fármaco Pirazinamida..... 33
Figura 14 Estrutura química do fármaco Etambutol..... 33
Figura 15 Fêmea embrionada de *Daphnia similis*, organismo utilizado nos ensaios de toxicidade. 39
Figura 16 *Echinometra lucunter*, organismo utilizado nos ensaios de toxicidade..... 40
Figura 17 Mapa da baía de Santos representando o local de coleta (Ilha das Palmas – Guarujá/Santos)..... 40
Figura 18 Tanque com condições ideais para os ouriços-do-mar utilizados no ensaio..... 41
Figura 19 Materiais utilizados na preparação da água utilizada nas amostras do ensaio..... 43
Figura 20 Leitura e contagem dos organismos por concentração, com auxílio de lâmpada fluorescente..... 46
Figura 21 Diferenciação de gênero através da coloração dos gametas dos ouriços-do-mar – à esquerda, gênero feminino (coloração alaranjada) e à direita, gênero masculino (coloração branca)..... 47
Figura 22 Obtenção dos gametas através de estímulo por impulsos elétricos de 35V..... 47
Figura 23 Obtenção dos gametas através de aplicação de KCL..... 48
Figura 24 Coleta dos gametas do gênero feminino..... 48
Figura 25 Coleta dos gametas do gênero masculino..... 49
Figura 26 Câmara de Sedgwick-Rafter..... 50
Figura 27 Pluteus, larva de *Echinometra lucunter*..... 50
Figura 28 Resultado do ensaio de toxicidade com *Daphnia similis* quanto à exposição em diferentes concentrações de Isoniazida..... 53
Figura 29 Resultado do ensaio de toxicidade com *Daphnia similis* quanto à exposição em diferentes concentrações de Pirazinamida..... 54
Figura 30 Resultado do ensaio de toxicidade com *Echinometra lucunter* quanto à exposição em diferentes concentrações de Isoniazida..... 55
Figura 31 Resultado do ensaio de toxicidade com *Echinometra lucunter* quanto à exposição em diferentes concentrações de Pirazinamida..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema básico para o tratamento da TB em adultos e adolescentes..... 30

Tabela 2. Condições físico-químicas exigidas pela ABNT, para realização de ensaios com *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter*..... 45

Tabela 3. Fármacos tuberculostáticos utilizados nos ensaios e seus respectivos fornecedores..... 42

Tabela 4. Valores obtidos para o consumo anual e fator de penetração no mercado para as ETEs Lagoa e Casuqueiro..... 51

Tabela 5. Resultados de Fpen e CAE dos tuberculostáticos nas águas de superfície de Cubatão/SP, separados por ETE Lagoa e ETE Casqueiro..... 52

Tabela 6. Resultados dos ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* referente ao fármaco Isoniazida..... 53

Tabela 7. Resultados dos ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* referente ao fármaco Pirazinamida..... 54

Tabela 8. Resultados dos ensaios de toxicidade crônica com os fármacos tuberculostáticos com o organismo-teste *Echinometra lucunter*..... 56

Tabela 9. Classificação dos fármacos tuberculostáticos baseados na diretiva 93/67/CEE da União Europeia levando em consideração ensaios com organismos-teste *D. similis* e *E. lucunter*..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	-	Microlitro
ABNT	-	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	-	Análise de variância
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAE	-	Concentração Ambiental Estimada
CE50	-	Concentração Mediana Efetiva que causa imobilidade em 50% dos organismos expostos CEO- Concentração de Efeito Observado
CENO	-	Concentração de Efeito Não Observado
CETESB	-	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CHMP	-	Comittee for Medicinal Products for Human Use
CI50	-	Concentração de Inibição de 50% dos organismos expostos
CONAMA	-	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	-	Coeficiente de Variação
DFC	-	Dose fixa combinada
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácidodesoxirribonucleíco
DOTS	-	Directlly observed treatment short course
DP	-	Desvio Padrão
EMEA	-	European Medicines Agency
ETE	-	Estação de Tratamento de Esgoto
FURP	-	Fundação do Remédio Popular
HSZ	-	Esquema terapêutico com estreptomicina, isoniazida e pirazinamida
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICSU	-	Committee of the International Council of Scientific Unions
ISO	-	International Organization for Standardization
KatG	-	Enzima catalase/piroxidase
KCL	-	Cloreto de potássio
KOW	-	Coeficiente de Partição (octanol/ água)
LFM	-	Laboratório Farmacêutico da Marinha
Log	-	Logarítimo
mg/kg	-	Miligrama por kilo
$mg.L^{-1}$	-	Miligrama por litro
$ng.L^{-1}$	-	Nanogramas por litro
OMS	-	Organização Mundial da Saúde

pH	-	Potencial Hidrogeniônico
PNCT	-	Programa Nacional de Controle a Tuberculose
RHZ	-	Esquema terapêutico com rifampicina, isoniazida e pirazinamida
RNA	-	Ácido ribonucleico
SABESP	-	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
SP	-	São Paulo
SUS	-	Sistema Único de Saúde
TB	-	Tuberculose
TDO	-	Tratamento diretamente observado
EU	-	União Europeia
USEPA	-	United States Environmental Protection Agency
USP	-	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
1.1. Poluição Aquática 13
1.2. Ecotoxicologia aquática 14
1.3. Fármacos no Meio Ambiente 16
1.4. Município de Cubatão 19
1.4.1. ETE – Cubatão 21
1.4.2 O município de Cubatão no contexto da contaminação aquática 23
1.5. Tuberculose 25
1.5.1. Esquema terapêutico da Tuberculose 29
1.5.1.1. Rifampicina 31
1.5.1.2. Isoniazida 32
1.5.1.3. Pirazinamida 32
1.5.1.4. Etambutol 33
1.6. Legislações 34
2. OBJETIVOS 35
2.1. Objetivo Geral 35
2.2. Objetivos específicos 35
3. METODOLOGIA 35
3.1. Cálculo da Concentração Ambiental Prevista (CAE) 35
3.1.1. Acesso às informações para os cálculos da CAE 36
3.1.2. Cálculos da Concentração Ambiental Estimada (CAE) 37
3.1.3. Avaliação ecotoxicológica 38
3.2. ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS 38
3.2.1. Organismos-teste 38
3.2.1.1. Organismo-*teste Daphnia similis* 38
3.2.1.2. O*rganismo-teste Echinometra lucunter* 39
3.2.2. Manutenção dos organismos 41
3.2.2.1. Manutenção *Daphnia similis* 41
3.2.2.2. Manutenção *Echinometra lucunter* 42
3.2.3. Substâncias teste 42
3.2.4. Preparação da água de diluição nos ensaios Ecotoxicológicos. 43
3.2.4.1. Preparação da água de diluição para ensaios com *Daphnia similis* 43
3.2.4.2. Preparação da água de diluição para ensaios com *Echinometra lucunter* 43
3.2.5. Controle dos ensaios e preparação da solução estoque 44
3.2.6. Condições físico-químicas para a realização dos ensaios ecotoxicológicos 44
3.2.7. Realização dos ensaios 45
3.2.7.1. Ensaio de toxicidade com *D.similis* 45
3.2.7.2. Ensaio de toxicidade com *E.lucunter* 46
3.2.7.3. Métodos estatísticos para avaliação dos resultados 50

4. RESULTADOS 51
4.1. Cálculo da Concentração Ambiental Estimada (CAE) 51
4.2. Resultados dos ensaios ecotoxicológicos 52
4.2.1. Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia similis* 53
4.2.2. Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com *Echinometra lucunter* 54
5. DISCUSSÃO 57
6. CONCLUSÃO 60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76
ANEXOS 83

1. INTRODUÇÃO

1.1. Poluição Aquática

A água é um recurso essencial para a manutenção da vida na Terra, mas esse recurso não tem sido cuidado na mesma proporção de sua importância (BARSZCZ *et al.,* 2019). A degradação dos corpos hídricos é um grave problema que está se agravando por conta das práticas de atividades potencialmente poluidoras (BARSZCZ *et al.,* 2019).

Devido ao crescimento populacional de centros urbanos, a poluição aquática tem se tornado um problema cada vez mais alarmante, principalmente a partir do século XX com o uso abusivo da água (YAMAMOTO, 2014).

Como consequência deste crescimento populacional, avanços tecnológicos e industriais têm sido observados a contaminação do ambiente aquático, que se dá a partir dos efluentes liberados na água, sem passar por um tratamento adequado antes (YAMAMOTO *et al.*, 2012; CORTEZ, 2011).

Os problemas como escassez de água bem como a poluição, são constantemente noticiados, mas as reais providências para minimizar os impactos são poucas ou ineficazes onde a grande diversidade de compostos identificados e quantificados no ambiente denota essa situação.

Dentre as principais fontes de poluição dos ecossistemas aquáticos, encontram-se os lançamentos de efluentes líquidos domésticos e industriais sem o devido tratamento. Aliados a esses fatos, a quantidade, a diversidade e o consumo crescente de produtos químicos aumentam a probabilidade dos riscos nesses ambientes (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

No Brasil, o tratamento de esgotos realizados pelas Estações de Tratamento (ETE), possuem inúmeras vantagens, como menor consumo de energia e menor custo de operação, sendo muito eficiente na remoção de poluentes em concentrações da ordem de $mg.L^{-1}$. Porém, torna-se mais difícil a remoção de contaminantes orgânicos em $\mu g.L^{-1}$ ou $ng.L^{-1}$ (LEITE *et al.*, 2010).

Diante de todos estes fatos, a Ecotoxicologia aquática ganha relevância como uma análise complementar destes compostos potencialmente poluidores, a fim da identificação de comportamento no ambiente em diversos organismos aquáticos.

1.2. Ecotoxicologia aquática

A ecotoxicologia surgiu pela junção das ciências de toxicologia clássica e ecologia, para complementar uma à outra (SOUZA, 2016). O termo ecotoxicologia ou Toxicologia Ambiental foi sugerido pela primeira vez em 1969, durante uma reunião do Committe of the International Council os Scientifc Unions (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaunt (CORTEZ, 2011) que definiu a ecotoxicologia como ciência que estuda os efeitos das interações de substâncias naturais ou sintéticas sobre organismos vivos e o meio em que vivem (SOUZA, 2016).

Ao longo dos anos, essa definição foi recebendo complementos, porém, com o mesmo princípio, como é o exemplo da definição mais recente de NEWMAN *et al.* (2002) que definiram a Ecotoxicologia como a ciência dos contaminantes e seus efeitos sobre os constituintes da biosfera, incluindo o homem (CORTEZ, 2011).

No Brasil, os ensaios Ecotoxicológicos deram início em 1975 pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da International Organization for Standardization (ISO), com auxílio da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) a partir de ensaios com peixes, que foram expostos a concentrações diferentes de efluentes líquidos liberados por uma indústria em Atibaia/SP (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Contudo, as primeiras normas de testes Ecotoxicológicos só começaram a ser publicadas a partir de 1987 pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

A CETESB e a ABNT instituíram as primeiras normas relativas a testes de toxicidade que utilizam organismos aquáticos que serviram de apoio para diversos institutos de pesquisas, indústrias, laboratórios particulares e governamentais, que realizam e têm intensificado ensaios Ecotoxicológicos para diversas finalidades (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Dentro da ecotoxicologia, os ensaios de toxicidade são consagrados como importantes métodos de controle ambiental, fornecendo dados qualitativos e quantitativos sobre os efeitos adversos de contaminantes (COONEY, 1995), proporcionando uma evidência direta das consequências de contaminação, podendo ser utilizada para estimar a toxicidade de misturas complexas em diferentes matrizes

ambientais (LOURENÇO, 2019).

Estudos Ecotoxicológicos podem ser utilizados para determinar efeitos biológicos em diferentes níveis de organização biológica, desde moleculares e bioquímicos, até comunidades e ecossistemas (Figura 1) (WALKER *et al.*, 1996; CORTEZ, 2011) e têm sido empregados com a finalidade de se avaliar os efeitos da introdução de xenobióticos no ambiente aquático, sendo que alguns parâmetros como toxicidade aguda e crônica já são previstos na Legislação Brasileira, e um exemplo disso é a Resolução CONAMA 357/2005 (PEREIRA, 2008).

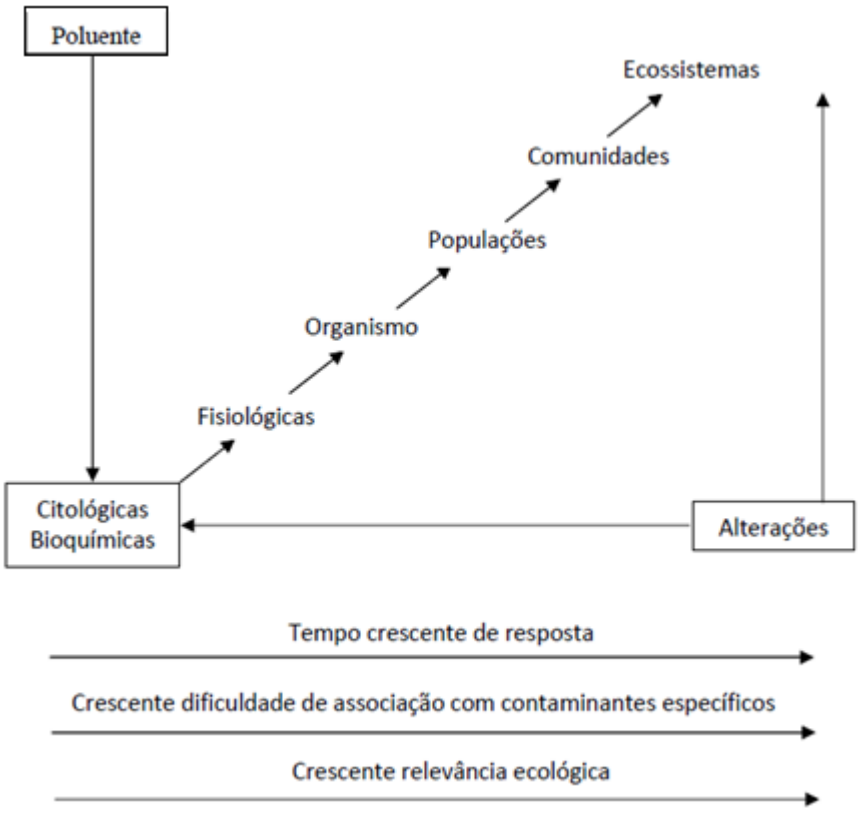


Figura 1. Níveis de organização biológica e respostas a poluentes.
Fonte: WALKER *et al.*, 1996; CORTEZ, 2011

Os testes em geral, contemplam ensaios de efeito agudo no qual é possível observar efeitos deletérios e mortalidade em um curto período e efeito crônico, em que os efeitos da substância são observados em parte do ciclo de vida de um organismo ou seus descendentes por um tempo maior. Nos ensaios Ecotoxicológicos, os organismos bioindicadores padronizados são utilizados para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos (SOUZA, 2016).

A Ecotoxicologia Aquática, como os demais campos de estudo da

Ecotoxicologia, envolve o conhecimento de outras áreas da ciência caracterizando um estudo multidisciplinar (RAND *et al.*, 1995; CORTEZ, 2011).

Rand *et al.* (1995) relatou que os primeiros ensaios de toxicidade com organismos aquáticos foram implementados a partir de 1930, com o objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias químicas e despejos líquidos (CORTEZ, 2011).

Diferentes métodos de ensaios com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, têm sido utilizadas para identificar os efeitos de xenobióticos no ambiente (COONEY, 1995), proporcionando uma evidência direta das consequências da contaminação (CESAR *et al.*, 2002).

Os ensaios de toxicidade aquática possuem uma série de vantagens como baixo custo, obtenção de respostas rápidas, simplicidade da maior parte dos métodos e fácil interpretação dos resultados (CORTEZ, 2011), e por este motivo, ganha espaço no campo da toxicologia ambiental.

1.3. Fármacos no Meio Ambiente

Com o passar do tempo, a revolução industrial impulsionou o aumento significativo (toneladas) da produção de substâncias químicas sintéticas (xenobióticos), e em grande parte com efeito biológico ou fins terapêuticos (medicamentos). Em adição, desenvolveu-se não só o potencial terapêutico e tóxico dos compostos, mas também, o quantitativo da produção de resíduos destes resultantes, com elevado impacto no ambiente, nas mais variadas espécies de organismos (PAIVA, 2009).

Fármacos, assim como novos pesticidas, produtos de cuidado/higiene pessoal, suplementos nutricionais, agentes de diagnóstico, entre outros compostos que têm sido detectados no ambiente e para os quais não há legislação estabelecendo padrões ou limites ambientais, são considerados contaminantes emergentes (BIRCH *et al.*, 2015). Os produtos farmacêuticos e os de higiene pessoal têm recebido atenção de pesquisadores nos últimos anos por causa da intensa produção e, principalmente, do uso generalizado e contínuo em humanos e animais (DAUGHTON, 2007).

A presença de fármacos no ambiente foi relatada pela primeira vez por Garrison *et al.* (1976), que identificaram o ácido clofíbrico em efluente tratado nos Estados Unidos, na faixa de 0,8 a 2,0 µg/L. Os estudos sobre a ocorrência desses

contaminantes no meio ambiente vêm crescendo e alertam sobre o seu possível risco tóxico (ESCHER, 2019).

Algumas substâncias farmacológicas, como medicamentos terapêuticos, fitoterápicos, produtos biotecnológicos, medicamentos veterinários, que são excretadas na forma não metabolizada ou de um metabólito, são classificadas como emergentes por serem ativas e causarem transformações no meio em que estão inseridas ou trazerem malefícios aos organismos presentes no local de descarte (FILHO *et al.*, 2007, PETROVIĆ *et al.*, 2005, JIMENEZ *et al.,* 2012).

Há preocupação com os possíveis efeitos desses compostos em organismos aquáticos, bem como com os elos da cadeia trófica que podem alimentar-se desses seres vivos contaminados, especialmente porque o ser humano se encontra no topo dessa cadeia (TORRES *et al.*, 2012). Em concentrações na ordem de ng/L, os fármacos podem alterar o sistema endócrino dos organismos aquáticos, desencadeando efeitos adversos como a interferência no crescimento, desenvolvimento e/ou reprodução (CUNHA *et al.*, 2017).

Os mecanismos de ação dos fármacos são diversificados, variando de acordo com a classe pertencente. Uma vez administradas, essas substâncias são absorvidas no organismo, sendo parcialmente metabolizadas e então excretadas nas formas original, associada ou como metabólitos. Quando essas substâncias são excretadas pela urina e fezes de seres humanos e animais, alcançam o esgoto doméstico e/ou os corpos d'água (BILA; DEZOTTI, 2003; MELO *et al.*, 2009).

Os fármacos não são completamente degradados após sua utilização e atingem o ciclo da água por meio de distintas rotas. As Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) são as principais vias de entrada dos fármacos nos corpos d'água, existem diversas rotas para os produtos farmacêuticos chegarem ao meio ambiente, conforme a Figura 2. A principal porta de entrada de fármacos na água é através de efluentes vindos das estações de tratamento de esgotos, pois as tecnologias convencionais de tratamento (ETEs) apresentam limitações na remoção de uma variedade de fármacos (CARVALHO *et al.*, 2009).

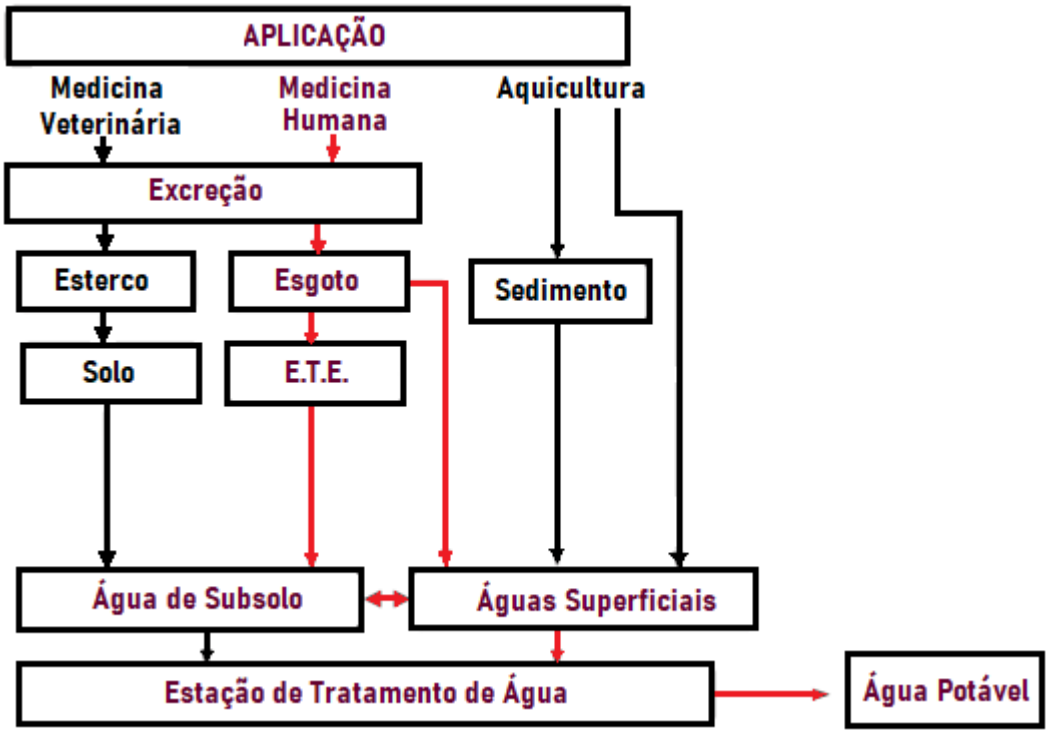


Figura 2. Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente
Fonte: Adaptada BILA e DEZOTTI, 2003;

Dados de monitoramento ambiental realizados no Brasil (LIMA *et al.*, 2017) indicam que fármacos são encontrados em mananciais superficiais, principalmente aqueles pouco preservados, em concentrações que variam de dezenas a centenas de nanogramas por litro ($ng.L^{-1}$) (SOUZA, 2020).

Por outro lado, a OMS (2012) salienta no documento *Pharmaceuticals in Drinking-Water*que que há lacunas no conhecimento da avaliação de riscos associados à exposição em longo prazo a fármacos em baixas concentrações e ao possível efeito combinado de misturas de substâncias químicas, incluindo os fármacos.

Na mesma linha, outros documentos da OMS (BERGMAN *et al.*, 2013; OMS, 2014) reconhecem a preocupação ambiental que se deve ter com fármacos que exibem atividade endócrina (desreguladores endócrinos) ou que induzam à resistência antimicrobiana (antibióticos) (SOUZA, 2020).

No ambiente aquático, a ocorrência e destino dos compostos farmaceuticamente ativos têm sido reconhecidos como um dos maiores problemas emergentes na química ambiental (PAIVA, 2009), porém, os relatos sobre os impactos ambientais de fármacos ainda são bem escassos no Brasil (ESCHER, 2019).

Em investigações desenvolvidas em países como Áustria, Brasil, Canadá, Croácia, Inglaterra, Alemanha, Grécia, Itália, Espanha, Suíça, Holanda e Estados Unidos da América, mais de 80 compostos, medicamentos e imensos metabólitos de drogas, têm sido detectados no ambiente aquático.

Muitos medicamentos de várias classes terapêuticas são encontrados em concentrações acima de valores $ug.L^{-1}$ em amostras de afluentes e efluentes de águas residuais e em amostras de águas superficiais localizadas de ETARs (PAIVA, 2009).

Em um estudo paralelo a este, Pereira *et al.* (2016) e colaboradores analisaram águas superficiais e de fundo no entorno do lançamento de esgoto pelo emissário submarino de Santos, SP, e evidenciaram pela primeira vez a presença de fármacos e drogas ilícitas em águas marinhas no litoral do Brasil onde foram detectadas a presença de acetaminofeno (34,6 $ng.L^{-1}$), losartan (32,0 $ng.L^{-1}$), valsartan (75,0 $ng.L^{-1}$) e diclofenaco (19,4 $ng.L^{-1}$), além de cocaína (537,0 $ng.L^{-1}$).

Neste contexto, é levando em consideração a escassez de estudos publicados sobre os medicamentos da classe dos tuberculostáticos no meio aquático (tanto em água doce, quanto em água marinha), que essa dissertação se torna relevante para a área da ecotoxicologia.

1.4. Município de Cubatão

O litoral paulista possui 880 km de extensão, sendo 16 municípios com uma área de 7.759 km², incluindo o município de Cubatão.

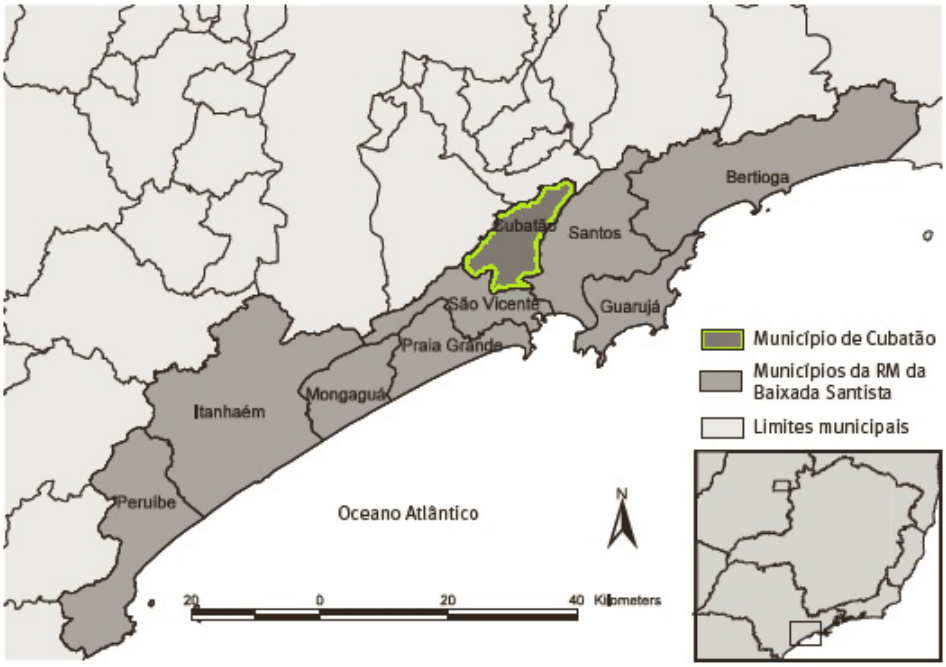


Figura 3. Localização do município de Cubatão na Região Metropolitana da Baixada Santista.
Fonte: Adaptada da Malha Digital dos Municípios Brasileiros.
Fonte: IBGE (2019).

Cercada pela Serra do Mar, Cubatão tornou-se essencialmente um lugar de passagem, obtendo um papel de destaque no cenário da Baixada Santista, do Estado de São Paulo e até mesmo do Brasil (IBGE, 2018).

Tudo isso aconteceu, pois com a Via Anchieta, o transporte rodoviário foi dinamizado entre São Paulo e a Baixada Santista, tornando Cubatão um grande centro de tráfego de veículos de passagem e de carga, fortalecendo ainda mais o desenvolvimento industrial na cidade (IBGE, 2018).

Com o passar dos anos, Cubatão se transformou e ganhou complexos industriais favorecendo a economia e o desenvolvimento paulistano, porém, começaram a surgir diversos problemas ambientais, como a poluição do ar, água e solo (IBGE, 2018).

O município de Cubatão já foi considerado uma das cidades mais poluídas do mundo; e danos à saúde, como carcinogênese, anencefalia fetal e problemas respiratórios foram relatados ao longo dos anos (IBGE, 2018).

E por conta desse histórico, muitos estudos foram realizados em água e sedimento para verificar a quantidade de metais, PBCs e danos remanescentes aos organismos do sistema estuarino e marinho (CETESB, 2014).

Além dos dados citados acima, segundo o IBGE, o município de Cubatão

apresenta apenas 62.7% de domicílios com esgotamento sanitário adequado, ou seja, aproximadamente 38% da população não possui sistema completo de esgoto que deve ser constituído com uma boa infraestrutura operacional além de um tratamento eficaz para o lançamento adequado no meio ambiente.

Apesar de termos essas informações quanto aos domicílios com esgotamento sanitário adequado, não é correto afirmar que está sendo adequado para o tratamento de substâncias como fármacos, pois a tecnologia adequada para a redução/eliminação de fármacos em águas envolve processos de alto custo a serem implementados nas estações de tratamento de esgotos (ETEs).

E por este motivo, levando em consideração o histórico de poluição de Cubatão e a não eficácia do sistema completo de esgoto em alguns bairros do município torna-se relevante o entendimento das estações de tratamento de efluentes responsáveis pelo município.

1.4.1. ETE – Cubatão

Segundo o IBGE, há 129.760 habitantes no município de Cubatão, sendo estes divididos em 37 bairros conforme Figura 4.

Figura 4. Divisão de bairros do município de Cubatão/São Paulo.
Fonte: Arquivo da prefeitura municipal de Cubatão.

Para a realização do saneamento básico do município, Cubatão possui como

prestadora de serviço a empresa SABESP, porém, nem todos os bairros são atendidos com o saneamento básico adequado, uma vez que a cidade possui muitos bairros periféricos, de difícil acesso.

A cidade de Cubatão possui duas Estações de Tratamento de Efluentes (ETE), sendo: ETE Casqueiro e ETE Lagoa Cubatão (Figura 5), e destas, cada uma possui características peculiares de tratamento.

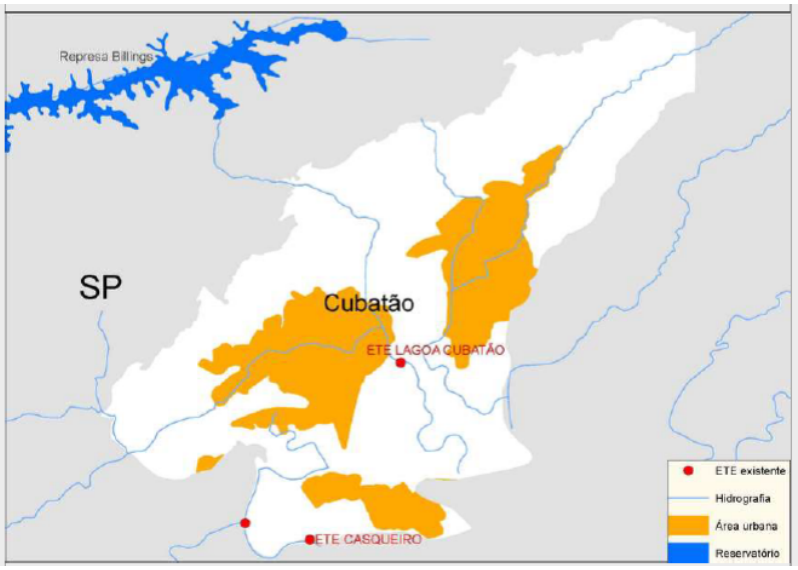


Figura 5. Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) existentes do município de Cubatão.
Fonte: BRASIL, 2017

A ETE Casqueiro atende 18.851 habitantes, possuindo como corpo receptor o Rio Santana, com eficiência aproximada de 90%. A ETE Casqueiro realiza seus tratamentos a partir de Lodos Ativados em Batelada, um tratamento biológico que é utilizado nas estações de maior capacidade de tratamento.

O processo convencional tem como objetivo a remoção da matéria orgânica e consistem em duas fases: líquida e sólida. A fase líquida consiste em após o processo de degradação da matéria orgânica nos tanques de aeração e do processo de sedimentação que ocorre nos decantadores secundários, o efluente clarificado é devolvido ao meio ambiente (SABESP, 2020).

Já a fase sólida, diz respeito ao tratamento e disposição da massa biológica, chamada de lodo gerada durante o tratamento. Nesta etapa, são adicionados produtos químicos ao lodo para condicionamento e desaguamento e disposição em centrífugas ou filtros prensas para aumentar o teor de sólidos para transporte e disposição final em aterros sanitários aprovados pelo órgão ambiental.

A ETE Lagoa Cubatão atende 42.513 habitantes, possuindo como corpo receptor o Rio Cubatão (o mais importante da região), com eficiência aproximada de 82%. A ETE Lagoa Cubatão realiza seus tratamentos a partir de Lagoa Aerada e Lagoa Facultativa/Decantação.

O tratamento de Lagoa Aerada necessita de oxigênio e a profundidade das lagoas varia de 2,5 a 4,0 metros. Os aeradores servem para garantir oxigênio no meio e manter os sólidos bem separados do líquido. A qualidade do esgoto que vem da lagoa aerada não é adequada para lançamento direto, pelo fato de conter uma grande quantidade de sódios e por este motivo é seguida do tratamento de decantação (SABESP, 2020).

O tratamento de Lagoa Facultativa/Decantação possui de 1,5 a 3 metros de profundidade, e há uma mistura de condições aeróbias e anaeróbias onde as condições aeróbias são mantidas nas camadas superiores das águas, e as condições anaeróbias predominam em camadas próximas ao fundo da lagoa (SABESP,2020).

Embora parte do oxigênio necessário para manter as camadas superiores aeróbias seja fornecida pelo ambiente externo, a maior parte vem da fotossíntese das algas, que crescem naturalmente em águas com grandes quantidades de nutrientes e energia da luz solar, onde as bactérias que vivem nas lagoas utilizam este oxigênio produzido para oxidar a matéria orgânica (SABESP, 2020).

Apesar das ETEs possuírem tratamentos, não é possível afirmar que são tratamentos adequados para substâncias em $ng.L^{-1}$ (como os fármacos), principalmente, se tratando de fármacos em grande quantidade, como é o caso dos tuberculostáticos, uma vez que a Tuberculose é um problema de saúde pública do município de Cubatão e por este motivo, foi definido como alvo para esta pesquisa.

1.4.2 O município de Cubatão no contexto da contaminação aquática

Partindo do princípio da contaminação marinha, o município de Cubatão que é proveniente de rios (água doce) faz parte do Sistema Estuarino de Santos, que se localiza na Região Metropolitana da Baixada Santista (RMBS) onde juntamente com o porto de santos, são fatores relevantes para a degradação ambiental por poluição hídrica em ambientes costeiros (ROVERSI, 2016).

O sistema estuarino de Santos constitui uma zona de transição entre o

Oceano Atlântico e as águas doces pertencentes da bacia hidrográfica dos cinco municípios que fazem parte do RMBS, incluindo o município de Cubatão, onde podemos destacar o Canal de Piaçaguera que possui 5 km de extensão e faz esta ligação entre os Rios Cubatão/Santana (onde estão localizadas as estações de tratamento de efluentes) e o ambiente marinho, na cidade de Santos/SP (ROVERSI, 2016).

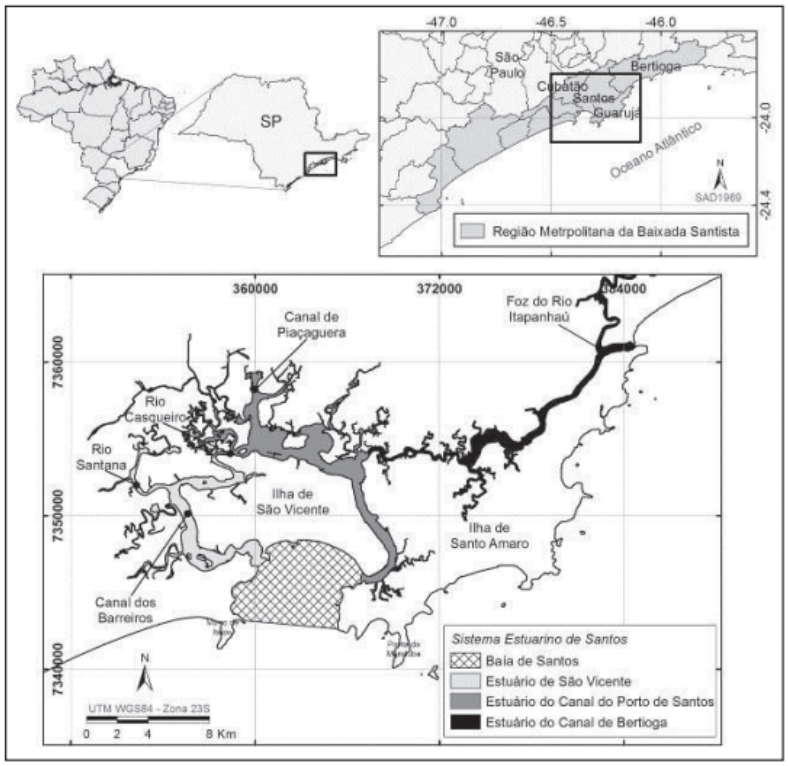


Figura 6. Localização do sistema estuarino de Santos/SP.
Fonte: ROVERSI, 2016

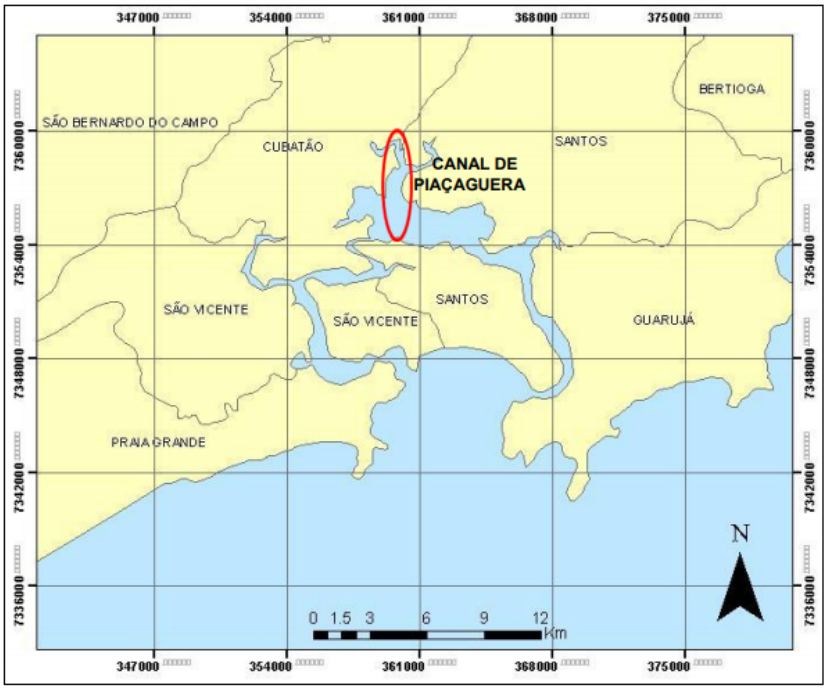


Figura 7. Canal de Piaçaguera inserido no sistema estuarino de Santos/SP, com ligação do município de Cubatão/SP.
Fonte: PARREIRA, 2012

Esta informação torna-se relevante pois a situação do ambiente estuarino ligado com Cubatão também pode ser considerado um agravamento do problema de contaminação marinha, uma vez que Cubatão não possui saneamento básico adequado para substâncias como fármacos e ele possui ligação ao ambiente marinho, podendo contaminar organismos como é o caso do ouriço-do-mar (AMBROZEVICIUS, 2011).

1.5. Tuberculose

A tuberculose é uma das doenças mais antigas da humanidade. O gênero *Mycobacterium* tem origem estimada em 150 milhões de anos, tendo provavelmente, durante o período de contato humano, matado mais pessoas do que qualquer outro microrganismo patogênico.

Há registros da doença em múmias egípcias, em trechos de livros hebraicos bíblicos, em antigos escritos chineses, e em estudos de Hipócrates na Grécia antiga, revelando a presença letal do patógeno nas principais civilizações (SILVA *et al.*, 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tuberculose é a principal

causa de morte por um único agente infeccioso em todo o mundo. Em 2018, havia um número estimado de 10 milhões de novos casos de tuberculose em todo o mundo e 1,5 milhão de pessoas morreram devido à doença.

No Brasil, levando em consideração os anos de 2017 e 2018, de acordo com o DataSus houve 186.660 novos casos de tuberculose, divididos nos 27 estados do país (Figura 8).

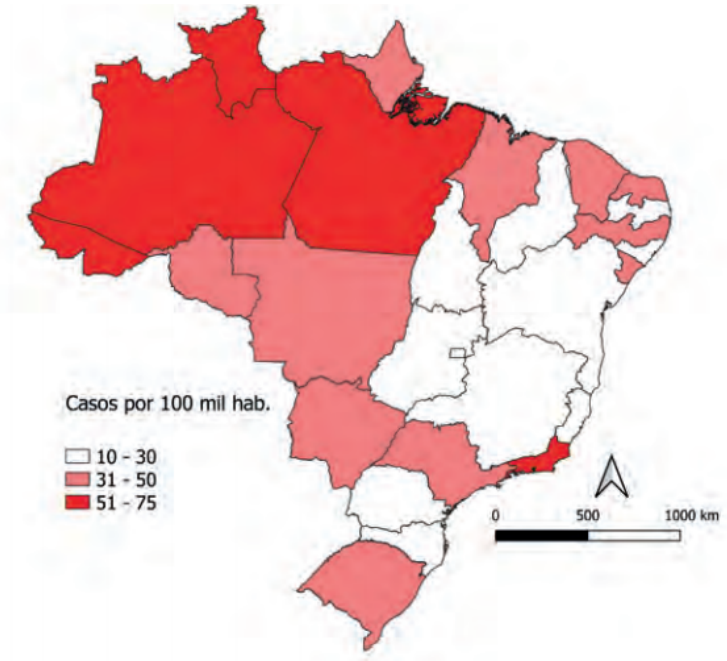


Figura 8. Incidência de casos de TB no Brasil por 100 mil habitantes.
Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020.

Já no município de Cubatão, no mesmo período, houve de acordo com o DataSus, 232 novos casos de tuberculose.

A tuberculose é uma doença infecciosa, causada por qualquer uma das sete espécies que integram o complexo *Mycobacterium tuberculosis: M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. canetti, M. microti, M. pinnipedi e M. caprae*.

Em saúde pública, a espécie mais importante é a M. *tuberculosis*, conhecida também como bacilo de Koch (BK). O *M. tuberculosis* é fino, ligeiramente curvo e mede de 0,5 a 3 μm. É um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), aeróbio, com parede celular rica em lipídios (ácidos micólicos e arabinogalactano), o que lhe confere baixa permeabilidade, reduz a efetividade da maioria dos antibióticos e facilita sua sobrevida nos macrófagos, uma vez que sua parede forma uma barreira hidrofóbica resistente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A *M. tuberculosis* possui tempo de duplicação em 18 a 48 horas, sendo um parasita intracelular facultativo, com preferência pela infecção de macrófagos (Figura 9) (SEGRETTI, 2016).

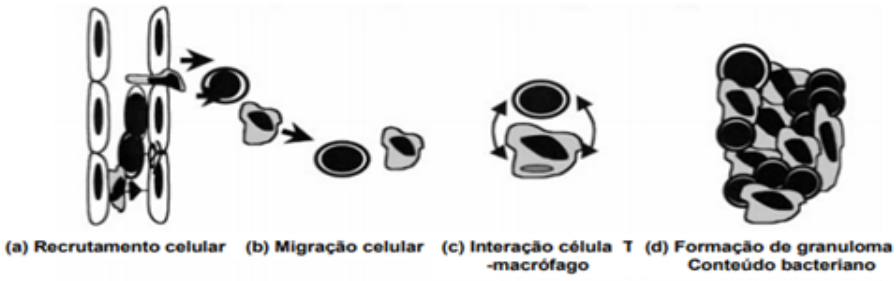


Figura 9. Expressão da imunidade protetora nos pulmões. Interação macrófago-linfócito e formação do granuloma da tuberculose.
Fonte: SAUNDERS, COOPER, SEGRETI, 2000

M. tuberculosis não é encontrado livre na natureza, sendo transmitido principalmente por via aerógena. Sua infecção possui baixa morbidade, o que, aliado a seu crescimento lento, proporciona uma manifestação patológica de curso lento e crônico em indivíduos de baixa imunidade. Tem preferência pela colonização dos pulmões conforme a Figura 10, já que sendo um aeróbico estrito encontra neste órgão melhores condições de crescimento e transmissão (PRIMI, 2018).

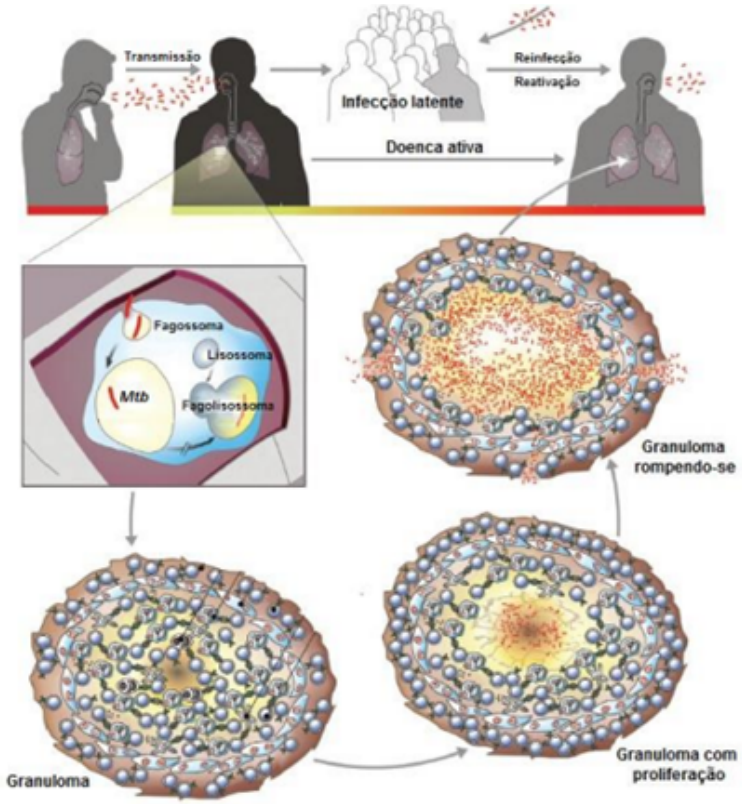


Figura 10. Transmissão e patologia do M. *tuberculosis*.
Fonte: GENTENBACHER, KAUFMANN, 2012.

A tuberculose normalmente se apresenta como uma doença de curso subagudo ou crônico. Logo, é comum a demora na procura por assistência médica, com 66% dos acometidos levando uma média de três meses para entrarem em contato com algum serviço de saúde.

Dentre a diversidade sintomatológica que pode ser manifestada durante a infecção, certos sinais e sintomas são mais comumente referidos pelo paciente como quadros envolvendo tosse, hemoptise, dispneia, dor torácica, rouquidão, febre, sudorese, perda ponderal, são parte importante e clássica da imensa gama de manifestações possíveis.

A tosse está presente em praticamente todos os pacientes, resultando do estímulo inflamatório das vias aéreas. Inicialmente apresenta-se como tosse seca, evoluindo para produtiva com expectoração mucosa ou purulenta, geralmente em pequena quantidade, e ocasionalmente associada à hemoptise (SILVA *et al.*, 2019).

1.5.1. Esquema terapêutico da Tuberculose

O tratamento da tuberculose tem como objetivo a cura e a rápida redução da transmissão da doença. Para que isso ocorra, os fármacos utilizados devem ser capazes de reduzir rapidamente a população bacilar (interrompendo a transmissão), prevenir a seleção de cepas naturalmente resistentes (impedindo o surgimento de resistência durante a terapia) e esterilizar a lesão (prevenindo a recidiva de doença) (SOTGIU *et al.*, 2016).

O tratamento da tuberculose dura no mínimo seis meses e visando o aumento da adesão ao tratamento, desde o início da década de 90, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a adoção da estratégia DOTS (*Directlly observed treatment, short course*) que é o tratamento diretamente observado de curta duração.

Essa estratégia possui cinco elementos, sendo (LIENHARDT *et al.*, 2004): a) Compromisso político e apoio financeiro para a manutenção das atividades de controle da tuberculose. b) Identificação dos casos de tuberculose através da baciloscopia do escarro de sintomáticos respiratórios; c) Esquema de fármacos antituberculose padronizado e administrado através de programas de tratamento diretamente observado (TDO) pelo menos nos dois primeiros meses de tratamento; d) Garantia do suprimento regular dos medicamentos antituberculose; e) Sistema de notificação e avaliação dos resultados do tratamento de cada paciente e do programa de controle de tuberculose como um todo.

Nos anos 1960, foram iniciadas as padronizações de esquema terapêutico e foi padronizado o uso de Isoniazida (H), Estreptomicina (S) e Pirazinamida (Z) por 18 meses (esquema HSZ). Em meados dos anos 70, desenvolveu-se a quimioterapia antituberculose de curta duração, com Rifampicina (R), Isoniazida (H) e Pirazinamida (Z) por 6 meses (esquema RHZ) (RABAHI *et al.*, 2017).

O Brasil foi o primeiro país do mundo a padronizar o esquema de 6 meses na rede pública com o fornecimento de medicamentos antituberculose gratuito, onde tais padrões continuam até hoje, sendo estes garantidos pelo PNCT (Programa Nacional de Controle à Tuberculose), e não estando disponíveis comercialmente.

Em 2010, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose propôs uma mudança no esquema terapêutico até então adotado no país. A decisão foi tomada em virtude do aumento da resistência primária à Rifampicina e à Isoniazida

(BRASIL, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013).

O esquema de tratamento da tuberculose é padronizado, deve ser realizado de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde e compreende duas fases: a intensiva (ou de ataque), e a de manutenção.

A fase intensiva tem o objetivo de reduzir rapidamente a população bacilar e a eliminação dos bacilos com resistência natural a algum medicamento. Uma consequência da redução rápida da população bacilar é a diminuição da contagiosidade. Para tal, são associados medicamentos com alto poder bactericida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A fase de manutenção tem o objetivo de eliminar os bacilos latentes ou persistentes e a redução da possibilidade de recidiva da doença. Nessa fase, são associados dois medicamentos com maior poder bactericida e esterilizante, ou seja, com boa atuação em todas as populações bacilares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

No Brasil, o esquema básico para tratamento da TB em adultos e adolescentes é composto por quatro fármacos na fase intensiva e dois na fase de manutenção. A apresentação farmacológica dos medicamentos, atualmente em uso, para o esquema básico é de comprimidos em doses fixas combinadas com a apresentação tipo 4 em 1 (RHZE – Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol) ou 2 em 1 (RH – Rifampicina e Isoniazida) (Tabela 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Tabela 1 - Esquema básico para o tratamento da TB em adultos e adolescentes.

ESQUEMA	FAIXAS DE PESO	UNIDADE/DOSE	DURAÇÃO
RHZE 150/75/400/275 mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	20 a 35 Kg	2 comprimidos	2 meses (fase intensiva)
	36 a 50 Kg	3 comprimidos	
	51 a 70 Kg	4 comprimidos	
	Acima de 70 Kg	5 comprimidos	
RH 300/150 mg[1] ou 150/75 mg (comprimidos em doses fixas combinadas)	20 a 35 Kg	1 comp 300/150 mg ou 2 comp 150/75 mg	10 meses (fase de manutenção)
	36 a 50 Kg	1 comp 300/150 mg + 1 comp de 150/75 mg ou 3 comp 150/75 mg	
	51 a 70 Kg	2 comp 300/150 mg ou 4 comp 150/75 mg	
	Acima de 70 Kg	2 comp 300/150 mg + 1 comp de 150/75 mg ou 5 comp 150/75 mg	

RHZE – Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol. RH – Rifampicina e Isoniazida.
Fonte: MINISTÉRO DA SAÚDE (2019).

No Brasil, pacientes com menos de 10 anos de idade são tratados com três medicamentos: Rifampicina (10 mg/kg), Isoniazida (10 mg/kg) e Pirazinamida (35 mg/kg) e esta decisão se baseia no menor risco de resistência à Isoniazida em pacientes com pequena carga bacilar, como é mais comum na tuberculose infantil, e no risco de alterações visuais causadas pelo uso do Etambutol, cujo diagnóstico pode ser difícil em crianças (RABAHI *et al.*, 2017).

1.5.1.1. Rifampicina

A Rifampicina é utilizada desde 1966 e é um fármaco bactericida que atua tanto no bacilo em crescimento e metabolicamente ativo, quanto na fase estacionária, com metabolismo reduzido (ARBEX *et al.*, 2010). Tem como mecanismo de ação a inibição da atividade RNA polimerase, bloqueando a síntese de RNA mensageiro que produz proteínas essenciais para a informação genética da bactéria, o DNA.

Este medicamento (Figura 11), tem como metabolito ativo o desacetilrifampicina, transformado rapidamente e liberado na circulação entero-hepática, com meia vida de aproximadamente 3 horas (FIOCRUZ, 2017). Tais características e associações com a pirazinamida permitem o encurtamento do tratamento da tuberculose para seis meses (ARBEX *et al.*, 2010).

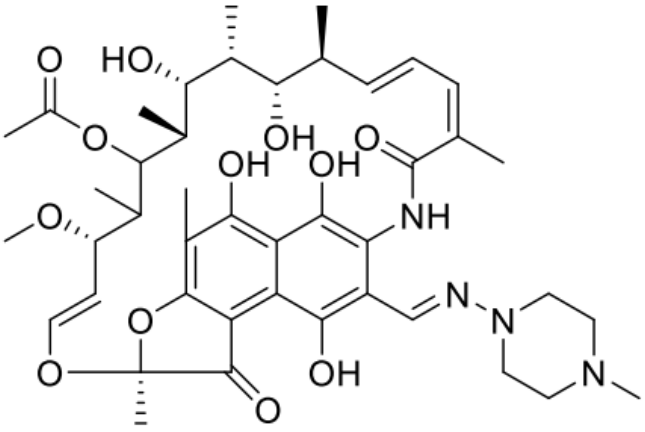


Figura 11. Estrutura química do fármaco Rifampicina.
Fonte: MEIRELLES, 2019.

1.5.1.2. Isoniazida

A Isoniazida é utilizada desde 1952 e é um dos fármacos mais importantes no tratamento da tuberculose tem estrutura química considerada simples (Figura 12), constituída de um anel piridina e um grupo hidrazida.

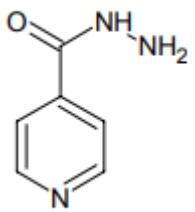


Figura 12. Estrutura química do fármaco Isoniazida.
Fonte: GRAEF, 2007.

Tem função bactericida sobre os bacilos de multiplicação rápida, mas tem ação restrita sobre os bacilos de crescimento lento (geralmente intracelulares) e aqueles de multiplicação intermitente (geralmente extracelulares) (ARBEX, *et al.* 2010).

A isoniazida é uma pró-droga que necessita ser ativada pela enzima catalase/peroxidase (KatG) do *M. tuberculosis*, consequentemente produzindo radicais reativos de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrato) e radicais orgânicos que inibem a formação de ácido micólico da parede celular, causando danos ao DNA e subsequente morte do bacilo (FIOCRUZ, 2017).

1.5.1.3. Pirazinamida

A Pirazinamida é um fármaco que foi sintetizado em 1936 e é utilizada como droga tuberculostática desde 1952 (ARBEX *et al.*, 2010). É bactericida e tem uma potente ação esterilizante, onde na lesão pulmonar por tuberculose, os bacilos fagocitados pelos macrófagos apresentam seu crescimento inibido pelo ambiente ácido e são esses bacilos, que são denominados persistentes e em fase de multiplicação, que são os responsáveis pela recaída bacteriológica da tuberculose. E foi esta atividade esterilizante da Pirazinamida que, juntamente com a Rifampicina, permitiu a redução do esquema de tratamento para seis meses (ARBEX *et al.*,

2010).

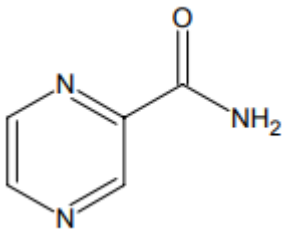


Figura 13. Estrutura química do fármaco Pirazinamida.
Fonte: GRAEF, 2007.

O mecanismo de ação da Pirazinamida não é conhecido, supondo-se que esta droga penetre no bacilo, seja convertida em ácido pirazinoico e atinja altas concentrações no citoplasma bacteriano. O acúmulo de ácido pirazinóico diminui o pH intracelular causando a inativação de enzimas e em consequência, prejudicando a biossíntese do ácido micólico causando danos ao DNA e subsequente morte do bacilo (FIOCRUZ, 2017).

1.5.1.4. Etambutol

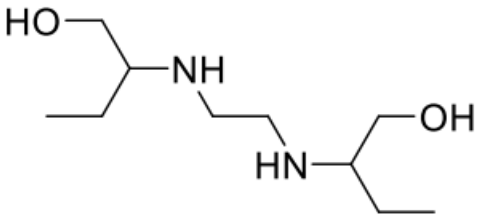


Figura 14. Estrutura química do fármaco Etambutol.
Fonte: Adaptada Meirelles, 2019.

O Etambutol foi sintetizado em 1961 e é utilizado no tratamento da tuberculose desde 1966 (ARBEX *et al.*, 2010).Este fármaco atua sobre os bacilos intra e extracelulares, principalmente os de multiplicação rápida onde interfere na biossíntese de arabinogalactano, que é o principal polissacarídeo da parede celular da micobactéria, (ARBEX *et al.*, 2010)causando comprometimento do metabolismo celular, a detenção de multiplicação e morte celular (FIOCRUZ, 2017).

E diante das informações apresentadas à cima, quanto do município de Cubatão, quanto dos tuberculostáticos, é de extrema importância a busca da avaliação de exposição dos fármacos, e esta avaliação inicia-se através do cálculo

da Concentração Ambiental Estimada (CAE).

1.6. Legislações

Há uma crescente mundial quanto à fabricação e consumo de produtos farmacêuticos, e consequentemente, o quanto destes produtos é inserido no meio ambiente.

No Brasil, não há registros de programas ou legislações que relatem sobre a problemática dos fármacos no meio ambiente, e o mais preocupante é que também não há uma legislação determinante quanto ao limite de lançamento de fármacos, ou de uma estrutura de ETE na qual consiga eliminar substâncias em $ng.L^{-1}$.

Na União Europeia, a aprovação do registro de novos medicamentos requer a avaliação dos potenciais riscos ambientais associados à sua utilização, além dos padrões mínimos já exigidos como segurança, estabilidade e eficácia, e essa exigência ambiental se deve a Diretiva 2004/27/CE.

Além disso, a Diretiva 2013/39 da União Europeia, implementa programas de monitoramento para os contaminantes emergentes com a finalidade de priorizar as substâncias que apresentem risco para o ambiente aquático e um exemplo disso é o Diclofenaco que foi inserido na lista de vigilância de substâncias que devem ser recolhidos, em toda a União Europeia, dados de monitoramento já que ele pode apresentar risco significativo para o meio aquático (PARLAMENTO EUROPEU, 2013).

Neste contexto, o presente estudo visou estimar a CAE de quatro fármacos da classe dos tuberculostáticos em águas superficiais no município de Cubatão (São Paulo, Brasil) e avaliar os efeitos biológicos adversos por meio de ensaios de toxicidade, a fim de obter dados relevantes para o monitoramento dos contaminantes, sendo um possível subsídio para atualizações e criações de legislações brasileiras.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo principal obter as concentrações ambientais estimadas (CAE) dos quatro fármacos da classe dos tuberculostáticos utilizados como esquema de tratamento para a tuberculose padronizado pelo Ministério da Saúde em águas superficiais no município de Cubatão (São Paulo, Brasil). Foram também avaliados os efeitos biológicos adversos dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida por meio de ensaios de toxicidade nos organismos-teste *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter*.

2.2. Objetivos específicos

- Estimar as concentrações dos fármacos tuberculostáticos Isoniazida, Pirazinamida, Rifampicina e Etambutol, em águas doces superficiais do município de Cubatão através do cálculo da Concentração Ambiental Estimada (CAE).
- Por meio de ensaios ecotoxicológicos, avaliar a toxicidade dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida nos organismos-teste *D. similis* e *E. lucunter*.

3. METODOLOGIA

3.1. Cálculo da Concentração Ambiental Prevista (CAE)

A CAE (Concentração Ambiental Estimada) busca avaliar a exposição de uma substância química, nos diferentes fatores ambientais onde são lançados devido a sua produção, processamento, uso e distribuição. Este cálculo pode ser estimado com base em concentrações medidas no ambiente de determinada substância, ou modelagem matemática (PAIVA, 2009).

A estimativa de tal exposição deve ser realizada somente com base nas características da substância ativa (medicamento), independentemente de sua via de administração, metabolismo (biotransformação), excreção e forma farmacêutica. O cálculo da CAE segue a diretriz da EMEA (2006), que estabelece como avaliar os potenciais riscos dos fármacos no ambiente com o intuito de fundamentar ainda

mais o potencial ecotoxicológico do manuseio dos medicamentos, estes que são constituídos em duas fases.

Na primeira fase da avaliação, o cálculo da CAE é restrito ao meio aquático onde seu cálculo inicial em águas superficiais assume que o cálculo é restrito a obtenção de uma estimativa da exposição do fármaco, sendo nesta parte, utilizados estudos epidemiológicos publicados e/ou dados coletados, não levando em consideração a biotransformação (metabolismo) nos organismos dos pacientes (PAIVA, 2009).

Quando os valores de CAE são inferiores a 0,01 $ug.L^{-1}$, e quando, aparentemente, não há questões ambientais paralelas, assume-se que o fármaco na dose terapêutica em que se encontra prescrito não representa risco ao meio ambiente.

Se os valores de CAE são iguais ou superiores a 0,01 $ug.L^{-1}$, então deve-se desenvolver, segundo o que está descrito na CHMP (*Comittee for Medicinal Products for Human Use*) de 2006, a segunda fase da avaliação na qual se caracteriza o destino ambiental e se realiza a análise de efeitos.

Em determinados casos, o limite de ação não se aplica. Algumas substâncias podem afetar a reprodução de vertebrados e invertebrados em concentrações menores que 0,01 $ug.L^{-1}$, por este motivo, as mesmas devem ser incluídas na segunda fase da avaliação (PAIVA, 2009).

A Fase II é uma avaliação realizada a partir de dados gerados em avaliações ecotoxicologicas com o objetivo do estudo das substâncias e do compartimento específico com base em um conjunto de dados, sendo sua emissão, destinos e efeitos do composto. Nesta fase podemos levar em consideração o metabolismo do paciente (GRUNG *et al.*, 2008).

3.1.1. Acesso às informações para os cálculos da CAE

Para a obtenção das informações dos medicamentos tuberculostáticos dispensados no município de Cubatão/SP, a fim de desenvolver os Cálculos da CAE, foi necessário protocolar um requerimento na Prefeitura Municipal de Cubatão, destinado ao Departamento de Vigilância em Saúde Epidemiológica.

Após o deferimento deste requerimento, a Vigilância em Saúde forneceu para este projeto, relatórios (ANEXO) que foram retirados do controle de estoque do

Programa de Controle de Tuberculose de Cubatão, do período de Julho/2017 à Julho/2018.

Os medicamentos tuberculostáticos são dispensados gratuitamente pelo governo (de acordo com o RENAME) e não há opção de compra, com exceção do fármaco Rifampicina.

A Rifampicina por ser um antibiótico com potencial para tratamento de outras patologias podem ser comercializado; no entanto, para este projeto, foi realizado o contato com as drogarias e farmácias de manipulação do município de Cubatão, e foi informado pelos farmacêuticos responsáveis técnicos que neste período (Julho/2017 à Julho/2018) não houve entrada deste medicamento, assim como, também não houve saída, tendo estes com estoque zerado em todas as drogarias do município.

3.1.2. Cálculos da Concentração Ambiental Estimada (CAE)

Após compilação do relatório fornecido pela Vigilância em Saúde – Programa de Controle de Tuberculose de Cubatão foi realizado então, os cálculos da CAE em águas doce superficiais.

O cálculo da CAE das águas superficiais foi realizado de acordo com a diretriz da EMEA (CHMP, 2006), através da seguinte equação (1):

$$\text{CAE águas superficiais} = \frac{\text{Dose máxima consumida por habitante(mg)} \times \text{Fpen}}{\text{resíduos líquidos (L)/habitante} \times \text{fator de diluição}} \quad \textbf{(1)}$$

Sendo que:

Fpen = fator de penetração no mercado

O Fpen (CHPM, 2006), foi calculado de acordo com a equação (2):

$$\text{Fpen [\%]} = \frac{\text{consumo (mg/ano)} \times 100}{\text{DDD (mg/dxhab)} \times \text{Pop} \times 365 \text{ dias}} \quad \textbf{(2)}$$

Sendo que:

DDD = dose diária definida (segundo OMS)

Pop = número de habitantes da cidade

Os valores de CAE foram calculados separadamente, considerando as duas ETEs do município de Cubatão (ETE Lagoa e ETE Casqueiro).

Cabe ainda destacar que a Dose Definida Diária (DDD) pode ser definida como uma unidade de medida de consumo de medicamentos, elaborada para solucionar as dificuldades originadas da utilização de mais de um tipo de unidade em estudos de utilização de medicamentos. Esta unidade é recomendada pelo Grupo de Estudos de Utilização de Medicamentos da OMS (WHO Drug Utilization Research Group) (ANVISA, 2021).

3.1.3. Avaliação ecotoxicológica

A avaliação dos efeitos biológicos foi realizada por meio de ensaios de toxicidade para avaliação da toxicidade com *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter*.

3.2. ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

3.2.1. Organismos-teste

Para garantir uma melhor avaliação dos resultados em relação aos ensaios ecotoxicológicos, foi necessária a escolha de organismos-teste sensíveis às mudanças do ambiente e que não sofram mudanças repentinas de habitat; sendo assim, foram realizados os ensaios com as espécies de *Daphnia similis* considerando o despejo dos esgotos em águas doces no município de Cubatão e *Echinometra lucunter* considerando a possibilidade de contaminação de ambientes marinhos através da ligação via Canal de Piaçaguera (Figura 7).

3.2.1.1. Organismo-*teste Daphnia similis*

A *Daphnia similis,* vulgarmente conhecida como “pulga d’água”*,* foi implantada em testes de toxidade aguda pela CETESB devido a sua adaptação em águas de baixa dureza, que são características das águas superficiais do Estado de São Paulo (LAMEIRA, 2008). Pertencente à Família Daphnidae, Ordem Cladocera, esse

microcrustáceo, de comprimento máximo 3,5 mm (Figura 15) é uma espécie planctônica filtradora de material orgânico em suspensão (ABNT, 2016).

Figura 15. Fêmea embrionada de *Daphnia similis*, organismo utilizado nos ensaios de toxicidade. Fonte: BEATRICI, 2004.

Em ambiente favorável, se reproduz por partenogênese, originando apenas fêmeas; porém, em ambiente desfavorável, originam-se machos e consequentemente efípios, espessamento de coloração escura, contendo ovos de resistência, que são resultantes de reprodução sexuada (KNIE e LOPES, 2004).

Para a realização de ensaios ou novos cultivos, são utilizados organismos neonatos com idade entre 6h e 24h, obtidos através de fêmeas com idade entre 7 a 28 dias (ABNT, 2016).

3.2.1.2. O*rganismo-teste Echinometra lucunter*

O *Echinometra lucunter*, também chamado de “ouriço-do-mar” é um organismo herbívoro, encontrado em ecossistema oceânico, especialmente em regiões costeiras e rasas, em substrato rochoso ou fundo arenoso (HILL e LAWRENCE, 2003).

Possuem grande quantidade de espinhos móveis (Figura 16) e uma estratégia de proteção e camuflagem, para a realização do comportamento de cobertura ou “*covering behavior*” (VERLING *et al.*, 2004).

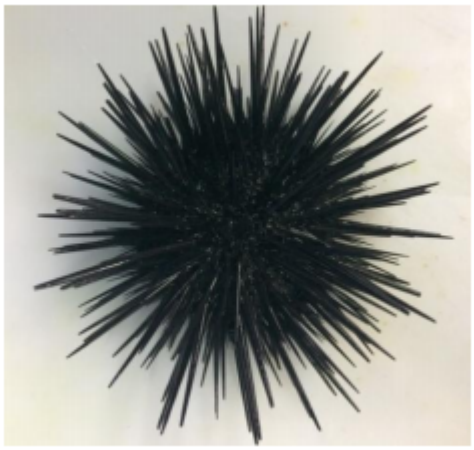


Figura 16. *Echinometra lucunter*, organismo utilizado nos ensaios de toxicidade.
Fonte: LOURENÇO, 2019.

Os ouriços-do-mar, por conta de sua alta sensibilidade às mudanças ambientais, são considerados ótimos bioindicadores e por este motivo, foi utilizado nesta pesquisa.

Os organismos utilizados neste ensaio foram coletados através de mergulho livre, na Ilha das Palmas – Guarujá/SP (Figura 17).

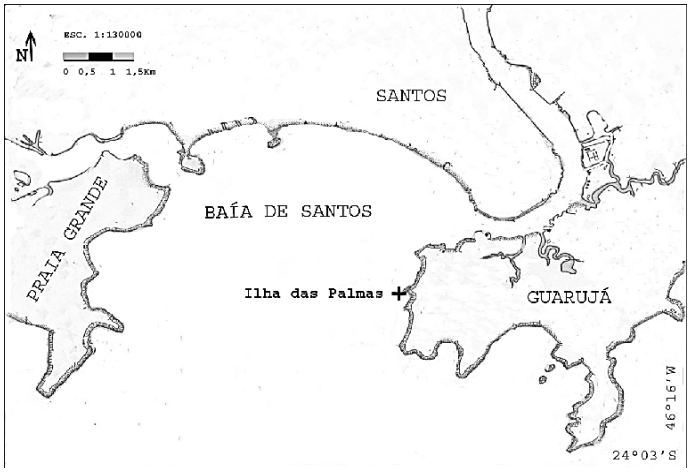


Figura 17. Mapa da baía de Santos representando o local de coleta (Ilha das Palmas – Guarujá/Santos).
Fonte: HENRIQUES, 2009

Estes, após coletados, foram armazenados em caixas térmicas recobertos com algas do gênero *Ulva* no intuito de preservar a temperatura até o laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, onde foram mantidos em tanque, conforme Figura 18, sob forte aeração, com condições ideais para este organismo até a realização dos ensaios.

Figura 18. Tanque com condições ideais para os ouriços-do-mar utilizados no ensaio.
Fonte: Arquivo pessoal.

3.2.2. Manutenção dos organismos

3.2.2.1. Manutenção *Daphnia similis*

A manutenção de *D. similis* deve ser realizada frequentemente, ou seja, filtragem e troca de água e alimentação dos organismos.

Para a alimentação destes microcrustáceos, várias espécies de algas verdes unicelulares podem ser utilizadas, mas geralmente usa-se a *Pseudokirchneriella subcaptata*, complementando com ração a base de peixe, propiciando assim, um ambiente favorável para a reprodução (ABNT, 2016).

Estes organismos são cultivados em recipientes, com até 25 organismos por litro de água reconstituída com alguns requisitos adequados para o cultivo da espécie, sendo eles: dureza total mgCO_3/L de 40 a 48 e pH de 7,0 a 7,6; e deverão ser mantidas em câmara de germinação com a temperatura variante entre 18ºC e 22ºC (ABNT, 2016).

3.2.2.2. Manutenção *Echinometra lucunter*

A manutenção de E. *lucunter* deve ser realizada frequentemente, obedecendo rigorosamente as condições ideais para estes organismos, de acordo com a norma NBR 15350 (ABNT, 2012); ou seja, deve-se observar os seus parâmetros físico-químicos de acordo com o citado na Tabela 2.

Além dos parâmetros físico-químicos, importante ressaltar que a água utilizada para a manutenção destes organismos é de fonte natural e coletada na Ilha das Palmas – Guarujá/SP.

3.2.3. Substâncias teste

Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos, foram utilizados os fármacos tuberculostáticos Isoniazida e Pirazinamida, de acordo com os cálculos da CAE e seus respectivos resultados, identificados na primeira parte desta pesquisa.

Os princípios ativos utilizados nos ensaios foram obtidos através da doação pelo LFM – Laboratório Farmacêutico da Marinha (Rio de Janeiro, Brasil) (Tabela 3).

Tabela 3 – Fármacos tuberculostáticos utilizados nos ensaios.

PRINCÍPIO ATIVO	FÓRMULA QUÍMICA	CAS	FORNECEDOR	FABRICANTE	CERTIFICAÇÕES
Isoniazida	C6H7N3O	54-88-3	LMF - Laboratório Farmacêutico da Marinha	Anuh Pharma	GMP
Pirazinamida	C5H5N3O	98-6-4	LMF - Laboratório Farmacêutico da Marinha	Anuh Pharma	CEP / GMP / Eu-GMP / WHO - PQ

Fonte: Arquivo pessoal.

Tais princípios ativos foram conservados no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, sob temperatura ambiente, até a realização dos testes.

3.2.4. Preparação da água de diluição nos ensaios Ecotoxicológicos.

3.2.4.1. Preparação da água de diluição para ensaios com *Daphnia similis*

A água utilizada para o preparo das amostras com as substâncias-testes para os ensaios com *Daphnia similis* é de fonte mineral, onde para manter suas condições adequadas é necessário o ajuste dos parâmetros físico-químicos de acordo com a exigência da NBR 12713, como por exemplo, dureza entre 40 e 48 mg $CaCO_3$/L e pH entre 7,0 e 7,6 (ABNT, 2016).

3.2.4.2. Preparação da água de diluição para ensaios com *Echinometra lucunter*

A água utilizada para o preparo das amostras com as substâncias-testes para os ensaios com *Echinometra lucunter* foi reconstituída a partir de uma mistura de sal CORAL PRO SALT marca (RED SEA) em água processada, que foi mantida sob constante agitação. Após, esta solução foi filtrada com o auxílio de uma membrana de celulose Millipore 0,45µm e, a água mantida com os padrões físico-químicos recomendados pela ABNT, tais como pH 7,8 a 8,4 e salinidade entre 30 e 37 ($g.L^{-1}$), todo o processo conforme Figura 19 (ABNT, 2012).

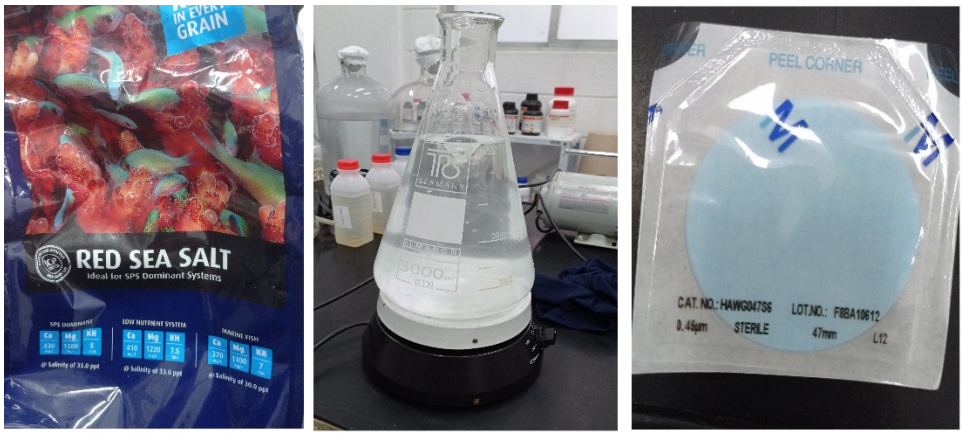


Figura 19. Materiais utilizados na preparação da água utilizada nas amostras do ensaio.
Fonte: Arquivo pessoal.

3.2.5. Controle dos ensaios e preparação da solução estoque

Para a realização do preparo da solução estoque, foi necessária a análise de parâmetros físico-químicos para que não houvesse alterações que comprometessem os resultados do ensaio ecotoxicológico.

Cada substância possui uma característica físico-química peculiar, onde com a ajuda do software EPI Suíte, essas informações foram obtidas de formas precisas e estudadas para a realização dos testes.

Um fator importante que foi observado em todos os princípios ativos foi o valor de Log Kow, que é o coeficiente de repartição octanol/água, tratando-se assim, da solubilização das substâncias testes em relação à solubilidade da água. O Log Kow das substâncias testes era de valores baixos, e por este motivo, foi utilizada apenas solubilização direta com água, não sendo necessário o uso de DMSO.

Na realização dos ensaios, foi utilizado o valor proporcionalmente exato para as diluições e concentrações estudadas, para evitar sobras da solução estoque e para obtenção de resultados mais precisos.

Além disso, para os ensaios, foram utilizadas pipetas eletrônicas devidamente calibradas, e o preparo de solução estoque e água de diluição foram preparadas no ato do ensaio, para evitar a degradação das substâncias e comprometimento dos resultados.

3.2.6. Condições físico-químicas para a realização dos ensaios ecotoxicológicos

Para manter um meio parecido com o habitat natural dos organismos-testes, a fim de buscar maior precisão dos resultados dos ensaios, os fatores físico-químicos foram realizados de acordo com as condições exigidas pela ABNT (Tabela 2).

Tabela 2 - Condições físico-químicas exigidas pela ABNT, para realização de ensaios com *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter.*

CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS	***Daphnia similis***	***Echinometra lucunter***
Temperatura	18 a 22ºC	24 a 28ºC
Salinidade	0	30 e 37 (g/L)
pH da água	7,0 a 7,6	7,8 a 8,4
Fotoperíodo	12h à 16h	12h à 16h
Idade dos organismos	6h à 24h (neonatos)	Embriões com 2h a partir da fecundação
Tempo do ensaio	48h	36h à 42h
Número de soluções-teste	6	6
Volume das soluções-testes	10mL	10mL
Efeito observado	Imobilidade e Mortalidade	Desenvolvimento embriolarval
Número de réplicas	4	4
Água de diluição	Natural	Reconstituída
Validade do ensaio	Máximo de 20% de morte ou imobilidade	Mínimo de 80% de larvas pluteus normais

Fonte: Arquivo pessoal.

3.2.7. Realização dos ensaios

Os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter* foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, entre os meses de Julho a Setembro/2019 e após, Agosto/2020 a Novembro/2020, seguindo todas as exigências da ABNT NBR 12713.

3.2.7.1. Ensaio de toxicidade com *D.similis*

Para o ensaio com *Daphnia similis*, foram realizadas três amostragens para cada substância-teste, como garantia dos resultados; sendo quatro réplicas para cada concentração (controle; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 $mg.L^{-1}$). Em cada réplica, foi pesado na balança analítica devidamente calibrada 0,01g de cada substância teste, que foram diluídas em 100mL de água.

Após as diluições, com auxílio de uma pipeta Pasteur, foi submetido em cada tubo, cinco neonatas (6 à 24h) evitando a passagem de gotas de água para o tubo de ensaio (1 a 2 gotas) a fim de não alterar a concentração final, totalizando assim, 20 organismos por concentração.

As amostras foram mantidas por 48h em câmara incubadora, com temperatura entre 18 e 22ºC, sem alimentação e em ambiente com fotoperíodo.

Após 48 horas, a olho nu e com auxílio de lâmpada fluorescente, foi realizada a leitura e contagem dos organismos por concentração de cada amostra (FÍGURA 20), assim como, o cálculo das concentrações que causaram morte e/ou imobilidade em 50% dos organismos (CE_{50}).

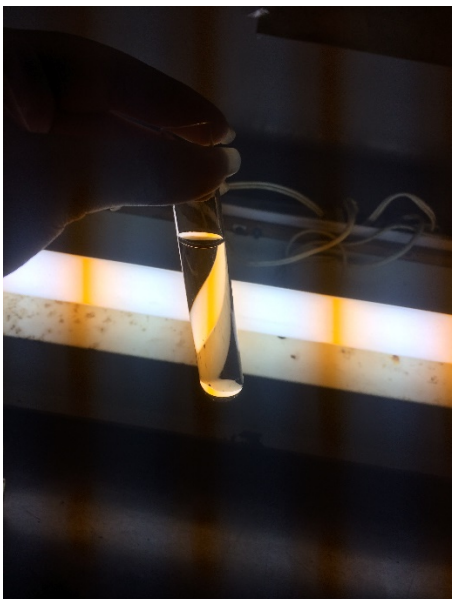


Figura 20. Leitura e contagem dos organismos por concentração, com auxílio de lâmpada fluorescente.
Fonte: Arquivo pessoal.

3.2.7.2. Ensaio de toxicidade com *E.lucunter*

Para o ensaio com *Echinometra lucunter*, foram realizadas três amostragens para cada substância-teste, como garantia dos resultados; sendo quatro réplicas para cada concentração (controle; 200, 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 $mg.L^{-1}$). Em cada réplica, foi pesado na balança analítica devidamente calibrada 0,02g de cada substância teste, que foram diluídas em 100mL de água.

Por conta do organismo *Echinometra lucunter* não possuir dimorfismo sexual externo, é necessário à diferenciação de gênero através da coloração dos gametas, ou seja, gametas com coloração alaranjada são indícios do gênero feminino, e gametas com coloração branca, do gênero masculino (Figura 21).

Figura 21. Diferenciação de gênero através da coloração dos gametas dos ouriços-do-mar – à esquerda, gênero feminino (coloração alaranjada) e à direita, gênero masculino (coloração branca).
Fonte: Arquivo pessoal.

Para obtenção dos gametas, o ouriço-do-mar foi estimulado por impulsos elétricos de 35V (Figura 22), porém, nem todos os organismos liberaram os gametas, tendo que assim, realizar a aplicação de 2,5 mL de KCl 0,5M em cada lado da região perioral (Figura 23).

Figura 22. Obtenção dos gametas através de estímulo por impulsos elétricos de 35V.
Fonte: Arquivo pessoal.

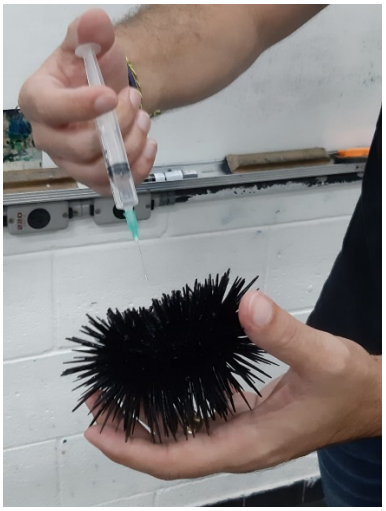


Figura 23. Obtenção dos gametas através de aplicação de KCL.
Fonte: Arquivo pessoal.

Após esta liberação, de acordo com cada gênero, houve a coleta – gênero feminino foram apoiadas em um béquer, com a superfície aboral virada para baixo (Figura 24).

Figura 24. Coleta dos gametas do gênero feminino.
Fonte: Arquivo pessoal.

E gênero masculino coletados com uma pipeta Pasteur de ponta fina, e transferidos para um béquer que estava sendo resfriado com o auxílio de gelo até o momento da fecundação (Figura 25).

Figura 25. Coleta dos gametas do gênero masculino.
Fonte: Arquivo pessoal.

Para o gênero feminino, foi necessário esperar a decantação dos ovócitos a fim de descartar o sobrenadante, filtrando a solução através de uma malha de 350µm, acrescentando água de diluição, onde este processo foi realizado três vezes de acordo com a ABNT/NBR 15350/2012.

Para os gametas do gênero masculino, foi acrescentado água de diluição, mantendo sempre a proporção de 0,5 mL de gametas/25mL de água. Para ocorrer a fecundação, foi inserido 1mL de esperma ao béquer contendo os óvulos, esperando de 5-10 minutos para a obtenção dos zigotos.

Após esta obtenção, foi retirado aproximadamente 1mL dessa solução para realizar a contagem através da câmara de Sedgwick-Rafter (Figura 26), que é especializada para contagem e análise, possibilitando uma maior identificação e quantificação dos zigotos, onde estes devem obter um valor mínimo de 80% de fecundação para dar prosseguimento ao ensaio. Este procedimento foi realizado e calculado a média e o volume da solução que após duas horas da fecundação sob constante agitação, foram transferidos para os tubos de ensaio das soluções-testes.

Ao final do ensaio, as substâncias-testes foram mantidas em câmara incubadora, devidamente identificadas, por um período de 42 horas.

Seguidamente do tempo estipulado, foi retirado um percentual para avaliar a formação de pelo menos 80% de *Pluteus;* após essa confirmação, o ensaio foi finalizado com a inserção de 0,5mL de formol tamponado com bórax (em cada tubo de ensaio) a fim de bloquear o desenvolvimento dos *Pluteus*.

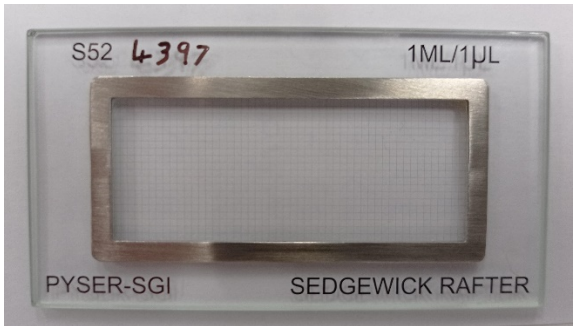


Figura 26. Câmara de Sedgwick-Rafter.
Fonte: Arquivo pessoal.

Finalizado o teste, foi realizada a leitura dos resultados de cada solução-teste, novamente com o auxílio da câmara de Sedgwink-Rafter, avaliando assim, o grau de desenvolvimento de Pluteus (Figura 27) diferenciando os organismos normais e os anormais (que apresentaram estágios anteriores aos Pluteus, sendo ovo, mórula, blástula ou gástrula; que tiveram atraso no desenvolvimento comparando com os demais e os que apresentarem deformações) através da contagem dos 100 primeiros zigotos.

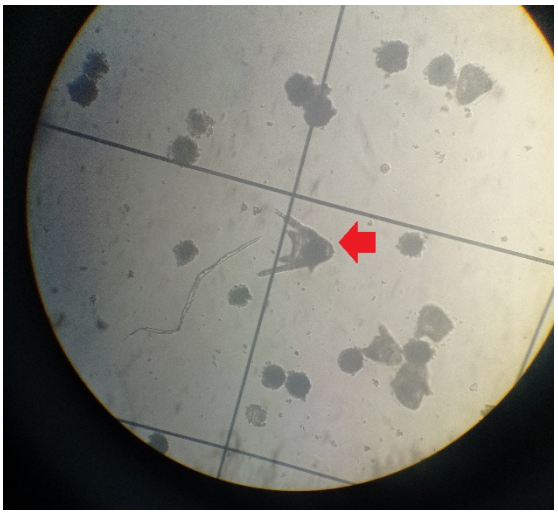


Figura 27. Pluteus, larva de *Echnometra lucunter.*
Fonte: Arquivo pessoal.

3.2.7.3. Métodos estatísticos para avaliação dos resultados

Os resultados dos ensaios de toxicidade foram registrados para o estabelecimento da média, desvio padrão (DP) e Coeficiente de variação (CV) dos resultados obtidos. Para estimativa dos valores de toxicidade, foi seguido o protocolo da *United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 2002).

Para estimativa da toxicidade aguda observada nos ensaios com *Daphnia similis*, foi utilizado o método estatístico *Trimmed Speramn Karber* (HAMILTON *et al.*, 1977), através do Software *Trimmed Spearman-Karber* (versão 1.5), que tem a capacidade de calcular o valor pontual da CE_{50} e os intervalos de confiança.

Com relação aos ensaios para avaliação da toxicidade crônica sobre o desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter*, foram estabelecidos os valores CI50 (concentração de inibição a 50% dos organismos expostos), CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado).

A determinação da CI50 foi calculada através do método de interpolação linear (NORBERG-KING, 1988). Para o estabelecimento de CENO e CEO foi utilizado o programa estatístico *Graphpad Prism*® versão 5.3, no qual os dados foram analisados quanto a normalidade e homogeneidade de variância através dos métodos *Chi-square* e Barllett, respectivamente. Posteriormente foi empregada a análise de variância (ANOVA) com *pos hoc* de Dunnett, com diferenças estatísticas sendo consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Cálculo da Concentração Ambiental Estimada (CAE)

A partir dos dados de consumo coletados e outras informações para o município de Cubatão, foram empregados os cálculos para a obtenção da Fpen dos fármacos Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol (Tabela 4).

Tabela 4. Valores obtidos para o consumo anual e fator de penetração no mercado para as ETEs Lagoa e Casqueiro.

Tuberculostático (mg)	DDD	Consumo anual* (mg)	Fpen ETE (%)
Rifampicina	750	6.115.200	17,215,344
Isoniazida	375	3.057.600	17,215,344
Pirazinamida	2	8.598.400	9,077,243
Etambutol	1.375	5.911.400	9,077,243

*consumo anual no município de Cubatão no período de Julho/2017 à Julho/2018. DDD, Dose Diária Definida. Fpen, fator de penetração no mercado.

A partir dos cálculos realizados para Fpen, foram então estimados valores para a Concentração Ambiental Estimada (CAE) para os tuberculostáticos, referentes à

quantidade dispensada no período de Julho/2017 à Julho/2018.

Para o cálculo da CAE das águas de superfície no município de Cubatão, foi necessária a separação por área de influência de ETEs e a quantidade de resíduos líquidos/habitantes/dia é de 413 L para a ETE Lagoa e 392 L para a ETE Casqueiro, sendo 10 o fator de diluição utilizado em ambas as estações de tratamento de efluentes. Tais dados seguem apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores obtidos para as CAE dos tuberculostáticos nas águas de superfície de Cubatão/SP, separados por ETE Lagoa e ETE Casqueiro.

Tuberculostático	**CAE ETE Lagoa* (µg.L^{-1})**	**CAE ETE Casqueiro* (µg.L^{-1})**
Rifampicina	3,12	3,29
Isoniazida	1,56	1,64
Pirazinamida	4,39	4,62
Etambutol	3,01	3,18

Para a área de influência da ETE Lagoa, os 4 fármacos tuberculostáticos (Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol e Isoniazida) apresentaram valor de CAE superior ao limite do documento EMEA (0,01 µg.L^{-1}) indicando que todos os tuberculostáticos inclusos neste estudo, da área da ETE Lagoa precisam ser avaliados quanto ao destino e o efeito ambiental dos compostos (EMEA,2006).

Para a área de influência da ETE Casqueiro, os 4 fármacos tuberculostáticos (Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol e Isoniazida) também apresentaram valor de CAE superior ao limite do documento EMEA (0,01 µg.L^{-1}) indicando que todos os tuberculostáticos inclusos neste estudo, da área da ETE Lagoa também precisam ser avaliados quanto ao destino e o efeito ambiental dos compostos (EMEA,2006).

4.2. Resultados dos ensaios ecotoxicológicos

As análises foram realizadas individualmente para cada fármaco (Isoniazida e Pirzinamida), mantendo primeiramente os resultados das análises de efeitos biológicos adversos nas neonatas de *Daphnia similis* com os fármacos selecionados e, após, as análises de inibição do desenvolvimento embriolarval dos Pluteus de *Echinometra lucunter*.

4.2.1. Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia similis*

As análises de toxicidade com *Daphnia similis (n=3)* com os fármacos Isoniazida e Pirazinamida foram realizadas através da observação dos organismos que apresentaram imobilidade/mortalidade quando foram expostos às diferentes concentrações destes fármacos (6,25 a 100 $mg.L^{-1}$) , e após, realizado o cálculo para encontrar a CE_{50}. Os resultados das substâncias analisadas nos ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* estão apresentados nas Figuras 28 e 29.

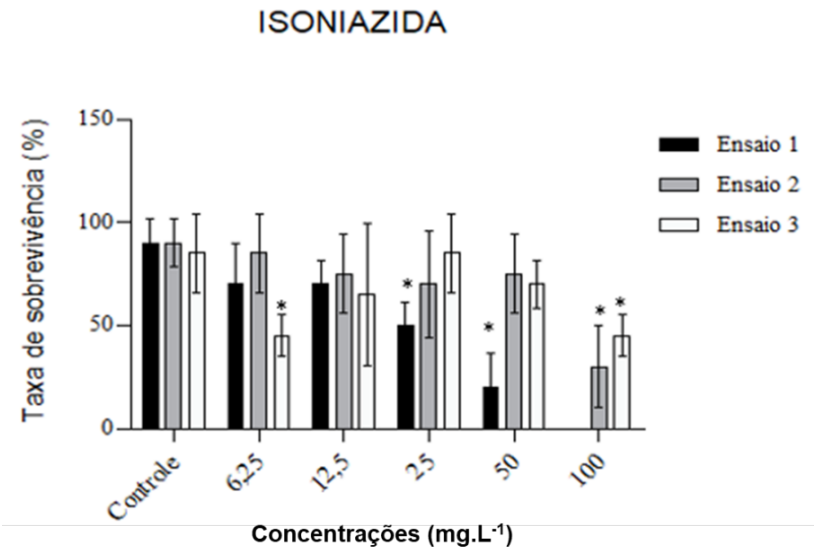


Figura 28. Resultado do ensaio de toxicidade com *Daphnia similis* quanto à exposição em diferentes concentrações de Isoniazida. Os valores expressados no gráfico representam a média± erro padrão de cada concentração testada. ANOVA com teste posterior de Dunnett: *p<0,05.

Tabela 6 – Resultados dos ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* referente ao fármaco Isoniazida.

Isoniazida	CE50 (mg.L-1)	Intervalo de confiança
1	100	---
2	83,12	62,99 - 109,69
3	26,79	19,41 - 36,98
Média	69,97	---
DP	38,33559573	---
CV (%)	54,78861759	---

CE_{50}- Concentração efetiva que induz efeito em 50% dos organismos expostos; IC- Intervalo de confiança; DP- Desvio Padrão; CV- Coeficiente de Variação.

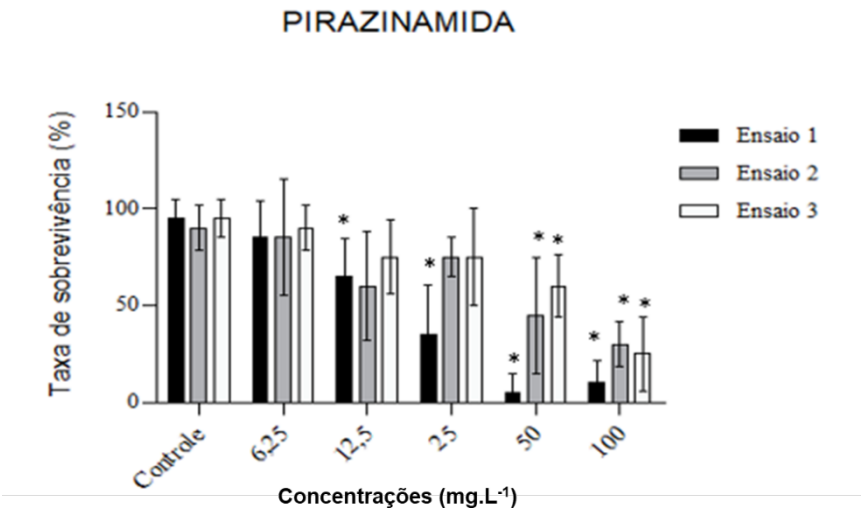


Figura 29. Resultado do ensaio de toxicidade com *Daphnia similis* quanto à exposição em diferentes concentrações de Pirazinamida. Os valores expressados no gráfico representam a média ± erro padrão de cada concentração testada. ANOVA com teste posterior de Dunnett: *p<0,05.

Tabela 7 – Resultados dos ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* referente ao fármaco Pirazinamida.

Pirazinamida	CE50 (mg.L-1)	Intervalo de confiança
1	62,19	43,05 - 89,84
2	18,32	13,95 - 24,07
3	52,97	30,72 - 91,35
Média	44,49333333	---
DP	23,13081567	---
CV (%)	51,98714938	---

CE50- Concentração efetiva que induz efeito em 50% dos organismos expostos; IC- Intervalo de confiança; DP- Desvio Padrão; CV- Coeficiente de Variação.

4.2.2. Resultados dos ensaios ecotoxicológicos com *Echinometra lucunter*

Os resultados dos ensaios de toxicidade com *Echinometra lucunter* avaliaram o desenvolvimento embriolarval e a formação de larvas *Pluteus*, a partir da exposição dos embriões com as substâncias-teste e em determinadas concentrações, simulando assim, o efeito dos efluentes lançados incorretamente ao ambiente aquático.

Os dados das substâncias analisadas nos ensaios de toxicidade com *Echinometra lucunter* referente ao fármaco Isoniazida (n=3) estão representados na Figura 30, onde o organismo-teste foi exposto a diferentes concentrações de Isoniazida (200,100,50,25,12.5 e 6,25 $mg.L^{-1}$), e foram observados valores de CEO e

CENO.

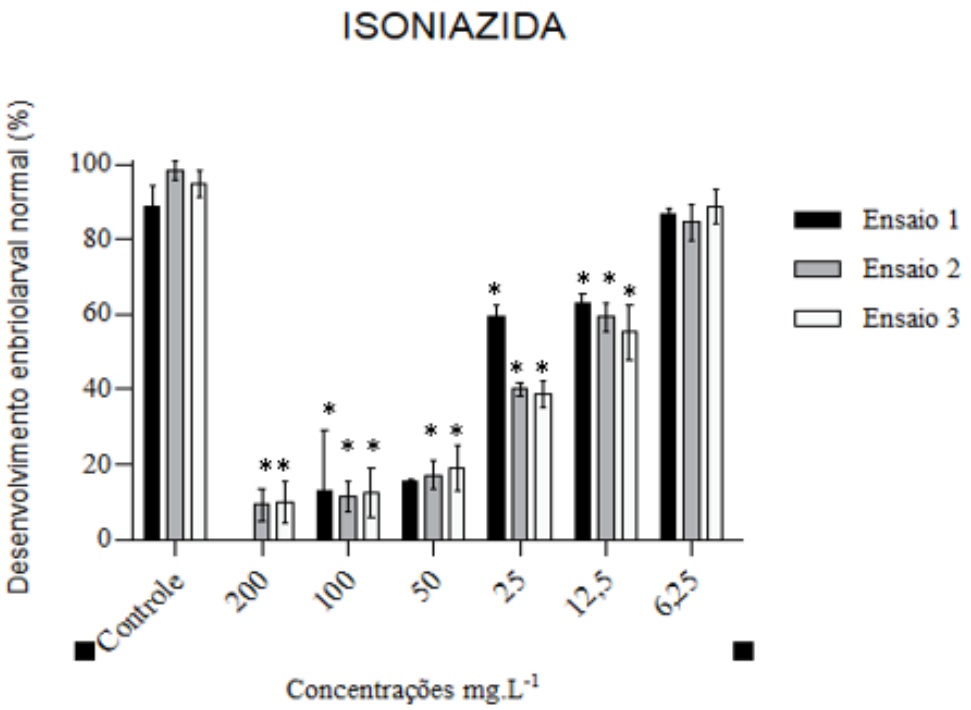


Figura 30. Resultado do ensaio de toxicidade com *Echinometra lucunter* quanto à exposição em diferentes concentrações de Isoniazida. Os valores expressados no gráfico representam a média ± erro padrão de cada concentração testada. ANOVA com teste posterior de Dunnett: *p<0,05.

Quanto aos ensaios de toxidade com *Echinometra lucunter* referente ao fármaco Pirazinamida (n=3), foram utilizadas as mesmas concentrações e foram observados valores de CEO e CENO, onde eles estão representados na Figura 31.

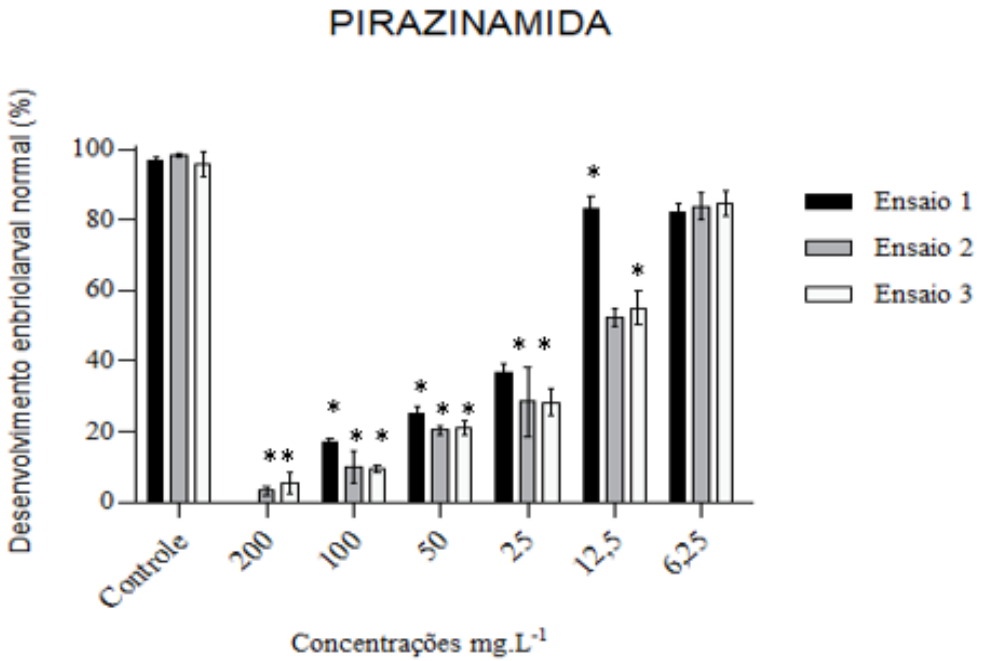


Figura 31. Resultado do ensaio de toxicidade com *Echinometra lucunter* quanto à exposição em diferentes concentrações de Pirazinamida. Os valores expressados no gráfico representam a média ± erro padrão de cada concentração testada. ANOVA com teste posterior de Dunnett: *p<0,05.

E para melhor visualização dos resultados, a Tabela 7 demonstra a copilação de CEO e CENO dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida.

Tabela 8 – Resultados dos ensaios de toxicidade crônica com os fármacos tuberculostáticos com o organismo-teste *Echinometra lucunter*.

Medicamento	CEO ($mg.L^{-1}$)	CENO ($mg.L^{-1}$)	CI50 ($mg.L^{-1}$)
Isoniazida	12,5	6,25	23,66 (22,69 - 25,62)
Pirazinamida	12,5	6,25	17,21 (16,33 - 18,33)

CEO – Menor concentração de efeito observado; CENO – Concentração de efeito não observado; CI_{50} – Concentração inibitória média

5. DISCUSSÃO

Há uma década, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a tuberculose (TB) em estado de emergência no mundo, onde ainda é a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Segundo estimativas da OMS, dois bilhões de pessoas correspondendo a um terço da população mundial está infectada pelo Mycobacterium *tuberculosis*. Destes, 8 milhões desenvolverão a doença e 2 milhões morrerão a cada ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. Estima-se uma prevalência de 50 milhões de infectados com cerca de 111.000 casos novos e 6.000 óbitos, ocorrendo anualmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Esses dados estatísticos da Tuberculose no Brasil levam ao aumento da produção e do uso de tuberculostáticos, onde estes podem ocasionar uma liberação inadequada ao meio ambiente através de sistemas de esgotos ineficazes em seu tratamento.

Por conta destes tratamentos ineficazes para a remoção dos fármacos, a identificação deles no meio ambiente é importante e possuem alguns métodos, como por exemplo, o cálculo da Concentração Ambiental Estimada (CAE) que foi utilizado neste estudo.

Os resultados obtidos de CAE demonstram valores superiores ao limite estimado de 0,01 $ug.L^{-1}$ para todos os fármacos tuberculostáticos desta pesquisa, onde, dessa forma, verifica-se a importância de um monitoramento ambiental eficaz para os fármacos, em especial, aos tuberculostáticos, pois pode tratar-se de substâncias com potencial alto risco ao ambiente aquático.

Diante deste resultado, se faz necessário o conhecimento sobre o destino destes fármacos, onde no município de Cubatão existem duas estações de tratamento de efluentes por responsabilidade da Sabesp, sendo ETE Lagoa e ETE Casqueiro; tais ETEs são destinadas há alguns bairros, porém, nem todos os habitantes possuem o saneamento adequado, principalmente quando estamos tratando de bairros periféricos.

Uma vez que há falha no sistema de saneamento básico adequado, se faz necessário também ensaios ecotoxicológicos para verificar o risco dessas

substâncias em organismos-teste, como por exemplo, *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter*.

Devido à alta sensibilidade aos poluentes, os ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* tiveram resultados rápidos, nas quais diz respeito à imobilidade e mortalidade dos organismos.

A média dos três ensaios com *Daphnia similis* para a CE_{50} do fármaco Isoniazida foi 69,97 $mg.L^{-1}$; e em relação ao fármaco Pirazinamida, a média dos três ensaios *com Daphnia similis* para a CE_{50} foi 44,49 $mg.L^{-1}$.

A avaliação toxicológica no organismo-teste *Echinometra lucunter* foi baseada na inibição do desenvolvimento embriolarval, onde este está diretamente relacionado ao seu sucesso reprodutivo. Deste modo, foram observados valores de CEO, CENO e CI_{50} para os fármacos tuberculostáticos, onde: i) Isoniazida apresentou CEO 12,5; CENO 6,25 e CI50 23,66 $mg.L^{-1}$ e ii) Pirazinamida apresentou CEO 12,5; CENO 6,25 e CI 5017,21 $mg.L^{-1}$.

Baumann *et al.* (2020) relata em seu estudo que a Isoniazida induziu significativamente uma leve necrose de célula única de hepatócitos e alterações de genes marcadores que são relacionados à hepatotoxicidade, onde confirmam os efeitos hepatotóxicos do fármaco. Além disso, Baumann *et al.* (2020) também complementa que a correlação da hepatotoxicidade e a síntese hepática reduzida de VTG não foi observada, sugerindo uma improvável interferência com o sistema endócrino.

Quanto ao fármaco Pirazinamida, não foram encontrados estudos deste fármaco em organismos aquáticos, porém, existem dados com roedores como do estudo em que Zhao *et al.*, (2017) apresenta resultados do fármaco Pirazinamida em alguns aspectos, como por exemplo, no metabolismo de purina onde os ratos fêmeas dosados com o fármaco houve diminuições significativas de AMP hepático como inosina e xantina, além do aumento de ácido úrico sérico que pode ser um indicativo de hiperuricemia. Zhao (2017) também destacou questões quanto ao estresse oxidativo, onde a Pirazinamida foi relatada como possível causadora de danos hepáticos oxidativos em ratos machos e fêmeas, pois houve o aumento de GSH e GSSG enquanto o glutamato e a glicina diminuíram acentuadamente.

Neste mesmo estudo, também foi relatado que a Pirazinamida produziu danos ao DNA mais graves em ratos, que podem estar associados à formação de radicais livres hepatotóxicos e genotóxicos.

Quintino *et al.* (2003) estudou o fármaco Pirazinamida em ratas gestantes onde identificou uma sequência comum de crescimento celular em todos os órgãos além de uma redução do peso da placenta no grupo tratado com doses mais altas de Pirazinamida; porém, nenhuma malformação fetal foi registrada além de efeitos colaterais como náusea e anorexia, o que vai de encontro com a bula do fabricante onde relata que a Pirazinamida não foi mutagênica.

Tais dados, apesar de serem baseados em roedores, podem estimar e conduzir como os efeitos ocorrem nos organismos aquáticos, uma vez que tais fármacos possuem similaridades com algumas enzimas. Por exemplo, o ouriço-do-mar apresenta 120 CYP genes, e os que são relacionados às famílias CYP1 a 4 constituem 80% deste total (YAMAMOTO, 2014); o tuberculostático Isoniazida inibe as isoenzimas e enzimas do citocromo CYP2C19 e CYP3A4 (família CYP2 e CYP3) *in vitro*, aumentando assim, a exposição deste fármaco nos organismos aquáticos (FIOCRUZ, 2017).

Ainda existe uma lacuna quanto à presença de metabólitos gerados e a porcentagem excretada inalterada dos fármacos tuberculostáticos, onde eles podem variar de 30-70% de sua forma inalterada, onde estes também são lançados nos sistemas de esgoto através da urina e das fezes e que também deve ser levado em consideração no que diz respeito a uma possível contaminação nos organismos de ambiente aquático, induzindo novos estudos.

Por fim, os dados de toxicidade segundo a diretiva 93/67/CEE (CEE Conselho da Comunidade Europeia) quanto à classificação das substâncias de acordo com as concentrações e efeito estimadas foram observadas e encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 – Classificação dos fármacos tuberculostáticos baseados na diretiva 93/67/CEE da União Europeia levando em consideração ensaios com organismos-teste *D. similis* e *E. lucunter*.

Organismo-teste D. *similis*		
Medicamento	**CE_{50} (mg/L^{-1})**	**Classificação**
Isoniazida	69,97	Nocivo
Pirazinamida	44,49	Nocivo
Organismo-teste E. *lucunter*		
Medicamento	**CI_{50} (mg/L^{-1})**	**Classificação**
Isoniazida	23,66	Nocivo
Pirazinamida	17,21	Nocivo

Para os ensaios com *Daphnia similis*, os fármacos Isoniazida e Pirazinamida

podem ser classificados como “nocivo” de acordo com a diretiva européia 93/67/CEE (CEE Conselho da Comunidade Europeia).

Para os ensaios toxicológicos com *Echinometra lucunter*, os fármacos Isoniazida e Pirazinamida também foram classificados como “nocivos” de acordo com a diretiva européia 93/67/CEE.

6. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, que avaliou os efeitos ecotoxicológicos dos fármacos tuberculostáticos em águas superficiais do município de Cubatão/SP, através da CAE e dos ensaios toxicológicos em organismos-teste *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter*, concluímos que:

- Foi calculada a Concentração Ambiental Estimada (CAE) dos fármacos tuberculostáticos dispensados/consumidos no município de Cubatão, onde os dois fármacos precisam ser avaliados quanto ao seu efeito ambiental (ensaios ecotoxicologicos) já que ultrapassaram o valor limite de 0,01 $\mu g.L^{-1}$ de acordo com a diretriz da EMEA (CHMP, 2006).
- Os organismos-teste estudados (*D. similis e E. lucunter*) apresentaram sensibilidade após exposição dos fármacos Isonizaida e Pirazinamida, onde, em ambos os organismos e testes os fármacos foram considerados como “nocivos” de acordo com a diretiva européia 93/67/CEE (CEE Conselho da Comunidade Européia).
- São necessários estudos com biomarcadores para o melhor conhecimento dos efeitos dos tuberculostáticos Isoniazida e Pirazinamida no ambiente aquático.

Considerando a escassez de estudos ecotoxicológicos em ambiente aquático do fármaco Isoniazida e considerando que não há estudos ecotoxicológicos em organismos-aquáticos do fármaco Pirazinamida publicados, havendo esta lacuna de rastreabilidade destes fármacos no meio ambiente, os resultados desta pesquisa poderão servir como subsídios a novas legislações referentes aos produtos farmacêuticos e também, a criação de programas governamentais que visem o monitoramento dos fármacos desde o seu registro em órgãos reguladores até a criação de adequados tratamentos das Estações de Tratamento de Efluentes (ETE) em busca de soluções que promovam redução e até mesmo a eliminação de fármacos no ambiente aquático.

Além disso, este estudo servirá como iniciativa para a avaliação dos demais fármacos tuberculostáticos em vários organismos aquáticos, podendo servir como comparação em demais trabalhos científicos.

7. ARTIGO PUBLICADO

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

Avaliação ecotoxicológica de medicamentos tuberculostáticos: Concentrações Ambientais Estimadas e efeitos biológicos em *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter*.

Ecotoxicological evalution of tuberculostatic medicines: Predicted Environmental Concentration and biological effects in *Daphnia similis* and *Echinometra lucunter*.

Evaluacion ecotoxicologica de medicamentos tuberculostaticos: Concentraciones Ambientales Estimadas y efectos biológicos em *Daphnia similis* y *Echinometra lucunter*.

Recebido: 08/04/2021 | Revisado: 14/04/2021 | Aceito: 27/04/2021 | Publicado: 12/05/2021

Monike Silva de Freitas
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6583-1257
Universidade Santa Cecília, Brasil
E-mail: monikesfreitas@yahoo.com.br
Walber Toma
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5265-7739
Universidade Santa Cecília, Brasil
E-mail: walbertoma@gmail.com
Fábio Hermes Pusceddu
ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0336-7310
Universidade Santa Cecília, Brasil
E-mail: fabiohp20@hotmail.com
Luciana Lopes Guimarães
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7230-9571
Universidade Santa Cecília, Brasil
E-mail: lucianafarm@unisanta.br

Resumo

Com o passar do tempo, o crescimento da produção de produtos farmacêuticos vem aumentando gradativamente e consequentemente, os resíduos destes produtos de forma inadequada no ambiente aquático também. Neste contexto, destaca-se a escassez de estudos ecotoxicológicos sobre os medicamentos da classe dos tuberculostáticos no meio aquático. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a presença dos fármacos tuberculostáticos utilizados como esquema padronizado pelo Ministério da Saúde para o tratamento de tuberculose (Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol) em águas superficiais do município de Cubatão (São Paulo, Brasil), através do cálculo da concentração ambiental estimada (CAE). Adicionalmente, foram avaliados os efeitos biológicos adversos nos organismos-testes *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter* para os fármacos Isoniazida e Pirazinamida. As concentrações ambientais estimadas foram calculadas para os quatro fármacos tuberculostáticos de acordo com a diretriz da Agência Europeia de Medicamentos (EMEA) (CHMP, 2006). Após, foram realizados ensaios de toxicidade em D. *similis* e *E. lucunter* de acordo com as normas ABNT NBR 12713:2016 e ABNT NBR 15350:2012, respectivamente. Os resultados das CAE para todos os fármacos tuberculostáticos incluídos neste estudo apresentaram valores superiores ao limite considerado pela EMEA de 0,01 $\mu g.L^{-1}$. Para o ensaio de toxicidade com D. *similis*, os fármacos Isoniazida e Pirazinamida apresentaram valores de CE_{50} respectivamente 69,97 $mg.L^{-1}$ e 44,49 $mg.L^{-1}$ sendo estes classificados como "nocivos" de acordo com a Diretiva da Comunidade Econômica Europeia (CEE) 93/67/CEE. Já para o ensaio de toxicidade com o organismo-teste *Echinometra lucunter*, os fármacos Isoniazida e Pirazinamida apresentaram valores de CI_{50} 23,66 $mg.L^{-1}$ e 17,21 $mg.L^{-1}$, respectivamente, resultados que os também como "nocivos" de acordo com a Diretiva 93/67/CEE. Os resultados desta pesquisa poderão servir como subsídios a novas legislações e a criação de programas governamentais que buscam soluções promovendo redução e até mesmo a eliminação de fármacos no ambiente aquático.

Palavras-chave: Isoniazida; Pirazinamida; Fármacos no meio ambiente; Concentração ambiental estimada; Ecotoxicologia.

Abstract

The increase in the production of pharmaceutical products has been gradually increasing and, consequently, the residues of these products inappropriately in the aquatic environment as well. In this context, the scarcity of ecotoxicological studies on drugs of the tuberculostatic class in the aquatic environment is highlighted. Thus, the present study aimed to evaluate the presence of tuberculostatic drugs used as a standardized scheme by the Brazilian Ministry of Health for the treatment of tuberculosis (Rifampicin, Isoniazid, Pyrazinamide and Etambutol), by calculating the predicted environmental concentration (PEC) in surface waters of the municipality from Cubatão (São

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

Paulo, Brazil). In addition, adverse biological effects on the test organisms *Daphnia similis* and *Echinometra lucunter* for the drugs Isoniazid and Pyrazinamide were evaluated. The PEC values were calculated among the four tuberculostatic drugs according to the guideline of the European Medicines Agency (EMEA) (CHMP, 2006). Afterwards, toxicity tests were performed on *D. similis* and *E. lucunter* according to Brazilian Association of Technical Standards ABNT NBR 12713:2016 e ABNT NBR 15350:2012, respectively. PEC values for all four tuberculostatic drugs included in the present study showed values that exceeded the limit considered by the EMEA of 0.01 µg.L-1. For the toxicity test with *D. similis*, the drugs Isoniazid and Pyrazinamide presented EC50 values of 69.97 $mg.L^{-1}$ and 44.49 $mg.L^{-1}$, respectively, being classified as "harmful" according to the Directive of the European Economic Community (EEC) 93/67 / EEC. As for the toxicity test with *E. lucunter*, the drugs Isoniazid and Pyrazinamide showed IC_{50} values of 23.66 $mg.L^{-1}$ and 17.21 $mg.L^{-1}$, respectively, results that are also considered "harmful" according to with Directive 93/67 / EEC. The results of this research may serve as subsidies to new legislation and the creation of government programs that seek solutions promoting reduction and even the elimination of pharmaceuticals in the aquatic environment.
Keywords: Isoniazid; Pyrazinamide; Pharmaceuticals in the environment; Predicted Environmental Concentration; Ecotoxicology.

Resumen

Con el tiempo, el crecimiento en la producción de productos farmacéuticos ha ido aumentando gradualmente y, en consecuencia, los residuos de estos productos de manera inapropiada también en el medio acuático. En este contexto, se destaca la escasez de estudios ecotoxicológicos sobre fármacos de la clase tuberculostática en el medio acuático. Así, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la presencia de fármacos tuberculostáticos utilizados como esquema estandarizado por el Ministerio de Salud de Brasil para el tratamiento de la tuberculosis (Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida y Etambutol), mediante el cálculo de la Concentración Ambiental Estimada (CAE) en aguas superficiales del municipio de Cubatão (São Paulo, Brasil). Además, se evaluaron los efectos biológicos adversos sobre los organismos de prueba *Daphnia similis* y *Echinometra lucunter* para los fármacos Isoniazida y Pirazinamida. CAE se calcularon entre los cuatro fármacos tuberculostáticos de acuerdo con las directrices de la Agencia Europea de Medicamentos (EMEA) (CHMP, 2006). Posteriormente, se realizaron pruebas de toxicidad en *D. similis* y *E. lucunter* según la Asociación Brasileña de Normas Técnicas (ABNT). Los resultados de las CAEs para todos los fármacos tuberculostáticos incluidos en el presente estudio mostraron valores superiores al límite considerado por la EMEA de 0,01 µg.L-1. Para el ensayo de toxicidad con *D. similis*, los fármacos Isoniazida y Pirazinamida tuvieron valores de CE50 de 69,97 $mg.L^{-1}$ y 44,49 $mg.L^{-1}$, respectivamente, siendo clasificados como "nocivos" según la Directiva de la Economía Europea. Comunidad (CEE) 93/67 / CEE. En cuanto al ensayo de toxicidad con *E. lucunter*, los medicamentos Isoniazida y Pirazinamida mostraron valores de IC50 de 23,66 $mg.L^{-1}$ y 17,21 $mg.L^{-1}$, respectivamente, resultados que también se consideran "nocivos" según la Directiva 93/67/ CEE. Los resultados de esta investigación pueden servir como subsidios a la nueva legislación y también a la creación de programas gubernamentales que busquen soluciones que promuevan la reducción e incluso la eliminación de las drogas en el medio acuático.
Palabras clave: Isoniazida; Pirazinamida; Drogas en el medio ambiente; Concentración ambiental estimada; Ecotoxicología.

1. Introdução

A tuberculose é uma das doenças mais antigas da humanidade, onde estima-se sua origem em 150 milhões de anos, tendo provavelmente matado mais pessoas do que qualquer outro microrganismo patogênico. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tuberculose é a principal causa de morte por um único agente infeccioso em todo o mundo. Há uma década, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a tuberculose (TB) em estado de emergência no mundo, onde ainda é a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos. Em 2018, havia um mímero estimado de 10 milhões de novos casos de tuberculose em todo o mundo e 1,5 milhão de pessoas morreram devido à doença. O Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo. Estima-se uma prevalência de 50 milhões de infectados com cerca de 111.000 casos novos e 6.000 óbitos, ocorrendo anualmente (Ministério da saúde, 2019).

O tratamento da tuberculose tem como objetivo a cura e a rápida redução da transmissão da doença. Seu tratamento dura no mínimo seis meses e a recomendação é a adoção da estratégia DOTS (*Directlly observed treatment, short course*). No Brasil, o esquema de tratamento da tuberculose é padronizado, e deve seguir recomendações do Ministério da Saúde que compreende em duas fases: a intensiva (ou de ataque), e a de manutenção. O esquema básico para tratamento da tuberculose em adultos e adolescentes é composto por quatro fármacos na fase intensiva e dois na fase de manutenção. A apresentação farmacológica dos medicamentos, atualmente em uso, para o esquema básico é de comprimidos em doses fixas combinadas

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

com a apresentação tipo 4 em 1 (RHZE – Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol) ou 2 em 1 (RH – Rifampicina e Isoniazida) (Ministério da saúde, 2019).

No contexto do alto consumo de medicamentos tuberculostáticos é necessário considerar também os destinos ambientais destes fármacos e a sua influência sobre a vida aquática, visto que as principais rotas de excreção humana (urina e fezes) resultará no despejo destes fármacos (e seus metabólitos) em águas por meio do lançamento de esgotos sanitários. Os efluentes procedentes de estações de tratamento de águas residuais são considerados a fonte mais importante para introdução de produtos farmacêuticos no meio ambiente (Reis-filho et al., 2007) pois as tecnologias convencionais de tratamento (ETEs) apresentam limitações na remoção de uma variedade de fármacos (Carvalho et al., 2009).

Nos últimos vinte anos, tem sido dada uma atenção especial a contaminação ambiental por fármacos por causa do potencial destas substâncias de induzir efeitos biológicos adversos, particularmente aos ecossistemas aquáticos, e vem sendo classificados como poluentes emergentes ambientais. A presença desses múltiplos compostos no ambiente implica também em múltiplas vias de ação, podendo interferir significativamente na fisiologia, no metabolismo e no comportamento das espécies (Fent et al., 2006).

A poluição por fármacos no ambiente pode ocorrer em concentrações de partes por bilhão (ppb) ou ainda em partes por trilhão (ppt), embora estes níveis já tenham sido considerados muito baixos para causar danos ambientais, muitas destas substâncias têm demonstrado afetar a vida aquática em concentrações similares (Jones et al., 2007). A existência de fármacos no ambiente foi relatada pela primeira vez por Garrison *et al.* (1976), que identificaram o ácido clofíbrico em efluente tratado nos Estados Unidos, na faixa de 0,8 a 2,0 $\mu g.L^{-1}$. Os estudos sobre a ocorrência desses contaminantes no meio ambiente vêm crescendo e alertam sobre o seu possível risco tóxico (ESCHER, 2019). Em um estudo coordenado por Pereira *et al.* (2016) foram realizadas análises de fármacos em águas superficiais e de fundo no entorno do lançamento de esgoto pelo emissário submarino do município de Santos (São Paulo, Brasil), e evidenciaram pela primeira vez a presença de fármacos e drogas ilícitas em águas marinhas no litoral do Brasil onde foram detectadas a presença de acetaminofeno (34,6 $ng.L^{-1}$), losartana (32,0 $ng.L^{-1}$), valsartana (75,0 $ng.L^{-1}$) e diclofenaco (19,4 $ng.L^{-1}$), além de cocaína (537,0 $ng.L^{-1}$).

Diferentes agências regulatórias têm publicado diretrizes detalhadas acerca da avaliação dos possíveis efeitos adversos de fármacos no ambiente. Na União Europeia, a aprovação do registro de novos medicamentos requer a avaliação dos potenciais riscos ambientais associados à sua utilização, além dos padrões mínimos já exigidos como segurança, estabilidade e eficácia, e essa exigência ambiental se deve a Diretiva 2004/27/CE. Além disso, a Diretiva 2013/39 da União Europeia implementa programas de monitoramento para os contaminantes emergentes com o propósito de priorizar as substâncias que apresentem risco para o ambiente aquático e, um exemplo disso é o diclofenaco que foi inserido na lista de vigilância de substâncias para o monitoramento do lançamento em águas, em toda a União Europeia. O U.S. Food and Drug Administration (FDA) publicou um guia de avaliação de medicamentos de uso humano e, conforme o documento, testes de avaliação ecotoxicológicas devem ser realizados para os medicamentos cujo princípio ativo que será introduzido no ambiente aquático em concentrações superiores a $1 \mu g.L^{-1}$ (Santos et al., 2010). No Brasil, a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Res. 357/2005 (e suas alterações) (Brasil, 2005), que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, não contempla limites para a presença de fármacos em águas e consequentemente a sua presença não é monitorada.

Neste cenário, levando em consideração o alto consumo de tuberculostáticos no Brasil, juntamente com a escassez de estudos quanto à presença destes fármacos e os seus efeitos biológicos em meio aquático, o presente estudo propôs-se estimar a presença de tuberculostáticos em águas superficiais do município de Cubatão (São Paulo, Brasil) por meio do cálculo da Concentração Ambiental Estimada (CAE) e avaliar os efeitos biológicos adversos por meio de ensaios de toxicidade, com o intuito de obter dados relevantes para o monitoramento dos contaminantes, sendo um possível subsídio para atualizações das

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

legislações brasileiras que dispõem sobre a qualidade das águas, assim como a criação de programas de monitoramento ambiental de fármacos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Cálculo da Concentração Ambiental Estimada – CAE

O cálculo da CAE para os fármacos Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol em águas superficiais foi realizado de acordo com a diretriz da EMEA (CHMP, 2006), através da seguinte equação (1):

$$\text{CAE águas superficiais} = \frac{\text{Dose máxima consumida por habitante(mg)} \times \text{Fpen}}{\text{resíduos líquidos (L)/habitante} \times \text{fator de diluição}}$$

Sendo que:

Fpen = fator de penetração no mercado

O Fpen (CHPM, 2006), foi calculado de acordo com a equação (2):

$$\text{Fpen}\,[\%] = \frac{\text{consumo (mg/ano)} \times 100}{\text{DDD (mg/dxhab)} \times \text{Pop} \times 365\ \text{dias}}$$

Sendo que:

DDD = dose diária definida (segundo OMS)

Pop = número de habitantes da cidade

Para a obtenção das informações dos medicamentos tuberculostáticos dispensados em Cubatão (São Paulo, Brasil) para os cálculos da CAE, foi necessário o protocolo junto à Prefeitura Municipal de Cubatão, destinado ao Departamento de Vigilância Epidemiológica onde a mesma forneceu o relatório retirado do Programa de Controle de Tuberculose de Cubatão, no período de Julho/2017 à Julho/2018.

Os tuberculostáticos são dispensados gratuitamente pelo governo brasileiro (de acordo com a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, RENAME) e não há opção de compra, com exceção do fármaco Rifampicina, pois o mesmo é um antibiótico com potencial para tratamento de outras patologias. No entanto, para este estudo, as farmácias de manipulação e drogarias do município de Cubatão foram contatadas, e foi informado pelos farmacêuticos responsáveis técnicos que no período de Julho/2017 à Julho/2018 não houve entrada deste medicamento, assim como, também não houve saída, tendo estes com estoque zerado em todas as farmácias do município.

2.2 Avaliação Ecotoxicológica

Segundo o EMEA (2006), se o valor de CAE for igual ou superior a 0,01 $\mu g.L^{-1}$, a avaliação do destino e efeito ambiental deve ser realizada. Sendo assim, houve a necessidade de realização de testes de toxicidade, onde, para garantir uma melhor avaliação dos resultados em relação aos ensaios ecotoxicológicos, foi necessário a escolha de organismos-teste sensíveis às mudanças do ambiente e que não sofram mudanças repentinas de habitat. Além disso, a escolha dos organismos levou em consideração o ambiente relacionado ao despejo do esgoto sanitário em águas doces de Cubatão/SP, onde foi utilizado o organismo-teste *Daphnia similis*. Adicionalmente se fez necessário a escolha do organismo-teste *Echinometra lucunter* dado que Cubatão compartilha do ambiente estuarino com a cidade de Santos/SP, logo, os lançamentos de tuberculostáticos nas águas do município de Cubatão podem também representar risco para os organismos marinhos.

Para avaliar os efeitos em *Daphnia similis* e em *Echinometra lucunter,* dois fármacos foram selecionados, sendo eles Isoniazida (Anuh Pharma®) e Pirazinamida (Anuh Pharma®) onde ambos apresentaram CAE acima de 0,01 $\mu g.L^{-1}$.

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

2.2.1 Teste de toxicidade aguda em *Daphnia similis*

Para a realização do ensaio de toxicidade aguda em *Daphnia similis*, foi utilizado organismos neonatos com idade entre 6h e 24h, obtidos através de fêmeas com idade entre 7 e 28 dias em concordância com a ABNT 12713:2016 (ABNT, 2016).

Foi realizado manutenção frequente destes organismos como filtragem e troca de água, além da alimentação com várias espécies de algas verdes, mas geralmente usada a *Pseudokirchneriella subcaptata*, propiciando um ambiente favorável para a reprodução (ABNT, 2016). Além da alimentação, também houve adaptação de ambiente favorável com até 25 organismos por litro de água reconstituída (de acordo com a NBR 12713, ABNT 2016) com alguns requisitos adequados para o cultivo da espécie, sendo eles: dureza total mgCO_3/L de 40 a 48 e pH de 7,0 a 7,6; e os mesmos foram acondicionados em câmara de germinação com a temperatura variante entre 18ºC e 22ºC (ABNT, 2016).

Para o ensaio com *Daphnia similis*, foram realizadas três amostragens para cada substância-teste, como garantia dos resultados; sendo quatro réplicas para cada concentração (controle; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 mg.L^{-1}). Em cada réplica, foi pesado na balança analítica devidamente calibrada 0,01g de cada substância teste, que foram diluídas em 100 mL de água. Após as diluições, com uma pipeta Pasteur, foi submetido em cada tubo, cinco neonatas (6 à 24h). As amostras foram mantidas por 48 h em câmara incubadora, com temperatura entre 18 e 22ºC, sem alimentação e em ambiente com fotoperíodo.

Após 48 horas, a olho nu e com auxílio de lâmpada fluorescente, foi realizada a leitura e contagem dos organismos por concentração de cada amostra, assim como, o cálculo das concentrações que causaram morte e/ou imobilidade em 50% dos organismos (CE_{50}).

2.2.2 Teste de toxicidade crônica em *Echinometra lucunter*

Para a realização do ensaio de toxicidade crônica em *Echinometra lucunter*, o organismo-teste foi coletado através de mergulho livre, na Ilha das Palmas – Guarujá (São Paulo, Brasil), armazenado em caixa térmica recoberto com algas do gênero *Ulva sp.* para manter as condições ideais de temperatura até o laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, onde foram mantidos em tanque sob constante aeração e condições ideais, como água natural e parâmetros físico-químicos em concordância com a norma ABNT NBR: 15350 (ABNT, 2012) até a idealização do ensaio. A água utilizada para o preparo das amostras com as substâncias-testes para os ensaios com *Echinometra lucunter* foi reconstituída a partir de uma mistura de sal CORAL PRO SALT marca (RED SEA) em água processada, que foi mantida sob constante agitação. Após, esta solução foi filtrada com o auxílio de uma membrana de celulose Millipore 0,45µm e, a água mantida com os padrões físico-químicos recomendados pela ABNT, tais como pH 7,8 a 8,4 e salinidade entre 30 e 37 (g/L) (ABNT, 2012).

Embriões de ouriço-do-mar recém-fertilizados foram expostos a diferentes concentrações de Isoniazida e Pirazinamida, sendo quatro réplicas para cada concentração (controle; 200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 mg.L^{-1}) onde os mesmos foram expostos durante o período de desenvolvimento embriolarval (36h a 42h) conforme a norma técnica ABNT NBR: 15350 (2012).

Seguidamente do tempo estipulado, foi retirado um percentual para avaliar a formação de 80% de *Pluteus*; após essa confirmação, o teste foi finalizado com a inserção de 0,5mL de formol tamponado com bórax (em cada tubo de ensaio) a fim de bloquear o desenvolvimento dos *Pluteus*. Finalizado o teste, foi realizada a leitura dos resultados de cada solução-teste, com o auxílio da câmara de Sedgwink-Rafter, avaliando assim, o grau de desenvolvimento de *Pluteus* diferenciando os organismos normais e os anormais através da contagem dos 100 primeiros zigotos.

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

2.3 Análise estatística

Os resultados dos ensaios de toxicidade foram registrados para o estabelecimento da média, desvio padrão (DP) e Coeficiente de variação (CV) dos resultados obtidos. Para estimativa dos valores de toxicidade, foi seguido o protocolo da United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2002).

Para estimativa da toxidade aguda observada nos ensaios com *Daphnia similis*, foi utilizado o método estatístico Trimmed Speramn Karber (Hamilton et. al., 1977), através do Software Trimmed Spearman-Karber (versão 1.5), que tem a capacidade de calcular o valor pontual da CE_{50} e os intervalos de confiança.

Com relação aos ensaios para avaliação da toxicidade crônica sobre o desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter*, foram estabelecidos os valores CI_{50} (concentração de inibição a 50% dos organismos expostos), CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado).

A determinação da CI_{50} foi calculada através do método de interpolação linear (NORBERG-KING, 1988). Para o estabelecimento de CENO e CEO foi utilizado o programa estatístico Graphpad Prism® versão 5.3, no qual os dados foram analisados quanto a normalidade e homogeneidade de variância através dos métodos Chi-square e Barllett, respectivamente. Posteriormente foi empregada a análise de variância (ANOVA) com *pos hoc* de Dunnett, com diferenças estatísticas sendo consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

3. Resultados e Discussão

A partir dos dados de consumo coletados e outras informações para a cidade de Cubatão, foram empregados os cálculos para a obtenção da Fpen dos fármacos Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol (tabela 1).

Tabela 1. Valores obtidos para o consumo anual e Fpen.

Tuberculostático	DDD (mg)	Consumo anual* (mg)	Fpen (%)
Rifampicina	750	6.115.200	0,017215344
Isoniazida	375	3.057.600	0,017215344
Pirazinamida	2.000	8.598.400	0,009077243
Etambutol	1.375	5.911.400	0,009077243

*consumo anual em Cubatão/SP no decorrer de Julho/2017 à Julho/2018. DDD, Dose Diária Definida. Fpen, fator de penetração no mercado. Fonte: Autores.

A partir dos cálculos realizados para Fpen, foram então estimados os valores para a Concentração Ambiental Estimada (CAE) para estes tuberculostáticos, referentes à quantidade dispensada no período de Julho/2017 à Julho/2018 (tabela 2). Para o cálculo da CAE das águas de superfície no município de Cubatão, foi necessária a separação por área de influência de ETEs e a quantidade de resíduos líquidos/habitantes/dia é de 413 L para a ETE Lagoa e 392 L para a ETE Casqueiro, sendo 10 o fator de diluição utilizado em ambas as estações de tratamento de efluentes.

Para a área de influência da ETE Lagoa, os 4 fármacos tuberculostáticos (Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol e Isoniazida) apresentaram valor de CAE superior ao limite do documento EMEA (0,01 $\mu g.L^{-1}$) indicando que todos os tuberculostáticos inclusos neste estudo, da área da ETE Lagoa precisam ser avaliados quanto ao destino e o efeito ambiental dos compostos (Emea, 2006).

Para a área de influência da ETE Casqueiro, os 4 fármacos tuberculostáticos (Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol e Isoniazida) também apresentaram valor de CAE superior ao limite do documento EMEA (0,01 $\mu g.L^{-1}$) indicando que todos os

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

tuberculostáticos inclusos neste estudo, da área da ETE Lagoa também precisam ser avaliados quanto ao destino e o efeito ambiental dos compostos (Emea, 2006).

Diante destes resultados, se faz necessário o conhecimento sobre o destino destes fármacos, onde no município de Cubatão existem duas estações de tratamento de efluentes por responsabilidade da Sabesp, sendo ETE Lagoa e ETE Casqueiro; tais ETEs são destinadas há alguns bairros, porém, nem todos os habitantes possuem o saneamento adequado, principalmente quando estamos tratando de bairros periféricos. A falha no sistema de saneamento básico adequado no município reforça a necessidade de ensaios ecotoxicológicos para verificar o potencial tóxico desses fármacos em organismos aquáticos.

Tabela 2. Valores obtidos para as Concentrações Ambientais Estimadas dos tuberculostáticos nas águas de superfície de Cubatão/SP, separados por ETE Lagoa e ETE Casqueiro.

Tuberculostático	**CAE ETE Lagoa* ($\mu g.L^{-1}$)**	**CAE ETE Casqueiro* ($\mu g.L^{-1}$)**
Rifampicina	3,12	3,29
Isoniazida	1,56	1,64
Pirazinamida	4,39	4,62
Etambutol	3,01	3,18

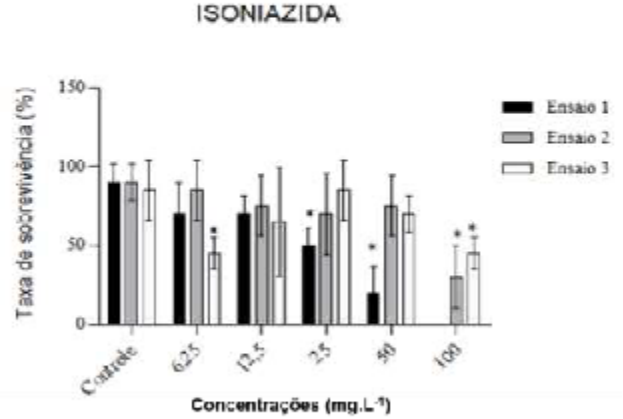
Fonte: Autores.

No presente estudo ensaios ecotoxicológicos foram realizados com os fármacos Isoniazida e Pirazinamida, analisando os efeitos biológicos adversos nas neonatas de *Daphnia similis* e, após, as análises de inibição do desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter*.

As análises de toxicidade com *D. similis* (n=3) com os fármacos Isoniazida e Pirazinamida foram realizadas através da observação dos organismos que apresentaram imobilidade/mortalidade quando foram expostos às diferentes concentrações destes fármacos (6,25 a 100 $mg.L^{-1}$), e após, foi realizado o cálculo para encontrar a CE_{50} para as substâncias analisadas. Os resultados das substâncias analisadas nos ensaios de toxicidade com *D. similis* com a Isoniazida estão expostos na Figura 1 e Tabela 3. Os resultados obtidos para o fármaco Pirazinamida estão expostos na Figura 2 e Tabela 4.

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

Figura 1. Resultados do ensaio de toxicidade com *Daphnia similis* quanto à exposição em diferentes concentrações de Isoniazida. Os valores relatados no gráfico representam a média± erro padrão de cada concentração testada. ANOVA com teste posterior de Dunnett: *p<0,05.



Fonte: Autores.

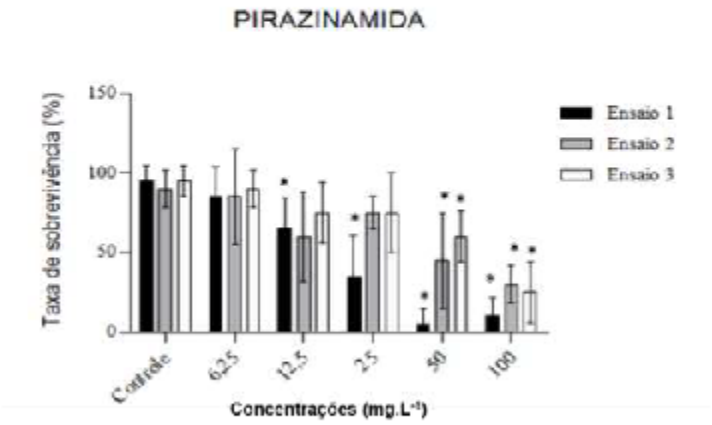
Tabela 3 – Valor de CE_{50} obtido dos ensaios para o fármaco Isoniazida com *D. similis*.

Isoniazida	CE_{50} (mg.L^{-1})	Intervalo de confiança
1	100	—
2	83,12	62,99-109,69
3	26,79	19,41-36,98
Média	69,97	—
DP	38,33	—
CV (%)	54,78	—

CE_{50}- Concentração efetiva que induz efeito em 50% dos organismos expostos; IC- Intervalo de confiança; DP- Desvio Padrão; CV- Coeficiente de Variação. Fonte: Autores.

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

Figura 2. Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* quanto à exposição em diferentes concentrações de Pirazinamida. Os valores expressados no gráfico representam a média ± erro padrão de cada concentração testada. ANOVA com teste posterior de Dunnett: *p<0,05.



Fonte: Autores.

Tabela 4. Valor de CE_{50} obtido dos ensaios para o fármaco Pirazinamida com *D. similis*.

Pirazinamida	CE_{50} (mg.L^{-1})	Intervalo de confiança
1	62,19	43,05-89,84
2	18,32	13,95-24,07
3	52,97	30,72-91,35
Média	44,49	—
DP	23,13	—
CV (%)	51,98	—

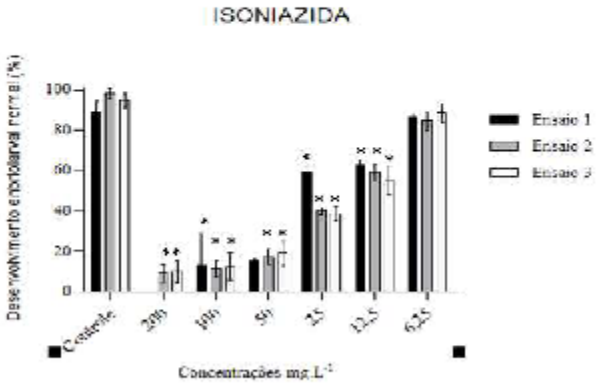
CE_{50}- Concentração efetiva que induz efeito em 50% dos organismos expostos; IC- Intervalo de confiança; DP- Desvio Padrão; CV- Coeficiente de Variação. Fonte: Autores.

Os resultados dos ensaios de toxicidade com *Echinometra lucunter* avaliaram o desenvolvimento embriolarval e a formação de larvas *Pluteus*, a partir da exposição dos embriões com as substâncias-teste e em determinadas concentrações, simulando assim, o efeito dos efluentes lançados incorretamente ao ambiente aquático.

Os dados das substâncias analisadas nos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* referente ao fármaco Isoniazida (n=3) estão representados na Figura 3, onde o organismo-teste foi exposto a diferentes concentrações de Isoniazida (6,25 a 200 mg.L^{-1}), e foram observados valores de CEO e CENO (Tabela 5). Os resultados obtidos para os fármaco Pirazinamida estão expostos na Figura 4 e Tabela 5.

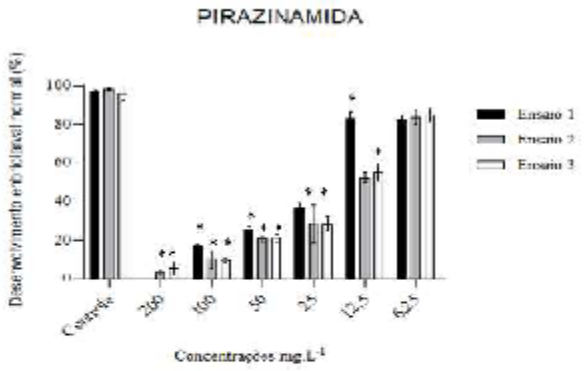
Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

Figura 3. Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* quanto à exposição em diferentes concentrações de Isoniazida. Os valores demonstrados no gráfico representam a média ± erro padrão de cada concentração testada. ANOVA com teste posterior de Dunnett: *p<0,05.



Fonte: Autores.

Figura 4. Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* quanto à exposição em diferentes concentrações de Pirazinamida. Os valores apresentados no gráfico representam a média ± erro padrão de cada concentração testada. ANOVA com teste posterior de Dunnett: *p<0,05.



Fonte: Autores.

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

Tabela 5. Resultados de CEO, CENO e CI_{50} dos ensaios de toxicidade crônica com os fármacos tuberculostáticos com o organismo-teste *Echinometra lucunter*.

Medicamento	CEO ($mg.L^{-1}$)	CENO ($mg.L^{-1}$)	CI_{50} ($mg.L^{-1}$)
Isoniazida	12,5	6,25	23,66 (22,69 - 25,62)
Pirazinamida	12,5	6,25	17,21 (16,33 - 18,33)

CEO – Menor concentração de efeito observado; CENO – Concentração de efeito não observado; CI_{50} – Concentração inibitória média. Fonte: Autores.

Cabe destacar que poucos são os estudos que avaliam os efeitos de tuberculostáticos em organismos aquáticos. Baumann et. al., (2020) relatam que a Isoniazida induziu alterações em hepatócitos de zebrafish (*Danio rerio*), onde posteriormente confirmaram os efeitos hepatotóxicos do fármaco na espécie estudada.

Quanto ao fármaco Pirazinamida, não há evidências científicas quanto aos estudos deste em organismos aquáticos, porém, existem dados de estudos com roedores. Zhao et. al., (2017) observaram que em ratos fêmeas houve diminuição significativa de AMP hepático, assim como inosina e xantina quando tratados com Pirazinamida, além do aumento de ácido úrico sérico podendo ser um indicativo de hiperuricemia. Zhao et al. (2017) também destacaram questões quanto ao estresse oxidativo, onde a Pirazinamida foi relatada como possível causadora de danos hepáticos oxidativos em ratos machos e fêmeas, pois houve o aumento de GSH e GSSG enquanto o glutamato e a glicina diminuíram acentuadamente. Neste mesmo estudo, também foi relatado que a Pirazinamida produziu danos ao DNA mais graves em ratos, que podem estar associados à formação de radicais livres hepatotóxicos e genotóxicos. Já Quintino et. al., (2003) estudaram o fármaco Pirazinamida em ratas gestantes onde nenhum efeito deletério foi observado em relação a grandes malformações fetais, mortes intrauterinas ou mortalidade materna.

Tais dados obtidos para a Pirazinamida, apesar de serem baseados em roedores, podem estimar e conduzir como os efeitos ocorrem nos organismos aquáticos, visto que alvos para fármacos utilizados em seres humanos podem apresentar similaridades com algumas enzimas presentes em organismos aquáticos. Podemos ilustrar como exemplo o fato do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* apresentar 120 CYP genes (citocromo P450, CYP), e os que são relacionados às famílias CYP1 a 4 constituem 80% deste total (Sea urchin genome sequencing consortium, 2006; Yamamoto, 2014). Cabe destacar ainda que o tuberculostático Isoniazida (um dos fármacos analisados neste estudo) inibe as CYP2C19 e CYP3A4 humanas (família CYP2 e CYP3) *in vitro*, aumentando assim a chance deste fármaco interferir na atividade das CYPs nos organismos aquáticos (Fiocruz, 2017).

Por fim, os resultados obtidos neste estudo quando classificados segundo a diretiva 93/67/CEE (CEE, Conselho da Comunidade Europeia) (CEC, 1996), onde as substâncias são avaliadas de acordo com os resultados pontuais de sua toxicidade, encontram-se na Tabela 6.

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

Tabela 6. Classificação dos fármacos tuberculostáticos baseados na diretiva 93/67/CEE da União Europeia levando em consideração ensaios com organismos-teste D. *similis* e E. *lucunter*.

Organismo-teste D. *similis*		
Medicamento	**CI_{50} ($mg.L^{-1}$)**	**Classificação**
Isoniazida	69,97	Nocivo
Pirazinamida	44,49	Nocivo
Organismo-teste E. *lucunter*		
Medicamento	**CI_{50} ($mg.L^{-1}$)**	**Classificação**
Isoniazida	23,66	Nocivo
Pirazinamida	17,21	Nocivo

Fonte: Autores.

Para os ensaios com *D.similis*, os fármacos Isoniazida e Pirazinamida podem ser classificados como "nocivo" em concordância com a diretiva europeia 93/67/CEE. Para os ensaios toxicológicos com *E. lucunter*, os fármacos Isoniazida e Pirazinamida também foram classificados como "nocivos" em concordância com a diretiva europeia 93/67/CEE.

4. Conclusão

Levando em consideração os resultados encontrados no presente estudo conclui-se que os quatro fármacos (Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol) precisam ser avaliados quanto ao seu efeito ambiental, visto que os valores das CAEs destes fármacos ultrapassaram o valor limite estabelecido pela diretriz da EMEA de 0,01 $\mu g.L^{-1}$ (CHMP, 2006). Além disso, os organismos-teste analisados neste estudo (*D. similis* e *E. lucunter*) apresentaram sensibilidade após exposição dos fármacos Isoniazida e Pirazinamida, onde, em ambos os organismos os fármacos foram considerados como "nocivos" de acordo com a diretiva europeia 93/67/CEE (CEE Conselho da Comunidade Europeia).

Por fim, considerando a escassez de estudos ecotoxicológicos em ambiente aquático do fármaco Isoniazida além do fato de não haver estudos ecotoxicológicos em organismos-aquáticos do fármaco Pirazinamida, os resultados desta pesquisa poderão servir como subsídios a novas legislações referentes aos produtos farmacêuticos e também, a criação de programas governamentais que pretendam realizar o monitoramento dos fármacos desde o seu registro em órgãos reguladores até a criação de adequados tratamentos das Estações de Tratamento de Efluentes em busca de soluções que promovam redução e até mesmo a eliminação de fármacos no ambiente aquático.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida à primeira autora.

Referências

ABNT NBR – Associação brasileira de normas técnicas. (2012). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar Echinometra lucunter. 15350:2012 Brasil; 2012 p. 21.

ABNT NBR - Associação brasileira de normas técnicas. (2016). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnias spp. (Cladócera, Crustácea). 12713:2016 Brasil; 2004 p. 33

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2003). http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/136_03rdc.htm

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2010). http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/renames2010final.pdf

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

Baumann, L., Holbech, H., Posthaus, H. S., Moissi, A. P., Hennies, M., Tidermann, J., Segner, H. & Braunbeck, T. (2020). Does hepatotoxicity interfere with endocrine activity in zebrafish (Danio rerio)? *Chemosphere*. 238(1), 124-589

Carvalho, G. G., Pires, A. J. V., Garcia, R., Veloso, C. M., Silva, R. R., Mendes, F. B. L., Pinheiro, A. A. & Souza, D. R. (2009). In situ degradability of dry matter, crude protein and fibrous fraction of concentrate and agroindustrial by-products. *Ciência Anim. Bras*. 10, 689-97

CEC (Commission of the european communities). Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, environmental risk assessment. Luxembourg: Office for official publication of the European Communities, v. 1488, p. 94, 1996.

CHMP – Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for huma use. (2006). http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). (2007). Relatório de monitoramento de emissários submarinos. http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/25-publicacoes-/-relatorios

EMEA – European medicines agency, committee for medicinal products for human use (CHMP) – Guideline on the environmental Risk Assessment - . (2006). https://www.ema.europa.eu/en/environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use.

Environmental Protection Agency (EPA). (2007). Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/ppcp/index.cfm

Escher, M.A. S., et al (2019). Problematica ambiental da contaminação dos recursos hidricos por fármacos. *RBCIAMB*. 51, 141-148.

European agency for the evaluation of medicinal products (EMEA). Note for guidance on environmental risk assessment of medicinal products for human use. (2005). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003978.pdf

Fent, K., Weston, A. A. & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 76, 122-159.

Garrison, A. W., Pope, J. D., Allen, F. R. & Keith, C. H. (1976). Identification and analysis of organic pollutants in water. *Michigan: Ann Arbor Science*. 5, 517-566.

Hamilton, A. M., Russo, R. C. & Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science e Technology*. 11(7), 714-719.

IMS Health – The pharmerging future, Pharmaceutical Executive. (2009) http://www.pharmexec.com/pharmexec/issue/issueDetail.jsp?id=17680

IMS Health – Saiba o que impulsiona o sistema de saúde brasileiro. (2011). http://www.imshealth.com/portal/site/ims/menuitem.d248e29c86589c9c30e81c033208c22a/?vgnextoid=c42ae9161a3f2310VgnVCM100000ed152ca2RCRD&cpsextcurrchannel=1

Jones, O.A.H., Voulvoulis, N. & Lester, J. N. (2007). Ecotoxicity of pharmaceuticals. Comprehensive Analytical Chemistry. 50, 387-424.

Brasil. Ministério da Saúde. (2019). Manual de Recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf

Newman, M.C. & UNGER, M.A. (2002). *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publisher.

Norberg-King, T. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. *National Effluente Toxicity Assessment Center*. 05-88.

Organização mundial da saúde (OMS). (2012). *Pharmaceuticals in Drinking-water*. Genebra. Health and Environment Water, Sanitation, Hygiene and Health.

Organização Mundial da Saúde (OMS). (2014). *Antimicrobial Resistance: global reporto n surveillance*. Genebra. Library Cataloguingin Publication.

Parlamento Europeu. Diretiva 2013/39/UE - Altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. (2013). *Jornal Oficial da União Europeia*. https://eur-lex.europa.eu/legal content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039&from=IT.

Pereira, C. D. S. (2008). Biomarcadores de exposição, efeito e bioacumulação de xenobióticos em mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) transplantados ao longo do litoral de São Paulo. Tese doutorado, Universidade de São Paulo, USP.

Pereira A. S. et al. (2018). Metodologia da pesquisa científica. UFSM

Quintino, M. P. (2003). Effects of pyrazinamide on pregnant albino rats. *International Journal of Morphology*. *21(4)* 299-302.

Reis-Filho, R. W., Barreiro, J. C., Vieira, E. M. & Cass, Q. B. (2007). Fármacos, ETEs e corpos hídricos. *Revista Ambiente & Água*. 2. 54-61.

SABESP-Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. (2018). Tratamento de esgotos. Recuperado de http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=49.

Santos, L. H. M., Araújo, A. B., Fachini, A., Pena, A., Delerue-matos, C. & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceutical in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. 75(1) 45-95.

Schaffer, E. W & Tiburtius, E. R. (2014). Triclosan: Fate in the Environmentand Perspectives in the Treatment of Public Water Supply. *Revista de Química*. 6(5), 1144-1159

Sea Urchin Genome Sequencing Consortium. (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Science. 314 (5801), 941-952.

Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos do Estado de São Paulo (SINDUSFARMA). (2012). http://www.sindusfarmacomunica.org.br/indicadores-economicos/

Research, Society and Development, v. 10, n. 5, e42310514825, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14825

USEPA - United States Environmental ProtectionAgency. (2002) EPA/600/4-91/003 — Short-termmethods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. *Cincinati: U.S. Environmental Protection Agency. pp.* 579.

UEPA – U.S. Environmental protection agency. (2009). Sperm cell toxicity testes using the sea urchin (arbacia punctulata). https://www.epa.gov/sites/production/files/201509/documents/seaurchintesting.pdf.

Yamamoto, N. S., et al (2012). *Avaliação dos esfeitos biológicos dos fármacos Losartan em microcrustáceos Daphnia similis e Ceriodpahnia dúbia *Crustacea, Cladocera). Unisanta BioScience*. 1(2), 49-53

Zhao, H., et al (2017). Pyrazinamide-induced hepatotoxicity and gender diferences in rats as revealed by a HNMR based metabolomics approach. Toxicological Research. *Toxicology Reserach*, 6(1), 17–29.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) 2012. **Ecotoxicologia aquática toxicidade crônica de curta duração– Método de ensaio com ouriço-do-mar**, Echinometra lucunter (Echinodermata: Echinoidea). Norma ABNT-NBR 15350.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) 2016. **Ecotoxicologia aquática toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp**. (Cladocera, Crustacea). Norma ABNT-NBR 12713.

ABNT NBR 15350 (2012) Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar** (Echinodermata: Echinoidea). 21 p. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2003. Resolução RDC nº 136, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/136_03rdc.htm (acesso em 16/01/2011).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA . ANVISA. Uso racional de antimicrobianos e a resistência microbiana. Disponível em https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo1/uso_estrategias14.htm (acesso em 05/04/2021).

ARBEX, M.A.; VARELLA, M.C.L.; SIQUEIRA, H.R.; MELLO, F.A.F. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. Ed. 36, p. 626-640, 2010.

BARSZCS, L.B.; Bellato F.C.; BENASSI R.F.; MATHEUS D.R. Avaliação ecotoxicológica de efluentes tratados por alagados construídos. **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 24 p. 1147, nov. – dez. 2019.

BAUMANN, L.; HOLBECH. H.; POSTHAUS, H.S; MOISSI, A.P; HENNIES, M; TIEDEMANN, J; SEGNER, H.; BRAUNBECK. T.. Does hepatotoxicity interfere with endocrine activity in zebrafish (Danio rerio)? https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2020Chmsp.238l4589B/abstract. 2010.

BEATRICI, A.C. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia* similis e *Daphnia* magna (crustácea, cladocera) submetidas a diferentes tipos de dietas e meios de cultivo**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós Graduação em Ecologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2004.

BERGMAN, A.; HEINDEL, J.J.; JOBLING, S.; KIDD, K.A.; ZOELLER, T. (2013) **Endocrine Disrupting Chemicals** – 2012: An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Program me and World Health Organization. Genebra: WHO/ UNEP. P. 296, 2013.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. (2003). Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26 n. 4, p. 523-530, 2003.

BIRCH, G.F.; DRAGE, D.S.; THOMPSON, K.; EAGLESHAM, F.; MUELLER, J.F. (2015) Emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, a food additive and pesticides) in waters of Sydney estuary, Australia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 97, n. 1-2, p. 56-66, 2015.

CARLSSON, C.; JOHANSSON, A.-K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K.; KÜHLER, T. (2006) Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. **The Science of the Total Environment**, v. 364, n. 1-3, p. 67-87. 2006.

CARVALHO, G. G.; PIRES, A. J. V.; GARCIA, R.; VELOSO, C. M.; SILVA, R. R.; MENDES, F. B. L.; PRINHEIRO, A. A.; SOUZA, D. R. In situ degradability of dry matter, crude protein and fibrous fraction of concentrate and agroindustrial by-products. **Ciência Anim. Bras**. v. 10, p. 689-697, 2009.

CÉSAR, A.; SILVA, S. L. R.; SANTOS, A. R. **Testes de toxicidade aquática no controle da poluição**. Disponível em https://www.unisanta.br/arquivos/apostilaecotox. pdf. 4º Edição – 1997.

CESAR, A.: MARÍN-GUIRAO, L.; VITA, R; MARÍN, A. Sensibilidad de anfípodos y erizosdel mar Mediterráneo a substâncias tóxicas de referência. **Ciencias Marinas**. v. 28, n.4, p. 407-417, 2002.

CHMP. **Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use**. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00. London, 1 June (2006). Disponível em: http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf.

COONEY, J.D. Sediment Testes. *In*: RAND, G.M. (org.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fateand Risk Assessment**. Ecological Services Inc. North Palm Beach, Florida, 1995.

CORTEZ, F. S. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados marinhos**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2011.

Cruz, F.O; Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. Controle da Tuberculose: **Uma Proposta de Integração Ensino-Serviço**. Rio de Janeiro: EAD/ENSPB. 2008.

CUNHA, D. L.; PAULA, L. M.; SILVA, S. M. C.; BILA, D. M.; FONSECA, E. M.; OLIVEIRA, J. L. M. Ocorrência e remoção de estrogênios por processos de tratamento biológico de esgotos. **Ambiente e Água**, Taubaté, v. 12, n. 2, p. 249-262, 2017.

DAUGHTON, C.G. Pharmaceuticals in the environment: sources and their management *In*: BARCELÓ, D. (org.). **Analyses, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle**. First edition. Elsevier. p. 1-49, 2007.

EMEA - European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), 2006. **Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human use**. Doc. Ref.: EMEA/CHMP/SWP/4447/00 corr 1, London, UK. https://www.ema.europa.eu/en/environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use. Acessado em 08 de janeiro de 2021.

ESCHER, M.A.S.; PINHEIRO, J.H.P.A.; TORRES, N.H.; FERREIRA, L.F.R. A problemática ambiental da contaminação dos recursos hídricos por fármacos. **RBCIAMB**. n. 51, p. 141-148, Mar. 2019.

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

FERREIRA, C.M. **Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (Ranacatesbeiana Shaw, 1802) como animais sentinelas**. São Paulo: 2002. 109p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, ano de 2002.

FILHO, J.P.A.F.; MATTIA, A.L.; SANTOS, L.O.; PIVA, L.T.; SILVA, P.S. Análise do tratamento diretamente observado para tuberculose, no município de Cubatão, São Paulo, Brasil. **Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro**. p. 190-200. Abr. - Jun. 2011.

FILHO, W. R. *et al.* Fármacos, ETEs e corpos hídricos. Ambiente e Água-Na Interdisciplinary. **Journal of Applied Science**, v. 2, n. 3, 2007.

FIOCRUZ. **Farmanguinhos – Rifampicina+Isoniazida+Pirazinamida+Etambutol**. Bula do Profissional da Saúde. 2017. Disponível em: https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=Farmanguinhos%20rifampicina%2Bisoniazida%2Bpirazinamida%2Betambutol. Acesso em: 01/09/2020.

FURIN, J.; COX, H.; PAI, M. *Tuberculosis*. **The Lancet**. Publicado online em Março, 2019. DOI: dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30308-3. Acessado em: 30/12/2020.

GARRISON, A. W.; POPE, J. D.; ALLEN, F. R.; KEITH, C. H. Identification and analysis of organic pollutants in water. *In*: KEITH, C. H. (org.). **Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water**. Michigan: Ann Arbor Science, p. 517-566, 1976.

GRUNG, M.; KÄLLQVIST, T.; SAKSHAUG, S.; SKURTVEIT, S.; THOMAS, K. V. Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. **Ecotoxicology and Enviromental Safety**. v. 71, n. 2, p. 328-340, 2008.

HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C., THURTON, R.V. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Techinol.,** New York. v. 11, n. 7, p. 714 – 719, 1977.

HENRIQUES, M.B.; CASARINI, L.M. Avaliação do crescimento do mexilhão

pernaperna e da espécie invasora Isognomon bicolor em branco natural da ilha das Palmas, baía de Santos, estado de São Paulo, **Brasil. B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 577-586, 2009.

HILL, S. K.; LAWRENCE, J. M. Habitats and Characteristics of the Sea Urchins Lytechinus variegatus and Arbacia punctulata (Echinodermata) on the Florida Gulf-Coast Shelf. **Marine Ecology**, v. 24, n. 1, p. 15-30, 2003.

IBGE (2019) **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatistica**. https://www.ibge.gov.br/geociencias/organizacao-do-territorio/15774-malhas.html?=et=downloads. Acessado: 19 de fevereiro 2021.

JIMENEZ, C. C. *et al.* Pharmaceutical products in the environment: sources, effects and risks. **Vitae**, v. 19, n. 1, p. 93-108, 2012.

KNIE, J. L. W. *et al.* Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. **A ecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 3, 2004.

LEITE, G. S.; A., R. J. C. Franco; AQUINO, S. F. Caracterização de contaminantes presentes em sistemas de tratamento de esgotos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem em alta resolução. **Quimica. Nova**, v. 33, n. 3, p. 734-738, 2010.

LIENHARDT, C.; OGDEN, J.A. *Tuberculosis* control in resource-poor countries: have were ached the limits of the universal paradigm? **TropMedInt Health**. v. 9, n. 7, p. 833-841, 2004.

LIMA, D.R.; TONUCCI, M.C.; LIBÂNIO, M.; AQUINO, S.F. (2017) Fármacos e desreguladores endócrinos em águas Brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 1043-1054, 2017.

LOURENÇO, B.F. **Avaliação ecotoxicológica comparativa entre plantas medicinais, seus marcadores de referência e princípios ativos sintéticos utilizados em tratamentos terapêuticos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Santa Cecília, São Paulo, Santos, 2019.

MEIRELLES, L.M.A. **Delineamento de biocompósitos baseados em paligorsquita e quitosana como carreadores de etambutol**. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos). Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2019.

MELO, S.A.S; TROVÓ, A.G; BAUTITZ, I.R.; NOGUEIRA, R.F.P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Quimica Nova**. v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil (2019)**. 2ª edição atualizada. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf. Acesso em: 20 de fevereiro de 2021.

NEWMAN, M.C.; UNGER, M.A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. Second Edition. Lewis Publisher, 2002.

NORBERG-KING, T. **An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach**. National Effluente Toxicity Assessment Center. Technical Report, 1988.

OLIVEIRA, R.J. **Hepatotoxicidade induzida pelos tubérculos táticos**. Porto: p.43, 2013. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, ano de 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). (2012) Pharmaceuticals in Drinking-water. **Genebra: Public Health and Environment Water, Sanitation, Hygiene and Health**. Acesso em: jul. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). (2014**) Antimicrobial Resistance: global report on surveillance**. WHO Library Cataloguingin-Publication Data. Genebra: OMS. p. 257.

PAIVA, O.J. **Estudo ecotoxicologico de medicamentos e outros químicos de farmácia**. São Paulo: 2009. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, 2009.

PARREIRA, C.N. **Avaliação da Hidrodinâmica e da poluição no canal de Piaçaguera, no estuário de Santos – São Vicente (SP), a partir de informações ambientais e modelagem numérica.** São Paulo: 2012. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós graduação em Ciência Ambiental, Universidade de São Paulo, 2012.

PARLAMENTO EUROPEU. Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013.Altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. **Jornal Oficial da União Europeia**, 2013. Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/legal content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039efrom=IT. Acesso em: 08 de janeiro de 2021.

PEREIRA, C.D.S. **Biomarcadores de exposição, efeito e bioacumulação de xenobióticos em mexilhões Perna perna (Linnaeus, 1758) transplantados ao longo do litoral de São Paulo**. Teses (Doutorado). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PETROVIĆ, M. *et al.* Liquid chromatography–tandem massspectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**. v. 1067, n. 1, p. 1-14, 2005.

PRASSE C, SCHLÜSENER MP, SCHULZ R, TERNES TA. Antiviral drugs in waste water and surface waters: a new pharmaceutical class of environmental elevance? **EnvironSciTechnol**. v. 1, n. 44, p. 1728-35, 2010.

PRIMI, M.C; **Candidatos a novos agentes tuberculostáticos: planejamento e**

síntese de inibidores da fosfopanteteínaadenilitransferase. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2018.

PUSCEDDU, F. H. **Avaliação do risco ambiental de sedimentos contaminados com triclosan, ibuprofeno, e 17α-ETINILESTRADIOL empregando invertebrados marinhos bentônicos**. Tese (Doutorado em Ciências, área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – Instituto de pesquisa energéticas e nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

QUINTINO, M.P; SIMÕES M.J; NAKAMURA M.U; FILHO, R.M.O. Effects of Pyrazinamide on Pregnant Albino Rats. **Int J. Morphol (online).** Vol. 21 n. 4 p. 299-302. 2003. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022003000400007.

RABAHI, M.F; JÚNIOR, J.L.R.S; FERREIRA, A.C.G; TANNUS-SILVA, D.G.S; CONDE, M.B; Tratamento da Tuberculose. Jornal Brasileiro de Pneumologia. **Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**. p. 272-486, 2017.

ROVERSI, F; ROSMAN, P.C.C; HARARI, J; **Análise das trajetórias das águas continentais afluentes ao sistema estuarino de Santos. Revista Brasileira de Recursos Hídricos.** v. 21. p. 242-250, 2016.

SABESP. **Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo** (2018) http://site.sabesp.com.br/. Acessado: 01 setembro 2020.

SANTOS, L. H.M.L.M., ARAÚJO, A.N., FACHINI, A., PENA, A., DELEUREMATOS, C., MONTENEGRO, M.C.B.S.M. Ecotoxocological aspects related to the presence of pharmaceutical in the aquatic environment. **Journal of Harzardous Materials**, v. 75 p. 45-95, 2010.

SCHEFFER, E. W.; TIBURTIUS, E. R. Triclosan: Fate in the Environmentand Perspectives in the Treatment of Public Water Supply. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1144-1159, 2014.

SEGRETTI, N.D; **Planejamento e síntese de tuberculostáticos potenciais com base na estrutura de maltosiltrasferase (GlgE) de Mycobacterium *tuberculosis*.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2016.

SILVA, D.R; MIGLIORI, G.B; MELLO, F.C.Q; Série tuberculose 2019. Jornal Brasileiro de Pneumologia. **Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**. 2019. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v45n2/pt_1806-3713-jbpneu-45-02-e20190064.pdf. Acesso em: 14/01/2021.

SOTGIU, G; NAGID, P; LODDENKEMPER, R; ABUBAKAR, I; MIRAVITLLES, M; MIGLIORI, G.B; The ERS-endorsedofficial ATS/CDC/IDSA clinicalpracticeguidelinesontreatmentofdrug-susceptible*tuberculosis*. **EurRespir J**. v. 48, n. 4, p. 963-971, 2016.

SOUZA, A**. Avaliação citotóxica de amoxicilina e clavulanato de potássio em**

mexilhões *Perna perna*. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SOUZA, C.C; AQUINO, S.F; SILVA, S.Q; Ensaios toxicológicos aplicados à análise de águas contaminadas por fármacos**. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.25, p. 217 – 228, mar.– abr. 2020.

TORRES, N. H.; AMÉRICO, J. H. P.; FERREIRA, L. F. R.; NAZATO, C.; MARANHO, L. A.; VILCA, F. Z.; TORNISIELO, V. L. Fármacos no ambiente - Revisão. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 14, n. 4, p. 67-75, jul.- dez. 2012.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. EPA/600/4-91/003 — Short-termmethods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. **Cincinati: U.S. Environmental Protection Agency**. p. 579, 2002.

USEPA. U.S. **Environmental Protection Agency. Sperm Cell Toxicity Tests Using the Sea Urchin (Arbaciapunctulata) EPA 833-C-09-001**. (2009). https://www.epa.gov/sites/production/files/201509/documents/seaurchintesting.pdf. Acessado em 08 de janeiro de 2021.

VERLING, E.; CROOK, A. C.; BARNES, D. K. A. The dynamics of covering be haviour in dominant echinoid populations from American and European west coasts. **Marine Ecology**, v. 25, n. 3, p. 191-206, 2004.

Veronesi, R.; Focaccia, R. **Tratado de Infectologia**. Quarta Edição. Rio de Janeiro: Atheneu. 2010.)

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M. e PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor e Francis, London, UK, p. 321, 1996.

YAMAMOTO, N. S. **Avaliação ecotoxicológica dos fármacos anti-hipertensivos Losartan e Valsartan em Ouriço-do-mar Lytechinusvariegatus (Echinodermata, Echinoidea)**. Dissertação de mestrado. Universidade Santa Cecília, São Paulo, 2014.

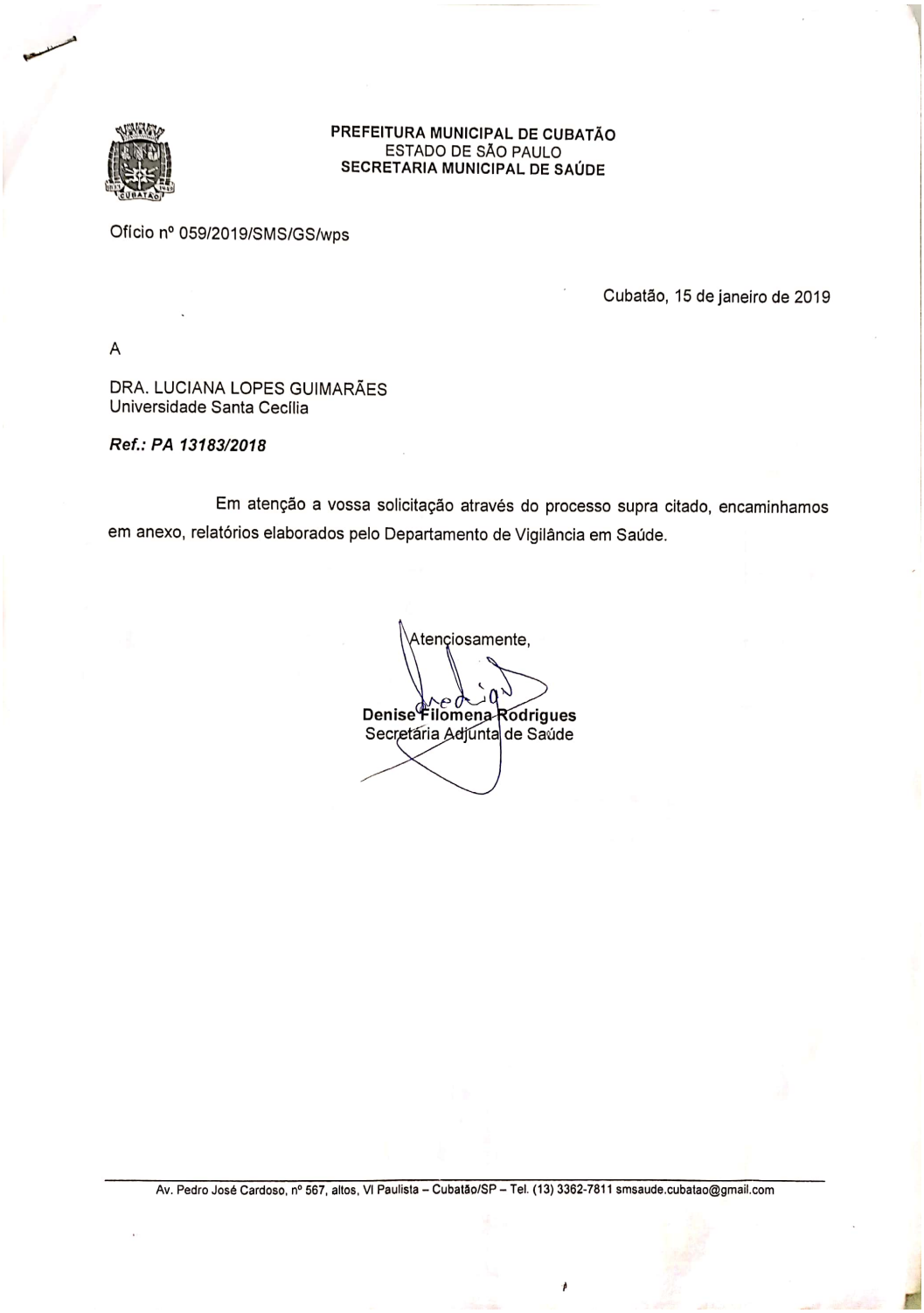
YAMAMOTO, N. S. *et al.* Avaliação dos efeitos biológicos dos fármacos Losartan em microcrustáceos *Daphnia* similis e Ceriodaphnia dúbia (Crustacea, Cladocera). São Paulo, **Unisanta BioScience**, v. 1, n. 2, p. 49-53, 2012.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. *In*: Zagatto, P. A. eBertoletti, E. (org.). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, S.P. Rima, p. 1-13, 2 ed., 2008.

Zhao H; Si, ZH; LI. MH; JIANG. L; FU. Y.H; XING, Y.X; HONG. W; RUAN. L.Y; LI, P.M; WANG, J.S; Pyrazinamide-induced hepatotoxicity and gender diferences in rats as revealed by a HNMR based metabolomics approach. **Toxicological Research**. Jan 1; 6 (1): 17–29. 2017.

ANEXOS

Anexo A –Relatório fornecido pelo Departamento de Saúde Epidemiológica do município de Cubatão referente à dispensação dos medicamentos tuberculostáticos.



PREFEITURA MUNICIPAL DE CUBATÃO
ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE

Ofício nº 059/2019/SMS/GS/wps

Cubatão, 15 de janeiro de 2019

A

DRA. LUCIANA LOPES GUIMARÃES
Universidade Santa Cecília

Ref.: PA 13183/2018

Em atenção a vossa solicitação através do processo supra citado, encaminhamos em anexo, relatórios elaborados pelo Departamento de Vigilância em Saúde.

Atenciosamente,

Denise Filomena Rodrigues
Secretária Adjunta de Saúde

Av. Pedro José Cardoso, nº 567, altos, Vl Paulista – Cubatão/SP – Tel. (13) 3362-7811 smsaude.cubatao@gmail.com

PREFEITURA MUNICIPAL DE CUBATÃO
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
Serviço de Vigilância Epidemiológica

Sistema de Controle Logístico de Medicamentos – Programa de Controle de Tuberculose Cubatão

QUANTIDADES DISPENSADAS EM UNIDADES														
MEDICAMENTOS	JUL/17	AGO/17	SET/17	OUT/17	NOV/17	DEZ/17	JAN/18	FEV/18	MAR/18	ABR/18	MAI/18	JUN/18	JUL/18	TOTAL
Rifampicina + isoniazida + pirazinamida + cloridrato de etambutol – Comp. 150+75+400+275mg	960	2232	1440	1240	1488	1612	1984	1116	1364	2232	1240	2480	2108	21496
Rifampicina + isoniazida – Comp. 150mg + 75mg	960	1984	1200	1116	1364	1488	1488	992	1240	2108	1116	2232	1984	19272