

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

**JULIANA ANDRADE DE SOUSA**

**Efeitos biológicos causados pelos fármacos Losartana,  
Diclofenaco e sua mistura em organismos marinhos**

**SANTOS/SP**

**2021**

**JULIANA ANDRADE DE SOUSA**

**Efeitos biológicos causados pelos fármacos Losartana,  
Diclofenaco e sua mistura em organismos marinhos**

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

**SANTOS/SP**

**2021**

578.77 Sousa, Juliana Andrade de.  
S697e Efeitos biológicos causados pelos fármacos Losartana,  
Diclofenaco e sua mistura em organismos marinhos.  
Juliana Andrade de Sousa.  
2021.  
33 f.

Orientador: Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira.  
Coorientador: Profa. Dra. Luciane Alves Maranhão

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

1. Pré Diclofenaco. 2. Losartana. 3. Misturas. 4. Toxicidade.  
5. Organismos aquáticos. I. Pereira, Camilo Dias Seabra.  
II. Maranhão, Luciane Alves. III. Efeitos biológicos causados  
pelos fármacos Losartana, Diclofenaco e sua mistura em  
organismos marinhos

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Capes,

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

Agradeço ao meu companheiro Marcos Antônio, pela paciência e apoio.

Agradeço aos meus orientadores: Professor Dr. Camilo Dias Seabra Pereira e a Professora Dra. Luciane Alves Maranhão, pela atenção, orientação e aprendizado.

Agradeço ao Professor Dr. Fábio Pusceddu, pela ajuda nos testes realizados com ouriço-do-mar, no laboratório de Ecotoxicologia do Santa Cecília.

Agradeço a mestranda Maysa Ueda, e ao Professor Dr. Denis Abessa, da Unesp-SV, por ceder os cistos de Artemia e a autorização do teste realizado no NEPEA.

Agradeço as secretárias Sandra e Imaculada, pela atenção, paciência e cordialidade em todos os momentos.

Agradeço aos meus amigos de mestrado Aline, Álison, Monike e Sueli, pelo apoio e troca de experiências, que foram fundamentais na trajetória.

## RESUMO

Estudos apontam que fármacos estão sendo levados para os oceanos, onde não há um tratamento adequado para este fim, acarretando contaminação e toxicidade aos organismos aquáticos. O presente estudo avaliou a taxa de sobrevivência e a taxa de desenvolvimento embriolarval Anormal, após exposição ao fármaco Losartana, um anti-hipertensivo, e ao fármaco Diclofenaco, um anti-inflamatório não esteroideal (AINES), além de sua mistura entre seus compostos. Foram realizados ensaio de toxicidade Aguda para *Artemia salina* e de toxicidade Crônica empregando-se embriões de ouriço-do-mar (*Echinometra lucunter*). Os organismos foram expostos aos fármacos isolados a diferentes concentrações: 1,56 mg/L; 3,12 mg/L; 6,25 mg/L; 12,5 mg/L; 25 mg/L; 50 mg/L e 100 mg/L, e a sua mistura nas concentrações: 0,78 mg/L; 1,56 mg/L; 3,12 mg/L; 6,25mg/L; 12,5 mg/L; 25 mg/L e 50 mg/L. O resultado obtido no ensaio de toxicidade Aguda não evidenciou toxicidade aos organismos expostos. O resultado obtido no ensaio de toxicidade Crônica com a Losartana não apresentou toxicidade aos embriões de ouriço-do-mar, em contrapartida o Diclofenaco isolado apresentou toxicidade Crônica em CENO= 6,25mg/L, CEO= 12,5 mg/L e CI50= 62,15 mg/L. O resultado obtido com embriões expostos à mistura da Losartana e o Diclofenaco, evidenciou toxicidade Crônica em CENO= 6,25 mg/L e CEO=12,5 mg/L, não sendo possível evidenciar a CI50.

**Palavras-chave:** Diclofenaco; Losartana; Misturas; Toxicidade; Organismos aquáticos.

## **ABSTRACT**

### **Biological effects caused by the drugs Losartan, Diclofenac and their**

Studies show that drugs are being taken to the oceans, where there is no adequate treatment for this purpose, causing contamination and toxicity to aquatic organisms. The present study evaluated the survival rate and the Abnormal embryolarval development rate, after exposure to the drug Losartan, an antihypertensive drug, and the drug Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), in addition to its mixture among its compounds. Acute toxicity tests for *Artemia salina* and Chronic toxicity were carried out using embryos of sea urchin (*Echinometra lucunter*). Organisms were exposed to isolated drugs at different concentrations: 1.56 mg/L; 3.12 mg/L; 6.25 mg/L; 12.5 mg/L; 25 mg/L; 50 mg/L and 100 mg/L, and their mixture at concentrations: 0.78 mg/L; 1.56 mg/L; 3.12 mg/L; 6.25mg/L; 12.5 mg/L; 25 mg/L and 50 mg/L. The result obtained in the Acute toxicity test did not show toxicity to the exposed organisms. The result obtained in the Chronic toxicity test with Losartan did not show toxicity to sea urchin embryos, in contrast, the isolated Diclofenac showed Chronic toxicity at CENO = 6.25mg/L, CEO = 12.5 mg/L and IC50 = 62.15 mg/L. The result obtained with embryos exposed to the mixture of Losartan and Diclofenac, showed Chronic toxicity at CENO= 6.25 mg/L and CEO=12.5 mg/L, not being possible to show the IC50.

**Keywords:** Diclofenac. Losartan. Mixtures. Toxicity. Coastal organisms.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|            |                                                                                                                                                                     |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.  | Origem e destino dos fármacos.....                                                                                                                                  | 1  |
| Figura 2.  | Materiais utilizados nos ensaios para avaliação de toxicidade Aguda e Crônica.....                                                                                  | 6  |
| Figura 3.  | <i>Artemia salina</i> .....                                                                                                                                         | 7  |
| Figura 4.  | ouriço-do-mar.....                                                                                                                                                  | 9  |
| Figura 5.  | Resultado do ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i> a exposição de diferentes concentrações da losartana.....                                         | 12 |
| Figura 6.  | Resultado do ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i> a exposição de diferentes concentrações do diclofenaco.....                                       | 12 |
| Figura 7.  | Resultado do ensaio de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i> a exposição de diferentes concentrações da mistura entre a losartana e o diclofenaco.....         | 13 |
| Figura 8.  | Resultado do ensaio de toxicidade crônica com <i>Echinometra lucunter</i> a exposição de diferentes concentrações da losartana.....                                 | 14 |
| Figura 9.  | Resultado do ensaio de toxicidade crônica com <i>Echinometra lucunter</i> a exposição de diferentes concentrações do diclofenaco.....                               | 14 |
| Figura 10. | Resultado do ensaio de toxicidade crônica com <i>Echinometra lucunter</i> a exposição de diferentes concentrações da mistura entre a losartana e o diclofenaco..... | 15 |

## LISTA DE TABELAS

|           |                                                                                                                   |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. | Características físico-químicas dos fármacos Losartana e Diclofenaco .....                                        | 3  |
| Tabela 2. | Concentrações encontradas em águas marinhas do fármaco Losartana.....                                             | 4  |
| Tabela 3. | Efeitos de toxicidade em espécies aquáticas a exposição da Losartana.....                                         | 4  |
| Tabela 4. | Concentrações encontradas em águas marinhas do fármaco Diclofenaco.....                                           | 5  |
| Tabela 5. | Efeitos de toxicidade em espécies aquáticas a exposição do Diclofenaco.....                                       | 5  |
| Tabela 6. | Resultado do tratamento no Controle da água e DMSO (Dimetilsulfóxido), utilizado no ensaio de toxicidade Aguda... | 11 |
| Tabela 7. | Resultado do tratamento no Controle da água e DMSO (Dimetilsulfóxido), utilizado no ensaio de toxicidade crônica. | 13 |
| Tabela 8. | Expressão do resultado no ensaio de toxicidade crônica a exposição ao Diclofenaco.....                            | 15 |
| Tabela 9. | Expressão do resultado no ensaio de toxicidade crônica a exposição entre a Losartana e o Diclofenaco.....         | 16 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |   |                                                            |
|-----------------|---|------------------------------------------------------------|
| ABNT            | - | Associação Brasileira de Normas Técnicas                   |
| AINES           | - | Anti-inflamatório Não Esteroidal                           |
| ANOVA           | - | Análise de variância                                       |
| CAS             | - | Chemical Abstracts Service                                 |
| CAT             | - | Catalase                                                   |
| CEC             | - | Conselho da Comunidade Europeia                            |
| CEO             | - | Concentração de Efeito Observado                           |
| CENO            | - | Concentração de Efeito Não Observado                       |
| CI50            | - | Concentração Inibitória Média a 50% dos organismos         |
| CL50            | - | Concentração de Efeito Letal a 50% dos organismos          |
| COX             | - | Ciclo-oxigenase                                            |
| DCF             | - | Diclofenaco                                                |
| DMSO            | - | Dimetilsulfóxido                                           |
| DNA             | - | Ácido Desoxirribonucleico                                  |
| FDA             | - | Food and Drug Administration                               |
| g/L             | - | Gramas por litro                                           |
| GPx             | - | Glutathione Peroxidase                                     |
| GST             | - | Glutathione S-Transferase                                  |
| HAS             | - | Hipertensão Arterial Sistêmica                             |
| H2O2            | - | Peróxido de hidrogênio                                     |
| Log             | - | Logaritmo                                                  |
| KCl             | - | Cloreto de Potássio                                        |
| K <sub>ow</sub> | - | Coeficiente de participação octanol-água                   |
| LOS             | - | Losartana                                                  |
| mL              | - | Mililitro                                                  |
| mg              | - | Miligrama                                                  |
| NEPEA           | - | Núcleo de Estudos sobre Poluição e Ecotoxicologia Aquática |
| OD              | - | Oxigênio Dissolvido                                        |
| PGRSS           | - | Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde     |
| pH              | - | Potencial Hidrogênioônico                                  |
| µg              | - | Micrograma                                                 |
| µl              | - | Microlitro                                                 |
| µm              | - | Micrômetro                                                 |
| %               | - | Porcentagem                                                |
| °C              | - | Grau Celsius                                               |

## SUMÁRIO

|     |                                                                                                      |    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.  | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                                                                              | 1  |
| 2.  | <b>MATERIAS E MÉTODOS</b> .....                                                                      | 6  |
| 2.1 | DILUIÇÕES.....                                                                                       | 6  |
| 2.2 | ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA.....                                                                      | 7  |
| 2.3 | ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA.....                                                                    | 8  |
| 2.4 | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                                                                             | 10 |
| 3.  | <b>RESULTADOS</b> .....                                                                              | 11 |
| 3.1 | RESULTADO DO ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>Artemia salina</i> .....                              | 11 |
| 3.2 | RESULTADO DO TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM ouriço-do-mar.....                                      | 13 |
| 4.  | <b>DISCUSSÃO</b> .....                                                                               | 16 |
| 5.  | <b>CONCLUSÃO</b> .....                                                                               | 20 |
| 6.  | <b>TRABALHO SUBMETIDO OU ACEITO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....                                            | 21 |
|     | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                                              | 22 |
|     | <b>ANEXO</b> - Carta controle de sensibilidade do organismo-teste: <i>Echinometra lucunter</i> ..... | 33 |

## 1. INTRODUÇÃO

As concentrações de fármacos encontradas em águas do oceano, abrangem vários fatores, por meio de indústrias farmacêuticas, drogarias (VAN, 2011; GUTPERLET *et al.*, 2015), (Figura 1) resíduos químicos, aterros sanitários, esgotos clandestinos (AASAWARI e UMESH, 2019; PEREIRA *et al.*, 2016; AL, 2012), descargas de efluentes domésticos, estações de tratamento de esgoto, águas superficiais e sedimento (FENT *et al.*, 2006; SANGION e GRAMATICA, 2016; COMBER *et al.*, 2018; LOLIC *et al.*, 2015). Apresentando elevada dispersão no oceano, são absorvidos pelo meio aquático (PEREIRA *et al.*, 2016; BOROVA *et al.*, 2014), causando efeitos adversos ao ecossistema (FURHACKER, 2008; SALGOT, 2006; TERNES, 2007).

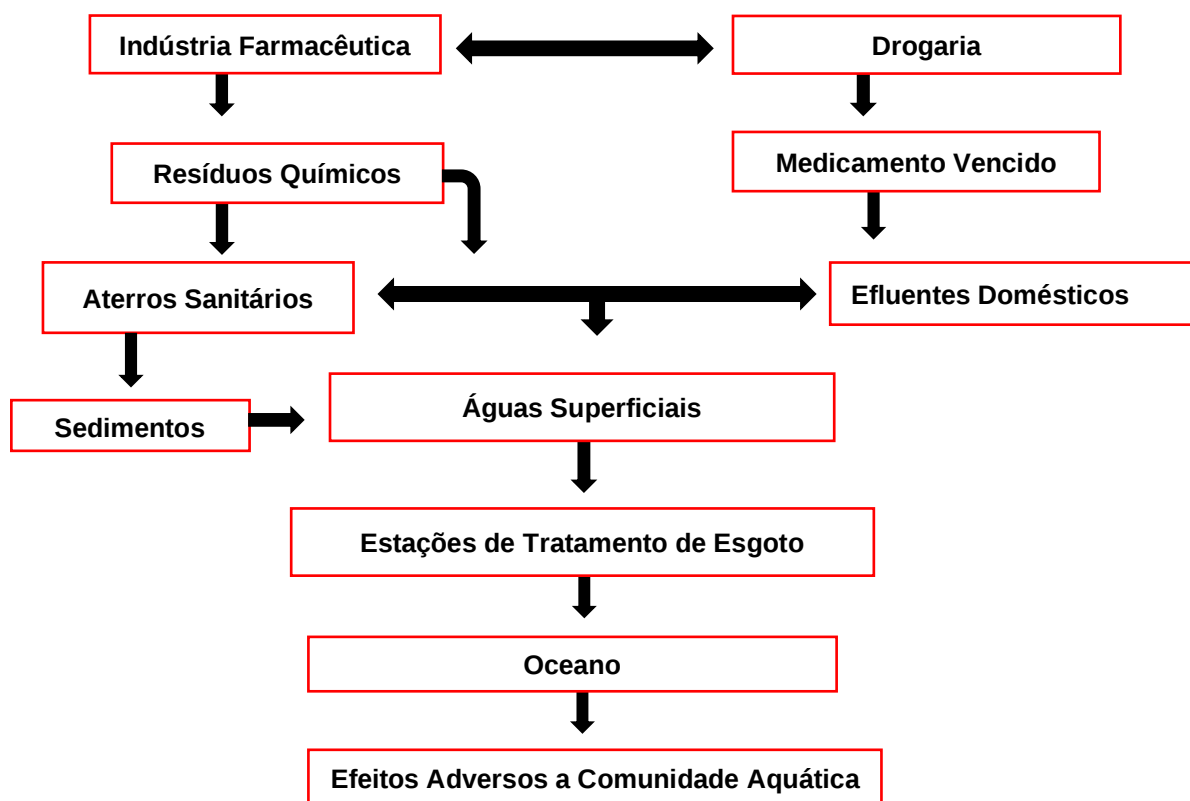


Figura1. Origem e destino dos fármacos. (Adaptada pelo autor)

Fonte: VAN, 2011; GUTPERLET *et al.*, 2015; AASAWARI e UMESH, 2019; PEREIRA *et al.*, 2016; FENT *et al.*, 2006; SANGION e GRAMATICA, 2016; COMBER *et al.*, 2018; LOLIC *et al.*, 2015.

Os fármacos encontrados no oceano, são transferidos de um nível biológico a outro (GEISSEN *et al.*, 2015), podendo sofrer biotransformação de maneira incompleta, gerando redução ou aumento na atividade biológica de seu

composto (KUMMERER, 2008). Seus riscos e efeitos no meio ambiente vem aumentando, sendo fontes de contaminação (SOUZA, 2009; ZHANG *et al.*, 2017).

Para minimizar os agravantes de contaminação no meio ambiente, legislações de âmbito nacional e estadual foram implementadas, como referência a Lei Estadual nº13039/2001 (BRASIL, 2001), visa laboratórios produtores, em assumirem a responsabilidade da destinação adequada a medicamentos com prazo de validade vencido (ANVISA, 2004), de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde - PGRSS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Em âmbito internacional, pode-se citar o sistema integrado europeu sobre o registro, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas: REACH, classificadas de acordo com os resultados pontuais de toxicidade, através da diretiva 93/67/CEE-Conselho da Comunidade Europeia (CEC, 1996), o qual classifica as substâncias químicas, em classes diferentes (Extremamente tóxico, muito tóxico, tóxico, nocivo e não tóxico), com base na diretiva 93/67/CEE. Em outros países, a lista internacional da União Europeia (EU 2015/495), (Comissão Europeia), demonstra crescimento de emissários de estações de tratamento de águas residuais, onde se concentram as águas internacionais e costeiras, que necessitam de tratamento abrangente (FENET *et al.*, 2014).

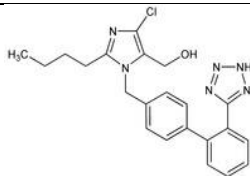
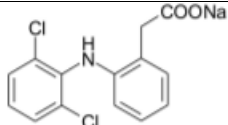
Em setembro de 2010, o parlamento europeu aprovou alterações à legislação sobre farmacovigilância, estendendo a ecofarmacovigilância, através da diretiva 2001/83 e do Regulamento 726/2004 (DAUGHTON e RUHOY, 2008), em relação a extensão da exposição ao medicamento, em humanos e espécies animais, obtendo informações físico-químicas, propriedades farmacológicas e toxicológicas da substância (SILVA, 2011; VELO e MORETI, 2010).

Ensaio ecotoxicológicos foram realizados em laboratório, baseados na ecotoxicologia, que busca entender o efeito das substâncias deixadas pelo homem no sistema aquático, e que refletem nas espécies, determinando efeitos deletérios de agentes físicos e químicos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). Podendo variar devido a fatores ambientais, como temperatura, tipo de substrato, salinidade e pressão (TANAKA, 2002; LAITANO, 2013), utilizando organismos marinhos como bioindicadores, que são utilizados para fornecer respostas na mudança fisiológica e ecológica (SUAREZ *et al.*, 2015), verificando

crescimento, reprodução e mortalidade (NACCI *et al.*, 1986; GONZALEZ *et al.*, 2017b).

Foram utilizadas duas substâncias para o ensaio de toxicidade do presente estudo, sendo descritas como Losartana e o Diclofenaco, representam suas características físico-químicas na tabela 1, através do nome do composto, abreviação, número de identificação da substância química (CAS), estrutura, coeficiente de participação octanol-água (Log Kow), e fórmula química. Os fármacos foram selecionados para o ensaio de toxicidade do efeito agudo, em testes com *Artemia salina*, e para o ensaio de toxicidade do efeito crônico, realizado com ouriço-do-mar.

Tabela 1. Características físico-químicas dos fármacos Losartana e Diclofenaco.

| Nome        | Abreviação | Cas number  | Estrutura                                                                           | Log Kow | Fórmula Química          |
|-------------|------------|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------------------|
| Losartana   | LOS        | 124750-99-8 |   | 2,84    | $C_{22}H_{22}ClN_6O$     |
| Diclofenaco | DCF        | 15307-79-6  |  | 4,51    | $C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Na$ |

Fonte: Adaptado pelo autor (SILVA *et al.*, 2018; MALACHIAS *et al.*, 2016; GODOY *et al.*, 2015; LAURENCE *et al.*, 2012; FONTES, 2016; SOUZA, 2014).

Um dos compostos utilizados no ensaio de toxicidade, o fármaco losartana, indicado para tratamento da hipertensão arterial sistêmica (HAS), atua em humanos bloqueando o canal de cálcio, são vasodilatadores diretos, bloqueando o receptor AT1 de angiotensina II (SILVA *et al.*, 2018; MALACHIAS *et al.*, 2016). No meio ambiente em águas superficiais, tem baixo potencial para se ligar ao iodo das estações de tratamento de esgoto, devido ser um ácido fraco, que não dissocia completamente seus íons nas águas (GODOY *et al.*, 2015).

A ocorrência de concentrações da losartana nos oceanos, tem sido reportada em diversos países (BERSUSA *et al.*, 2010), como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Concentrações encontradas em águas marinhas do fármaco Losartana.

| País            | Concentração  | Matriz ambiental   | Referência                    |
|-----------------|---------------|--------------------|-------------------------------|
| Brasil          | 0,032 µg/L    | Águas costeiras    | PEREIRA <i>et al.</i> , 2016. |
| Espanha         | 0,62 µg/L     | Mar mediterrâneo   | GROS <i>et al.</i> , 2017.    |
| Índia           | 2500 µg/L     | Próximo a fábricas | LARSSON, 2007.                |
| Portugal        | 0,91 µg/L     | Próximo a hospital | SANTOS <i>et al.</i> , 2013.  |
| Costa Espanhola | 0,62 µg/L     | Águas superficiais | HUERTA <i>et al.</i> , 2011.  |
| Alemanha        | 0,000333 µg/L | Efluentes          | GURKE, 2015.                  |
| Suécia          | 0,98 µg/L     | Efluentes          | GROS <i>et al.</i> , 2017.    |

Estudos abordam, efeitos de toxicidade a exposição de concentrações do fármaco losartana em espécies aquáticas, como demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Efeitos de toxicidade em espécies aquáticas a exposição da losartana.

| Espécie                      | Concentração | Efeito | Referência      |
|------------------------------|--------------|--------|-----------------|
| <i>Lenna minor</i>           | 63,9 mg/L    | CE50   | GODOY, 2015.    |
| <i>Pimephales promelas</i>   | 1000 mg/L    | CE50   | FDA, 2001.      |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i>   | 929 mg/L=96h | CL50   | FDA, 2001.      |
| <i>Lytechinus variegatus</i> | 50 mg/L      | CENO   | YAMAMOTO, 2014. |
| <i>Lytechinus variegatus</i> | 70 mg/L      | CEO    | YAMAMOTO, 2014. |
| <i>Mexilhão Perna perna</i>  | 50 mg/L      | CENO   | CORTEZ, 2018.   |
| <i>Mexilhão Perna perna</i>  | 75 mg/L      | CEO    | CORTEZ, 2018.   |
| <i>Mexilhão Perna perna</i>  | 84,6 mg/L    | CI50   | CORTEZ, 2018.   |

Outro composto utilizado no ensaio, é o fármaco diclofenaco, um anti-inflamatório não esteroide (AINES), inibidor da COX (ciclo-oxigenase) 1 e 2, inibindo deste modo a produção de prostaglandina e tromboxano, responsáveis por fatores fisiológicos na manutenção do organismo (LAURENCE *et al.*, 2012). Quando exposto a luz solar se decompõe rapidamente, originando compostos como 2-cloroanilina, 2,6-dicloroanilina, 2,6-diclorofenol (BARTELS e TUMPLING, 2007), originando reações de oxidação. Encontrado no oceano em sua forma original e como metabólito 3'-OH-DCF e 4'-OH-DCF, por meio da metabolização humana (VIENO e SILLAMPAA, 2014), resultam em radicais hidroxilo, capaz de gerar processos oxidativos em espécies marinhas (SCHMITT *et al.*, 2007).

Demonstram ocorrência de suas concentrações (Tabela 4), em matrizes ambientais de diversos países (CARVALHO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2005).

Tabela 4. Concentrações encontradas em águas marinhas do fármaco Diclofenaco.

| País        | Concentração | Matriz ambiental      | Referência                                            |
|-------------|--------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|
| Brasil      | 0,194 µg/L   | Águas costeiras       | PEREIRA <i>et al.</i> , 2016.                         |
| Alemanha    | 2 µg/L       | Águas superficiais    | BARTELS e TUMPLING, 2007                              |
| França      | 1,5 µg/L     | Mar mediterrâneo      | TOGOLA e BUDZENSKI, 2008.                             |
| Grécia      | 0,016 µg/L   | Mar mediterrâneo      | ALYGIZAKIS <i>et al.</i> , 2016.                      |
| Irlanda     | 0,016 µg/L   | Águas marinhas        | MCENEFF <i>et al.</i> , 2014.                         |
| Portugal    | 0,031 µg/L   | Estuário do Arade     | GONZALEZ <i>et al.</i> , 2015.                        |
| Canadá      | 1,5 µg/L     | Efluentes             | LEE <i>et al.</i> , 2005.                             |
| Espanha     | 0,031 µg/L   | Mar mediterrâneo      | GROS <i>et al.</i> , 2012; BIEL <i>et al.</i> , 2018. |
| Cingapura   | 0,003 µg/L   | Águas marinhas        | RODRIGUES, 2013; BAYEN <i>et al.</i> , 2013.          |
| Taiwan      | 0,053 µg/L   | Águas marinhas        | FANG <i>et al.</i> , 2012.                            |
| Reino Unido | 0,195 µg/L   | Estuário              | THOMAS e HILTON, 2004; NEBOT <i>et al.</i> , 2007.    |
| Suiça       | 2,4 µg/L     | Estação de Tratamento | GONZALEZ <i>et al.</i> , 2017a.                       |

Estudos abordam, efeitos de toxicidade em espécies aquáticas, quando expostos a concentrações do fármaco diclofenaco, demonstrado na tabela 5.

Tabela 5. Efeitos de toxicidade em espécies aquáticas a exposição do Diclofenaco.

| Espécie                           | Concentração   | Efeito                                                                                                                                                                             | Referência                                                                                                              |
|-----------------------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Mytillus spp</i>               | 1000 µg/L      | Redução de enzimas antioxidantes; Danos em DNA.                                                                                                                                    | ERICSON <i>et al.</i> , 2010; SCHIMIDT <i>et al.</i> , 2011, 2013; RIBAS <i>et al.</i> , 2016.                          |
| <i>Mytillus galloprovincialis</i> | 0,25 a 25 µg/L | Alterações imunológicas; Efeitos genotóxicos; Indução de enzimas oxidantes; Peroxidação lipídica; Bioacumulação; Granulócitos; Fagocitose; Variação de genes na renovação celular. | MEZZELLANI <i>et al.</i> , 2018; ERICKSON <i>et al.</i> , 2010; GONZALEZ e BEBIANO 2011; 2012; 2014; MEZZELLANI, 2016a. |
| <i>Mytillus galloprovincialis</i> | 1000 µg/L      | Estresse oxidativo; Ativação de respostas imunes; Desequilíbrio energético, impactando no crescimento e reprodução.                                                                | SCHIMIDT <i>et al.</i> , 2011, 2013; ERICSON <i>et al.</i> , 2010.                                                      |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i>        | 100 a 500 µg/L | Alterações citológicas em fígado e rim.                                                                                                                                            | TRIEBSKORN, 2004.                                                                                                       |
| <i>Truta marrom</i>               | ≥ 10 µg/L      | Lesões em brânquias, fígado e rim.                                                                                                                                                 | SCHWARZ, <i>et al.</i> , 2017.                                                                                          |
| <i>Truta marrom</i>               | ≥ 100 µg/L     | CL50                                                                                                                                                                               | ERICSSON, 2010; SCHIMIDT <i>et al.</i> , 2013.                                                                          |

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar em laboratório concentrações de compostos, por meio de ensaios de toxicidade, na verificação da toxicidade aguda e crônica dos fármacos Losartana e Diclofenaco, isolados e em combinação. Utilizando como ferramentas, expressões de toxicidade em CENO, CEO, CI50 e CL50 aos organismos expostos. Para que os resultados, sirvam de contribuição em estudos futuros, no esforço em diminuir os compostos farmacêuticos do oceano.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 DILUIÇÕES

As diluições utilizadas nos ensaios de toxicidade Aguda e Crônica, foram preparadas pouco antes do início do teste, em balões volumétricos (Figura 2), pesado em balança analítica, devidamente calibrada, a pesagem de 0,01g de cada substância-teste, diluídas em 100 mL de água. Utilizado 0,05 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido), para a diluição dos fármacos.

Com o auxílio de pipetas automática (Figura 2), para colocação do fármaco losartana e diclofenaco, nos tubos de ensaio e em suas réplicas. Foram utilizadas diluições com fator 2, gerando as concentrações: 1,56; 3,12; 6,25; 12,50; 25; 50 e 100 (mg/L), completando com água até o volume final de 10 mL em cada tubo, utilizando 3 réplicas para cada uma das sete concentrações apontadas.



Figura 2. Materiais utilizados nos ensaios para avaliação de toxicidade Aguda e Crônica.

Na concentração da mistura entre a losartana e o diclofenaco, utilizou a seguinte concentração para cada fármaco: 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 (mg/L), completando com água até o volume final de 10 mL.

Os fármacos utilizados foram disponibilizados pelo Laboratório de Ecotoxicologia Prof. Caetano Belliboni na Universidade Santa Cecília (Unisanta), ambos do laboratório Sigma-Alorich.

As concentrações foram baseadas em estudos prévios, realizados em laboratório e não publicados, bem como a Diretiva 93/67/CEE internacional (CEE-Conselho da Comunidade Europeia), retificada no regulamento (CE) nº 1907/2006, através de critérios de identificação de substâncias persistentes e bioacumuláveis em organismos marinhos, que estabelece avaliação dos riscos potenciais do fármaco no ambiente, previsto da superfície na água em concentrações na ordem de 0,01 mg/L (DIRETIVA, 2006). Utilizando expressões de toxicidade em CENO (Concentração de Efeito Não Observado), CEO (Concentração de Efeito Observado), CL50 (Concentração Letal a 50% dos organismos) e CI50 (Concentração Inibitória Média a 50% dos organismos).

## 2.2 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA

Utilizado o microcrustáceo *Artemia salina* (Crustacea: Brachiopoda), (Figura 3), no ensaio de toxidade aguda, devido sua praticidade em manuseio (FERREIRA *et al.*, 2000), e por possuir padrões de protocolos estabelecidos pela ABNT NBR 16530:09/2016.



Figura 3. *Artemia salina*.

Fonte: <https://aquaculture.ugent.be/x-files/larvi01/img/artemia.jpg>.

Para a realização do ensaio, utilizou a água do mar de Santos-SP, passando por autoclave e filtrada em membrana de celulose com porosidade de

0,45 µm, utilizada para a diluição dos fármacos e manuseio dos cistos. Os cistos desidratados foram disponibilizados pelo Núcleo de Estudos sobre Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA), do Instituto de Biociências da Unesp, localizado no município de São Vicente-SP.

Para a eclosão dos cistos de *Artemia salina*, e a obtenção dos náuplios, foram adicionados cerca de 0,5 g/L de ovos dos cistos, adicionados a 150 mL de hipoclorito e a 100 mL de água, em 1 litro de água do mar aerada, a salinidade de 30 a 36 (g/L), incubado o frasco em temperatura  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por um período de 24 horas na ausência de luz, ausente de alimentação.

As vidrarias utilizadas foram lavadas antes do uso com ácido nítrico a 10%, água potável e água destilada, para retirar qualquer resíduo que possa haver, seguindo as condições de parâmetros físico-químicos iniciais, através do controle (pH 7,54; Oxigênio Dissolvido 7,52mg/L; salinidade 34 g/L e temperatura  $25\pm 2$ ), e finais (pH 7,67; Oxigênio Dissolvido 3,86 mg/L; salinidade 34 g/L e temperatura  $25\pm 2$ ).

As concentrações dos fármacos losartana, diclofenaco e suas misturas, foram expostas aos náuplios após 24 horas de sua eclosão, utilizando 10 náuplios em cada concentração, durante o período de exposição por 48 horas. O resultado foi expresso como a concentração da amostra que causa a morte em 50% do organismo-teste, no período de 48 horas (CL50 - 48h).

O parâmetro estabelecido como ponto final de observação do efeito tóxico agudo, foi a morte da *Artemia salina*, analisadas em microscópio estereoscópico, os náuplios mortos e vivos, em cada réplica, de cada concentração. (VEIGA e VITAL, 2002; ABNT, 2016; MEYER *et al.*, 1982).

## 2.3 ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA

Conhecido na costa brasileira, o ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea), (Figura 4), da espécie *Echinometra lucunter*, encontrado em águas tropicais no oceano Atlântico, apresenta espinhos resistentes e coloração negra, característica de grande importância ecológica para o ecossistema, por ser uma ferramenta para a ecotoxicologia utilizado em ensaios de toxicidade, possui padrões de protocolos estabelecido, conforme ABNT (2012), (SANTOS e FLAMMANG, 2005; TAVARES, 2004).



Figura 4. ouriço-do-mar.  
Fonte: SCIANI *et al.*, 2011.

Os organismos foram coletados na Ilha das Palmas (Guarujá, São Paulo), através de mergulho livre, após a coleta foram acondicionados em caixas isotérmicas, em seguida levados ao Laboratório de Ecotoxicologia Prof. Caetano Belliboni na Universidade Santa Cecília (Unisantia), onde foram mantidos em tanques com aeração constante em água do mar, em condições controladas até o início do ensaio.

A carta controle de sensibilidade do organismo-teste (ouriço-do-mar), se encontra em anexo, referente aos 15 indivíduos do organismo utilizado no período de execução do presente estudo. O ensaio foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pela ABNT/NBR 15350:2012.

Para a realização do ensaio de toxicidade crônica, foram medidas as condições de parâmetros físico-químicos, iniciais do controle (pH 8,35; Oxigênio Dissolvido 5,67 mg/L; salinidade 35 g/L e temperatura  $21,8 \pm 2$ ), e finais (pH 7,91; Oxigênio Dissolvido 4,12 mg/L; salinidade 36 g/L e temperatura  $25 \pm 2$ ).

Para a realização do ensaio de toxicidade, os organismos foram estimulados através da aplicação de impulsos elétricos de 35V, e quando não liberado os gametas, injetado 2,5 mL de cloreto de potássio (KCl) a 0,5 mol, para estimular a liberação. Sendo os gametas femininos amarelo-alaranjados, e os masculinos brancos. Para a coleta dos óvulos, as fêmeas foram apoiadas com a superfície aboral voltada para baixo, em um recipiente menor que o seu diâmetro, com água de diluição a temperatura do ensaio. Os espermatozoides foram coletados com auxílio de uma pipeta automática de ponta fina, acondicionados em um béquer seco, envolto com gelo.

Para a fecundação preparada uma solução na proporção de 0,5 mL de espermatozoide, para 25 mL de água de diluição. Esta solução foi misturada de modo a proporcionar a dissolução de possíveis grumos. Em seguida

acrescentado volume de 1 mL da solução de esperma ao recipiente, contendo os óvulos, aguardando 10 minutos com leve agitação.

Após esse período, três sub amostras de 10 µl da solução, foram colocadas em uma lâmina de *Sedgwick-Rafter*, para contagem e cálculo da porcentagem de fecundação (mínimo de 80% de óvulos fecundados para utilização no ensaio). Para a utilização nos ensaios, os óvulos se encontraram redondos, lisos e de tamanho homogêneo.

Utilizou-se água reconstituída no ensaio, a mistura de sal comercial da marca *Coral Pro salt* (Red Sea®), filtrada em membrana de celulose Millipore®, com porosidade de 0,45 µm, para a utilização no ensaio com os fármacos e manuseio dos gametas, em seguida distribuídos 60 µL dos óvulos recém fecundados, uma base de 300 ovos em cada tubo de ensaio, para cada concentração e suas réplicas.

Após o período de exposição a 42 horas, em câmara de cultivo do organismo, com temperatura a  $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ , retirada 10 µl do controle e verificado se pelo menos 80% das larvas atingiram o estágio *pluteus*, a critério de aceitabilidade do ensaio. Após completar o período de exposição, o experimento foi encerrado com 0,5 mL de formol tamponado, com bórax em cada réplica.

A contagem dos primeiros 100 embriões, seguiu analisada em microscópio, utilizando lâmina *Sedgwick-Rafter*, para observação do grau de desenvolvimento, através de seu aspecto morfológico. Os embriões que atingiram seu estágio de larva *pluteus* desenvolvidos, foram considerados normais, verificado através do comprimento dos bastonetes esqueléticos, e aqueles que apresentaram alterações morfológicas ou retardo no seu desenvolvimento, considerados com anormalidades.

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após os ensaios de toxicidade, os dados foram submetidos a análises de normalidade e homocedasticidade. Posteriormente realizou-se análise de variância (ANOVA –  $p < 0,05$ ) seguida de Dunnett's, para determinação de CENO (Concentração de Efeito Não Observado) e CEO (Concentração de Efeito Observado), CL50 (Concentração Letal a 50% dos organismos), empregando o programa estático *GraphPad Prism* 5.01. A CI50 (Concentração inibitória média

a 50% dos organismos), calculada por interpolação linear em embriões de ouriço-do-mar.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 RESULTADO DO ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM *Artemia salina*

O resultado do tratamento no Controle da água, apresentou 100% da taxa de sobrevivência aos organismos expostos, e o DMSO obteve 97% na taxa de sobrevivência. Ambos os testes, estão dentro dos padrões estipulados pelos protocolos (ABNT, 2016), para realização do teste (Tabela 6). Foram analisados com o intuito de verificar, se houve influência no ensaio.

Tabela 6. Resultado do Tratamento no Controle da água e DMSO (Dimetilsulfóxido), utilizado no ensaio de toxicidade Aguda.

| Tratamento | Taxa de sobrevivência | Desvio Padrão |
|------------|-----------------------|---------------|
| Controle   | 100,00%               | 0,00%         |
| DMSO       | 97,00%                | 5,00%         |

O resultado obtido nos ensaios, para verificação da taxa de sobrevivência da *Artemia salina*, dos fármacos losartana e diclofenaco isolados, expostos às concentrações: 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 (mg/L), e em combinação de sua mistura, utilizando as concentrações de cada fármaco: 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 (mg/L), indicaram ausência de toxicidade aguda, para as concentrações expostas aos organismos, em ambos os testes. A comparação de seus resultados, utilizou como referência o tratamento do Controle da água.

As Figuras 5, 6 e 7, demonstram a porcentagem da taxa de sobrevivência, obtida no ensaio de toxicidade aguda, com o organismo *Artemia salina*, impossibilitando o cálculo da CL50.

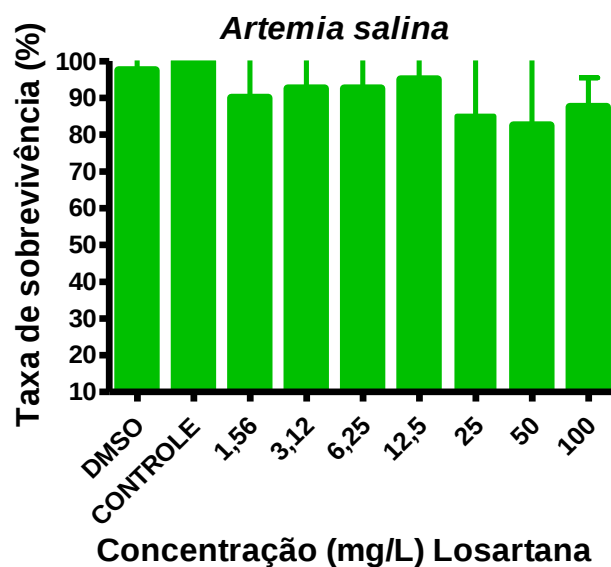


Figura 5. Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* a exposição de diferentes concentrações da losartana. Os valores são expressos estatisticamente através do Programa Prisma 5.1. Representam a média  $\pm$  desvio padrão para cada concentração testada por ANOVA. Demonstrando a porcentagem da taxa de sobrevivência.

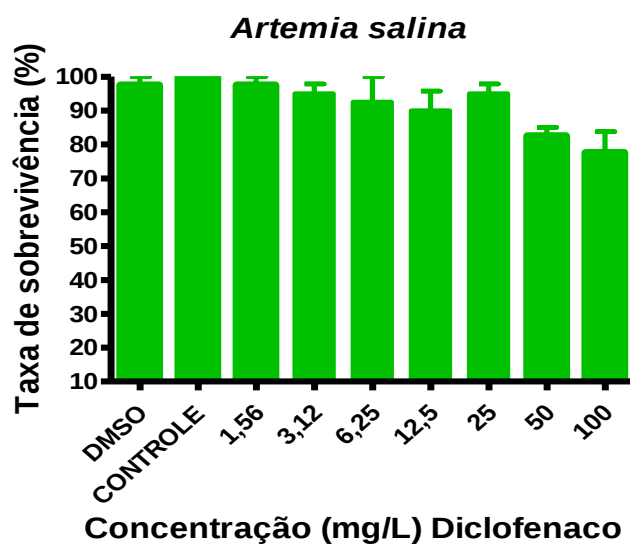


Figura 6. Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* a exposição de diferentes concentrações do diclofenaco. Os valores são expressos estatisticamente através do Programa Prisma 5.1. Representam a média  $\pm$  desvio padrão para cada concentração testada por ANOVA. Demonstrando a porcentagem da taxa de sobrevivência.

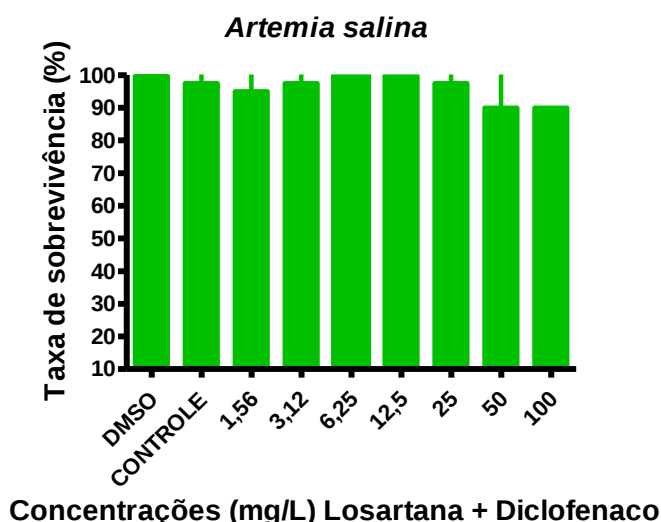


Figura 7. Resultado do ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* a exposição de diferentes concentrações da mistura entre a losartana e o diclofenaco. Os valores são expressos estatisticamente através do Programa Prisma 5.1. Representam a média  $\pm$  desvio padrão para cada concentração testada por ANOVA. Demonstrando a porcentagem da taxa de sobrevivência.

### 3.2 RESULTADO DO ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA COM ouriço-do-mar

No ensaio realizado para verificação da toxicidade crônica, aos organismos expostos ao tratamento do controle, não apresentaram toxicidade, chegando a 96,75% da taxa de desenvolvimento embriolarval, e o DMSO obteve 97,50% na taxa de desenvolvimento embriolarval dos organismos expostos. Ambos os testes no tratamento do Controle e do DMSO (Tabela 7), se encontram em condições aceitáveis para o ensaio, conforme protocolo (ABNT 15350/2012).

Tabela 7. Resultado do tratamento no Controle da água e DMSO (Dimetilsulfóxido), utilizado no ensaio de toxicidade crônica.

| Tratamento | Desenvolvimento embriolarval | Desvio Padrão |
|------------|------------------------------|---------------|
| Controle   | 96,75%                       | 0,8997%       |
| DMSO       | 97,50%                       | 0,9574%       |

O fármaco losartana exposto nas concentrações de 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 (mg/L), não apresentou diferença estatística com o controle, não apresentando toxicidade a exposição no ensaio de toxicidade crônica, para embriões de *Echinometra lucunter*, como demonstra a Figura 8.

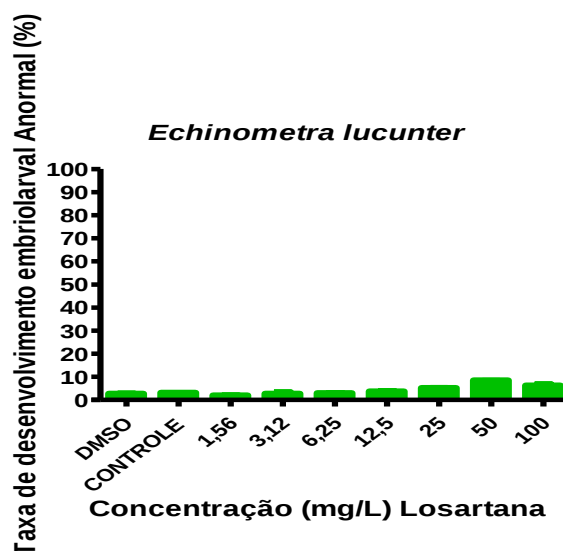


Figura 8. Resultado do ensaio de toxicidade crônica com *Echinometra lucunter* a exposição de diferentes concentrações da losartana. Os valores são expressos estatisticamente através do Programa Prisma 5.1. (\*). Representam a média  $\pm$  desvio padrão para cada concentração testada por ANOVA com testes posteriores de Dunnet: (\*  $p < 0.05$ ). Demonstram a porcentagem da taxa de desenvolvimento embriolarval Anormal.

O diclofenaco apresentou CENO= 6,25 mg/L, e toxicidade observada na CEO= 12,5 mg/L. Através do método de interpolação linear, foi possível estimar a concentração inibitória a 50% dos organismos expostos, obtendo a CI50= 62,15 mg/L. Esses resultados são observados na figura 9 e tabela 8.

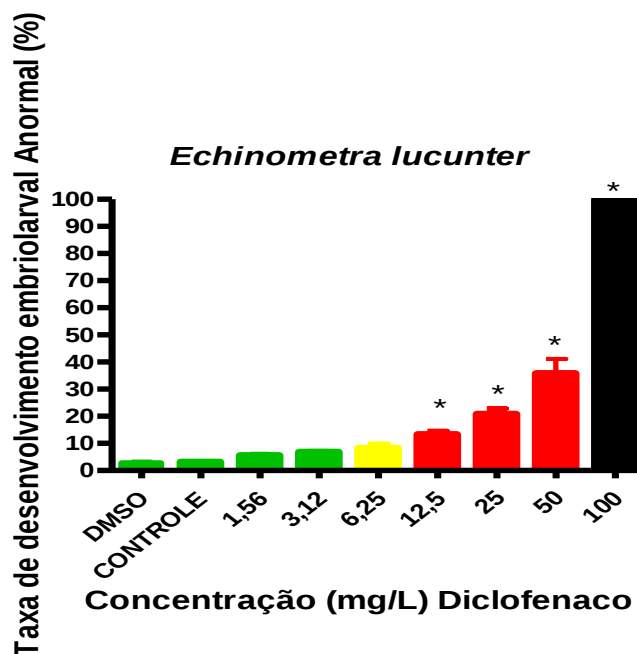


Figura 9. Resultado do ensaio de toxicidade crônica com *Echinometra lucunter* a exposição de diferentes concentrações do diclofenaco. Os valores são expressos estatisticamente através do Programa Prisma 5.1. Representam a média  $\pm$  desvio padrão para cada concentração testada por ANOVA com testes posteriores de Dunnet (\*  $p < 0.05$ ). Demonstram a porcentagem da taxa de desenvolvimento embriolarval Anormal.

A expressão do resultado no ensaio de toxicidade crônica ao diclofenaco, se encontram especificadas na tabela 8.

Tabela 8. Expressão do resultado no ensaio de toxicidade crônica a exposição ao Diclofenaco.

| COMPOSTO    | CENO (mg/L) | CEO(mg/L) | CI50 (mg/L) |
|-------------|-------------|-----------|-------------|
| Diclofenaco | 6,25 mg/L   | 12,5 mg/L | 62,15 mg/L  |

CENO: Concentração de Efeito Não Observado. CEO: Concentração de Efeito Observado.  
CI50: Concentração Inibitória média.

As concentrações expostas na mistura dos fármacos losartana e diclofenaco, apresentou resultado no ensaio de toxicidade crônica, conforme expressão, a partir das concentrações 6,25 mg/L=CENO, e 12,5 mg/L=CEO (Figura 10).

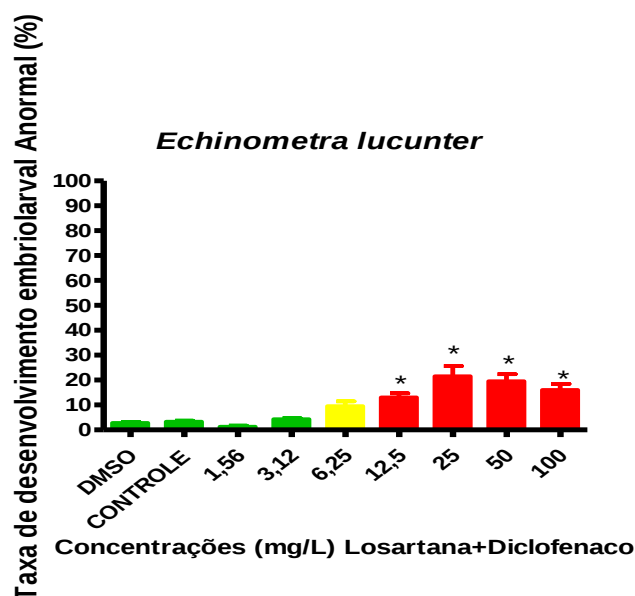


Figura 10. Resultado do ensaio de toxicidade crônica com *Echinometra lucunter* a exposição de diferentes concentrações da mistura entre a losartana e o diclofenaco. Os valores são expressos estatisticamente através do Programa Prisma 5.1. Representam a média  $\pm$  desvio padrão para cada concentração testada por ANOVA com testes posteriores de Dunnet (\*  $p < 0.05$ ). Demonstram a porcentagem da taxa de desenvolvimento embrionário Anormal.

Os resultados do ensaio de toxicidade crônica, a exposição da mistura entre a losartana e o diclofenaco, não possibilitaram o cálculo da CI50, sendo descritas a expressão de seus resultados de toxicidade na tabela 9.

Tabela 9. Expressão do resultado no ensaio de toxicidade crônica a exposição entre a Losartana e o Diclofenaco.

| COMPOSTO                | CENO (mg/L) | CEO(mg/L) | CI50(mg/L) |
|-------------------------|-------------|-----------|------------|
| Losartana + Diclofenaco | 6,25 mg/L   | 12,5mg/L  | -----      |

CENO: Concentração de Efeito Não Observado. CEO: Concentração de Efeito Observado.  
CI50: Concentração Inibitória média.

#### 4. DISCUSSÃO

No ensaio de toxicidade aguda, realizada com o organismo *Artemia salina*, os resultados obtidos não apresentaram toxicidade para nenhuma concentração testada. Esses resultados, corroboram com os estudos de Fabbri *et al.*, (2014), no qual considera ser improvável que ensaios de toxicidade aguda, gerem efeitos tóxicos nesse organismo, devido a *Artemia salina* ser resistente em ambientes naturais. Para se observar efeito de toxicidade, são indicados ensaios de toxicidade crônica, expostos a um período mais longo (FENT *et al.*, 2006; PEAKE *et al.*, 2016). A escolha da *Artemia salina*, para o ensaio de toxicidade aguda, ocorreu por Ferreira *et al.*, (2000), que aborda serem organismos filtradores de pequeno porte, utilizados em ensaios de toxicidade, devido sua sensibilidade e poder de filtração.

Estudos realizados por Dayane *et al.*, (2013), utilizando a *Artemia salina* como bioindicador, demonstrou que as concentrações expostas a um contaminante por 72 horas ao microcrustáceo, houve mortalidade em 83% dos organismos. Evidenciando, que o aumento de tempo realizado na exposição as concentrações do contaminante, interfere nos movimentos básicos, e por consequência no metabolismo do organismo. A exposição do contaminante a concentrações menores não apresentou efeito tóxico, considerando que o contaminante serviu como fonte de nutriente, garantindo sua sobrevivência. (DAYANE *et al.*, 2013).

No ensaio de toxicidade crônica, a exposição da losartana, não obteve taxa de desenvolvimento embriolarval Anormal aos embriões de ouriço-do-mar, não obtendo toxicidade. Cortez *et al.* (2018), abordou em seus estudos com biomarcadores, que as concentrações expostas em 75 mg/L da losartana, sinalizaram indução na atividade de enzimas, na catalisação de xenobióticos, para fins de desintoxicação. Observadas a partir da atividade da enzima CYP-

450, Glutathione-S-transferase e Glutathione peroxidase, expostas a concentrações do composto entre 0,03 e 3 µg/L, encontrado efeitos citogenotóxicos em brânquias de mexilhão (BEIRAS *et al.*, 2003; CORTEZ *et al.*, 2018).

Alguns estudos encontrados sobre a losartana, demonstram que a exposição de concentrações do composto em organismos de animais roedores, ocorre a inibição de atividade ATPase da célula (VALLES e MANUCHA, 2000). Em organismos marinhos, altera a fluidez da membrana celular, ocorrendo dano ao DNA e na membrana lisossomal (ZOUMPOULAKIS, 2003; GONZALEZ *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016; GROS *et al.*, 2017).

Godoy *et al.* (2015) aponta, a necessidade de avaliar efeitos biológicos com biomarcadores, utilizando a losartana, devido estudos em ecossistemas marinhos e estuarinos, não identificarem dados suficientes para esta classe de fármacos anti-hipertensivos, que aborde a toxicidade de forma padronizada.

No ensaio de toxicidade crônica, a exposição dos embriões de *Echinometra lucunter*, não ocorreu desenvolvimento embriolarval das larvas *pluteus*, quando expostos à concentração de 100 mg/L do diclofenaco, ocorrendo toxicidade aos organismos expostos, a partir da concentração de 62,15 mg/L, expressos em CI50 (Concentração Inibitória Média).

O diclofenaco é encontrado em efluentes de estações de tratamento de esgoto, e influenciam as espécies que absorvem este composto, acarretando impacto em sua sobrevivência, desenvolvimento e comportamento, em estágios embrionários e juvenis (MEYER *et al.*, 2016). Sua bioacumulação elevada é encontrada em espécies aquáticas (XIE *et al.*, 2017), causando obstrução da via metabólica da COX, contribuindo para o estresse oxidativo nas células (GONZALEZ *et al.*, 2011). Estudos com biomarcadores, identificaram alteração no estado oxidativo das células durante o metabolismo do fármaco, sinalizando a capacidade de causar efeitos adversos, em organismos alvo e não alvo (AGUIRRE *et al.*, 2013).

A metabolização do diclofenaco em peixes, crustáceos, moluscos e invertebrados aquáticos (SNYDER, 2000), é semelhante à via que ocorre em humanos, por meio do sistema citocromo P-450 a biotransformação é induzida, e quando há presença de xenobióticos a indução acontece pela enzima CYP1A1, gerando espécies reativas de oxigênio (GOKSOYR e FORLIN, 1992).

Pourahmad *et al.* (2011), aponta que os metabólitos do diclofenaco, formam espécies reativas de oxigênio, capazes de desestabilizar as membranas. Por meio do ensaio de toxicidade crônica com embriões de ouriço-do-mar, obtivemos a CI50 dos organismos expostos, levando a considerar a indução desta enzima instável a CYP-1A1, capaz de desestabilizar as membranas gerando concentração de inibição no organismo exposto.

Guiloski *et al.* (2017), utilizou biomarcadores na exposição ao diclofenaco em concentrações a 20 µg/L, em ensaios crônicos na espécie *Rhamdia quelen* expostos por 28 dias, verificou aumento da enzima Glutathione S-transferase no fígado, desencadeando stress oxidativo (ANTUNES, 2010), exarcebando a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio), ocorrendo aumento na atividade da enzima Catalase (HITE *et al.*, 1999). Em espécies de peixe *Truta marrom*, a concentrações superiores a 10 µg/L, apresentaram indícios de lesões em brânquias, fígado e rim (SCHWARZ *et al.*, 2017). E em espécies de peixe *Cyprinus carpio*, expostos entre 12h a 48 horas do composto, apresentou aumento na atividade da Catalase nas brânquias, após esse período em 72 horas de exposição, observado reações de toxicidade no fígado (ISLAS-FLORES *et al.*, 2013). Quando expostos a 0,1mg/L do diclofenaco, foram encontradas alterações no sistema imune, na força e crescimento, levando à morte do organismo (ERICSSON, 2010; SCHIMIDT *et al.*, 2013).

A espécie *Daphnia magna*, quando exposta em 48 horas a concentração de 9,7 mg/L do diclofenaco, não acarretou aumento significativo da atividade da enzima Catalase (GOMEZ-OLIVAN *et al.*, 2014). Comparando com o resultado obtido do presente estudo com embriões de ouriço-do-mar, expostos ao diclofenaco até a concentração de 6,25 mg/L, não se observou concentração tóxica nos organismos expostos, estabelecendo a CENO=6,25mg/L.

O ensaio de toxicidade crônico, exposto a mistura da losartana e o diclofenaco, empregando embriões de *Echinometra lucunter*, não foi possível detectar com clareza os efeitos apresentados, se foram aditivos, sinérgicos ou antagônicos, resultando em discreta tendência ao antagonismo, pois não foi possível calcular a CI50, que inibe 50% dos organismos expostos. A toxicidade da mistura dos fármacos em efluentes, podem ocorrer por meio de resultados das interações de seus constituintes, podendo ser aditivos, sinérgicos ou antagônicos (JAMES *et al.*, 2000; PANOUILLERES *et al.*, 2007; INCE *et al.*,

1999). Por meio de etapas toxicocinéticas no local de captação, ou na eliminação de seus agentes químicos, que modificam a detoxificação dos compostos, podendo ocorrer interações no sítio de ação, afetando a ligação dos compostos no receptor (SPURGEON *et al.*, 2010).

Autoridades reguladoras são responsáveis por avaliar os riscos de produtos químicos novos para o meio ambiente, verificando parâmetros entre eles o coeficiente de participação octanol-água (Log K<sub>ow</sub>), (KAILA *et al.*, 2018). Estudos indicam, que a bioacumulação desses compostos em tecidos de organismos marinhos, pode ser causada devido ao coeficiente de participação octanol-água (Log K<sub>ow</sub>) do fármaco ser superior, indicando maior concentração e persistência do composto no organismo, com poder de hidrofobicidade e afinidade aos lipídios e proteínas plasmáticas, sendo mais fácil de atravessar a membrana dos animais (CLEUVERS, 2004).

O sistema convencional no tratamento de esgoto, não são eficientes para degradar as moléculas dos compostos farmacêuticos, que são removidos parcialmente, conhecidos como processos primários e secundários (YANG *et al.*, 2017; ZIYLAN, 2011; INCE, 1999). Para um processo eficaz, é necessário que os tratamentos sigam técnicas terciárias, que permitem tecnologias de filtração e adsorção por carvão ativado, com processos oxidativos na presença de ozonização e fotólise (LI *et al.*, 2014; PEAKE *et al.*, 2016), e que essas substâncias sejam monitoradas em efluentes de matrizes ambientais, com técnicas analíticas, que permitem detecção precisa (SANTOS *et al.*, 2010; ZENKER *et al.*, 2014).

## 5. CONCLUSÃO

As informações obtidas sobre os níveis encontrados de fármacos nos oceanos e ecossistemas estuarinos, levou à investigação dos efeitos tóxicos em níveis biológicos e fases da vida diferentes na cadeia trófica, expostas a diferentes concentrações da losartana, diclofenaco e sua mistura. Os testes realizados com *Artemia salina*, não apresentaram toxicidade aguda. Por outro lado, a toxicidade crônica em embriões de ouriço-do-mar, foram evidenciadas pela exposição ao diclofenaco e a sua mistura. Expressadas sua toxicidade em CENO, CEO e CI50, a partir das concentrações 6,25 mg/L=CENO; 12,5 mg/L=CEO e 62,15 mg/L=CI50.

Havendo a necessidade da realização de testes de toxicidade com outros organismos e comunidades, utilizando biomarcadores que sejam protocolados, e que subsidiem dados confiáveis nos efeitos da toxicidade, para estabelecer concentrações seguras. Para que gerem subsídios a futuras avaliações de risco ambiental e revisões na legislação, englobando o monitoramento de sistemas complexos das estações de tratamento de esgoto e matrizes ambientais, contribuindo para a redução na concentração de fármacos nos oceanos.

## 6. TRABALHO SUBMETIDO OU ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

### Marine Pollution Bulletin

#### Single and mixture toxicity of pharmaceuticals losartan and diclofenac to marine organisms *Artemia salina* and *Echinometra lucunter*

--Manuscript Draft--

|                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Manuscript Number:</b>    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Article Type:</b>         | Research Paper                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Keywords:</b>             | Diclofenac; Losartan; Mixtures; Toxicity; Marine organisms                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>Corresponding Author:</b> | Luciane Alves Alves Maranhão, PhD<br>Unaerp<br>São Vicente, BRAZIL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>First Author:</b>         | Juliana Andrade de Sousa                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>Order of Authors:</b>     | Juliana Andrade de Sousa<br>Fabio Hermes Pusceddu, PhD<br>Maysa Ueda<br>Denis Moledo de Souza Abessa<br>Camilo Dias Seabra Pereira<br>Luciane Alves Maranhão, PhD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Abstract:</b>             | Drugs are being taken to the oceans through the sewage system, where there is no adequate treatment for this purpose, causing contamination and toxicity to aquatic organisms. The present study evaluated the survival rate of microcrustaceans <i>Artemia salina</i> and the embryolarval development rate of sea urchin embryos <i>Echinometra lucunter</i> , after exposure to the drug Losartan, an antihypertensive, and to the drug Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs), and their mixture. Losartan did not show toxicity. In contrast, the isolated diclofenac showed toxicity to <i>E. lucunter</i> embryos (NOEC = 6.25mg/L, LOEC = 12.5 mg/L; IC 50 = 64.25 mg/L). The mixture of losartan and diclofenac showed chronic toxicity to <i>E. lucunter</i> embryos (NOEC = 6.25 mg/L; LOEC = 12.5 mg/L. Our results may generate subsidies for future environmental risk assessments and legislation that encompass the drugs monitoring and reduction in effluent treatment plants and environmental matrices. |
| <b>Suggested Reviewers:</b>  | Maria Dolores Basallote, PhD<br>University of Huelva: Universidad de Huelva<br>dolores.basallote@uca.es<br>The author has some articles published using seaurchin species to evaluate environmental matrices toxicity<br><br>Gabriela Aguirre-Martínez, PhD<br>Arturo Prat University<br>gabriela.aguirre@uca.es<br>Her research interest is focused on ecotoxicology of emerging contaminants (pharmaceuticals and personal care products, microplastics) and Persistent Organic Pollutants (POPs). She is especially interested in developing toxicological indicators to evaluate the effects of exposure of aquatic organisms to pollutants present in the environment.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASAWARI, TAK.; UMESH, B. K. Evaluation of trace elements and particulate matter deposition on plant foliage exposed to vehicular pollution. **Acta Botanica Croatica**, v. 78, n. 2, p. 164-168, 2019.

AGUIRRE, MARTÍNEZ. G.V.; BURATTI, S.; FABBRI, E.; DEL, VALLS, A.T.; MARTÍN, DÍAZ, M.L. Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, p. 1408-1418, 2013.

ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15350 :2012**. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea), 2012.

ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT. NBR 16530:09/ 2016**. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Artemia* sp (Crustacéa Brachiopoda). Primeira edição, 2016.

AL, AUKIDY. M.; VERLICH, P.; FELIC, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Monitoring release of pharmaceutical compounds: occurrence and environmental risk assessment of two WWYP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. **Science of the Total Environment**, v. 438, p. 15-25, 2012.

ALYGIZAKIS, N.A.; FERRERO, P.G.; BOROVA, V.L.; PAVLIDOU, A.; HATZIANESTIS, I.; THOMAIDIS, N.S. Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 1097-1105, 2016.

ANTUNES, S. C.; MARQUES, S. M.; PEREIRA, R.; GONÇALVES, F. E NUNES, B. Testing procedures for the determination of several biomarkers in different species, for environmental assessment of pollution. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, p. 1625-1630, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 306, de 07 de dezembro de 2004. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde**. Diário Oficial da União, Brasília, de 10 de dezembro de 2004.

BARTELS, P.; TUMPLING JR., W. V. Solar radiation influence on the decomposition process of diclofenac in surface waters. **Science of the Total Environment**, v. 374, p. 143, 2007.

BAYEN, S.; ZHANG, H.; DESAI, M. M.; OOI, S.K.; KELLY, B.C. Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore's marine environment: influence of hydrodynamics and physical chemical properties. **Environmental Pollution**, v. 182, p. 1-8, 2013.

BEIRAS, R.; FERNANDEZ, N.; BELLAS, J.; BESADA, V.; GONZALEZ-QUIJANO, A.; NUNES, T. Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. **Chemosphere**, v. 52, p. 1209-1224, 2003.

BERSUSA, A.A.S.; PASCALICCHIO, A.E.; PESSOTO, U.C.; ESCUDER, M.M.L. Access of hypertension and/or diabetes patients to healthcare services in Baixada Santista. **Revista Brasileira Epidemiologia**, v. 13, n. 3, p. 1-9, 2010.

BIEL, MAESO. M.; BAENA, NOGUERAS. R.M.; CORADA, FERNÁNDEZ. C.; LARA, MARTÍN, P.A. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 649-659, 2018.

BRASIL. LEI nº. 13039, de 11 de janeiro de 2001. **Dispõe que é de responsabilidade das indústrias farmacêuticas e das empresas de distribuição de medicamentos, dar destinação adequada a medicamentos com prazos de validade vencidos e adota outras providências. (Paraná).** Diário Oficial n. 5904, de 12 de janeiro de 2001.

BOROVA, V.L.; MARAGOU, N.C.; GAGO-FERRERO, P.; PISTOS, C.; THOMAIDIS, N.S. Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 17, p. 4273-4285, 2014.

CARVALHO, E.V.; FERREIRA, EL.; MUCINI, L.; SANTOS, C. Aspectos legais e toxicológicos do descarte de medicamentos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 22, n.1-2, p. 1-8, 2009.

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.

CLEUVERS, M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 3, p. 309-315, 2004.

COUMBER, S.; GARDNER, M.; SOURME, P.; LEVERETT, D.; ELLOR, B. Active pharmaceutical ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment Works: a cause for concern? **Science of the Total Environment**, v. 613-614, p. 538- 547, 2018.

CORTEZ, F.; SOUZA, L.; GUIMARÃES, L.; ALMEIDA, J.; PUSCEDU, F.; MARANHO, L.; MOTA, L.; NOBRE, C.; SANTOS, A.; PEREIRA C. Ecotoxicological effects of losartan on the brown mussel *Perna perna* and its

occurrence in seawater from Santos Bay (Brazil). **Science of the Total Environment**, v. 637-638, n. 1363, p. 137, 2018. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.069.

DAUGHTON, C.G.; RUHOY, I.S. The after life of drugs and the role of pharmacovigilance. **Drug Safety**, v. 31, p. 1069-1082, 2008. <https://doi.10.2165/0002018-200831120-00004>.

DAYANE R.M.A; CRISTINA V.H; GRACIELA I.B.M; KESTUR G.S; WASHINGTON L.E.M. **Avaliação toxicológica em Artemia salina de suspensão de nanofibrilas de celulose a partir de resíduos da Pupunha**. VII Workshop de Nanotecnologia aplicada ao Agronegócio. Embrapa Instrumentação, São Carlos. Pag. 554-556, 2013.

DIRECTIVA 93/67/CEE. Da comissão de 20 de julho de 1993/67/548. **CEE do Conselho a comissão das comunidades europeias, 1967**. Retificação ao Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de dezembro, 2006.

ERICSON, H.; THORSEN, G.; KUMBLAD, L. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 99, p. 223-231, 2010.

FABBRI, R.; MONTAGNA, M.; BALBI, T.; RAFFO, E.; PALUMBO, F.; E CANESI, L. Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Environmental Research**, v. 99, p. 1-8, 2014.

FANG, T.H.; NAN, F.H.; CHIN, T.S.; FENG, H.M. The occurrence and distribution of pharmaceutical compounds in the effluents of a major sewage treatment plant in Northern Taiwan and the receiving coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 1435-1444, 2012.

FENET, H.; ARPIN-PONT, L.; VANHOUTTE-BRUNIER, A.; MUNARON, D.; FIANDRINO, A.; MARTÍNEZ BUENO, M.J.; BOILLLOT, C.; CASELLAS, C.; MATHIEU, O.; GOMEZ, E. Reducing PEC uncertainty in coastal zones: A case study on carbamazepine, oxcarbazepine and their metabolites. **Environment International**, v. 68, p. 177-184, 2014.

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

FERREIRA, C. M.; VELANDIA J. R.; AUREA. E. "Síntese de 1, 3, 5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia Salina* leach". **Química nova**, v. 23. n. 1, 2000.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. **Center for Drug Evaluation and Research. Environmental Assessment/FONSI**. Approval Package for Application Number 20-386/S-019 and 029. Review of Environment Assessment NDA-20, p. 386, 2001.

FONTES, K. M.; **Avaliação do risco ambiental do fármaco Diclofenaco em ambientes marinhos**. Dissertação de Mestrado (Programa Interunidades de Pós-Graduação em Análise Ambiental Integrada) Universidade Federal de São Paulo-Campus Diadema/Baixada Santista, p. 106, 2016.

FURHACKER, M. The Water Framework Directive - Can we reach the target? **Water Science & Technology**, v. 57, p. 9-17, 2008.

GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMPP, E.; UMLAUF, G.; NADAL, M.; VAN DER PLOEG, M.; VAN DE ZEE, S.E.A.T.M.; RITSEMA, C.J. Emerging pollutants in the environment: a challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57-65, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>.

GODOY, A. A.; KUMMROW, F.; PAMPLIN, P. Ecotoxicological evaluation of propranolol hydrochloride na losartan potassium to *Lemna minor* L. (1753) individually and in binary mixtures. **Springer Science + Business Media New York**, 2015.

GOKSOYR, A.; FORLIN, L. The cytochrome P- 450 systems in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 22, p. 287-311, 1992.

GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; GARCÍA-MEDINA, S.; VALDÉS-ALANÍS, A.; ISLAS-FLORES, H. E NERI-CRUZ, N. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 391-399, 2014.

GONZALEZ, REY. M.; BEBIANNO, M.J. Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) ibuprofen distresses antioxidant defense system in mussel *Mytilus galloprovincialis* gills. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 264-269, 2011.

GONZALEZ, REY. M.; BEBIANNO, M.J. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) Ibuprofen induces antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 361-371, 2012.

GONZALEZ, REY. M.; BEBIANNO, M.J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 148, p. 221-230, 2014.

GONZALEZ, REY. M.; TAPIE, N.; LE MENACH, K.; DÉVIER, M.H.; BUDZINSKI, H.; BEBIANNO, M.J. Occurrence of APIS and pesticides in aquatic systems. **Marine Pollution Bulletin**, v. 96, p. 384-400, 2015.

GONZALEZ, ALONSO. S.; MERINO, L.M.; ESTEBAN, S.; LOPEZ DE ALDA, M.; BARCELO, D.; DURAN, J.J.; LOPEZ-MARTINEZ, J.; ACENA, J.; PEREZ, S.; MASTROIANNI, N.; SILVA, A.; CATALA, M.; VALCARCEL, Y. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on

the northern Antarctic Peninsula region. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 241-254, 2017a.

GONZALEZ, ROMERO. R.V; SUAREZ, ULLOA, J; RODRIGUEZ, CASARIEGO D, GARCIASOUTO, G, DIAZ, A. Effect of Florida Red Tides on histone variant expression and DNA methylation in the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. **Aquatic Toxicology**, v. 186, p. 196-204, 2017b.

GROS, M.; RODRÍGUEZ, MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole - linear ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1248, p. 104-121, 2012.

GROS, M.; BLUMB, K.M.; JERNSTEDTA, H.; RENMAN, G.; RODRÍGUEZ, MOZAZ, S.; HAGLUND, P.; ANDERSSON, P.L.; WIBERG, K.; AHRENS, L. Screening and prioritization of micropollutants in wastewaters from on-site sewage treatment facilities. **Journal of Hazardous Materials**, v. 328, p. 37-45, 2017.

GUILOSKI, I. C.; PIANCINI, L. D. S.; DAGOSTIM, A. C.; CALADO, S. L. D. M.; FÁVARO, L. F.; BOSCHEN, S. L.; CESTARI, M. M.; CUNHA, C. D. E ASSIS, H. C. S. D. Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 291-300, 2017.

GUTPERLET, R.; CAPPERUCCI, R.M; BARTHOLOM, A; KRNCKE, A.I. Benthic biodiversity changes in response to dredging activities during the construction of a deep-water port. **Marine Biodiversity**, v. 10, n. 6, p. 1-21, 2015.

GURKE, R.; ROBLER, M.; MARX, C.; DIAMOND, S.; SCHUBERT, S.; OERTEL, R.; FAULER, J. Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant. **Science of the Total Environment**, v. 532, p. 762-770, 2015.

HITE, D. R. C.; AUH, C. E SCANDALIOS, J. G. Catalase activity and hydrogen peroxide levels are inversely correlated in maize scutella during seed germination. **Redox Report**, v. 4, p. 29-34, 1999.

HUERTA, FONTELA. M.; MARIA, T. GALCERAN.; VENTURA, F. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. **Water Research**, v. 45, p. 1432-1442, 2011.

INCE, N.H.; DIRILGEN, N.; APIKYAN, L. G.; TEZCANLI, G.; ÜSTÜN, B.; ARCH. Assessment of toxic interactions of heavy metals in binary mixtures: a statistical approach. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 36, p. 365-372, 1999.

ISLAS-FLORES, H.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; COLÍN-

CRUZ, A.; NERI-CRUZ, N. E GARCÍA-MEDINA, S. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p. 32-38, 2013.

JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M.; WILLIAMS, P. L. **Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications**; eds.; 2nd. John Wiley & Sons. Cap. 1, 2000.

KAILA, B.; HANSON, A.; DALE, J.; HOFF, B.; TYLOR, J.; LAHREN, B.; DAVID, R.; MOUNT, B.; ANTHONY, J.; SQUILLACE, C.; LAWRENCE, P. Burkhard b. Estimating n-octanol-water partition coefficients for neutral highly hydrophobic chemicals using measured n-butanol-water partition coefficients. **Chemosphere**, v. 218, p. 616-623, 2018.

KUMMERER, K. **Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks**. Editora: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Cap. 16, p. 257-276, 2008.

LAITANO, M.V.; NUNEZ, J.D.; CLEDON, M. Shell alterations in the limpet *Bostriaculus odites*: A bioindicator of harbour pollution and mine residuals. **Ecological Indicators**, v. 34, p. 345-351, 2013.

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

LAURENCE, L. BRUNTON.; RANDA HILAL.DANDAN.; BJORN C. KNOLLMANN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. Editora: McGraw-Hill, Artmed, RJ. 12ª edição, 2012.

LEE, H.B.; PEART, T.E.; SVOBODA, M.L. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 122-129, 2005.

LI, Y.; ZHU, G.; NQ, W.J.; TAN, S.K. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. **Science of Total Environment**, v. 468-469, p. 908-932, 2014.

LOLIC, A.; PAÍGA, P.; SANTOS, L.H.M.LM.; RAMOS, S.; CORREIA, M.; DELEURE, M.C. Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of North of Portugal: Occurrence and environmental risk. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 240-250, 2015.

MALACHIAS, M.; PÓVOA, R.; NOGUEIRA, A.; SOUZA, D.; COSTA, L.; MAGALHÃES, M. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 3 - Clinical and Complementary Assessment. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, 2016. doi/10.5935/abc.20160153.

MCENEFF, G.; BARRON, L.; KELLEHER, B.; PAULL, B.; QUINN, B. A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves. **Science of the Total Environment**, v. 476-477, p. 317-326, 2014.

MEZZELANI, M.; GORBI, S.; DA ROS, Z.; FATTORINI, D.; d'ERRICO, G.; MILAN, M.; BARGELONI, L.; REGOLI, F. Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) in marine organisms: bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galliprovincialis*. **Marine Environmental Research**, v. 121, p. 31-39, 2016a.

MEZZELANI, M.; GORBI, S.; REGOLI, F. Pharmaceuticals in the aquatic environment: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 140, p. 41-60, 2018.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, and Cell Culture Laboratory, Purdue Cancer Center, Purdue University, West Lafayette, IN 47907. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MEYER, W.; REICH, M.; BEIER, S.; BEHRENDT, J.; GULYAS, H.; OTTERPOHL, R. Medição e concentrações ambientais previstas de carbamazepina, diclofenaco e metoprolol em pequenos e médios rios no norte da Alemanha. **Environment Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 8, p. 16, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-016-5481-2>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n. 1555, de 27 de junho de 2007. **Institui o Comitê Nacional para a Promoção do Uso Racional de Medicamentos**, 2007.

MORENO, GONZÁLEZ, R.; RODRIGUEZ, MOZÁS, S.; GROS, M.; BARCELÓ, D.; LEÓN, V.M. Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (SE Spain). **Environment Research**, v. 138, p. 326-344, 2015.

NACCI, D.; JACKIM, E.; WALSH, R. Comparative evaluation of three rapid marine toxicity tests: sea urchin early embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity test and Microtox. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 521-525, 1986.

NEBOT, C.; GIBB, S.W.; BOYD, K.G. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, p. 87-94, 2007.

PANOUILLERES, M.; BOILLOT, C.; PERRODIN, Y. Study of the combined effects of a peracetic acid-based disinfectant and surfactants contained in hospital effluents on *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 327-340, 2007. [10.1007/s10646-007-0136-2](http://dx.doi.org/10.1007/s10646-007-0136-2). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment International**, v. 32, n. 2, p. 265-268, 2006.

PEAKE, B.M.; BRAUND, R.; TONG, A.Y.C.; TREMBLAY, L.A. **The Life-cycle of Pharmaceuticals in the Environment**. Woodhead Publishing Series in Biomedicine, v. 51, 2016.

PEREIRA, C.D.S.; MARANHO, L.A.; CORTEZ, F.S.; PUSCEDDU, F.H.; SANTOS, A.R.; RIBEIRO, D.A.; CESAR, A.; GUIMARÃES, L.L. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**, v. 548-549, p. 148-154, 2016.

POURAHMAD, J.; MORTADA, Y.; ESKANDARI, M. R.; SHAHRAKI, J. Involvement of Lysosomal Labilisation and Lysosomal/mitochondrial Cross-Talk in Diclofenac Induced Hepatotoxicity. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 4, p. 877-887, 2011.

RIBAS, J.L.C.; ZAMPRONIO, R. A.; ASSIS, H. C. S. Effects of trophic exposure to diclofenac and dexamethasone on hematological parameters and immune response in freshwater fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35 n. 4, p. 975-982, 2016.

RODRÍGUEZ, NAVAS, C.; BJORKLUND, E.; BAK, A.S.; HANSEN, M.; KROGH, K.A.; MAYA, F.; FORTEZA, R.; CERDÀ, V. Pollution pathways of pharmaceutical residues in the aquatic environment on the island of Mallorca, Spain. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, p. 56-66, 2013.

SALGOT, M.; HUERTAS, E.; WEBER, S.; DOTT, W.; HOLLENDER, J.; Wastewater reuse and risk: definition of key objectives. **Desalination**, v. 187, n. 1-3, p. 29-40, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.04.065>.

SANGION, A.; GRAMATICA, P. PBT assesment and prioritization of contaminants of emerging concern: pharmaceutical. **Environmental Research**, v.147, p. 297-306, 2016.

SANTOS, R.; FLAMMANG, P. Morphometry and mechanical design of tube foot stems in sea urchins: A comparative study. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 315, p. 211-223, 2005.

SANTOS, L. H.; ARAÚJO, A. N.; FACHINI, A.; PENA, A.; MATOS, DELERUE. C.; MONTENEGRO, M. C. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 45-95, 2010.

SANTOS, L.H.M.L.M.; GROS, M.; RODRIGUEZ, MOZAZ, S.; DELERUE-MATOS, C.; PENA, A.; BARCELÓ, D.; MONTENEGRO, M.C.B.S.M. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters:

identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v. 461-462, p. 302-316, 2013.

SCHMITT-JANSEN, M.; BARTELS, P.; ADLER, N. E. ALTENBURGER, R. Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 1389-1396, 2007.

SCHMIDT, W.; OROURKE, K.; HERNAN, R.; QUINN, B. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 1389-1395, 2011.

SCHMIDT, W.; RAINVILLE, L.C.; MC ENEFF, G.; SHEEHAN, D.; QUINN, B. A proteomic evaluation of the effects of the pharmaceuticals diclofenac and gemfibrozil on marine mussels (*mytilus* spp.): evidence for chronic sublethal effects on stress-response proteins. **Drug testing and Analysis**, v. 6, n. 3, p. 210-219, 2013.

SCHWARZ, S.; SHMIEG, H.; SCHEURER, M.; KOHLER, H.R.; TRIEBSKORN, R. Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta* f.fario. **Science of the Total Environment**, v. 607-608, p. 1026-1036. 2017.

SCIANI, J. M.; ZYCHAR, B.C.; GONÇALVES, L. R. C.; NOGUEIRA, T. O.; GIORGI, R.; PIMENTA, D.C. Pro-inflammatory effects of the aqueous extract of *Echinometra lucunter* sea urchin spines. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, p. 277-280, 2011.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. **Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes**. Química Nova, Campinas, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000400020>.

SILVA, C. M. L.; LIMA, B. S.; CRUZ, E. S.; MATOS, I. G.; ANDRADE, V.M.; CARVALHO, Y. M. B. G.; LIMA, C. M.; SERAFINI, M. R. Evaluation of the quality of losartan potassium capsules manipulated in Lagarto. **Scientia Plena**, v. 14, n. 07, 2018.

SNYDER, M. J. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 529-547, 2000.

SOUZA, S.M.L.; VASCONCELOS, E.C.; DZIEDZIC, M.; OLIVEIRA, C.M.R. Environmental risk assessment of antibiotics: an intensive care unit analysis. **Chemosphere**, v. 77, n. 7, p. 962-967, 2009.

SOUZA, B.P.; **Avaliação da remoção de sulfametoxazol, diclofenaco e 17β-estradiol em água por meio de processo oxidativo com cloro**. Ilha Solteira: [s.n]. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento. Recursos Hídricos e tecnologias ambientais, 2014.

SPURGEON, D.J.; OLIVER, A.H.J.; JEAN-LOU, C.M.; CLAUS SVENDSEN.; SURESH S.F.; STEPHEN R. S. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. **Science of the Total Environment**, v.408, p.3725-37341, 2010.

SUAREZ-ULLOA. V.; GONZALEZ-ROMERO, R.; EIRIN-LOPEZ, J.M. Environmental epigenetics: A promising venue for developing next generation pollution biomonitoring tools in marine invertebrates. **Marine Pollution Bulletin**, v. 98, p. 5-13, 2015.

TANAKA, M.O.; DUQUEE, STRADA, T.E.M.; MAGALHAES, C.A. Dynamics of the Acmaeid Limpet *Collisella subrugosa* and vertical distribution of size and abundance along a wave exposure gradient. **Journal of Molluscan Studies**, v. 68, p. 55-64, 2002. <https://doi.org/10.1093/mollus/68.1.55>.

TAVARES, Y.A.G. **Biologia reprodutiva dos equinóides *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) e *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758), na ilha da Galheta, litoral paranaense, Brasil**. 190f. Tese de doutorado em Zoologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

TERNES T.; BONERZ M.; HERRMANN N.; TEISER B.; ANDERSEN HR. Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: an option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. **Chemosphere**, v. 66, p. 894-904, 2007.

THOMAS, K.V.; HILTON, M.J. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 436-444, 2004.

TOGOLA, A.; BUDZINSKI, H. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, p. 150-158, 2008.

TRIEBSKORN, R.; CASPER, H.; HEYD, A.; EIKEMPER, R.; KOHLER, H.R.; E SCHWAIGER, J. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug Diclofenac. Part II: cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 151-166, 2004.

VALLES, P.G.; MANUCHA, W.A. H<sup>+</sup>-ATPase activity on unilateral ureteral obstruction: interaction of endogenous nitric oxide and angiotensin II. **Kidney International**, v. 58, p. 1641-1651, 2000.

VAN, DER. Aa. N.G.F.M.; KOMMER, G. J.; VAN MONTFOORT. E. J.; VERSTEEGH, J.F.M. Demographic projections of future pharmaceutical consumption in the Netherlands. **Water Science and Technology**, v. 63, p. 825-31, 2011.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. **"Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp."** Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo, p. 111-122, 2002

VELO, G.; MORETTI, U. Ecopharmacovigilance for better health. **Drug Safety**, v. 33, p. 963-968, 2010.

VIENO, N.; SILLANPAA, M. Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant-A review. **Environment International**, v. 69, p. 28-39, 2014.

XIE, Z.; LU, G.; YAN, Z.; LIU, J.; WANG, P.; WANG, Y. Bioaccumulation and trophic transfer of pharmaceuticals in food webs from a large freshwater lake. **Environmental Pollution**, v. 222, p. 356-366, 2017.

YAMAMOTO, NATHÁLIA.S. **Avaliação ecotoxicológica dos fármacos antihipertensivos losartan e valsartan em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)**. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ecossistemas Costeiros e Marinheiros) - Universidade Santa Cecília, Santos, 2014.

YANG, Y.; YON, S.O.; KIM, K.H.; KWON, E.E.; TSANG, Y.F. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/ sewage treatment plants: a review. **Science of the Total Environment**, v. 596-597, p. 303-320, 2017.

WILLIAMS, TD.; MIRBAHAI, L.; CHIPMAN, J.K. The toxicological application of transcriptomics and epigenomics in zebrafish and other teleosts. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 2, p. 157-171, 2014.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, S.P. Rima, cap. 1, p. 13-36, 2º ed., 2008.

ZENKER, A.; CICERO, M.R.; PRESTINACI, F.; BOTTONI, P.; CARERE, M. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. **Journal of Environment Management**, v. 133, p. 378-387, 2014.

ZHANG, R.; ZHANG, R.; LI, J.; CHENG, Z.; LUO, C.; WANG, Y.; YU, K.; ZHANG, G. Occurrence and distribution of antibiotics in multiple environmental media of the East River (Dongjiang) catchment, South China. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 24, n. 10, p. 9690-9701, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8664-7>.

ZIYLAN, A.; INCE, NH. The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: treatability by conventional and non-conventional processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 24-37, 2011.

ZOUMPOULAKIS, P.; DALIANI, I.; ZERVOU, M.; KYRIKOU, I.; SIAP, E.; LAMPRINIDIS, G.; MIKROS, E.; MAVROMOUSTAKOS, T. Losartan's molecular basis of interaction with membranes and AT1 receptor. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 125, p. 13-25, 2003.

Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center. **Larvi 2001**. Disponível em: <<https://aquaculture.ugent.be/x-files/larvi01/img/artemia.jpg>>. Acesso em 25 abril 2021.

## ANEXO

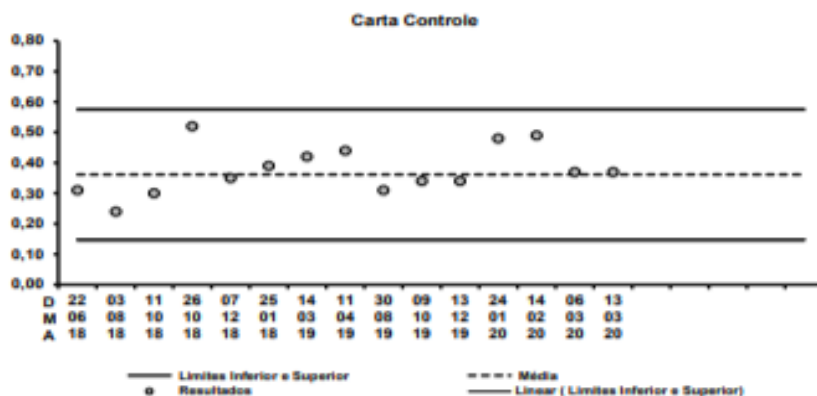
Carta controle de sensibilidade do organismo-teste: *Echinometra lucunter*.

|                                                                                   |                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|  | <b>UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA - UNISANTA</b>                |
|                                                                                   | <b>INSTITUTO SUPERIOR DE EDUCAÇÃO SANTA CECÍLIA - ISESC</b> |
|                                                                                   | Departamento de Ecotoxicologia                              |
| <b>CARTA CONTROLE DE SENSIBILIDADE DE ORGANISMOS -TESTE</b>                       |                                                             |

Organismo – teste: *Echinometra lucunter*  
 Método empregado: ABNT NBR 15350  
 Substância de referência: Sulfato de Zinco  
 Data de atualização: 13/03/2020

| Dados dos testes de sensibilidade utilizados no cálculo da carta controle |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|---------------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                                                                           | Teste 1    | Teste 2    | Teste 3    | Teste 4    | Teste 5    | Teste 6    | Teste 7    | Teste 8    | Teste 9    | Teste 10   |
| DATA                                                                      | 16/06/2016 | 02/07/2016 | 05/08/2016 | 23/08/2016 | 11/11/2016 | 26/11/2016 | 15/12/2016 | 02/02/2017 | 14/03/2017 | 31/03/2017 |
| Resultado                                                                 | 0,59       | 0,29       | 0,59       | 0,36       | 0,39       | 0,27       | 0,52       | 0,26       | 0,28       | 0,33       |
|                                                                           | Teste 11   | Teste 12   | Teste 13   | Teste 14   | Teste 15   | Teste 16   | Teste 17   | Teste 18   | Teste 19   | Teste 20   |
| DATA                                                                      | 12/05/2017 | 02/06/2017 | 15/06/2017 | 30/06/2017 | 25/08/2017 | 29/09/2017 | 08/11/2017 | 01/02/2018 | 23/03/2018 | 15/05/2018 |
| Resultado                                                                 | 0,31       | 0,25       | 0,39       | 0,51       | 0,27       | 0,55       | 0,32       | 0,28       | 0,38       | 0,43       |

| Dados estatísticos obtidos na carta controle |               |                 |                 |                             |
|----------------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------------------|
| MÉDIA mg/L                                   | DESVIO PADRÃO | LIMITE INFERIOR | LIMITE SUPERIOR | COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%) |
| <b>0,36</b>                                  | <b>0,11</b>   | <b>0,15</b>     | <b>0,58</b>     | <b>30</b>                   |



ANÁLISE CRÍTICA:

  
 Eng. Aldo Ramos Santos  
 Coordenador do DET / ISESC

  
 Fernando Sanzi Cortez  
 Biólogo Responsável

LET PL027-REV01-OUT/11