

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

BARBARA FARIA LOURENÇO

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA COMPARATIVA ENTRE PLANTAS
MEDICINAIS, SEUS MARCADORES DE REFERÊNCIA E PRINCÍPIOS
ATIVOS SINTÉTICOS UTILIZADOS EM TRATAMENTOS TERAPÊUTICOS

SANTOS/ SP

2018

BARBARA FARIA LOURENÇO

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA COMPARATIVA ENTRE PLANTAS
MEDICINAIS, SEUS MARCADORES DE REFERÊNCIA E PRINCÍPIOS
ATIVOS SINTÉTICOS UTILIZADOS EM TRATAMENTOS TERAPÊUTICOS**

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 orientação da Prof. Dra. Luciana Lopes Guimarães e do Prof. Dr. Walber Toma.

SANTOS/SP

2018

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

Lourenço, Barbara Faria.
AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA COMPARATIVA ENTRE PLANTAS MEDICINAIS,
SEUS MARCADORES DE REFERÊNCIA E PRINCÍPIOS ATIVOS SINTÉTICOS
UTILIZADOS EM TRATAMENTOS TERAPÊUTICOS/ Barbara Faria Lourenço.
-- 2018.
n. de f. 132

Orientador: Dra. Luciana Lopes Guimarães.
Coorientador: Dr. Walber Toma.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Santa Cecília,
Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas
Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2018.

1. Descarte incorreto. 2. RENAME. 3. Ensaio de toxicidade. 4.
Diretiva 93/67/CEE. 5. Evitar impactos.
I. Guimarães, Luciana Lopes. II. Toma. Walber.
III. AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA COMPARATIVA ENTRE PLANTAS
MEDICINAIS, SEUS MARCADORES DE REFERÊNCIA E PRINCÍPIOS
ATIVOS SINTÉTICOS UTILIZADOS EM TRATAMENTOS TERAPÊUTICOS

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

Dedico este trabalho a minha mãe Leila, aos meus avós Nilce e Paulo e a minha bisavó Maria de Lourdes, in memoriam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me capacitar à realização desse estudo. A minha família, que se manteve ao meu lado, me dando suporte e me incentivando, principalmente a minha mãe, que depositou muita confiança em mim.

A Fundação Capes, pela bolsa de estudo, capaz de estimular a carreira científica. A Universidade Santa Cecília, por ceder o espaço para realização das pesquisas e algumas substâncias utilizadas no estudo.

Agradeço, em especial, minha orientadora professora Dra. Luciana Lopes Guimarães, pela oportunidade que me foi dada, por toda confiança e apoio no decorrer do estudo. Ao professor Dr. Walber Toma, pela orientação, compreensão e, também, pela ajuda na obtenção das substâncias do estudo.

Não posso esquecer-me de agradecer a todos do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, que foram essenciais para a realização do estudo, principalmente ao professor Dr. Aldo Ramos Santos, ao professor Dr. Fábio Hermes Pusceddu, ao professor Fernando Sanzi Cortez e, assim como toda a equipe de monitores e estagiários, que contribuíram através de seus conhecimentos técnicos. Em especial, ao amigo Jonas, monitor do Laboratório de Ecotoxicologia, que além de me ajudar na parte técnica, me aconselhou muito durante o estudo.

A Mariana, técnica do Laboratório Químico da Universidade Santa Cecília, e a responsável pelo laboratório Kátia, que auxiliaram no estudo. Aos professores e amigos, do programa de Mestrado em Ecologia, da Universidade Santa Cecília, que participaram da minha formação.

RESUMO

Diversos estudos têm apresentado concentrações significativas de compostos sintéticos, medicamentos e metabólitos em ecossistemas aquáticos. A partir do descarte incorreto, essas substâncias podem agredir o ambiente e trazer malefícios à biota local. Atualmente, alguns medicamentos fitoterápicos foram inseridos na RENAME, a fim de atender às necessidades de saúde da população brasileira, porém não existem estudos que comprovem se essas substâncias causam impactos ao ambiente. Diante do contexto, esse trabalho avaliou os efeitos biológicos adversos letais, subletais e no desenvolvimento de organismos aquáticos, frente a concentrações distintas de vegetais encontrados na RENAME, seus marcadores de referências e princípios ativos sintéticos com as mesmas indicações terapêuticas, por meio de ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter*. Como resultado para os ensaios com *D. similis* foram encontrados dois vegetais, cinco marcadores de referência e cinco princípios ativos sintéticos classificados como nocivos, dois marcadores classificados como tóxicos e um marcador e um sintético classificados como muito tóxicos ao ambiente. Para os ensaios com *E. lucunter*, três vegetais e oito sintéticos foram classificados como nocivos, três vegetais e seis marcadores como tóxicos e um vegetal e um marcador considerados muito tóxicos ao ambiente, de acordo com a Diretiva 93/67/CEE. Com isso, vale ressaltar que frente aos ensaios realizados, as substâncias estudadas apresentaram concentrações de efeitos significativos, com maior toxicidade para os marcadores de referência e para os princípios ativos sintéticos. A partir desses resultados, torna-se importante ressaltar a necessidade de uma atenção especial a fim de alterar a forma do descarte ou garantir um processo de tratamento específico para essas substâncias que apresentaram toxicidade, buscando atender a legislação vigente e evitando impactos aos organismos dos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: Descarte incorreto. RENAME. Ensaio de toxicidade. Diretiva 93/67/CEE. Evitar impactos.

ABSTRACT

Several studies have shown significant concentrations of synthetic compounds, drugs and metabolites in aquatic ecosystems. From the incorrect disposal, these substances can attack the environment and bring harm to the local biota. Many studies have presented significant concentrations of medications. Currently, some herbal medicines have been inserted in RENAME in order to meet the health needs of the Brazilian population, but there are no studies to prove that these substances have an impact on the environment. In view of the context, this work evaluated the adverse biological effects lethal, sublethal and in the development of aquatic organisms, against distinct concentrations plants found in RENAME, their reference markers and synthetic active principles with the same therapeutic indications, through toxicity tests with *Daphnia similis* and *Echinometra lucunter*. As a result, two plants, five reference markers and five synthetic active principles classified as noxious, two markers classified as toxic and one marker and a synthetic were classified as very toxic to the environment for the *D. similis* trials. For the trials with *E. lucunter* three plants and eight synthetic were classified as harmful, three plants and six markers as toxic and one plant and a marker considered very toxic to the environment, according to Directive 93/67/CEE. Therefore, it is worth mentioning that in the tests carried out, the studied substances showed concentrations of significant effects with greater toxicity for the reference markers and for the synthetic active principles. From the results, it is important to emphasize the need for special attention in order to change a way to discard or guarantee a specific treatment process for those substances which have shown toxicity, seeking to comply with current legislation and avoiding impacts to organisms of aquatic ecosystems.

Keywords: Incorrect disposal. RENAME. Toxicity tests. Directive 93/67/EEC. Avoid impacts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Conceito de ecotoxicologia.....	30
FIGURA 2- Esquema apresentado com as diferenças entre os ensaios de toxicidade aguda e crônica.....	34
FIGURA 3- Exemplos de possíveis rotas dos fármacos até alcançarem ecossistemas aquáticos.....	36
FIGURA 4- Exemplar de <i>Daphnia similis</i> , organismo utilizado para testes de toxicidade.....	43
FIGURA 5- Cultivo de <i>Daphnias similis</i> em câmara de germinação.....	43
FIGURA 6- Exemplar de <i>Echinometra lucunter</i> , organismo utilizado para testes de toxicidade.....	44
FIGURA 7- Tanque de armazenamento dos organismos até a realização dos testes	45
FIGURA 8- Material utilizado nos ensaios.....	53
FIGURA 9- Leitura do ensaio de toxicidade aguda com <i>D. similis</i>	54
FIGURA 10- Identificação dos gêneros de <i>E. lucunter</i> , de acordo com a coloração de seus gametas.....	54
FIGURA 11- Estímulos elétricos sendo aplicados ao <i>E. lucunter</i> para liberação de gametas.....	55
FIGURA 12- Liberação de gametas femininos de <i>E. lucunter</i>	55
FIGURA 13- Gametas masculinos que foram transferidos em um béquer e resfriado por gelo, que permaneceram até o momento da fecundação.....	56
FIGURA 14- Zigoto obtido pela união de gametas de <i>E. lucunter</i> , envolto pela membrana de fecundação, que está apontada pela seta.....	56
FIGURA 15- Pluteus, larvas de <i>E. lucunter</i>	57
FIGURA 16- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Ácido Clorogênico.....	60
FIGURA 17- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Ácido Ursodesoxicólico.....	60
FIGURA 18- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Alcachofra.....	61
FIGURA 19- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Ácido Clorogênico.....	62

FIGURA 20- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Ácido Ursodesoxicólico.....	62
FIGURA 21- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Cascara Sagrada.....	63
FIGURA 22- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Dihidroxiantraquinona.....	64
FIGURA 23- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Sulfato de Magnésio.....	64
FIGURA 24- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Cascara Sagrada.....	65
FIGURA 25- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Dihidroxiantraquinona.....	66
FIGURA 26- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Sulfato de Magnésio.....	66
FIGURA 27- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Epicatequina.....	67
FIGURA 28- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Omeprazol.....	68
FIGURA 29- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Espinheira Santa.....	69
FIGURA 30- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Epicatequina.....	69
FIGURA 31- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Omeprazol.....	70
FIGURA 32- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Hortelã.....	71
FIGURA 33- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Mentol.....	71
FIGURA 34- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Prednisona.....	72
FIGURA 35- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Hortelã.....	73

FIGURA 36- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Mentol.....	73
FIGURA 37- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Prednisona.....	74
FIGURA 38- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Garra- do- diabo.....	75
FIGURA 39- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Harpagosídeo.....	76
FIGURA 40- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Garra- do- diabo.....	77
FIGURA 41- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Harpagosídeo.....	77
FIGURA 42- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Salicina.....	79
FIGURA 43- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Ácido Acetilsalicílico.....	79
FIGURA 44- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Salgueiro.....	80
FIGURA 45- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Salicina.....	81
FIGURA 46- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações do Ácido Acetilsalicílico.....	81
FIGURA 47- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Unha de gato.....	82
FIGURA 48- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações da Unha de gato.....	83
FIGURA 49- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Cumarina.....	85
FIGURA 50- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Acetilcisteína.....	85
FIGURA 51- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações do Guaco.....	86
FIGURA 52- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à	

exposição de diferentes concentrações da Cumarina.....	87
FIGURA 53- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações da Acetilcisteína.....	87
FIGURA 54- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Isoflavona de Soja.....	88
FIGURA 55- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Genisteína.....	89
FIGURA 56- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Daidzeína.....	89
FIGURA 57- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Valerato de Estradiol.....	90
FIGURA 58- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Isoflavona de Soja.....	91
FIGURA 59- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Genisteína.....	91
FIGURA 60- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações da Daidzeína.....	92
FIGURA 61- Resultado do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> frente à exposição de diferentes concentrações de Valerato de Estradiol.....	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do SUS (RENAME SUS).....	24
TABELA 2. Normas criadas pela CETESB e ABNT, que padronizam os ensaios de toxicidade em organismos aquáticos.....	31
TABELA 3. Determinação de toxicidade para efeitos de substâncias lançadas no ambiente aquático.....	39
TABELA 4. Vegetais, marcadores de referência e princípios ativos sintéticos utilizados para a realização dos ensaios ecotoxicológicos.....	46
TABELA 5. Organismos utilizados nos testes de sensibilidade, as substâncias utilizadas como referência e os respectivos End-points.....	48
TABELA 6. Forma de preparo, solubilidade e proporção soluto/solvente das substâncias utilizadas para os ensaios com <i>D. similis</i>	49
TABELA 7. Forma de preparo, solubilidade e proporção soluto/solvente das substâncias utilizadas para os ensaios com <i>E. lucunter</i>	50
TABELA 8. Condições exigidas pela ABNT (2016), para realização dos ensaios.....	51
TABELA 9. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>D. similis</i> referente ao grupo da Alcachofra.....	61
TABELA 10. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>E. lucunter</i> referente ao grupo da Alcachofra.....	63
TABELA 11. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>D. similis</i> referente ao grupo da Cascara Sagrada.....	65
TABELA 12. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>E. lucunter</i> referente ao grupo da Cascara Sagrada.....	67
TABELA 13. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>D. similis</i> referente ao grupo da Espinheira Santa.....	68
TABELA 14. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>E. lucunter</i> referente ao grupo da Espinheira Santa.....	70
TABELA 15. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>D. similis</i> referente ao grupo da Hortelã.....	72
TABELA 16. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>E. lucunter</i> referente ao grupo da Hortelã.....	74
TABELA 17. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>D. similis</i> referente ao	

grupo Garra- do- Diabo.....	76
TABELA 18. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>E. lucunter</i> referente ao grupo da Garra- do- Diabo.....	78
TABELA 19. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>D. similis</i> referente ao grupo da Salgueiro.....	80
TABELA 20. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>E. lucunter</i> referente ao grupo do Salgueiro.....	82
TABELA 21. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>D. similis</i> referente ao grupo do Unha de gato.....	83
TABELA 22. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>E. lucunter</i> referente ao grupo da Unha de gato.....	84
TABELA 23. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>D. similis</i> referente ao grupo do Guaco.....	86
TABELA 24. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>E. lucunter</i> referente ao grupo do Guaco.....	88
TABELA 25. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>D. similis</i> referente ao grupo Isoflavona de soja.....	90
TABELA 26. Resultados dos ensaios de toxicidade com <i>E. lucunter</i> referente ao grupo Isoflavona de soja.....	93
TABELA 27. Comparativo entre os resultados obtidos nos ensaios com <i>D. similis</i> , com os órgãos vegetativos, marcadores de referência e princípios ativos sintéticos analisados.....	94
TABELA 28. Comparativo entre os resultados obtidos nos ensaios com <i>E. lucunter</i> , com os órgãos vegetativos, marcadores de referência e princípios ativos sintéticos analisados.....	97
TABELA 29. Tabela com os valores estimados do processo de biodegradação dos marcadores de referências e dos princípios ativos sintéticos.....	100
TABELA 30- Valores de log K _{OW} e log BCF dos marcadores de referência utilizados nos ensaios de toxicidade.....	102
TABELA 31- Valores de Log K _{OW} e log BCF dos princípios ativos sintéticos utilizados nos ensaios de toxicidade.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAF- Fator de Bioacumulação

CE₅₀- Concentração Mediana Efetiva que causa imobilidade em 50% dos organismos expostos

CEO- Concentração de Efeito Observado

CENO- Concentração de Efeito Não Observado

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

CI₅₀- Concentração de Inibição de 50% dos organismos expostos

CL₅₀- Concentração Mediana Letal a 50% dos organismos expostos

CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente

CV- Coeficiente de Variação

DMSO- Dimetilsufóxido

DP- Desvio Padrão

ETE Estação de Tratamento de Esgoto

FPHCP- Fármacos, produtos de higiene e cuidados pessoais

ICP- The Inhibition Concentration

ICSU- Committee of the International Council of Scientific Unions

ISO- International Organization for Standardization

KOW- Coeficiente de Partição (octanol/ água)

Log- Logarítimo

LTM- Limite de Tolerância Médio

mg/L- Miligrama por litro

ng/L- nanogramas por litro

OD- Oxigênio Dissolvido

OMS- Organização Mundial da Saúde

pH- Potencial Hidrogeniônico

PhACs- *Pharmaceutically Active Compounds*

PPB- Partes por Bilhão

PPCPs- Pharmaceuticals and Personal Care Products

PPT- Partes por Trilhão

RENAME- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RENAME SUS- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do SUS

RENISUS- Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

SUS- Sistema Único de Saúde

USEPA- United States Environmental Protection Agency

µl- Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1 Uso dos recursos naturais de forma sustentável.....	21
2.2 Uso de medicamentos fitoterápicos.....	21
2.3 Fitoterápicos inseridos na RENAME.....	23
2.4 Indicação terapêutica dos fitoterápicos inseridos na RENAME e dos compostos sintéticos equivalentes.....	25
2.5 Poluição aquática.....	28
2.6 Ecotoxicologia aquática.....	29
2.7 Ensaios de toxicidade.....	32
2.8 Escolha do organismo- teste.....	34
2.9 Fármacos e produtos de higiene pessoal no ambiente.....	35
2.10 Fatores que influenciam a toxicidade no meio ambiente.....	37
2.11 Legislação vigente.....	38
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo Geral.....	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
4. METODOLOGIA.....	42
4.1 Organismos-teste.....	42
4.1.1 <i>Daphnia similis</i>	42
4.1.2 <i>Echinometra lucunter</i>	43
4.2 Manutenção dos organismos.....	45
4.2.1 Manutenção de <i>D. similis</i>	45
4.2.2 Manutenção de <i>E. lucunter</i>	45
4.3 Substâncias- teste.	45
4.4 Preparação da água de diluição.....	47
4.4.1 Água para ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i>	47
4.2 Água para ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i>	47
4.5 Teste de Sensibilidade	47
4.6 Parâmetros físico-químicos.....	48
4.7 Controle dos ensaios.....	48
4.8 Preparação da solução estoque.....	49

4.9 Condições para a realização dos ensaios ecotoxicológicos.....	51
4.10 Realização dos ensaios.....	52
4.10.1 Ensaio preliminar.....	52
4.10.2 Ensaio definitivo.....	52
4.11 Métodos de ensaio de toxicidade.....	53
4.11.1 Ensaio de toxicidade com <i>D. similis</i> (Mortalidade ou Imobilidade das neonatas).....	53
4.11.2 Ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i> (Desenvolvimento embriolarval).....	54
4.12 Avaliação dos resultados.....	57
5. RESULTADOS.....	59
5.1 Avaliação da toxicidade dos compostos utilizados para o tratamento de disfunções no sistema digestivo.....	59
5.1.1 Ensaos com os compostos do Grupo 1- Alcachofra.....	59
5.1.2 Ensaos com os compostos do Grupo 2- Cascara sagrada.....	63
5.1.3 Ensaos com os compostos do Grupo 3- Espinheira santa.....	67
5.1.4 Ensaos com os compostos do Grupo 6- Hortelã.....	71
5.2 Avaliação da toxicidade dos compostos utilizados como antiinflamatórios.....	75
5.2.1 Ensaos com os compostos do Grupo 4- Garra- do- diabo.....	75
5.2.2 Ensaos com os compostos do Grupo 8- Salgueiro.....	78
5.2.3 Ensaos com os compostos do Grupo 9- Unha de gato.....	82
5.3 Avaliação da toxicidade dos compostos utilizados para tratamentos diversos	84
5.3.1 Ensaos com os compostos do Grupo 5- Guaco.....	84
5.3.2 Ensaos com os compostos do Grupo 7- Isoflavona de soja.....	88
6. DISCUSSÃO.....	94
7. CONCLUSÃO.....	105
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
9. VERSÃO COMPACTA.....	108
REFERÊNCIAS.....	113

GLOSSÁRIO.....	124
APÊNDICES.....	126
Apêndice A- Resultados Físico-Químicos dos ensaios de toxicidade com <i>D. similis</i>	126
Apêndice B- Resultado Físico- Químico do ensaio de toxicidade com <i>E. lucunter</i>	128
ANEXOS.....	130
Anexo A- Carta controle- <i>D. similis</i>	130
Anexo B- Carta controle- <i>E. lucunter</i>	131
Anexo C- Relatório para uso em laboratório.....	132

1. INTRODUÇÃO

A existência do ser humano baseia-se na utilização de recursos naturais, que são passados ao longo de gerações. Porém o homem tem explorado a natureza de forma frenética o que pode trazer aspectos negativos, gerando alterações no meio natural. Com isso, torna-se importante desempenhar um papel fundamental na proteção da natureza e na manutenção da diversidade biológica, buscando desenvolver técnicas sustentáveis de melhor aproveitamento dos recursos naturais (SNUC, 2000).

Esse assunto tem sido muito discutido devido às alterações que estão ocorrendo nos ecossistemas e os impactos sofridos pela biodiversidade através da ação antrópica, que têm atingido dimensões catastróficas, o que pode ser observada através de alterações na qualidade do solo, ar e água.

A poluição, a partir da liberação de efluentes na água, tem sido uma das principais causas dos impactos ao meio ambiente, pois agredem e desequilibram os ecossistemas aquáticos. Vale ressaltar que esses efluentes liberados podem ter substâncias com teor tóxico que não passaram por um tratamento adequado e que se acumulam no ambiente (PEREIRA *et al.*, 2016).

Uma das preocupações recentes tem sido a contaminação aquática a partir da liberação de medicamentos, produtos de higiene e cuidados pessoais, que vêm sendo utilizados pelos seres humanos, na medicina veterinária e práticas agrícolas (HEBERER, 2002; QUINTANA *et al.*, 2007). Ao liberar essas substâncias sem tratamento específico nos corpos de água, pode incidir impactos na fauna e flora dos ecossistemas, o que resulta em prejuízos ecológicos e econômicos.

Os medicamentos têm funções importantíssimas para a sociedade, como auxiliar no combate das enfermidades ou até proporcionar cada vez mais o prolongamento da longevidade humana. Porém, muitos desses produtos são descartados junto ao lixo doméstico, esgoto comum ou seus metabólitos podem ser excretados pelas fezes e urina, sem sofrer alterações, que acabam alcançando os corpos d'água e podem persistir no ambiente (UEDA *et al.*, 2009).

No Brasil, o Ministério do Meio Ambiente normatiza o correto descarte de substâncias químicas, com objetivo de educar e inspecionar empresas, indústrias ou outros estabelecimentos que exerçam atividades relacionadas à produção, comércio, manipulação ou uso das substâncias farmacológicas, para garantir que o descarte

dos resíduos gerados esteja dentro dos regulamentos estabelecidos pela Legislação Ambiental. Porém, o descarte efetuado pelo consumidor final é o que apresenta maior lacuna na legislação (BILA & DEZOTTI, 2003).

Diante desse contexto, no presente estudo foi avaliada a toxicidade de órgãos vegetativos que compõem medicamentos fitoterápicos de uso comum, inseridos na RENAME, seus marcadores de referência e princípios ativos utilizados em medicamentos sintéticos que possuem indicações terapêuticas equivalentes, em organismos representantes de ecossistemas dulcícolas e marinhos. Os ensaios de toxicidade com essas substâncias possibilitam considerar o impacto da liberação de medicamentos fitoterápicos e sintéticos, classificando os mais tóxicos ou não tóxicos sobre os organismos aquáticos, a fim de incitar um destino final apropriado aos medicamentos fitoterápicos da RENAME, caso essas substâncias apresentarem toxicidade e estabelecer limites para descarte dessas substâncias em ambientes aquáticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 USO DOS RECURSOS NATURAIS DE FORMA SUSTENTÁVEL

Há muitos anos, o homem tem utilizado recursos fornecidos pela natureza, uma prática comum em diversas comunidades que buscam vegetais, animais e matérias inorgânicas para o consumo, porém, nem sempre é positivo para o meio, o que permite acarretar desequilíbrio ao ecossistema explorado, inclusive levar a extinção de espécies, poluição local e esgotamento de recursos naturais (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Para evitar o processo de degradação do ambiente, estudos desses ecossistemas e novos hábitos foram essenciais, com intuito de encontrar um meio para obtenção de recursos de forma sustentável, com a finalidade de diminuir esses impactos e gerar melhorias ao ambiente e os seres vivos que ali habitam (CALLISTO *et al.*, 2005).

A exploração de recursos naturais tem ocorrido não somente no ambiente terrestre, mas também no ambiente aquático, local altamente complexo e rico em biodiversidade, que pode ser composto por vários tipos de ecossistemas, dentre eles rios, lagos, estuários, mares e oceanos, todos os produtos de interações complexas entre os componentes bióticos e abióticos característicos de cada um deles (COSTA & OLIVI, 2008).

É importante ressaltar que discussões sobre uso de recursos naturais de forma sustentável têm mostrado preocupação na utilização de produtos da natureza e, o intuito é colocar um limite para o progresso material e para o consumo, o qual tem visto como limitado e traz grandes preocupações nos dias atuais. Para o autor Cavalcanti (2003), sustentabilidade “significa a possibilidade de se obter continuamente condições iguais ou superiores de vida para um grupo de pessoas e seus sucessores em dado ecossistema”.

2.2 USO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Pensando no uso de recursos naturais, o homem vem buscando o uso dos vegetais como forma de tratamento ou prevenção de doenças, sendo utilizados desde os hominídeos, a partir de conhecimentos empíricos.

As primeiras descobertas foram feitas por estudos arqueológicos em ruínas do Irã. Na China, há muitos anos atrás já existiam farmacopeias que compilavam as

ervas e as suas indicações terapêuticas (COCCO & REZENDE, 2002), com o tempo os vegetais passaram a ser cultivados, de forma racional, em hospitais e conventos, onde utilizavam os mesmos para com os pacientes em virtude curativa (RUDDER, 2002), sendo assim transferidos de geração em geração mantendo-se em nossa medicina primitiva até a medicina atual.

Os vegetais eram utilizados da maneira como encontrados no meio ambiente, passando depois, a serem concentrados apenas alguns órgãos com intuito de melhorar a intensidade e uniformidade de suas ações, com diferentes indicações terapêuticas. À medida que os avanços da química surgiram, as substâncias ativas foram identificadas, isoladas e usadas como moléculas sinteticamente elaboradas, com atividade terapêutica ainda maior (AURICCHIO & BACCHI, 2003).

Como sobrevivência os vegetais extraem elementos necessários do solo e, são encaminhados às folhas onde, sob a ação do sol, ocorrem reações químicas nas células, que transformam esses reagentes retirados do solo em açúcar e outros derivados. Conforme o tipo do solo, espécie do vegetal e o clima da região, resultam elementos diferenciados, como sais minerais, tanino, mucilagem, vitaminas, substâncias amargas, gorduras, essências e produtos medicamentosos (ARNOUS *et al.*, 2005). É importante advertir a existência de vegetais que podem ser tóxicos a saúde dos animais, como a beladona, a arnica ou a dedaleira, cuja ação é forte demais (RUDDER, 2002).

A fitoterapia é o termo utilizado para compreender o estudo e o uso de princípios ativos vegetais, como uma fonte alternativa de medicamento, utilizando diversos órgãos, como raízes, cascas, folhas, frutos e sementes, de acordo com a espécie em questão. Há também diferentes formas de preparação, como chás, extratos vegetais, pomadas, tinturas, infusão e cápsulas, sendo a infusão e o chá as formas mais utilizadas. No primeiro processo o vegetal a ser utilizado é fervido junto à água, já no segundo a água é fervida sozinha e depois colocada sobre o vegetal, quando são liberados os seus princípios terapêuticos (AZEVEDO, 2008). Já, alguns grupos farmacêuticos passaram a desenvolver esforços voltados para o aprimoramento de medicamentos fitoterápicos e sua produção em escala industrial.

Os medicamentos sintéticos surgiram no século XX, onde possuíam as mesmas características dos fitoterápicos, porém sua formulação é à base de substâncias químicas, tornando mais fácil de obter e menos dispendiosas. Contudo,

o uso dos medicamentos a base de vegetais, vem sendo explorado como uma fonte alternativa, com intuito de prevenção de doenças a partir de um custo reduzido, principalmente em países em desenvolvimento. Já no caso de doenças crônicas ainda os medicamentos sintéticos vem sendo os mais utilizados, por conta de seus resultados rápidos (DAS DORES *et al.*, 2003).

2.3 FITOTERÁPICOS INSERIDOS NA RENAME

A Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) é uma lista de medicamentos que deve atender às necessidades de saúde prioritárias da população brasileira. Trata-se de um instrumento mestre para as ações de assistência farmacêutica no Sistema Único de Saúde (SUS).

Há mais de 25 anos, em 1978, foi adotada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma estratégia da política de medicamentos que promove a relação de fármacos essenciais para uso seguro e racional. Esta relação é constantemente revisada e atualizada pela Comissão Técnica e Multidisciplinar de Atualização da RENAME, instituída pela Portaria GM no. 1.254/2005, e composta por órgãos do governo, incluindo instâncias gestoras do SUS, universidades, entidades de representação de profissionais da saúde (FARMACOTERAPÊUTICA, 2002).

Conforme determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para serem comercializados os medicamentos fitoterápicos precisam de um registro, por isso os vegetais passam por diversos testes que comprovam sua eficácia e segurança.

Segundo a ANVISA, o último levantamento do número de fitoterápicos registrados foi realizado em 2011, na época havia 382 medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil, sendo 357 medicamentos fitoterápicos simples, ou seja, apenas uma espécie vegetal empregada como ativo e, 25 compostos com mais de uma espécie vegetal empregada como ativo.

Das espécies vegetais citadas, 71 espécies foram registradas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), com conhecimento tradicional e popular e, com seus estudos químicos e farmacológicos disponíveis. Dessas, foram selecionadas 12 plantas, as quais na forma de medicamentos fitoterápicos e, foram incluídas na lista de Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do SUS (RENAME SUS), presentes na Tabela 1. Torna-se importante

ressaltar que os medicamentos fitoterápicos distribuídos podem ser industrializados ou manipulados, e são obtidos em farmácias de manipulação do SUS, farmácias vivas ou farmácias de manipulação conveniadas (RENAME, 2017).

Tabela 1- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais do SUS (RENAME SUS).

Nome Popular	Nome Científico	Marcador de referência
Alcachofra	<i>Cynara scolymus</i>	A droga vegetal é constituída pelas folhas secas, inteiras ou fragmentadas, contendo, no mínimo 0,8% de ácido clorogênico calculado em relação ao material dessecado (Farmacopéia 3ª edição, pg 800, 1977).
Aroeira	<i>Schinus terebinthifolius</i>	As cascas de <i>Schinus terebinthifolius</i> devem conter o Flavonóide Amentoflavona (Farmacopéia 1ª edição, pg 100).
Babosa	<i>Aloe vera</i>	A droga vegetal é constituída pelas folhas frescas, contendo gel incolor, mucilaginoso, constituído de, no mínimo, 0,3% de carboidratos totais. (Farmacopéia Brasileira, 5ª edição, Vol. II, 2010).
Cascara sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i>	O vegetal é constituído pelas cascas de caule e ramos contendo 8% de heterosídeos antracênicos, dos quais, no mínimo, 60% consistem de cascarosídeos. (Farmacopéia Brasileira, 4ª edição, Vol. II, 1996).
Espinheira santa	<i>Maytenus ilicifolia</i>	As droga vegetal é constituída pelas folhas secas que contem no mínimo 2% de taninos totais, expressos em pirogalol dos quais no mínimo 2.8 mg/g equivalem a epicatequina (Farmacopéia Brasileira, 5ª edição, 2010).
Garra-do-diabo	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Harpagosídeo é considerado o marcador referência em 2% de concentração (WHO, 2001).
Guaco	<i>Mikania glomerata</i>	A cumarina (1,2-benzopirona) é um dos principais constituintes da <i>M. glomerata</i> Sprengel sendo definida como o marcador químico para controle de qualidade de formulações a base de guaco, conforme a Lista de registros de fitoterápicos da ANVISA, Resolução RE nº 89, de 16 de março de 2004 (Brasil, 2004).
Hortelã	<i>Mentha x piperita</i>	As folhas e sumidades floridas devem conter no mínimo 40% de mentol (Farmacopéia Brasileira, 2ª edição, p. 383, 1959).

Nome Popular	Nome Científico	Marcador de referência
Isoflavona de soja	<i>Glycine max</i>	Conforme preconizado pela Anvisa cada 200 mg de extrato seco de <i>Glycine max</i> deverá conter 40% de isoflavonas totais, sendo tais isoflavonas caracterizadas pelos marcadores referência daidzeína e genisteína (Brasil, 2002).
Plantago	<i>Plantago ovataforssk</i>	A semente e a casca da semente do <i>Plantago</i> contêm mucilagem como seu principal constituinte (ANVISA, 2011).
Salgueiro	<i>Salix alba</i>	A droga vegetal é constituída pelas cascas dos ramos jovens, secas, inteiras ou fragmentadas, contendo, no mínimo, 1,5% de derivados de salicina expressos em salicina. (Farmacopéia Brasileira, 5ª ed. Vol II, p. 1279).
Unha de gato	<i>Uncaria tomentosa</i>	Do ponto de vista fitoquímico cada 100 mg de extrato seco de <i>Uncaria tomentosa</i> devem conter entre 4,5-5,5 mg de alcalóides totais calculados como o marcador referência mitrafilina (Anvisa, 2011).

Fonte: RENAME (2017), adaptado.

As indicações terapêuticas dos medicamentos fitoterápicos liberados estão associadas a diferentes distúrbios que podem aparecer no sistema digestivo e no sistema respiratório, que são responsáveis pelo fornecimento de energia necessária ao bom funcionamento do organismo. Alguns são anti-inflamatórios, que asseguram a manutenção e o equilíbrio, através do controle do processo de inflamação, dores e febre no organismo. Medicamentos com uso exclusivo para mulheres ou também chamados de medicamentos ginecológicos, com a presença de hormônios, que previnem possíveis sintomas da menopausa, também fazem parte da relação da RENAME.

2.4 INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS DOS FITOTERÁPICOS INSERIDOS NA RENAME E DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS EQUIVALENTES

Como muitos fitoterápicos, a Alcachofra possui efeito colagogo e coletérica, ou seja, substâncias que são usadas para contrair a vesícula biliar, estimulando a liberação da bile, o que facilita a digestão de alimentos gordurosos (BALBINO *et al*,

2010, bem como o fármaco sintético que também tem ação colagogo, utilizado para tratamento de cálculos biliares (FRIEDMAN *et al.*, 2014).

A Cascara Sagrada possui ação laxativa para pessoas que sofrem de constipação, o que não é uma doença, mas sim um sintoma caracterizado pela emissão muito rara de fezes, que frequentemente são mais rígidas (DARROZ *et al.*, 2015).

O Sulfato de Magnésio, composto sintético com a mesma indicação terapêutica da Cascara Sagrada, é também uma substância de escolha para profilaxia e tratamento de prisão do ventre, pois promove a retenção osmótica do líquido no cólon, causando distensão e aumento da atividade peristáltica, o que posteriormente resulta na evacuação intestinal (SOUZA *et al.*, 2006).

A Espinheira Santa possui diversos benefícios quando utilizado para tratamentos gástricos, pode apresentar ação contra úlcera péptica e gastrite e apresenta mais de um mecanismo de ação, ainda não conclusivamente elucidados, e não se deve somente a um princípio ativo específico do vegetal para realizar a tal função (SANTOS OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O Omeprazol possui as mesmas indicações terapêuticas que a Espinheira Santa, ou seja, para tratamento de esofagite causada por refluxo, gastrite, úlcera gástrica e úlcera duodenal, pode também funcionar como um protetor gástrico, o que evita a lesão do tecido gástrico que pode ser causada por outros tipos de medicamentos (BIGHETTI, 2012).

A Garra- do- diabo pode ser utilizada no tratamento de doenças reumáticas, diabetes, arteriosclerose, doença do fígado, rins e bexiga. Pode ser benéfica também sobre doenças do estômago, vesícula, pâncreas e intestinos, alguns estudos afirmam que seu uso regular reduzia os males da velhice e as artérias tornavam-se mais elásticas. Já, o harpagosídeo extraído do vegetal, possui ação antiespasmódica, ou seja, ele suprime a contração do tecido muscular liso, especialmente em órgão tubulares, a fim de prevenir a ocorrência de espasmos no estômago, intestino, útero ou bexiga (DA ROSA & MACHADO, 2007).

A Prednisona, composto sintético, faz parte do grupo dos glicocorticoides, eles possuem diversas funções que favorecem o bem estar para o homem, tem como principal função o tratamento de doenças nas quais estejam envolvidos mecanismos imunes e inflamatórios, mas podem induzir a maturação, diferenciação ou mesmo a

morte celular por apoptose, o que permite seu uso no tratamento de tumores, especialmente os de linhagem hematopoiética (LONGUI, 2007).

Estudos afirmam que o Guaco age diretamente causando broncodilatação e relaxamento da musculatura lisa dos órgãos do sistema respiratório, o que pode estar relacionado ao bloqueio dos canais de cálcio, acompanhado de ações anti-inflamatória e antialérgica, sendo assim o fitoterápico é utilizado no tratamento da asma, a qual se caracteriza pela obstrução e inflamação das vias aéreas (CASTRO *et al.*, 2006).

A Acetilcisteína, composto sintético, é utilizada em pessoas que tem dificuldade para expectorar e possui muita secreção, são sintomas de algumas doenças como: bronquite crônica e suas exacerbações, enfisema, doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquite aguda, pneumonia, colapso pulmonar/atelectasia, fibrose cística/mucoviscidose (ZIMENT, 1983).

A Hortelã normalmente é ingerida na forma de chá para o tratamento de diversos problemas digestivos ou para limpar os pulmões e descongestionar o nariz. A literatura registra diversas atividades para esse vegetal, como espasmolíticas, ou seja, inibe a motilidade da musculatura visceral, auxilia no tratamento estomacal e contra ação antibacteriana tópica e antifúngica tópica (BUFALO *et al.*, 2016).

O Mentol, extraído do vegetal, é muito utilizado, devido a diversas indicações terapêuticas que ele possui como exemplos de sua função ele pode ter ação calmante, ser utilizado como ingrediente em muitos cremes analgésicos e no tratamento de artrite e em condições de estresse dos músculos esqueléticos, aliviando o desconforto por modulador aferente, causando impulsos de dor, como parte de um efeito adstringente e excitando os nervos que reconhecem a sensação de frio (DA SILVA RAMOS *et al.*, 2017).

As Isoflavonas são encontradas na soja e são classificados como fitoestrógenos, ou seja, hormônios produzidos pelo vegetal e, suas concentrações são relativamente altas nas leguminosas. Essas substâncias podem prevenir a perda óssea pós-menopausa e a osteoporose, porém podem ter outras propriedades bioquímicas, tais como inibição da atividade enzimática e efeito antioxidante (BARBOSA *et al.*, 2008). A genisteína tem sua função relacionada à defesa do organismo contra o câncer, doenças cardiovasculares e estimula o aumento na resposta imunológica (WATANABE *et al.*, 2002).

O valerato de estradiol é encontrado em medicamentos contraceptivos sintéticos, como anticoncepcionais, e é indicado à terapia de reposição hormonal (TRH) para o tratamento dos sintomas da menopausa em mulheres com útero intacto ou histerectomizadas (ISOTTON *et al.*, 2008).

O salgueiro, também conhecido como salgueiro-branco, tem sido utilizado há muito tempo com fins medicinais e, a fim de minimizar dores e febres, principalmente em processos inflamatórios (DIOGO, 2008).

O Ácido Acetilsalicílico pertence ao grupo dos fármacos anti-inflamatórios sintéticos não esteróides, com propriedade analgésica, antipirética e anti-inflamatória. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição irreversível da enzima ciclooxigenase, envolvida na síntese das prostaglandinas, característica que pode ter influenciado no desenvolvimento dos organismos analisados (SECOLI, 2001).

Unha-de-gato é um arbusto muito popular no Peru, utilizado para diversos fins medicinais, porém pesquisas comprovaram a sua eficácia nas ações anti-inflamatórias. No tratamento de amigdalite, sinusite, rinite e para o tratamento de doenças reumáticas e musculares (MARQUES, 2008).

2.5 POLUIÇÃO AQUÁTICA

Devido ao crescimento populacional de centros urbanos, a poluição aquática tem se tornado um problema cada vez mais preocupante, principalmente a partir do século XX com o uso abusivo da água, que se torna importante em diversas atividades humanas como, no abastecimento público e industrial, na agricultura, na recreação, no transporte, na aquicultura, entre outros usos (YAMAMOTO, 2014).

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

Nestes efluentes incluem a presença de substâncias químicas metabolizadas pelo organismo humano, as quais podem afetar a qualidade da água na região de descarga e também comprometer a biota local, causando mutações, alterações nos ecossistemas locais ou até a morte de seres vivos (SANTOS *et al.*, 2010).

Este quadro é extremamente preocupante em razão dos problemas de saneamento básicos relacionados com doenças de veiculações hídricas,

principalmente se levado em conta regiões costeiras, onde uma grande parte da população tem acesso (FILHO *et al.*, 2007), além da falta de água potável para consumo, que tem sido muito reduzida nos dias atuais.

No Brasil, o tratamento de esgotos realizado pelas Estações de Tratamento (ETE), possuem inúmeras vantagens, como menor consumo de energia e menor custo de operação, sendo muito eficiente na remoção de poluentes em concentrações da ordem de mg/L. Porém, torna-se mais difícil a remoção de contaminantes orgânicos em µg/L ou ng/L, o que pode alcançar os ecossistemas costeiros, quando liberados pelo emissário (LEITE *et al.*, 2010).

No Estado de São Paulo o tratamento de esgotos ocorre através do método de lodos ativados, que consiste na remoção da matéria orgânica pelo processo de oxidação no tanque de aeração, onde o ar é inserido por reatores, originando ações bacterianas, que conseguem realizar a quebra dos poluentes biodegradáveis, em seguida o efluente é encaminhado ao decantador, onde uma parte dos sólidos sedimentáveis retornam ao tanque aerado por meio do sistema de recirculação do lodo, os microrganismos então voltam a formar a biomassa, utilizando apenas o oxigênio para que as suas células permaneçam vivas, acarretando a degradação da matéria orgânica, a outra parte do lodo, conhecido como lodo excedente deve receber a destinação e tratamento adequado (SILVEIRA, 2010). Já no Litoral, além do lodo ativado algumas cidades possuem emissários submarinos, que lançam os esgotos tratados no mar e, por processo de fotólise ocorre o processo de degradação de compostos químicos em substâncias menos agressivas, porém algumas podem se tornar persistentes e não se degradarem com facilidade, mantendo-se no ecossistema aquático.

2.6 ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

Os impactos ambientais nos ecossistemas aquáticos podem ter diferentes origens e formas, a partir da liberação de substâncias tóxicas como apresentado, que podem aparecer em concentrações muito superiores às aquelas encontradas naturalmente. Com isso, organismos que vivem nesses ambientes estão sofrendo demasiadamente, o que provoca estresse, prejuízos e, em casos mais graves pode ocasionar queda bruta na biodiversidade (GOULART & CALLISTO, 2003), já que essas substâncias podem interferir na fisiologia, no metabolismo, no comportamento

dos seres vivos ou até mesmo efeitos classificados como secundários, pois alteram a defesa imunológica, o que os tornam mais vulneráveis a aquisição de doenças (FILHO *et al.*, 2007).

Partindo deste princípio, em uma reunião do Committee of the International Council of Scientific Unions (ICSU), em Estocolmo, no ano de 1969, foram apontados pontos e preocupações sobre a toxicidade aquática (TRUHAUT, 1977 apud MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008) e, a partir dessa discussão, aumentou a preocupação com os impactos que poderia ocasionar ao ambiente.

O conceito de ecotoxicologia é uma parte da ciência que estuda os efeitos das substâncias que podem ser classificadas como prejudiciais aos organismos vivos, que habitam ecossistemas que recebem esses constituintes, com o objetivo de estudar as principais fontes de contaminação ambiental, sendo elas naturais ou sintéticas e, os possíveis riscos que podem causar na biota local (Figura 1) (CRANE, 1997; MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Já afirmava Buikema & Voshell (1993), que Aristóteles, cientista conhecido como “Pai da Biologia”, submeteu espécies de peixes de águas continentais em águas oceânicas, para estudar as reações que poderiam causar, já que esses organismos não são acostumados com a presença excessiva de sais, podendo ser tóxico, esse experimento foi um dos primeiros em seres vivos aquáticos.

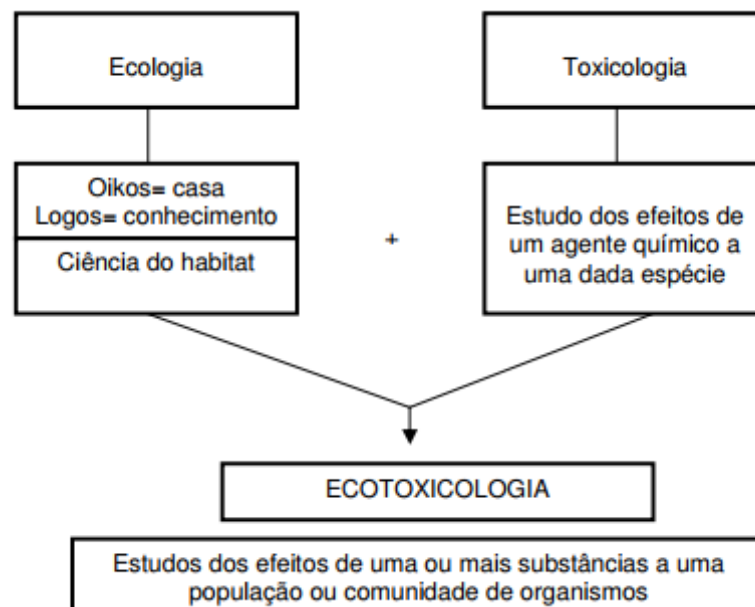


Figura 1- Conceito de ecotoxicologia.

Fonte: BLAISE, 1984 apud ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008.

No Brasil, os ensaios ecotoxicológicos deram início em 1975 pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da International Organization for Standardization (ISO), com auxílio da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) a convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), a partir de ensaios com peixes, que foram expostos a concentrações diferentes de efluentes líquidos liberados por uma indústria na região de Atibaia, São Paulo, onde pode encontrar o limite de tolerância médio (LTM), ou seja, a concentração de efluente que causou efeito letal em pelo menos 50 % da totalidade dos peixes (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Estudos foram aprimorados e adaptados para os ensaios de toxicidade, com efeitos agudos ou crônicos e outras espécies de organismos foram utilizadas, como previsto na resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 357/2005 da Legislação Brasileira. A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) e a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) instituíram as primeiras normas relativas a testes de toxicidade que utilizam organismos aquáticos (Tabela 2), que serviram de apoio para diversos institutos de pesquisas, indústrias, laboratórios particulares e governamentais, que realizam e têm intensificado ensaios ecotoxicológicos para diversas finalidades (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Essas normas passam por constantes alterações e outros organismos são incluídos, com intuito de melhorar os estudos e a capacidade de avaliação toxicológica de substâncias liberadas no meio ambiente, sendo que a última alteração foi em 2016.

Tabela 2- Normas criadas pela CETESB e ABNT, que padronizam os ensaios de toxicidade em organismos aquáticos.

Normas	Identificação
L5.018	Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> Claus, 1879 (Cladocera, Crustacea).
L5.019	Teste de toxicidade aguda com peixes. Parte I- Sistema estático. Parte II- Sistema semi estático. Parte III- Sistema de fluxo contínuo.
L5.020	Teste de toxicidade com <i>Chlorella vulgaris</i> (Chlorophyceae).
L5.022	Avaliação de toxicidade crônica, utilizando <i>Ceriodaphnia dubia</i> Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea).
L5.227	Bioensaio de toxicidade aguda com <i>Photobacterium phasphoreum</i> (Sistema Microtox).
L5.228	Teste de toxicidade aguda utilizando <i>Spirillum volutans</i> .
L5.250	Teste de toxicidade crônica de curta duração com <i>Lytechinus variegatus</i> Lamarck, 1816 (Echinodermata, Echinoidea).
L5.251	Teste de toxicidade aguda com <i>Mysidopsis juniae</i> Silva, 1979 (Mysidacea, Crustacea).

Normas	Identificação
ABNT	Nbr 12713 Ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> Claus, 1879 (Cladocera, Crustacea).
	Nbr 12714 Ensaio de toxicidade aguda com peixes. Parte I- Sistema estático.
	Nbr 12715 Ensaio de toxicidade aguda com peixes. Parte II- Sistema semi estático.
	Nbr 12716 Ensaio de toxicidade aguda com peixes. Parte III- Sistema de fluxo contínuo.
	Nbr 12648 Ensaio de toxicidade com <i>Chlorella vulgaris</i> (Chlorophyceae).

Fonte: MAGALHÃES & FERRÃO FILHO (2008), adaptada.

2.7 ENSAIOS DE TOXICIDADE

Para preservar os ecossistemas aquáticos, houve a necessidade avaliar a toxicidade de substâncias liberadas no meio ambiente, através de ensaios expondo diferentes concentrações em organismos indicadores, que devido às suas características, são classificados como sensíveis, por apresentarem alguma alteração fisiológica, morfológica ou comportamental na presença de toxinas e, esses organismos precisam ser ecologicamente representativos no ambiente. Porém, os resultados desses ensaios não representam o real impacto causado por algumas dessas substâncias, pois as mesmas podem ser degradadas rapidamente ou por não demonstrarem grandes concentrações sobre o ecossistema, mas são facilmente quantificados através da interpolação gráfica e análise estatística (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Os ensaios de toxicidade são realizados a partir de diversas fontes de contaminação, como: efluentes agrícolas, industriais e domésticos, sedimentos, medicamentos e produtos químicos em geral, com o objetivo de verificar as concentrações consideradas ambientalmente relevantes à toxicidade, os limites de substâncias químicas que causam impactos aos organismos aquáticos, a quantidade máxima dessas substâncias que podem ser liberadas no ambiente, estabelecerem critérios e padrões da qualidade das águas e a sensibilidade dos organismos aquáticos (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Para tal resultado, é necessário seguir condições semelhantes ao ambiente original, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido, dureza da água, fotoperíodo, duração do teste, entre outros fatores.

Todos os ensaios realizados devem manter um frasco- controle com água de diluição somente, para exposição dos organismos as condições semelhantes ao

ecossistema analisado e avaliar se algum fator abiótico pode interferir nos resultados (YAMAMOTO, 2014).

Os ensaios agudos são testes curto período que avaliam efeitos imediatos que causam nos organismos ao serem expostos a condições adversas de seu habitat, levando de um a quatro dias no máximo, que podem causar morte ou imobilidade dos organismos em pelo menos 50% dos que foram testados (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008). Os resultados são expressos CE_{50} (Concentração mediana efetiva que causa imobilidade em 50% dos organismos expostos) ou CL_{50} (Concentração mediana letal a 50% dos organismos expostos) (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008).

Outro ensaio definido como crônico, é mais demorado, pois deve expor os organismos pelo menos um décimo ou mais do tempo de vida, período significativo para avaliar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais dos organismos. Pode apresentar três variações: ensaios com todo o ciclo de vida, ensaios com uma parte do ciclo, geralmente a fase mais sensível, normalmente a fase inicial de seu desenvolvimento e, ensaios funcionais que avaliam os efeitos sobre várias funções fisiológica dos organismos (CÉSAR, SILVA e SANTOS, 1997). Os resultados para esse tipo de ensaio expressam a concentração que causa a redução no desenvolvimento do organismo (CI_{50} - Concentração de inibição de 50% dos organismos), a maior concentração analisada que não causa efeitos ao organismo-teste (CENO) e a concentração que começa causar efeitos significativos nos organismos testados (CEO) (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). A diferença entre os ensaios de toxicidade aguda e crônica estão representados na Figura 2.

Após o termino dos ensaios, são avaliados efeitos biológicos nos organismos a partir das concentrações analisadas, como a quantidade mortes ou imobilidade, alteração no crescimento, na reprodução, malformação, comportamento dos organismos.

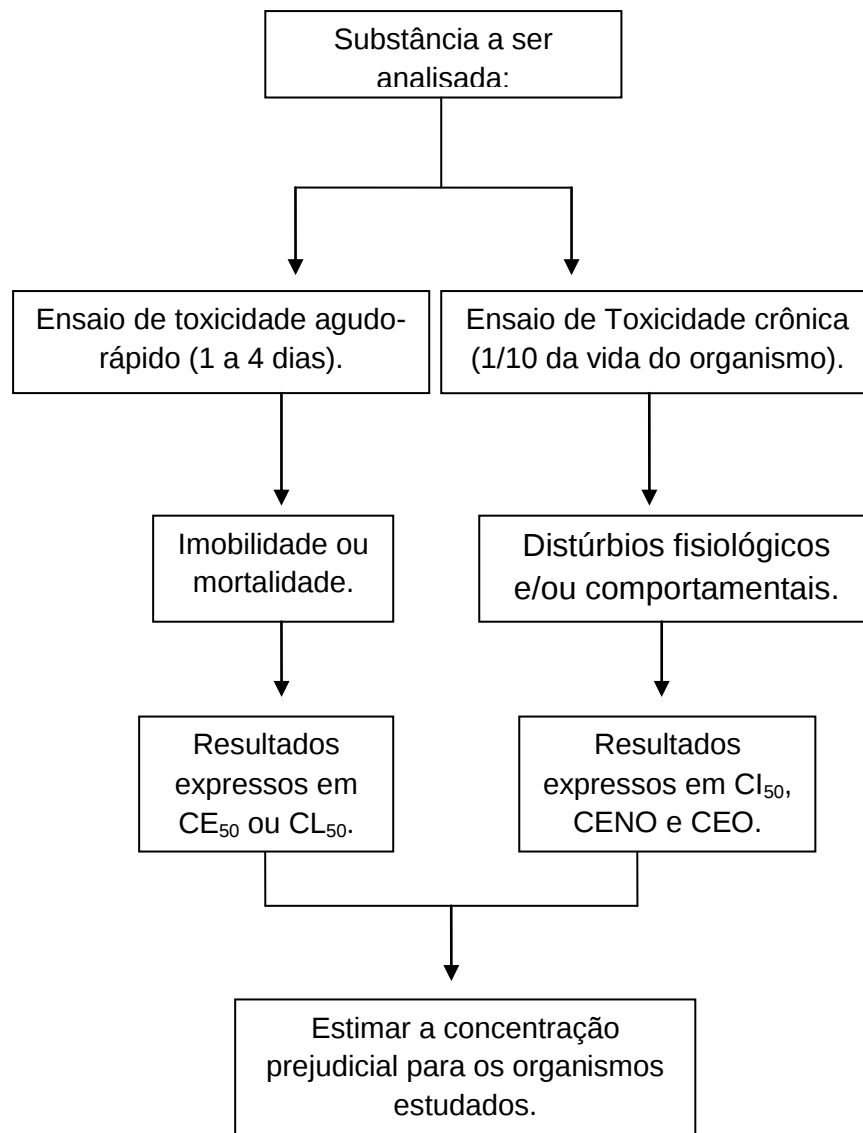


Figura 2- Esquema apresentado com as diferenças entre os ensaios de toxicidade aguda e crônica.

2.8 ESCOLHA DO ORGANISMO-TESTE

A espécie escolhida para a realização dos testes de toxicidade necessita gerar uma resposta válida aos efeitos agudos e crônicos de diversos agentes tóxicos, com isso destacam-se organismos sensíveis que representam diversos ecossistemas e níveis tróficos, como: microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias. A sensibilidade que esses organismos apresentam, podem variar de acordo com os fatores abióticos, nível nutricional, idade, gênero, fase de desenvolvimento, características genéticas, entre outros (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Para Rand (1995), a escolha dos organismos utilizados nos testes precisa atender alguns requisitos, como um número elevado de exemplares da espécie

escolhida para não ocorrer um desequilíbrio no meio ambiente, estudar seu comportamento, sua fisiologia, deve ser facilmente cultivado em laboratório, avaliar sua importância ecológica e econômica para facilitar os ensaios.

Normalmente são realizados testes com três organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos do ambiente aquático. Exemplo: produtores primários, representados por espécies de algas como *Clorella vulgaris* ou *Pseudokirchneriella subcapitata*; consumidores primários como microcrustáceos *Daphnia similis* ou *Ceriodaphnia dubia* e, consumidores secundários representados por peixes como *Cheidon notomelas*, *Hemigrammus marginatus*, entre outros (ZAGATTO, & BERTOLETT, 2008).

2.9 FÁRMACOS E PRODUTOS DE HIGIENE PESSOAL NO AMBIENTE

Vale ressaltar que produtos de uso pessoal (PPCPs- Pharmaceuticals and Personal Care Products), como xampu, sabonete, pasta de dente, cosméticos, entre outros, também aparecem em grande quantidade no ambiente aquático, o que pode promover a sua degradação ou acumulação no local e, assim interferir também no desenvolvimento e sobrevivência da biota local (QUINTANA *et al.*, 2007).

Estudos atuais têm apresentado diversos fármacos com concentrações significativas em ecossistemas aquáticos, impregnados em sedimentos, dissolvidos na água ou até mesmo presente na biota local (BILA & DEZOTTI, 2003).

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

Para evitar esse processo de acumulação, metodologias de análise, separação, quantificação e identificação foram empregados, com a finalidade de detectar algumas substâncias nos corpos de água em partes por bilhão (ppb) - partes por trilhão (ppt) (MOMPELAT, 2009).

Segundo Jimenez (2012) e Boxall (2004), as principais classes de fármacos com capacidade de causar danos aos organismos pertencentes a esses ecossistemas são: analgésicos, antibióticos, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios,

antidepressivos e hormônios. As substâncias utilizadas para fabricação dos fármacos são classificadas como compostos ativos persistentes, que mantêm suas propriedades químicas estáveis por um determinado tempo. Depois de ingeridas, essas substâncias podem ser metabolizadas por completo, a partir de ações hepáticas ou ainda manter substâncias imutáveis, as quais são liberadas na urina (YAMAMOTO, 2014). Com isso, essas substâncias são liberadas, depois de consumidas, em concentrações da ordem de microgramas por litro ($\mu\text{g/L}$) ou nanogramas por litro (ng/L) e, são introduzidos no meio ambiente via esgoto doméstico, seja ele tratado ou não, o que podem exercer efeitos tóxicos sobre a biota onde esses elementos são liberados (SANTOS *et al.*, 2010, LEITE *et al.*, 2010). Seguem representado na Figura 3, exemplos de possíveis rotas dos fármacos até alcançarem ecossistemas aquáticos.

Segundo Santos *et al.* (2010), estudos de toxicidade com fármacos encontrados no ambiente aquático providos a partir de uma liberação accidental de substâncias tóxicas vêm sendo realizados constantemente, porém os resultados têm sido apresentados a partir de ensaios agudos, já os ensaios crônicos em ambiente oceânico têm sido muito escassos nos estudos avaliados de 1996 a 2009.

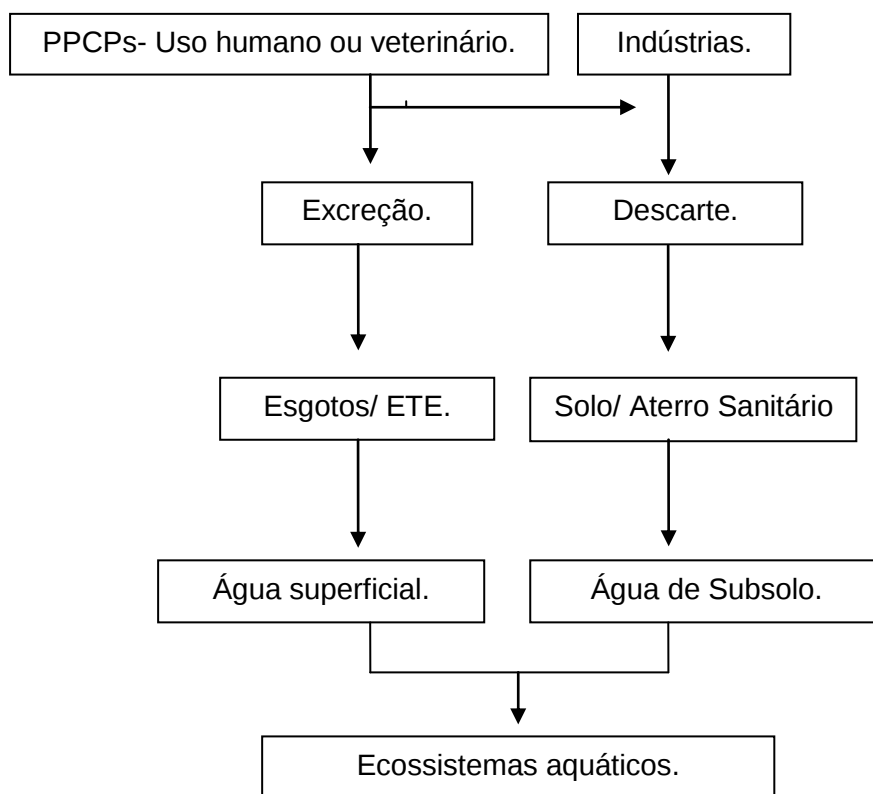


Figura 3- Exemplos de possíveis rotas dos fármacos até alcançarem ecossistemas aquáticos.

2.10 FATORES QUE INFLUÊNCIAM A TOXICIDADE NO MEIO AMBIENTE

Um fator importante que pode influenciar a persistência de fármacos nos ecossistemas aquáticos é o Log K_{OW} (Coeficiente de repartição octanol/água), das substâncias químicas, que é definido pela relação das concentrações da substância dissolvida em óleo e em água, medindo a afinidade do produto pelas substâncias lipofílicas (oleosas) e pela água através de um experimento que mistura quantidade conhecida de uma substância, um solvente orgânico imiscível com água, que mimetiza a fase oleosa, e água e, após a separação das fases orgânica e aquosa, determina-se a quantidade de substância presente em cada uma das fases e então, encontra-se a concentração da substância na fase orgânica e divide pela concentração da substância na fase aquosa e o resultado determina o caráter lipofílico que a substância testada apresenta, quanto maior seu valor, maior caráter lipofílico e quanto menor for o valor mais solúvel em água é a substância (IUPAC, 2009).

Quando se fala a nível celular, vale ressaltar que a membrana celular é formada por uma bicamada fosfolipídica, possui um caráter de baixa polaridade, beneficiando a absorção de substâncias lipofílicas, as quais se acumulam nas células, ou seja, as células tendem a armazenar compostos nas porções lipídicas de seus tecidos, propriedade conhecida como Fator de Bioacumulação (BAF, BF) (SILVA, 2015).

O composto que possui essas características pode entrar no organismo por qualquer rota disponível, como componente da água, sedimentos ou por absorção de alimentos. O BAF pode ser medido por unidade de massa corporal ou por grama de lipídeo e a concentração em alimentos é expressa por grama de peso seco dos alimentos (IUPAC, 2009).

O fator de bioconcentração (BCF) também é importante pois indica o grau de afinidade de um poluente a organismos vivos (RAND *et al.*, 1995). Na estimativa do BCF para organismos aquáticos, pode ser usada a relação de equilíbrio entre um meio biológico (como o tecido de um organismo marinho) e um meio externo como a água. O BCF é determinado dividindo a concentração de equilíbrio (mg/Kg) de um composto químico em um organismo ou tecido pela concentração de um agente químico no meio externo. Em geral, é muito comum os compostos apresentarem um alto valor de K_{OW} e um alto BCF (ISNARD, 1988).

Com o auxílio do *software* EPI Suite, é possível acessar uma plataforma conhecida por BIOWIN que tem por objetivo estimar a probabilidade de biodegradação aeróbica e anaeróbica de um composto orgânico na presença de populações mistas de microorganismos ambientais, onde é possível encontrar sete modelos diferentes que indicam propriedades diferentes. Os dados experimentais de biodegradação para Biowin3 e 4 estima o tempo necessário para a biodegradação final e primária completa em um ambiente aquático, com isso torna-se um elemento importante para auxílio no estudo de substâncias encontradas nos ecossistemas aquáticos (EPISUITE ver 4.1).

2.11 LEGISLAÇÃO VIGENTE

Com esses avanços tecnológicos e industriais têm sido observado que existem poucas informações do destino final de substâncias químicas liberadas. Com isso, à necessidade de fiscalizar e avaliar essas substâncias que podem ser tóxicas.

O Ministério da Saúde e o Ministério do Meio Ambiente são responsáveis por vistoriar indústrias ou estabelecimentos que exerçam atividades relacionadas à produção, comércio, manipulação ou uso das substâncias farmacológicas, para que ocorra o descarte correto das substâncias que não serão utilizadas, a fim de garantir que os descartes dessas substâncias estejam dentro dos regulamentos da Legislação Ambiental (MELO *et al.*, 2009), porém não possui limites bem definidos para casos com contaminação de resíduos farmacêuticos em geral, deixando lacunas, as quais ainda necessitam avaliações para evitar futuros problemas. Por isso, torna-se importante, o estudo de princípios ativos farmacológicos para conhecer sua ação no ambiente, definindo-os como tóxica ou não, para uma possível reformulação na legislação vigente (OLLER *et al.*, 2011).

De acordo com Oliveira (2009), no ano de 2006, foi aprovado no Parlamento Europeu e pelo Conselho da Comunidade Européia, um regulamento com o objetivo de melhorar a proteção da saúde humana e do ambiente, a partir de riscos que podem resultar dos produtos químicos, que ficou conhecido como REACH, Regulamento nº 1907/2006. Este regulamento promove igualmente métodos alternativos para avaliar, registrar, autorizar e restringir a liberação de substâncias

que podem ser perigosas ao ambiente, tendo em vista a redução do número de ensaios em animais.

As substâncias são avaliadas de acordo com os resultados pontuais de sua toxicidade, onde limita os valores da concentração de efeito ou letalidade a 50% dos organismos (CE_{50} e Cl_{50}) pela diretiva 93/67/CEE (CEE- Conselho da Comunidade Europeia) (CEC, 1996). Segue na Tabela 3 a determinação de toxicidade para as substâncias de acordo com a Diretiva 93/67/CEE.

Tabela 3- Determinação de toxicidade para efeitos de substâncias lançadas no ambiente aquático.

Não Tóxico	Nocivo	Tóxico	Muito tóxico	Extremamente tóxico
CE_{50}/Cl_{50} > 100mg.L ⁻¹	CE_{50}/Cl_{50} entre 10 e 100mg.L ⁻¹	CE_{50}/Cl_{50} entre 1 e 10mg.L ⁻¹	CE_{50}/Cl_{50} entre 0,1 e 1mg.L ⁻¹	CE_{50}/Cl_{50} < 0,1mg.L ⁻¹

Fonte: Diretiva 93/67/CEE, adaptada.

Os fármacos e produtos de higiene pessoal (PPCPs) não estão contemplados nas legislações ambientais vigentes, tanto brasileiras como internacionais (PUSCEDDU, 2009). Porém, houve a necessidade de criar um instrumento de fiscalização para controlar a liberação de efluentes encontrados nos ecossistemas aquáticos, a fim de garantir que o ecossistema aquático permaneça com condições adequadas para o desenvolvimento e sobrevivência dos organismos, com isso foi implantada a resolução CONAMA 357/2005, que tem como objetivo fiscalizar e controlar a liberação de efluentes, exigindo condições e padrões dos lançamentos de efluentes.

Conforme a resolução 430/2011, que complementa e altera a resolução CONAMA 357/2005, as substâncias liberadas em ambientes aquáticos não devem possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos, com isso qualquer efluente de fonte poluidora somente poderá ser lançado após o devido tratamento e desde que obedeçam às exigências nesta resolução (BRASIL, 2011).

Em relação aos fitoterápicos, as leis são muito particulares. A ANVISA vem elaborando normas para a regulamentação de medicamentos fitoterápicos, desde a Portaria n. 6 de 1995, onde constituiu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela RDC n. 17 de 2000, e a Resolução RDC n. 48 de 16 de março de

2004, e as informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, (CARVALHO, 2007).

Esta preocupação das autoridades regulatórias com a normatização dos medicamentos fitoterápicos propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos. O uso tradicional de diversos vegetais baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, propõe que poucas plantas medicinais sejam avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança (TUROLA & NASCIMENTO, 2006). A dificuldade de conhecimento dos vegetais nativos, por falta de investimento ou complexidade dos princípios ativos, faz com que o campo da fitoterapia ainda seja bem rudimentar se comparado aos medicamentos sintéticos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a toxicidade de vegetais utilizados como medicamentos fitoterápicos de uso comum, inseridos na RENAME, seus marcadores de referência e princípios ativos sintéticos com a mesma indicação terapêutica, em organismos de ecossistemas dulcícolas e marinhos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar ensaios ecotoxicológicos a fim de avaliar os efeitos subletais de curta duração em *Daphnia similis*, microcrustáceo de ecossistema dulcícola, frente a vegetais com ação fitoterápica, seus marcadores de referência e princípios ativos sintéticos com a mesma indicação terapêutica.
- ✓ Realizar ensaios ecotoxicológicos a fim de avaliar os efeitos de curta duração que podem afetar o desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter*, equinoderma de ecossistemas marinhos, frente a vegetais com ação fitoterápica, seus marcadores de referência e princípios ativos sintéticos com a mesma indicação terapêutica.
- ✓ Comparar e classificar as substâncias analisadas, quanto sua toxicidade, de acordo com a Diretiva 93/67/EEC da União Européia.

4. METODOLOGIA

Os ensaios começaram em março de 2016 e foram até agosto de 2017, no laboratório de Ecotoxicologia Professor Caetano Belliboni da Universidade Santa Cecília- Santos/SP.

A metodologia empregada para realização dos ensaios ecotoxicológicos foi conduzida pelas normas brasileiras de toxicidade aguda, método de ensaio com *Daphnia* spp. NBR 12713 (ABNT, 2016) e, toxicidade crônica de curta duração, método de ensaio com ouriço-do-mar NBR 15350 (ABNT, 2012), frente a diversas concentrações de compostos naturais e sintéticos escolhidos.

4.1 ORGANISMOS- TESTE

Para alcançar o objetivo do estudo, foram realizadas análises com a espécie de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, animal classificado como invertebrado de ecossistema oceânico, da classe Echinoidea, dentro do filo Echinodermata e *Daphnia similis*, popularmente conhecido como pulga d'água, invertebrado também, porém vive em ecossistema dulcícola, classificado como microcrustáceo, da classe Branchiopoda, do filo Crustacea.

Estes organismos foram escolhidos para os ensaios, pois tratam-se de seres vivos sensíveis às mudanças do ambiente e por terem um único habitat por longo tempo, o que permite avaliar as mudanças no mesmo exemplar.

4.1.1 *Daphnia similis*

Microcrustáceo planctônico, que vive em ecossistema dulcícola e, têm larga distribuição no hemisfério norte. Atua como consumidor primário da cadeia alimentar aquática e, entre os metazoários é um filtrador de material orgânico em suspensão, tendo como principal fonte de alimento microalgas, principalmente unicelulares (ABNT, 2016).

Seu comprimento máximo é de 3,5 mm aproximadamente (Figura 4). Em ambiente favorável, se reproduz por partenogênese, originando apenas fêmeas, porém em ambiente desfavorável, originam-se machos e consequentemente efípios, espessamento de coloração escura contendo ovos de resistência, que são resultantes de reprodução sexuada (KNIE & LOPES, 2004).



Figura 4- Exemplar de *Daphnia similis*, organismo utilizado para testes de toxicidade.
Fonte: Arquivo pessoal.

Os organismos são cultivados em recipientes, com cerca de 25 exemplares em 1,5 litros de água reconstituída e, mantidos em câmara de germinação com a temperatura que pode variar entre 18⁰C a 22⁰C, como apresentado na Figura 5. Para a realização dos ensaios ou produção de um novo cultivo são utilizadas as neonatas, que são geradas pelas *D. similis* adultas, com idade entre 7 e 28 dias, por partenogênese, a partir da segunda postura, com idade entre 6h e 24h, (ABNT 12713, 2016).



Figura 5- Cultivo de *Daphnias similis* em câmara de germinação.
Fonte: Arquivo pessoal.

4.1.2 *Echinometra lucunter*

Trata-se de um animal encontrado em ecossistema oceânico, com cerca 950 espécies móveis, que podem ser também chamadas de “ouriço- do- mar, rótulas ou corupios”. É comumente encontrado em regiões costeiras e rasas, em substrato rochoso ou fundo arenoso (HILL & LAWRENCE, 2003).

Frequentemente, essa espécie pode adornar-se com os restos de materiais como estratégia de proteção e camuflagem realizando um comportamento para cobertura. O comportamento de cobertura ou “covering behavior” é muito discutido

na literatura quanto sua real função, havendo possibilidades de relações a fatores bióticos e abióticos (VERLING *et al.*, 2004).

Segundo Barnes (2005), o *E. lucunter* retira do substrato algas, seu principal alimento, podendo também consumir grande variedade de vegetais e animais em sua dieta. Por outro lado, esses animais servem de alimentos para outros seres vivos, como lontras ou até mesmo para o ser humano, que consome suas ovas em sushis ou em outras especialidades culinárias.

O significado do nome Echinoidea refere-se à quantidade de espinhos móveis que eles trazem fundidos a uma carapaça de carbonato de cálcio, significa porco-espinho (Figura 6). Os espinhos, quando perfuram, podem causar ferimentos gravíssimos, também podem ser retirados do animal para uso em móveis decorativos (BARNES, 2005).



Figura 6- Exemplar de *Echinometra lucunter*, organismo utilizado para testes de toxicidade.
Fonte: Arquivo pessoal.

Os organismos foram coletados através de mergulho livre, na ilha das Palmas, no município de Guarujá, São Paulo, armazenados em caixa térmica, recobertos com algas do gênero *Ulva sp.*, mantendo as condições de temperatura que eles estavam e transportados até o laboratório, onde foram mantidos em um tanque, sob forte aeração e condições ideais para estes organismos (Tabela 8), até o momento da realização dos ensaios (Figura 7).



Figura 7- Tanque de armazenamento dos organismos até a realização dos testes.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2 MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS

4.2.1 MANUTENÇÃO DE *D. similis*

A manutenção destes organismos é realizada frequentemente e, consiste na filtragem ou troca de água e alimentação dos organismos com algas verdes unicelulares, conhecida como *Pseudokirchneriella subcapitata*, complementando com ração a base de peixe, o que propicia condições adequadas para a reprodução e, a água utilizada para o cultivo foi empregada de forma natural (Tabela 8). A falta ou excesso de alimentos ou superpopulação pode prejudicar no cultivo de *D. similis*, com a obtenção de machos (ABNT, 2016).

4.2.2 MANUTENÇÃO DE *E. lucunter*

A água utilizada para manter os organismos é natural e coletada na Ilha das Palmas. Já, para manutenção destes organismos no tanque, seus parâmetros físico-químicos são observados diariamente, como a temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido (OD), obedecendo às condições ideais para esses organismos, conforme a norma NBR 15350 (ABNT, 2012), que busca categorias semelhantes à de seu habitat natural, ecossistema dulcícola (Tabela 8).

4.3 SUBSTÂNCIAS-TESTE

Para realização dos ensaios ecotoxicológicos foram selecionados nove grupos de fármacos, sendo formados por órgãos vegetativos que compõem os

medicamentos fitoterápicos, da lista do RENAME, seus marcadores de referência e compostos sintéticos que apresentam a mesma indicação terapêutica (Tabela 4).

Tabela 4- Vegetais, marcadores de referência e princípios ativos sintéticos utilizados para a realização dos ensaios ecotoxicológicos.

Grupos	Vegetais (Nome popular)	Marcadores de referência	Princípios ativos sintéticos
Disfunções do sistema digestivo	Alcachofra	Ácido clorogênico	Ácido Ursodesoxicólico
	Cascara sagrada	Dihidroxiantraquinona	Sulfato de Magnésio
	Espinheira santa	Epicatequina	Omeprazol
	Hortelã	Mentol	Prednisona
Anti-inflamatórios	Garra-do-diabo	Harpagosídeo	Prednisona
	Salgueiro	Salicina	Ácido Acetilsalicílico
	Unha de gato	---	Prednisona
Disfunções do sistema respiratório	Guaco	Cumarina	Acetilcisteína
Fito-hormônio	Isoflavona de soja	Genisteína e Daidzeína	Valerato de Estradiol

Os princípios ativos sintéticos foram escolhidos de acordo com as ações semelhantes aos medicamentos fitoterápicos, visando realizar uma análise comparativa quanto à toxicidade aos ecossistemas aquáticos.

As análises são realizadas com os vegetais fitoterápicos liberados pelo RENAME, a fim de comparar sua possível toxicidade com os sintéticos e fornecer segurança ambiental quanto ao uso, por se tratar de medicamentos que atendem às necessidades de da população brasileira através do SUS.

Todas as substâncias utilizadas nos ensaios foram obtidas a partir de empresas fornecedoras, acompanhadas de laudo técnico com certificado de análise de controle de qualidade devidamente registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e no Ministério da Saúde (MS).

O marcador de referência Mitrafilina, do grupo 9, Unha de gato, não foi encontrado à venda, com isso os ensaios não foram realizados para esse composto.

4.4 PREPARAÇÃO DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

4.4.1 ÁGUA PARA ENSAIOS DE TOXICIDADE COM *D. similis*

A água utilizada para a preparação das amostras é de fonte natural, coletada no Rio Jurubatuba em Cubatão-SP. Para manter as condições adequadas, quando necessário, deve-se ajustar a dureza entre 40 a 48 mg CaCO₃/L e o pH entre 7,0 e 7,6, dentre outros parâmetros exigidos pela NBR 12713 (ABNT, 2016).

4.4.2 ÁGUA PARA ENSAIOS DE TOXICIDADE COM *E. lucunter*

Para a diluição das substâncias-teste, manuseio dos gametas e preparação do controle, a água utilizada é reconstituída, a partir da mistura de sal comercial da marca CORAL PRO SALT (RED SEA®) em água processada, mantida sob agitação para solubilização total do sal, assim ela preserva as características encontradas no ambiente natural dos organismos. A solução foi filtrada, com auxílio de um suporte de filtração e membrana de celulose Millipore® de 0,45µm e, a água deve manter os padrões físico-químicos como pH entre 7,8 e 8,4 e salinidade entre 30 e 37(g/L), segundo a norma 15350 (ABNT, 2012).

4.5 TESTES DE SENSIBILIDADE

Os ensaios de sensibilidade foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília, sempre em paralelo a cada lote de organismos utilizados, seguindo as mesmas condições dos ensaios definitivos e os resultados repassados para uma carta-controle (Anexo A e B), com finalidade de avaliar a saúde dos organismos-teste, para que haja maior confiabilidade nos resultados obtidos com as substâncias-teste.

Os valores obtidos nos ensaios com substâncias de referência devem estar compreendidos em um intervalo de +/- 2 desvios-padrão em relação aos valores médios obtidos anteriormente para a mesma espécie. Sendo importante também, calcular a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) (ABNT, 2016).

Para obtenção e segurança dos resultados, foram realizados os ensaios de sensibilidade com os organismos apresentados na Tabela 5, onde apontam a substância utilizada como referência e os End-points.

Tabela 5- Organismos utilizados nos testes de sensibilidade, as substâncias utilizadas como referência e os respectivos End-points.

Organismos Testados	Substâncias de referência	Efeitos	End-point
<i>Daphnia similis</i>	Cloreto de potássio (KCl)	Agudo	Imobilidade ou mortalidade (CE50- 48h em mg.L ⁻¹)
<i>Echinometra lucunter</i>	Sulfato de Zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	Crônico	Desenvolvimento embriolarval (CI50- 36 à 42h em mg.L ⁻¹)

4.6 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

As variáveis de cada substância foram analisadas antes e depois de cada ensaio, para que alterações não comprometessem os resultados, como o pH e oxigênio dissolvido (Apêndices A e B)..

Outro fator importante para o preparo da solução estoque foi o log K_{OW}, ou seja, razão da solubilidade de uma substância química em octanol para sua solubilidade em água em equilíbrio.

Para a diluição de substâncias com o log K_{OW} alto foi utilizado o solvente orgânico Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de Dimetilo (DMSO), com a fórmula (CH₃)₂SO, na menor proporção possível, para não comprometer as substâncias e, posteriormente, o volume foi completado com a água para o teste. Já as substâncias com o log K_{OW} baixo foram solubilizadas diretamente com a água utilizada nos ensaios.

4.7 CONTROLE DOS ENSAIOS

Para diluição das substâncias testadas foram utilizadas água ou Dimetilsulfóxido (DMSO), já que ele não possui efeito comprovado em baixas concentrações para as neonatas, como menciona Barbosa (2003). Mesmo assim, com intuito de avaliar possíveis efeitos nos organismos a partir destes solventes, foi realizado, em cada amostragem, um ensaio somente com água utilizada na diluição e outro controle com o solvente diluído a 3%, para não comprometer os ensaios.

4.8 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE

Cada substância possui suas características físico-químicas específicas, com auxílio do *software* EPI Suite e informações obtidas nos laudos das substâncias, as estruturas químicas foram estudadas, como mostram as Tabelas 6 e 7.

Tabela 6- Forma de preparo, solubilidade e proporção soluto/solvente das substâncias utilizadas para os ensaios com *D. similis*.

Grupos	Compostos	Solubilidade	Proporção (mg. L⁻¹)
Disfunções do sistema digestivo	Alcachofra	Água- infusão	1000
	Ácido clorogênico	Água	75
	Á. Ursodesoxicólico	300µL de DMSO + água	200
	Cascara sagrada	Água- infusão	1000
	Dihidroxiantraquinona	300µL de DMSO + água	1
	Sulfato de Magnésio	Água	1000
	Espinheira Santa	Água- infusão	1000
	Epicatequina	Água	100
	Omeprazol	300µL de DMSO + água	1000
	Hortelã	Água- infusão	200
	Mentol	Água	50
	Prednisona	100µL de DMSO + água	250
Anti-inflamatórios	Garra- do -diabo	Água- infusão	1000
	Harpagosídeo	Água	20
	Prednisona	100µL de DMSO + água	250
	Salgueiro	Água- maceração	1000
	Salicina	Água	1000
	Ácido Acetilsalicílico	Água	650
	Unha de gato	Água- infusão	1000
	Prednisona	100µL de DMSO + água	250
Disfunções do sistema respiratório	Guaco	Água- infusão	1000
	Cumarina	Água	100
	Acetilcisteína	Água	100
Fito- hormônio	Isoflavona de soja	Água- maceração	100
	Genisteína/ daidzeína	300µL de DMSO + água	15/15
	Valerato de Estradiol	300µL de DMSO + água	1

Grupos	Compostos	Solubilidade	Proporção (mg. L⁻¹)
---------------	------------------	---------------------	---

Disfunções do sistema digestivo	Alcachofra	Água- infusão	1000
	Ácido clorogênico	Água	10
	Á. Ursodesoxicólico	300µL de DMSO + água	200
	Cascara sagrada	Água- infusão	120
	Dihidroxi-antraquinona	300µL de DMSO + água	1,2
	Sulfato de Magnésio	Água	1600
	Espinheira Santa	Água- infusão	100
	Epicatequina	Água	1
	Omeprazol	300µL de DMSO + água	100
	Hortelã	Água- infusão	4
Anti-inflamatórios	Mentol	Água	500
	Prednisona	100µL de DMSO + água	50
	Garra- do -diabo	Água- infusão	50
	Harpagósideo	Água	2
	Prednisona	100µL de DMSO + água	50
	Salgueiro	Água- maceração	800
	Salicina	Água	800
	Ácido Acetilsalicílico	Água	200
	Unha de gato	Água- infusão	100
	Prednisona	100µL de DMSO + água	50
Disfunções do sistema respiratório	Salgueiro	Água- maceração	800
	Guaco	Água- infusão	150
	Cumarina	Água	20
Fito- hormônio	Acetilcisteína	Água	250
	Isoflavona de soja	Água- maceração	10
	Genisteína/ daidzeína	300µL de DMSO + água	30/ 30
	Valerato de Estradiol	300µL de DMSO + água	100

Tabela 7- Forma de preparo, solubilidade e proporção soluto/solvente das substâncias utilizadas para os ensaios com *E. lucunter*.

As informações obtidas foram anotadas em um relatório fornecido pelo laboratório, com algumas informações adaptadas, para facilitar o procedimento de manipulação das substâncias e também para anotações dos resultados finais (Anexo C).

Alguns vegetais foram preparados a partir de infusão, ou seja, imersão de folhas, raízes, caules ou sementes diretamente na água quente, conforme o método de preparo na embalagem dos produtos, mantendo o contato do órgão vegetal com a água quente por aproximadamente 10 minutos, após esse período a solução foi filtrada e utilizada para os ensaios. Outra forma utilizada foi a partir de maceração, método de extração de compostos químicos dos órgãos vegetativos.

Para evitar sobras da solução estoque, o volume utilizado para cada ensaio foi proporcional para as diluições nas concentrações estudadas, que foram preparadas com intervalos reduzidos, para uma melhor precisão dos resultados.

Foram utilizadas pipetas eletrônicas e balões volumétricos calibrados para a obtenção das soluções-teste. A água de diluição e a solução estoque foram preparadas no momento do ensaio, evitando a degradação das substâncias.

4.9 CONDIÇÕES PARA A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

A fim de manter as condições normais na água, os fatores físico-químicos como pH, a temperatura e a salinidade foram acompanhadas em todos os ensaios, no início e no término, permanecendo os valores como apresentado na Tabela 8, para garantir que esses fatores não comprometessem os resultados, buscando o meio parecido com o natural (Apêndices A e B).

Tabela 8- Condições exigidas pela ABNT (2012, 2016), para realização dos ensaios.

Condições	<i>D. similis</i>	<i>E. lucunter</i>
pH da água	7,0 a 7,6	7,8 a 8,4
Temperatura	18 a 22 ⁰ C	24 a 28 ⁰ C
Salinidade	0	30 e 37 (g/L)
Fotoperíodo	12h às 16h	12h às 16h
Idade dos organismos	Neonatos com 6h a 24h	Embriões com 2h a partir da fecundação
Tempo do ensaio	48h	36h às 42h
Condições	<i>D. similis</i>	<i>E. lucunter</i>
Número de soluções-teste	5	5

Volume das soluções-teste	10mL	10mL
Efeito observado	Imobilidade e mortalidade	Desenvolvimento embriolarval
Número de réplicas	4	4
Água de diluição	Natural	Reconstituída
Sistema de ensaio	Estático	Estático
Recipiente-teste	Tubo de ensaio de 20mL	Tubo de ensaio de 20mL
Alimentação	Nenhuma	Nenhuma
Validade do ensaio	Máximo de 20% de morte ou imobilidade no controle do solvente	Mínimo de 80% de larvas pluteus normais no controle do solvente

4.10 REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS

De acordo com as normas NBR 12713 e NBR 15350 (ABNT 2012, 2016), os testes voltados à toxicidade foram realizados em duas etapas: um ensaio preliminar e um definitivo, com as mesmas condições de análises.

4.10.1 ENSAIO PRELIMINAR

A fim de determinar um intervalo de concentrações preciso para o ensaio definitivo, a análise preliminar foi realizada com intervalos de diluições grandes, dando foco para a concentração em que foi possível observar efeito.

4.10.2 ENSAIO DEFINITIVO

Com a concentração previamente estipulada, foram realizadas razões de diluições com intervalos de 2,0, para cada substância avaliada e, cinco diluições, com quatro réplicas (Figura 8), para fins quantitativos conforme disposto na norma 15350 (ABNT, 2012).



Figura 8- Material utilizado nos ensaios.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.11 MÉTODOS DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE

Os ensaios foram realizados com o propósito de avaliar a concentração que os organismos-teste apresentaram efeitos.

4.11.1 ENSAIO DE TOXICIDADE COM *D. similis* (Mortalidade ou Imobilidade das neonatas)

Os efeitos de toxicidade com *D. similis* tiveram respostas rápidas ao organismo teste, o que levou de 0 a 48 horas para aparecer, a partir do contato com as concentrações estabelecidas nas amostras estudadas.

Foram realizadas três amostragens para cada substância, como garantia dos resultados. As diluições preparadas a partir da solução-estoque foram determinadas a partir do ensaio preliminar, com quatro réplicas em cada concentração e cinco organismos foram submetidos a cada tubo.

Com as diluições preparadas, as neonatas foram transferidas para os tubos, com auxílio de uma pipeta Pasteur, com o mínimo de água possível, para evitar a alteração da concentração final. A amostra foi mantida em câmara incubadora, com temperatura entre 18⁰C e 22⁰C, em um ambiente com fotoperíodo de 12h às 16h, sem alimentação, no período do ensaio.

Após 48 horas, foram contados e registrados os organismos imóveis por concentração da amostra, foram calculadas as concentrações que causaram morte em 50% dos organismos (CE₅₀) (Figura 9).

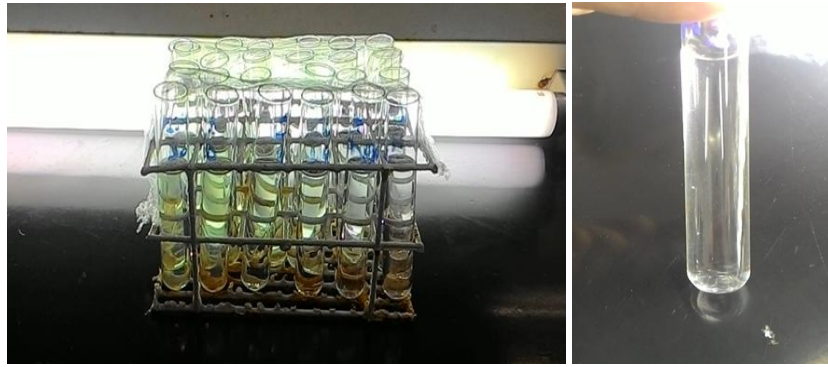


Figura 9- Leitura do ensaio de toxicidade aguda com *D. similis*.
Fonte: Arquivo pessoal.

4.11.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM *E. lucunter* (Desenvolvimento Embrionarval)

O ensaio com *E. lucunter* teve como objetivo avaliar o desenvolvimento embrionário e larval expostos a diferentes concentrações das substâncias e, seu resultado é dado pela resposta de um estímulo que pode durar longo tempo, geralmente por um período de 1/10 do ciclo vital até a totalidade de vida.

Os organismos não apresentam dimorfismo sexual externo, porém o gênero é detectado pela coloração dos gametas, no caso de gametas com coloração branca tratam-se de machos e amarelo-alaranjado de fêmeas (Figura 10).

Para obtenção dos gametas, o *E. lucunter* foi estimulado por impulsos elétricos, a partir de um circuito de corrente alternada e transformados de 35 V (Figura 11), porém dessa forma se o organismo não liberar os gametas em até cinco pulsos elétricos, uma injeção de 2,5 mL de KCl 0,5M é aplicada na região perioral.

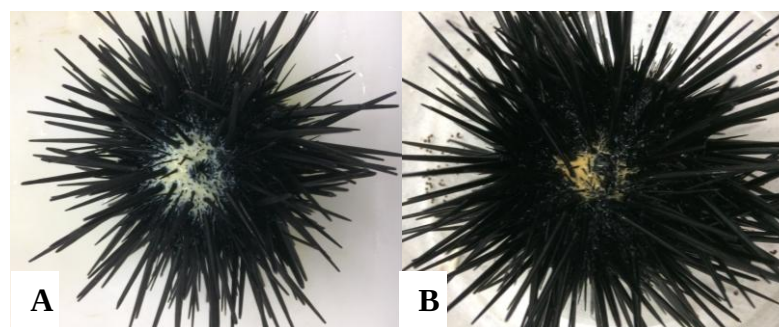


Figura 10- Identificação dos gêneros de *E. lucunter*, de acordo com a coloração de seus gametas. A- Macho- gameta branco; B- fêmea- gameta amarelo- alaranjado.

Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 11- Estímulos elétricos sendo aplicados ao *E. lucunter* para liberação de gametas.
Fonte: Arquivo pessoal.

Após a estimulação para a liberação dos gametas, houve a coleta e mistura para fecundação. As fêmeas foram apoiadas com superfície aboral virada para baixo em um béquer menor que seu diâmetro, de modo que os gonopóros ficassem imersos na água de diluição, conforme a Figura 12. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta fina, foi retirada uma sub-amostra de óvulos de cada fêmea (três fêmeas utilizadas em cada ensaio), para verificar a viabilidade dos óvulos.

Os gametas masculinos foram coletados com pipeta Pasteur de ponta fina, diretamente dos gonopóros e transferidos em um pequeno béquer, resfriado por gelo até o momento da fecundação (Figura 13).

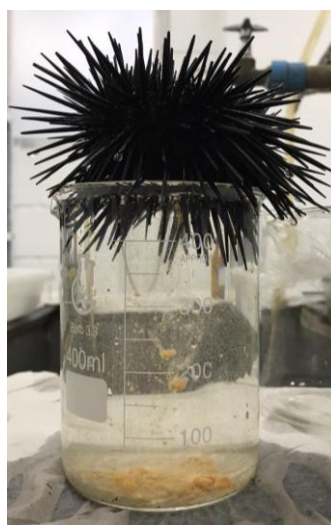


Figura 12- Liberação de gametas femininos de *E. lucunter*.
Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 13- Gametas masculinos que foram transferidos em um béquer e resfriado por gelo, que permaneceram até o momento da fecundação.

Fonte: Arquivo pessoal.

Foi necessário esperar a decantação dos óvulos para descartar o sobrenadante, filtrar a solução através de malha de 350 μ m e acrescentar água de diluição até 600mL, aumentando seu volume, o processo foi realizado três vezes. Já para utilização dos gametas masculinos, acrescentou-se água de diluição, mantendo a proporção de 0,5 mL de gametas para 25mL de água.

Para que ocorra a fecundação, foi inserido 1mL da solução de esperma ao recipiente que contem a solução dos óvulos e esperou por cinco minutos, para obtenção dos zigotos. Porém, para realizar o cálculo da porcentagem da fecundação, foi coletado 1mL da solução e feita a contagem em câmara de Sedgwick-Rafter, identificados e quantificados os zigotos, que foram caracterizados pela membrana de fecundação em volta do ovo (Figura 14), obteve-se um valor mínimo necessário de 80% de fecundação. O procedimento foi realizado três vezes, calculado a média e o volume dessa solução que foi inserido nas soluções-teste. Após duas horas da fecundação, os embriões foram transferidos para o ensaio.

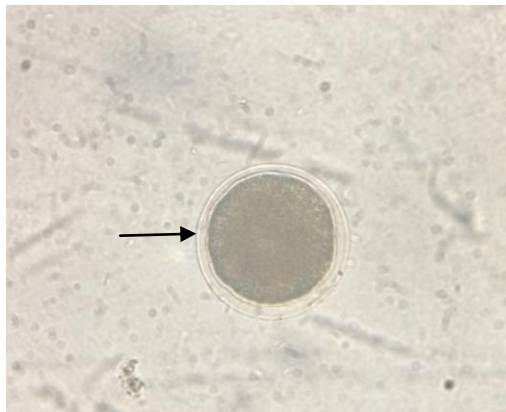


Figura 14- Zigoto obtido pela união de gametas de *E. lucunter*, envolto pela membrana de fecundação, que está apontada pela seta.

Fonte: Arquivo pessoal. Aumento da lente- 100X.

Foram realizadas três amostragens, com 5 concentrações estipuladas a partir das determinadas no ensaio preliminar, para cada substância. Em cada réplica foram adicionados 300 zigotos e, ao término do experimento, o mesmo foi mantido em câmara incubadora, por um período de 36 a 42 horas.

Logo após o tempo estipulado, foi retirada uma alíquota do controle de água, para avaliar a formação de pelo menos 80%, no estágio larval, conhecido como Pluteus. Confirmado a formação de Pluteus, o ensaio foi finalizado, inserindo 0,5mL de formol tamponado com bórax em cada tubo, para bloquear o desenvolvimento dos Pluteos.

A leitura dos resultados nas solução-teste foi realizada com o auxílio da câmara de Sedgwick- Rafter, observando os primeiros 100 organismos, onde foi possível avaliar o grau de desenvolvimento de Pluteus, diferenciando os organismos normais e anormais, considerando os organismos anormais aqueles que apresentaram os estágios anteriores aos Pluteus (ovo, mórula, blástula e gástrula), os que tiveram atraso no desenvolvimento em relação ao controle dos organismos e os que apresentaram deformações, como na Figura 15.

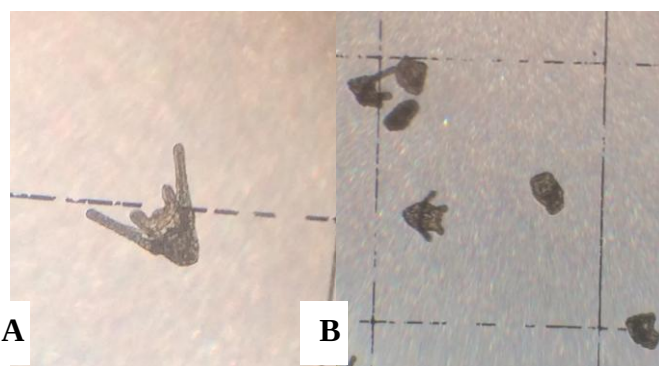


Figura 15- Pluteus, larvas de *E. lucunter*. A- Desenvolvimento normal; B- Desenvolvimento anormal.

Fonte: Arquivo pessoal. Aumento da lente- A- 100X; B- 40X.

4.12 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados apresentados em todas as etapas dos ensaios foram anotados, a fim de encontrar os valores de toxicidade seguindo o protocolo da United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2002).

Para todos os ensaios foram calculados a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV).

Com a finalidade de calcular os valores de CE_{50} para os ensaios com *D. similis*, utilizou-se o método estatístico Trimmed Spearman Karber (Hamilton *et al.*, 1977), através da utilização do *Software* Trimmed Spearman-Karber (versão 1.5), o qual tem capacidade de calcular o valor exato e preciso da CE_{50} e os intervalos de confiança.

Para expressar os resultados de toxicidade com *E. lucunter* estabeleceu-se as concentrações onde não foram observados efeitos biológicos (CENO) e, as concentrações que causaram efeitos nos organismos observados (CEO), pelo programa estatístico Graphpad Prism® for Windows versão 5.03, através da análise de variância (ANOVA), onde foi empregado o teste de *Dunnett*, com intuito de encontrar as concentrações que apresentaram diferenças significativas quando o $p < 0,05$.

As concentrações que causaram inibição no desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* em 50% dos organismos (CI_{50}) e os intervalos de confiança foram obtidas através do método de Interpolação Linear (USEPA, 1988), através do software The Inhibition Concentration (ICp) (Versão 2.0).

5. RESULTADOS

Os resultados dos ensaios definitivos foram validados a partir dos ensaios de sensibilidade, preliminares e dos controles com os solventes. A apresentação dos resultados foi realizada por grupos dos compostos de acordo com suas indicações terapêuticas, mantendo primeiramente os resultados das análises de efeitos letais nas neonatas de *D. similis* e, posteriormente, as análises de inibição do desenvolvimento embrionário dos Pluteus de *E. lucunter*.

Os resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* foram obtidos pela leitura dos organismos que tiveram imobilidade ou mortalidade quando expostos a determinadas concentrações e, posteriormente o cálculo foi realizado para encontrar a CE_{50} .

Já, os resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* serviram para avaliar o desenvolvimento do embrião e formação das larvas dos organismos, a partir do momento que os embriões foram expostos as substâncias-teste em determinadas concentrações, para simular os efeitos de efluentes lançado ao ambiente aquático pela liberação dessas substâncias.

Considerando que a Diretiva 93/67/CEE avaliar e afirmar que as substâncias químicas não são tóxicas quando o valor da CE_{50} aparecer acima de 100mg.L^{-1} , os ensaios foram realizados com até 1000mg.L^{-1} , para obter, os devidos valores de CE_{50} , mesmo classificados como não tóxicos.

O controle positivo de DMSO, que foi utilizado na diluição de substâncias, não apresentou diferença significativa comparada ao controle de água, onde apresentou mais de 80% dos organismos normais, o que não indica efeito adverso. Todos os valores dos parâmetros físico-químicos (pH e OD), realizados nos ensaios estão representados nos Apêndices A e B e, estão dentro dos limites de tolerância para espécie.

5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES NO SISTEMA DIGESTIVO

5.1.1 ENSAIOS COM OS COMPOSTOS DO GRUPO DA ALCACHOFRA

O vegetal não apresentou toxicidade em 1000mg.L^{-1} . Os dados paralelos das outras substâncias analisadas nos ensaios de toxicidade com *D. similis*, com as

concentrações estudadas, estão representados nas figuras 16 e 17 e, os resultados comparativos deste grupo estão na Tabela 9.

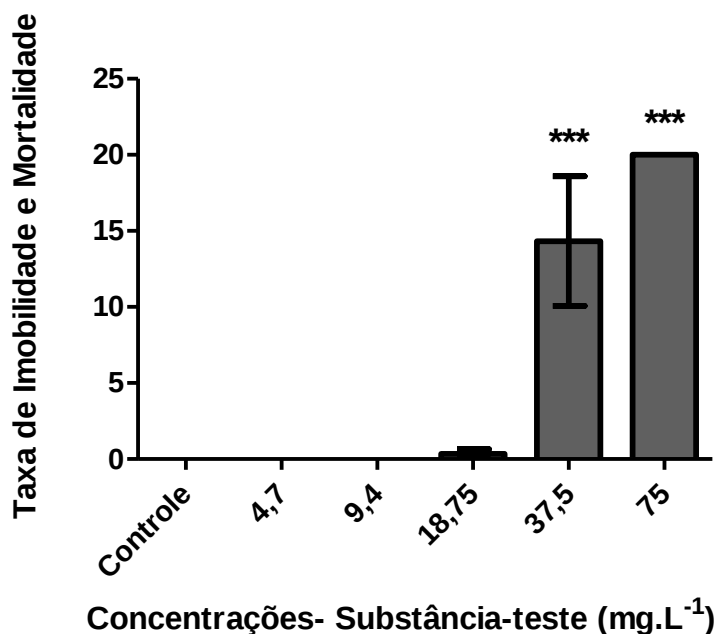


Figura 16- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Ácido Clorogênico. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

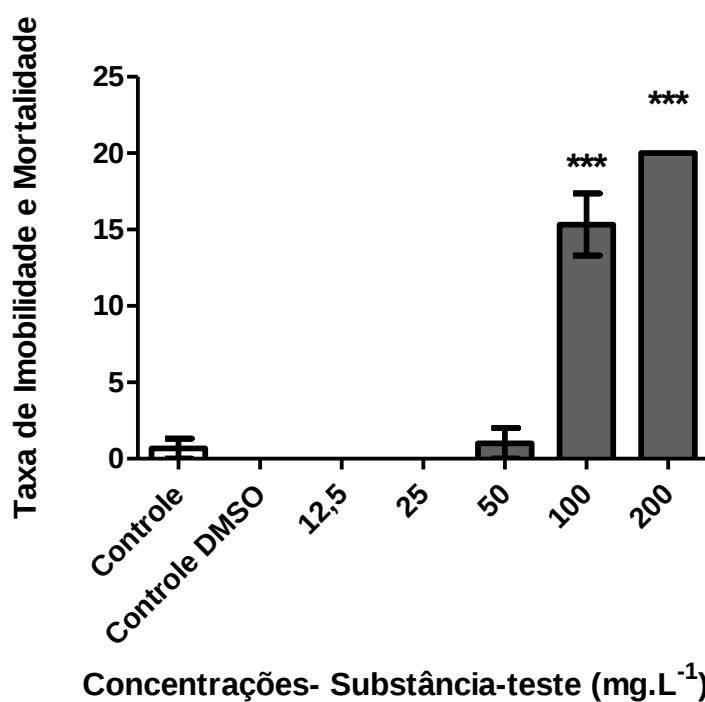


Figura 17- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Ácido Ursodesoxicólico. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabela 9- Resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* referente ao grupo da Alcachofra.

Ensaio	Alcachofra CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Ácido Clorogênico CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Á. Ursodesoxicólico CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	> 1000	25,61	75,79
2	> 1000	43,08	67,41
3	> 1000	29,42	93,30
Média	>1000	32,70	78,84
DP	---	9,19	13,21
CV (%)	---	28,09	16,75
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	---	36,64	91,65
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	---	29,21	67,84

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

Os resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* estão apresentados nas Figuras 18, 19 e 20 e, na tabela 10 estão os valores de CI₅₀ e os IC (intervalos de confiança) superiores e inferiores.

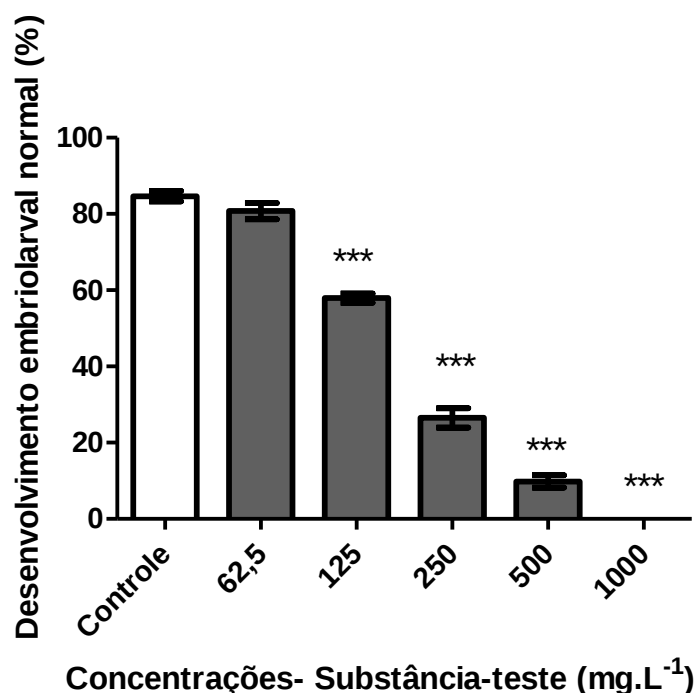


Figura 18- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Alcachofra. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$.**

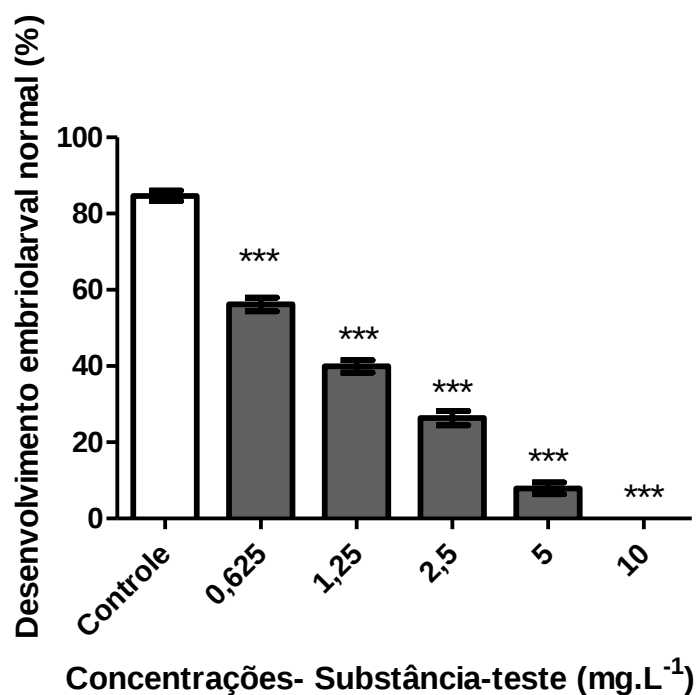


Figura 19- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Ácido Clorogênico. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

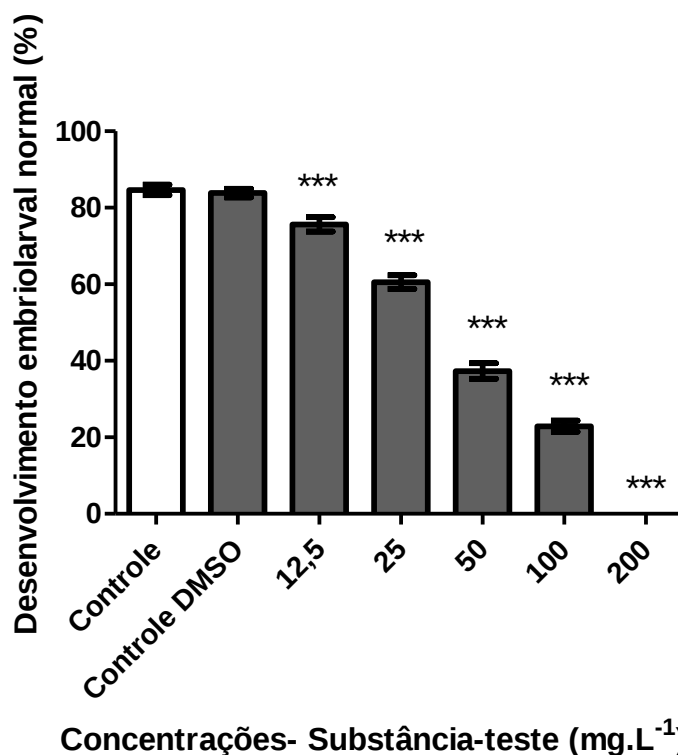


Figura 20- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Ácido Ursodesoxicólico. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabela 10- Resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* referente ao grupo da Alcachofra.

Ensaio	Alcachofra CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Ácido Clorogênico CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Á. Ursodesoxicólico CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	163,30	1,05	40,65
2	170,45	1,16	45,42
3	194,51	2,32	48,14
Média	176,10	1,51	44,74
DP	16,35	0,70	3,80
CV (%)	9,28	46,60	8,50
CENO	62,5	<0,625	<12,5
CEO	125	0,625	12,5
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	186,41	2,03	51,93
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	164,60	1,03	40,74

CI50- Concentração Inibitória 50%; CEO- Concentração de Efeito Observado; CENO- Concentração de Efeito Não Observado; IC- Intervalo de Confiança.

5.1.2 ENSAIOS COM OS COMPOSTOS DO GRUPO DA CASCARA SAGRADA

As substâncias com as concentrações estudadas deste grupo para os ensaios com *D. similis* estão nas Figuras 21, 22 e 23 e, os resultados gerais na Tabela 11.

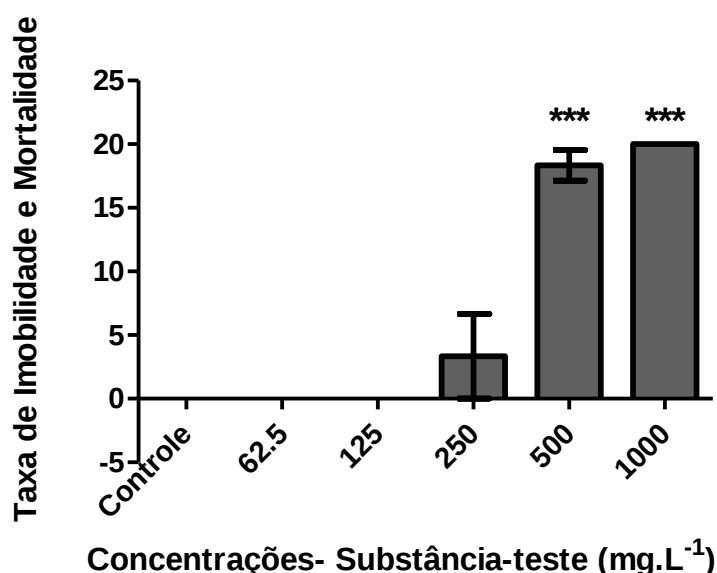


Figura 21- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Cascara Sagrada. Os valores expressados representam a média ± erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: *p<0.05; **p<0.01; * p<0.001.**

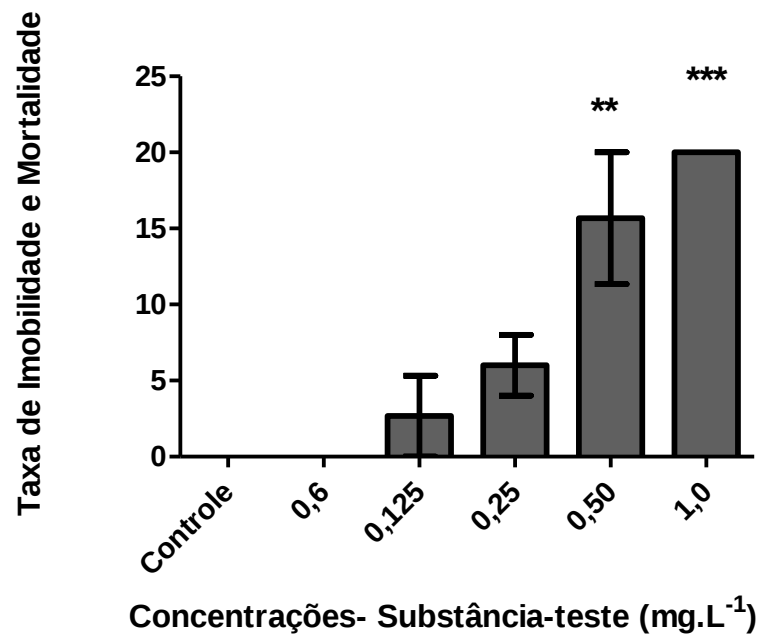


Figura 22- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Dihidroxi-antraquinona. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

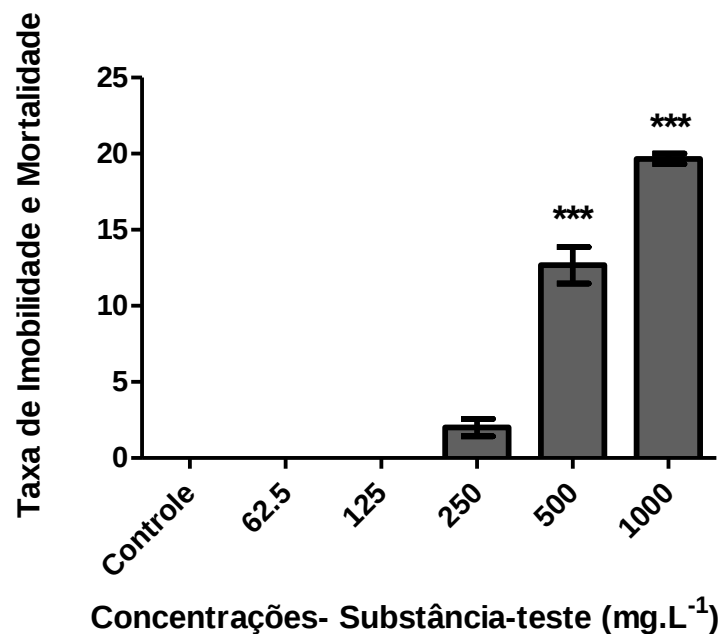


Figura 23- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Sulfato de Magnésio. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabela 11- Resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* referente ao grupo da Cascara Sagrada.

Ensaio	Cascara Sagrada	Dihidroxiantraquinona	Sulfato de magnésio
	CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	269,84	0,19	713,26
2	318,64	0,48	726,21
3	277,39	0,31	807,93
Média	288,62	0,33	749,13
DP	26,27	0,14	51,33
CV (%)	9,10	44,60	6,85
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	336,9	0,39	876,42
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	247,3	0,27	640,67

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

Os ensaios de toxicidade com *E. lucunter* estão expressados nas Figuras 24, 25 e 26. Na tabela 12 estão os valores de Cl₅₀.

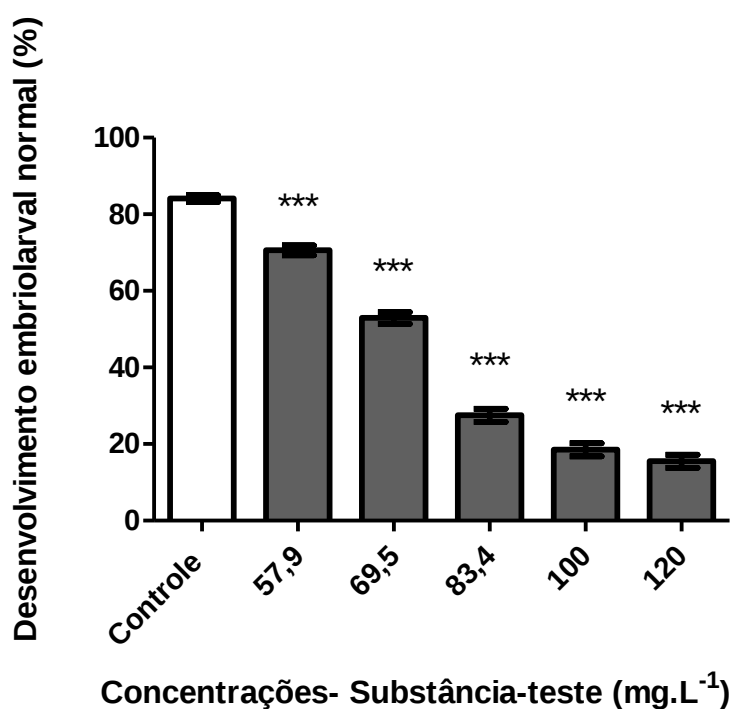


Figura 24- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Cascara Sagrada. Os valores expressados representam a média ± erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: *p<0.05; **p<0.01; * p<0.001.**

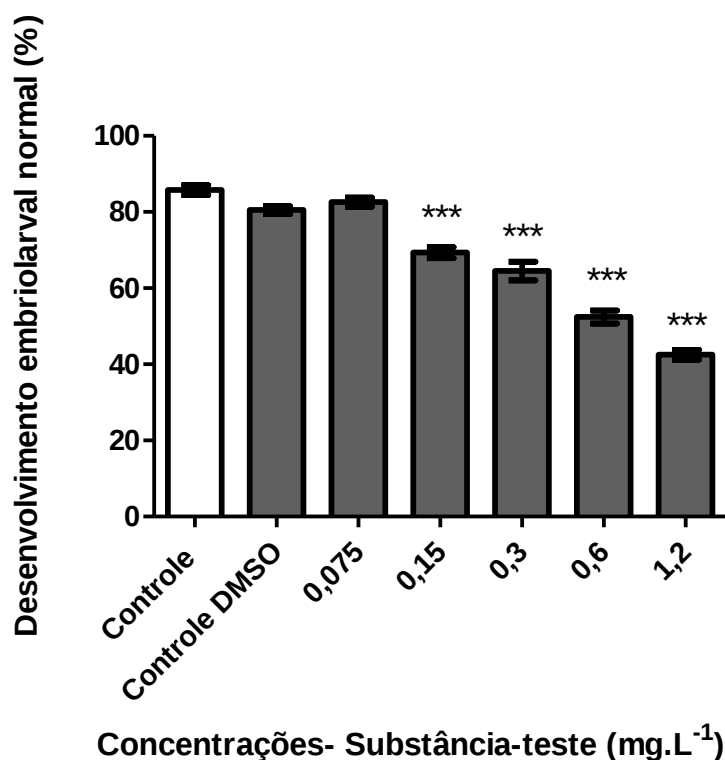


Figura 25- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Dihidroxi-antraquinona. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

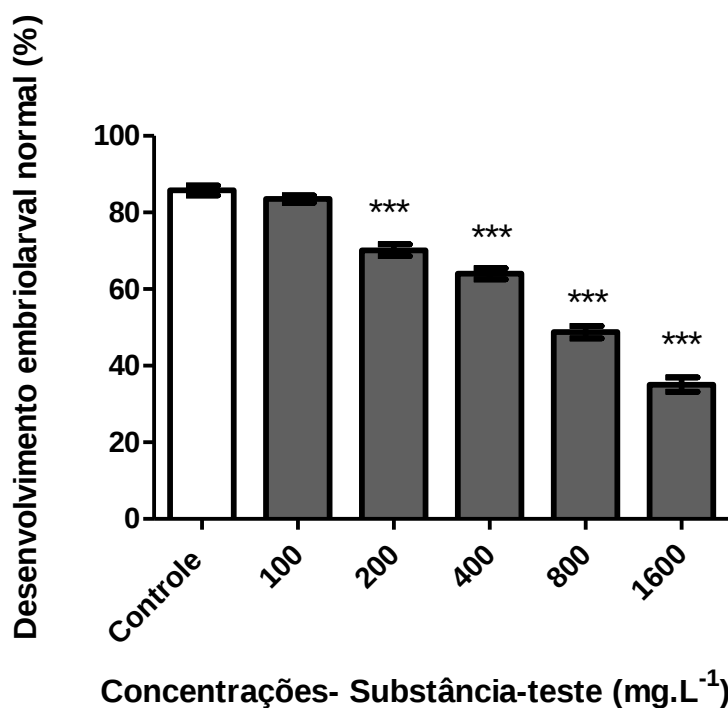


Figura 26- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Sulfato de Magnésio. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Tabela 12- Resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* referente ao grupo da Cascara Sagrada.

Ensaio	Cascara Sagrada	Dihidroxi-antraquinona	Sulfato de Magnésio
	CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	75,95	1,02	1075,40
2	74,40	1,13	1226,67
3	75,69	1,08	1167,12
Média	75,35	1,08	1156,40
DP	0,83	0,05	76,20
CV (%)	1,10	5,11	6,60
CENO	< 57,9	0,075	100
CEO	57,9	0,15	200
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	77,24	---	1326,90
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	73,81	---	864,87

CI50- Concentração Inibitória 50%; CEO- Concentração de Efeito Observado; CENO- Concentração de Efeito Não Observado; IC- Intervalo de Confiança.

5.1.3 ENSAIOS COM OS COMPOSTOS DO GRUPO DA ESPINHEIRA SANTA

O vegetal, Espinheira Santa, apresentou a toxicidade superior a 1000mg.L⁻¹. Já, os resultados das outras substâncias estão nas figuras 27 e 28, e na Tabela 13.

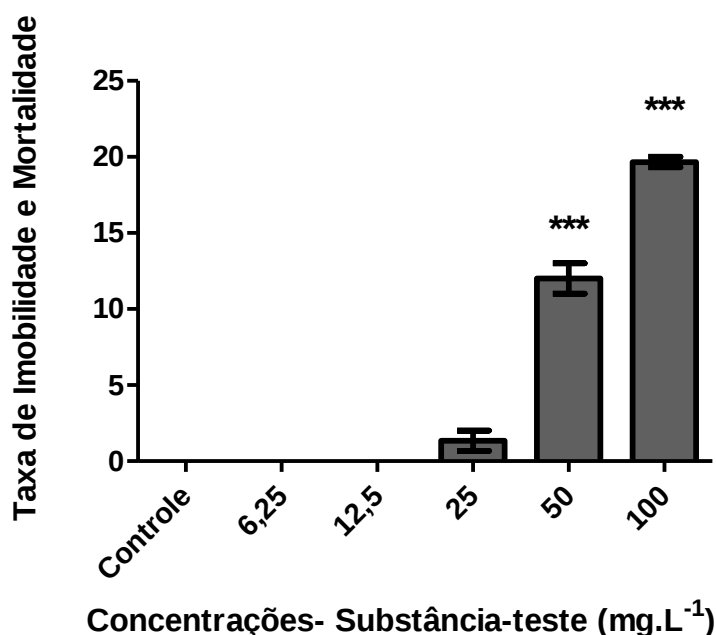


Figura 27- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Epicatequina. Os valores expressados representam a média ± erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: *p<0.05; **p<0.01; *p<0.001.**

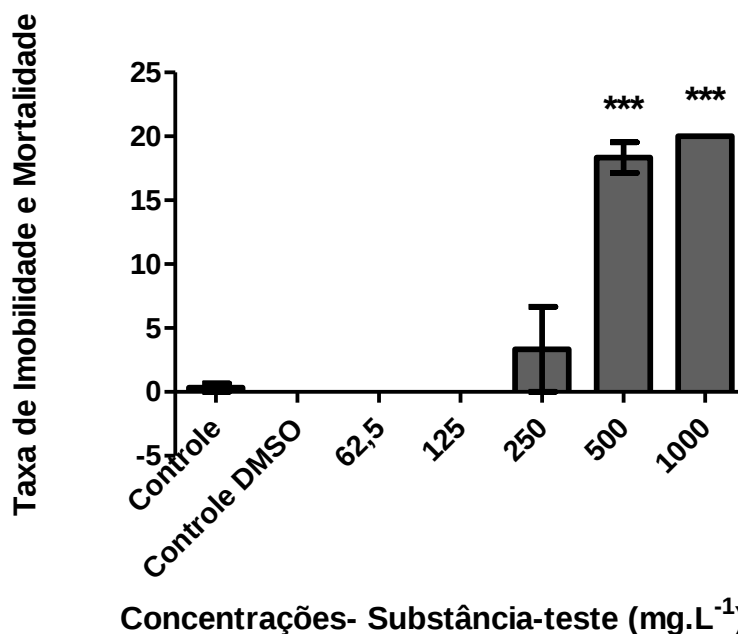


Figura 28- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Omeprazol. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabela 13- Resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* referente ao grupo da Espinheira Santa.

Ensaio	Espinheira Santa CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Epicatequina CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Omeprazol CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	> 1000	39,23	366,02
2	> 1000	46,29	251,47
3	> 1000	43,53	406,13
Média	>1000	43,01	341,21
DP	---	3,56	80,26
CV (%)	---	8,27	23,52
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	---	51,36	381,65
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	---	36,04	305,42

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

Os resultados dos ensaios com *E. lucunter* foram apresentados nas Figuras 29, 30 e 31. Os valores das CI50 estão representados na Tabela 14.

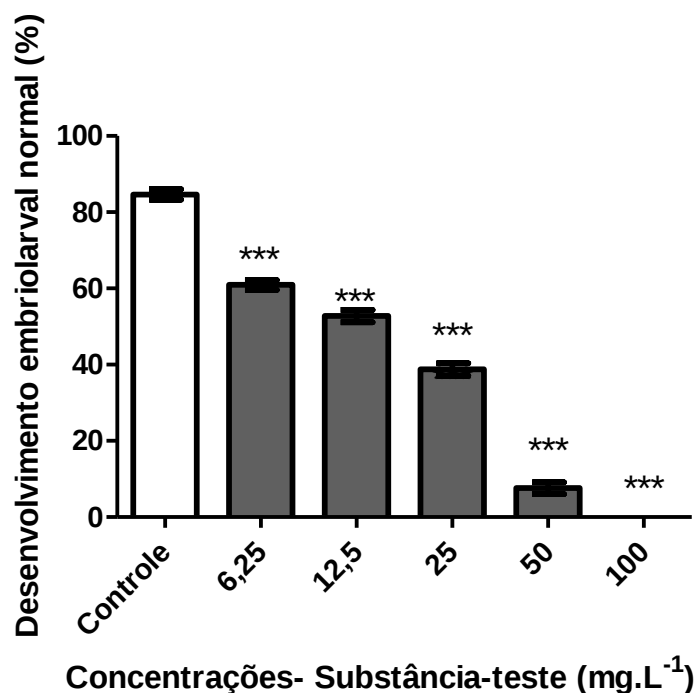


Figura 29- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Espinheira Santa. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

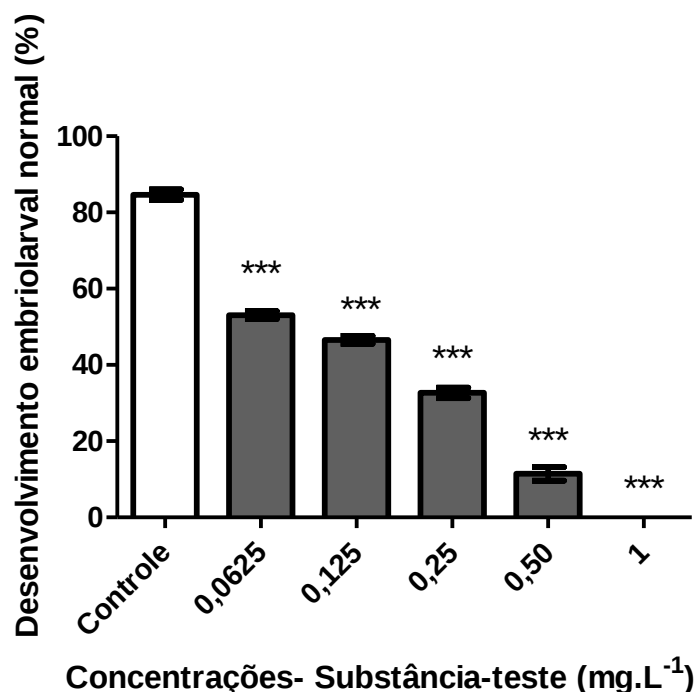


Figura 30- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Epicatequina. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

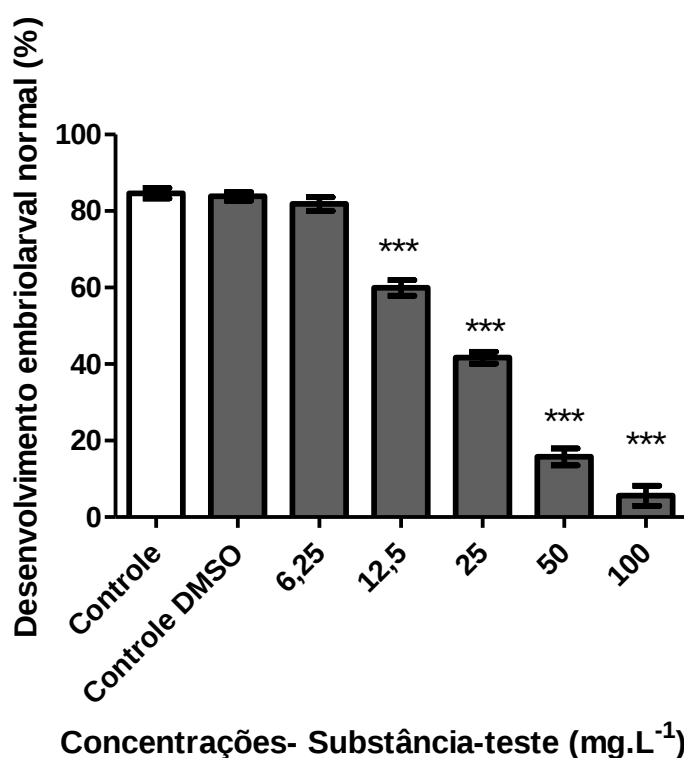


Figura 31- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Omeprazol. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabela 14- Resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* referente ao grupo da Espinheira Santa.

Ensaio	Espinheira Santa Cl ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Epicatequina Cl ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Omeprazol (mg.L ⁻¹)
1	21,68	0,15	24,95
2	20,24	0,16	23,21
3	23,47	0,17	25,45
Média	21,80	0,16	24,54
DP	1,62	0,01	1,17
CV (%)	7,42	6,25	4,79
CENO	< 6,25	< 0,0625	6,25
CEO	6,25	0,0625	12,5
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	26,90	0,19	27,20
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	17,0	0,13	21,50

Cl50- Concentração Inibitória 50%; CEO- Concentração de Efeito Observado; CENO- Concentração de Efeito Não Observado; IC- Intervalo de Confiança.

5.1.4 ENSAIOS COM OS COMPOSTOS DO GRUPO DA HORTELÃ

Os resultados de cada substância estudadas com *D. similis* estão representados nas figuras 32, 33 e 34 e, os resultados finais na Tabela 15.

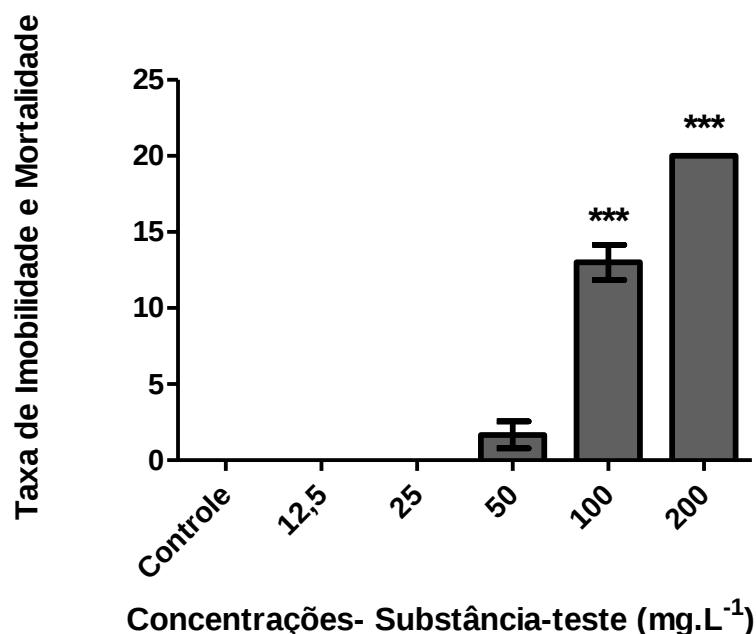


Figura 32- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Hortalã. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

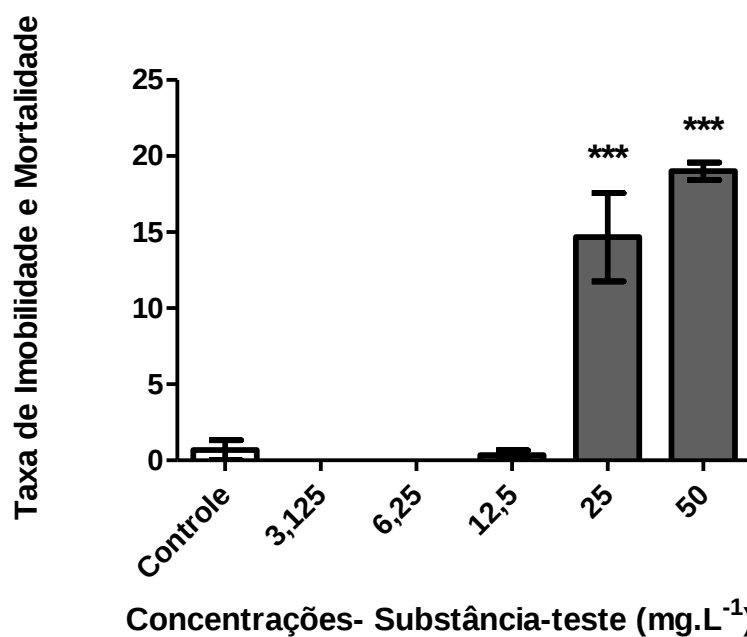


Figura 33- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Mentol. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

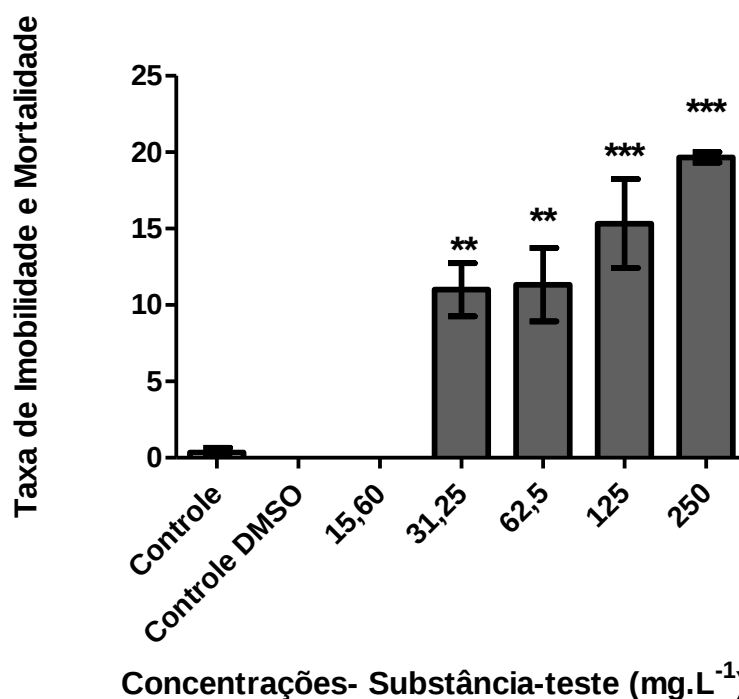


Figura 34- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Prednisona. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabela 15- Resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* referente ao grupo da Hortelã.

Ensaio	Hortelã CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Mentol CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Prednisona CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	75,79	23,37	31,23
2	90,13	21,82	71,79
3	90,13	25,0	49,67
Média	85,35	23,40	50,89
DP	8,28	1,59	20,31
CV (%)	9,70	6,80	39,90
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	100,86	27,82	65,74
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	72,23	19,68	39,45

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

Os valores médios dos resultados dos ensaios com *E. lucunter* estão apresentados nos gráficos, com as concentrações estudadas para o grupo (Figuras 35, 36 e 37) e, na Tabela 16 estão os valores de CI50.

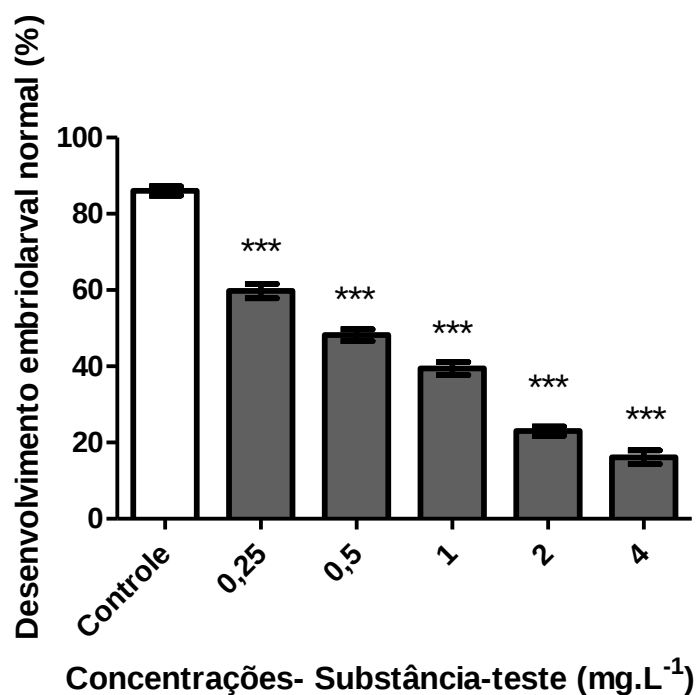


Figura 35- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Hortelã. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

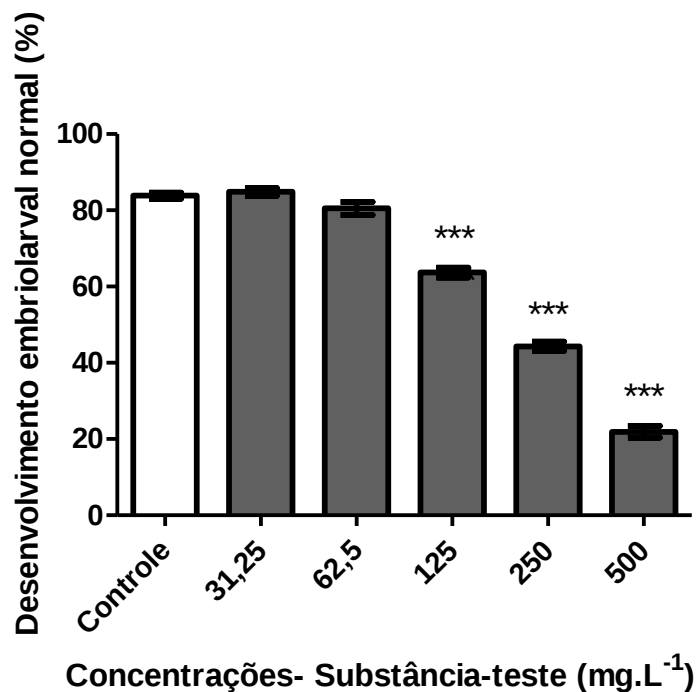


Figura 36- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Mentol. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

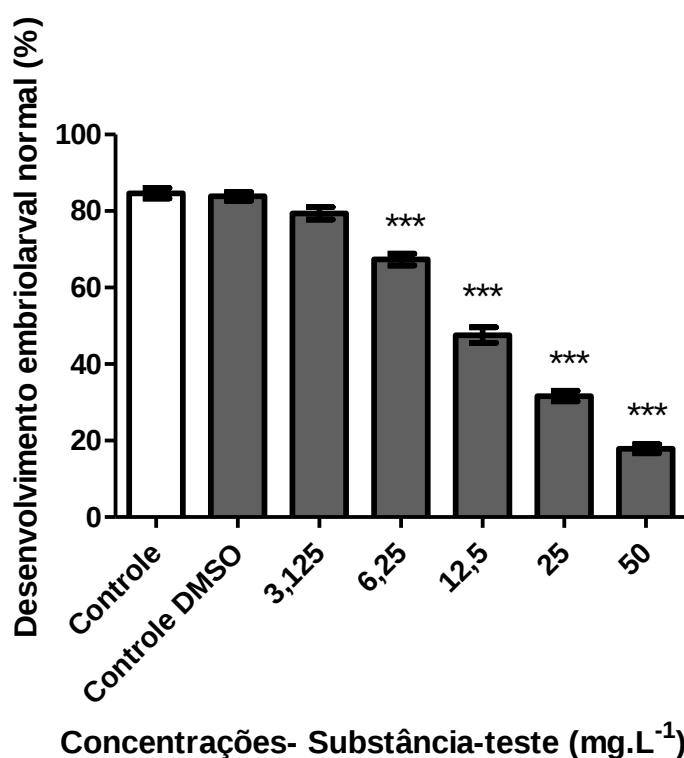


Figura 37- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Prednisona. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Tabela 16- Resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* referente ao grupo da Hortelã.

Ensaio	Hortelã CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Mentol CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Prednisona CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	0,79	293,95	17,96
2	0,93	270,35	15,20
3	0,66	256,80	15,57
Média	0,79	273,70	16,24
DP	0,13	18,80	1,50
CV (%)	17,02	6,87	9,22
CENO	< 0,25	62,5	3,125
CEO	0,25	125	6,25
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	1,03	306,19	18,83
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	0,57	242,18	12,57

CI50- Concentração Inibitória 50%; CEO- Concentração de Efeito Observado; CENO- Concentração de Efeito Não Observado; IC- Intervalo de Confiança.

5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS UTILIZADOS COMO ANTI-INFLAMATÓRIOS

5.2.1 ENSAIOS COM OS COMPOSTOS DO GRUPO DA GARRA- DO- DIABO

O vegetal e o marcador de referência deste grupo com as concentrações estudadas a partir dos ensaios com *D. similis* estão representadas nas figuras 38 e 39 e, as CE_{50} na Tabela 17. O composto sintético equivalente para o grupo é a Prednisona e suas concentrações e resultados foram apresentados na Figura 34.

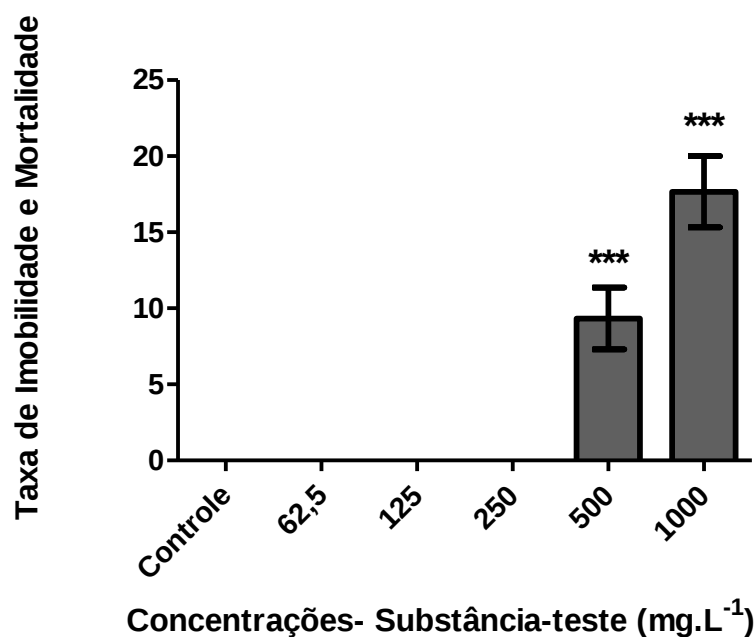


Figura 38- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Garra- do- diabo. Os valores expressados representam a média ± erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

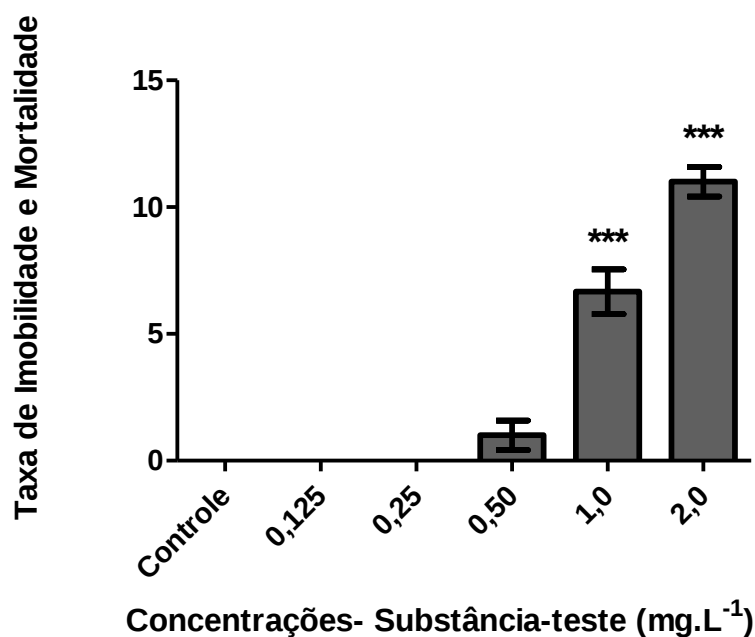


Figura 39- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Harpagosídeo. Os valores expressados representam a média ± erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabela 17- Resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* referente ao grupo da Garra-do- Diabo.

Ensaio	Garra- do- Diabo CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Harpagosídeo CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Prednisona CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	450,63	2,0	31,23
2	743,0	1,43	71,79
3	517,63	1,78	49,67
Média	570,42	1,74	50,89
DP	153,17	0,29	20,31
CV(%)	26,85	16,55	39,90
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	708,95	2,58	65,74
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	461,4	0,99	39,45

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

Os resultados dos ensaios com *E. lucunter* estão representados nos gráficos a seguir (Figuras 40 e 41) e, na tabela 18. Os resultados da Prednisona foram apresentados na Figura 37.

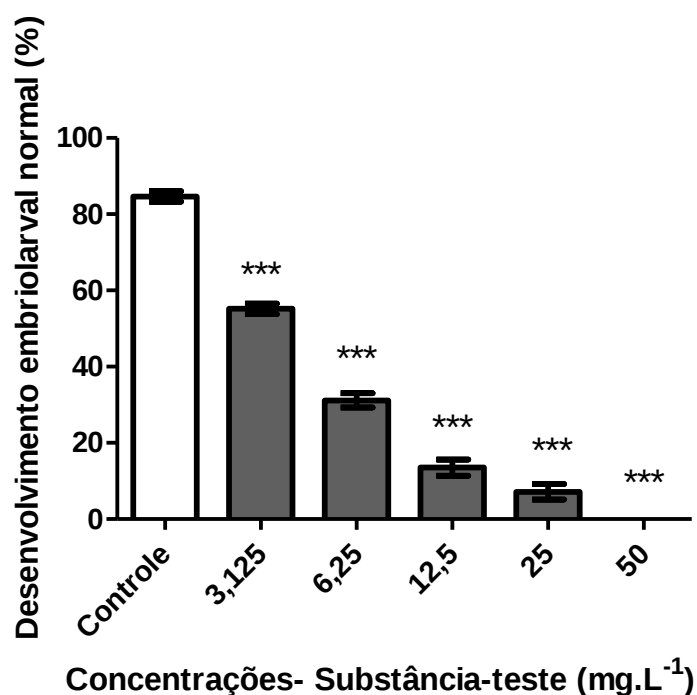


Figura 40- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Garra- do- diabo. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

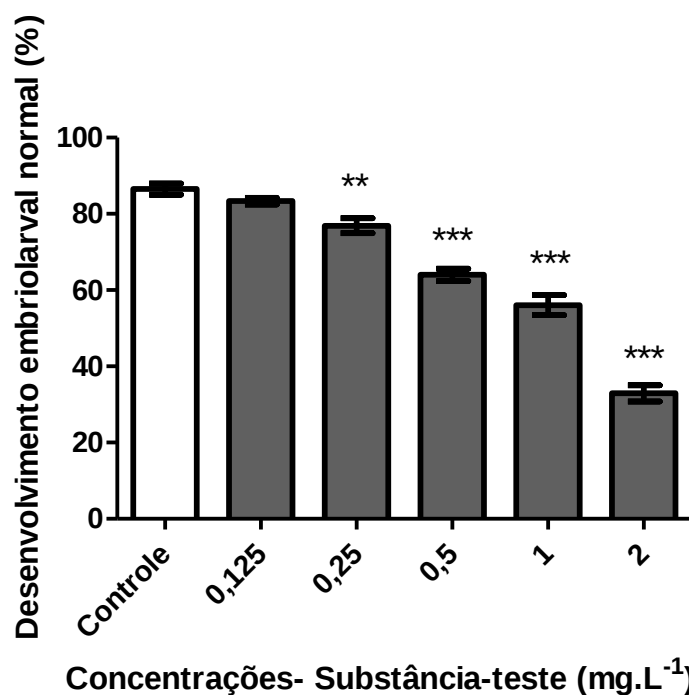


Figura 41- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Harpagosídeo. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabela 18- Resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* referente ao grupo da Garra-do- Diabo.

Ensaio	Garra- do- Diabo CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Harpagosídeo CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Prednisona (mg.L ⁻¹)
1	4,57	1,24	17,96
2	4,51	1,64	15,20
3	5,10	1,74	15,57
Média	4,73	1,54	16,24
DP	0,32	0,26	1,50
CV (%)	6,90	17,18	9,22
CENO	< 3,125	0,125	3,125
CEO	3,125	0,25	6,25
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	5,31	1,57	18,83
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	4,26	1,30	12,57

CI50- Concentração Inibitória 50%; CEO- Concentração de Efeito Observado; CENO- Concentração de Efeito Não Observado; IC- Intervalo de Confiança.

5.2.2 ENSAIOS COM OS COMPOSTOS DO GRUPO DO SALGUEIRO

Os ensaios com o Salgueiro apresentaram sua toxicidade acima de 1000mg.L⁻¹, por isso seus resultados não foram expressados nos gráficos. Os resultados do marcador de referência e do composto sintético equivalente, a partir dos ensaios com *D. similis* estão representados nas figuras 42 e 43 e, as CE₅₀ deste grupo estão na Tabela 19.

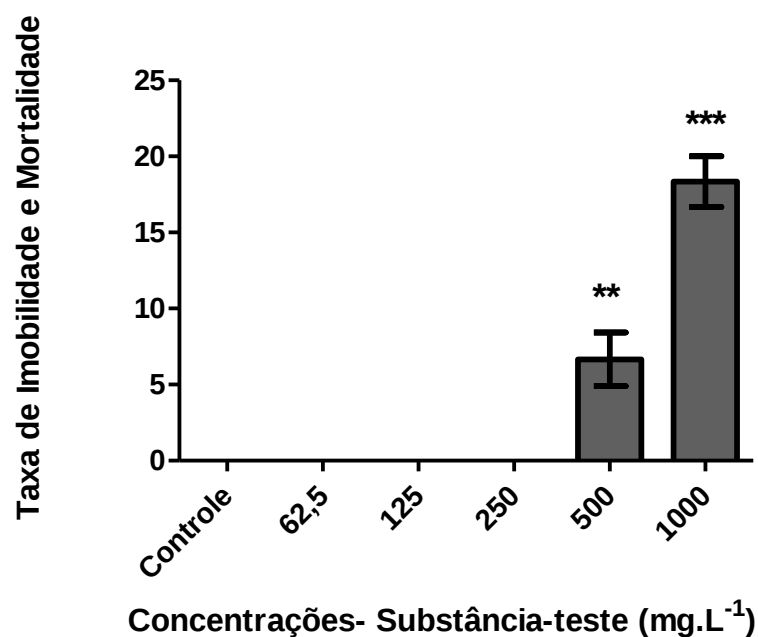


Figura 42- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Salicina. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

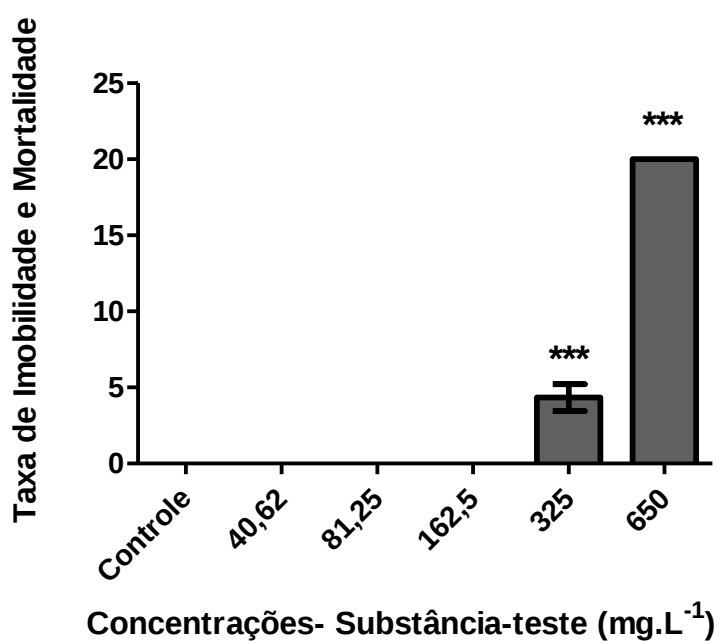


Figura 43- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Ácido Acetilsalicílico. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabela 19 Resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* referente ao grupo do Salgueiro.

Ensaio	Salgueiro CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Salicina CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Ácido Acetilsalicílico CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	> 1000	679,09	414,23
2	> 1000	500,0	400,12
3	> 1000	615,57	373,33
Média	> 1000	598,22	395,9
DP	---	90,80	20,80
CV (%)	---	15,18	5,25
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	---	766,5	448,65
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	---	474,9	349,4

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

Os resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* para o grupo do Salgueiro estão nas Figuras 44, 45 e 46 e, na Tabela 20 estão os valores de CI50 e os IC superiores e inferiores.

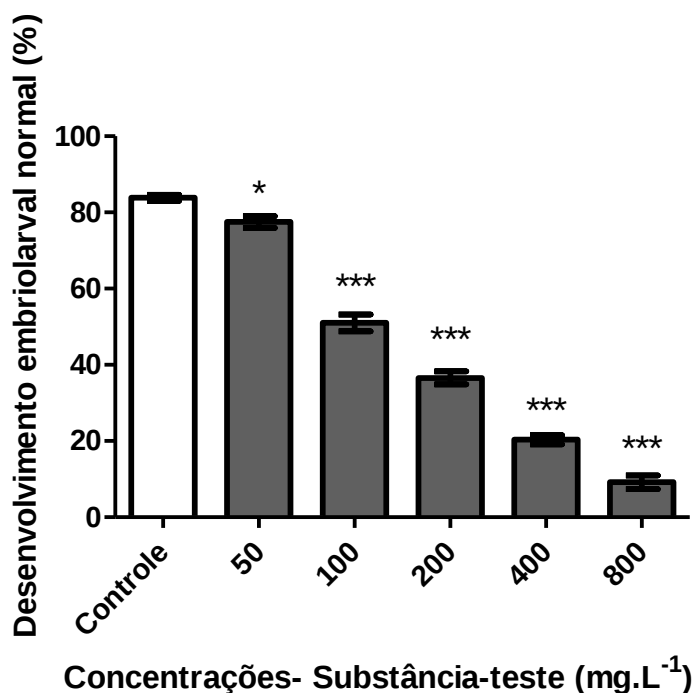


Figura 44- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Salgueiro. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$.**

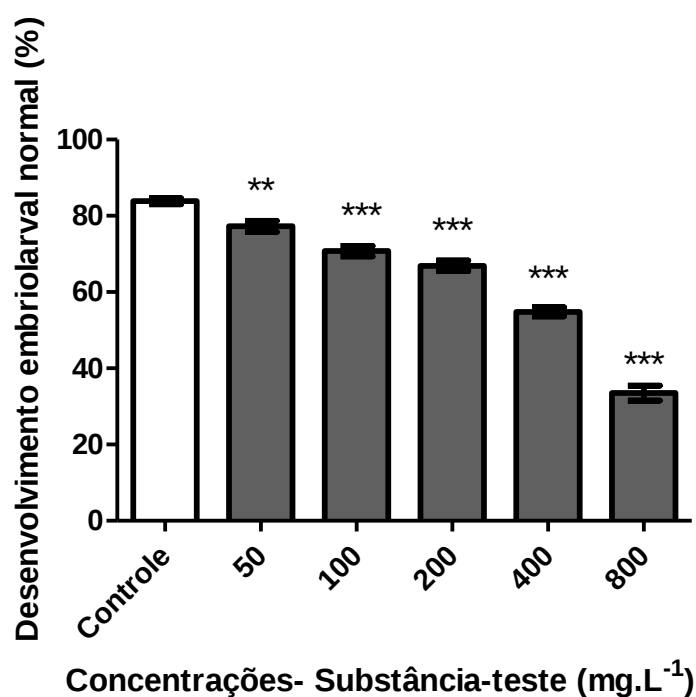


Figura 45- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Salicina. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

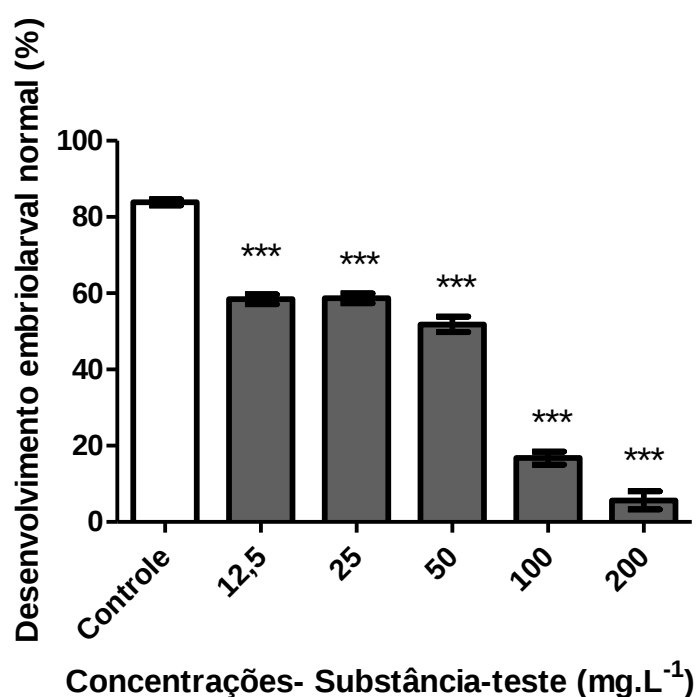


Figura 46- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações do Ácido Acetilsalicílico. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Tabela 20- Resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* referente ao grupo do Salgueiro.

Ensaio	Salgueiro CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Salicina CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Ácido Acetilsalicílico CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	166,18	785,50	64,21
2	174,50	577,78	66,47
3	155,11	596,52	60,50
Média	165,26	653,26	63,73
DP	9,73	114,90	3,01
CV (%)	5,90	17,58	4,73
CENO	< 50,0	< 50,0	< 12,5
CEO	50,0	50,0	12,5
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	198,13	548,56	68,81
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	126,04	634,30	57,54

CI50- Concentração Inibitória 50%; CEO- Concentração de Efeito Observado; CENO- Concentração de Efeito Não Observado; IC- Intervalo de Confiança.

5.2.3 ENSAIOS COM OS COMPOSTOS DO GRUPO DA UNHA DE GATO

Mais uma vez, como composto sintético foi utilizado a Prednisona (Figura 34). O resultado que resumem a toxicidade do vegetal estão Figura 47 e na Tabela 21.

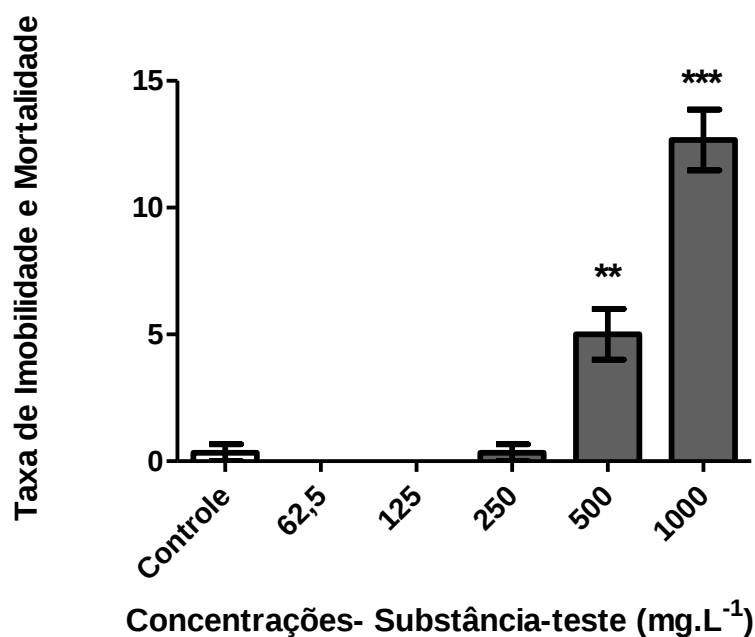


Figura 47- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Unha de gato. Os valores expressados representam a média ± erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: *p<0.05; **p<0.01; *p<0.001.**

Tabela 21- Resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* referente ao grupo da Unha de gato.

Ensaio	Unha de gato CE_{50} (mg.L ⁻¹)	Prednisona CE_{50} (mg.L ⁻¹)
1	865,54	31,23
2	870,55	71,79
3	679,09	49,67
Média	772,31	50,89
DP	455,54	20,31
CV	17,07	39,90
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	1198,61	65,74
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	546,26	39,45

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

Os resultados dos ensaios de toxicidade com o *E. lucunter* estão na Figura 48 e na tabela 22, os resultados com a Prednisona foram apresentados na Figura 37.

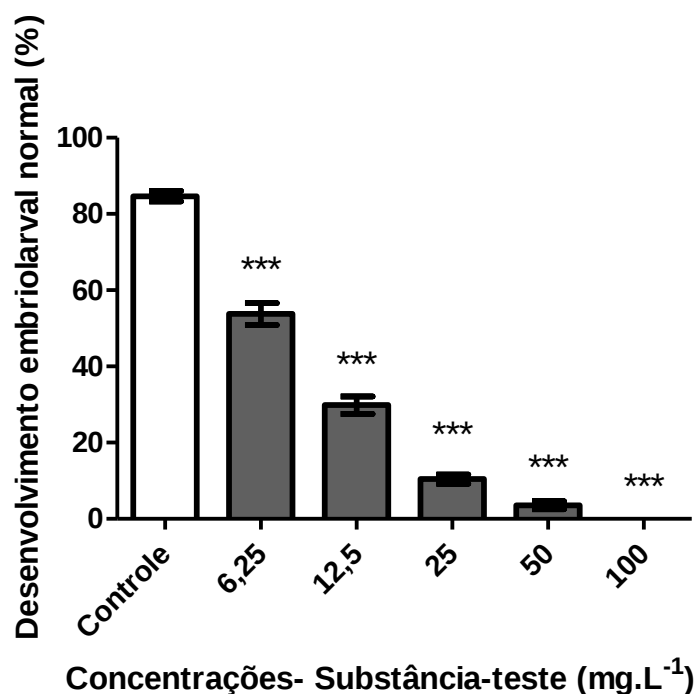


Figura 48- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações do Unha de gato. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$.**

Tabela 22- Resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* referente ao grupo Unha de gato.

Ensaio	Unha de gato CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Prednisona CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	9,08	17,96
2	8,62	15,20
3	10,06	15,57
Média	9,25	16,24
DP	0,73	1,50
CV (%)	7,95	9,22
CENO	< 6,25	3,125
CEO	6,25	6,25
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	13,45	18,83
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	7,69	12,57

CI50- Concentração Inibitória 50%; CEO- Concentração de Efeito Observado; CENO- Concentração de Efeito Não Observado; IC- Intervalo de Confiança.

5.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS UTILIZADOS PARA TRATAMENTOS DIVERSOS

5.3.1 ENSAIOS COM OS COMPOSTOS DO GRUPO DO GUACO

Nas Figuras 49 e 50, estão representados os resultados paralelos da Cumarina e Acetilcisteína, que foram obtidos a partir dos ensaios com *D. similis*, o vegetal Guaco apresentou toxicidade acima de 1000mg.L⁻¹, com isso seus resultados não foram considerados. Na Tabela 23 observa-se os valores de CE₅₀ e CI₅₀ para o grupo estudado.

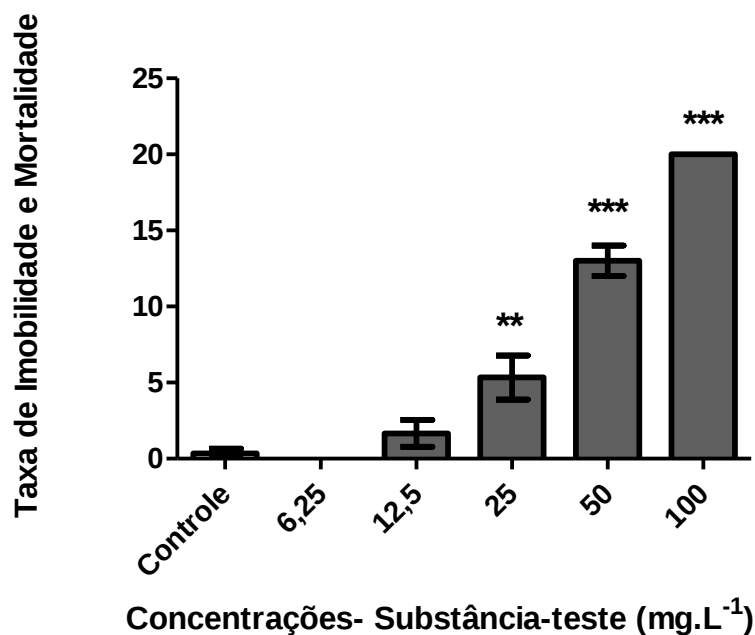


Figura 49- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Cumarina. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

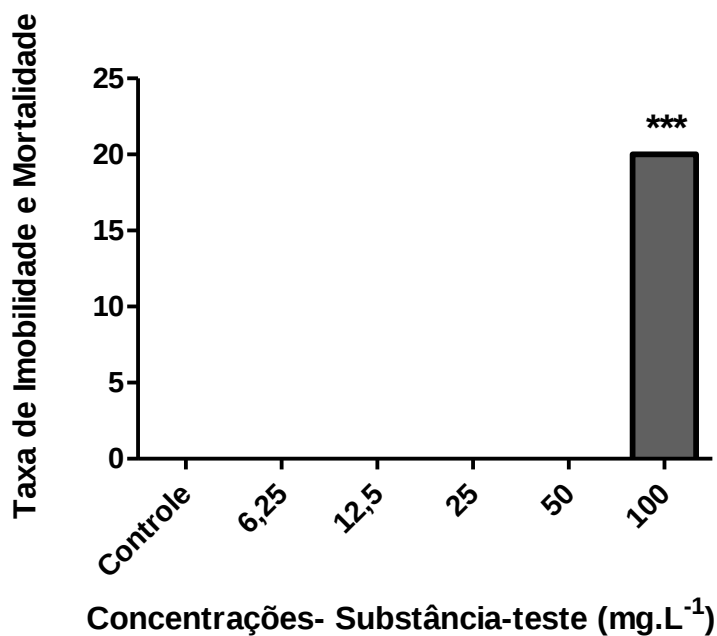


Figura 50- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Acetilcisteína. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Tabela 23- Resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* referente ao grupo do Guaco.

Ensaio	Guaco CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Cumarina CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Acetilcisteína CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	> 1000	42,23	70,71
2	> 1000	36,60	70,71
3	> 1000	29,73	70,71
Média	> 1000	36,19	70,71
DP	---	6,26	0
CV (%)	---	17,30	0
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	---	44,64	---
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	---	29,35	---

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

Os resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* estão apresentados nas Figuras 51, 52 e 53. Já, na tabela 24 estão os valores de CI50 e os IC superiores e inferiores.

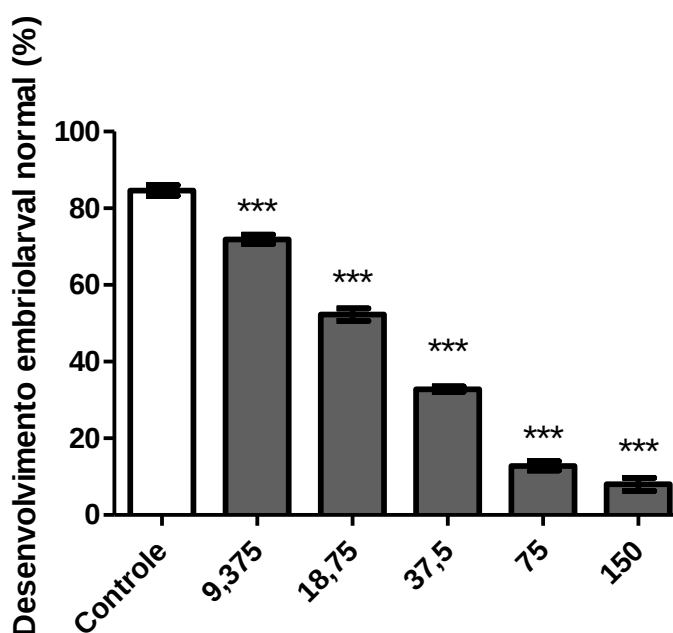


Figura 51- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações do Guaco. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

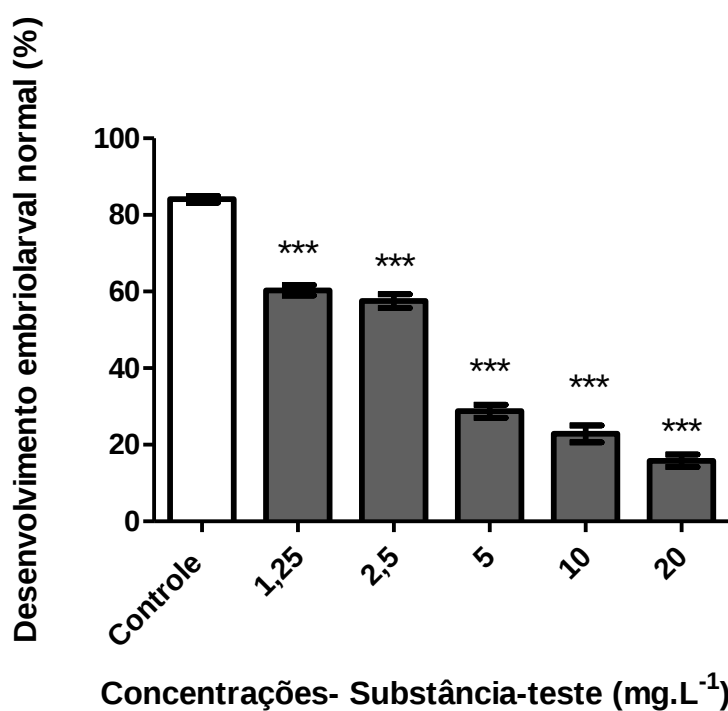


Figura 52- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações da Cumarina. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

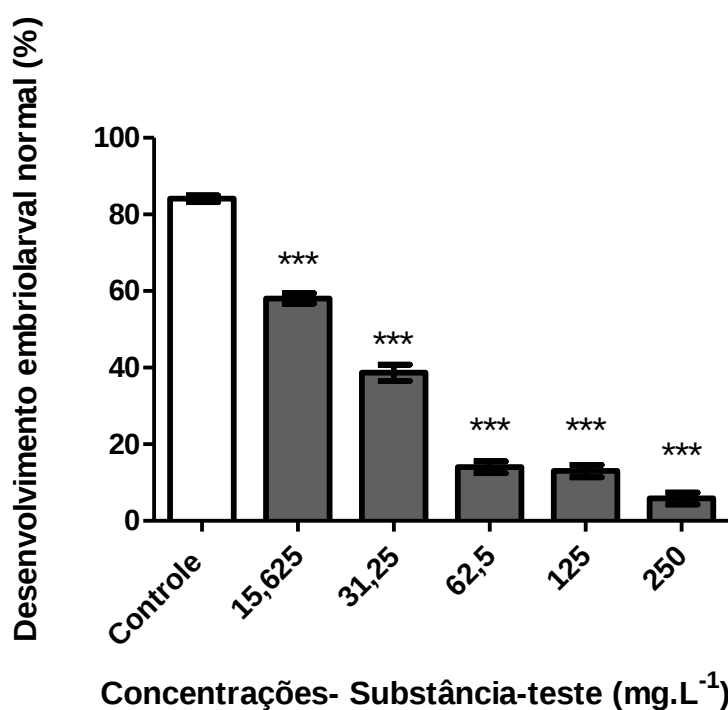


Figura 53- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações da Acetilcisteína. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Tabela 24- Resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* referente ao grupo do Guaco.

Ensaio	Guaco CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Cumaina CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Acetilcisteína (mg.L ⁻¹)
1	28,67	4,06	26,46
2	28,32	3,80	33,18
3	27,77	3,62	28,05
Média	28,25	3,83	29,23
DP	0,45	0,22	3,51
CV (%)	1,60	5,78	12,01
CENO	< 9,375	<1,25	< 15,625
CEO	9,375	1,25	15,625
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	31,0	4,11	33,50
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	24,35	3,56	26,0

CI50- Concentração Inibitória 50%; CEO- Concentração de Efeito Observado; CENO- Concentração de Efeito Não Observado; IC- Intervalo de Confiança.

5.3.2 ENSAIOS COM OS COMPOSTOS DO GRUPO ISOFLAVONA DE SOJA

Os resultados dos ensaios com *D. similis* estão nos gráficos a seguir (Figuras 54, 55, 56 e 57). Já os resultados gerais podem ser observados na Tabela 25.

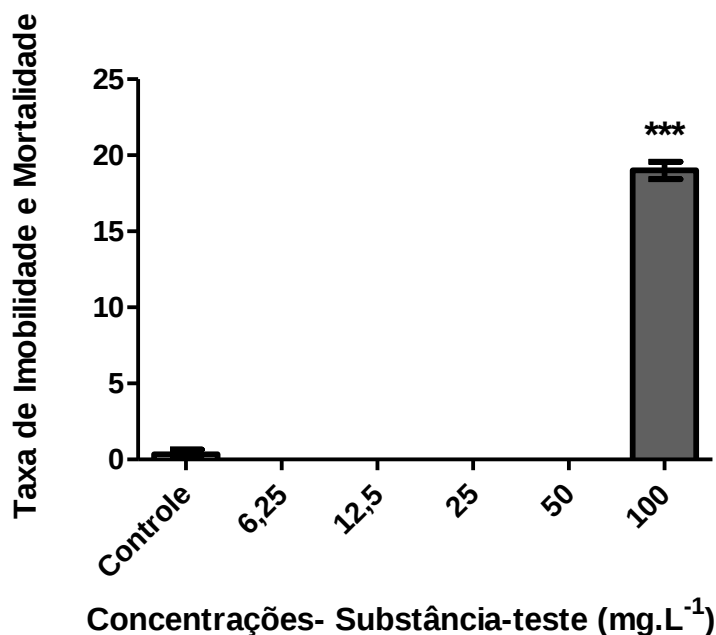


Figura 54- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Isoflavona de Soja. Os valores expressados representam a média ± erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: *p<0.05; **p<0.01; * p<0.001.**

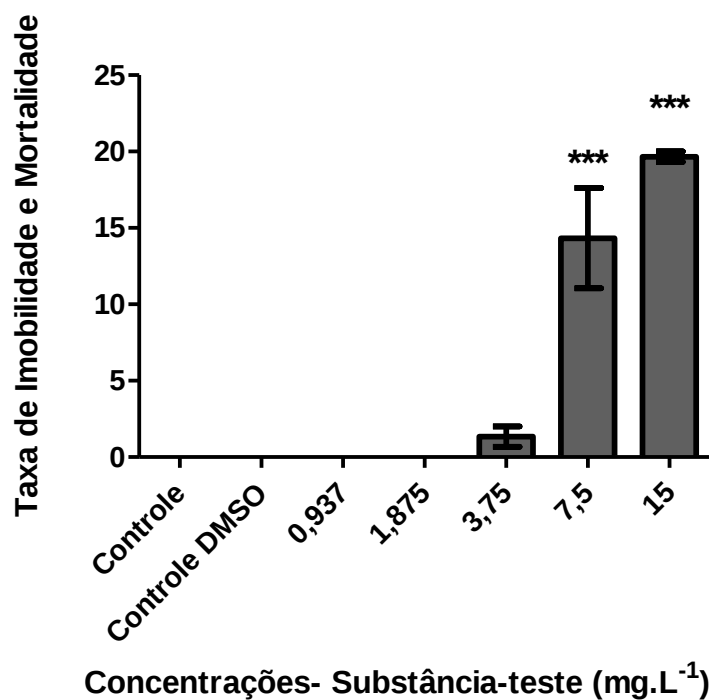


Figura 55- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Genisteina. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

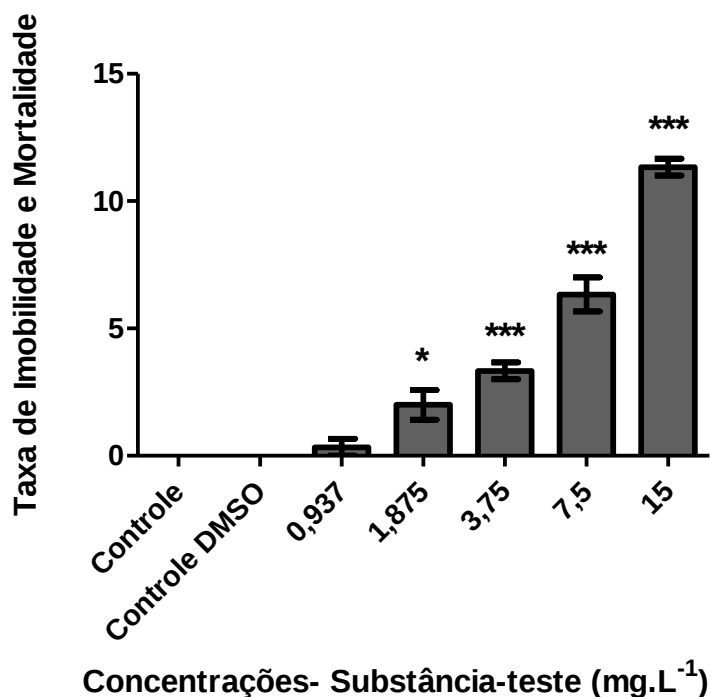


Figura 56- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Daidzeina. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

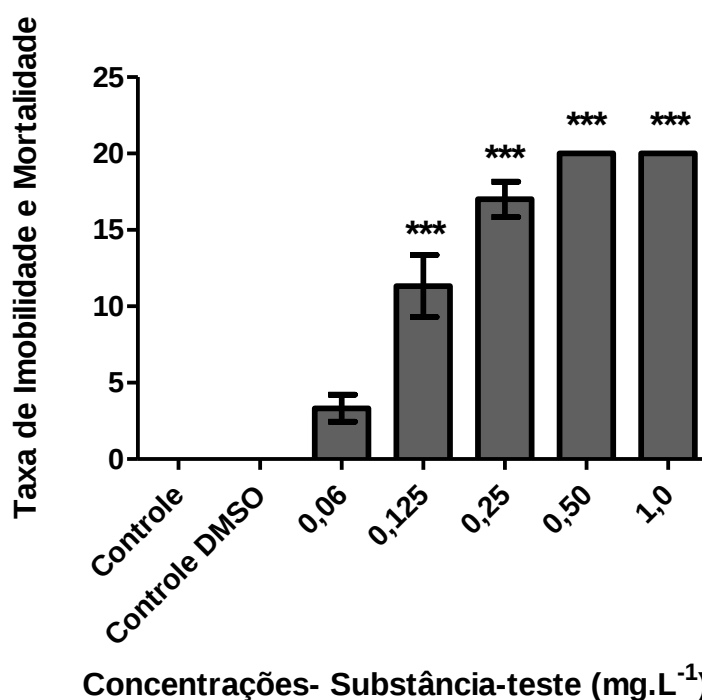


Figura 57- Resultado do ensaio de toxicidade com *D. similis* frente à exposição de diferentes concentrações de Valerato de Estradiol. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Tabela 25- Resultados dos ensaios de toxicidade com *D. similis* referente ao grupo Isoflavona de soja.

Ensaio	Isoflavona de soja CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Genisteína CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Daidzeína CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Valerato de estradiol CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	73,49	7,87	11,37	0,10
2	70,71	6,09	12,61	0,15
3	77,11	5,12	13,36	0,11
Média	73,77	6,36	12,45	0,12
DP	3,21	1,39	1,00	0,03
CV (%)	4,35	21,92	8,07	22,05
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	---	7,41	20,45	0,15
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	---	5,47	7,63	0,09

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

O grupo apresentou valores significativos para os ensaios com *E. lucunter* e, apresentados nos gráficos, (Figuras 58, 59, 60 e 61). Na Tabela 26 estão os valores de CI50 e os IC (intervalos de confiança) superiores e inferiores.

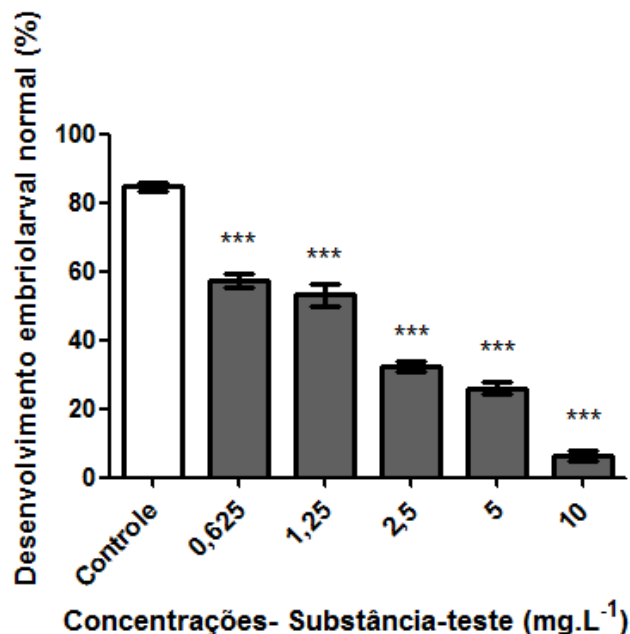


Figura 58- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Isoflavona de Soja. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

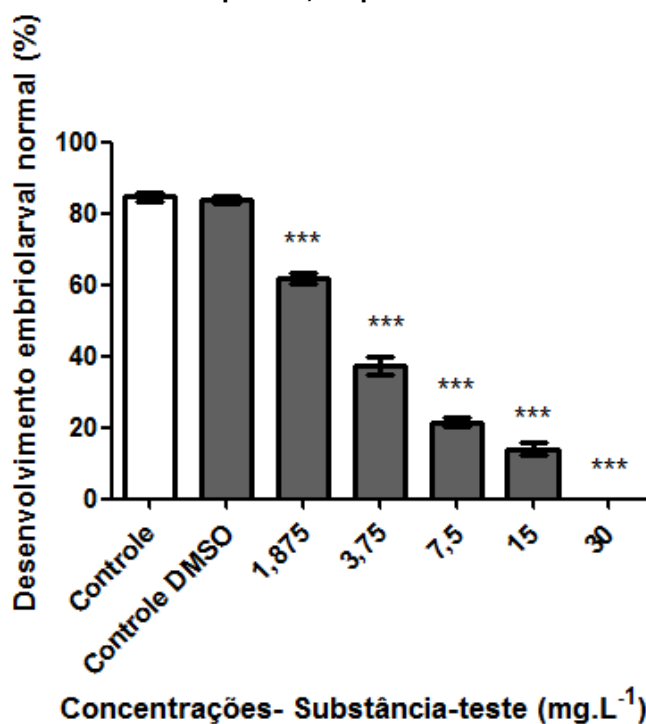


Figura 59- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Genisteína. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

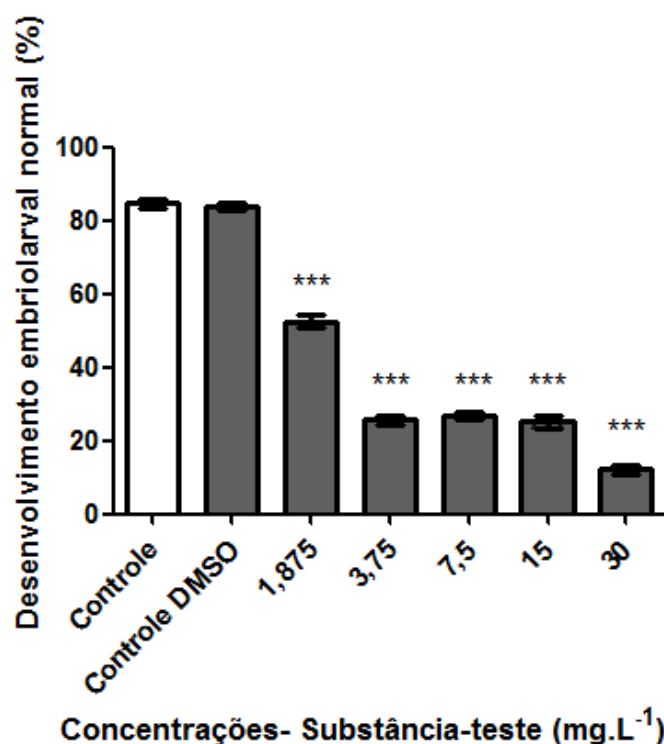


Figura 60- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações da Daidzeina. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

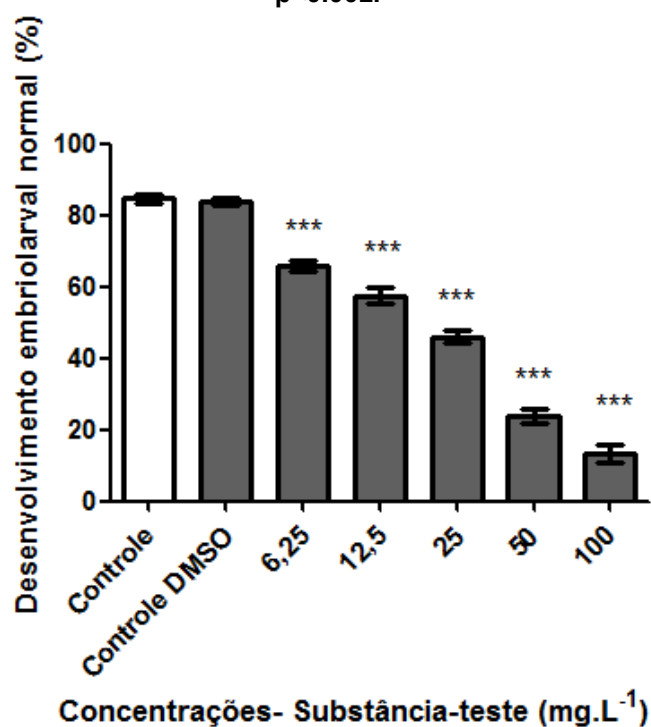


Figura 61- Resultado do ensaio de toxicidade com *E. lucunter* frente à exposição de diferentes concentrações de Valerato de Estradiol. Os valores expressados representam a média $\pm$ erro padrão para cada concentração testada. ANOVA com teste posteriori de Dunnett: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Tabela 26- Resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* referente ao grupo Isoflavona de soja.

Ensaio	Isoflavona de Soja CI₅₀ (mg.L⁻¹)	Genisteína CI₅₀ (mg.L⁻¹)	Daidzeína CI₅₀ (mg.L⁻¹)	Valerato de Estradiol CI₅₀ (mg.L⁻¹)
1	1,80	3,31	2,42	25,77
2	1,87	3,13	2,68	27,38
3	1,91	3,66	2,69	32,07
Média	1,86	3,37	2,60	28,40
DP	0,05	0,27	0,15	3,27
CV (%)	3,0	8,00	5,90	11,52
CENO	< 0,625	< 1,875	< 1,875	< 6,25
CEO	0,625	1,875	1,875	6,25
IC superior (Média em mg.L ⁻¹)	2,11	4,02	2,84	30,41
IC inferior (Média em mg.L ⁻¹)	1,35	3,01	2,35	24,10

CI50- Concentração Inibitória 50%; CEO- Concentração de Efeito Observado; CENO- Concentração de Efeito Não Observado; IC- Intervalo de Confiança.

6. DISCUSSÃO

Os ensaios de toxicidade com o organismo *D. similis* tiveram resultados rápidos, devido à espécie ser altamente sensível a uma grande diversidade de poluentes, o que acaba inibindo o desenvolvimento, causando a imobilidade ou até a mortalidade dos organismos (CETESB, 1990).

Para expressar os resultados dos ensaios com *D. similis*, foi realizado um comparativo que se apresenta na Tabela 27 e, as CE_{50} encontradas foram classificadas de acordo com a Diretiva 93/67/CEE apontada na Tabela 3.

Tabela 27- Comparativo entre os resultados obtidos nos ensaios com *D. similis*, com os órgãos vegetativos, marcadores de referência e princípios ativos sintéticos analisados.

Grupos	Vegetais	CE_{50} (mg.L ⁻¹)	Marcadores de referência	CE_{50} (mg.L ⁻¹)	Compostos sintéticos	CE_{50} (mg.L ⁻¹)
Disfunções do sistema digestivo	Alcachofra	>1000	Ácido clorogênico	32,70	Ácido Ursodesoxicólico	78,84
	Cascara sagrada	288,62	Dihidroxian- traquinona	0,33	Sulfato de Magnésio	749,13
	Espinheira santa	>1000	Epicatequina	43,01	Omeprazol	341,21
	Hortelã	85,35	Mentol	23,40	Prednisona	50,89
Anti- infamatórios	Garra-do- diabo	570,42	Harpagósideo	1,74	Prednisona	50,89
	Salgueiro	>1000	Salicina	598,22	Ácido Acetilsalicílico	395,90
	Unha de gato	772,31	Mitrafilina	----	Prednisona	50,89
Disfunções do sistema respiratório	Guaco	>1000	Cumarina	36,19	Acetilcisteína	70,71
Fito- hormônios	Isoflavona de soja	73,77	Genisteína Daidzeína	6,36 12,45	Valerato de Estradiol	0,12

Nota-se que foram utilizados 1000mg.L⁻¹ para o ensaio de toxicidade com a Alcachofra, porém não foi o suficiente para encontrar sua CE_{50} , classificando essa substância como não tóxica. Já a CE_{50} do seu marcador de referência, Ácido Clorogênico, é de 32,70mg.L⁻¹ e do fármaco sintético, Ursodiol, de 78,84mg.L⁻¹, com isso essas duas substâncias podem ser classificadas como nocivas, mesmo que os valores da CE_{50} de ambos apresentam grande diferença. Cabe ressaltar que o marcador de referência do fitoterápico, ácido clorogênico, apresentou maior toxicidade em relação ao princípio ativo sintético correspondente.

As CE_{50} do vegetal Cascara Sagrada e do princípio ativo sintético, Sulfato de magnésio estão acima de 100mg.L⁻¹, o que demonstra, segundo a Diretiva 93/67/CEE, que as duas substâncias são classificadas como “não tóxicas” ao meio

ambiente, apesar de apresentarem valores de CE_{50} bem distintos, como 288,62 e 749,13mg.L⁻¹, respectivamente. Para a Dihidroxiانtraquinona o valor de CE_{50} foi de 0,33mg.L⁻¹, resultado esperado, já que o marcador de referência apresenta uma maior tendência de bioconcentração, devido ao seu alto valor de Log K_{ow} , ou seja, a Dihidroxiانtraquinona tem uma maior afinidade por substâncias lipofílicas, se atrai facilmente as células do organismos e se acumula no interior delas, prejudicando o metabolismo das neonatas de *D. similis*., com o valor de CE_{50} apresentado, a substância foi classificada como muito tóxico ao ambiente.

Como mencionado nos estudos de Silva (2014), foi confirmado a partir de ensaios de toxicidade que a Espinheira Santa não foi classificada como tóxica, pois sua CE_{50} é maior que 1000mg.L⁻¹, diferente de seu marcador de referência, Epicatequina, que tem a CE_{50} de 43,01mg.L⁻¹, sendo classificada como nociva e, o princípio ativo sintético, Omeprazol, também classificado como não tóxico, conforme sua CE_{50} de 341,20mg.L⁻¹.

A Garra- do- Diabo, foi classificada como não tóxica segundo a Diretiva 93/67/CEE, porém seu marcador de referência, Harpagosídeo, tem a CE_{50} de 1,74mg.L⁻¹, o que o classifica como tóxico e, a Prednisona, princípio ativo sintético, que também serviu como substância para outros grupos, possui sua CE_{50} de 50,89mg.L⁻¹, mostrando que essa substância é nociva ao ambiente.

Os resultados apontaram que o Guaco não tem efeito biológico em uma concentração de 1000mg.L⁻¹ e, já a substância de referência, Cumarina pode ser classificada como nociva por ter uma CE_{50} de 36,19mg.L⁻¹, a qual possui atividade anticoagulante, função que pode comprometer o metabolismo dos organismos analisados (CZELUSNIAK, 2012). O princípio ativo sintético, Acetilcisteína, tem a capacidade de deixar o pH da solução estoque ácido, porém na proporção diluída a mesma se manteve estável sem haver alterações e, sua CE_{50} de 70,71mg.L⁻¹, o que classifica essa substância como nociva ao ambiente.

A Hortelã teve sua CE_{50} de 85,35mg.L⁻¹, o Mentol 23,4 mg.L⁻¹ e a Prednisona, CE_{50} de 50,89mg.L⁻¹. O grupo foi classificado como nocivo, porém o mentol apresentou um índice de toxicidade mais elevado devido a acumulação dessa substância no animal analisado, mesmo princípio do Log K_{ow} citado anteriormente para a Dihidroxiانtraquinona. Segundo Da Silva Ramos *et al.* (2017) o óleo essencial da Hortelã, mesma espécie estudada, apresentou CL_{50} 414,6µg.mL⁻¹,

confirmando sua toxicidade frente ao organismo *Artemia salina*, espécie de crustáceo capaz de viver em ambientes extremamente secos, caracterizando como agente bioativo.

Pela Diretiva 93/67/CEE, a Isoflavona de soja e um de seus marcadores de referência, Daidzeína, são classificados como nocivos, devido as CE_{50} apresentadas, 73,77 e 12,45mg.L⁻¹, respectivamente. Já a Genisteína, outro marcador do vegetal, foi classificado como tóxico com a CE_{50} de 6,36mg.L⁻¹. O Valerato de Estradiol tem a CE_{50} de 0,12mg.L⁻¹, como também apontado por Silva (2014), sendo classificado como muito tóxico.

A Genisteína e a Daidzeína podem aparecer no organismo, devido ao consumo da Isoflavona de soja, tendo vida média no plasma de 7 horas em adultos, independentemente da via de administração (BARBOSA *et al.*, 2008), tempo que pode ser tóxicos quando encontrados em organismos mais sensíveis.

As substâncias do grupo Salgueiro obtiveram as CE_{50} acima de 100mg.L⁻¹, o que os tornam substâncias não tóxicas.

Já o resultado para o vegetal Unha de gato mostrou que ele não é tóxico ao ambiente, com a CE_{50} de 772,31mg.L⁻¹. Como princípio ativo sintético foi utilizado a Prednisona, estudada em outros grupos, classificada como nociva ao ambiente, com a CE_{50} de 50,89mg.L⁻¹.

Nota-se que a maioria dos vegetais avaliados não apresentaram grau de toxicidade, somente a Hortelã e a Isoflavona de soja. Já os marcadores de referência, por se tratarem de substâncias puras, com exceção da Genisteína e Daidzeína do grupo da Isoflavona de soja e a Salicina do grupo do Salgueiro, apresentaram maior toxicidade em relação aos princípios ativos sintéticos, de acordo com a Diretiva 93/67/CEE.

Para realização dos ensaios de toxicidade com o organismo *E. lucunter* foram usadas baixas concentrações das substâncias analisadas, por ser uma fase onde ocorre o desenvolvimento do organismo, pela capacidade de persistência de alguns medicamentos no ambiente oceânico, como mostrado por Santos (2010) e, pela exposição dos organismos a estes poluentes por parte ou durante todo o ciclo de vida. De modo geral, esses efeitos são subletais, letais e são observados em situações em que as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência do organismo, embora afetem uma ou várias de suas funções biológicas, tais como

reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras (CETESB 1990).

Ao avaliar os resultados obtidos nos ensaios com *E. lucunter*, percebe-se que as substâncias apresentaram um determinado grau de toxicidade de acordo com a Diretiva 93/67/CEE, mantendo somente os vegetais Alcachofra e Salgueiro, os marcadores de referências Mentol e Salicina e o princípio ativo sintético Sulfato de magnésio, como substâncias não tóxicas (Tabela 28).

Tabela 28- Comparativo entre os resultados obtidos nos ensaios com *E. lucunter*, com os órgãos vegetativos, marcadores de referência e princípios ativos sintéticos analisados.

Grupos	Vegetais	CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Marcadores de referência	CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Compostos sintéticos	CI ₅₀ (mg.L ⁻¹)
Disfunções do sistema digestivo	Alcachofra	176,10	Ácido clorogênico	1,51	Ácido Ursodesoxicólico	44,74
	Cascara sagrada	75,35	Dihidroxyan- traquinona	1,08	Sulfato de Magnésio	>1000
	Espinheira santa	21,80	Epicatequina	0,16	Omeprazol	24,54
	Hortelã	0,79	Mentol	273,70	Prednisona	16,24
Anti- inflamatórios	Garra-do- diabo	4,73	Harpagosídeo	1,54	Prednisona	16,24
	Salgueiro	165,26	Salicina	653,26	Ácido Acetilsalicílico	63,73
	Unha de gato	9,25	Mitrafilina	----	Prednisona	16,24
Disfunções do sistema respiratório	Guaco	28,25	Cumarina	3,83	Acetilcisteína	29,23
Fito- hormônio	Isoflavona de soja	1,86	Genisteína	3,37	Valerato de Estradiol	28,40
			Daidzeína	2,60		

Nos ensaios realizados com o grupo da Alcachofra, foram obtidos os valores de CENO para a substância de referência e para o princípio ativo sintético, Ácido Clorogênico e Ursodiol, apresentaram valores inferiores a 0,625 e 12,5mg.L⁻¹, respectivamente, como apontado na Tabela 10. Observou-se que o ácido clorogênico apresentou maior toxicidade e foi classificado como tóxico, o ursodiol como nocivo e o vegetal Alcachofra como não tóxico ao ambiente.

Não foi possível encontrar o valor de CENO para o vegetal Cascara Sagrada, porém sabe-se que é menor que 57,9mg.L⁻¹. Os valores de CI₅₀ deste grupo, apresentou toxicidade para a substância Cascara Sagrada, consequentemente seu marcador de referência por estar na forma pura, que apresentou CI₅₀ de 1,08mg.L⁻¹.

A CI_{50} do Omeprazol foi de $24,54\text{mg.L}^{-1}$ e, os valores de CENO para o fitoterápico e seu marcador de referência, Espinheira Santa e Epicatequina, foram inferiores a $6,25$ e $0,0625\text{mg.L}^{-1}$, respectivamente. Como mostrado na Tabela 28, esse grupo possui alta toxicidade, com a CI_{50} do fitoterápico e seu marcador $21,80$ e $0,16\text{mg.L}^{-1}$, respectivamente.

A menor concentração estipulada para a Garra- do- diabo não foi hábil para encontrar o valor de CENO, mas sabe-se que é menor que $3,125\text{mg.L}^{-1}$. Os resultados das CI_{50} desse grupo mostraram que as três substâncias podem apresentar um grau de toxicidade ao ambiente, já que os valores da Concentração Inibitória foram extremamente baixos, $4,73\text{mg.L}^{-1}$ para o vegetal, seu marcador de referência com $1,54\text{mg.L}^{-1}$ e o princípio ativo sintético Prednisona com $14,24\text{mg.L}^{-1}$.

Nos ensaios apresentados para o grupo do Guaco, os valores de CENO para as três substâncias apresentaram valores inferiores a $9,375$, $1,25$ e $15,625\text{mg.L}^{-1}$, para o vegetal, marcador de referência e para o princípio ativo sintético. As CI_{50} encontradas para as substâncias deste grupo podem mostrar que tanto o Guaco, como a Cumarina e a Acetilcisteína, apresentam um valor alto para inibição de 50% dos organismos, podendo afirmar que essas substâncias são agressivas ao meio ambiente, classificando o vegetal e o composto sintético como nocivos e o marcador de referência como tóxico ao ambiente.

Os resultados dos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* para o grupo da Hortelã foram de extrema importância, pois mostraram CI_{50} de $0,79\text{mg.L}^{-1}$ para o vegetal, $273,70\text{mg.L}^{-1}$ para o marcador de referência e $16,24\text{mg.L}^{-1}$ para o princípio ativo sintético, resultado curioso pelo fato do vegetal ter um valor de concentração de inibição menor comparado ao marcador de referência, o que indica uma maior agressão ao ambiente causada pelo fitoterápico.

Em um experimento de Garlet (2007), foram extraídos terpenos, pequenas moléculas sintetizadas pelo vegetal, a partir do óleo essencial da Hortelã, com a ideia de identificar substâncias produzidas pela Hortelã. Como resultados foram apresentados diversas moléculas, como limoneno, carvona, isomentona, mentona, entre outras substâncias. Baseado nesse experimento é possível ter uma possível resposta para o vegetal ter a CI_{50} menor do que o princípio ativo sintético, já que possuem outras substâncias presentes no vegetal.

Nos ensaios realizados com o grupo referente à Isoflavona de soja, os valores de CENO para todas as substâncias deste grupo não foram evidentes, sendo inferiores a 0,625, 1,875, 1,875 e 6,25mg.L⁻¹ para a Isoflavona de Soja, Genisteína, Daidzeína e Valerato de estradiol. Por outro lado, os valores de Concentração Inibitória (CI₅₀) mostraram que todas as substâncias do grupo apresentaram um grau de toxicidade significativa, como o vegetal que manteve sua CI₅₀ 1,90mg.L⁻¹, seus marcadores de referência CI₅₀ 3,37mg.L⁻¹ para a Genisteína e 2,60mg.L⁻¹ para a Daidzeína e o princípio ativo sintético possui a CI₅₀ de 28,40mg.L⁻¹.

Nos ensaios apresentados para o grupo do Salgueiro, mostraram que os valores de CENO para as substâncias são inferiores a 50, 50 e 12,5mg.L⁻¹, respectivamente para o Salgueiro, Salicina e para o Ácido Acetilsalicílico. Já os valores encontrados para CI₅₀ do grupo variaram entre 63,73mg.L⁻¹ para o Ácido Acetilsalicílico, 165,26mg.L⁻¹ para o Salgueiro e 653,26mg.L⁻¹, o que torna esse grupo menos agressivo que os outros estudados, de acordo com a Diretiva 93/67/CEE, apresentada na Tabela 3.

O valor de CENO para fitoterápico Unha de gato é inferior a 9,375mg.L⁻¹. E a CI₅₀ é de 9,25mg.L⁻¹ e 16,24mg.L⁻¹ para o fitoterápico e para o princípio ativo sintético, respectivamente.

Os ensaios de toxicidade com *E. lucunter*, apresentaram maior número de substâncias classificadas como tóxicas ao ambiente segundo a Diretiva 93/67/CEE, porém fora desta classificação encontram-se os vegetais Alcachofra e Salgueiro, os marcadores de referência Mentol e Salicina e o princípio ativo sintético Sulfato de Magnésio, que não apresentaram toxicidade ao meio.

Ao fazer um comparativo entre os marcadores de referência e os compostos sintéticos, é possível afirmar, observando as Tabelas 27 e 28, que a maioria dos marcadores de referência apresentou maior toxicidade para ambos os ensaios, porém as concentrações dessas substâncias encontradas nos vegetais inseridos na RENAME estão em menor porcentagem, ou seja, para encontrar esses marcadores no ambiente, a quantidade do vegetal deveria ser mais elevada que o necessário para o tratamento e, se o uso de um marcador for de forma isolada, a concentração pode diminuir, por se tratar de substâncias puras, sendo também menos agressiva devido a quantidade reduzida.

Não se tem estudos ainda que comprovem o tempo de degradação de vegetais no ambiente aquático, com isso torna-se necessário avaliar se estas substâncias podem desaparecer mais rapidamente do que os princípios ativos sintéticos, garantindo assim um menor impacto ambiental quando os medicamentos fitoterápicos forem usados.

Com o auxílio do *software* EPI Suite foi possível acessar a plataforma BLOWIN, onde foi estimado o tempo para a biodegradação dos marcadores de referência e dos princípios ativos sintéticos através de dois modelos distintos, o Biowin 4 que estima em dias, a transformação de um composto original para um metabolito inicial e, o Biowin 3 que avalia o tempo necessário, em meses, para biodegradação final que é a transformação de um composto original em dióxido de carbono e água, óxidos minerais de quaisquer outros elementos presentes no composto de teste e material celular novo. Deve-se notar que as classificações são apenas semi-quantitativas e não são meias-vidas, os valores estão na Tabela 29.

Tabela 29- Tabela com os valores estimados do processo de biodegradação dos marcadores de referências e dos princípios ativos sintéticos. Biowin 3- representa a biodegradação final do composto (meses). Biowin 4 – representa a biodegradação primária do composto em dias.

Marcadores de referência	Boiwin 3	Boiwin 4	Princípios ativos sintéticos	Boiwin 3	Boiwin 4
Ácido clorogênico	3,14	4,13	Ácido Ursodesoxicólico	2,59	3,62
Dihidroxyan-traquinona	2,74	3,54	Sulfato de Magnésio	2,98	3,70
Epicatequina	2,81	3,73	Omeprazol	1,95	3,35
Mentol	3,01	3,75	Prednisona	1,86	2,93
Harpagósideo	2,62	3,68	Prednisona	1,86	2,93
Salicina	3,30	4,15	Ácido Acetilsalicílico	3,03	3,82
Mitrafilina	---	---	Prednisona	1,86	2,93
Cumarina	3,02	3,86	Acetilcisteína	3,15	4,20
Genisteína/ Daidzeína	2,69/ 2,67	3,63/ 3,61	Valerato de Estradiol	2,54	3,58

Torna-se importante analisar e confirmar o tempo de biodegradação dessas substâncias quando encontradas nos ecossistemas aquáticos, impedindo a

liberação das mesmas, caso sejam mais difíceis de serem degradadas e apresentarem toxicidade que comprometam a biota local. Por outro lado, pode-se esperar que muitas delas se degradem rapidamente e não trazem efeitos biológicos para os organismos ali encontrados.

A produção e o uso dos fármacos estudados podem ser liberados para o ambiente por meio do sistema de esgoto, já que no Estado de São Paulo o processo de tratamento de esgotos quando é realizado, acontece pelo método de lodo ativado, onde não ocorre a remoção de compostos específicos não biodegradáveis, que os tornam responsáveis pela contaminação da biota aquática (VON SPERLING, 1996).

Outro fator importante para se observar são as substâncias que contem o valor de $\log K_{OW}$ elevado, pois apresentam certa afinidade por estruturas apolares. Silva (2015), afirma que quanto maior o valor de $\log K_{OW}$, mais apolar é o composto químico, que por sua vez possui maior afinidade com a membrana celular de organismos, facilitando a absorção destes compostos e aumentando a chance da bioacumulação e de gerar um efeito tóxico.

Os valores expostos nas tabelas 30 e 31 serviram para avaliar o potencial de absorção das substâncias analisadas, os $\log K_{OW}$ abaixo de 2.5 mostram que as substâncias possuem baixo potencial de absorção pelas células através da membrana plasmática, já o $\log K_{OW}$ de 2,5 a 4.0 apresentam potencial médio de absorção e $\log K_{OW}$ acima de 4.0 o potencial de absorção é elevado (BARCELO & PETROVIC, 2007). Esse fator foi avaliado através do *software* EPI Suite a fim de comparar o $\log K_{OW}$ e o $\log BCF$, fator de bioconcentração das substâncias estudadas com os resultados obtidos nos ensaios.

Tabela 30- Valores de log K_{OW} e log BCF dos marcadores de referência utilizados nos ensaios de toxicidade.

Marcadores de referência	Log K_{OW}	Log BCF
Ácido clorogênico	-1,01	0,50
Dihidroxiantraquinona	3,94	1,68
Epicatequina	0,51	0,50
Mentol	3,40	1,77
Harpagosídeo	-1,96	0,50
Salicina	-1,22	0,50
Cumarina	1,39	0,58
Daidzeina	2,55	0,76
Genisteina	2,84	0,95

K_{OW} - Partição octanol-água; BCF - Fator de Bioconcentração.

Tabela 31- Valores de Log K_{OW} e log BCF dos princípios ativos sintéticos utilizados nos ensaios de toxicidade.

Princípios ativos sintéticos	Log K_{OW}	Log BCF
Ácido Ursodiol	4,15	0,50
Sulfato de Magnésio	-2,20	0,50
Omeprazol	2,23	1,14
Prednisona	1,46	0,63
Ácido Acetilsalicílico	1,19	0,50
Acetilcisteína	-0,66	0,50
Valerato de Estradiol	6,42	0,66

K_{OW} - Partição octanol-água; BCF - Fator de Bioconcentração.

Para algumas substâncias estudadas, houve relação entre o valor de Log K_{OW}, BCF e CE₅₀/CI₅₀, pois quanto mais elevado seu Log K_{OW}, aumenta a chance de bioconcentração das substâncias nos organismos, o que pode comprometer os organismos, com uma menor concentração do composto analisado.

Para o grupo da Isoflavona de soja, esse critério não é válido, pois observa-se que o Log K_{OW} do Valerato de estradiol é mais elevado do que os dos marcadores

de referência, Genisteína e Daidzeína, mas o resultado da CI_{50} para os ensaios com *E. lucunter*, mostraram maior toxicidade para os marcadores de referência.

Estudos sugerem que a ação antioxidante da Isoflavona de soja seja parcialmente devido a sua ação sequestradora de radicais livres e como quelante de metais, e esses efeitos dependem diretamente da posição da hidroxila fenólica (ARORA et al., 1998), podendo ser um fator comprometedor para o metabolismo dos organismos utilizados. Por outro lado, alguns compostos não se acumulam significativamente em animais, principalmente nos vertebrados, apesar do seu alto valor de $\text{Log } K_{OW}$. Isto porque alguns organismos têm a habilidade de metabolizar rapidamente tais compostos (MENICONI, 2007). Com isso, se torna necessário mais estudos com o grupo para confirmar essa afirmação, mas pode ser uma explicação para um resultado diferente que apareceu para esses compostos.

Estudos de água superficial da Alemanha foram encontrados três tipos isoflavonas: norringenina, daidzeína em concentrações de cerca de 17ng/L^{-1} , e a genisteína em concentrações mais elevadas, entre 400 e 1.300ng/L^{-1} , e foram observados efeitos negativos na reprodução dos peixes, o que foi associado à alta concentração dessas substâncias no ecossistema aquático (Lintelmann et al., 2003). Já, em estudos realizados no Brasil foram encontradas concentrações cerca de 1000 vezes maior para 17β -estradiol (Ghiselli, 2006), e na bacia do Rio Atibaia foi detectada a presença de 17β -estradiol com valores mínimos e máximos de 106 e 6.806 ng/L^{-1} , respectivamente (Raimundo, 2007).

Já o composto sintético pode ser utilizado em contraceptivos e por isso pode aparecer em maior quantidade no ambiente aquático, o que se torna muito negativo, pois a exposição contínua dessas substâncias tem sido associada a efeitos nos processos de desenvolvimento, pois causa a feminilização de machos e na reprodução pois afeta a fertilidade (Bohm, 2014).

Os ensaios de toxicidade demonstraram a importância de avaliar o efeito adverso que esses compostos podem apresentar ao ambiente, já que as menores concentrações onde foram observados efeitos podem servir como índice de risco ambiental.

Atualmente, a Resolução CONAMA 430 de 2011, atende e monitora a liberação de compostos específicos não biodegradáveis, a fim de garantir a preservação dos ecossistemas aquáticos, mas os fármacos não são contemplados

e, nesse sentido, a presença de compostos farmacêuticos no ambiente apresenta lacunas na legislação ambiental, ou seja, não possuem limites para liberação. Porém, essas substâncias necessitam de mais atenção, já que sua ocorrência pode causar efeitos potenciais sobre a biota local, com isso torna-se importante um processo de tratamento específico e uma regulamentação vigente ou a inclusão de novos compostos na próxima revisão da resolução CONAMA 430/2011.

Entre os objetivos mais relevantes do Reach, Regulamento nº 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, a garantia do uso seguro das substâncias químicas é essencial para a preservação da biota aquática e, após a avaliação dos resultados obtidos torna-se necessário desenvolver mecanismos e procedimentos mais eficazes, sobre os perigos dos compostos analisados serem liberadas no corpo d'água, alertar sobre o uso seguro das substâncias e desenvolver métodos alternativos para a liberação de compostos tóxicos ou a troca por outro que se degradam rapidamente ou que não apresentam toxicidade.

7. CONCLUSÃO

Este estudo avaliou os efeitos ecotoxicológicos de drogas fitoterápicas inseridas pelo RENAME, seus marcadores de referência e os princípios ativos sintéticos com as mesmas indicações terapêuticas, por meio de ensaios de toxicidade, nos quais foram observados efeitos subletais nas neonatas de *D. similis* e o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*.

Diversos efeitos ecotoxicológicos foram observados nas substâncias analisadas. Esses efeitos tóxicos podem trazer diversos impactos a organismos que habitam os ecossistemas aquáticos. Através dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- ✓ A Alcachofra foi à substância que apresentou a menor toxicidade para este grupo sendo classificada como não tóxica para os dois ensaios. Já o Ácido Clorogênico e o Ursodiol se mostraram mais agressivos ao ambiente e foram classificados como nocivos no ensaio com *D. similis* e como tóxico e nocivo, respectivamente, nos ensaios com *E. lucunter*.
- ✓ O grupo da Cascara Sagrada apresentou maior toxicidade para o marcador de referência sendo classificado como muito tóxico no ensaio com *D. similis* e tóxico no ensaio com *E. lucunter*, o vegetal foi classificado como não tóxico e nocivo pra os ensaios com *D. similis* e *E. lucunter*, respectivamente. Já o princípio ativo sintético, Sulfato de Magnésio, foi classificado como não tóxico nos dois ensaios.
- ✓ Para o ensaio de toxicidade com *D. similis* a Espinheira Santa e o Omeprazol não apresentaram toxicidade, porém o marcador de referência, Epicatequina, foi classificado como nocivo. No ensaio de toxicidade com *E. lucunter*, o vegetal e o princípio ativo sintético foram classificados como nocivos ao ambiente e o marcador de referência como muito tóxico.
- ✓ A Garra- do- Diabo foi classificada como não tóxica segundo o ensaio de toxicidade com *D. similis*, diferente das outras substâncias, que são tóxicas e nocivas, para o marcador e para o princípio ativo sintético, respectivamente. Para os ensaios de toxicidade com *E. lucunter* as três substâncias apresentaram agressividade se liberadas nos ecossistemas aquáticos, sendo classificadas como tóxicos, para o vegetal e seu marcador e, nocivo para o composto sintético.
- ✓ O Guaco não apresentou toxicidade no ensaio com *D. similis*, já seu marcador e o princípio ativo sintético são nocivos ao ambiente. No ensaio com *E. lucunter* as

três substâncias apresentaram toxicidade ao ambiente, sendo tóxicas o vegetal e seu marcador e nocivo o princípio ativo sintético.

✓ Os três compostos do grupo da Hortelã apresentaram concentrações significativas e semelhantes de toxicidade no ensaio com *D. similis* e foram classificadas como nocivas, porém a Hortelã no ensaio com o *E. lucunter* teve sua concentração Inibitória menor que seu marcador de referência, o Mentol, sendo considerada muito tóxica, seu marcador como não tóxico e a Prednisona nociva ao ambiente.

✓ Todas as substâncias que representam o grupo da Isoflavona de Soja apresentaram um grau de toxicidade aos dois ensaios realizados. Para o ensaio com *D. similis*, o marcador de referência foi considerado tóxico e as outras substâncias nocivas ao ambiente, já para o ensaio com *E. lucunter* o Valerato de estradiol foi classificado como nocivo e as outras substâncias como tóxicas.

✓ O grupo do Salgueiro foi o menos agressivo para os ensaios com *D. similis*, classificando as substâncias como não tóxicas. Já no ensaio com *E. lucunter*, o Salgueiro e a Salicina foram classificadas como não tóxicas e o princípio ativo sintético, Ácido Acetilsalicílico foi classificado como nocivo ao ambiente.

✓ A Unha- de- gato não apresentou toxicidade para o ensaio com *D. similis* diferente da Prednisona como já mencionado. Para o ensaio com *E. lucunter* as duas substâncias apresentaram valores significativos para Concentração Inibitória, a Unha de gato foi classificada como tóxica e a prednisona como nociva.

Após avaliar os resultados, foi possível observar que os vegetais apresentaram menor toxicidade comparada com as outras substâncias estudadas, marcadores de referência e princípios ativos sintéticos, que apresentaram maior toxicidade.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos neste estudo, tornam-se necessárias mudanças no processo de tratamento de esgoto ou a implantação dele em locais que não existe, melhorando a qualidade das águas e efluentes que serão liberadas no ambiente aquático, para minimizar os impactos causados ao ambiente e à biota aquática, que pode ser afetada. Porém, como no Estado de São Paulo o tratamento de efluentes ocorre de forma simples, essa opção ainda torna-se inviável.

Com isso, o monitoramento dos fármacos liberados também se torna essencial, visando um melhor descarte para aqueles que apresentam índice alto de toxicidade e que podem comprometer os organismos aquáticos.

Os ensaios de toxicidade são importantes, pois possibilitam estabelecer limites para a liberação de medicamentos, sendo liberados os descartes daqueles que possuem valores seguros que não comprometem os organismos, com o intuito de evitar a bioacumulação ou mau desenvolvimento nos organismos aquáticos. Existe também, a necessidade de avaliar outros endpoints, ou seja, outros organismos para se ter mais representatividade na aplicação dos dados, pois somente com os ensaios realizados não se define o risco dessas substâncias no ambiente.

Deve-se orientar a população sobre os problemas relacionados ao descarte inadequado dos medicamentos e, indicar pontos de coleta dos mesmos para um descarte adequado.

9. VERSÃO COMPACTA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA COMPARATIVA ENTRE PLANTAS MEDICINAIS, MARCADORES DE REFERÊNCIA E PRINCÍPIOS ATIVOS SINTÉTICOS UTILIZADOS EM TRATAMENTOS TERAPÊUTICOS

Barbara Faria Lourenço- E- mail: babifl@gmail.com

Resumo

A partir do descarte incorreto, substâncias persistentes podem agredir o ambiente aquático e trazer malefícios à biota local. Atualmente muitos medicamentos fitoterápicos foram inseridos na RENAME, porém não se sabe se essas substâncias causam impactos ao ambiente. Diante do contexto, este estudo avaliou os efeitos biológicos subletais ou no desenvolvimento de organismos aquáticos, frente a concentrações de vegetais da RENAME, seus marcadores de referências e princípios ativos sintéticos com as mesmas indicações terapêuticas, por meio de ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter*. Como resultado para os ensaios com *Daphnia similis* foram encontrados dois vegetais, cinco marcadores de referência e cinco princípios ativos sintéticos classificados como nocivos, dois marcadores classificados como tóxicos e um marcador e um sintético classificados como muito tóxicos ao ambiente. Para os ensaios com *Echinometra lucunter* três vegetais e oito sintéticos foram classificados como nocivos, três vegetais e seis marcadores como tóxicos e um vegetal e um marcador considerados muito tóxicos ao ambiente, de acordo com a Diretiva 93/67/CEE. Com isso, vale ressaltar que frente aos ensaios realizados, as substâncias estudadas apresentaram concentrações de efeitos significativos, com maior toxicidade para os marcadores de referência e para os princípios ativos sintéticos.

Palavras-chave: Descarte incorreto. RENAME. Ensaios de toxicidade. Diretiva 93/67/CEE. Evitar impactos.

COMPARATIVE ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION BETWEEN MEDICINAL PLANTS, REFERENCE MARKERS AND SYNTHETIC ACTIVE PRINCIPLES USED IN THERAPEUTIC TREATMENTS

Abstract

From the incorrect disposal, persistent substances can attack the aquatic environment and bring harm to the local biota. Currently many herbal medicines have been inserted in RENAME, but it isn't known if these substances cause impacts to the environment. In view of the context, this study evaluated the biological effects sublethal or in the development of aquatic organisms, against concentrations of RENAME plants, their reference markers and synthetic active principles with the same therapeutic indications, through toxicity tests with *Daphnia similis* and *Echinometra lucunter*. As a result, two plants, five reference markers and five synthetic active principles classified as noxious, two markers classified as toxic, and one marker and a synthetic were classified as very toxic to the environment for the *Daphnia similis* trials. For the trials with *Echinometra lucunter* three plants and eight synthetic were classified as harmful, three plants and six markers as toxic and a vegetable and a marker considered very toxic to the environment, according to Directive 93/67 / EEC. Therefore, it is worth mentioning that in the tests carried out, the studied substances showed concentrations of significant effects, with greater toxicity for the reference markers and for the synthetic active principles.

Keywords: Incorrect disposal. RENAME. Toxicity tests. Directive 93/67 / EEC. Avoid impacts.

Introdução

A existência do ser humano baseia-se na utilização de recursos naturais, que são passados ao longo de gerações, porém a exploração da natureza tem sido de forma frenética, o que pode trazer aspectos negativos, gerando alterações no meio natural [1]. Esse assunto tem sido discutido devido aos impactos sofridos na biodiversidade através das ações antrópicas, observadas através de alterações na qualidade do solo, ar e água.

A poluição, a partir da liberação de efluentes na água, tem sido uma das principais causas dos impactos ao meio ambiente, vale ressaltar que esses efluentes liberados podem ser substâncias com teor tóxico que não passaram por um tratamento adequado e que se acumulam no ambiente, podendo incidir impactos na fauna e flora dos ecossistemas, o que resulta em prejuízos ecológicos e econômicos [2].

Os medicamentos têm funções importantíssimas para a sociedade, como auxiliar no combate das enfermidades. Porém, muitos desses produtos são descartados junto ao lixo doméstico, esgoto comum ou seus metabólitos podem ser excretados pelas fezes e urina, sem sofrer alterações, e acabam alcançando os corpos d'água [3]. O descarte efetuado pelo consumidor final é o que apresenta maior lacuna na legislação [4].

Diante desse contexto, no presente estudo foi avaliada a toxicidade de vegetais, seus marcadores de referência e princípios ativos sintéticos que possuem indicação terapêutica equivalentes, em organismos de ecossistemas dulcícolas e marinhos. Os ensaios de toxicidade possibilitam classificar as substâncias como tóxicas ou não tóxicas, a fim de incitar um destino final apropriado no caso de serem positivas para toxicidade e estabelecer orientações para o descarte correto dessas substâncias.

Objetivo

Pensando nestes agravantes, o presente estudo teve como objetivo comparar a toxicidade de vegetais utilizados como medicamentos fitoterápicos de uso comum, inseridos na RENAME, seus marcadores de referência e princípios ativos sintéticos com a mesma indicação terapêutica, através de análises ecotoxicológicas com *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter*.

Metodologia

Os ensaios foram realizados com organismos *Daphnia similis* e *Echinometra lucunter*, que foram escolhidos devido a respostas rápidas que podem surgir quando expostos a substâncias contaminantes e a quantidade encontrada no ambiente.

Foram selecionados nove grupos de fármacos, formados por órgãos vegetativos que compõem os fitoterápicos, da lista do RENAME, seus marcadores de referência e princípios ativos sintéticos que apresentam a mesma indicação terapêutica (Tabela 1).

Tabela 1- Vegetais, marcadores de referência e princípios ativos sintéticos utilizados para a realização dos ensaios ecotoxicológicos.

Grupos	Vegetais (Nome popular)	Marcadores de referência	Princípios ativos sintéticos
Disfunções do sistema digestivo	Alcachofra	Ácido clorogênico	Ácido Ursodesoxicólico
	Cascara sagrada	Dihidroxyantraquinona	Sulfato de Magnésio
	Espinheira santa	Epicatequina	Omeprazol
	Hortelã	Mentol	Prednisona
Anti-inflamatórios	Garra-do-diabo	Harpagósideo	Prednisona
	Salgueiro	Salicina	Ácido Acetilsalicílico
	Unha de gato	---	Prednisona
Disfunções do sistema respiratório	Guaco	Cumarina	Acetilcisteína
Fito-hormônio	Isoflavona de soja	Genisteína e Daidzeína	Valerato de Estradiol

Os ensaios de toxicidade foram realizados a fim de avaliar os efeitos de curta duração subletais em *Daphnia similis* e, efeitos que podem afetar o desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*, seguindo o protocolo da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) e as normas brasileiras NBR 12713 e NBR 15350 [5;6].

Foram realizados testes preliminares para encontrar concentrações em que os resultados fossem significativos, seguidos de três amostragens definitivas, onde obteve-se cinco concentrações, com quatro réplicas para cada concentração.

Resultados

A apresentação dos resultados foi realizada por grupos dos compostos de acordo com suas indicações terapêuticas, mantendo primeiramente os resultados das análises de subletais de *D. similis* e, posteriormente, as análises de inibição do desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*, como apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2- Resultados obtidos nos ensaios com *D. similis*.

Grupos	Vegetais	CE50 (mg.L ⁻¹)	Marcadores de referência	CE50 (mg.L ⁻¹)	Compostos sintéticos	CE50 (mg.L ⁻¹)
Disfunções do sistema digestivo	Alcachofra	>1000	Ácido clorogênico	32,70	Ácido Ursodesoxicólico	78,84
	Cascara sagrada	288,62	Dihidroxian- traquinona	0,33	Sulfato de Magnésio	749,13
	Espinheira santa	>1000	Epicatequina	43,01	Omeprazol	341,21
	Hortelã	85,35	Mentol	23,40	Prednisona	50,89
Anti- infamatórios	Garra-do- diabo	570,42	Harpagosídeo	1,74	Prednisona	50,89
	Salgueiro	>1000	Salicina	598,22	Ácido Acetilsalicílico	395,90
	Unha de gato	772,31	Mitrafilina	----	Prednisona	50,89
Disfunções do sistema respiratório	Guaco	>1000	Cumarina	36,19	Acetilcisteína	70,71
Fito- hormônios	Isoflavona de soja	73,77	Genisteína Daidzeína	6,36 12,45	Valerato de Estradiol	0,12

Tabela 3- Comparativo entre os resultados obtidos nos ensaios com *E. lucunter*.

Grupos	Vegetais	CI50 (mg.L ⁻¹)	Marcadores de referência	CI50 (mg.L ⁻¹)	Compostos sintéticos	CI50 (mg.L ⁻¹)
Disfunções do sistema digestivo	Alcachofra	176,10	Ácido clorogênico	1,51	Ácido Ursodesoxicólico	44,74
	Cascara sagrada	75,35	Dihidroxian- traquinona	1,08	Sulfato de Magnésio	>1000
	Espinheira santa	21,80	Epicatequina	0,16	Omeprazol	24,54
	Hortelã	0,79	Mentol	273,70	Prednisona	16,24
Anti- inflamatórios	Garra-do- diabo	4,73	Harpagosídeo	1,54	Prednisona	16,24
	Salgueiro	165,26	Salicina	653,26	Ácido Acetilsalicílico	63,73
	Unha de gato	9,25	Mitrafilina	----	Prednisona	16,24
Disfunções do sistema respiratório	Guaco	28,25	Cumarina	3,83	Acetilcisteína	29,23
Fito- hormônio	Isoflavona de soja	1,86	Genisteína Daidzeína	3,37 2,60	Valerato de Estradiol	28,40

Discussão

Os ensaios de toxicidade demonstraram a importância de avaliar o efeito adverso que esses compostos podem apresentar ao ambiente. Já que as menores concentrações onde foram observados efeitos podem servir como índice de risco ambiental.

Atualmente, a Resolução CONAMA 357 [7], atende e monitora a liberação de compostos específicos não biodegradáveis, mas os fármacos não são contemplados, pensando nisso, a presença de compostos farmacêuticos no ambiente não possuem limites para

liberação. Entre os objetivos mais relevantes do Reach, a garantia do uso seguro das substâncias químicas é essencial para a preservação da biota aquática e, após a avaliação dos resultados obtidos torna-se necessário desenvolver mecanismos e procedimentos mais eficazes, sobre os perigos dos compostos analisados serem liberadas no corpo d'água, alertar sobre o uso seguro das substâncias e desenvolver métodos alternativos para a liberação desses compostos tóxicos.

Conclusão

Após os ensaios realizados foram encontrados dois vegetais, cinco marcadores de referência e cinco princípios ativos sintéticos classificados como nocivos, dois marcadores classificados como tóxicos e um marcador e um sintético classificados como muito tóxicos ao ambiente, para os ensaios com *Daphnia similis*. Já para os ensaios com *Echinometra lucunter* três vegetais e oito sintéticos foram classificados como nocivos, três vegetais e seis marcadores como tóxicos e um vegetal e um marcador considerados muito tóxicos ao ambiente, de acordo com a Diretiva 93/67/CEE. Após avaliar os resultados, foi observado que os vegetais apresentaram menor toxicidade comparado com as outras substâncias.

Agradecimentos

A CAPES pela bolsa concedida ao primeiro autor, a Universidade Santa Cecília, aos laboratórios pelo espaço para a realização dos estudos e aos professores que participaram e ajudaram nas pesquisas.

Referências

1. BRASIL. Lei 9985/00 que **Institui o Sistema Nacional de Unidade de Conservação da Natureza**, 2000.
2. PEREIRA, C.D.S., *et al.* **Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. Science of the Total Environment**, v. 548, p. 148-154, São Paulo, 2016.
3. UEDA, J. *et al.* **Impacto ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema.** Revista Ciências do Ambiente On-Line, v. 5, n. 1, 2009.
4. BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Fármacos no meio ambiente.** Química Nova, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
5. ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) 2016. **Ecotoxicologia aquática-toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp*, (Cladocera, Crustacea).** Norma ABNT-NBR 12713.
6. ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (2012). **Ecotoxicologia Aquática. – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com Ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea).** Rio de Janeiro. NBR 15350.
7. BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA 357, 2005 - Publicação DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.**

REFERÊNCIAS

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

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

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, CAMBRAIA, R. P. **Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário**. Revista espaço para a Saúde, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. **Folhas de *Eugenia uniflora* L.(pitanga: propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas)**. Rev. Inst. Adolfo Lutz, p. 55-61, 2003.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, M. **Antioxidant activities of isofl avones and their biological metabolities in a liposomal system**. Arch Biochem Biophys, v. 356, n. 2, p. 133-134, 1998.

AZEVEDO M. A. M. **Análise da valoração dos impactos ambientais e da demanda de fitoterápicos oriundos do maracujá no Brasil**. Dissertação de mestrado. Rev. FAE, Curitiba, v.11, n.1, p.19-32, 2008.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. **Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, n. 6, p. 992-1000, 2010.

BARBOSA, I. R. et al. **Acute and chronic toxicity of dimethylsulfoxide to *Daphnia magna***. Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 70, n. 6, p. 1264-1268, 2003.

BARBOSA, D. S. et al. **Importância da ingestão de soja nos sintomas do climatério, osteoporose e doenças cardiovasculares.** Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, v. 12, n. 1, 2008.

BARCELO, D.; PETROVIC, M. **Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle.** Water research, v. 45, n. 3, p. 1165-1176, 2011.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. Aplicação dos ensaios ecotoxicológicos e Legislação pertinente. **Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações.** Rima. São Paulo. São Carlos, p. 347-379, 2006.

BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; DE CARVALHO, J. E. **Regulação e modulação da secreção gástrica.** Revista de Ciências Médicas, v. 11, n. 1, 2012.

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

BOHM, Bärwald et al. **Glyphosate effects on yield, nitrogen fixation, and seed quality in glyphosate-resistant soybean.** Crop Science, v. 54, n. 4, p. 1737-1743, 2014.

BÚFALO, J. *et al.* **PEG-induced osmotic stress in Mentha x piperita L.: structural features and metabolic responses.** Plant Physiology and Biochemistry, v. 105, p. 174-184, 2016.

BUIKEMA, A.L. & VOSHELL, J.R. **Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates.** Handbook of ecotoxicology, p. 101-116, 1993

BRASIL. **Farmacopeia brasileira**, 2 edição. Agência nacional de vigilância sanitária, Brasília, 1959.

BRASIL. Lei 9985/00 que **Institui o Sistema Nacional de Unidade de Conservação da Natureza**, 2000.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA 430**, Publicação DOU nº 053, págs. 58-63. 2011.

CALLISTO, M.; GONÇALVES JR, J. F.; MORENO, P. **Invertebrados aquáticos como bioindicadores**. Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais, v. 1, p. 1-12, 2005.

CARVALHO, G. F.S., MIRANDA, D. A, TINÔCO, M. S. **O OURIÇO-LILÁS, *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) E O LIXO MARINHO NA BAÍA DE TODOS OS SANTOS, BRASIL**. Dissertação de mestrado, Santa Catarina, 2011.

CASTRO, E.M. et al. **Coumarin contents in young *Mikania glomerata* plants (Guaco) under different radiation levels and photoperiod**. Acta Farmacêutica Bonaerense, v.25, n.3, p.387-92, 2006.

CAVALCANTI, C. **Desenvolvimento e Natureza: estudos para uma sociedade sustentável**. São Paulo: Cortez, p. 29-40, 2003.

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.

CETESB. São Paulo. **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no controle de efluentes Líquidos**. Série Manuais. São Paulo-SP.1990.

COCCO M. I. M., REZENDE H. A. **A Utilização da fitoterapia no cotidiano de uma população rural**. Revista da escola de enfermagem da USP, São Paulo; 36(3): 282-8. 2002.

COSTA, C.R. & OLIVI, P. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação**. Química Nova, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, São Paulo, 2008.

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

CRANE, M. **Research needs for predictive multispecies tests in aquatic toxicology**. Hydrobiologia, v. 346, n. 1, p. 149-154, 1997.

CZELUSNIAK, K. E. *et al.* **Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando Mikania glomerata Sprengel e Mikania laevigata Schulyz Bip. ex Baker**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DA ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA, **O Ciclo Gerencial**. FARMACOTERAPÊUTICA, Pharmacia Brasileira, ano VII, n. 4, p. 47 – 50, 2002.

DA ROSA, C.; MACHADO, C. A. **Plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças reumáticas: revisão**. Rev. Bras. Farm, v. 88, n. 1, p. 26-32, 2007.

DA SILVA RAMOS, R. *et al.* **Chemical Composition and In Vitro Antioxidant, Cytotoxic, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oil of Mentha piperita L.(Lamiaceae)**. The Scientific World Journal, v. 2017, 2017.

DARROZ, J. V. *et al.* **Utilização de fitoterápicos no tratamento de constipação intestinal**. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, v. 18, n. 2, 2015.

DAS DÔRES, R. G. R. *et al.* **FITOTERAPIA E ALOPATIA: A ATENÇÃO FARMACÊUTICA" VERDE"**. Infarma-Ciências Farmacêuticas, v. 15, n. 1/3, p. 62-66, 2003.

DIOGO, L. P. **Associação do uso de antiinflamatórios não esteróides e nefropatia induzida por contraste em pacientes submetidos a cateterismo**

cardíaco. Tese de doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul/PONTIFÍCIA, 2008.

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

FRIEDMAN, S.; BLUMBERG, R. S. **Doença inflamatória intestinal.** Gastreenterologia e Hepatologia de Harrison-2, p. 140, 2014.

GARLET, T. M. B. **Produtividade, teor e composição do óleo essencial de espécies de Mentha L.(Lamiaceae) cultivadas em hidroponia com variação de potássio.** Tese de Doutorado- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p-113, 2007.

Ghiselli G.; **Avaliação das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP).** Tese de Doutorado; 2006.

GOULART, M. D.; CALLISTO, M. **Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental.** Revista da FAPAM, v. 2, n. 1, p. 153-164, 2003.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. **Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays.** Environmental Science & Technology, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HEBERER, T. **Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data.** Toxicology letters, v. 131, n. 1, p. 5-17, 2002.

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

ISNARD, P.; LAMBERT, S. **Estimating bioconcentration factors from octanol-water partition-coefficient and aqueous solubility**. Chemosphere, v.17, p.21-34, 1988.

ISOTTON, A. L.; W., M. C. O.; CZEPIELEWSKI, M. A. **Influências da reposição de estrógenos e progestágenos na ação do hormônio de crescimento em mulheres com hipopituitarismo**. Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia= Brazilian archives of endocrinology and metabolism. Vol. 52, n. 5,(Jul. 2008), p. 901-916, 2008.

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

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

LEITE, G. S.; A., R. J. C. Franco; AQUINO, S. F. **Caracterização de contaminantes presentes em sistemas de tratamento de esgotos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem em alta resolução**. Quim. Nova, Vol. 33, No. 3, 734-738, 2010.

Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N.; **Endocrine disruptors in the environment**.; Pure Appl.Chem.; 75; 631-681; 2003.

LONGUI, C. A. **Glucocorticoid therapy: minimizing side effects**. Jornal de pediatria, v. 83, n. 5, p. S163-S171, 2007.

MAGALHÃES, D.; FERRAO-FILHO, A. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**. Oecologia brasiliensis, v. 12, n. 3, p. 3, 2008.

MARQUES, O. C. P. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com actividade antioxidante**. Dissertação de Mestrado-Universidade de Coimbra, 2008.

MELO, S. A. S. et al. **Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados**. Química nova, p. 188-197, 2009.

MENICONI, Maria de Fátima Guadalupe. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente: diferenciação de fontes em sedimentos e metabólitos em bile de peixes**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte- Natal, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação nacional de medicamentos essenciais-RENAME**. 2017.

MONTENEGRO M.C.B.S.M. **Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment**. Journal of hazardous materials, v. 175, n. 1, p. 45-95, 2010.

NORDBERG, M. *et al.* **Glossary of Terms Used in Ecotoxicology (IUPAC Recommendations 2009)**. Pure and Applied Chemistry, v. 81, n. 5, p. 829-970, 2009.

OLIVEIRA FERNANDES, L.. **Processo decisório do REACH-a nova política europeia dos químicos**. Ambiente & sociedade, v. 12, n. 1, 2009.

OLLER, I.; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J. **Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination—a review**. Science of the total environment, v. 409, n. 20, p. 4141-4166, 2011.

PEREIRA, C.D.S., *et al.* **Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone.** *Science of the Total Environment*, v. 548, p. 148-154, São Paulo, 2016.

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

PUSCEDDU, F. H. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados de água doce com ênfase em ensaios com sedimento marcado (spiked sediment).** Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo- 2009.

QUINTANA, J. B.; CARPINTERIO, J.; RODRÍGUEZ, I. **Analysis fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle.** Dissertação de mestrado. Universidade Santa Cecília- 2007.

RAIMUNDO, Cassiana Carolina Montagner *et al.* **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia.** 2007.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; MCCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: RANDY, M.G. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.** Florida: Taylor & Francis, 1995. p.3-67.

RIBEIRO, A. S. S. *et al.* **Utilização dos recursos naturais por comunidades humanas do Parque Ecoturístico do Guamá, Belém, Pará.** *Acta amazônica*, v. 37, n. 2, p. 235-240, 2007.

RUDDER, E.A.M.C. **Guia compacto das plantas medicinais.** Editora Rideel. 2002.

RUPPERT. E. E., FOX S. R., BARNES D. R. **Zoologia dos Invertebrados.** Editora

Roca, 7 edição, São Paulo, 2005.

SANTOS H.M.L.M., ARAÚJO A.N., FACHINIA A., PENA A., DELERUE M., MOMPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. **Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water.** Environment international, v. 35, n. 5, p. 803-814, 2009.

SANTOS, L. HMLM et al. **Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment.** Journal of hazardous materials, v. 175, n. 1, p. 45-95, 2010.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. **Review of Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribution to the studies of pharmacological properties.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 2B, p. 650-659, 2009.

SILVA, M. P. O. **AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE COMPARATIVA DA ISOFLAVONA DE SOJA COM O MEDICAMENTO SINTÉTICO VALERATO DE ESTRADIOL NO ORGANISMO DAPHNIA SIMILIS.** Trabalho de conclusão de curso. Universidade Santa Cecília, 2015.

SILVEIRA, G. E. **Sistema de Tratamento de Efluentes Industriais.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade do Rio Grande do Sul, 2010.

SOUZA, A. S. R. et al. **Sulfato de magnésio nas síndromes hipertensivas da gestação: efeitos hemodinâmicos maternos e fetais.** Femina, v. 34, n. 9, p. 625-631, 2006.

TRUHAUT, R. **Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives.** Ecotoxicology and environmental safety, v. 1, n. 2, p. 151-173, 1977.

TUROLLA M. S. R., NASCIMENTO E. S. **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 289-306, São Paulo, 2006.

UEDA, J. et al. **Impacto ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema.** *Revista Ciências do Ambiente On-Line*, v. 5, n. 1, 2009.

USEPA - **United States Environmental Protection Agency. EPI Suite® v.4.11.** The Estimation Programs Interface. (2012).

USEPA. **An interpolation estimate for chronic toxicity: The Icp approach.** Norberg-King, T. J. Technical Report 05-88, National Effluent Toxicity Assessment Center, Environmental Research Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN 55804. 1988.

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

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** Editora UFMG, 1996.

WATANABE, S; UESUGI, S.; KIKUCHI,. **Isoflavones for prevention of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation.** *Biomedicine & pharmacotherapy*, v. 56, n. 6, p. 302-312, 2002.coasts. *Marine Ecology*, 2004.

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

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

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

ZIMENT, I. **Farmacologia das secreções respiratórias e das substâncias mucocinéticas.** Jornal Brasileiro de Pneumologia, v. 9, n. 2, p. 93-96, 1983.

GLOSSÁRIO

Água de diluição- água utilizada para preparar as soluções-estoque, soluções-teste e controle.

Água reconstituída- água processada com adição de sais ou água natural ajustada, para as condições exigidas pelos organismos-teste.

Fator de bioacumulação (BAF, BF)- razão da concentração de substâncias presente nos tecidos de organismos sobre aquela que está no ambiente.

Fator de bioconcentração (BCF)- indica o grau de afinidade de um poluente a organismos vivos.

Coeficiente de partição óleo-água (Log KOW, P)- relação das concentrações da substância em óleo e em água. Para a determinação do valor, é realizado um experimento no qual se misturam quantidade conhecida da substância, um solvente orgânico imiscível com água (n-octanol, clorofórmio, éter etílico, etc), que mimetiza a fase oleosa, e água e, após a separação das fases orgânica e aquosa, determina-se a quantidade de substância presente em cada uma das fases.

Concentração de efeito observado/ Concentração letal (CE50/ CL50)- corresponde à concentração da amostra responsável pelo efeito em 50 % dos organismos testados.

Concentração inibitória (CI50)- Concentração de um composto necessária para reduzir o crescimento populacional de organismos (Inibição), em 50% dos organismos testados.

Concentração Inicial de Efeito Não Observado (CENO)- maior concentração da amostra, no início do ensaio, que não causa efeito deletério no desenvolvimento embrionário dos organismos, estatisticamente significativo em relação ao controle, nas condições de ensaio.

Concentração de Efeito Observado (CEO)- menor concentração real da amostra, no início do ensaio, que causa efeito deletério no desenvolvimento embrionário dos organismos, estatisticamente significativo em relação ao controle, nas condições de ensaio.

Controle- conjunto de organismos-teste expostos à água d diluição nas mesmas condições de ensaio, utilizado para avaliar a aceitabilidade do ensaio.

Ensaio de toxicidade aguda- Efeito deletério, letal ou não letal, causado pela amostra no organismo-teste, no período de exposição do ensaio.

Ensaio de toxicidade crônica- efeito deletério causado pela amostra no desenvolvimento embriolarval do organismo-teste no período de exposição do ensaio.

Fator de diluição- Número de vezes que a amostra foi diluída.

Infusão- imersão de uma substância aromática em água quente ou a ferver.

Princípio ativo- substância que deverá exercer efeito farmacológico. Um medicamento, alimento ou planta pode ter diversas substâncias em sua composição, porém somente uma ou algumas destas conseguirão ter ação no organismo.

Maceração- operação física que consiste em retirar ou extrair de um corpo, certas substâncias que são consideradas princípios ativos. Esses princípios ativos podem ser posteriormente utilizados com certas finalidades farmacológicas ou químicas.

Organismo-teste- Organismo utilizado na realização do ensaio ecotoxicológico.

APENDICES

APENDICE A

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NO ENSAIO COM *D. similis*- APÓS A LEITURA DOS RESULTADOS

Resultados dos ensaios de ecotoxicologia realizados com *D. similis* e os vegetais fitoterápicos.

Vegetais	pH	OD
Alcachofra	7,5	8,2
Cascara Sagrada	7,2	7,9
Espinheira Santa	7,8	7,9
Garra- do- Diabo	7,2	8,3
Guaco	7,4	7,7
Hortelã	7,5	8,4
Isoflavona de Soja	7,7	8,0
Salgueiro	7,7	8,1
Unha- de- gato	7,4	8,5

Resultados dos ensaios de ecotoxicologia realizados com *D. similis* e os marcadores de referência.

Marcadores de referência	pH	OD
Ácido clorogênico	7,5	8,1
Dihidroxianthraquinona	7,4	8,1
Epicatequina	7,8	8,0
Harpagósideo	7,6	8,5
Cumarina	7,8	8,1
Mentol	7,8	7,9
Daidzeina	7,6	7,9
Genisteina	7,7	7,9
Salicina	7,4	8,2

Resultados dos ensaios de ecotoxicologia realizados com *D. similis* e os princípios ativos sintéticos.

Princípios ativos sintéticos	pH	OD
Ácido Ursodiol	7,7	7,4
Sulfato de Magnésio	7,6	8,2
Omeprazol	7,4	8,1
Prednisona	7,5	8,2
Acetilcisteína	7,0	7,6
Prednisona	7,5	8,2
Valerato de Estradiol	7,8	8,3
Ácido Acetilsalicílico	6,5	7,7
Prednisona	7,5	8,2

APENDICE B

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS NO ENSAIO CRÔNICO- APÓS A LEITURA DOS RESULTADOS

Resultados dos ensaios de ecotoxicologia realizados com *E. lucunter* e os vegetais fitoterápicos.

Vegetais	pH	OD	Salinidade
Alcachofra	8,2	8,0	35
Cascara Sagrada	8,3	7,0	36
Espinheira Santa	8,1	8,0	35
Garra- do- Diabo	8,0	8,0	35
Guaco	8,1	7,0	36
Hortelã	8,2	7,0	36
Isoflavona de Soja	8,0	7,0	36
Salgueiro	8,1	7,5	33
Unha- de- gato	7,8	8,0	35

Resultados dos ensaios de ecotoxicologia realizados com *E. lucunter* e os marcadores de referência.

Marcadores de referência	pH	OD	Salinidade
Ácido clorogênico	7,9	8,0	35
Dihidroxianthraquinona	8,0	8,0	35
Epicatequina	8,2	7,0	36
Harpagósideo	8,0	8,0	35
Cumarina	8,1	6,8	33
Mentol	8,2	6,8	33
Daidzeina	8,2	8,0	35
Genisteina	8,0	6,8	33
Salicina	8,0	6,8	33

Resultados dos ensaios de ecotoxicologia realizados com *E. lucunter* e os princípios ativos sintéticos.

Princípios ativos sintéticos	pH	OD	Salinidade
Ácido Ursodiol	8,1	8,0	35
Sulfato de Magnésio	8,4	8,1	33
Omeprazol	8,2	8,1	33
Prednisona	8,2	7,4	33
Acetilcisteína	7,8	8,0	35
Prednisona	8,2	8,1	33
Valerato de Estradiol	8,0	7,4	33
Ácido Acetilsalicílico	7,8	7,4	33
Prednisona	8,2	7,4	33

ANEXOS

ANEXO A- CARTA CONTROLE DO LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA-
UNISANTA- *Daphnia similis*.

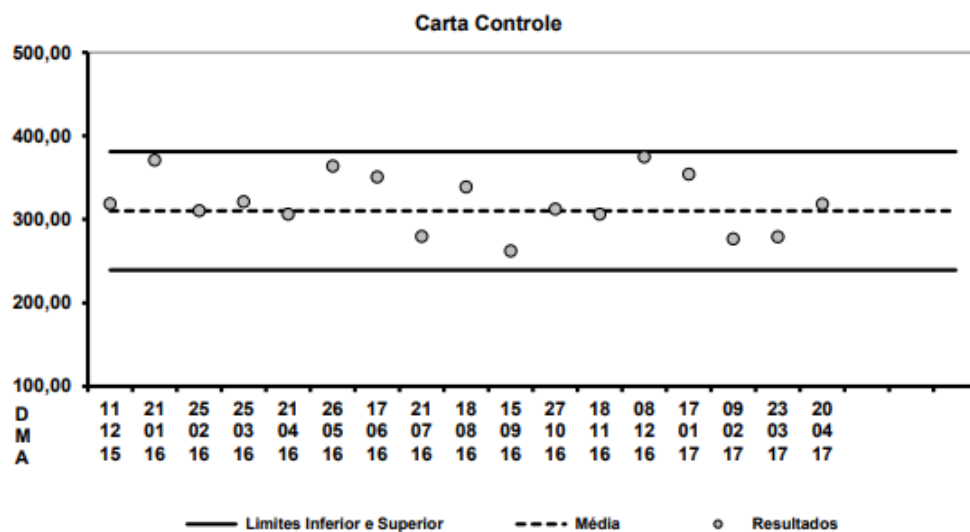
	UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA - UNISANTA
	INSTITUTO SUPERIOR DE EDUCAÇÃO SANTA CECÍLIA - ISESC
	Departamento de Ecotoxicologia
CARTA CONTROLE DE SENSIBILIDADE DE ORGANISMOS -TESTE	

Organismo – teste: *Daphnia similis*
 Método empregado: ABNT NBR 12713
 Substância de referência: Cloreto de potássio

Data de atualização: 20/04/2017

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	27/08/2015	03/09/2015	29/10/2015	26/11/2015	03/12/2015					
Resultado	312,69	284,91	306,10	368,55	279,05					
	Teste 11	Teste 12	Teste 13	Teste 14	Teste 15	Teste 16	Teste 17	Teste 18	Teste 19	Teste 20
DATA										
Resultado										

Dados estatísticos obtidos na carta controle				
MÉDIA mg/L	DESVIO PADRÃO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
310,26	35,49	239,28	381,24	11



ANÁLISE CRÍTICA:



Eng. Aldo Ramos Santos
 Coordenador do DET / ISESC



Fernando Sanzi Cortez
 Biólogo Responsável

ANEXO B- CARTA CONTROLE DO LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA- UNISANTA- *Echinometra lucunter*.

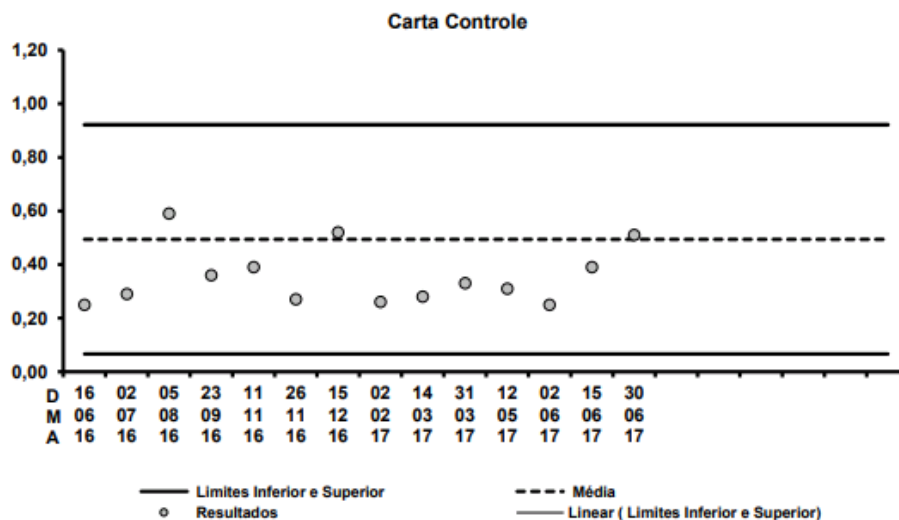
	UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA - UNISANTA
	INSTITUTO SUPERIOR DE EDUCAÇÃO SANTA CECÍLIA - ISESC
	Departamento de Ecotoxicologia
CARTA CONTROLE DE SENSIBILIDADE DE ORGANISMOS -TESTE	

Organismo – teste: *Echinometra lucunter*
 Método empregado: ABNT NBR 15350
 Substância de referência: Sulfato de Zinco

Data de atualização: 30/06/2017

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	24/03/2016	24/03/2016	06/05/2016	13/05/2016	26/05/2016					
Resultado	0,59	0,26	0,64	0,26	0,66					
	Teste 11	Teste 12	Teste 13	Teste 14	Teste 15	Teste 16	Teste 17	Teste 18	Teste 19	Teste 20
DATA										
Resultado										

Dados estatísticos obtidos na carta controle				
MÉDIA mg/L	DESVIO PADRÃO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
0,49	0,21	0,07	0,92	43



ANÁLISE CRÍTICA:


 Eng. Aldo Ramos Santos
 Coordenador do DET / ISESC


 Fernando Sanzi Cortez
 Biólogo Responsável

ANEXO C

RELATÓRIO UTILIZADO NO LABORATÓRIO PARA AUXILIAR A PREPARAÇÃO
DAS AMOSTRAS.

Teste número: _____	Data: _____	Hora de início: _____
Organismo-teste: _____ Substância: _____		

Cálculo:	Pesar: _____
----------	--------------

PREPARO DO ENSAIO

DATA: _____ HORA: _____

CONCENTRAÇÃO	VOL. SOL. ESTOQUE	ÁGUA DE DILUIÇÃO	VOLUME FINAL

LEITURA (NORMAL)

DATA: _____ HORA: _____

CONCENTRAÇÃO	R1	R2	R3	R4

OBSERVAÇÃO: