



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA VOLUNTÁRIA – PICVOL

**ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE FÁRMACOS PARA ORGANISMOS
AQUÁTICOS**

**ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE FÁRMACOS PARA O INSETO
CHIRONOMUS SANCTICAROLI COMO ORGANISMOS-TESTE**

Área do conhecimento: Engenharias
Subárea do conhecimento: Qualidade do ar, das águas e do solo
Especialidade do conhecimento: Ecotoxicologia aquática

Relatório Final
Período do projeto: de agosto de 2022 a agosto de 2023

Esse projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PICVOL

Orientadora: Prof. Dra. Andréa Novelli
Autor: Angel Tomé de Lima Silva



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. METODOLOGIA	4
3.1. ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS	4
3.1.1. CULTIVO DOS ORGANISMOS-TESTE	4
3.2. BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA	5
3.2.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE	5
3.2.2. TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>CHIRONOMUS SANCTICAROLI</i> ...	6
3.3. ANÁLISE DOS DADOS	6
3.3.1. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS ECOTOXICOLÓGICOS	6
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
4.1. TESTES DE SENSIBILIDADE	7
4.2. TESTES DE TOXICIDADE COM O FÁRMACO ENALAPRIL	7
5. CONCLUSÃO	10
6. PERSPECTIVAS DE FUTUROS TRABALHOS	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional verificado no último século tem gerado maior demanda da indústria farmacêutica, tendo como consequência o lançamento em maior escala, nos corpos hídricos, dos resíduos excretados pelas atividades metabólicas dos indivíduos. A partir da década de 70, houve um avanço na comunidade científica em pesquisas que avaliam o impacto que certos compostos exercem nos ecossistemas aquáticos, uma vez que muitas dessas substâncias ainda não possuem *status* regulatório no Brasil e podem ter efeitos desconhecidos no ambiente (Marmolejo *et al.*, 2020).

Nesse sentido, os fármacos se apresentam como contaminantes emergentes de impacto ecotoxicológico, capazes de ultrapassar barreiras fisiológicas (Gomes, 2013). Montagner, Vidal e Acayaba (2017) afirmaram que, após análise de 124 contaminantes em amostras de água tratada, dentre eles hormônios; fármacos, cafeína, produtos de higiene pessoal, pesticidas e, cerca de 45% destes, foram encontrados acima da faixa de tolerância dos métodos analíticos utilizados. Além de não haver alta eficiência de remoção dessas substâncias nas Estações de Tratamento de Água (ETAs), os fármacos também podem ser bioacumulativos ou biopersistentes quando atingem o meio ambiente (Alves; Girard; Pinheiro, 2016).

Os anti-hipertensivos são uma categoria de fármacos responsáveis pelo controle da pressão arterial, sendo dividida entre diuréticos, β -bloqueadores, antagonistas de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e bloqueadores do receptor de angiotensina II (Machado *et al.*, 2021). O maleato de enalapril, por exemplo, age inibindo a ação da angiotensina II, provocando a diminuição da contração e a consequente redução da pressão arterial. No Brasil, a hipertensão arterial sistêmica e o diabetes mellitus lideram o ranking de doenças crônicas (Ribeiro *et al.*, 2021).

Sendo assim, a realização de bioensaios com contaminantes de natureza farmacológica representa uma importante ferramenta de avaliação dos efeitos tóxicos em diferentes tipos de organismos. Dessa forma, através dos estudos ecotoxicológicos é possível determinar o nível



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

de sensibilidade dos indivíduos expostos, bem como os efeitos em longo prazo, contribuindo assim, para a avaliação dos impactos ambientais sobre nos ecossistemas aquáticos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

A pesquisa teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda do fármaco maleato de enalapril para o organismo teste *Chironomus sancticaroli* (inseto).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a CL50, 96h (Concentração Letal) do maleato de enalapril para o organismo-teste *Chironomus sancticaroli*, através dos testes de toxicidade aguda;
- Encontrar a faixa de sensibilidade do organismo-teste *Chironomus sancticaroli* para o cloreto de potássio (carta controle), por meio de testes de toxicidade aguda.

3. METODOLOGIA

As culturas de *Chironomus sancticaroli* foram mantidas rotineiramente no laboratório do Grupo de Estudos de Ecossistemas Aquáticos: Ecotoxicologia Aplicada (LABGEEA), da Universidade Federal de Sergipe - UFS, Brasil (Sisgen no. AA59178).

3.1. ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS

3.1.1. CULTIVO DOS ORGANISMOS-TESTE

Para o cultivo de *Chironomus sancticaroli* (Figura 2), adotou-se os procedimentos de acordo com Fonseca e Rocha (2004). Os organismos foram inseridos em bandejas preparadas com 3 cm de espessura de sedimento (calcinado em mufla a 550°C por duas horas) e 4L de água de manutenção. Todas as bandejas foram aeradas continuamente, expostas à luz durante



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

12 horas por dia, e mantidas sob temperatura controlada ($25\pm 1^\circ\text{C}$). No primeiro dia do cultivo, as larvas foram alimentadas com 10^5 células/mL de alga (*Raphidocelis subcapitata*). Nos demais dias, utilizou-se ração de peixe Tetramin® na proporção de 0,04 mg/L.

Figura 2 - Fases do ciclo de vida do inseto *Chironomus sancticaroli*: desova (1), eclosão da desova (2), I instar larval (3), IV instar larval (4), pupa (5) e adultos fêmea e macho (6).



Fonte: Corbi *et al.* (2019).

3.2. BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

3.2.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE

O maleato de enalapril utilizado foi obtido comercialmente em farmácia de manipulação (CAS número 76095-16-4, pureza $\geq 99\%$) e diluído em água reconstituída para o preparo da solução-mãe, numa concentração de 2 g/L. A partir da solução-mãe, foram feitas diluições seriadas em uma faixa de 25-400 mg/L para o preparo das soluções-teste. A diluição foi realizada utilizando água reconstituída para cultivo.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

3.2.2. TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM *CHIRONOMUS SANCTICAROLI*

A metodologia aplicada na realização dos testes de toxicidade aguda com enalapril seguiu de uma adaptação nos padrões estabelecidos por Fonseca e Rocha (2004). A princípio, foram depositadas 6 larvas de *C. sancticaroli* com estágio de vida no IV instar (7/8 dias) em copos de plásticos atóxicos contendo 50g de sedimento (calcinado em mufla a 550°C por duas horas) e 100 mL da solução-teste. Para cada concentração, realizou-se três réplicas do ensaio. O teste teve duração de 96 horas, e foi mantido em sala climatizada a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Encerradas as 96 horas, foram contabilizados os organismos imóveis em cada réplica. Além disso, mediu-se o pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica da água no início e no fim do teste.

Para fins de comparação dos níveis de toxicidade, montou-se um ponto de controle durante o ensaio, contendo 50g de sedimento e água reconstituída para cultivo em cada réplica. Além disso, para atestar a viabilidade dos ensaios, foram realizados testes de sensibilidade utilizando como substância o cloreto de potássio (KCl), antecedentes aos testes de toxicidade com o fármaco.

3.3. ANÁLISE DOS DADOS

3.3.1. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS ECOTOXICOLÓGICOS

Os resultados dos testes de sensibilidade com KCl, e dos testes de toxicidade aguda com o enalapril foram analisados pelo método estatístico *Trimmed Spearman Karber* e, posteriormente, expressos em CL_{50,96h} para ambos os compostos (Hamilton, Russo e Thurston, 1977).



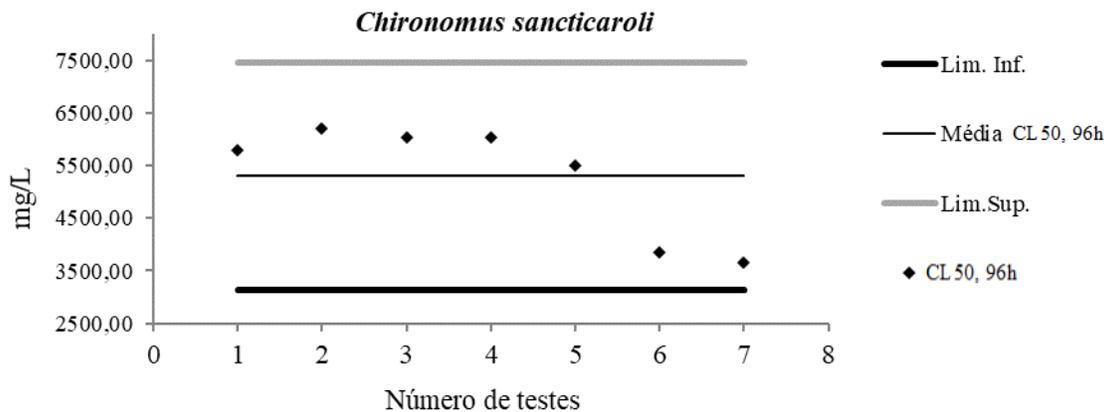
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. TESTES DE SENSIBILIDADE

A partir dos testes com o KCl para *Chironomus sancticaroli*, determinou-se uma CL_{50,96h} média de 5302,3 mg/L. A carta controle (Figura 3) ajustou a faixa de sensibilidade entre 7469,4 e 3135,2 mg/L, mostrando que o valor médio encontrado está dentro dos limites de tolerância e, portanto, os organismos apresentaram boas condições fisiológicas para a realização dos ensaios de toxicidade aguda.

Figura 3 - Resultado dos testes de sensibilidade ao cloreto de potássio para *C. sancticaroli* (2022-2023)



Fonte: do autor (2023).

4.2. TESTES DE TOXICIDADE COM O FÁRMACO ENALAPRIL

Os testes de toxicidade aguda com o enalapril indicaram uma CL_{50,96h} média de 132,20 mg/L para o organismo *Chironomus sancticaroli*. Durante o período do estudo, pesquisadores do mesmo grupo realizaram testes semelhantes utilizando zooplâncton. Para os cladóceros *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* foram encontrados, respectivamente, valores médios de CE_{50,48h} correspondentes a 126,71 mg/L e 170,15 mg/L.

O valor de CL₅₀ menor para *C. sancticaroli* em relação à *C. silvestrii* mostrou que os



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

insetos se encontram mais sensíveis que os microcrustáceos para o enalapril. No estudo realizado por Novelli *et al.* (2012), por exemplo, no qual foi feita uma análise da toxicidade da abamectina para *D. similis*, *C. xanthus* e *Danio rerio*, a CE50,48h encontrada para *D. similis* foi de $3,54 \pm 5,1$ ng/L, enquanto que a CL50,96h para *C. xanthus* correspondeu a $4,54 \pm 0,50$ μ g/L. A abamectina é um pesticida comumente utilizado no controle de pragas em lavouras, e os efeitos da sua dispersão nos ecossistemas se assemelham aos dos fármacos.

Tabela 1 - Resultado do teste de toxicidade aguda com o maleato de enalapril (mg/L)

Organismo	<i>Chironomus sancticaroli</i>
Duração do teste	96h
Concentração mínima e máxima	25 - 400 mg/L
CL50,96h	132,2 mg/L

Fonte: do autor (2023).

Segundo Antza, Stabouli e Kotsis (2016), o enalapril possui um tempo de meia vida relativamente curto de 1,3 hora (Figura 4), e o enalaprilato, enzima ativadora do mecanismo reacional do enalapril, circula por cerca de 11 horas no organismo que o ingere até atingir a metade de sua concentração. Em ambientes aquosos com pH neutro ou básico, a estrutura molecular do enalapril favorece a sua degradação em enalaprilato por hidrólise mais facilmente (Bout; Vromans, 2022).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Figura 4 – Tempo de meia vida para os fármacos Enalapril e Lercanidipino

Características farmacológicas	Lercanidipina	Enalapril
Peso molecular	648,2	492,53
Forma	Citrino em pó	Pó esbranquiçado
Solubilidade em Água	Não	Sim
Meia-vida	3 horas	1,3 horas
Absorção	Gastrointestinal	Gastrointestinal
Secreção	Urina, fezes	Urina, fezes

Fonte: Antza, Stabouli e Kotsis (2016).

Ao analisar o trabalho de Osawa *et al.* (2015), apresentado na figura 5, observa-se que as concentrações de fármacos com finalidades semelhantes à do enalapril (anti-hipertensivos) encontrados em corpos de água doce são da ordem de um milhão de vezes menores que a CL50, 96h determinada neste estudo. Tais dados sugerem que um corpo hídrico dificilmente alcançará a concentração de enalapril necessária para a letalidade dos organismos-teste de maneira natural, sobretudo ao se considerar um cenário com efeitos decorrentes da administração combinada destes fármacos.

Figura 5 - Cromatografia líquida para identificação de fármacos na Bacia do Alto Iguaçu.

Composto	Rio	Mínimo (ng L ⁻¹)	Ponto e Campanha	Máximo (ng L ⁻¹)	Ponto e Campanha	Média (ng L ⁻¹)	Frequência (%)
Metoprolol	Palmital	29,8	PA3;C1	903,6	PA2;C2	355.38	50
	Atuba	18,0	AT1;C1	4658,5	AT4;C3	971.42	81
	Iguaçu	67,1	IG2;C4	1247,2	IG2;C1	452.78	81
	Belém	61,1	BL1;C4	2125,9	BL3;C3	784.46	83
Propranolol	Palmital	48,0	PA3;C1	178,2	PA2;C2	123.56	50
	Atuba	44,5	AT1;C1	3877,9	AT4;C4	513.38	81
	Iguaçu	57,6	IG3;C2	1562,7	IG3;C4	253.56	81
	Belém	68,7	BL1;C1	299,7	BL2;C3	191.55	83
Nadolol	Palmital	<L.Q ^a	-	26,6	PA2;C2	26.63	8
	Atuba	29,7	AT3;C1	123,8	AT3;C3	76.97	31
	Iguaçu	<L.Q ^a	-	<L.Q ^a	-	-	0
	Belém	<L.Q ^a	-	30,0	BL2;C4	30.02	8

Fonte: Osawa *et al.* (2015).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Vale salientar ainda que, além da interação destes compostos com o ecossistema de tal maneira que os impactos sejam sinérgicos ou antagônicos, deve-se levar em consideração as condições do meio durante a realização dos procedimentos laboratoriais (pH, temperatura e oxigênio dissolvido na água, por exemplo) uma vez que estas são variáveis importantes na precisão dos resultados dos testes.

5. CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda, foi possível estabelecer uma CL50, 96h de enalapril para *C. sancticaroli* correspondente a 132,2 mg/L, sendo este valor inferior à CE50,48h de 170,15 mg/L para *C. silvestrii* e superior à CE50,48h de 126,71 mg/L encontrada para *D. similis*, a partir de bioensaios realizados no mesmo período. Em comparação aos estudos consolidados na literatura, observou-se que a faixa de sensibilidade caracteriza os organismos como sensíveis em relação aos cladóceros. Entretanto, a faixa de concentração do enalapril aplicada neste estudo supera consideravelmente as concentrações encontradas de fármacos com ação similar ao enalapril em corpos hídricos. Dessa maneira, cabe a necessidade de estudos mais aprofundados para o fármaco em questão, uma vez que os seus efeitos ainda são pouco conhecidos sobre organismos bioindicadores de ambientes aquáticos.

6. PERSPECTIVAS DE FUTUROS TRABALHOS

Diante da escassez de trabalhos encontrados na literatura sobre a toxicidade do maleato de enalapril para organismos não-alvo, bem como da sua detecção e quantificação nos corpos hídricos, torna-se patente estudos mais aprofundados sobre os efeitos tóxicos deste fármaco em diferentes níveis de organização biológica. Por essa razão, recomenda-se verificar se a presença deste fármaco pode representar um risco ecológico em cadeia trófica nos ecossistemas aquáticos.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, T. C.; GIRARDI, R.; PINHEIRO, ADÍLSON. Micropoluentes, ocorrência, remoção e regulamentação. **Rega**. Porto Alegre, v. 14, 2017.
- ANTZA, C.; STABOULI, S.; KOTSIS, V. Combination therapy with lercanidipine and enalapril in the management of the hypertensive patient: an update of the evidence. **Vascular Health Risk Management**. 15 nov., 2016 12:443-451. doi: 10.2147/VHRM.S91020.
- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Ouro Preto, n. 3, v. 18, p. 187-204, 2013.
- BOUT, M. R.; VROMANS, H. Influence of commonly used excipients on the chemical degradation of enalapril maleate in this its solid state: the role of condensed water. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. Porto Alegre, v. 14, 2017.
- FONSECA, A. L.; ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae). **Acta Limnologica Brasiliensia.**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 153-161, 2004.
- GOMES, R. M. V. A.G. **Efeitos da tetraciclina em *Gambusia holbrooki*: enzimas antioxidantes e alterações histopatológicas**. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto Alegre, 2013. p. 75.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, Washington/EUA v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.
- MACHADO, L. C.; SANTOS, J. F.; BARROS, E. M. S.; PAULA, R. A.; PIRES, J. G. P. Critérios de escolha de fármacos anti-hipertensivos em adultos. **Brazilian Journal of Health Review**. Curitiba, v.4, n.2, p. 6756-6775, 2021.
- MARMOLEJO, J. M.; SAAVEDRA, Y. G.; ROMERO, V. G.; MARTÍNEZ, L. D. L.; BERRONE, K. V.; SAAVEDRA, J. M.; RAMIRES, R. F. Contaminantes emergentes. Problemática ambiental asociada al uso de antibiótico. Novas técnicas de detenção, remediação e perspectivas de legislação na América Latina. **Salud Ambiental**, 2020, v. 20, p. 53-61.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

MARTINS, K. F.; ACOSTA, V. V.; DIAS, G. K.; ALMEIDA, J.O.; TAVARES, A. R.; ROBALDO, R. B. Identificação e determinação de estágios larvais do mosquito *Chironomus sp.* (diptera: chironomidae) em um córrego pluvial localizado no Capão do Leão no extremo sul do Brasil. **XXXI CIC- Congresso de Iniciação Científica**. Universidade Federal de Pelotas, 2022.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, São Paulo, n. 9, v. 40, p. 1094-1110, 2017.

NCD Risk Factor Collaboration. **Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019**: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. 11 set. 2021, v. 398, p. 957-980.

NOVELLI, A.; VIEIRA, B. H.; CORDEIRO, D.; CAPPELINI, L. T. D.; VIEIRA, E. M.; GAETA, E. L. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. **Chemosphere**. Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Carlos, v. 86, n.1, p. 36-40, 2012.

OSAWA, R. A.; IDE, A. H.; SAMPAIO, N. M. F. M.; AZEVEDO, J. C. R. Determinação de fármacos anti-hipertensivos em águas superficiais na região metropolitana de Curitiba. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**. Porto Alegre, out., 2015, v. 20, n. 4, p. 1039-1050.