

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

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

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

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

### **Monike Silva de Freitas**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6583-1257>  
Universidade Santa Cecília, Brasil  
E-mail: monikesfreitas@yahoo.com.br

### **Walber Toma**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5265-7739>  
Universidade Santa Cecília, Brasil  
E-mail: walbertoma@gmail.com

### **Fábio Hermes Pusceddu**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0336-7310>  
Universidade Santa Cecília, Brasil  
E-mail: fabiohp20@hotmail.com

### **Luciana Lopes Guimarães**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7230-9571>  
Universidade Santa Cecília, Brasil  
E-mail: lucianafarm@unisanta.br

### **Resumo**

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

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

### **Abstract**

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

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

**Keywords:** Isoniazid; Pyrazinamide; Pharmaceuticals in the environment; Predicted Environmental Concentration; Ecotoxicology.

### Resumen

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

**Palabras clave:** Isoniazida; Pirazinamida; Drogas en el medio ambiente; Concentración ambiental estimada; Ecotoxicología.

## 1. Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Cálculo da Concentração Ambiental Estimada – CAE

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

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

Sendo que:

Fpen = fator de penetração no mercado

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

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

Sendo que:

DDD = dose diária definida (segundo OMS)

Pop = número de habitantes da cidade

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

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

### 2.2 Avaliação Ecotoxicológica

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

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

### 2.2.1 Teste de toxicidade aguda em *Daphnia similis*

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

Foi realizado manutenção frequente destes organismos como filtragem e troca de água, além da alimentação com várias espécies de algas verdes, mas geralmente usada a *Pseudokirchneriella subcaptata*, propiciando um ambiente favorável para a reprodução (ABNT, 2016). Além da alimentação, também houve adaptação de ambiente favorável com até 25 organismos por litro de água reconstituída (de acordo com a NBR 12713, ABNT 2016) com alguns requisitos adequados para o cultivo da espécie, sendo eles: dureza total  $\text{mgCO}_3/\text{L}$  de 40 a 48 e pH de 7,0 a 7,6; e os mesmos foram acondicionados em câmara de germinação com a temperatura variante entre 18°C e 22°C (ABNT, 2016).

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

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

### 2.2.2 Teste de toxicidade crônica em *Echinometra lucunter*

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

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

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

### 2.3 Análise estatística

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

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

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

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

### 3. Resultados e Discussão

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

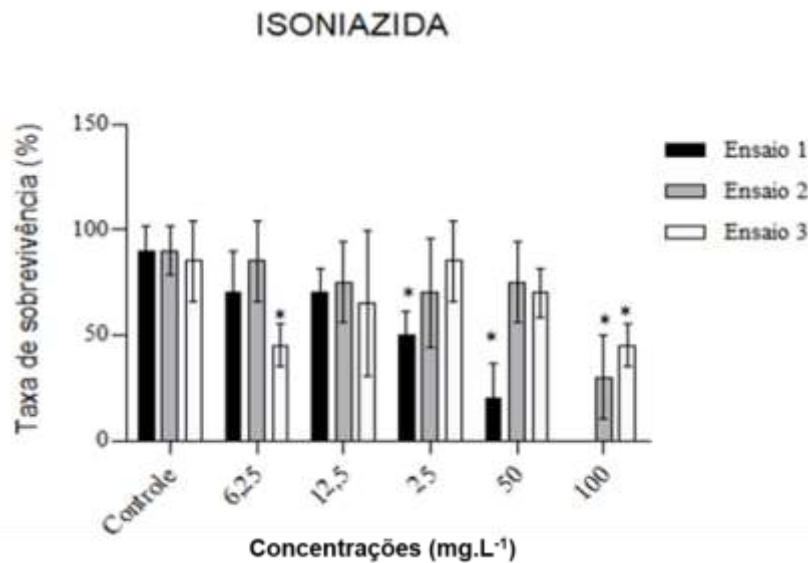
<b>Tuberculostático</b>	<b>CAE ETE Lagoa* (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>CAE ETE Casqueiro* (<math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>
<b>Rifampicina</b>	3,12	3,29
<b>Isoniazida</b>	1,56	1,64
<b>Pirazinamida</b>	4,39	4,62
<b>Etambutol</b>	3,01	3,18

Fonte: Autores.

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

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

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



Fonte: Autores.

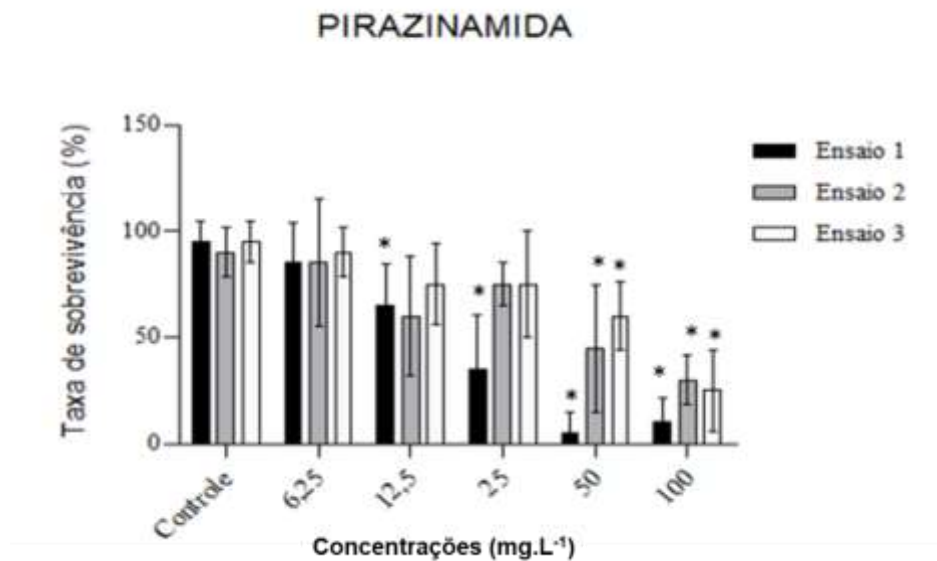
**Tabela 3** – Valor de CE<sub>50</sub> obtido dos ensaios para o fármaco Isoniazida com *D. similis*.

Isoniazida	CE <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	Intervalo de confiança
1	100	---
2	83,12	62,99-109,69
3	26,79	19,41-36,98
<b>Média</b>	69,97	---
<b>DP</b>	38,33	---
<b>CV (%)</b>	54,78	---

CE<sub>50</sub>- Concentração efetiva que induz efeito em 50% dos organismos expostos;  
 IC- Intervalo de confiança; DP- Desvio Padrão; CV- Coeficiente de Variação.  
 Fonte: Autores.



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



Fonte: Autores.

**Tabela 4.** Valor de CE<sub>50</sub> obtido dos ensaios para o fármaco Pirazinamida com *D. similis*.

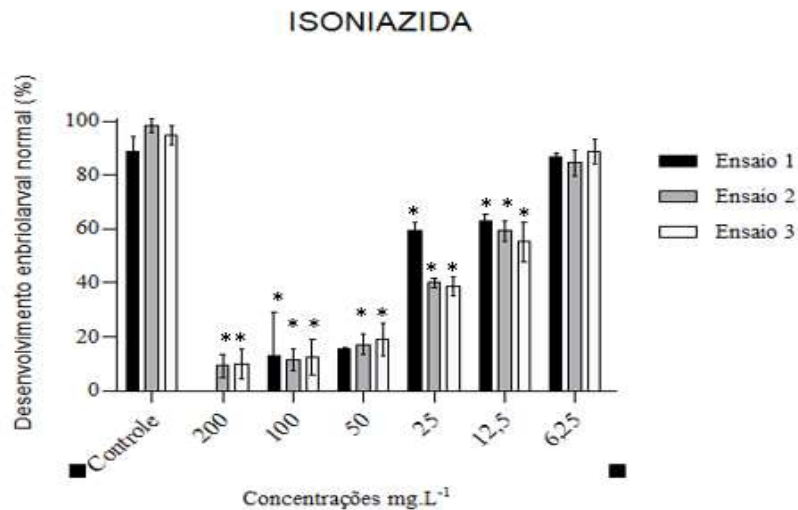
Pirazinamida	CE <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	Intervalo de confiança
1	62,19	43,05-89,84
2	18,32	13,95-24,07
3	52,97	30,72-91,35
<b>Média</b>	44,49	---
<b>DP</b>	23,13	---
<b>CV (%)</b>	51,98	---

CE<sub>50</sub>- Concentração efetiva que induz efeito em 50% dos organismos expostos;  
 IC- Intervalo de confiança; DP- Desvio Padrão; CV- Coeficiente de Variação.  
 Fonte: Autores.

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

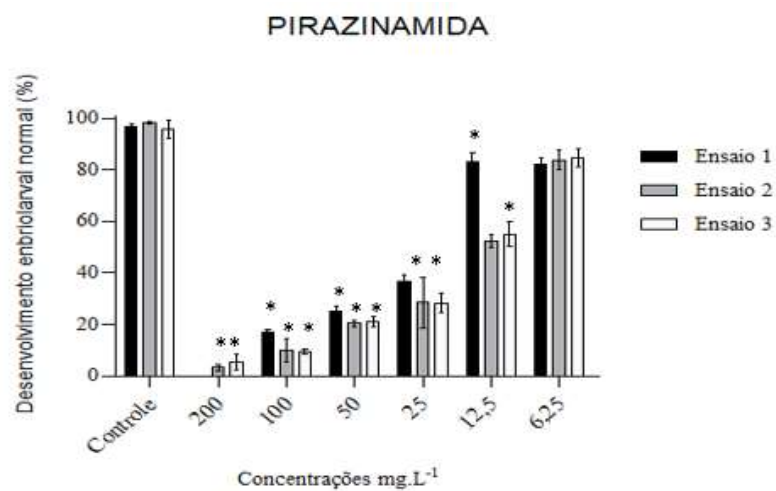
Os dados das substâncias analisadas nos ensaios de toxicidade com *E. lucunter* referente ao fármaco Isoniazida (n=3) estão representados na Figura 3, onde o organismo-teste foi exposto a diferentes concentrações de Isoniazida (6,25 a 200 mg.L<sup>-1</sup>), e foram observados valores de CEO e CENO (Tabela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

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



Fonte: Autores.

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



Fonte: Autores.

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

Medicamento	CEO (mg.L <sup>-1</sup> )	CENO (mg.L <sup>-1</sup> )	CI <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
Isoniazida	12,5	6,25	23,66 (22,69 - 25,62)
Pirazinamida	12,5	6,25	17,21 (16,33 - 18,33)

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

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

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

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

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

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

<b>Organismo-teste <i>D. similis</i></b>		
<b>Medicamento</b>	<b>CI<sub>50</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Classificação</b>
Isoniazida	69,97	Nocivo
Pirazinamida	44,49	Nocivo
<b>Organismo-teste <i>E. lucunter</i></b>		
<b>Medicamento</b>	<b>CI<sub>50</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Classificação</b>
Isoniazida	23,66	Nocivo
Pirazinamida	17,21	Nocivo

Fonte: Autores.

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

#### 4. Conclusão

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

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

#### Agradecimentos

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

#### Referências

- ABNT NBR – Associação brasileira de normas técnicas. (2012). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*. 15350:2012 Brasil; 2012 p. 21.
- ABNT NBR - Associação brasileira de normas técnicas. (2016). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladóccera, Crustácea). 12713:2016 Brasil; 2004 p. 33
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2003). [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/136\\_03rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/136_03rdc.htm)
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). (2010). <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/renome2010final.pdf>

- Baumann, L., Holbech, H., Posthaus, H. S., Moissi, A. P., Hennies, M., Tidemann, J., Segner, H. & Braunbeck, T. (2020). Does hepatotoxicity interfere with endocrine activity in zebrafish (*Danio rerio*)? *Chemosphere*. 238(1), 124-589
- Carvalho, G. G., Pires, A. J. V., Garcia, R., Veloso, C. M., Silva, R. R., Mendes, F. B. L., Pinheiro, A. A. & Souza, D. R. (2009). In situ degradability of dry matter, crude protein and fibrous fraction of concentrate and agroindustrial by-products. *Ciência Anim. Bras.* 10, 689-97
- CEC (Commission of the European Communities). Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, environmental risk assessment. Luxembourg: Office for official publication of the European Communities, v. 1488, p. 94, 1996.
- CHMP – Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. (2006). <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf>.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). (2007). Relatório de monitoramento de emissários submarinos. <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/25-publicacoes/-relatorios>
- EMA – European medicines agency, committee for medicinal products for human use (CHMP) – Guideline on the environmental Risk Assessment - . (2006). <https://www.ema.europa.eu/en/environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use>.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2007). Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/ppcp/index.cfm>
- Escher, M.A. S., et al (2019). Problemática ambiental da contaminação dos recursos hídricos por fármacos. *RBCIAMB*. 51, 141-148.
- European agency for the evaluation of medicinal products (EMA). Note for guidance on environmental risk assessment of medicinal products for human use. (2005). [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC500003978.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003978.pdf)
- Fent, K., Weston, A. A. & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 76, 122-159.
- Garrison, A. W., Pope, J. D., Allen, F. R. & Keith, C. H. (1976). Identification and analysis of organic pollutants in water. *Michigan: Ann Arbor Science*. 5, 517-566.
- Hamilton, A. M., Russo, R. C. & Thurston, R. V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science e Technology*. 11(7), 714-719.
- IMS Health – The pharmerging future, Pharmaceutical Executive. (2009) <http://www.pharmexec.com/pharmexec/issue/issueDetail.jsp?id=17680>
- IMS Health – Saiba o que impulsiona o sistema de saúde brasileiro. (2011). <http://www.imshealth.com/portal/site/ims/menuitem.d248e29c86589c9c30e81c033208c22a/?vgnnextoid=c42ae9161a3f2310VgnVCM100000ed152ca2RCRD&cpsexcurrchannel=1>
- Jones, O.A.H., Voulvoulis, N. & Lester, J. N. (2007). Ecotoxicity of pharmaceuticals. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 50, 387-424.
- Brasil. Ministério da Saúde. (2019). Manual de Recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil. [https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_rec\\_omendacoes\\_controle\\_tuberculose\\_brasil\\_2\\_ed.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_rec_omendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf)
- Newman, M.C. & UNGER, M.A. (2002). *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publisher.
- Norberg-King, T. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. *National Effluent Toxicity Assessment Center*. 05-88.
- Organização mundial da saúde (OMS). (2012). *Pharmaceuticals in Drinking-water*. Geneva. Health and Environment Water, Sanitation, Hygiene and Health.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). (2014). *Antimicrobial Resistance: global report n surveillance*. Geneva. Library Cataloguing in Publication.
- Parlamento Europeu. Diretiva 2013/39/UE - Altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. (2013). *Jornal Oficial da União Europeia*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039&from=IT>.
- Pereira, C. D. S. (2008). Biomarcadores de exposição, efeito e bioacumulação de xenobióticos em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) transplantados ao longo do litoral de São Paulo. Tese doutorado, Universidade de São Paulo, USP.
- Pereira A. S. et al. (2018). Metodologia da pesquisa científica. UFSM
- Quintino, M. P. (2003). Effects of pyrazinamide on pregnant albino rats. *International Journal of Morphology*. 21(4) 299-302.
- Reis-Filho, R. W., Barreiro, J. C., Vieira, E. M. & Cass, Q. B. (2007). Fármacos, ETEs e corpos hídricos. *Revista Ambiente & Água*. 2. 54-61.
- SABESP-Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. (2018). Tratamento de esgotos. Recuperado de <http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=49>.
- Santos, L. H. M., Araújo, A. B., Fachini, A., Pena, A., Deleuremats, C. & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceutical in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. 75(1) 45-95.
- Scheffer, E. W & Tiburtius, E. R. (2014). Triclosan: Fate in the Environment and Perspectives in the Treatment of Public Water Supply. *Revista de Química*. 6(5), 1144-1159
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium. (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*. 314 (5801), 941-952.
- Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos do Estado de São Paulo (SINDUSFARMA). (2012). <http://www.sindusfarmacomunica.org.br/indicadores-economicos/>

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

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

Yamamoto, N. S., et al (2012). Avaliação dos efeitos biológicos dos fármacos Losartan em microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea, Cladocera). *Unisant BioScience*. 1(2), 49-53

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