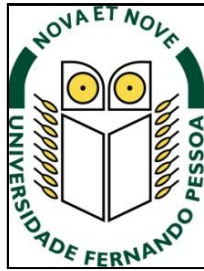


Fernanda Margarida Silva Cardoso Rodrigues

**Estudo dos efeitos de paracetamol em parâmetros reprodutivos e
comportamentais de *Daphnia magna***

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2010



Fernanda Margarida Silva Cardoso Rodrigues

**Estudo dos efeitos de paracetamol em parâmetros reprodutivos e
comportamentais de *Daphnia magna***

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2010

"Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências farmacêuticas “

Sumário:

Nas últimas décadas a contaminação de origem antropogénica dos ecossistemas aquáticos tem vindo sucessivamente a aumentar. Em consequência, fármacos e seus resíduos são frequentemente detectados em ecossistemas aquáticos. A concentração crescente de resíduos de fármacos em ecossistemas aquáticos tem vindo a reunir cada vez mais interesse, quer por estar a sofrer um aumento em quantidade e variedade, quer pela toxicidade que pode provocar nos organismos aquáticos, criando a necessidade da avaliação do seu efeito nestes ecossistemas. *Daphnia magna* é um organismo teste amplamente utilizado em Ecotoxicologia na avaliação da toxicidade de substâncias químicas, tendo sido a espécie escolhida para a realização deste estudo. Assim, e em virtude de uma ausência de estudos em número suficiente para caracterizar a resposta ecotoxicológica que deriva da exposição ao anti-inflamatório paracetamol por via ambiental, foi estabelecido como objectivo do presente estudo avaliar os efeitos deste composto sobre juvenis do organismo padrão *Daphnia magna*. Para este efeito, realizaram-se testes padronizados de toxicidade aguda e crónica, com concentrações conhecidas do fármaco. Os resultados obtidos, sugerem que o paracetamol tem um efeito de toxicidade aguda sobre o crustáceo com valores de LC_{50} às 24 horas de 0,328 mg/l (+/- 0,104 mg/l). Sugerem também um efeito deletério na alimentação e reprodução de *Daphnia magna*, pois verificou-se um decréscimo significativo da taxa reprodutiva em todas as concentrações utilizadas, e também um decréscimo na taxa de alimentação na mais alta concentração utilizada.

Abstract:

In few decades anthropogenic contamination of aquatic ecosystems has been significantly increased. Consequently, drugs and their residues are commonly found in aquatic ecosystems. The increasing concentration and variety of pharmaceutical residues in aquatic ecosystems has increased the scientific interest, either due to the increase of these residues in aquatic ecosystems, but also as a consequence of the potential toxicity that they may cause in aquatic organisms. This enhances the need to evaluate the effect of these compounds in aquatic ecosystems. *Daphnia magna* is

commonly used as test organism in Ecotoxicology, for the assessment of the toxicity of chemicals, and was the species chosen for the present study. Therefore, and due to a lack of a suitable number of studies characterizing the ecotoxicological response derived from the environmental exposure to the anti-inflammatory drug paracetamol, our primary objective was to evaluate the effects of this compound on *Daphnia magna* juveniles. To attain this purpose, were observed the acute and chronic toxicity elicited by the mentioned compounds, following exposures to known concentrations of the drug. The obtained results suggested that paracetamol evidenced an acute toxic effect on the crustacean with LC_{50} values at 24 hours of 0.328 mg/l. They also suggest a deleterious effect on feeding and reproduction behaviors of *Daphnia magna*, as there was a significant decrease in reproductive rate at all concentrations used, and also a decrease in the feeding rate for the highest tested concentration.

Dedicatórias:

À minha avó, pois sem ela nada seria possível. Pelo inestimável amor e amizade

Agradecimentos:

Ao Prof. Doutor Bruno Nunes, orientador científico desta dissertação, por todo o apoio, orientação e motivação em todas as fases do trabalho. Pela leitura criteriosa dos textos e pela inestimável disponibilidade.

Aos meus pais, por me acompanharem e apoiarem em todas as fases difíceis da vida, ajudando mais uma vez a ultrapassar esta. Pela vida, amor e exemplo.

Aos meus amigos, pela amizade, carinho e ajuda prestada ao longo da minha vida.

Ao Ricardo, pela inestimável paciência, amizade, ajuda, carinho e dedicação, desde sempre demonstrados.

Índice:

SUMÁRIO.....	1
DEDICATÓRIA.....	3
AGRADECIMENTOS.....	4
ÍNDICE.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS.....	8
I.1. Contaminantes antropogénicos.....	9
I.2. Farmacos como contaminantes ambientais.....	9
I.3. Paracetamol como contaminante ambiental.....	12
I.4. Utilização de bioensaios em testes ecotoxicológicos.....	14
I.4.1. Modalidade dos testes.....	15
I.5. Organismos-teste.....	15
I.6. <i>Daphnia magna</i> como organismo padrão em Ecotoxicologia.....	16
I.7. Características morfológicas de <i>Daphnia magna</i>	16
I.8. Características reprodutivas de <i>Daphnia magna</i>	17
I.9. Substância em estudo: paracetamol.....	17
I.10. Estudos ecotoxicológicos com paracetamol.....	18
CAPÍTULO II. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
II.1. Condições de cultura do organismo-teste <i>Daphnia magna</i>	19
II.1.1. Luz e temperatura.....	19
II.1.2. Organismo-teste.....	20
II.1.3. Meio de cultura.....	20
II.1.4. Alimentação.....	20
II.2. Condições de ensaio.....	22
II.3. Testes agudos: determinação do valor de LC ₅₀	22
II.3.1. Condições de ensaio.....	23
II.4. Testes crónicos: avaliação dos efeitos do paracetamol a nível reprodutivo.....	24
II.5. Testes agudos: Determinação do comportamento alimentar.....	24
II.6. Análise estatística.....	25

CAPÍTULO III. RESULTADOS.....	25
III.1. Teste agudo	25
III.2. Teste crónico	26
III.3. Teste de comportamento alimentar	27
CAPÍTULO IV. DISCUSSÃO.....	28
IV.1. Toxicidade aguda: avaliação dos efeitos letais do paracetamol.....	28
IV.2. Toxicidade crónica: Avaliação dos efeitos do paracetamol a nível reprodutivo...	32
IV.3. Testes agudos:Determinação dos efeitos do paracetamol no comportamento alimentar.....	34
CAPÍTULO V. CONCLUSÃO.....	35
CAPÍTULO IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

Índice de figuras:

Figura 1. Fontes de contaminação ambiental.....	11
Figura 2. Principais fármacos contaminantes ambientais.....	11
Figura 3. Morfologia de <i>Daphnia magna</i>	16
Figura 4. Condições de cultura de <i>Daphnia magna</i> no laboratório.....	20
Figura 5. Sistemas de crescimento das algas para alimentação dos crustáceos.....	22
Gráfico 1. Resultados dos testes de mortalidade ao fim de 24 horas.....	26
Gráfico 2. Resultados dos testes de reprodução ao fim de 14 dias.....	27
Gráfico 3. Resultados dos testes de alimentação (ao fim de 24 horas).....	28

I) Introdução:

A presença de poluentes nos ecossistemas aumentou muito nos últimos anos, principalmente nos ambientes aquáticos. Os ecossistemas aquáticos são o destino final de muitos poluentes, sendo que estes podem provir de fontes naturais ou de fontes de contaminação antropogénica (Altindang *et al.*, 2008). As classificações de acordo com a natureza dos poluentes (chumbo, dióxido de carbono, desperdícios sólidos, etc) e de acordo com o ambiente afectado (ar, água, solo, etc.) são naturalmente métodos largamente utilizados (Odum, 1971). De acordo com os tipos de poluentes, podem referir-se os poluentes não biodegradáveis, que são materiais que não se degradam ou apenas o fazem muito lentamente no ambiente natural (como por exemplo, o DDT ou substâncias fenólicas de cadeia longa). Estas substâncias são relevantes, pois não se desenvolvem processos de tratamento naturais que possam compensar a intensidade com que o homem as faz entrar no ecossistema (Hartwell, 2008). Estes poluentes, para além de se acumularem no ambiente são normalmente biologicamente amplificados à medida que se deslocam nos ciclos biogeoquímicos e ao longo das cadeias alimentares (Fent *et al.*, 2006). Para além disso, combinam-se frequentemente no ambiente com outros compostos, produzindo toxinas adicionais (Fent *et al.*, 2006). Para este tipo de poluentes, o único anulamento possível consiste na sua remoção ou extracção do sistema ambiental que suporta a vida. Tal solução é normalmente inviável, pelos custos e esforços envolvidos, pelo que a única solução razoável consiste em proibir o lançamento de tais matérias no ambiente em geral, ou encontrar substitutos biodegradáveis para tais matérias (Odum, 1971). Por outro lado, os poluentes biodegradáveis podem ser rapidamente decompostos em sistemas naturais ou em sistemas de engenharia (como as estações municipais de tratamento de águas residuais), que reforçam a grande capacidade da natureza para decompor ou reciclar. Ou seja, esta categoria inclui substâncias para as quais existem mecanismos naturais de tratamento de resíduos, como o calor. (Odum, 1971).

1) Contaminantes antropogénicos:

Os contaminantes foram definidos como substâncias libertadas através da actividade humana. Estas substâncias podem tornar-se poluentes (definidos como substâncias que ocorrem no ambiente resultantes em parte da actividade humana que tem um efeito deletério em organismos vivos; Odum, 1971). Muitos dos compostos orgânicos encontrados em águas são sintéticos, ou seja, fabricados pelo homem (antropogénicos). São chamados de xenobióticos e definidos como químicos estranhos ou material não produzido na natureza, não sendo um constituinte natural de um sistema biológico específico (Kronimus *et al.*, 2004). Os compostos orgânicos encontrados no meio, incluem contaminantes intencionalmente lançados no ambiente, como insecticidas ou pesticidas, ou compostos que são produtos ou resíduos de processos industriais, como moléculas sintéticas (Newnan e Unger, 2003). As descargas de poluentes em águas constituem a maior fonte de contaminação a nível global: os lixos domésticos são habitualmente descarregados em sistemas de esgotos e as descargas industriais são efectuadas em sistemas de esgotos ou directamente em águas de superfície (Santos *et al.*, 2010).

2) Fármacos como contaminantes ambientais:

Os fármacos, em geral, são potenciais agentes para acções lentas e deletérias sobre o ecossistema, devido a factores intrínsecos (pH, reactividade química e potencial de oxidação-redução) e extrínsecos (temperatura, humidade relativa do ambiente e composição gasosa do ambiente; Newnan e Unger, 2003). Constituem um perigo pois são fracamente removidos nas estações de tratamento de águas residuais, têm facilidade de penetração das barreiras biológicas, exercem acção farmacológica mesmo em baixas quantidades, exercendo acções farmacológicas distintas de acordo com a espécie animal e respectivas vias metabólicas envolvidas (Fent *et al.*, 2006). Têm também elevada capacidade de bioacumulação ou persistência ambiental, podendo adquirir novas formas (metabolitos ou produtos de degradação), com novos modos de acção e novos órgãos alvo (Fent *et al.*, 2006).

De acordo com o estudo conduzido por Christen *et al.* (2010), os compostos farmacêuticos de uso humano e veterinário encontram-se em crescente uso, sendo que são usadas cerca de 3000 substâncias farmacêuticas na União Europeia. Os mais consumidos habitualmente são AINES (anti-inflamatórios não esteróides), analgésicos, antibióticos, reguladores lipídicos, β -bloqueadores e hormonas. A contaminação aquática por estes compostos provém maioritariamente de desperdícios hospitalares e municipais. Nas últimas décadas, foram detectados em baixas concentrações, em estações de tratamento de águas residuais, águas superficiais e marinhas e águas subterrâneas em vários países. As concentrações medidas nos efluentes de esgotos e estações de tratamento encontram-se, geralmente no intervalo de ng/l - g/l, e em ng/l, em rios, lagos e mares. Por exemplo, foram encontradas concentrações de drogas ácidas, como o bezafibrato e o naproxeno em estações de tratamento de água na Alemanha na concentração de 4,6 $\mu\text{g/l}$ e 0,4 $\mu\text{g/l}$, respectivamente (Miao *et al.*, 2002). Foram também encontradas concentrações de clorofibrato (que possui actividade biológica e elevada persistência ambiental) superiores a 0,8 ng/l em estações de tratamento de águas residuais, e concentrações de 270 ng/l, em água da torneira na Suíça (Nunes *et al.*, 2004). Na Alemanha foram também encontrados vários metabolitos do antibiótico eritromicina como a roxitromicina e o sulfometazol em concentrações de 6 $\mu\text{g/l}$, em estações de tratamento de água (Hirsch *et al.*, 1999).

Segundo o estudo conduzido por Santos *et al.*, (2010), a principal fonte de contaminação do ambiente por químicos de utilização terapêutica é a excreção inalterada de fármacos na urina e nas fezes. É também importante referir outras fontes de contaminação, que assumem também alguma importância na contaminação ambiental, como indicado pela imagem abaixo:

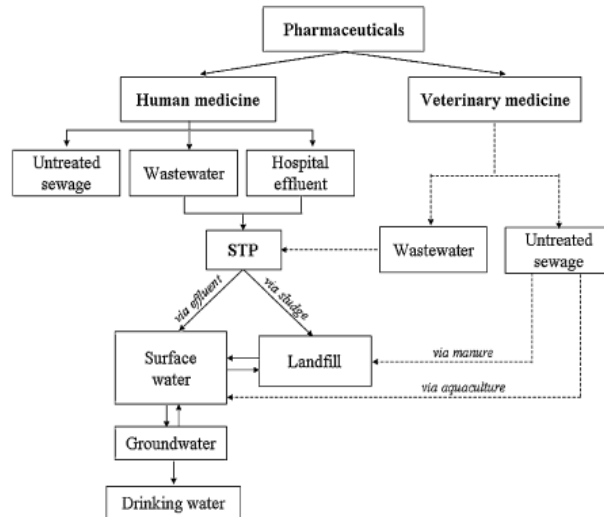


Imagem 1- “Percurso ambiental dos fármacos no ambiente”.

Adaptado de: Santos *et al.*, (2010).

Ainda segundo este artigo, os AINES são os principais fármacos contaminantes encontrados no ambiente, como indica a figura abaixo:

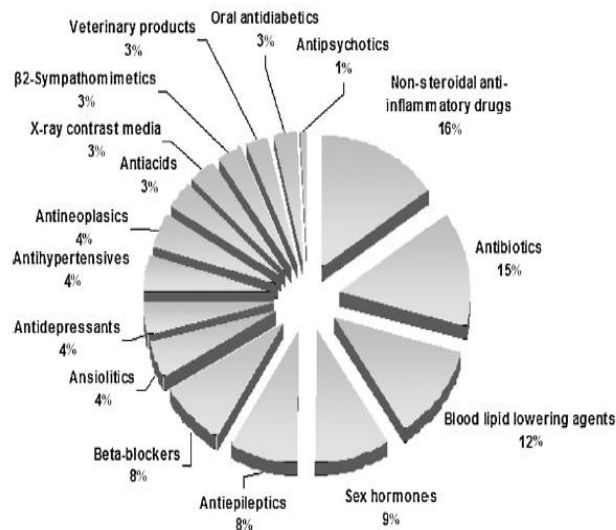


Imagem 2- “Principais classes medicamentosas como contaminantes ambientais”.

Adaptado de: Santos *et al.*, (2010).

AINES, como o naproxeno, diclofenac, ibuprofeno e paracetamol, foram já encontrados em concentrações de 2,06 ng/l, 18,74 ng/l, 9,89 ng/l e 2,42 ng/l, respectivamente. Foram ainda encontrados, drogas de utilização em terapêutica psiquiátrica como a carbamazepina, numa concentração de 3,09 ng/l, antibióticos como o sulfametoxazol em concentrações de 11,92 ng/l, β - bloqueadores como o sotalol em concentrações de 1,82 ng/l, e anti-histaminicos como a ranitidina em concentrações de 0,57 ng/l (Ginebreda *et al.*, 2010). Bendz *et al.*, (2005), em análises realizadas a um rio na Suécia, encontrou concentrações de AINES até 3,9 μ g/l, antibióticos em concentrações de 0,08 μ g/l, e anti-epiléticos em concentrações de 1,68 μ g/l.

Segundo Sanderson *et al.*, (2003), o paracetamol é encontrado em águas da Europa e Norte da América em concentrações de 0,014 μ g/l. Ginebreda *et al.*, (2010), publicou um estudo acerca da presença de vários fármacos no rio Llobregat em Espanha. Segundo este mesmo estudo, o paracetamol foi detectado com uma frequência de 90% em amostras provenientes de rios do Mediterrâneo. Segundo Jones *et al.* (2001), são prescritos 10,4 milhões de medicamentos (sob diversas formulações, como cápsulas, comprimidos ou saquetas) com paracetamol nos Estados Unidos da América anualmente, sendo que a concentração máxima de paracetamol encontrada em estações de tratamento de águas residuais é de 6000 ng/l.

3) Paracetamol como contaminante ambiental:

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINES) como o paracetamol, podem ser encontrados na ordem dos mg/l em águas de superfície, águas de consumo humano e efluentes de estações de tratamento de águas residuais, sendo uns dos compostos farmacêuticos mais frequentemente encontrados em ambientes aquáticos (Parolini *et al.*, 2009). Vários estudos realizados na Europa, Canadá e Estados Unidos da América, durante a última década, mostram que os compostos mais encontrados nas águas residuais, rios e mesmo em águas para consumo são os AINES. Isto ocorre provavelmente pois estes são largamente usados no tratamento de dor moderada e crónica e no tratamento de doenças reumáticas (Farré *et al.*, 2008). Um número de reservatórios aproveitados para água potável, foram monitorizados ao longo do rio Lergue no sul da França, sendo encontrados vários contaminantes, entre eles produtos farmacêuticos como os AINES paracetamol e diclofenac e o anticonvulsivante

carbamazepina (Farré *et al.*, 2008). Os AINES são um dos grupos de fármacos encontrados em maiores concentrações em águas nos Estados Unidos da América (p.e., o naproxeno em concentrações até 3200 ng/l e o ibuprofeno em concentrações até 1900 ng/l). AINES como o diclofenac, apresentam uma taxa de remoção nas estações de tratamento de cerca de 50%, sugerindo assim que tem uma baixa inactivação nos sistemas de tratamento de água (Yu *et al.*, 2006).

Segundo Heberer (2002), o paracetamol é facilmente degradado e removido das estações de tratamento de águas. No entanto, a sua presença é ubíqua, e encontra-se amplamente disperso pelo ambiente aquático. Em análises a efluentes de esgotos e rios da Alemanha, o paracetamol foi encontrado em menos de 10% dos esgotos, não sendo detectado nas águas dos rios. Em análises a 142 cursos de água, nos Estados Unidos da América, susceptíveis de contaminação com esgotos municipais, foi detectado paracetamol em 17% das amostras, em concentrações máximas de 10,0 µg/l (Heberer, 2002).

Segundo Ternes (1998), foram encontrados antiflogísticos em mais de 50% das águas analisadas nos esgotos alemães, rios e efluentes industriais. O paracetamol foi detectado numa concentração máxima de 1 µg/l. Este fármaco não foi também detectado em águas superficiais, dentro dos limites de detecção, podendo isto dever-se à completa remoção pelo sistema de tratamento de águas.

Foi também encontrado paracetamol em amostras de água de estações de tratamento de águas residuais, numa concentração de 0,036 µg/l, e numa concentração de 0,76 µg/kg em amostras sólidas de sedimento (Stackelberg *et al.*, 2007). O máximo encontrado em amostras de água foi de 0,12 µg/l em águas antes de tratamento; no entanto, após tratamento da água, o valor máximo encontrado foi de 0 µg/l (Stackelberg *et al.*, 2007). Foram também já detectadas concentrações de paracetamol de 0,16 µg/l, em amostras de água provenientes dos Estados Unidos da América (Focazio *et al.*, 2008).

Fent *et al.*, (2006) publicou um artigo de revisão que refere que a concentração de paracetamol em influentes de estações de águas residuais é de 6,9 µg/l, e nos efluentes é de 0 µg/l, com uma percentagem máxima de remoção de 100%. Ainda segundo este

estudo, foram encontradas concentrações de paracetamol superiores a 10 µg/l em 24% de amostras de água nos Estados Unidos (Fent *et al.*, 2006).

4) Utilização de bioensaios em testes ecotoxicológicos:

4.1) Modalidades de testes:

Nos testes de toxicidade utilizados em Ecotoxicologia é importante a relação entre a quantidade de químico ao qual o organismo é exposto e os efeitos tóxicos causados. O parâmetro dose-resposta permite a avaliação dos riscos de um químico para o ambiente (Walker *et al.*, 2001). Existem muitos métodos de avaliar/quantificar a toxicidade de um xenobiótico. Os parâmetros de toxicidade (*end-points*) mais comumente utilizados são a avaliação da mortalidade, capacidade de reprodução e testes comportamentais (OECD, 2008). No entanto, existem muitos ensaios que permitem estimar a dose ou concentração que causa letalidade a 50% dos organismos expostos (LC₅₀) (OECD, 1984). Numa abordagem mais recente, é possível estabelecer a concentração ou dose que não causa efeito observável (NOEC). Estes valores, obtidos a partir dos testes ecotoxicológicos, dependem das condições em que estes são realizados, como temperatura, humidade ou estado de saúde do organismo (Walker *et al.*, 2001).

Uma das dificuldades do teste de toxicidade com organismos aquáticos reside em manter a concentração de contaminante constante na água, pois este é perdido devido à absorção e metabolismo por parte do organismo, e à volatilização, degradação e absorção pela água (OECD, 2008). Quando a percentagem de perda é relativamente baixa, os ensaios podem ser realizados em sistemas estáticos ou semi-estáticos. Nos sistemas estáticos, a água não é substituída durante a duração do teste, enquanto nos ensaios semi-estáticos, a água é substituída em intervalos regulares (usualmente a cada 24 horas) (OECD, 2008).

Outro sistema que pode ser utilizado é o sistema de fluxo contínuo, em que a solução teste é continuamente renovada, assegurando uma concentração constante da substância teste e previne possíveis contaminações com algas ou mucos. É no entanto mais dispendioso e mais complexo (OECD, 2008).

5) Organismos-teste:

Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos é necessário a selecção de um organismo-teste. O organismo-teste é seleccionado de acordo com alguns critérios, tais como disponibilidade e abundância no ambiente, facilidade de cultivo em laboratório e conhecimento da biologia da espécie. São espécies indicadoras, preferencialmente, espécies sensíveis e locais (Rand, 1995). Acrescenta-se a necessidade de representatividade do organismo em relação a um determinado grupo de importância ecológica, e a estabilidade genética que serve de base a populações (Rand, 1995).

De entre as espécies que reúnem tais critérios, uma amplamente utilizada, e cuja metodologia de cultivo e teste é normalizada em vários países, é o microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*. (Imagem 3). (Rand, 1995). Para além de ser utilizada como organismo-teste, é também uma espécie bioindicadora em estudos ecotoxicológicos. Espécies bioindicadoras indicam a presença ou ausência de um dado contaminante no ambiente, indicando o estado biótico ou abiótico de um determinado ambiente, permitindo aferir sobre o impacto produzido sobre um determinado habitat, comunidade ou ecossistema. Estes organismos podem sofrer alterações ecológicas, comportamentais, bioquímicas, morfológicas, fisiológicas ou genéticas devido à exposição a um dado contaminante (Pepper *et al.*, 1996).

6) *Daphnia magna* como organismo padrão em Ecotoxicologia:

A *Daphnia magna* é um microcrustáceo de água doce, da ordem *Cladocera* com cerca de 1,5 mm de comprimento quando adulto, vulgarmente designado por pulga-de-água. É um habitante comum das águas doces interiores do globo, alimenta-se de algas e é a presa principal de vários peixes (Walker *et al.*, 2001). É muito usada em bioensaios toxicológicos, nomeadamente nos testes requeridos pela legislação nacional e europeia para a avaliação ecotoxicológica de novos agentes químicos, de efluentes urbanos e industriais e de ecossistemas de água doce (Walker *et al.*, 2001). É um organismo passível de ser mantido em laboratório, dado ser de reduzidas dimensões, de fácil adaptação a condições laboratoriais, altamente prolífico e sem grandes variações nas ninhadas. Pelo facto de se reproduzir por partenogénese (reprodução assexuada) é

possível manter um clone, mantendo o património genético constante ao longo do tempo (Walker *et al.*, 2001). Este organismo foi seleccionado como organismo-teste para este ensaio por ser amplamente conhecido (em termos biológicos), facilmente cultivado e mantido em laboratório e por se reproduzir frequentemente, o que garante o suprimento de organismos para testes constantes. Para além disso, são apenas necessárias infra-estruturas simples, os custos para manutenção são baixos e a resposta aos agentes ambientais é rápida devido ao seu ciclo de vida curto. Os testes ecotoxicológicos que habitualmente envolvem este organismo são também de curta duração: duram normalmente 24-48h em sistemas estáticos (OECD, 2001), o que contribui para sua actual aceitação e divulgação.

7) Características morfológicas e fisiológicas de *Daphnia magna*:

Organismos desta espécie apresentam, como todos os crustáceos, uma carapaça que no seu caso sofre muda diária. As crias são geneticamente iguais à progenitora, reproduzindo-se mesmo em condições adversas, como curto fotoperíodo, baixa concentração de alimentos e elevada densidade populacional. Apresenta uma ampla distribuição geográfica e importância ecológica com significativo relevo nas cadeias alimentares de água doce e possui elevada sensibilidade a uma grande variedade de tóxicos (OECD, 2008).



Imagem 3- Adulto da espécie *Daphnia magna* (adaptado a partir de Tatarazako e Oda, 2007).

8) Características reprodutivas de *Daphnia magna*:

Em condições naturais, *D. magna* reproduz-se por partenogénese cíclica, o que fornece tanto clones de longo termo, como populações com reprodução sexuada. Isto significa que, durante a maior parte do ano, as populações naturais de *D. magna* são constituídas maioritariamente por fêmeas, sendo os machos apenas abundantes na Primavera e Outono, ou quando ocorrem condições ambientais desfavoráveis como, por exemplo, baixas temperaturas ou grande densidade populacional e subsequente acumulação de produtos de excreção. Contudo, em laboratório, onde as condições ambientais podem ser mantidas favoráveis e constantes, a reprodução sexuada normalmente não ocorre, e *D. magna* reproduz-se apenas partenogenicamente, originando numerosos descendentes geneticamente idênticos às fêmeas progenitoras, o que permite eliminar a variabilidade de ordem genética dos bioensaios (Pepper *et al.*, 1996). O seu ciclo de vida varia entre cerca de 40 dias a 25 °C, e 56 dias a 20°C. Quando mantida em laboratório, esta espécie tem, normalmente, juvenis de 2 em 2 dias e precisa de 6 a 10 dias para dar origem à primeira ninhada. Os ovos são libertados quando as fêmeas mudam a sua carapaça (Pepper *et al.*, 1996).

9) Substância em estudo: paracetamol

O paracetamol ou acetaminofeno é um fármaco com propriedades analgésicas e antipiréticas, mas sem propriedades anti-inflamatórias clinicamente significativas (Guimarães *et al.*, 2006). Pertence à classe dos anti-inflamatórios não esteróides, que actuam por inibição, reversível ou irreversível, de uma ou das duas isoformas da enzima cicloxigenase, COX-1 e COX-2, envolvidas na síntese das prostaglandinas a partir do ácido araquidónico (Guimarães *et al.*, 2006). O paracetamol é um composto para-aminofenólico, derivado da anilina, sendo uma das substâncias mais utilizadas actualmente. A sua actividade antipirética é devida à molécula de anilina, sendo quase completamente biotransformado no organismo pelas enzimas microsossomais hepáticas. Cerca de 60% é conjugado com o ácido glucorónico, 35% é conjugado com grupos sulfonato, e uma pequena parte conjugada com a cisteína, sendo outra parte hidroxilada (Guimarães *et al.*, 2006).

10) Estudos ecotoxicológicos com paracetamol:

Foram já realizados estudos, que se focaram nos efeitos do paracetamol em organismos não-alvo como *D. magna*, no entanto, estes incidiram somente na mortalidade, como os estudos de Kim *et al.* (2007), Henschel *et al.*, (1997) ou Madden *et al.*, (2009), referidos e abordados na secção da discussão. No entanto, não existem estudos nem dados relativos à reprodução e balanço energético e alimentar dos efeitos do paracetamol em *D. magna*.

Assim, e em virtude de uma ausência de estudos em número suficiente para caracterizar a resposta ecotoxicológica que deriva da exposição a paracetamol por via ambiental aquática, foi estabelecido como objectivo do presente estudo avaliar os efeitos deste composto sobre juvenis do organismo padrão *Daphnia magna*.

II) Material e métodos:

A avaliação dos efeitos toxicológicos do paracetamol em *D. magna*, neste trabalho, foi realizada, utilizando alguns end-points como a mortalidade (com cálculo do LC₅₀), comportamento alimentar e os efeitos sobre a reprodução. O parâmetro mortalidade, avalia o número de crias com menos de 24 horas, que morrem (permanecem imóveis após estímulo) após exposição a diferentes concentrações de paracetamol. Segundo as normas da OCDE (OCDE, 1984), adoptadas no presente estudo, os animais em estudo encontram-se mortos quando se apresentam imóveis ao fim de 15 segundos após leve agitação.

De acordo com a norma da OCDE (OCDE, 1998) é necessário reportar a mortalidade diariamente, durante uma exposição aguda de 48 horas. O parâmetro LC₅₀, importante para medir os efeitos toxicológicos de uma dada substância num determinado organismo bioindicador, deverá ser posteriormente calculado com base nos valores de mortalidade ao fim do período de exposição de 48 horas. A concentração letal a 50%, corresponde à concentração necessária para produzir morte em 50% da população (OCDE, 1984). O parâmetro LC₅₀ descreve a distribuição da susceptibilidade do organismo-teste a um composto (Stephan, 1977). Em organismos aquáticos, os valores obtidos experimentalmente são comparados com concentrações esperadas em

compartimentos aquáticos, num tempo comparável. Permite assim, prever o risco ambiental de determinada substância, indicando o potencial dano para o ambiente permitindo a protecção e conservação do ambiente. (EPA U.S., 1978).

1) Condições de cultura do organismo-teste *Daphnia magna*:

Os animais a utilizar em testes ecotoxicológicos devem ser preferencialmente identificados pelo genótipo, e não devem ter mais de 24 horas. Os animais devem provir de um stock saudável, sem sinal de stress, como alta mortalidade, animais descolorados ou demora na produção da primeira ninhada. Devem ser mantidos em condições de cultura apropriadas (luz, temperatura, meio, alimento e número de animais por cultura) (OECD, 1998). As progenitoras utilizadas no presente estudo obedeceram a este critério, sendo provenientes de uma cultura monoclonal do Laboratório de Ecologia de Águas Doces, Ecotoxicologia e Risco, do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Laboratório Associado (Aveiro).

1.1) Luz e temperatura:

Os animais foram cultivados com exposição a 16 horas de luz, não excedendo a intensidade de $15\text{-}20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, e mantidos a uma temperatura entre 18 e 22° C ($\pm 2^\circ$ C), e sem arejamento durante a sua manutenção (OECD, 1998).

Foram mantidos em frascos contendo cerca de 100 ml de água isenta de cloro. As crias produzidas foram retiradas ao longo de todo o tempo de ensaio.



Imagem 4 - Condições de cultura de *Daphnia magna* no laboratório.

1.2) Meio de cultura:

O meio utilizado neste estudo foi água isenta de cloro, obtida por borbulhar ar sob pressão em água da rede de distribuição pública, permitindo assim a libertação do cloro (desinfectante).

1.3) Alimentação:

A norma de teste adoptada implica que a alimentação dos organismos da cultura laboratorial fosse preferencialmente feita com células algais vivas (*Chorela sp*, *Selenastrum sp*, ou *Scenedescus subspicatus*). A alimentação foi fornecida a uma taxa constante (OECD, 1998).

Para a alimentação dos animais, foi assim cultivado um meio de algas em laboratório. Foi preparado um meio artificial para permitir o crescimento de algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Stein (1973), apresenta o protocolo geral que foi seguido no presente trabalho, para um dos meios passíveis de serem utilizados na manutenção laboratorial de microalgas verdes e na realização de testes ecotoxicológicos com essas mesmas algas. Trata-se do meio Woods Hole MBL (Marine Biological Laboratory) e os procedimentos apresentados foram adaptados a partir de Stein (1973).

O meio Woods Hole MBL é um meio totalmente artificial, sintético, rico, que contém os macronutrientes e micronutrientes necessários para sustentar o crescimento algal. Este conjunto de nutrientes essenciais é conseguido adicionando uma série de reagentes laboratoriais (na sua maioria sais) a água destilada (Stein, 1973). Assim, é obtido pela diluição com água destilada de diversas soluções stock de compostos químicos:

(1) CaCl_2 [36,76g/l]; (2) MgSO_4 [36,97g/l]; (3) NaHCO_3 [12,6g/l]; (4) K_2HPO_4 [8,7 g/l]; (5) NaNO_3 [85,01g/l]; (6) Na_2SiO_3 [28,42g/l]; (7) Na_2EDTA [4,36g/l]; (8) FeCl_3 [3,15g/l]; (9) CuSO_4 [0,01g/l]; (10) ZnSO_4 [0,022g/l]; (11) CoCl_2 0,01 g/l; (12) MnCl_2 [0,18g/l]; (13) Na_2MoO_4 [0,006g/l]; (14) Tris(hydroxymethyl) amino-metano [50g em 200ml]. (Stein, 1973).

Ao recipiente onde se fez o meio de cultura (próprio para autoclavagem), já metade cheio com água destilada, adicionou-se 1 ml por litro de meio de cada uma das soluções de 1 a 11, e 2 ml por litro de meio da solução 12. (Stein, 1973). Esterilizou-se o meio por autoclavagem, a 120°C, durante 60 minutos, com pressão de 1 atmosfera. (Stein, 1973). Após autoclavagem, e imediatamente antes de o meio ser usado, adicionou-se, sob condições de assepsia, 1 ml de solução de vitaminas (tiamina biotina e cianocobalamina, em concentrações finais no meio de cultura de 100, 0,5 e 0,5 µg/l, respectivamente) (Stein, 1973).

Inoculou-se o frasco de cultura com 1 ml de uma solução de *Pseudokirchneriella subcapitata*. O frasco de cultura foi constantemente arejado e mantido iluminado com luz de intensidade controlada. As algas cresceram durante cerca de 14 dias, sendo depois retiradas para alimentação dos animais. Os animais foram alimentados com uma suspensão de células algais, obtida por centrifugação a 3000g por 5 minutos.



Imagem 5- Vaso de crescimento das algas para alimentação dos crustáceos.

2) Condições de ensaio:

Todas as condições bióticas e abióticas foram mantidas constantes e tal como foram enunciadas, ao longo de todos os ensaios, com excepção dos testes agudos de letalidade, durante os quais não foi fornecido alimento.

3) Testes agudos: determinação do valor de LC_{50}

Os ensaios de toxicidade aguda permitem determinar a toxicidade relativa de uma amostra ou substância, sobre um organismo aquático, exposto a diferentes concentrações conhecidas da amostra/substância, num curto período de tempo (Rand, 1995). O tempo de exposição geralmente situa-se entre 24-48h, incluindo os parâmetros avaliados: a mortalidade, no caso de peixes; imobilidade, no caso de invertebrados; e crescimento de uma cultura, no caso de algas. O resultado é expresso em Concentração Efectiva Média - CE_{50} , ou seja, a concentração à qual 50% da população exposta sobrevive à concentração exposta, num período determinado (Rand, 1995). Assim, o objectivo do ensaio de toxicidade aguda, é determinar a concentração de substância que produz um efeito deletério na população exposta, durante um curto período de tempo (Rand, 1995).

Neste estudo, os ensaios foram realizados de acordo com as normas da "Organization for Economic Cooperation and Development" - OECD, OECD Test Guidelines for Testing of Chemicals desenvolvido para *Daphnia magna* (OECD, 1998). Para os testes de mortalidade, animais com menos de 24 horas foram colocados em frascos, contendo 10 animais por frasco, cada frasco contendo 100 ml de água isenta de cloro. As concentrações de paracetamol a que os animais foram expostos foram 0,5 mg/l; 0,25 mg/l; 0,125 mg/l; 0,0625 mg/l e 0,03125 mg/l, sendo as soluções preparadas a partir de uma solução stock de paracetamol de 2 mg/l. Foi realizado um controlo nas mesmas condições. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. O ensaio teve a duração de 24 horas. Foram mantidos em condições de temperatura entre o 18° C e o 22° C, com um fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuridão. Este ensaio, permitiu calcular a mortalidade causada pelas concentrações de paracetamol utilizadas e calcular o parâmetro LC₅₀, (concentração letal 50).

3.1) Condições de ensaio:

Foram utilizados 60 animais neonatos, com menos de 24 horas de idade, divididos em grupos de 10 para testes semi-estáticos. De acordo com a metodologia de testes padronizados utilizada, foi contabilizado o número de animais mortos no final do período de exposição; a mortalidade dos animais nas condições controlo não excedeu os 10%, permitindo viabilizar o teste. No final, o número de animais mortos em cada uma das concentrações permitiu o cálculo do valor de concentração letal a 50% (LC₅₀). O resultado destes ensaios foi igualmente útil para escolher a gama de concentrações que foram posteriormente usadas no teste de toxicidade crónica (OECD, 1998) e de comportamento alimentar.

4) Testes crónicos: avaliação dos efeitos do paracetamol a nível reprodutivo

Este ensaio pretendeu avaliar o efeito das várias concentrações sub-letais de paracetamol (calculados com base nos resultados obtidos a partir do teste de toxicidade aguda), na taxa de reprodução de *D. magna*, ao longo de um período alargado e

consequentemente ecologicamente relevante. Os testes crónicos permitem avaliar os possíveis efeitos adversos de um químico sobre o organismo, exposto a concentrações sub-letais do mesmo, durante um longo período de exposição, permitindo assim que o organismo seja exposto à substância em estudo durante todo o seu ciclo de vida, incluindo vários estágios como a juventude, crescimento, maturidade sexual e reprodução (Rand, 1995).

Segundo a norma OECD/211, (1998) os ensaios crónicos com *D. magna* são realizados num período de 21 dias, com fluxo semi-estático, e avaliam a reprodução do organismo. Assim, estes testes visam uma avaliação geral do desempenho reprodutivo das fêmeas como indicativo de contaminação ambiental, cobrindo assim todo o ciclo do organismo (OECD, 1998). O principal objectivo do teste é observar o efeito de químicos na reprodução de *Daphnia magna*. Assim, jovens fêmeas de *Daphnia magna*, com idades de 24 horas, foram expostas à substância teste em diferentes concentrações (OECD, 1998).

Para os testes de exposição crónica, foram utilizadas concentrações sub-letais de paracetamol, preparadas a partir da mesma solução stock de 2 mg/l. As concentrações de exposição utilizadas foram de 0,164 mg/l; 0,082 mg/l; 0,041 mg/l; 0,0205 mg/l e 0,01025 mg/l. Os animais foram alimentados 3 vezes por semana com uma suspensão de algas. O ensaio teve a duração de 14 dias. Para os testes de exposição crónica, os animais com menos de 24 horas, foram divididos em frascos, contendo 10 animais por frasco, cada frasco contendo 100 ml de água isenta de cloro. Foram mantidos em condições de temperatura entre o 20° C ($\pm 2^\circ\text{C}$), com um fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuridão. Foi realizado um controlo nas mesmas condições. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. No final do ensaio o número total de crias vivas por fêmea foi contado, sendo assim excluídas as crias que morreram durante o tempo de ensaio (OECD, 1998).

5) Testes agudos: determinação do comportamento alimentar

Este ensaio pretendeu avaliar o efeito das várias concentrações sub-letais de paracetamol, no padrão alimentar de *Daphnia magna*. Para os testes de comportamento

alimentar, foram utilizadas concentrações sub-letais de paracetamol, preparadas a partir da mesma solução stock de 2 mg/l. As concentrações de exposição utilizadas foram de 0,164 mg/l; 0,082 mg/l; 0,041 mg/l; 0,0205 mg/l e 0,01025 mg/l. O ensaio teve a duração de 24 horas. Para os testes de alimentação, os animais adultos, foram divididos em frascos, contendo 10 animais por frasco, cada frasco contendo 100 ml de água isenta de cloro. Foram mantidos em condições de temperatura de 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), com um fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuridão. Foi realizado um controlo nas mesmas condições. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Adicionou-se uma quantidade conhecida de células de *P. subcapitata* a todos os frascos contendo organismos-teste. Foi realizada a contagem de células algais ao tempo zero para cada concentração e também para o controlo. Ao fim de 24 horas, no final do teste, foram novamente contadas as células para todas as concentrações e também para o controlo. Para ambas as contagens, foi utilizada um hematocitómetro (câmara de Neubauer).

6) Análise estatística:

Foi realizada uma análise de variância para verificar diferenças significativas entre os tratamentos, seguida de um teste de Dunnet, para discriminar diferenças significativas relativamente aos tratamento controlo. Para o cálculo do valor de LC_{50} , utilizou-se o método Probit (Finney, 1971). A homogeneidade de variâncias foi testada previamente pelo teste de Levene.

III) Resultados:

1) Testes de mortalidade:

O teste de mortalidade revelou diferenças significativas entre o tratamento controlo e os tratamentos expostos às concentrações de 0,03125; 0,25 e 0,5 ($F = 61,78$; g. l. = 5, 12; $p < 0,01$). Os dados obtidos permitiram calcular o valor de LC_{50} , de 0,328 mg/l ($\pm 0,104$ mg/l).

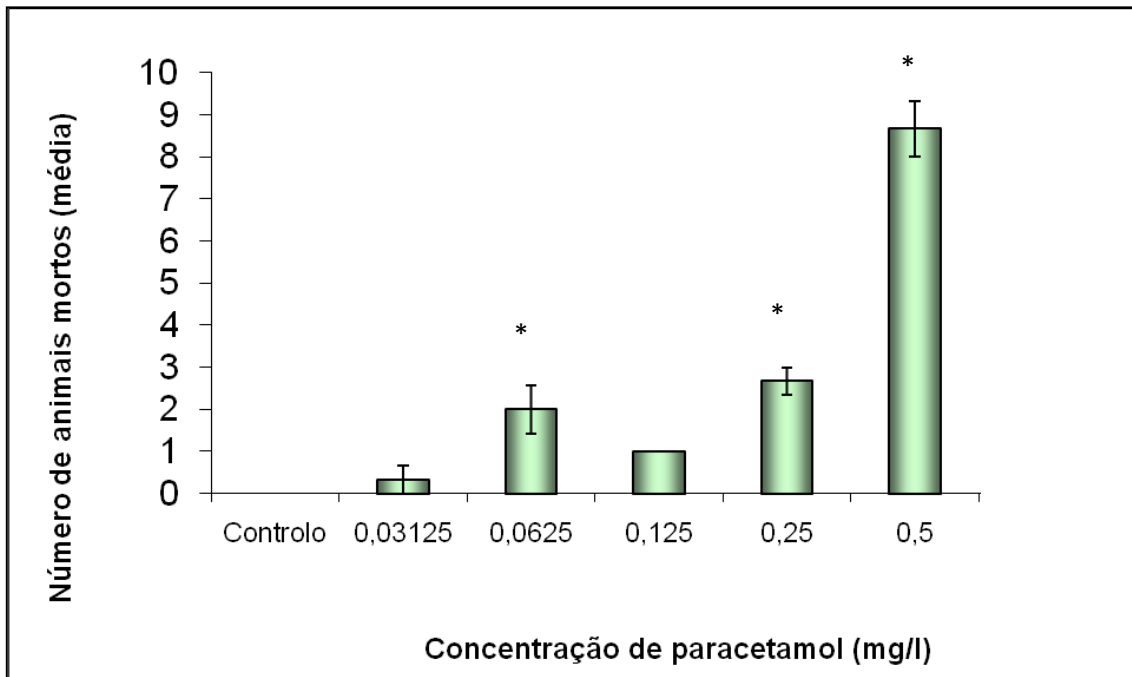


Gráfico 1- Resultados dos testes de mortalidade: número de animais mortos por tratamento; os valores referem-se à média das 3 réplicas + respectivas barras de erro padrão; * - diferenças significativas em relação ao controlo ($p < 0,05$).

2) Teste de reprodução:

O teste de reprodução revelou diferenças significativas entre o tratamento controlo e todos os tratamentos adoptados ($F = 71,4$; g. l. = 5, 12; $p < 0,01$), com uma significativa e dose-dependente redução do número de neonatos por fêmea.

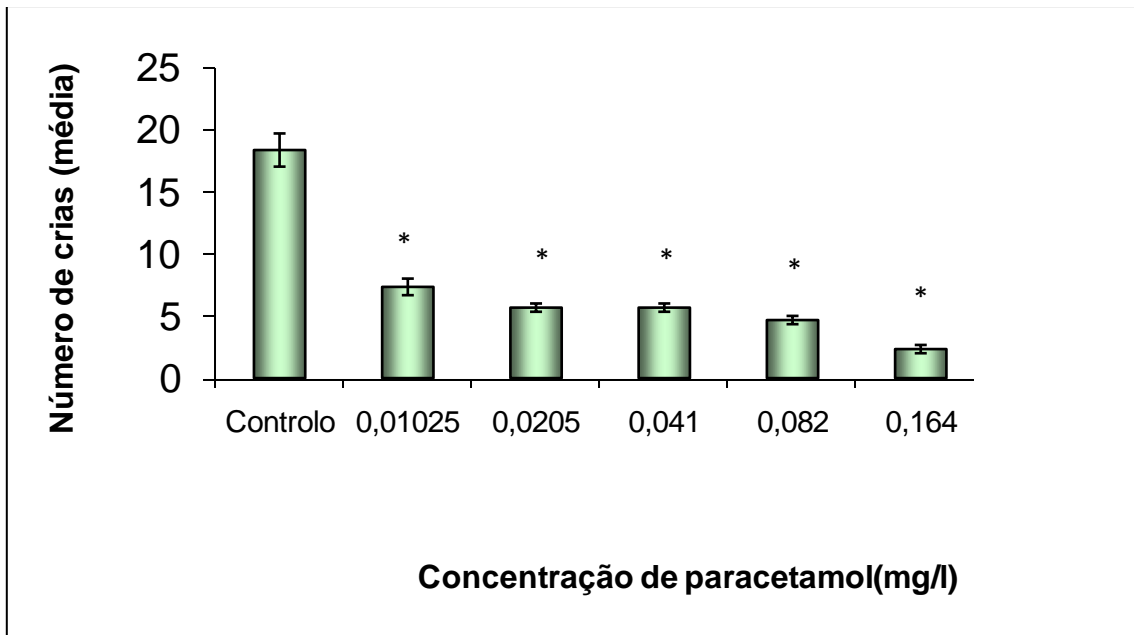


Gráfico 2- Resultados do teste de reprodução; os valores referem-se à média das 3 réplicas + respectivas barras de erro padrão; * - diferenças significativas em relação ao controlo ($p < 0,05$).

3) Teste de alimentação:

O teste de alimentação revelou diferenças significativas entre o tratamento controlo e o tratamento de concentração mais elevada, correspondente a 0,5 mg/l ($F = 316,55$; g. l. = 5, 12; $p < 0,01$).

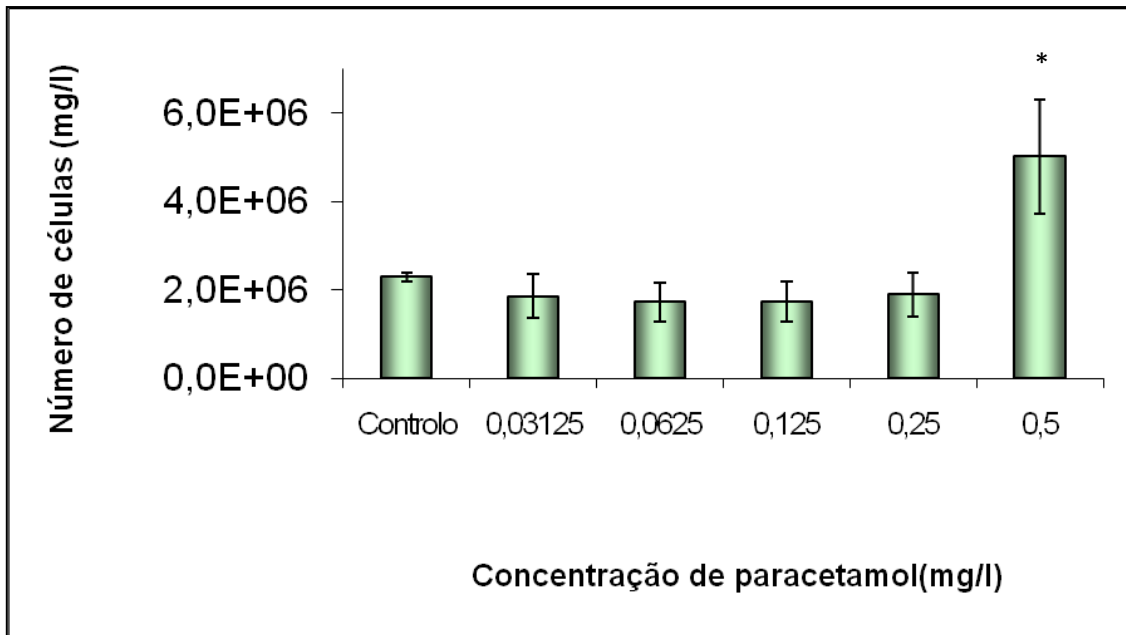


Gráfico 3- Resultados do teste de alimentação (24 horas); os valores referem-se à média do número de células algais das 3 réplicas ao fim do período de 24 horas + respectivas barras de erro padrão; * - diferenças significativas em relação ao controlo ($p < 0,05$).

IV) Discussão:

1) Toxicidade aguda:

Segundo Farré *et al.*, (2008), os efeitos adversos do paracetamol devem-se principalmente à formação de metabolitos hepatotóxicos, primariamente N-acetilparabenoquinona-imina (NAPQI), sintetizada quando existe diminuição da glutathiona nas células do fígado. O metabolismo do paracetamol, em doses terapêuticas, envolve a sua conjugação por intermédio de arilssulfotransferases (com grupos sulfonato) e de glucoronosiltransferases (conjugação com ácido glucorónico). No entanto, a acção oxidativa do citocromo P₄₅₀ permite a formação de uma pequena percentagem de NAPQI, que é prontamente eliminada por conjugação com a glutathiona. Em sobredosagem, a glutathiona intracelular esgota-se e permite a acção tóxica do NAPQI formado (Guimarães *et al.*, 2006). Este mecanismo de actuação é comum a uma multiplicidade de organismos, pelo que é de esperar que os efeitos ambientais que

resultam da presença de resíduos de paracetamol possam obedecer aos mesmos parâmetros.

Tal como no presente estudo, trabalhos prévios recorreram à imobilização como critério de ecotoxicidade para avaliar os efeitos do paracetamol em organismos aquáticos. No estudo conduzido por Kim *et al.* (2007), foi calculado um valor de LC₅₀ às 48 horas de 30,1 mg/l para *Daphnia magna*. Relativamente ao cálculo do PEC (predicted environmental concentration), este foi de 16,5 µg/l, e um valor de PNEC (predicted no effect concentration) de 9,2 µg/l. A razão PEC/PNEC calculada, apresentou assim um valor superior a um, que segundo este autor sugere risco ecotoxicológico para este fármaco no organismo estudado. Comparando com o presente estudo, o estudo de Kim *et al.*, (2007) apresenta um valor de LC₅₀ muito elevado. Assim, é possível concluir que o paracetamol apresentou uma maior toxicidade no presente estudo relativamente ao do autor referenciado, pois o organismo por nós utilizado foi bastante mais sensível ao fármaco. Esta diferença significativa no valor de LC₅₀ pode dever-se às diferentes condições de exposição. No estudo conduzido por Kim *et al.*, (2007), foi utilizado dimetilsulfóxido para preparar as soluções stock, numa concentração que não excedeu os 0,5%, sendo que no presente estudo não foi utilizado nenhum solvente para preparação das soluções stock. As soluções stock de paracetamol, utilizadas no trabalho descrito por Kim *et al.* (2007), não foram imediatamente usadas, mas sim preparadas e armazenadas durante dois dias, o que pode ter conduzido à parcial degradação do composto. As condições experimentais adoptadas no trabalho descrito por este autor, foram também sensivelmente diferentes das adoptadas no nosso estudo. O meio de manutenção de *Daphnia magna* no estudo conduzido por Kim *et al.* (2007), foi filtrado antes de ser utilizado, sendo que no presente estudo não houve filtração. Todos estes parâmetros podem conduzir a alterações fisiológicas significativas, influenciando a diferença de resultados observada. Para além disso, o parâmetro de LC₅₀, calculado por este autor, refere-se a 48 horas, enquanto no presente estudo, o parâmetro LC₅₀ se refere a 24 horas. É no entanto importante salientar, que segundo Kim *et al.*, (2007), *D. magna* foi o organismo mais sensível a todos os fármacos testados, apresentando este composto risco ecotoxicológico para este crustáceo.

Também Henschel *et al.*, (1997), reportou valores de LC₅₀ para o paracetamol em *D. magna* entre 19 e 50 mg/l, verificando igualmente que a toxicidade do paracetamol nestes organismos aumenta ao longo do tempo, pois o valor de LC₅₀ às 24 horas é de 293 mg/l, diminuindo para 50 mg/l às 48 horas, sugerindo que a sensibilidade do organismo-teste aumenta ao longo do tempo de exposição. Em função destes resultados, este estudo conclui que o paracetamol provoca efeitos ecotoxicológicos em *Daphnia magna*. Mais uma vez, este parâmetro ecotoxicológico calculado por Henschel *et al.* (1997), foi mais elevado do que o calculado no presente estudo. Assim, pode concluir-se que a espécie *Daphnia magna* se revelou mais sensível no presente estudo, sendo que foram utilizadas as mesmas condições de teste nos dois estudos comparados.

Madden *et al.*, (2009) utilizou a tecnologia ECOSAR (*Ecological Structure Activity Relationships* - sistema informático de previsão que estima a toxicidade aquática de produtos químicos: o programa estima a toxicidade aguda ou crónica de um produto para organismos aquáticos como peixes, invertebrados e plantas aquáticas) para estimar o LC₅₀ do paracetamol no crustáceo *Daphnia magna*, encontrando um valor de LC₅₀ às 48 horas de 34,699 mg/l. Comparando com o presente estudo, em que o valor encontrado de LC₅₀ foi de 0,328 mg/l, relativamente à exposição aguda de *Daphnia magna* a diferentes concentrações de paracetamol, pode verificar-se que os organismos utilizados no presente estudo foram novamente mais sensíveis ao fármaco. É importante salientar também que o LC₅₀ calculado por este autor se refere a 48 horas, ao contrário do presente estudo, no qual o valor de LC₅₀ se refere a 24 horas.

Carlsson *et al.*, (2006) investigou a ecotoxicidade aguda dos 10 medicamentos mais usados na Suécia, em *Daphnia magna*. Os resultados obtidos mostram que em caracterização inicial de risco, o paracetamol constitui um risco ambiental de acordo com o parâmetro PEC/PNEC ≥ 1 . Para este composto a concentração máxima registada é de 6,0 µg/l, em águas residuais, sendo este valor 50 vezes inferior do que o calculado PEC em águas residuais, e metade do PEC em águas de superfície. Foi avaliada a toxicidade aguda em peixes, invertebrados e algas, sendo a espécie mais sensível *D. magna*, onde o valor de LC₅₀ calculado para o paracetamol é de 9,2 mg/l. Este artigo não apresenta no entanto dados de toxicidade crónica, sendo aplicado o factor 1000 para o cálculo do PNEC. Segundo este autor, a cálculo do PEC em águas superficiais é dado pela fórmula: “Worst case: PEC_{água de superfície} = $\frac{1}{4}$ DOSE_{Eai}*F_{pen} /

($\text{WASTEWinhab} \cdot \text{DILUTION} \cdot 100$)”, em que DOSE_{Ei} corresponde à maior dose diária recomendada; F_{pen}, corresponde à percentagem de venda no mercado e 100 à percentagem de correcção. No caso do paracetamol, a percentagem de correcção utilizada por este autor foi de 1000, devido à falta de dados relativos à toxicidade crónica. Comparando os dados obtidos no presente estudo (em que o valor de LC₅₀ encontrado foi de 0,328 mg/l), e os valores calculados por Carlsson *et al.*, (2006) poderá dizer-se que existe uma aparente contradição, pois ambos os LC₅₀ apresentam diferenças de uma ordem de grandeza. Enquanto as conclusões obtidas pelo estudo de Carlsson *et al.*, (2006) apontam para uma reduzida relevância da toxicidade aguda e dos efeitos ambientais causados pelo paracetamol, o presente trabalho evidencia um inegável potencial toxicológico desta substância.

Segundo Lauridsen *et al.*, (2000), o consumo de paracetamol por ano na Dinamarca excede as 200 toneladas. Ainda segundo este autor, não existem dados de concentração da sua presença no ambiente, mas segundo o estudo realizado, o LC₅₀ para o organismo *D. magna* é de 136 mg/l ao fim de 24 horas, sendo o PEC de 65,4 µg/l e o seu PNEC de 136 µg/l; a razão PEC/PNEC não excede 1, significando assim que a substância não tem efeitos adversos no ambiente. Assim, o valor de LC₅₀ encontrado por Lauridsen *et al.*, (2000) encontra-se muito superior ao encontrado no presente estudo, mostrando mais uma vez, que a espécie utilizada no presente estudo foi mais sensível ao paracetamol do que a referida na presente bibliografia.

Devido à sua ampla utilização, os resíduos de agentes terapêuticos (como os anti-inflamatórios não esteróides) no meio aquático assumem-se como potencialmente activos. AINES como o ibuprofeno e os seus metabolitos, bem como o ácido acetilsalicílico, a carbamazepina ou o paracetamol, podem constituir risco ecotoxicológico (Farré *et al.*, 2008). Como prova da ampla utilização e libertação de resíduos deste composto para o ambiente, podemos citar o estudo de Kim *et al.*, (2007), que refere que o paracetamol tem um volume de produção de 1.068.921 kg na Coreia do Sul (valores de 2003), sendo um dos fármacos mais frequentemente detectados em estações de tratamento de águas residuais, águas potáveis e águas superficiais. Este composto foi detectado em 24% de amostras de água corrente nos Estados Unidos da América, com um nível de detecção máximo de 10 mg/l.

2) Toxicidade crónica: avaliação dos efeitos do paracetamol a nível reprodutivo

Os dados obtidos por intermédio do presente estudo apontam inequivocamente para o potencial toxicológico do paracetamol em termos reprodutivos, em *Daphnia magna*. No entanto, torna-se difícil estabelecer comparações entre o efeito reprodutivo aqui observado e estudos ecotoxicológicos anteriores, que relacionem efeitos reprodutivos e exposição ao paracetamol. No entanto, o caso do paracetamol, entre todos os restantes anti-inflamatórios não esteróides, não é totalmente ímpar, pois outros compostos desta classe farmacoterapêutica evidenciaram colocar questões ecotoxicológicas interessantes. Heckmann *et al.*, (2007), publicou um estudo acerca da toxicidade crónica do anti-inflamatório ibuprofeno e os seus efeitos na história e dinâmica populacional de *Daphnia magna*. Segundo este estudo, o ibuprofeno encontra-se frequentemente em ecossistemas de água doce. Neste estudo, *D. magna* foi exposta a diferentes concentrações (0, 20, 40 e 80 mg/ l) de ibuprofeno, durante 14 dias, medindo-se efeitos crónicos na mortalidade e performance populacional. A taxa de crescimento da população sofreu significativa redução em todas as concentrações de ibuprofeno, mas a sobrevivência apenas foi afectada na maior concentração utilizada, que segundo este autor, significa que as concentrações testadas têm reduzido efeito sobre a sobrevivência, demonstrando uma baixa toxicidade aguda do ibuprofeno. A reprodução, por outro lado, foi afectada nas mais baixas concentrações de exposição, sendo o LC₅₀ (imobilização) de 13,4 mg/l. Relativamente aos dados de reprodução, no presente estudo, tal como no estudo de Heckmann *et al.*, (2007), em todas as concentrações se verificou redução significativa da taxa de reprodução, o que, segundo este autor, mostra que existe um efeito muito específico do ibuprofeno na taxa de reprodução de *Daphnia magna*. Embora não sendo dados obtidos para o paracetamol, a similaridade de resultados é evidente; em ambos os estudos, compostos anti-inflamatórios exerceram efeitos a nível reprodutivo e populacional em *Daphnia magna*. Estes resultados são relevantes, pois sugerem que o crustáceo, exposto a concentrações de fármacos já encontradas no ambiente, podem vir a sofrer efeitos crónicos na reprodução, havendo diminuição desta espécie nos ecossistemas aquáticos. É no entanto, difícil concluir sobre os efeitos do paracetamol em *Daphnia magna*, pois o fármaco, apesar de pertencente à mesma classe,

não é o mesmo, e para além disso, foram utilizadas concentrações de exposição muito diferentes. É no entanto importante referir que estes dois fármacos (paracetamol e ibuprofeno), pertencem à mesma classe farmaco-terapêutica, partilham o mesmo mecanismo de acção farmacológica, podendo assim causar os mesmos efeitos adversos em organismos-teste.

Outros efeitos ao nível reprodutivo foram já conduzidos em *D. magna* para o ibuprofeno, nomeadamente por Han *et al.*, (2010). Os *end-points* utilizados para este estudo foram a sobrevivência das fêmeas, o número de crias por fêmea, o tempo da primeira reprodução, a taxa de crescimento da população e o número de crias por ninhada. De acordo com os resultados obtidos, em todas as concentrações, a taxa de mortalidade foi de 0%. O número de crias por ninhada, foi diminuindo de uma média de 39,3 até uma média de 21,7, à medida que se aumentou a concentração de ibuprofeno. Para além disso, verificou-se um aumento de tempo até as fêmeas terem a primeira cria de 10,0 para 11,1 dias à medida que se aumentou a concentração de ibuprofeno, além de que se verificou também uma diminuição significativa do número de crias por fêmea de 157,1 (na mais baixa concentração), para 75,5 (para a mais alta concentração). Este fármaco causou efeitos significativos na sobrevivência e reprodução dos crustáceos. O valor estimado de LC₅₀ foi de 51,4 mg/l, sendo que a taxa de crescimento da população diminuiu à medida que se aumentou a concentração de fármaco. Segundo Han *et al.*, (2010), uma maior exposição dos crustáceos ao fármaco (21 dias), resultou em maiores efeitos. O LOEC (lowest observed effect concentration) para efeitos sobre a reprodução foi de 1,23 mg/l, que foi a menor concentração estudada, enquanto às 48 h, o LC₅₀ (imobilidade) foi de 51,4 mg/l. Comparando com o presente estudo, o LC₅₀ é mais uma vez bastante elevado, mas tal como neste estudo, verificam-se efeitos do anti-inflamatório ibuprofeno sobre a reprodução de *Daphnia magna*. É possível assim identificar um padrão comum, pois nos dois estudos a performance reprodutiva de *D. magna* vai diminuindo à medida que a concentração de fármaco aumenta. Deve também ser observado que durante o estudo realizado por Han *et al.*, (2010), a diminuição do número de crias pode dever-se ao aumento de tempo de geração da primeira cria, parâmetro que não foi avaliado no presente estudo. Apesar da comparação de resultados, é importante salientar que se trata de fármacos diferentes, embora pertencentes à mesma classe, e que têm o mesmo mecanismo de acção farmacológica, podendo assim causar os mesmos efeitos adversos em organismos-teste.

Santos *et al.*, (2010), documentou a toxicidade crónica do ibuprofeno em alguns organismos aquáticos. No organismo *Oryzias latipes*, exposto a diferentes concentrações deste fármaco ao longo de seis semanas, verificou-se um aumento do fígado, juntamente com maior produção de ovos e uma redução do número de desova semanal. Com o crustáceo *Daphnia magna*, a taxa de crescimento populacional decresceu significativamente à medida que se aumentou a concentração de fármaco (de 0 a 80 mg/l). Da mesma maneira, a reprodução também foi afectada em todas as concentrações de exposição, sendo completamente inibida na concentração mais elevada de fármaco. Estes resultados encontram-se concordantes com o presente estudo em que a reprodução também foi afectada em todas as concentrações, podendo ser um indicativo que o paracetamol, tal como o ibuprofeno, inibe a reprodução de *D. magna*. Ainda segundo este autor, *D. magna* foi a espécie estudada mais sensível ao paracetamol, entre organismos como algas, embriões de peixes e bactérias luminescentes, onde foram reportados valores de LC₅₀ de 50 mg/l. Considerando que foram já reportadas concentrações de paracetamol de 78,17 µg/l em águas superficiais, e sendo o valor previsto do PNEC de 9,2 µg/l, podemos afirmar que o paracetamol pode constituir uma ameaça para organismos não-alvo, como *D. magna*.

3) Testes agudos: determinação do comportamento alimentar

Os dados obtidos no presente estudo demonstram uma alteração marcada no comportamento alimentar de *D. magna*. Este resultado não é surpreendente se considerarmos dados anteriormente publicados. Solé *et al.*, (2010), publicou um estudo sobre os efeitos do paracetamol em moluscos marinhos (mexilhão *Mytilus galloprovincialis*), que foram expostos ao paracetamol em concentrações de 23 e 403 µg/l durante 10 dias, em condições semi-estáticas. Este estudo mostrou que, relativamente ao controlo, a taxa de alimentação aumentou para ambas as concentrações de paracetamol, sendo no entanto este aumento independente da concentração. Este facto deveu-se ao dano causado pelo paracetamol na glândula digestiva destes animais. Estes resultados são contraditórios aos apresentados no presente trabalho, podendo este facto ficar a dever-se aos estudos serem realizados em organismos aquáticos diferentes. É no entanto importante salientar, que em ambos os estudos, se verificou alteração do

comportamento alimentar dos organismos após exposição a concentrações conhecidas do fármaco paracetamol.

Segundo Jaweckil e Persoone (2006), o crustáceo *Thamnocephalus platyurus*, exposto a diferentes concentrações de paracetamol (200; 20; 2; 0,2 e 0,02 mg/ l), apresenta uma diminuição do número de partículas ingeridas de 45 % para a máxima concentração testada, sugerindo mais uma vez a alteração do padrão alimentar dos organismos-teste após exposição ao paracetamol, sendo este resultado mais aproximado ao obtido neste estudo.

Pascoe *et al.*, (2003), publicou no seu estudo o efeito de alguns fármacos no organismo aquático *Hydra vulgaris*, entre os quais se encontra o paracetamol. Foi estudado o padrão alimentar deste organismo após exposição ao paracetamol, não se verificando uma alteração significativa neste comportamento após exposição a concentrações de 10 µg/l, 100 µg/l, 1 mg/l e 10 mg/l, não sendo registada mortalidade dos organismos-teste a nenhuma concentração, sugerindo assim que este fármaco não apresenta risco de toxicidade letal crónica. Tal conclusão não se encontra de acordo com os resultados obtidos neste estudo, onde claramente o paracetamol apresenta riscos toxicológicos a nível agudo e crónico.

V) Conclusão:

A presença de resíduos de fármacos de utilização humana em águas constitui-se como um assunto de crescente relevância, pois muitos destes agentes químicos possuem características específicas que lhes conferem propriedades particulares. A capacidade que muitos destes compostos possuem de alterar a fisiologia e a bioquímica de muitas espécies não alvo permite antever que, a nível ambiental, possam existir múltiplos alvos potenciais, sob a forma de variadas espécies. Dos parâmetros mais importantes que podem ser alterados pela exposição a xenobióticos, tais como resíduos de fármacos, podem salientar-se os efeitos comportamentais e reprodutivos, pois podem acarretar consequências deletérias para as populações expostas. Assim, o presente trabalho visou avaliar os efeitos ao nível comportamental e da performance reprodutiva na espécie de crustáceo que se assume como padrão em Ecotoxicologia de água doce (*Daphnia magna*), após exposição aguda e crónica ao paracetamol. Sendo estes dois parâmetros

(comportamento e reprodução) de relevância indiscutível, foi possível assim efectuar uma avaliação preliminar da capacidade que o paracetamol pode possuir de interferir com crustáceos (consumidores primários da maioria dos ecossistemas dulçaquícolas), tanto a nível individual, como ao nível da população.

Segundo o presente estudo, o fármaco paracetamol apresenta riscos ecotoxicológicos para organismos não-alvo, neste caso para o microcrustáceo *Daphnia magna*. Após análise dos resultados obtidos e comparações com vários estudos já publicados, verificou-se que o paracetamol tem efeitos neste organismo a nível agudo e crónico, expressos neste estudo pelo valor de LC_{50} , efeitos deletérios a nível reprodutivo e de comportamento alimentar. Verificou-se que *Daphnia magna* é uma espécie bastante sensível a este fármaco, pois o valor de LC_{50} é relativamente baixo, demonstrando potenciais efeitos agudos neste organismo. Para além disso, a exposição do organismo a este fármaco mostrou decréscimo da taxa de reprodução e modificação do comportamento alimentar, demonstrando assim potenciais efeitos crónicos.

Estudos simples e pouco dispendiosos como o utilizado no presente trabalho providenciam informação básica acerca da ecotoxicidade de xenobióticos, podendo revelar-se muito úteis para previsão de possíveis riscos a nível dos ecossistemas aquáticos. Será importante no futuro dar mais importância a estas questões, pois a crescente procura e utilização de fármacos poderá tornar-se determinante ao nível da contaminação dos ecossistemas aquáticos, sendo importante avaliar a presença deste ou outros fármacos no Ambiente, e os seus mecanismos de toxicidade para variadas espécies aquáticas, prevendo assim os efeitos tóxicos destes poluentes. Esta informação é fundamental para permitir a realização de estudos de impacto ambiental mais abrangentes que visem a caracterização dos riscos colocados pelos sistemas de tratamentos de águas residuais de origem humana no ambiente aquático.

VI) Referências bibliográficas:

- Altindag, A., Ergonul, M.B., Yigit, S., BayKan, O. (2008). The acute toxicity of lead nitrate on *Daphnia magna* Straus, *African Journal of Biotechnology*, **23** (7), pp.4298-4300.
- Bendz, D., Paxeus, N. A., Ginn, T. R., Loge, F. J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden, *Journal of Hazardous Materials*, 122 (4), pp. 195–204.
- Carlsson, C., Johansson, A.K., Alvan, G., Bergman, K., Kühler T.(2006) Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients, *Science of the Total Environment*, **364** (11), pp. 67– 87.
- Christen, V., Hickmann, S., Rechenberg, B., Fent, K. (2010). Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action, *Aquatic Toxicology*, **96** (11), pp. 167–181.
- Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment, *Trends in Analytical Chemistry*, **27** (10), Pp. 991- 1007.
- Farré, M., Petrovic, M., Gros, M., Kosjek, T., Martinez, E., Heath, E., Osvald, P., Loos, R., Le Menach, K., Budzinski, H., De Alencastro, F., Müller, J., Knepper, T., Fink, G., Ternes, T.A., Zuccato, E., Kormali, P., Gans, O., Rodil, R., Quintana, J.B., Pastori, F., Gentili, A., Barcelo, D. (2008). First interlaboratory exercise on non-steroidal anti-inflammatory drugs analysis in environmental samples, *Talanta*. **76**(4), pp 580–590.

- Fent, K., Weston, A., Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology*, **76** (9) pp. 122–159.
- Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*, New York, Cambridge Press.
- Focazio , M.J., Kolpin, D.W., Barnes, K.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Thurman, M.E. (2008). A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — II) Untreated drinking water sources, *Science of the total environment*, 402 (4) pp. 201 – 216.
- Ginebreda, A., Muñoz, I., López de Alda, M., Brix, R., López-Doval, J., Barceló, D. (2010). Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain), *Environment International*, **36** (11) pp. 153–162.
- Guimarães, S., Moura, D., Silva, P. (2006). *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*, Porto, Porto Editora.
- Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Choi, K., Khim, J. S., Zhang, X., Giesy, J. P. (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, *Aquatic Toxicology*, **98** (2), pp.256–264.
- Hartwell, S.I., (2008). Distribution of DDT and other persistent organic contaminants in Canyons and on the continental shelf of the central California coast, *Marine Environmental Research*, **65**(10), pp. 199–217.

- Heberer, T., (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicology Letters*, **131** (1) pp. 5–17.
- Heckmann, L.H., Callaghan, A., Hooper, H. L., Connon, R., Hutchinson, T. H., Maund, S. J., Sibly, R. M. (2007). Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics, *Toxicology Letters*, **172** (6), pp. 137–145.
- Henschel, K. P., Wenzel, A., Diedrich, M., Flidner, A. (1997). Environmental Hazard Assessment of Pharmaceuticals, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **25**(1) pp. 220–225.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *The Science of the Total Environment*, **225**, pp. 109-118.
- Jaweckil, G., Persoone, G. (2006). Toxicity of Selected Pharmaceuticals to the Anostracan Crustacean *Thamnocephalus platyuru*, *Environment Science & Pollution Research*, **13** (1), pp. 22 – 27.
- Jones, O.A.H. Voulvoulis, N., Lester, J.N. (2001). Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review, *Environmental Technology*, **22** (12), pp. 1383-1394.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.G., Park, J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea, *Environment International*, **33** (1), pp. 370–375.

- Kronimus, A., Schwarzbauer, D., Dsikowitzky, L., Heim, S., Littke, R. (2004). Anthropogenic organic contaminants in sediments of the Lippe River, Germany, *Water Research*, **38**(4), pp. 3473–3484.
- Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L.P., Lützhøft, H.-C., Sørensen, B. H. (2000). Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use, *Chemosphere*, **40**, pp. 783-793.
- Madden, J. C., Enoch, S.J., Hewitt, M., Cronin, M.T.D. (2009). Pharmaceuticals in the environment: Good practice in predicting acute ecotoxicological effects, *Toxicology Letters*, **185** (12), pp. 85–101.
- Miao, X.S., Koenig, B. G., Metcalfe, C.D. (2002). Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, **952** (01), pp. 139–147.
- Newnan, M., Unger M., (2003). *Fundamentals of Ecotoxicology*, New York, Lewis Publishers.
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. (2004). Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, *Chemosphere*, **57**(09), pp. 1581–1589.
- OECD (1998). *Daphnia magna Reproduction Test*, Guidelines for testing of chemicals/211.
- OECD (1984). *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test and Reproduction Test.
- OECD (2001). Ecotoxicological Studies and risk assessment, Dossier Guidance.

- OECD (2008). Report of the validation of an enhancement of OECD TG 211: *Daphnia magna* reproduction test, (93).
- Odum, P.E. (1971). *Fundamentos de Ecologia*, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Riva, C., Provini, A.(2009). An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), *Toxicology in Vitro*, **23**(5) pp. 935-942.
- Pascoe, D., Karntanut, W., Müller, C.T. (2003). Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*, *Chemosphere*, **51** (12), pp. 521–528.
- Pepper, I.L., Gerba, C. P., Brusseau, M. L. (1996). *Polution Science*, Arizona, Academic Press.
- Rand, G. M., (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, envioronmental fate, and risk assessment*, Florida, Taylor & Francis.
- Sanderson, H., Johnson, D. J., Wilson, C.J., Brain, R.A., Solomon, K.R. (2003). Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening, *Toxicology Letters*, **144** (5) pp. 383-395.
- Santos, L., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment, *Journal of Hazardous Materials*, **175** (10) pp. 45–95.

- Solé, M., Shaw, J.P., Frickers, P. E., Readman, J. W., Hutchinson, T. H. (2010). Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen, *Analytic Bioanalytical Chemistry*, **396** (11), pp. 649–656.
- Stackelberg, P.E., Gibs, J., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Lippincott, R. L. (2007) Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds, *Science of the Total Environment*, **377** pp. 255–272.
- Stein, J.R. (1973). *Handbook of Physiological methods – Culture methods and growth measurements*, Cambridge, Cambridge University Press.
- Stephan, C.E., (1977). *Methods for Calculating an LC₅₀ Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, Baltimore, American Society for Testing and Materials.
- Tatarazako, N., Oda, S., (2007). The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans, *Ecotoxicology*, **16** (2), pp. 197–203.
- Ternes, T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Research*, **32** (2), pp. 3245 – 3260.
- U.S. EPA (1978). Registration of Pesticides in the United States - Proposed Guidelines, Federal Register, (43).
- Walker, C. H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B.(2001). *Principles of Ecotoxicology*, London, Taylor & Francis.

- Yu, J.T., Bouwer, E.J., Coelhan, M. (2006). Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural water management*, **86** (8), pp 72–80.