

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA EXPOSIÇÃO DE EXCIPIENTES SOBRE O CRESCIMENTO DE CHLORELLA VULGARIS

Bárbara Letícia Ribeiro de Castro¹, Silvia Maria Mathes Faustino²

RESUMO

Dentre as muitas substâncias que alcançam o meio aquático, os fármacos são potenciais causadores de efeitos biológicos sobre os organismos deste meio. Embora os princípios ativos de medicamentos em ambientes aquáticos sejam bastante estudados, os efeitos potenciais de excipientes sobre os organismos do meio aquático são raramente investigados. O trabalho consiste em avaliar os efeitos ecotoxicológicos de 5 excipientes amplamente presentes em formulações de medicamentos, utilizando a microalga *Chlorella vulgaris* como organismo-teste, visando a segurança hídrica e usos múltiplos da água. A metodologia segue a ABNT NBR 12648 para ensaios de toxicidade crônica com clorófitas e ensaios com substância de referência dodecil sulfato de sódio (DDS) para validação dos ensaios. Ensaios preliminares com DDS mostraram tanto efeitos estimulantes no crescimento celular em concentrações mais baixas quanto efeitos inibitórios em concentrações mais altas, com início da inibição notável a partir de 155 mg/L. Os resultados apresentados baseiam o delineamento para os ensaios futuros com a substância de referência. O estudo contribui para a compreensão do papel dos excipientes como potenciais contaminantes emergentes, em consonância com o ODS 6.

PALAVRAS-CHAVE: Ecotoxicologia. Microalgas. Substância de referência.

ABSTRACT

Among the many substances that reach the aquatic environment, drugs are potential causes of biological effects on organisms in this environment. Although the active ingredients of drugs in aquatic environments are widely studied, the potential effects of excipients on organisms in the aquatic environment are rarely investigated. The work consists of evaluating the ecotoxicological effects of 5 excipients widely present in drug formulations, using the microalgae *Chlorella vulgaris* as a test organism, aiming at water security and multiple uses of water. The methodology follows ABNT NBR 12648 for chronic toxicity tests with chlorophytes and tests with reference substance sodium dodecyl sulfate (DDS) for validation of the tests. Preliminary trials with DDS have shown both stimulating effects on cell growth at lower concentrations and inhibitory effects at higher concentrations, with notable onset of inhibition from 155 mg/L. The results presented here are the basis for the design for future trials with the reference substance. The study contributes to the understanding of the role of excipients as potential emerging contaminants, in line with SDG 6.

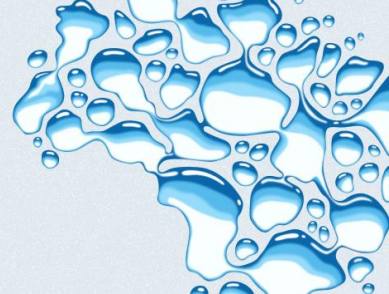
KEYWORDS: Ecotoxicology. Microalgae. Reference substance.

INTRODUÇÃO

O meio aquático é o destino de grande parte dos poluentes, provenientes principalmente do lançamento de efluentes domésticos e industriais que afetam a qualidade da água, vida aquática e os ecossistemas. Dentre as principais classes de substâncias poluidoras, os fármacos são encontrados constantemente nos corpos hídricos e possuem potencial de exercer efeitos biológicos sobre os organismos aquáticos (Santos *et al.*, 2023).

¹ Aluna da Universidade Federal do Amapá. Segurança Hídrica e Usos Múltiplos da Água. Macapá, Amapá, Brasil. E-mail: bararicastrol@hotmail.com.

² Docente do Curso de Farmácia/Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde/ Programa de Mestrado Profissional em Rede Nacional em Gestão e Regulação de Recursos Hídricos - ProfÁgua. Universidade Federal do Amapá. Macapá, Amapá, Brasil. E-mail: fitomathes@yahoo.com.br.



As formulações farmacêuticas de medicamentos são constituídas de fármaco e excipientes, surgindo uma questão a ser investigada quando a possibilidade de excipientes também exercerem efeitos biológicos potenciais pois esta condição é raramente discutida e essas substâncias ocorrem e interagem no meio aquático assim como o princípio ativo (Pifferi; Restani, 2002; Carlsson *et al.*, 2006).

Os testes ecotoxicológicos são uma ferramenta eficiente na investigação dos efeitos potenciais que substâncias podem efetuar sobre um organismo teste representativo. No ambiente aquático, as microalgas, como a *Chlorella vulgaris*, são amplamente utilizadas em virtude da sua ampla distribuição geográfica e por serem bioindicadoras da qualidade, possuindo alta sensibilidade a alterações ambientais pois são os primeiros organismos a responderem a qualquer mudança que acontece ao longo do tempo (Lourenço, 2006; Zagatto; Bertoletti, 2014).

Com isto, o trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos potenciais dos excipientes metabissulfito de sódio, sorbato de potássio, benzoato de sódio, metilparabeno e propilenoglicol, amplamente utilizados nas formulações de medicamentos, por meio de ensaios ecotoxicológicos com a *Chlorella vulgaris*, realizando a validação do teste mediante aplicação estatística.

MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada é descrita pela NBR ABNT 12648: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*) para os ensaios definitivos e ensaios com substância de referência para validação dos ensaios.

A substância de referência utilizada no ensaio foi o dodecil sulfato de sódio (DDS) e a microalga utilizada no estudo foi a *Chlorella vulgaris*, isolada da Lagoa dos Índios, cidade de Macapá, Amapá (0°01'52.4"N 51°06'08.9"W) e cultivada no Laboratório de Algas e Bioprospecção – LACAL (UNIFAP), em meio líquido NPK, temperatura de 25 °C ± 2 °C, luminosidade artificial e aeração constantes.

Os ensaios preliminares com a substância de referência foram realizados conforme ensaio definitivo, testando 5 concentrações em cada ensaio com a finalidade de estabelecer a CE_{50} , onde para o ensaio 1 as concentrações foram 20; 55; 90; 125 e 160 mg/L e para o ensaio 2 foram 150; 155; 160; 165 e 170 mg/L. Como controle negativo foi utilizado meio líquido contendo somente as algas e NPK.

As soluções-teste foram preparadas em triplicata para o controle negativo e concentrações-teste em frascos de cultivo, com duração de 72 h ± 2 h, inóculo em fase exponencial de crescimento, temperatura de 25 °C ± 2 °C, em sistema estático e luminosidade artificial contínua.

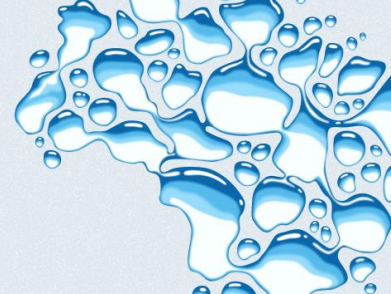
O volume final das soluções-teste foram de 20mL, com número de células no inóculo de 10⁶/mL e a avaliação do crescimento algal foi realizada a partir da contagem direta por microscopia óptica utilizando a câmara de Neubauer (Lourenço, 2006).

Os dados das contagens foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, com aplicação do teste-t e teste Mann Whitney, utilizando p-valor <0,05, no programa Excel. A partir do estabelecimento da CE_{50} , será preparada uma carta controle com os resultados de 5 testes com a substância de referência, para posterior realização dos testes com os excipientes escolhidos.

A proposta final inclui a elaboração de uma cartilha digital educativa que apresente os efeitos do descarte irregular de medicamentos sobre a cadeia trófica, enfatizando a importância ecológica das microalgas.

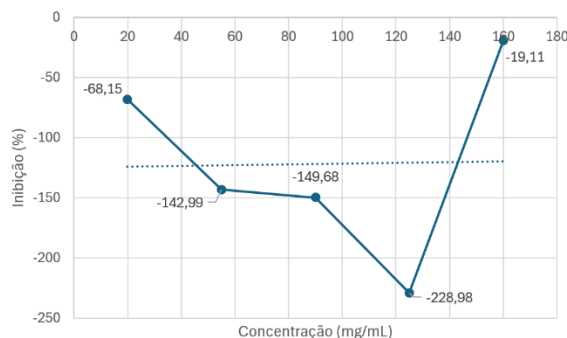
RESULTADOS E DISCUSSÕES





Para o ensaio 1 com DDS, as concentrações testadas apresentaram estímulo no crescimento da *C. vulgaris*, conforme demonstrado na figura 1.

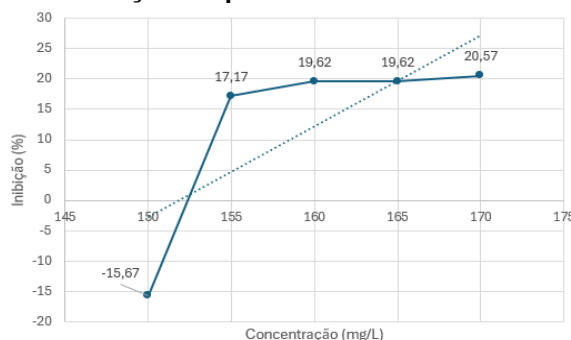
Figura 1 – Concentração-resposta observada no ensaio 1 com DDS



Fonte: Autoria própria.

Para o ensaio 2 com DDS, as concentrações testadas apresentaram sutil inibição no crescimento da *C. vulgaris*, com exceção da concentração de 150 mg/L, conforme demonstrado na figura 2.

Figura 2 – Concentração-resposta observada no ensaio 2 com DDS



Fonte: Autoria própria.

Os coeficientes de variação da biomassa algácea apresentados pelo controle negativo nos ensaios preliminares (ensaio 1 – 19,82%; ensaio 2 – 13,89%) se apresentaram dentro do valor recomendado pela normativa ($\leq 20\%$) ao final do período de exposição, indicando que os resultados são válidos (Abnt, 2023).

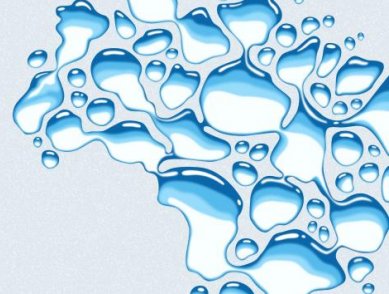
Os coeficientes de variação da biomassa algácea nas concentrações-teste se apresentaram dentro do valor recomendado ($\leq 30\%$) e p-valor $<0,05$ entre controle negativo e tratamento ao final do período de exposição, apresentando significado estatístico, com exceção da concentração de 160 mg/L no ensaio 1 (86,70%, p-valor $>0,05$) (Abnt, 2023).

A variação desse valor pode estar associada a não padronização no manejo das soluções-teste e de critérios de exclusão na contagem das células na câmara de Neubauer, uma vez que houve a padronização para o ensaio 2 e os valores de coeficiente de variação estiveram dentro do valor recomendado.

No ensaio 1, as concentrações testadas estimularam o crescimento celular observando que, em concentrações mais baixas, o DDS promoveu aumento da biomassa. Esse efeito é observado no estudo de Gomma *et al.* (2023) denominado de resposta hormética em que, uma determinada substância em concentrações baixas, serve de substrato para as microalgas e consequentemente, efeitos positivos no crescimento celular.

Ao comparar os dois ensaios, percebe-se que a inibição do crescimento celular começa a ocorrer a partir da concentração de 155 mg/L, não sendo suficientes para determinar a CE_{50} , sugerindo que em concentrações mais altas, a inibição em 50 % das células ocorra.





CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que em concentrações mais baixas, ocorre efeito hormético na microalga testada e, em concentrações mais elevadas, o efeito inibitório se torna aparente. As concentrações de DDS testadas não foram ideais para a determinação da CE_{50} , contudo, os resultados apresentados irão embasar os ensaios posteriores com a substância de referência e com os excipientes a serem testados.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA) através do Convênio CAPES/UNESP N°. 951420/2023. Agradeço ao Programa de Mestrado Profissional em Rede Nacional em Gestão e Regulação de Recursos Hídricos - ProfÁgua pelo apoio técnico científico aportado até o momento.

REFERÊNCIAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae) - 12648**. 5. ed. Rio de Janeiro, 2023. 35 p.
- CARLSSON, C.; JOHANSSON, A.; ALVAN, G.; BERGMAN, K.; KÜHLER. Are pharmaceuticals potente environmental pollutants? Part II: environmental risk assessments of selected pharmaceutical excipients. **Science of the Total Environment**, Sweden, v. 364, p. 88-95, 2006.
- GOMMA, M.; EL-NAEB, E. H.; HIFNEY, A. F.; ADAM, M. A.; FAWZY, M. A. Hormesis effects of phenol on growth and cellular metabolites of *Chorella sp.* under diferente nutritional conditions using response surface methodology. **Environmental Science and Pollution Research**. [s.l.], v. 30, p. 56904-56919, 2023.
- LOURENÇO, O. S. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006. 606 p.
- PIFFERI, G.; RESTANI, P. The safety of Pharmaceutical excipients. **II Farmaco**, [s.l.], v. 58, ed. 8; p. 541-550, 2003.
- SANTOS, J. T., PINHEIRO, C. M., HOSS, L., SCHOELER, G. P., HOLANDA, J. R. A. B., SILVA, J. K. P., MENDES, J., MORSELLI, L. B. G. A., CARMO, L. A. G., QUADRO, M. S., ANDREAZZA, R., ESCOBAR, C. C. Estudo sobre a ocorrência e potenciais impactos de fármacos no meio ambiente. **Contemporary Journal**. [s.l.], v. 3, n. 12, p. 25868-25889, 2023.
- ZAGATTO, A. P.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2014. p. 486.

