



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL,
ARQUITETURA E URBANISMO.**

**Estudo da biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina,
empregando ensaios de respirometria e toxicidade.**

Suzete Maria Lenzi Caminada

Campinas
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E URBANISMO

Suzete Maria Lenzi Caminada

**Estudo da biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina,
empregando ensaios de respirometria e toxicidade.**

Dissertação apresentada à Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, na área de concentração de Saneamento e Ambiente.

Orientador: Alexandre Nunes Ponezi

Campinas
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

C146e Caminada, Suzete Maria Lenzi
Estudo da biodegradação do hidrocloreto de fluoxetina, empregando ensaios de respirometria e toxicidade. / Suzete Maria Lenzi Caminada. --Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Alexandre Nunes Ponezi.
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo.

1. Biodegradação. 2. Fluoxetina. 3. Toxicidade - Testes. 4. Drogas. I. Ponezi, Alexandre Nunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. III. Título.

Título em Inglês: Biodegradation of the fluoxetine hydrochloride using respirometric and toxicological methods.

Palavras-chave em Inglês: Biodegradation, Fluoxetine, Toxicity testing, Drugs

Área de concentração: Saneamento e Ambiente

Titulação: Mestre em Engenharia Civil

Banca examinadora: Sueli Ivone Borrelly, Ruben Bresaola Junior

Data da defesa: 12/12/2008

Programa de Pós Graduação: Engenharia Civil

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E URBANISMO.

Suzete Maria Lenzi Caminada

**Estudo da biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina,
empregando ensaios de respirometria e toxicidade.**

Dissertação apresentada à Comissão de pós-graduação Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, na área de concentração de Saneamento e Ambiente.

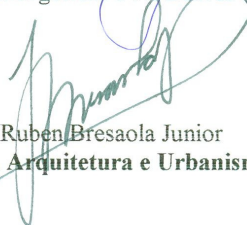
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi
Presidente e Orientador/Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo
FEC/UNICAMP.



Prof. Dra. Sueli Ivone Borrely
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/USP).



Prof. Dr. Ruben Bresola Junior
Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo FEC/UNICAMP.

Campinas, 12 de dezembro de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais por tudo que me ensinaram, aos meus filhos que, mesmo sem saber me incentivaram a continuar e ao Ricardo pelo companheirismo, carinho e apoio, meu amor, respeito e admiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter iluminado o meu caminho com sua luz.

Professor Alexandre pela orientação, determinação e amizade, Professora Marta pela valiosa ajuda nos ensaios microbiológicos e ao Armando pelo companheirismo. Aos integrantes e ex-integrantes do Departamento de Microbiologia do CPQBA, pela convivência, amizade e valiosa contribuição.

Ao Adilson da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, CPQBA, pela decisiva orientação e ajuda na realização de análises cromatográficas.

Sinésio Boaventura, Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, pela orientação quanto ao descarte dos resíduos gerados neste trabalho.

A UNICAMP, Departamento de Saneamento - Laboratório de Saneamento, pelas instalações e, especialmente, ao Enelton e a Ligia.

Professora Suely Ivone Borrely, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), por ter disponibilizado os laboratórios, por seu profissionalismo e pela nova amizade que se criou. Gabriel e Neto, os “anjos da guarda”, quando a tarefa é minuciosa, difícil, precisa.

Dra. Joyce (Farmácia popular-Amparo/SP) e Dra. Maria Helena de Mateo pela contribuição e conhecimento.

A todos os professores e funcionários da FEC em especial ao Professor Rubens Bresaola Júnior, pela amizade e entusiasmo.

Aos meus familiares, alunos, funcionários do Colégio Integrado-Jaguariúna e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação profissional.

Muito obrigado.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

Fernando Pessoa

RESUMO

Caminada, Suzete Maria Lenzi. **Estudo da biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina, empregando ensaios de respirometria e toxicidade.** Campinas: Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo – UNICAMP, 2008. 139p. Dissertação (mestrado).

A Comissão da União Européia e o comitê científico de toxicologia, ecotoxicologia e ambiente, identificaram, a necessidade da obtenção de dados sobre os efeitos dos fármacos no ambiente. Estes compostos e seus metabólitos são introduzidos no ambiente, pelo esgoto em quantidades que superam 100 toneladas/ano. A literatura científica comenta que a presença de fármacos no ambiente é, geralmente, pequena quando comparada a outros produtos químicos. No entanto, a alta persistência de vários destes compostos e sua contínua reposição aumentam o risco de exposição crônica para os organismos aquáticos, como também para os humanos. Um destes compostos, Hidrocloridrato de Fluoxetina, medicamento bastante utilizado no tratamento da ansiedade e distúrbios de comportamento, obesidade e bulimia nervosa, tem sido reportado como um causador de distúrbios em organismos aquáticos. Os resultados demonstram que o fármaco em estudo foi parcialmente degradado pelos organismos no sistema teste com uma remoção de 27%. Os ensaios ecotoxicológicos indicaram que os fármacos apresentam toxicidades diferentes entre as formulações estudadas. As avaliações da toxicidade das amostras geradas pelo sistema de respirometria apresentaram uma redução na toxicidade. Os ensaios indicam uma possível acumulação ambiental com conseqüências prejudiciais aos organismos aquáticos.

PALAVRAS-CHAVE: BIODEGRADAÇÃO, FLUOXETINA, TOXICIDADE-TESTES, RESPIROMETRIA-TESTES, DROGAS.

ABSTRACT

Caminada, Suzete Maria Lenzi. **Estudo da biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina, empregando ensaios de respirometria e toxicidade.** Campinas: Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo – UNICAMP, 2008. 139p. Dissertação (mestrado).

The Commission of the European Union and the scientific committee of toxicology, ecotoxicology and environment 1990, identified, the need of the obtaining of data on the effects of the drugs in the environment. These composed and they metabolics are, introduced in the environment, through the wastewater sanitary, in larger proportions than 100 ton/year. The scientific literature comments that the drugs presences in the environment are generally, small when compared the other chemical products. However the high persistence of several of these composed and its continuous replacement increases the risk of chronic exhibition for the aquatic organisms as well as for the humans. One of these substance, Hidrocloridrato de Fluoxetine, medication quite used in the treatment of the anxiety and disturbances of behavior, obesity and nervous bulimy, it has been reported as a caused of disturbances in aquatic organisms. The results demonstrate that the drug in study was degraded partially by the organisms in test system with a maximum removal of approximately 27%. The toxicological rehearsals indicated that the drugs presents show different toxicity among the studied formulations. The evaluation of the toxicity of the samples generated by the system presented a reduction in the toxicity. The rehearsals indicate a possible environmental accumulation with harmful consequences to the aquatic organisms.

WORD-KEY: BIODEGRADATION, HIDROCLORIDRATE OF FLUOXETINE, TOXCICITY TEST, RESPIROMETRIC TEST, DRUGS.

Índice de Figuras

Figura 1 – Fluxograma esquemático representando as principais rotas de exposição de fármacos em matrizes ambientais (fonte: Halling- Sorensen, 1998). Adaptado por Ponezi et al., 2006.	27
Figura 2 – Fases da ação dos fármacos. Adaptado Korolkovas,1988.	46
Figura 3 - Processo de biotransformação de um fármaco no organismo.	47
Figura 4 - Fases do metabolismo.....	49
Figura 5 - Sistema nervoso (Fonte: internet-ClinicaMILLERDEPAIVA.com).....	52
Figura 6 - Síntese da serotonina a partir do triptofano (Fonte: Internet - www.orgone.com.br)	56
Figura 7 - Molécula da serotonina (Fonte: Internet-www.orgone.com.br)	56
Figura 8 - Mecanismos de produção da serotonina (Fonte: Internet-www.orgone.com.br)	57
Figura 9 - Mecanismos de destruição da serotonina (Fonte: Internet-www.orgone.com.br)	58
Figura 10 – O ISRS bloqueia a recaptação da serotonina nos dendritos e no axônio. Os círculos vermelhos mostram as bombas de recaptação bloqueadas. (Fonte: Internet-www.orgone.com.br)	59
Figura 11 - <i>Down-regulation</i> nos receptores somatodendríticos e <i>up-regulation</i> nos terminais axônicos. (Fonte: Internet-www.orgone.com.br)	60
Figura 12 - O <i>down-regulation</i> dos receptores pós-sinápticos permite uma diminuição dos sintomas depressivos.(Fonte: Internet-www.orgone.com.br)	61
Figura 13 - Hidrocloridrato de fluoxetina.(Fonte:Internet- www.scielo.br)	63
Figura 14 - Estrutura molecular prevista para Norfluoxetina.	66
Figura 15 - Foto da Microplaca de Elisa – Utilizada para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	77
Figura 16 - Foto da <i>Ceriodaphnia dubia</i> – organismo-teste empregado na avaliação de efeito da droga a organismos aquáticos.....	87
Figura 17 – Foto de montagem do ensaio de toxicidade aguda.....	90
Figura 18 – Foto de <i>Vibrio fischeri</i> em placa de petri visualizada em luz Ultra Violeta.	91
Figura 19 – Analisador de Toxicidade por fotoluminescência bacteriana - Modelo M 500 Microbics.	92
Figura 20 – Bacias dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí. A seta indica a área de estudo.	97
Figura 21 – Avaliação do consumo do hidrocloridrato de fluoxetina durante o período junho/2006 à junho 2008.....	98
Figura 22 – Ensaio de MIC. Avaliação das concentrações do hidrocloridrato de fluoxetina que apresentam crescimento microbiano.	106
Figura 23 – Ensaio de MIC. Avaliação do crescimento microbiano em concentrações de 200 a 1,95 µg/mL.	107

Figura 24 – Avaliação da biodegradação do hidrocloreto de fluoxetina durante o período de 28 dias do ensaio respirométrico.	109
Figura 25 – Ilustração da diversidade microbiana observada durante o período do ensaio de respirometria. 1 = 125 µg/L, diluição: 10^{-6} , leitura em 21/07/08; 2 = 125 µg/L, diluição: 10^{-5} , leitura em 21/07/08;	112
Figura 26 - Ilustração da diversidade microbiana observada durante o período do ensaio de respirometria. 3 = 62,5 µg/L, diluição: 10^{-5} , leitura em 21/07/08; 4 = 62,5 µg/L, diluição: 10^{-6} , leitura em 21/07/08;	113
Figura 27 – Ensaio de toxicidade aguda (<i>Vibrio fischeri</i>) avaliando o hidrocloreto de fluoxetina puro, formulação comercial e amostras provenientes da respirometria.....	121

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Déficit de abastecimento de água e esgotamento de esgoto no Brasil.....	29
Tabela 2–Percentagem do abastecimento de água, coleta e tratamento de esgoto no Estado de São Paulo.....	29
Tabela 3 - Eficiência de remoção afluente e efluente de fármacos em plantas de tratamento de esgotos.....	30
Tabela 4 - Efeitos tóxicos de alguns fármacos em organismos aquáticos.	34
Tabela 5 - Métodos utilizados na determinação de fármacos em ambientes aquáticos: Método e Substâncias Referência.....	38
Tabela 6 – Tipos e sub-tipos de receptores da serotonina.....	62
Tabela 7 - Características físico-químicas do hidrocloridrato de fluoxetina e norfluoxetina.....	63
Tabela 8 - Concentrações séricas e tempo de meia vida dos antidepressivos ISRS (inibidores seletivos da recaptação da serotonina)	67
Tabela 9 - Efeitos de toxicidade do hidrocloridrato de fluoxetina em organismos aquáticos.....	71
Tabela 10 – Composição do meio de cultura MS.....	77
Tabela 11 - Concentrações do Hidrocloridrato de fluoxetina obtidas pelas diluições em série na microplaca.	78
Tabela 12 – Soluções estoque para preparo da solução nutriente (cfe.descrito nos item 4.4 do método E.1.1.3 – IBAMA, 1988).....	81
Tabela 13 - Ensaio de toxicidade utilizando o Hidrocloridrato de Fluoxetina.....	86
Tabela 14 - Condições teste – Toxicidade aguda <i>Ceriodaphnia dubia</i>	87
Tabela 15 - Valores expressos em mg das formas farmacêuticas mais prescritas e consumidos mensalmente, durante o período avaliado (Junho/06 à Maio/07).	99
Tabela 16 - Valores expressos em mg das formas farmacêuticas mais prescritas e consumidos mensalmente, durante o período Avaliado (Junho/07 à Junho/08).	100
Tabela 17 - Relação dose/habitante/mês para o período avaliado (Junho/06 à Maio/07).	101
Tabela 18 - Relação dose/habitante/mês para o período avaliado (Junho/07 à Junho/08).	101
Tabela 19 - Relação dose diária definida para o período avaliado (Junho/06 à Maio/07).	102
Tabela 20 - Relação dose diária definida para o período avaliado (Junho/07 à Junho/08).	102
Tabela 21 - Estimativa dose diária/habitante µg/L esgoto, considerando o consumo de 100 Litros de água/dia/ habitante , para o período avaliado. (Junho/06 à Maio/07)....	103
Tabela 22 - Estimativa dose diária/habitante µg/L esgoto, considerando o consumo de 100 Litros de água/dia/ habitante , para o período avaliado (Junho/07 à Junho/08)...	103

Tabela 23 - Consumo do fármaco, pelos microrganismos presentes no inóculo (período avaliado: 16/07/2008 a 05/08/2008). Concentração µg/mL.....	108
Tabela 24 - Análise quantitativa DQO do processo de degradação do Hidrocloridrato de fluoxetina. Concentração em µg/mL.....	110
Tabela 25 - Acompanhamento de pH durante o período do teste de respirometria....	111
Tabela 26 – Contagem de colônias microbianas durante o ensaio de respirometria. Plaqueamento meio PCA 24 horas 37 °C, valores expressos em UFC.	112
Tabela 27 - Ensaio 01 - Fármaco Comercial- Solução 01- 200µg/mL.....	115
Tabela 28 - Ensaio 02 - Fármaco Comercial- Solução 01- 200µg/mL.....	115
Tabela 29 - Ensaio 03 – Medicamento genérico – Hidrocloridrato de fluoxetina 200µg/mL.	115
Tabela 30- Dados gerais - Concentração em 200µg/mL.....	116
Tabela 31 - Teste de toxicidade aguda com microcrustáceo <i>Ceriodaphnia dubia</i> , resultados referentes aos ensaios 03, 04 e 05.....	117
Tabela 32 – Resultados da concentração efetiva para o teste de toxicidade aguda utilizando o microcrustáceo <i>Ceriodaphnia dubia</i>	118
Tabela 33 - Ensaio 04 - Fármaco Comercial - 214,49µg/ml – amostra 16/07/2008. ...	120
Tabela 34 - Ensaio 05 - Fármaco Comercial - 204,55µg/ml – amostra 21/07/2008. ...	120
Tabela 35 - Ensaio 06 - Fármaco Comercial - 195µg/ml – amostra 28/07/2008.	120
Tabela 36 - Ensaio 07 - Fármaco Comercial - 155,83µg/ml – amostra 05/08/2008. ...	120
Tabela 37 - Ensaio 08 - Hidrocloridrato de Fluoxetina CAS 56296-78-7 adquirido através da Sigma com grau de pureza de >90% - 200µg/mL.	121

Lista de abreviaturas e siglas

BCF- Fator de bioacumulação
CE50 - Concentração efetiva média
CENO – Concentração de efeito não observado.
CEO – Concentração letal de efeito observado
CER - Concentração do efluente no corpo receptor
CFF – Conselho Federal de Farmácia
CG/EM -cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CG-EM/EM - cromatografia gasosa acoplada a dois espectrômetros de massas em série
CL50 - Concentração letal média
CLAE/EM – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa
CLAE/EM/EM – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a dois espectrômetros de massas em série
DL50 – Dose letal do efeito observado em 50% dos organismos teste
ETA - Estação de tratamento de água
ETE – Estação de tratamento de esgoto
ISRS – Inibidor seletivo da recaptação da serotonina
 K_{OW} , - Coeficiente de partição octanol/água, representando o grau de hidrofobicidade de determinado composto.
MAO – monoaminoxidase - enzima hepática
MIC – Concentração inibitória mínima
ND – Não determinada
NA – Não avaliado
pKa – constante de ionização ácida
pH – Potencial hidrogeniônico
QE = vazão do efluente
 $Q_{7,10}$ = vazão mínima anual do rio, média de sete dias consecutivos, com probabilidade de 10 anos de retorno.
RHW – Água residual reconstituída

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos Gerais	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Principais rotas de exposição de fármacos em matrizes ambientais	25
3.2 Descarte de medicamentos vencidos e os aspectos toxicológicos da incineração ..	27
3.3 Disposição ambiental	28
3.4 Estabilidade e meia vida dos fármacos no ambiente	30
3.5 Efeitos em organismos aquáticos	33
3.6 Efeitos na saúde humana	34
3.7 Métodos analíticos utilizados na determinação de fármacos	36
3.8 Ecotoxicologia	37
3.9 Avaliação do impacto ambiental de fármacos em ambientes aquáticos.	39
3.10 Estimativa do potencial de impacto ambiental	41
3.11 Tipos de tratamento	44
3.12 Limites de tolerância	44
4 AÇÃO BIOLÓGICA DOS FÁRMACOS	45
4.1 Introdução	45
4.1.1 Metabolismo ou Biotransformação	46
4.1.2 Fatores que afetam o metabolismo	47
4.1.3 Local e fases do metabolismo	48
4.1.4 Eliminação de fármacos pelo organismo	49
4.1.5 Classificação dos fármacos	50
4.2 Sistema nervoso	51
4.3 Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos	52
4.4 Antidepressivos inibidores da recaptação da serotonina	54
4.4.1 Síntese da Serotonina (5HT)	55
4.4.2 Produção da Serotonina nos neurônios serotoninérgicos	57
4.4.3 Recaptação e destruição da Serotonina pelo neurônio Serotoninérgico	58
4.4.4 Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS).	59
4.4.5 Tipos e Sub-tipos	61
4.5 O Hidrocloridrato de Fluoxetina	62
4.5.1 Propriedades físico-químicas do hidrocloridrato de fluoxetina.	62
4.5.2 Química e relações entre estrutura e atividade	63

4.5.3 Propriedades farmacológicas: hidrocloridrato de fluoxetina.....	64
4.5.4 Absorção, distribuição, destino e excreção.....	65
4.5.5 Reações tóxicas e efeitos colaterais.....	68
4.5.6 Interações com outros fármacos.....	68
4.6 Métodos analíticos utilizados na determinação do hidrocloridrato de fluoxetina.	69
4.7 Toxicidade.....	70
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
5.1 Proposta Metodológica.....	72
5.2 Locais de realização dos experimentos.....	74
5.3 Fonte.....	74
5.3.1 Químicos.....	74
5.4 Avaliação e estimativa do consumo do fármaco na cidade de Amparo-SP.....	75
5.6. Determinação da Concentração mínima inibitória (MIC) para seleção das concentrações do fármaco comercial, com atividade microbiana (CLSI, 2005)	76
5.6.1. Montagem e realização do ensaio.....	76
5.6.1.2 Preparação do inóculo	79
5.7 Teste da biodegradabilidade imediata em sistema fechado, baseado no Teste de Gledhill-modificado, 1988 (IBAMA).....	80
5.8 Avaliação dos microrganismos durante os ensaios de respirometria por plaqueamento.....	84
5.9 Avaliação da capacidade de remoção da hidrocloridrato de fluoxetina, através de análise quantitativa – cromatografia (CLAE/EM).....	84
5.10 Avaliação da concentração de compostos de carbono através de análise quantitativa DQO (Demanda Química de Oxigênio).....	85
5.11 Testes de toxicidade	85
5.11.1 Ensaio de toxicidade aguda do Hidrocloridrato de Fluoxetina utilizando a <i>Ceriodaphnia dubia</i> : método NBR 13373 (ABNT, 2006).	86
5.11.2 Ensaio de toxicidade aguda com a bactéria marinha <i>Vibrio fischeri</i> (Sistema Microtox). Método: 15411-2 (ABNT, 2006a).....	90
5.12 Descarte do material utilizado durante a realização da pesquisa	93
5.12.1 Material biológico	93
5.12.2 Material químico	94
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
6.1 Dados sobre o local de estudo	95
6.2. Avaliação do consumo do hidrocloridrato de fluoxetina na cidade de Amparo/SP.	96
6.3 Avaliação do potencial de biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina utilizando o modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade (QSAR'S).....	105
6.4 Avaliação da biodegradação do Hidrocloridrato de fluoxetina, por respirometria e quantificação por cromatografia líquida (CLAE), Demanda Química de Oxigênio (DQO), acompanhamento pH e plaqueamento em meio PCA.	106
6.4.1 Determinação da Concentração mínima inibitória (MIC) para seleção das concentrações do Fármaco Comercial, com atividade microbiana (CLSI, 2005).	106
6.4.2 Ensaio de respirometria em sistema fechado.	107
6.4.2.1 Quantificação do consumo do fármaco por cromatografia (CLAE).	108

6.4.2.2 Análise quantitativa DQO (Demanda Química de Oxigênio)	110
6.4.2.3 Acompanhamento da variação do valor de pH durante o período do teste de respirometria.....	111
6.4.2.4 Plaqueamento em meio PCA	111
6.5 Avaliação da toxicidade do hidrocloridrato de fluoxetina	113
6.5.1 Testes preliminares	114
6.5.1.1 Teste preliminar de toxicidade aguda com microcrustáceo <i>Ceriodaphnia dubia</i> , NBR 13373 (ABNT, 2005).....	114
6.5.1.2 Teste preliminar de toxicidade aguda com a bactéria marinha <i>Vibrio fischeri</i> , NBR 15411-2 (ABNT, 2006)	114
6.5.2 Avaliação da toxicidade do hidrocloridrato de fluoxetina.....	116
6.5.2.1 Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>Ceriodaphnia dubia</i>	116
6.5.2.2 Teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha <i>Vibrio fischeri</i> (Sistema Microtox).....	119
7 CONCLUSÃO	122
7.1 Propostas para trabalhos futuros	123
REFERÊNCIAS.....	124
GLOSSÁRIO	130
ANEXO A	132

1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica mundial é considerada como o segundo melhor negócio do planeta, ficando atrás apenas de companhias de petróleo. Segundo a revista inglesa Focus, (2008 apud MORAIS, 2003) o setor faturou em 2002, 406 bilhões de dólares.

O Brasil está entre os cinco maiores consumidores de medicamentos do mundo, com mais de 32 mil rótulos de medicamentos com 12 mil substâncias quando na verdade bastariam 300 itens. Há uma drogaria para cada 3 mil habitantes, mais que o dobro do recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Considerados os mais consumidos da indústria farmacêutica, Prozac[®], Xenical[®] e Viagra[®] são rotulados como “Drogas de Comportamento” por serem destinados primordialmente a melhorar a qualidade de vida das pessoas. Esses medicamentos atraem milhares de pessoas no mundo, geram verdadeiras fortunas aos laboratórios e estão presentes, de alguma forma, na mídia de massa (MORAIS, 2003).

A força dessa indústria é tão grande, que pesquisadores e entidades médicas como a Associação Americana de Medicina estão questionando a própria idoneidade da informação produzida por universidades e centros de pesquisa patrocinados por laboratórios. Afinal, no ano 2000, a indústria farmacêutica financiou 70% dos testes de drogas clínicas realizados por instituições de pesquisa "independentes" dos Estados Unidos, o que custou aos cofres dos laboratórios 60 bilhões de dólares.

Há quem afirme que o preço pago pelos centros de pesquisa por esse tipo de parceria pode ter sido alto demais (MORAIS, 2003)

É comum também a imposição de cláusulas de confidencialidade que impedem a divulgação de resultados e o intercâmbio de dados entre cientistas, duas restrições quase fatais para a produção de conhecimento científico. "A ciência depende de um fluxo aberto e livre de informação", diz o pesquisador Steven Rosenberg, do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. "No entanto, quanto mais a pesquisa é sustentada por companhias privadas, mais a ética dos negócios atropela a ética da ciência. Devido estes fatores, conflitos de interesses entre cientistas e a indústria farmacêutica vêm sendo objeto de estudos importantes nos últimos anos.

Um dos mais rumorosos aconteceu no Canadá, aonde a hematologista Nancy Olivieri, da Universidade de Toronto, conduziu uma pesquisa sobre uma droga desenvolvida pelo laboratório Apotex para tratamento da talassemia, um tipo de anemia que ocorre principalmente entre populações que vivem em áreas próximas do mar Mediterrâneo. Ela constatou que o remédio expunha os pacientes a danos no fígado e no coração, no entanto foi impedida de compartilhar os dados com outros colegas e de advertir o público sobre os riscos da droga porque a Apotex evocou a cláusula de confidencialidade do contrato. Como a comunidade dos pesquisadores ficou ao lado da hematologista, a Universidade de Toronto acabou alterando sua política de parceria com os laboratórios – ainda assim, a Apotex manteve o sigilo das informações sobre os efeitos colaterais do seu produto (MORAIS, 2003)

"Todo remédio tem efeitos colaterais", afirma Arnaldo Lichtenstein, clínico-geral do Hospital das Clínicas, em São Paulo. O pior é que a intervenção para aliviar tais efeitos, com o uso de outros medicamentos, não raro fecha um circuito de complicações das qual o paciente não consegue se libertar facilmente (MORAIS, 2003).

A automedicação tem se tornado um problema tão sério e preocupante que o Ministério da Saúde lançou em 24 de Setembro, p.p, uma campanha para conscientizar a população quanto ao problema e, principalmente quanto ao risco de intoxicações. Também foi lançado o Formulário Terapêutico Nacional de 2008 (FTN), publicação que contém informações, composição e efeitos colaterais dos remédios que compõem a

Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename). O FTN e o material da campanha estarão no site do Ministério da Saúde. Disponível: www.portalsaude.gov.br.

A variedade de especialidades químicas fármaco-terapêuticas bem como os metabólitos gerados, os fármacos excretados inalterados ou na forma conjugada através de urina e fezes, assim como os descartes inadequados e os medicamentos vencidos, indicam a necessidade de estudos relacionados aos aspectos ecotoxicológicos, quantificação e identificação quanto à presença destes compostos nas várias matrizes ambientais e eficiência na remoção dos mesmos.

A contaminação das águas superficiais por farmoquímicos tem suscitado preocupações entre cientistas devido ao potencial de efeitos negativos sobre os organismos aquáticos (HENRY, 2004). Pouco é conhecido sobre o destino e o comportamento dessas substâncias no ambiente aquático, assim como não está claro quais organismos são afetados e em que grau. Atualmente, uma avaliação do risco ambiental devido à contaminação por fármacos tem sido requerida em vários países (BILA e DEZOTTI, 2003).

HENRY (2004) comenta a ineficiência dos processos das estações de tratamento de esgoto em remover os fármacos e seus metabólitos. Estudos recentes têm relatado a presença de fármacos, em partes por bilhão em águas superficiais, águas residuais e tratadas. Embora seus metabólitos ocorram apenas em baixas concentrações (ng / L) no ambiente, os efeitos negativos sobre os organismos aquáticos são possíveis.

Diante da problemática quanto ao uso indiscriminado dos compostos farmacêuticos, insegurança quanto ao real efeito que estes produtos possam causar, assim como a falta de procedimentos adequados para seu descarte e tratamento a contaminação ambiental, causada por estes compostos, é um assunto bastante atual no meio científico e preocupante em termos de saúde pública. A presença destes compostos e/ou seus metabólitos tem sido apontado como um causador de inúmeras modificações tanto em nível fisiológico como genético, assim como organismos

aquáticos, e com potencial, bastante provável, de causar doenças ao homem conforme demonstrado em vários artigos científicos.

O monitoramento da eficiência de remoção destes compostos ao passar pelos sistemas atuais de tratamento é de grande importância, pois, no futuro, podem ser necessárias adaptações, ou mesmo a implantação de sistemas de tratamento complementares e mais eficaz, para a remoção de fármacos do ambiente (BROOKS et al., 2002).

Daí o interesse em desenvolver o presente trabalho que abordou aspectos referentes ao consumo, disposição, biodegradação e toxicidade do hidrocloridrato de fluoxetina, levando a conclusão da necessidade do desenvolvimento de ações quanto ao uso indiscriminado de fármacos, o controle e remoção destes compostos nas várias matrizes ambientais, visto que são substâncias com potencialidade para causar efeitos tóxicos aos organismos vivos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo:

- avaliar o consumo do hidrocloridrato de fluoxetina, tendo como referência a cidade de Amparo-SP;
- estudar o fator de biodegradação; e,
- realizar ensaios de toxicidade em organismos teste.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica procurou verificar informações sobre a problemática da disposição de fármacos no ambiente e, em particular, o hidrocloridrato de fluoxetina também quanto à sua classificação, caracterização, rotas de impactos ambientais, toxicologia, ecotoxicologia, biodegradação e outros aspectos relevantes sobre o composto em estudo.

No final da década de 90, com o crescimento dos conhecimentos na área da química ambiental, iniciou-se o estudo da disposição dos compostos farmacêuticos, e dos seus metabólitos, no ambiente, principalmente no compartimento aquático (JONES et al., 2001).

A grande maioria dos trabalhos publicados refere-se à avaliação destas substâncias em rios e lagos como também em efluentes domésticos e água de abastecimento.

Embora os riscos associados com a exposição dos fármacos sejam provavelmente mais significativos no ambiente natural, o interesse deve ser focalizado na exposição humana, principalmente em áreas em que se pratica o reuso indireto da água, onde o efluente de esgoto é descartado diretamente em córregos e rios, e que servem como fonte de água para abastecimento das comunidades.

Atualmente, nos Estados Unidos, Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRS) estão na lista dos 200 medicamentos mais prescritos (em

www.rxlist.com/). Diante deste fato, as grandes áreas metropolitanas em países industrializados têm, provavelmente, quantidades mensuráveis de ISRSs e seus metabólitos que chegam continuamente às estações de tratamento de esgoto (HENRY, 2004).

Um destes compostos é o hidrocloridrato de fluoxetina, medicamento bastante indicado pela medicina utilizado no tratamento da ansiedade e distúrbios de comportamento, obesidade e bulimia nervosa.

3.1 Principais rotas de exposição de fármacos em matrizes ambientais.

Segundo HOLM et al., 1995, as principais rotas de contaminação ambiental causada pelos humanos, são provenientes da ingestão seguida de excreção e disposição através do sistema de tratamento de esgoto. Outras fontes poluidoras como água residuária provenientes de hospitais, indústrias farmacêuticas e resíduos sólidos podem ser considerados.

De acordo com MULROY (2001) 50% a 90% da dose administrada de um fármaco são excretados inalterados ou na forma de seus metabólitos, principalmente na urina, fezes ou esterco animal, sendo freqüentemente encontrados no esgoto doméstico.

A literatura científica descreve que a presença de fármacos no ambiente é, geralmente, pequena quando comparada a outros produtos químicos. No entanto a alta persistência de vários destes compostos e sua contínua reposição aumentam o risco de exposição crônica para os organismos aquáticos como também para os humanos (DAUGHTON e TERNES, 1999).

Um problema detectado atualmente diz respeito à não degradação destes compostos durante tratamento em diferentes estações de Tratamento de Esgoto e conseqüentemente o seu lançamento nos corpos d'água, resultando na contaminação das águas de rios, lagos, estuários e, mesmo em algumas situações, em poucos casos, de águas subterrâneas.

De acordo com STUMPF et al. (1996) em trabalho realizado no estado do Rio de Janeiro, onde foi estudada a taxa de remoção de fármacos individuais durante a passagem por uma ETE (Estação de Tratamento de Esgoto), foi verificada uma variação de remoção de 12 a 90% destes compostos após o tratamento. Segundo estes autores, o lodo gerado no processo é comumente lançado em campos agrícolas, podendo causar uma possível contaminação do solo, águas superficiais e percolação para águas subterrâneas.

Segundo HALLING-SORENSEN (1998) as principais rotas de exposição dos diferentes tipos de fármacos no ambiente podem ser visualizadas em fluxograma esquemático na Figura 1.

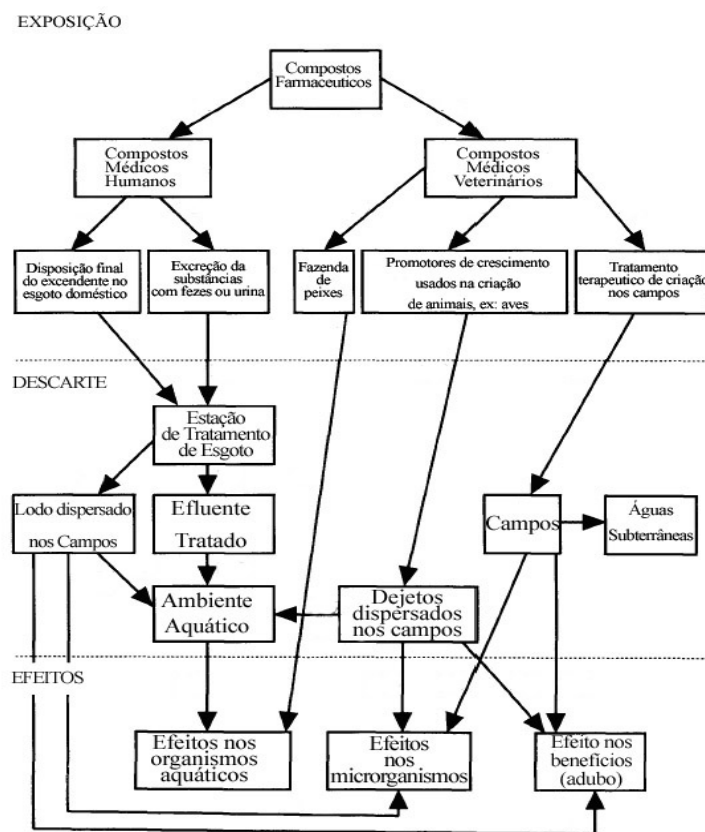


Figura 1 – Fluxograma esquemático representando as principais rotas de exposição de fármacos em matrizes ambientais (fonte: Halling- Sorensen, 1998). Adaptado por Ponezi et al., 2006.

3.2 Descarte de medicamentos vencidos e os aspectos toxicológicos da incineração.

A grande preocupação ambiental não é necessariamente o volume de produção de um fármaco, mas sua persistência no ambiente e atividade biológica (por exemplo: toxicidade, bioacumulação, biodegradação, dentre outros). Ainda pouco estudados na sua totalidade, esses compostos impactam microrganismos, tanto aquáticos como terrestres assim como o rendimento do solo em campos de cultivo (GONÇALVES, 2003).

A disposição imprópria destes produtos também pode contribuir para a contaminação ambiental como, por exemplo, descarte de resíduos de origem doméstico.

Em estudo realizado por GONÇALVES, 2003 o principal procedimento utilizado no descarte de medicamentos vencidos é a incineração, resultando na emissão de poluentes ambientais, como dioxinas, dibenzo-p-dioxinas policloradas e dibenzofuranos, concluindo que os medicamentos vencidos representam problema a saúde pública. Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) regulamentou o descarte de Resíduos dos Serviços de Saúde (RSS), agrupando os medicamentos em nove classes diferentes. No entanto, os medicamentos de utilização em domicílio podem ser descartados em esgoto sanitário, quando líquidos, e em lixo domiciliar, no caso de resíduos sólidos.

3.3 Disposição ambiental

De acordo com dados do IBGE, Censo (2000), Relatório das águas interiores, CETESB (2000) e ABICALIL (2002) sobre o retrato do Saneamento no Brasil, aproximadamente, 15 milhões de habitantes das cidades (10% total) não têm acesso à água potável e, aproximadamente 75% de todo esgoto sanitário coletado nas cidades é despejado “in natura”, poluindo os cursos d’água. Nas Tabelas 1 e 2 abaixo estão apresentados os dados do Censo e do relatório de águas interiores.

Tabela 1 - Déficit de abastecimento de água e esgotamento de esgoto no Brasil.

Região	Déficit de abastecimento de Água (%)	Déficit esgotamento sanitário (%)
Norte	52	64
Nordeste	34	62
Sudeste	12	18
Sul	20	36
Centro Oeste	27	59
Brasil	22	38

Fonte: ABICALIL, M.T.O. O pensamento do setor de Saneamento no Brasil, 2002. Cobertura dos serviços de água e esgoto São Paulo

Tabela 2—Porcentagem do abastecimento de água, coleta e tratamento de esgoto no Estado de São Paulo.

Região	Abastecimento Água¹ (%)	Coleta de Esgoto¹ (%)	Tratamento Esgoto² (%)
Metropolitana	99	82	50
Litoral	99	53	90
Interior	97	89	31
Total no Estado	98	83	41

1 – IBGE – Censo 2000; 2 – Relatório das águas interiores – CETESB-2000

Vários pesquisadores têm relatado a presença de compostos farmacêuticos, tanto de origem veterinária, quanto humana, em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgotos (ETE), estações de tratamento de água (ETA) como também em outras matrizes ambientais tais como solo, sedimento e águas naturais, em concentrações que variam na faixa de µg/L e ng/L (STUMPF et al., 1996; ZUCCATO et al., 2000; e HALLING-SORENSEN et al., 1998).

Na Tabela 3 são apresentados os dados que reportam a eficiência da remoção de fármacos em plantas de tratamento de esgotos realizados por vários pesquisadores em diferentes países.

Tabela 3 - Eficiência de remoção de fármacos em plantas de tratamento de esgotos.

Composto	Afluente (µg/L)	Efluente (µg/L)	Remoção (%)	Referência
Analgésico/antiinflamatório				
AAS	3.2	0.6	81	Ternes <i>et al.</i> (1999)
AS	57	0.05	99	Metcalf <i>et al.</i> (2003a)a
AS	330	3.6	-	Carballa <i>et al.</i> (2004)
Diclofenaco	3.0	2.5	17	Heberer (2002)
Diclofenaco	2.8	1.9	23	Quintana <i>et al.</i> (2005)b
Diclofenaco	0.4 – 1.9	0.4 – 1.9	0	Tauxe-Wuersch <i>et al.</i> (2005)c
Ibuprofen	38.7	4	>90	Buser <i>et al.</i> (1999)
Ibuprofen	2.6 – 5.7	0.9 – 2.1	60 – 70	Carballa <i>et al.</i> (2004)a
Ibuprofen	2 – 3	0.6 – 0.8	53 – 79	Tauxe-Wuersch <i>et al.</i> (2005)c
β - bloqueadores				
Metropolol	n.r.	n.r.	0 – 10	Andreozzi <i>et al.</i> (2003a)c
Propanolol	70	304	0	Roberts and Thomas (2005)a
Atenolol	n.r.	n.r.	< 10	Andreozzi <i>et al.</i> (2003 ^a)c
Antilipênicos				
Benzafibrato	1.18	0.6 – 0.84	27 – 50	Stumpf <i>et al.</i> (1999)b
Fenofibrato	0.44	0.22 – 0.4	6 - 45	Stumpf <i>et al.</i> (1999)b
Ácido clofíbrico	1	0.68 – 0.88	15 – 34	Stumpf <i>et al.</i> (1999)b
Compostos neuroativos				
Carbamazepina	n.r.	n.r.	7 – 8	Ternes (1998)b
Carbamazepina	0.7	0.7	< 50	Metcalf <i>et al.</i> (2003a)a
Diazepan	0.59 – 1.18	0.1 – 0.66	93	Van Der Hoeven (2004)

n.r.: não reportado. Fonte: FENT *et al.* (2005) a) concentração média ou %. b) concentração média ou %. c) concentração máxima ou %.

3.4 Estabilidade e meia vida dos fármacos no ambiente.

Segundo ZAGATTO, 2006, os processos de degradação, englobando degradação abiótica e/ou degradação biótica (biodegradação), referem-se aos processos pelos quais uma substância química, de estrutura complexa, é convertida em moléculas mais simples.

- Degradação abiótica: aquela que ocorre decorrente transformações químicas, como:
 - compostos orgânicos: hidrólise, fotólise, óxido/redução e reações de troca iônica; e,
 - compostos inorgânicos: adsorção, complexação (quelatos), óxido-redução e polimerização.
- Degradação biótica (biodegradação): pode ser aeróbica ou anaeróbica. A biodegradação de um composto orgânico não é decorrente da atividade de um único e específico organismo. Ela resulta da participação de uma cadeia de microrganismos, que geralmente atua sinergicamente, utilizando diferentes vias metabólicas e processos enzimáticos.

A tendência da suscetibilidade de um composto à ação de microrganismos, a qual é influenciada por:

- Características químicas: massa molecular, estrutura molecular, presença e tipos de grupos funcionais, os quais provêm sítios para o início do processo;
- Características físicas do composto (solubilidade em água e pressão de vapor);
- Presença e biomassa de microrganismos adequados; tempo de adaptação; nutrientes; pH (6-8 bactérias; 5-6 fungos); temperatura 10 - 30°C; concentração menor 10 µg/L de contaminante (valor mínimo necessário para que haja resposta microbiana) AZEVEDO, 2003.

A biodegradação de compostos orgânicos por microrganismos ocorre por meio de uma série de reações mediadas por enzimas, principalmente reações de oxidação, hidroxilação, redução, hidrólise entre outras. Pode-se citar como fatores determinantes na biodegradação os fatores relativos ao substrato, aos microrganismos e os relativos ao meio.

Estudos ambientais conduzidos com alguns biocidas têm evidenciado que comunidades microbianas podem adquirir adaptação metabólica, ou seja, desenvolver a habilidade de degradar metabolicamente compostos xenobióticos quando expostas a eles por períodos prolongados (ZAGATTO, 2006).

Com o objetivo de prever o comportamento e o impacto ambiental de novas substâncias químicas, foram estabelecidos métodos padronizados para avaliar sua biodegradabilidade, uma vez que constitui importante propriedade para a estimativa de sua provável distribuição e concentração no meio. Neste sentido, agências nacionais e internacionais atuam no desenvolvimento e/ou revisão de tais metodologias, as quais são incorporadas às legislações para posterior utilização em ações regulatórias (ZAGATTO, 2006).

Alguns métodos padronizados prevêm a avaliação da biodegradabilidade de alguns compostos, uma vez que constitui importante propriedade para a estimativa de sua provável distribuição e concentração no meio. Neste sentido, agências nacionais e internacionais atuam no desenvolvimento e/ou revisão de tais metodologias, as quais são incorporadas às legislações para posterior utilização em ações regulatórias, podendo-se citar: IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente), CETESB (Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Básico) e Ministério da Agricultura; ISO (International Organizations of Standardization), MITI (Japanase Ministry of International Trade and Industry), USEPA (United States Environmental Protection Agency), ASTM (American Society for Testing and Materials) e OECD (Organization for Economic Cooperation and Development)

A Portaria Normativa nº 84 IBAMA (Brasil, 1996) em seu artigo 1º estabelece procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, para efeito do registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental (ppa), de agrotóxicos seus componentes e afins, segundo definições dispostas nos incisos XX, XXI, XXII, do artigo 2º, do Decreto nº

98.916/90. No Brasil esta Portaria prevê testes de bioconcentração com peixes quando a substância apresentar uma das seguintes características:

- a) $\log K_{ow} > 2,0$;
- b) solubilidade em água $< 1,0$ mg/l;
- c) tempo de meia-vida > 4 dias.

3.5 Efeitos em organismos aquáticos

Os fármacos são sintetizados para atingir órgãos ou rotas metabólicas e moleculares específicas, tanto nos humanos, como em animais. Mas também possuem, freqüentemente, efeitos colaterais importantes. Quando introduzidos no ambiente eles podem afetar os animais pelas mesmas rotas e atingir órgãos, tecidos, células ou biomoléculas com funções semelhantes a dos humanos (FENT et al., 2005). É importante reconhecer que para os organismos aquáticos o efeito específico, ou o modo de ação de drogas utilizadas na saúde humana não são muito bem conhecidos e estas substâncias podem agir de modo adverso (BILA E DEZOTTI, 2003).

Os ensaios ecotoxicológicos, realizados atualmente, são desenvolvidos com sistemas de testes estabelecidos com microrganismos tradicionais, objetivando a determinação da mortalidade. Entretanto, estes testes deveriam ser realizados objetivando o efeito do fármaco em organismos vertebrados e invertebrados, baseados na hipótese de semelhança no modo de ação. (FENT et al., 2005). A grande maioria dos fármacos é excretada através das fezes e urina, como uma mistura de metabólitos e compostos não transformados (JONES et al., 2001; SANDERSON et al.2004).

Um grande problema detectado é a taxa de reposição continuada desses compostos, nas várias matrizes ambientais os quais potencialmente sustentam a exposição crônica nos organismos aquáticos (DAUGHTON e TERNES, 1999, SANDERSON et al., 2004). Os efeitos da toxicidade, destas substâncias, em alguns organismos aquáticos podem ser observados em dados presentes na Tabela 04.

Tabela 4 - Efeitos tóxicos de alguns fármacos em organismos aquáticos.

Composto	Uso terapêutico	Organismo teste	Toxicidade	Ensaio	Referência
Clorofibrato	Antilipêmico	Alga	DE10 = 5.4 mg/L DE50 = 12 mg/L	Inibidor de crescimento	Kopf (1995)
Diazepan	Psicofarmaco	<i>D. magna</i>	DL50 = 13.9 mg/L DL50 = 4.3 mg/L	reprodução	Lilius et al. (1995) Calleja at al. (1993)
Etinilestradiol	Hormônio	Alga	DE10 = 0.054 mg/L DE50 = 0.84 mg/L	Reprodução	Kopf (1995)
Ibuprofen	Analgésico	<i>Trichphyton rubrum</i>	MIC = 5- 10 ~g/ml	MIC pH 5	Sanyal et al. (1993)
Metronidazol	Antibiótico	<i>Chlorella sp.</i>	DE10 = 2.03 mg/L (72 horas)	Resistência	Leffet et al. (1993)
Ivermectin	Vermífugo	<i>D. magna</i>	DL50 = 0.025 ppb CENO = 0.01 ppb (48 horas)	Reprodução	Halley et al. (1989)
Estrogênio	hormônio	Alfafa	0.02-2nmol/L 200-2000nmol/L.	Crescimento	Shore et al. (1992)

Fonte: HALLING-SORENSEN *et al.* (1998).

3.6 Efeitos na saúde humana

O efeito dos fármacos na saúde humana deve ser analisado de maneira ordenada e qualitativa levando em consideração as preocupações especiais e as necessidades da sociedade dentro das classes e produtos. Assim, pode ser destacado o uso de antibióticos que é uma grande preocupação dos especialistas, devido a ocasionarem o desenvolvimento de resistência em populações bacterianas (SANDERSON *et al.*, 2004).

O aumento do uso e tipos de antibióticos durante as últimas cinco décadas resultou em uma seleção genética de bactérias resistentes, com efeito, em longo prazo e provavelmente irreversível (SANDERSON *et al.*, 2004).

JORGENSEN e HALLING-SORENSEN (2000), comentam em seus estudos, que o desenvolvimento de resistência é favorecido através da exposição a baixas concentrações de antibióticos. Um outro exemplo que requer preocupação especial são os hormônios sexuais, que podem atuar como perturbadores endócrinos em organismos não-alvo a baixas concentrações, e os antineoplásicos e imunossupressores, utilizados em quimioterapia, os quais são conhecidos como potentes agentes mutagênicos.

Alguns aditivos utilizados em medicamentos como parafinas, corantes, estabilizadores, e surfactantes, são reportados na literatura como produtos extremamente tóxicos ($EC_{50} < 0.1 \text{ mg/L}$) (CARLSSON, 2006 e 2006a). Assim, produtos formulados deveriam reduzir o uso destes aditivos sem comprometer a eficácia do produto.

Atividades de farmacodinâmica unida a ecotoxicologia de fármacos são ciências que podem apresentar resultados mais conclusivos do risco dos mesmos e suas formulações aos problemas ambientais (SANDERSON et al., 2004).

Compostos farmacêuticos menos específicos, que atingem mecanismos básicos de funções celulares podem ter seu efeito tóxico aumentado devido a estas substâncias atingirem organismos não-alvos pelos mesmos mecanismos basais (SEILER, 2002).

Novos fármacos possuem especificidades ao receptor alvo, sendo maiores as chances de prever o potencial de efeitos aos organismos não alvos e seus modos estreitos de ação (DAUGHTON, 2003). Os impactos de substâncias químicas podem interferir em qualquer nível de hierarquia biológica; células, organismos, populações e ecossistemas. Efeitos sutis podem incluir seleção genética, perturbação endócrina, genotoxicidade e subsequentemente alterar o comportamento metabólico e funções da espécie no ecossistema (JORGENSEN e HALLING-SORENSEN, 2000).

No entanto, estas mudanças são de difícil análise e interpretação devido ao seu inter-relacionamento (SANDERSON et al., 2004). A habilidade para distinguir a relação entre normal ou saudável e, anormal ou doente, em sistemas complexos, é muito relativo, devido à falta de sistemas comparativos e de como eles são afetados. Por exemplo, misturas de fármacos com agrotóxicos podem obscurecer a elucidação de efeitos sutis no ambiente.

O poder de recuperação de um ecossistema (autodepuração) pode devolver a este, um estado normal natural depois de sofrer uma perturbação. No entanto, o estado para o qual este é revertido pode ser diferente quando uma mudança descontínua é efetuada. (DAUGHTON, 2003). Sinais biológicos sutis e/ou efeito cascata dos compostos farmacêuticos (concentrações extremamente baixas) no ambiente podem ser estudados em experiências de microcosmo (JORGENSEN e HALLING-SORENSEN, 2000; SANDERSON, 2002; CLÁSSIC, 2002). Recuperação neste contexto significa retorno para um estado natural não perturbado (SANDERSON, 2002).

3.7 Métodos analíticos utilizados na determinação de fármacos

Para a determinação de fármacos, diferentes métodos analíticos são reportados na literatura, os quais são principalmente válidos para matrizes biológicas como sangue, tecido e urina, sendo que algumas modificações nestes métodos podem ser suficientes para análises de amostras ambientais (BILA e DEZOTTI, 2003).

No entanto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos mais sensíveis para a detecção de concentrações na faixa de $\mu\text{g/L}$ e ng/L para a análise destes compostos residuais, em efluentes de ETE, ETA, em águas de rios, de subsolos e água potável.

Em seu estudo TERNES (2001) fez uma revisão de vários métodos analíticos utilizados na determinação de fármacos residuais, em diferentes matrizes aquosas Tabela 5.

3.8 Ecotoxicologia

Com o objetivo de prever o comportamento e o impacto ambiental de novas substâncias químicas, foram estabelecidos métodos padronizados para avaliar sua degradabilidade, uma vez que constitui importante propriedade para a estimativa de sua provável distribuição e concentração no meio (ZAGATTO, 2006). Durante a seleção do método deve-se levar em consideração algumas condições como:

- Aplicabilidade a uma variedade de substâncias, considerando sua solubilidade e volatilidade;
 - Disponibilidade do laboratório em relação a equipamentos e métodos analíticos específicos;
 - Rapidez, facilidade de execução e custos mínimos; e,
 - Ampla aceitabilidade, com resultados significativos às ações a serem tomadas.
- Com o objetivo de prever o comportamento e o impacto ambiental de novas substâncias químicas, foram estabelecidos métodos padronizados para avaliar sua degradabilidade, uma vez que constitui importante propriedade para a estimativa de sua provável distribuição e concentração no meio (ZAGATTO, 2006).

Tabela 5 - Métodos utilizados na determinação de fármacos em ambientes aquáticos: Método e Substâncias Referência.

Método	Referência
CLAE/EM(a)	Ácido salicílico, antiinflamatórios e antilipêmicos Ácido clofibrico, antibióticos, antilipêmicos, antiinflamatórios, anticonvulsivantes Antibióticos
CLAE/EM/EM(b)	Antibióticos Analgésicos, β -bloqueadores, antilipêmicos, antibióticos Antiinflamatórios, drogas psiquiátricas e antidiabéticas β -bloqueadores, antibióticos Antibióticos
CG/EM(c)	Analgésicos, antilipêmicos e metabólitos, antiinflamatórios. Analgésicos, antipiréticos, antiinflamatórios, antilipêmicos, anticonvulsivantes drogas psiquiátricas Estrogênios Ácido Clofibrico, antiinflamatórios, anticonvulsivantes
CG-EM/EM(d)	Antiinflamatórios, anticonvulsivantes, ácido salicílico, ácido clofibrico, antilipêmicos. β -bloqueadores, drogas psiquiátricas, estrogênios Estrogênio

Fonte: TERNES, 2001

De acordo com CETESB (1990a,1990b), em termos de ação de controle, a estimativa do potencial de impacto ambiental é a informação mais importante de todo o processo de controle de agentes tóxicos em efluentes líquidos, pois é neste ponto que se estima se o corpo receptor sofre impacto ou não, a que nível e se esse nível é aceitável ou não.

Alguns estudos têm demonstrado que uma significativa redução da toxicidade de efluentes brutos pode ser obtida através de tratamentos convencionais (FENT, 2005). No entanto, mesmo após o tratamento, os efluentes podem apresentar toxicidade remanescente, a qual pode ser incompatível com a qualidade de água para preservação da vida aquática. Nesses casos, a toxicidade do efluente deve ser reduzida, aos níveis solicitados pelo órgão de controle, utilizando a metodologia e o conhecimento técnico-científico disponível.

É importante destacar que, se tratando de fármacos, ainda não existe legislação específica para os produtos, nem tratamentos específicos para a remoção destes compostos que eventualmente possam permanecer na água, mesmo após tratamento convencional. Alguns trabalhos técnicos apresentam dados com eficiência variável de remoção 50 – 90%, em tratamentos convencionais, sendo o que apresentou melhores resultados foi o sistema de lodos ativados (STUMPF et al, 1996).

Alguns artigos trazem como alternativa, a incineração para a eliminação dos fármacos, principalmente os com data de vencimento expirada. No entanto este procedimento acarretaria um aumento na emissão de poluentes, principalmente dioxinas e furanos (GONÇALVES, 2003).

3.9 Avaliação do impacto ambiental de fármacos em ambientes aquáticos.

Para se avaliar os efeitos causados à(s) espécie(s)-teste, utiliza-se os testes de toxicidade que consistem em expor os organismos aquáticos, representativos do ambiente, a várias concentrações de uma ou mais substâncias, ou a fatores ambientais, durante um determinado período de tempo (ensaios toxicológicos). Estes ensaios quando orientados a um objetivo prático bem definido, se utilizam, preferencialmente, de reações biológicas consideradas adequadas para estimar os efeitos potenciais de agentes tóxicos sobre uma determinada comunidade em organismos teste. (AZEVEDO, 2005).

Por meio de estudos ecotoxicológicos verifica-se que nem todos os efeitos observados nos organismos vivos podem ser utilizados com um objetivo prático, pois, para tanto, é necessário que os mesmos tenham um significado ecológico bem definido. Nesse sentido, efeitos sobre as funções biológicas fundamentais como reprodução, crescimento e morte, afetam diretamente as características das diversas comunidades

aquáticas em suas inter-relações recíprocas, e entre elas e o ambiente abiótico, o que as tornam apropriadas aos objetivos práticos. (AZEVEDO, 2005)

Normalmente são realizados testes com três organismos, pertencentes a diferentes níveis tróficos do ambiente aquático. (AZEVEDO, 2005)

Dependendo da sua composição química, alguns efluentes são tóxicos apenas a peixes, outros a microcrustáceos e outros a ambos os organismos. As algas, por exemplo, podem ser mais sensíveis que as outras espécies testadas. Assim, é recomendável, sempre que possível, avaliar o efeito de um determinado efluente a mais de uma espécie representativa da biota aquática, para que se possa, através do resultado obtido com o organismo mais sensível, estimar com maior segurança o impacto desse efluente num corpo receptor. (AZEVEDO, 2005)

Na descrição dos efeitos deletérios de um agente tóxico são utilizados os termos “efeito agudo” e “efeito crônico”.

Efeito agudo: Trata-se de uma resposta rápida, dos organismos aquáticos a um estímulo, em geral, num intervalo de zero à 96 horas. Normalmente o efeito é a letalidade, ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade de alguns microcrustáceos. Para avaliar os efeitos agudos de agentes tóxicos em testes de toxicidade usa-se, geralmente, a concentração letal (CL50) ou a concentração efetiva (CE50) a 50% dos organismos em teste. Essa é a resposta considerada mais significativa para ser extrapolada a uma população.

Efeito crônico: O efeito crônico se traduz pela resposta de um estímulo que continua por longo tempo, geralmente por períodos que podem abranger parte ou todo o ciclo de vida dos organismos.

De modo geral, esses efeitos são sub-letais e são observados em situações em que as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência do organismo, embora

afetem uma ou várias de suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, entre outras. Para avaliar esses efeitos utilizam-se testes de toxicidade crônica, nos quais é determinada a concentração do agente tóxico que não causa o efeito observado - **Concentração de Efeito Não Observado (CENO)**.

Quando efluentes líquidos, mesmo os tratados, são lançados de forma contínua no ambiente aquático, podem ocorrer efeitos crônicos, uma vez que os organismos são expostos a baixas concentrações de determinados poluentes durante longos períodos de tempo.

3.10 Estimativa do potencial de impacto ambiental.

De acordo com CETESB (1990a, 1990b), a avaliação do impacto é estimada comparando-se a concentração do efeito tóxico nos testes de toxicidade com a concentração do efluente no corpo receptor.

A concentração do efluente no corpo receptor (CER), expressa em percentagens, é calculada pela equação (01):

$$CER = \frac{QE}{QE + Q_{7,10}} \times 100 \quad (01)$$

Onde:

QE = vazão do efluente

$Q_{7,10}$ = vazão mínima anual do rio, média de sete dias consecutivos, com probabilidade de 10 anos de retorno.

Quando o $Q_{7, 10}$ não se aplica a um determinado corpo receptor, devem ser utilizados os dados de vazão mínima apropriados.

Quanto ao teste de toxicidade aguda, foi demonstrado experimentalmente, que ao nível de 1/3 da CL50 ou CE50 praticamente cessam os efeitos tóxicos agudos. Assim, a estimativa de impacto, para prevenir os efeitos agudos, é obtida como pode ser visto na equação (02)

$$CER < ou = \frac{CE50 \text{ ou } CL50}{3} \quad (02)$$

Sabe-se, também, que a relação entre a CL50 ou CE50 e CENO está na ordem de 1/10. Portanto, com a obtenção dos dados de toxicidade aguda (CL50 ou CE50), é possível estimar a toxicidade crônica, expressa em CENO. Desse modo, a estimativa de impacto, para prevenir efeitos crônicos, é obtida tanto com os resultados estimados através de testes agudos como através de testes crônicos, como mostrado na equação 03:

$$CER < ou = \frac{CE50 \text{ ou } CL50}{10} \quad \text{ou} \quad CER < ou = CENO \quad (03)$$

A estimativa apresentada, até este ponto, se aplica as situações de mistura completa do efluente no corpo receptor, baseando-se na utilização de 3 espécies, no mínimo, de organismos aquáticos bem como na suposição que não exista variabilidade na toxicidade do efluente ao longo do tempo.

No entanto, a utilização de um número reduzido de espécies pode gerar uma razoável incerteza quando se efetua uma estimativa de impacto, pois alguns estudos têm demonstrado que a sensibilidade entre as diversas espécies de organismos pode variar ao redor de dez vezes. Portanto, esse fator de incerteza deve ser considerado,

pois é praticamente impossível avaliar a toxicidade de um efluente com a maioria dos grupos taxonômicos existentes.

No que se refere à variabilidade na toxicidade de efluentes, foi demonstrado que esses podem apresentar variações ao redor de dez vezes. Assim, até que seja demonstrado que o efluente mantém um nível de toxicidade constante, o fator dez deve ser também considerado em uma estimativa de impacto.

Considerando as fontes de incerteza acima, recomenda-se que a estimativa de impacto seja efetuada utilizando-se as equações a seguir:

- Para evitar efeitos tóxicos agudos

$$CER < ou = \frac{CE50 \text{ ou } CL50}{300} \quad (04)$$

- Para evitar efeitos tóxicos crônicos.

$$CER < ou = \frac{CE50 \text{ ou } CL50}{1000} \quad (05)$$

ou ,

$$CER < ou = \frac{CENO}{100} \quad (06)$$

Os níveis de incerteza apresentados podem ser reduzidos, desde que seja efetuada uma avaliação da toxicidade do efluente, e a variabilidade nos níveis de toxicidade seja determinada juntamente com um estudo quantitativo da dispersão do efluente no rio.

É importante ressaltar que para os efeitos tóxicos carcinogênico, assume-se que há a probabilidade de ocorrência de dano em qualquer nível de exposição, ou seja, não há limiar de tolerância, não sendo estabelecida dose de referência.

Alguns estudos têm demonstrado que uma significativa redução da toxicidade de efluentes brutos pode ser obtida através de tratamentos convencionais. No entanto, mesmo após o tratamento, os efluentes podem apresentar toxicidade remanescente, a qual pode ser incompatível com a qualidade de água para preservação da vida aquática. Nesses casos, a toxicidade do efluente deve ser reduzida, aos níveis solicitados pelo órgão de controle, utilizando a metodologia e o conhecimento técnico-científico disponível (FENT 2005).

3.11 Tipos de tratamento

É importante destacar que, se tratando de fármacos, ainda não existe legislação específica, nem tratamentos específicos para a remoção destes compostos que, eventualmente, possam permanecer na água, mesmo após tratamento convencional. Alguns trabalhos técnicos apresentam dados com eficiência variável de remoção 50 – 90%, em tratamentos convencionais, sendo o que apresentou melhores resultados foi o sistema de lodos ativados (STUMPF et al, 1996).

3.12 Limites de tolerância

Os limites de tolerância (LT ou TLV = Threshold Limit Valeus) e as concentrações máximas permissíveis (CMP ou MAC = Maximum Allowable Concentration) são valores utilizados como guia de proteção de indivíduos expostos ocupacionalmente a agentes agressivos físicos, químicos ou biológicos, que podem provocar danos à saúde.

4 AÇÃO BIOLÓGICA DOS FÁRMACOS

4.1 Introdução

A química farmacêutica é a ciência que tem por função a compreensão dos mecanismos de ação dos fármacos, relacionando a estrutura química e atividade biológica, correlacionando o comportamento biodinâmico, reatividade química e as propriedades do agente terapêutico (KOROLKOVAS, 1988).

Os fármacos são, em geral, provenientes de ácidos ou bases fracas, transformados em sais ou ésteres, visando à melhora das propriedades físico-químicas, como solubilidade, estabilidade, fotossensibilidade, propriedades organolépticas; assim como melhora na biodisponibilidade e redução de toxicidade. No entanto nem todos os sais são adequados para o uso terapêutico. Estas substâncias chegam aos tecidos através do sangue circulante e podem ser empregadas para:

- fornecimento de elementos ao organismo (vitaminas, sais minerais, hormônios);
- prevenção de doenças e/ou infecções (soros e vacinas);
- combate à infecção (antibióticos e quimioterápicos);
- bloqueio temporário de uma função normal (anestésicos e anticoncepcionais);
- correção de alguma função orgânica (disfunção-cardiotônicos; hipofunção-insuficiência da supra-renal; hiperfunção-hipertensão);
- destoxificações (antídotos)
- agentes auxiliares de diagnóstico (radioisótopos);

A figura 2 apresenta as fases da ação dos fármacos segundo proposto por KOROLKOVAS (1988).

4.1.1 Metabolismo ou Biotransformação.

O metabolismo ou biotransformação é a alteração química que a molécula original, sofre no organismo, também denominada molécula parenteral, geralmente por ação de enzimas inespecíficas, em um ou vários compostos denominados metabólitos. A biotransformação pode ocorrer, em maior ou menor grau, em praticamente todas as células do organismo. Este processo pode ocorrer, em maior ou menor grau, em praticamente todas as células do organismo. Entretanto, o principal órgão responsável por esta função no organismo é o fígado.

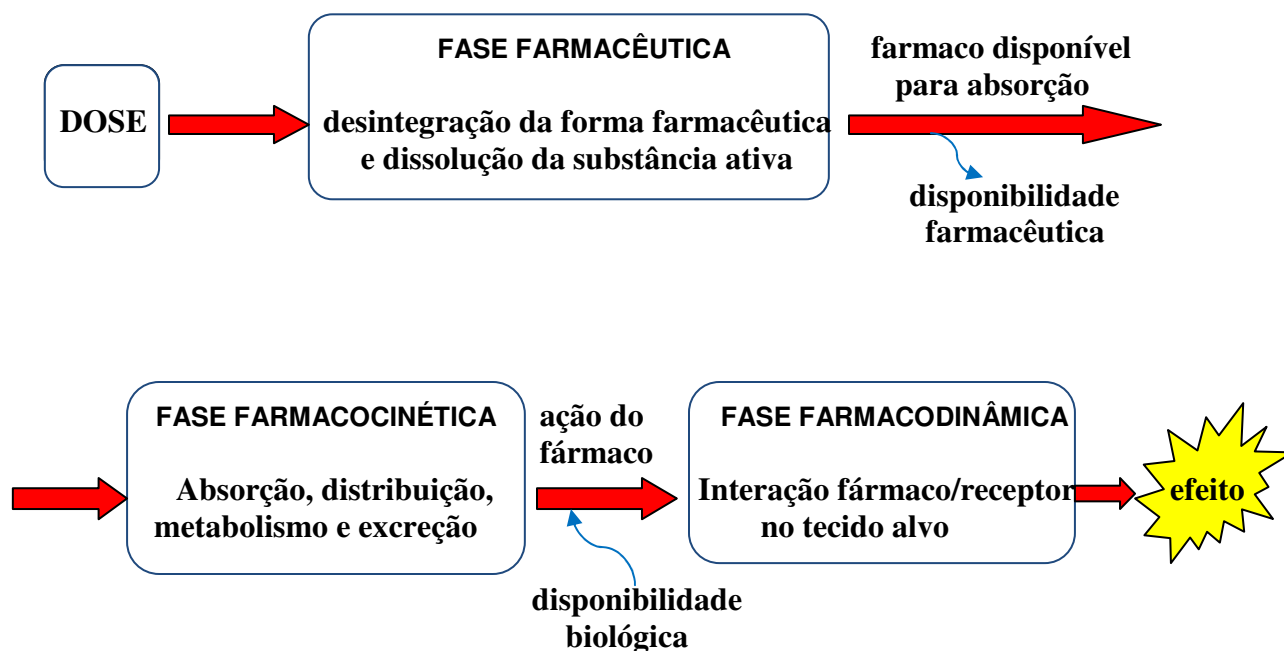


Figura 2 – Fases da ação dos fármacos. Adaptado Korolkovas,1988.

A biotransformação, juntamente com os fenômenos de absorção, distribuição e excreção, participa de importante mecanismo regulador de níveis plasmáticos de drogas. A aceleração da biotransformação de uma droga reduz sua concentração no

sangue, diminuindo assim sua ação farmacológica. A inibição, ao contrário, prolonga o tempo de permanência desta droga no organismo, conferindo maior tempo de ação. A Figura 3 apresenta de maneira esquemática o processo de biotransformação de um fármaco no organismo.

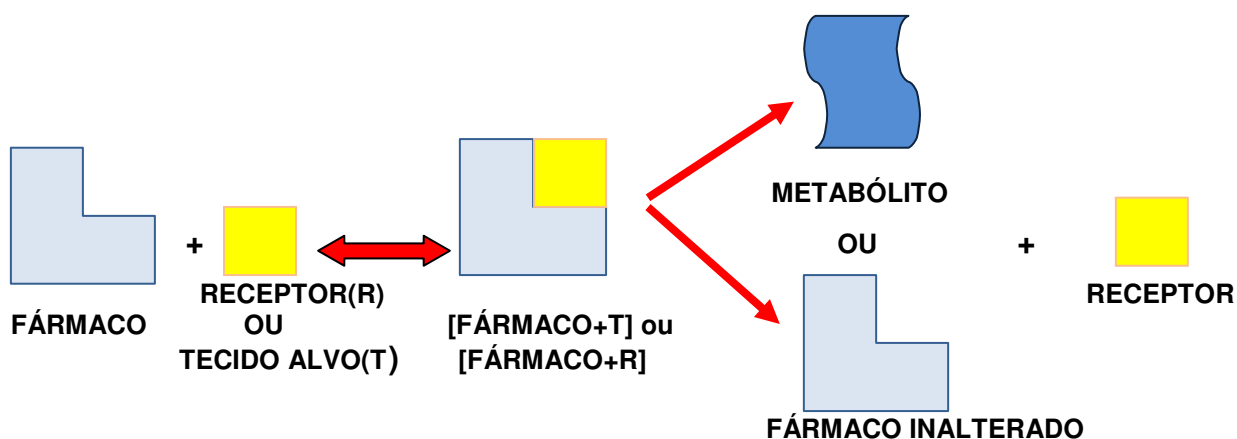


Figura 3 - Processo de biotransformação de um fármaco no organismo.

Assim, certos fármacos, como os análogos de aminas biógenas, esteróides, purinas, pirimidinas, aminoácidos, assemelham-se muito a substâncias normalmente presentes nos animais, inclusive no homem. Por esta razão, podem sofrer as mesmas interações específicas com as enzimas, proteínas carregadores e sistemas transportadores, que os seus correspondentes endógenos.

4.1.2 Fatores que afetam o metabolismo

Alguns fatores podem afetar os mecanismos da biotransformação, tais como:

- Fatores ambientais internos: sexo, idade, peso, estado nutricional, estado emocional, etc.;

- Administração de fármacos: via de administração, local da administração, estado físico e químico do fármaco, etc.;
- Fatores ambientais externos: temperatura ambiente, luz, umidade, etc.

4.1.3 Local e fases do metabolismo

Os fármacos, em sua maioria, são metabolizados principalmente no fígado, através da ação de enzimas. Outros locais de metabolização são cérebro, rins, pulmões, intestinos. Durante o metabolismo, geralmente as moléculas pouco polares, se convertem em moléculas mais polares, tornando-se assim mais solúveis em água, sendo mais facilmente excretadas pelo rim (KOROLKOVAS, 1988).

Enquanto permanecem no interior do organismo, podem continuar intactas ou sofrerem transformações químicas, resultando em compostos menos ativos, mais ativos, com atividade semelhante ou atividade diferente (KOROLKOVAS, 1988). A Figura 4 apresenta de maneira esquemática as fases do metabolismo dos fármacos.

Na fase I, os fármacos apolares (A) são, em geral inativados (C), e posteriormente excretados (D) ou, em alguns casos ativados pela introdução de grupos polares, através das reações de oxidação, redução, hidrólise e desmetilação (B).

Na fase II, também denominada fase sintética, onde um composto endógeno é adicionado ao produto químico obtido da fase I, formando-se o metabólito final. Os compostos polares (B) são inativados (D) por processos de síntese ou conjugação (ligação do fármaco com substâncias existentes no organismo – aminoácidos, carboidratos).

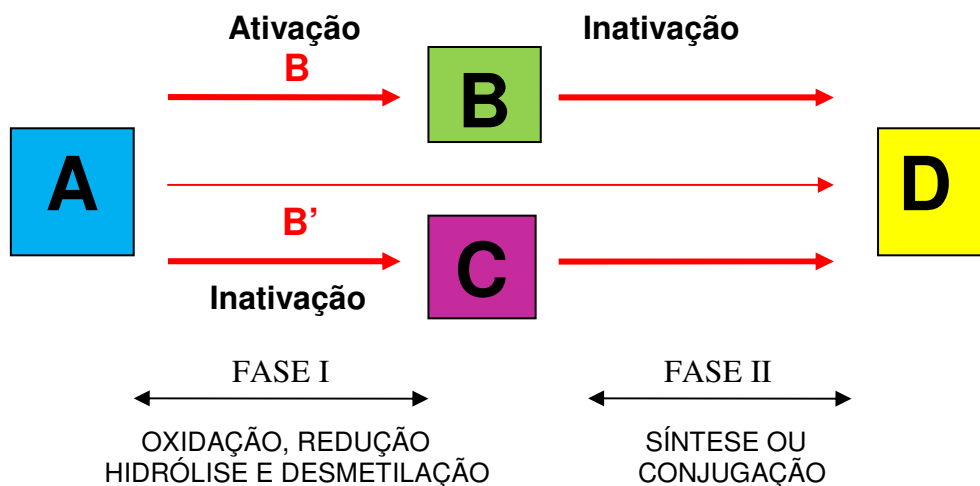


Figura 4 - Fases do metabolismo

Desta forma, a excreção do fármaco pode ser feita na forma inalterada, oxidada, reduzida, hidrolisada, desmetilada ou ainda na forma conjugada.

4.1.4 Eliminação de fármacos pelo organismo

Os rins são os principais órgãos responsáveis pela eliminação das drogas polares ou hidrossolúveis do organismo. No entanto, se a droga ainda apresentar alguma lipossolubilidade, ela poderá ser reabsorvida pelas células tubulares renais, após a filtração glomerular. Desta forma, a eliminação das drogas pelo organismo é dependente das características físico-químicas.

Todo o sangue do corpo é filtrado pelos rins em cerca de 100 minutos, sendo assim toda droga que não estiver ligada `a proteínas plasmáticas, aparecerá no fluido tubular após este tempo. (FRANCISCHI, 2005).

4.1.5 Classificação dos fármacos

Os fármacos são classificados de acordo com o órgão ou tecido que atuam, sendo divididos em:

- Aparelho circulatório: cardiotônicos, antiarrítmicos, antianginosos, vasodilatadores periféricos, anti-hipertensivos.
- Órgãos hematopoiéticos e no sangue: anti-anêmicos, anti-coagulante, coagulantes, derivados do sangue, expansores plasmáticos.
- Aparelho genito-urinário: diuréticos, antissépticos urinários, oxitócicos.
- Aparelho respiratório: expectorantes, anti-tussícos, broncodilatadores, descongestionantes.
- Aparelho digestivo: laxativos, antidiarreico, antiácidos e inibidores da secreção gástrica, antieméticos, digestivos, adsorventes.
- Metabolismo e nutrição: antilipêmicos, repositores hidroeletrólitos, suplementos dietéticos e nutrientes parenterais, vitaminas, outros.
- Ação endócrina: hipofisários e afins, androgênios, estrogênios, gestagênicos, insulina e antidiabéticos orais, tireoideanos e anti-tireoideanos, corticosteróides.
- Antiinfecciosos e antiparasitários: antibióticos, sulfamídicos, nitrofuranos, antimoniais, tuberculostático, hansenostático, antimaláricos, antiamebianos, giardicidas e triconomicidas, anti-helmínticos.
- Citostáticos: alcalóides, alquilantes, antimetabólitos, antibióticos.
- Antireumáticos
- e outros.
- Imunoterápicos: imunoglobulina, soros, vacinas.
- Uso oftálmico: agentes diagnósticos, anestésicos, antiinfecciosos e antiinflamatórios, mióticos, midriáticos e cicloplégicos, umectantes.
- Agentes diagnósticos: contrastes radiológicos, outros agentes diagnósticos.

- Sistema nervoso central e periférico: anestésicos, hipnóticos e sedativos, anticonvulsivantes, anti-Parkinsonianos, antipiréticos e analgésicos, neurolépticos, ansiolíticos, antidepressivos, bloqueadores neuro-musculares.
- Sistema nervoso autônomo: adrenérgicos, colinérgicos, bloqueadores adrenérgicos, bloqueadores colinérgicos e antiespasmódicos, anti-histamínicos.

4.2 Sistema nervoso

O sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O Sistema Nervoso Central envolve o encéfalo e a medula espinal que se aloja no interior da coluna vertebral, é responsável pelo comando, controle e manutenção dos sistemas fisiológicos, mantendo a homeostase do organismo. Muitas funções estão associadas a áreas específicas do encéfalo, sendo estas: bulbo, ponte, cerebelo, hipotálamo e cérebro. Os componentes do sistema nervoso irão se completar a medula, que será responsável pela ligação entre o encéfalo e as demais partes do organismo.

O Sistema Nervoso Periférico é constituído pelos nervos (feixes de dendritos e axônios) e pelos gânglios nervosos (conjunto de corpos celulares fora do SNC), sendo este dividido em: sistema nervoso periférico voluntário; e involuntário. O sistema nervoso periférico involuntário é dividido em: sistema nervoso periférico autônomo simpático e parassimpático. A Figura 05 apresenta de forma mais detalhada estas informações.

O sistema nervoso tem como principais células os neurônios, que devido ao processo de diferenciação celular, possui características anatômicas e fisiológicas capazes de promover a propagação de impulsos elétricos e químicos, importantes para a comunicação entre o sistema nervoso e demais regiões do corpo.

O processo de despolarizações e repolarizações sucessivas pelo axônio (parte constituinte do neurônio) é chamado de propagação do impulso. Quando o potencial de

ação alcança o terminal do axônio, ele altera a permeabilidade da membrana do mesmo, despolarizando-a e liberando um neurotransmissor.

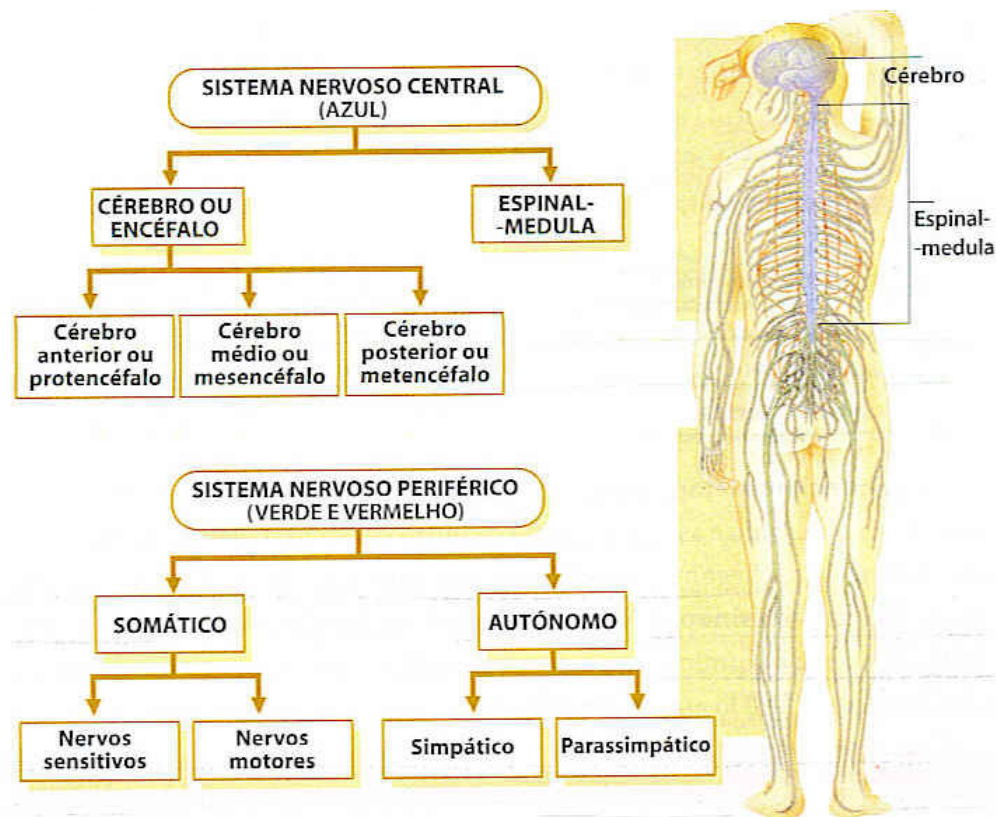


Figura 5 - Sistema nervoso (Fonte: internet-ClinicaMILLERDEPAIVA.com)

4.3 Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos

De acordo com BALDESSARINI, 2003, as psicoses estão entre os distúrbios psiquiátricos mais graves, nos quais não há apenas um acentuado comprometimento do comportamento, como também uma grave incapacidade de pensar de modo coerente, de compreender a realidade ou de perceber a presença dessas

anormalidades. Esses distúrbios comuns (que afetam cerca de, 0,5-1,0% da população em idade inespecífica) incluem tipicamente sintomas de crenças falsas (delírios) e sensações anormais (alucinações).

As alterações do humor ou do afeto incluem as síndromes de *depressão maior* (que antigamente incluía a melancolia) e o *distúrbio bipolar* (antigamente distúrbio maníaco-depressivo). O distúrbio bipolar caracteriza-se por uma alta tendência a recidiva de depressão e excitação maníaca, freqüentemente com manifestações psicóticas BALDESSARINI, 2003.

Antigamente denominado psicose, são os distúrbios menos difundidos são consideradas como distúrbios associados à ansiedade. Como a capacidade de compreender a realidade é mantida, o sofrimento e a incapacidade são algumas vezes graves. As alterações de ansiedade podem ser agudos ou transitórios ou, comumente, com recaídas na doença ou persistentes BALDESSARINI, 2003.

Os sintomas podem incluir alterações de humor como o medo e pânico, anormalidades limitadas do pensamento (obsessões, medos irracionais ou fobias), ou do comportamento (compulsões, histeria ou fixação em sintomas físicos imaginados ou exagerados).

Conforme BALDESSARINI, 2003 os medicamentos psicotrópicos, modificadores seletivos do Sistema Nervoso Central, podem ser classificados, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em: ansiolíticos e sedativos; potencializadores da cognição; antipsicóticos (neurolepticos); antidepressivos; ansiolíticos e sedativos; estimulantes psicomotores e psicomiméticos. Destas categorias, três apresentam grande importância quando se fala em controle de vendas em estabelecimento farmacêutico (ansiolíticos, antidepressivos e estimulantes psicomotores).

De acordo com BALDESSARINI, 2003 desde a década de 1950 e início da de 60, foram desenvolvidos fármacos com comprovada eficácia numa ampla variedade de

distúrbios psiquiátricos graves levando ao surgimento da sub-especialidade da psicofarmacologia. O tratamento da depressão baseia-se num grupo variado de agentes terapêuticos antidepressivos, em parte por ser a depressão clínica uma síndrome complexa de gravidade amplamente variável.

Os primeiros agentes utilizados com sucesso foram os antidepressivos tricíclicos nortriptilina (Pamelor®), maprotilina (Ludimil®), desipramina (Norpramine®), amitriptilina (Elavil®), clomipramina (Anafranil®), imipramina (Tofranil®) , entre outros (CRAIG,2008).

Na atualidade, uma série de agentes inovadores como os inibidores seletivos da recaptação da serotonina, dominam o tratamento dos distúrbios depressivos e são amplamente utilizados no tratamento dos distúrbios graves da ansiedade (BALDESSARINI, 2003).

O Conselho Regional de Medicina (CRM/SP) relata que hoje, cerca de 10-15% das prescrições feitas nos EUA são para medicações destinadas a afetar os processos mentais: para sedar, estimular ou, de algum modo, mudar o humor, o raciocínio ou o comportamento (CREMESP, 2002).

4.4 Antidepressivos inibidores da recaptação da serotonina.

Entre os antidepressivos, os inibidores seletivos de recaptação de serotonina têm sido os mais freqüentemente utilizados, por serem mais seguros e mais bem tolerados. O hidrocloreto de fluoxetina, mais conhecida pela marca registrada Prozac® apelidado de "a droga da felicidade", que chegou ao mercado em 1988 atualmente é um dos mais prescritos no Brasil e no mundo. Desde seu surgimento, são prescritas cerca de 1.000.000 de receitas médicas por mês para este fármaco; tendo sido utilizado por mais de 35 milhões de pessoas no mundo (BALDESSARINI, 2003). Outra

característica deste medicamento é que este pode atuar na promoção de perda de peso e bulimia, aumentando ainda mais seu consumo.

No Brasil, a legislação que aprova o regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial é a Portaria nº 344/98 – SVS/MS, de 12 de maio de 1998 (CFF, 1999/2000) a qual define as seguintes listas de substâncias: A1 e A2 (entorpecentes), A3, B1 e B2 (psicotrópicos), C1 (outras substâncias sujeitas a controle especial), C2 (retinóicas para uso sistêmico) e C3 (imunossupressoras) (ANDRADE et al., 2004).

Em estudo realizado por ANDRADE et al, 2004, entre as prescrições C1, o hidrocloridrato de fluoxetina predomina com, aproximadamente, 68,8%. Sendo a maioria das prescrições emitidas por clínico geral (52,4%). Segundo o Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo (CREMESP, 2002) um em cada dez adultos recebe prescrição de antidepressivos,

Como é uma “droga recente”, 20 anos desde o seu lançamento, ainda não se sabe sobre os efeitos a longo prazo. De qualquer forma, muitas pessoas estão consumindo esta droga diariamente. Nomes Comerciais: DAFORIN[®], PROZAC[®], FLUXENE[®], FLUOX[®], são algumas das formas comerciais similares encontradas.

4.4.1 Síntese da Serotonina (5HT)

A síntese da serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), ocorre pela hidroxilação e descarboxilação do aminoácido triptofano, está demonstrada esquematicamente na Figura 06 e a representação da sua molécula na Figura 07 (NEGRÃO, 2008 Fonte: www.orgone.com.br).

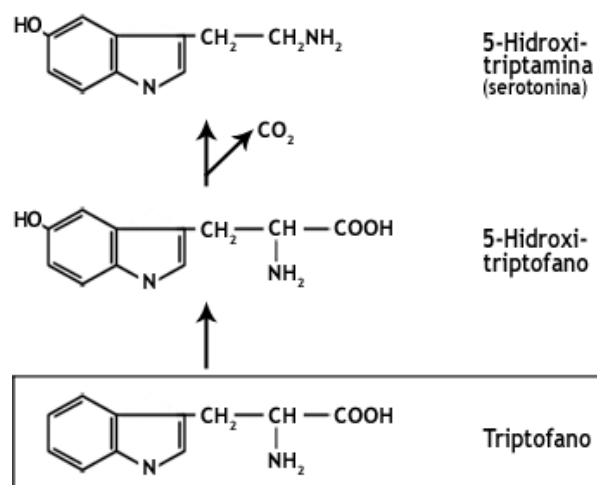


Figura 6 - Síntese da serotonina a partir do triptofano (Fonte: Internet-www.orgone.com.br)

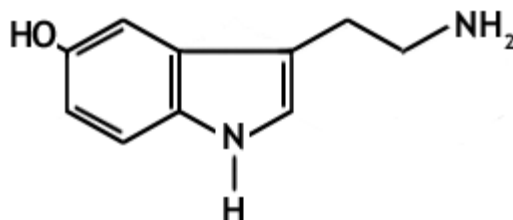
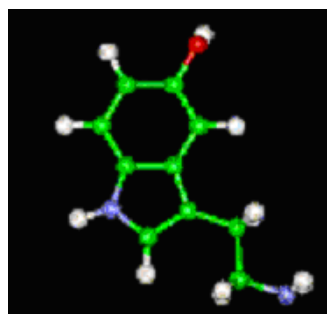


Figura 7 - Molécula da serotonina (Fonte: Internet-www.orgone.com.br)

Esse neurotransmissor concentra-se principalmente nas células do trato gastrointestinal (90%), o restante encontra-se no sistema nervoso central e plaquetas. Os efeitos são observados principalmente no sistema cardiovascular, sistema respiratório e intestinal (NEGRÃO, 2008 Fonte: www.orgone.com.br).

4.4.2 Produção da Serotonina nos neurônios serotoninérgicos.

Apesar do Sistema Nervoso Central conter menos do que 2% da serotonina total do organismo, como é sintetizado a partir do triptofano, o nível de 5-HT é dependente da disponibilidade desse aminoácido. A Figura 8 mostra como o triptofano é admitido dentro do neurônio serotoninérgico, através da bomba de recaptação do triptofano.

Em seguida, esse aminoácido sofre a ação da enzima triptofano hidroxilase (TRI OH), para se formar o metabólito intermediário, o 5- hidroxitriptofano (5-HTP), que é convertido em serotonina (5-HT), pela enzima aromática aminoácido descarboxilase (AAADC). A serotonina assim formada é guardada em vesículas sinápticas para eventual liberação para a fenda sináptica. A proteína 5-HT transportadora não é mostrada nessa figura (NEGRÃO, 2008 Fonte: www.orgone.com.br).

A síntese de 5-HT é bloqueada pela p-clorofenilalanina (PCPA). Fibras nervosas estimulam o terminal do axônio a secretar 5-HT, tanto através da despolarização, como pela ação de proteína 5-HT transportadora (NEGRÃO, 2008. Disponível: www.orgone.com.br).



Figura 8 - Mecanismos de produção da serotonina (Fonte: Internet-www.orgone.com.br)

4.4.3 Recaptação e destruição da Serotonina pelo neurônio Serotoninérgico.

Depois de se acoplarem aos receptores pós-sinápticos, as moléculas de serotonina são readmitidas para dentro do neurônio serotoninérgico, através da proteína 5-HT transportadora, que age como uma bomba de recaptação seletiva da serotonina.

Uma vez dentro do neurônio, a serotonina é degradada pela monoaminoxidase (MAO), que converte esse neurotransmissor em seus metabólitos Figura 9 (NEGRÃO, 2008. Disponível: www.orgone.com.br).



Figura 9 - Mecanismos de destruição da serotonina (Fonte: Internet-www.orgone.com.br)

4.4.4 Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS).

Quando se administra um ISRS, ele imediatamente bloqueia a bomba de recaptação da serotonina nas duas extremidades do neurônio serotoninérgico, causando um aumento do neurotransmissor na região somatodendrítica, mas não nos terminais axônicos inicialmente.

“Os receptores somatodendríticos e terminais estão ainda com densidade elevada, estando *up-regulated*, com conseqüente diminuição do fluxo de impulsos axônicos libertadores de serotonina nos terminais. Acredita-se que é por essa razão que não se observam efeitos imediatos depois da administração desses antidepressivos, apesar de haver um aumento da quantidade de serotonina na região somatodendrítica” Figura 10 (NEGRÃO, 2008 Fonte: www.orgone.com.br).

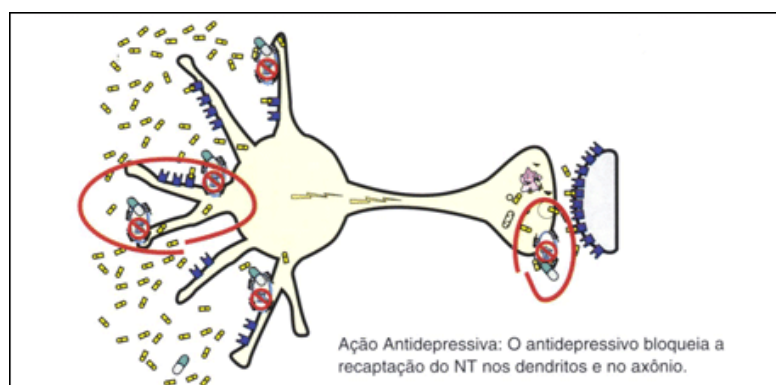


Figura 10 - O ISRS bloqueia a recaptação da serotonina nos dendritos e no axônio. Os círculos vermelhos mostram as bombas de recaptação bloqueadas. (Fonte: Internet-www.orgone.com.br)

“Após um certo tempo, ocorre uma diminuição da densidade dos receptores (*down-regulation*), na região somatodendrítica, mas ainda não no terminal axônico.

Nessa fase, já existe um aumento de fluxo de impulsos no axônio, com aumento da quantidade de neurotransmissor na fenda sináptica, mas os receptores pós-sinápticos ainda estão *up-regulated*” Figura 11 (NEGRÃO, 2008 Fonte: www.orgone.com.br).

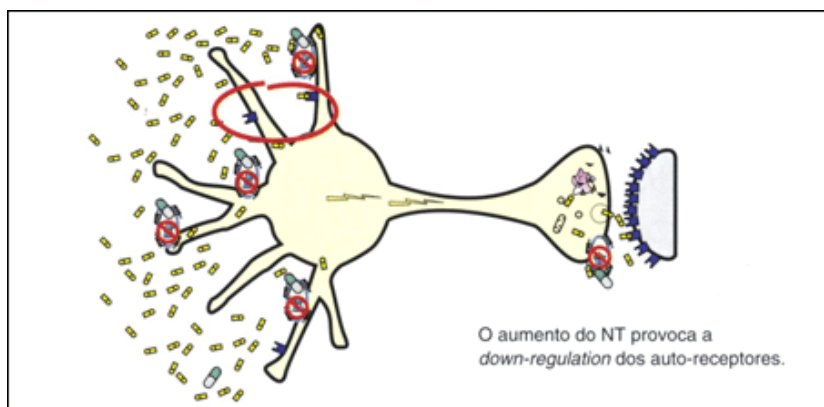


Figura 11 - *Down-regulation* nos receptores somatodendríticos e *up-regulation* nos terminais axônicos. (Fonte: Internet-www.orgone.com.br)

Os efeitos antidepressivos dos ISRS ainda não são observados nessa fase. O aumento da quantidade de neurotransmissor na fenda sináptica causa uma diminuição da densidade de receptores no botão pós-sináptico, com conseqüente melhora dos sintomas clínicos Figura 12 (NEGRÃO, 2008 Fonte: www.orgone.com.br).

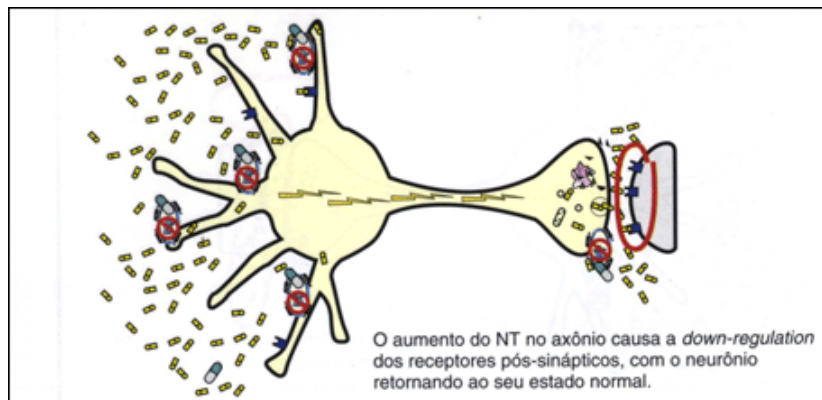


Figura 12 - O *down-regulation* dos receptores pós-sinápticos permite uma diminuição dos sintomas depressivos.(Fonte: Internet-www.orgone.com.br)

4.4.5 Tipos e Sub-tipos

Neurônios que secretam 5-HT são chamados de *serotoninérgicos*. Logo depois de sua liberação, o 5-HT é recaptado pelo neurônio serotoninérgico por uma proteína transportadora.

A função da serotonina é exercida pela sua interação com receptores específicos. Sete tipos específicos de receptores já foram clonados. Desses sete tipos vários sub-tipos foram discriminados, como pode ser observado na Tabela 6 (NEGRÃO, 2008 Fonte: www.orgone.com.br).

Tabela 6 – Tipos e sub-tipos de receptores da serotonina.

Tipo	Distribuição	Função
5-HT 1	Cérebro, nervos intestinais	Inibição neuronal comportamento vasoconstrição cerebral
5-HT 2	Cérebro, coração, pulmão, músculo estriado, plaquetas intestino, vasos sanguíneos	Excitação neuronal vasoconstrição comportamento depressão, ansiedade
5-HT 3	Sistema límbico, sistema nervoso autonômico	Náusea, ansiedade
5-HT 4	cérebro, músculo liso	Excitação neuronal
5-HT 5 5-HT 6 5-HT 7	cérebro	Desconhecido

4.5 O Hidrocloridrato de Fluoxetina.

4.5.1 Propriedades físico-químicas do hidrocloridrato de fluoxetina.

O Hidrocloridrato de Fluoxetina (CAS-56.296-78-7) é um sólido cristalino, de coloração branca a branco-amarelada, solúvel em água na concentração de 5mg/mL, metanol, clorofórmio e insolúvel em hexano, acetato de etila e benzeno. É estável durante 24 meses, quando exposta a uma temperatura de 25, 40 ou 50 °C. (www.merck-chemicals.com)

A Figura 13 apresenta a estrutura química e a Tabela 7 contém as características físico-químicas desta substância, respectivamente.

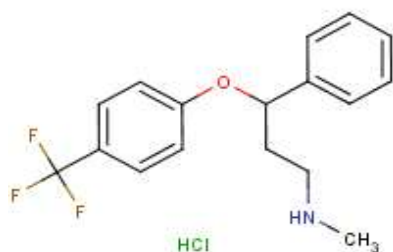


Figura 13 - Hidrocloridrato de fluoxetina.(Fonte:Internet- www.scielo.br)

Tabela 7 - Características físico-químicas do hidrocloridrato de fluoxetina e norfluoxetina.

Parâmetros	hidrocloridrato de fluoxetina			norfluoxetina		
<i>Parâmetros físico-químicos</i>						
Fórmula empírica	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO			C ₁₆ H ₁₆ F ₃ NO		
Massa Molecular	309,3			295,3		
pKa	10,06 ± 0,10			9,05 ± 0,13		
<i>Parâmetros ambientais</i>						
pH	2,0	7,0	11,0	2,0	7,0	11,0
Log K _{OW}	1,25	1,57	4,30	0,97	2,05	4,06
BCF	≈1	2,00	1071,52	≈1	6,97	716,12
Log K _{OC}	0,64	0,97	3,70	0,49	1,57	3,58

Fonte: BROOKS, 2002

4.5.2 Química e relações entre estrutura e atividade

A maioria desses inibidores consiste em aril ou ariloxialquilaminas. As relações entre estrutura e atividade não estão bem estabelecidas para os inibidores seletivos da recaptação da serotonina. Entretanto, sabe-se que a para-localização do substituinte

CF₃ do hidrocloreto de fluoxetina é decisiva para a potência de transportador da serotonina. Sua remoção e sua substituição na posição orto de um grupo metóxi produzem a nisoxetina, um inibidor altamente seletivo da captação de norepinefrina. (GOODMAN & GILMAN, 2003)

4.5.3 Propriedades farmacológicas: hidrocloreto de fluoxetina.

A compreensão das ações tardias e indiretas dessa classe de antidepressivos e ansiolíticos, comumente utilizados continua sendo ainda bem menos completa que a das ações dos antidepressivos tricíclicos. Entretanto existem notáveis aspectos paralelos entre as respostas nos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico. À semelhança dos antidepressivos tricíclicos, que bloqueiam a recaptção de norepinefrina, os inibidores da recaptção de serotonina bloqueiam imediatamente o transporte neuronal da serotonina e, aparentemente de modo indefinido, resultam em complexas respostas secundárias, BALDESSARINI, 2003.

O aumento da disponibilidade sináptica de serotonina estimula grande número de tipos de receptores 5-HT(5-hidroxitriptamina), serotonina, pós-sinápticos. Suspeita-se que a estimulação dos receptores 5-HT₃ possa contribuir para os efeitos adversos comuns característicos dessa classe de fármacos, incluindo efeitos gastrointestinais (náuseas, vômitos) e sexuais (demora ou comprometimento do orgasmo). Além disso, a estimulação dos receptores 5-HT_{2C} pode contribuir para o risco de agitação ou inquietação algumas vezes induzidas por inibidores da recaptção de serotonina.

Os inibidores da recaptção de serotonina bloqueiam imediatamente o transporte neuronal da mesma e, aparentemente de modo indefinido, resultam em complexas respostas secundárias. Muitos outros receptores 5-HT pós-sinápticos presumivelmente permanecem disponíveis para mediar um aumento da transmissão serotoninérgica e

contribuir para os efeitos de elevação do humor e ansiolíticos dessa classe de fármacos, BALDESSARINI, 2003.

Basicamente, o que ocorre na depressão é uma diminuição da quantidade de neurotransmissor disponível na fenda sináptica. Quando se administram antidepressivos que inibem a mono-aminoxidase (inibidores da MAO ou tricíclicos), com diminuição da destruição da serotonina, ou quando é administrado um inibidor seletivo da bomba de recaptação da serotonina (ISRS). Ambos acarretam aumento da quantidade desse neurotransmissor disponível na fenda sináptica, provocando a melhora dos sintomas. O sistema serotoninérgico está, sem dúvida, envolvido na fisiopatologia dos transtornos do humor.

4.5.4 Absorção, distribuição, destino e excreção.

A maioria dos antidepressivos encontra-se disponível na forma oral com fácil absorção. Inicialmente são utilizados em doses fracionadas por terem meia-vida relativamente longa, e faixas de concentrações bastante amplas.

De acordo com BALDESSARINI, 2003, hidrocloreto de fluoxetina é absorvido, sem inconvenientes, por via oral, com pouco efeito de primeira passagem hepática. A magnitude da absorção não é afetada pelos alimentos, embora estes diminuam ligeiramente a velocidade de absorção. O pico de concentração plasmática ocorre entre as 6 e 8 horas posteriores a uma única dose oral e em concentrações que podem variar de 20 a 40mg.

As maiores alterações eletroencefalográficas e as variáveis psicométricas ocorrem entre 8 e 10 horas após a dose. Sua capacidade de união às proteínas plasmáticas é muito importante, aproximadamente 94,5%. Este fato deve ser

considerado devido a possíveis interações medicamentosas. Este medicamento é desmetilado no fígado em norfluoxetina, seu principal metabólito ativo.

Excreta-se pela urina em 80%, dos quais 2,5% como droga-mãe e 10% como norfluoxetina. Com a matéria fecal elimina-se 15%. A norfluoxetina e vários outros metabólitos não identificados são excretados pela urina (65 %) e nas fezes (15 %) por mais de 30 dias. Como o fígado é o principal local de metabolização da fluoxetina, seu comprometimento pode afetar a eliminação da droga. Os portadores de cirrose hepática podem ter uma meia-vida média que pode chegar a 7,6 dias. A eliminação também está retardada, com duração de 12 dias. Portanto, a fluoxetina deve ser usada com cautela em hepatopatas. A Figura 14 apresenta a estrutura química da norfluoxetina.

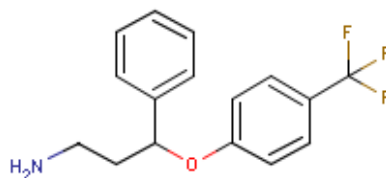


Figura 14 - Estrutura molecular prevista para Norfluoxetina.
(Fonte:Internet-www.scielo.br)

Os metabólitos dos inibidores da recaptação de serotonina, como a norfluoxetina agente N-desmetilados do hidrocloreto de fluoxetina, são eliminados mais lentamente e, alguns deles exibem atividade farmacológica. A norfluoxetina é um inibidor do transporte de serotonina de ação muito longa e, também compete com outros agentes pelas oxidases hepáticas, de modo a elevar as concentrações circulantes de outros agentes, incluindo antidepressivos tricíclicos, vários dias após a interrupção da administração do fármaco original.

A meia-vida é a meia-vida de eliminação (β) aproximada. Os valores de meia-vida, fornecidos entre parênteses são os dos metabólitos ativos, comumente N-desmetilados) que contribuem para a duração global da ação. As concentrações séricas e tempo de meia vida de alguns antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina, A meia-vida no soro da fluoxetina é de 2 a 3 dias, e a da norfluoxetina, 7 a 9 dias. Estes dados podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentrações séricas e tempo de meia vida dos antidepressivos ISRS (inibidores seletivos da recaptação da serotonina)

Fármacos	Meia-vida de eliminação,* h, fármaco original (metabólito)	Concentrações séricas típicas, µg/ml
Inibidores da recaptação da serotonina		
Citalopran	36	0,075-0,150
Fluoxetina	50 (240)	0,100-0,500
Fluvoxemina	15-20	0,100-0,200
Paroxetina	22	0,030-0,100
Sertralina	24 (65)	0,025-0,050
Venlafaxina**	5 (11)	-----

** Agente disponível em formulações de liberação lenta que retardam a absorção, mas não a meia-vida de eliminação.

Fonte: Parte da tabela apresentada, BALDESSARINI, 2003., modificada

A inativação e a eliminação da maioria dos antidepressivos ocorrem durante um período de vários dias. Em geral, os derivados N-desmetilados dos inibidores da recaptação de serotonina apresentam meias-vidas de eliminação de cerca de 2 vezes aquelas dos fármacos originais. Embora a meia-vida de hidrócloridrato de fluoxetina seja de cerca 50 horas e seu subproduto, norfluoxetina, pode levar cerca de 240 horas para ser eliminado. (BALDESSARINI, 2003).

4.5.5 Reações tóxicas e efeitos colaterais.

É comum a ocorrência de efeitos colaterais significativos dos antidepressivos. Os antidepressivos mais modernos, notavelmente os inibidores da recaptação de serotonina, estão associados a um risco muito menor, embora apresentem alto risco de náuseas e vômitos, cefaléia e disfunção sexual, incluindo inibição da ejaculação em homens e comprometimento do orgasmo em mulheres. Alguns inibidores da recaptação de serotonina e talvez o hidrocloridrato de fluoxetina, em particular, têm sido associados à agitação e inquietação, lembrando a acatisia.

A maioria dos antidepressivos e o lítio são secretados no leite materno, cerca 10% da dose administrada é secretada no leite, sendo que sua segurança para lactantes durante a amamentação não está estabelecida nem definida com segurança, , BALDESSARINI, 2003.

4.5.6 Interações com outros fármacos.

De acordo com AZEVEDO (2003), na exposição de duas ou mais substâncias, deve-se considerar a possibilidade de um composto interferir na ação do outro. Portanto, pode haver alterações nos efeitos que produziriam separadamente, podendo apresentar efeitos diversos como: aditivo, sinérgico, potencialização, antagonismo competitivo, antagonismo químico e antagonismo funcional.

A tendência de vários inibidores da recaptação de serotonina competirem com o metabolismo de outros fármacos pode resultar em interações farmacológicas significativas e potencialmente perigosas. Assim, quando se utilizam combinações desses agentes com antidepressivos tricíclicos, como se faz algumas vezes ao tentar obter um efeito terapêutico mais rápido ou controlar pacientes deprimidos resistentes ao

tratamento, as concentrações séricas do tricíclico pode aumentar até níveis tóxicos, que podem persistir por vários dias após a interrupção da fluoxetina, devido a eliminação prolongada da norfluoxetina.

Os inibidores da recaptação de serotonina e praticamente todo agente com atividade que potencializa a serotonina podem interagir perigosamente ou até mesmo de modo fatal com inibidores da MAO (monoamino-oxidase), em particular os inibidores da MAO de ação longa.

Em trabalho realizado por BILA e DEZOTTI (2003), o ácido clofíbrico, maior metabólito de três antilipênicos, foi identificado em água superficial, efluente de ETE, esgoto doméstico na Alemanha, Canadá, Mar do Norte, Suécia e Brasil, em concentrações na faixa de $\mu\text{g/L}$ e ng/L . Em seu trabalho, FENT, 2005 comenta que a associação entre o ácido clofíbrico e a fluoxetina aumenta a resposta de genotoxicidade.

Em trabalho realizado por LEMOS (2005), foi constatada a ação genotóxica do Fármaco Comercial na concentração 5mg/ml , o artigo também relata que em trabalhos de outros pesquisadores, o medicamento elevou o número de células com quebras cromossômicas ao tratar células V79 (*in vitro*), os autores também demonstram que quando ocorre a interação do hidrocloreto de fluoxetina com as vitaminas A e/ou C, ocorre uma diminuição de células com alterações cromossômicas induzidas pelo Fármaco Comercial.

4.6 Métodos analíticos utilizados na determinação do hidrocloreto de fluoxetina.

A detecção e quantificação do hidrocloreto de fluoxetina e norfluoxetina, seu principal metabólito, em matrizes aquosas segue um esquema geral que compreende: pré-filtração, extração, concentração, detecção e quantificação. Pesquisas realizadas por KOLPIN et al. (2002); JONES-LEPP et al. (2001); WESTON et al. (2001), utilizando

como matriz ambiental água superficial, estações de tratamento de esgoto utilizaram diferentes métodos cromatográficos (CLAE -Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; LC-ES/IT/MS - Cromatografia Líquida acoplada a espectrofotometria de massa e elétron spray ; CG/EM – cromatografia gasosa acoplada com espectrofotometria de massa), mostraram-se adequados para a detecção e quantificação do hidrocloridrato de fluoxetina.

Conforme U.S. PHARMACOPEIA (2004), a identificação química das substâncias Hidrocloridrato de Fluoxetina e norfluoxetina pode ser realizada por espectrofotometria, reação visual e cromatografia.

É importante salientar que até o momento não existe um método padrão para estas análises. Sendo assim, a literatura apresenta utilização de vários processos.

4.7 Toxicidade

De acordo com BROOKS, 2002 a exposição ambiental tanto do hidrocloridrato de fluoxetina como norfluoxetina, principal metabólito, tem sido investigada por vários pesquisadores, que detectaram a presença destas substâncias em corpos d'água e efluentes de esgotos municipais (JONES-LEPP et al., 2001). KOLPIN et al. (2002) constataram a presença destes compostos em águas superficiais, e os resultados apresentaram uma concentração máxima 0,012 µg/L. WESTON et al (2001) indicam que a concentração em efluente do hidrocloridrato de fluoxetina pode atingir o valor de 0,540 µg/L, como verificaram em seu trabalho.

De acordo com WESTON et al. (2001) e KOLPIN et al. (2002), a descarga contínua dos fármacos e de produtos de higiene pessoal em corpos d'água acarreta uma exposição que podem induzir efeito crônico aos organismos aquáticos das mesmas substâncias e/ou seus metabólitos. Entretanto a magnitude, frequência e duração da exposição ainda não foram completamente exploradas.

LANGE et al., (2006) utilizaram um biomonitor para avaliar mudanças na atividade do *Gammarus pulex* de uma maneira quantitativa à exposição do Hidrocloridrato de Fluoxetina a concentrações variáveis entre 10-100 ng/L. Os resultados apresentaram uma diminuição significativa na atividade do organismo teste.

As conseqüências potenciais desta atividade diminuída, para o crescimento da população do *G. pulex* e, as comunidades bentônicas, demonstraram os efeitos devidos à exposição às misturas dos fármacos.

Há pouca informação disponível para a exposição da Hidrocloridrato de Fluoxetina e os efeitos em ecossistemas aquáticos (FONG, 2001; WESTON et al., 2003 e RICHARDS et al., 2003). Este é um problema que deve ser investigado e avaliado quanto seu real potencial de contaminação ambiental.

Os efeitos específicos do Hidrocloridrato de Fluoxetina a organismos aquáticos podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9 - Efeitos de toxicidade referente ao hidrocloridrato de fluoxetina em organismos aquáticos.

ORGANISMO	DE ₅₀	CENO	CEO	MATRIZ	REFERÊNCIA
<i>Pseudo Kirchneriella subcapitata</i>	24 µg/L	ND	13,6 µg/L	AAP	USEPA,1989 USEPA,1991.
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	234 µg/L	56 µg/L	112 µg/L	esgoto	USEPA, 1991
<i>Daphnia magna</i>	820 µg/L	NA	NA	esgoto	USEPA, 1991
<i>Pimephales promelas</i>	705 µg/L	NA	NA	esgoto	USEPA, 1991
<i>Hyalella azteca</i>	> 43 mg/Kg	ND	5,4 mg/Kg	Sedimento	FLAHERTY et al, 2001
<i>Chironomus tentans</i>	15,2 mg/Kg	ND	1,3 g/Kg	Sedimento	FLAHERTY et al, 2001

Fonte: (FONG,2001). BROOKS, 2002

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Proposta Metodológica

Neste trabalho foi estudado o potencial de biodegradação do hidrocloreto de fluoxetina na forma comercial e um medicamento genérico, como também do princípio ativo puro.

Como a literatura científica disponível não apresenta dados de biodegradabilidade do composto em estudo, foram realizados ensaios visando à avaliação do potencial de biodegradação do hidrocloreto de fluoxetina como também seu potencial tóxico antes e após o processo.

Os experimentos foram conduzidos em etapas distintas, onde, numa primeira Etapa, Fase I, avaliou-se o consumo do fármaco hidrocloreto de fluoxetina na forma comercial, detendo-se aos fármacos comerciais, similares, mais consumidos através de levantamento nas farmácias e drogarias da cidade de Amparo, durante o período de junho/2006 a junho 2008.

Os dados foram obtidos pela consulta direta aos registros no livro (C1), conforme determina a Portaria nº 344/98 – SVS/MS, de 12 de maio de 1998 (CFF, 1999/2000). Foram consultadas as três farmácias que predominam no comércio local, compreendendo 80% da venda de medicamentos na cidade. O consumo do fármaco

em Farmácias de manipulação, Postos de Saúde e Hospitais da cidade de Amparo-SP, não foi avaliado.

Com os dados obtidos foi estimada a relação dose/habitante, dose diária definida e dose diária/habitante. esgoto $\mu\text{g/L}$, para o período avaliado.

A Etapa 2 compreendeu a avaliação do composto em estudo e testes de biodegradabilidade imediata, sendo dividida em duas fases:

- Fase II - considerações sobre a estrutura do composto e os dados disponíveis em literatura sobre evidências de sua biodegradabilidade, identificando os prováveis compartimentos e a respectiva extensão de sua distribuição, utilizando o modelo QSAR's (U.S.Environmental Protection Agency-USEPA).
- Fase III – teste de biodegradabilidade imediata por ensaio de respirometria baseado no Teste Gledhill-modificado,1988-IBAMA) e, quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As melhores concentrações, do fármaco, a serem utilizadas nos ensaios de respirometria foram determinadas pelo ensaio da Concentração mínima inibitória (MIC).

Paralelamente ao ensaio de respirometria, foi realizado plaqueamento utilizando meio de cultura PCA (Plate count Agar), visando avaliar a qualidade do pré-inóculo, inóculo e o desenvolvimento dos microrganismos presentes durante o período de duração do teste, que não excedeu 28 dias.

A análise quantitativa foi realizada utilizando Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde foi avaliada a percentagem de biodegradação do fármaco comercial durante o período do teste de respirometria, assim como o teor de pureza do princípio ativo e um fármaco genérico.

A análise de Demanda Química de Oxigênio (DQO) foi realizada visando avaliar o processo de biodegradação, considerando-se também a presença dos excipientes (outros componentes da formulação comercial) visto que os mesmos também contribuem como fonte de carbono para os microrganismos.

Os testes de toxicidade aguda, Etapa 3, avaliaram os efeitos agudo do composto a organismos aquáticos e foram conduzidos simultaneamente à avaliação de biodegradação, compreendendo a Fase IV.

5.2 Locais de realização dos experimentos

As etapas da pesquisa proposta foram desenvolvidas na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica no CPQBA/UNICAMP,, Laboratório de Saneamento e Ambiente (Faculdade de Engenharia Civil – Departamento de Saneamento e Ambiente - UNICAMP) e Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- USP (IPEN) onde foram conduzidos os ensaios de toxicidade aguda.

5.3 Fonte

5.3.1 Químicos

O composto do hidrocloreto de fluoxetina **CAS 56296-78-7** adquirido através da Sigma com grau de pureza de maior que 90%, foi utilizado para os ensaios cromatográficos e alguns ensaios toxicológicos. Para condução dos experimentos referentes a biodegradação, ensaio de respirometria e ensaios de toxicidade aguda, o

composto utilizado, na forma comercial, foi adquirido em farmácia local, na cidade de Amparo-SP.

Formulação comercial dados: cápsula de 20mg (cx.c/28 comprimidos). Cada cápsula contém: cloridrato de fluoxetina 22,36mg, equivalente a 20mg de fluoxetina. Excipientes: amido em pó e amido em pó com 5% de silicone q.s.p.(quantidade suficiente para).

Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento do trabalho, grau P.A., foram adquiridos no mercado local.

5.4 Avaliação e estimativa do consumo do fármaco na cidade de Amparo-SP.

Foram avaliadas as receitas dos medicamentos junto aos estabelecimentos comerciais farmacêuticos (farmácias e drogarias), durante o período junho/2006 a junho/2008. Os dados foram obtidos pela consulta direta aos registros no livro (C1), conforme determina a Portaria nº 344/98 – SVS/MS, de 12 de maio de 1998 (CFF, 1999/2000). Com os dados obtidos foi estimada a relação dose/habitante, dose diária definida e dose diária/habitante. Esgoto µg/L, para o período avaliado.

O contato nos estabelecimentos foi realizado com o farmacêutico responsável, sendo ele informado do objetivo do trabalho, qual material estava sendo solicitado, assim como a garantia de sigilo para toda e qualquer informação obtida.

5.5 Avaliação do Hidrocloridrato de Fluoxetina CAS 56296-78-7 - através do modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade Q'SARS.

A avaliação do potencial de biodegradação do hidrocloreto de fluoxetina foi realizada utilizando o programa de modelagem QSAR (ECOSAR) utilizado pela U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Este programa é utilizado por vários pesquisadores em estudos do comportamento de moléculas químicas em matrizes ambientais, como também quando estas são submetidas aos processos convencionais de tratamento de efluentes.

O programa ECOSAR pode ser obtido gratuitamente via website da USEPA (<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episutedl.htm>).

5.6. Determinação da Concentração mínima inibitória (MIC) para seleção das concentrações do Fármaco Comercial, com atividade microbiana (CLSI, 2005)

Inicialmente foi realizada a determinação da Concentração mínima inibitória (MIC) para seleção das concentrações do fármaco comercial, com atividade microbiana (CLSI, 2005), a serem utilizadas no teste de respirometria em sistema fechado.

Este ensaio foi utilizado para definir a maior e menor concentração do material capaz de ser biodegradado pelos microrganismos presentes no inóculo.

5.6.1. Montagem e realização do ensaio

Para a realização do ensaio foi utilizada uma cápsula do fármaco comercial, cápsula cuja formulação corresponde a 20mg do hidrocloreto de fluoxetina + excipientes (solução-estoque), onde o conteúdo da cápsula foi dissolvido em 20ml da solução constituída por água esterilizada e um dispersante, tween 80 (0,1%). Desta forma obteve-se uma solução 1mg/ml.

Em uma microplaca de Elisa, estéril, de 96 poços (12 colunas x 8 linhas) foram transferidos 100µl de meio MS, com o auxílio de uma micropipeta (Eppendorf) de volume variável de 8 canais nas colunas de 01 a 08 e linhas A a H. A Tabela 10 contém dados quantitativos da formulação do meio MS.

Tabela 10 – Composição do meio de cultura MS.

Reagentes	quantidade
Nitrato de sódio (NaNO_3)	3,0g
Fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4)	1,0g
Sulfato de magnésio (MgSO_4)	0,5g
Sulfato ferroso (FeSO_4)	0,01g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Na seqüência foram adicionados 100 µL (equivalente a 100 µg) da solução estoque nos 8 primeiros poços da linha A. O conteúdo dos orifícios foram homogeneizados com o auxílio da micropipeta de multicanal e transferidos da linha A para os orifícios da linha C, repetindo-se este procedimento partindo-se da linha C até a linha H, de modo a obter concentrações decrescente do fármaco. Os 100 µL finais foram desprezados. Volume final nos poços 200µL.

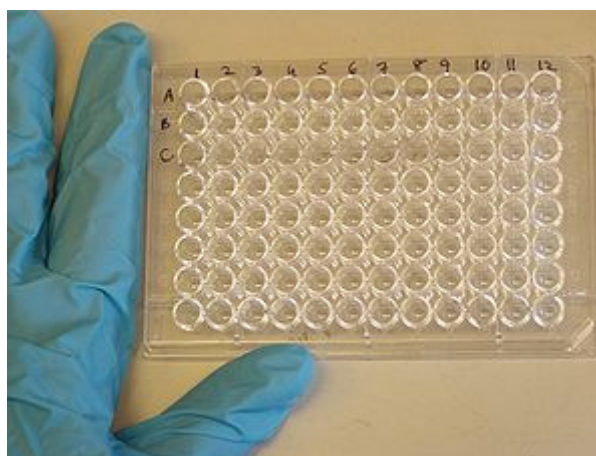


Figura 15 - Foto da Microplaca de Elisa – Utilizada para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A seguir foi adicionado 100 µl do inóculo em cada orifício (A a H; colunas 1 a 8). Desta forma as concentrações obtidas em cada linha, considerando a concentração inicial expressa em µg/100µl.

As concentrações obtidas para cada linha na microplaca podem ser observadas na Tabela 11.

O segundo poço (B) foi preparado, utilizando-se 80µL (80µg), visando obter uma concentração intermediária de 20 µg /100µL (200 µg/mL).

A seguir foram adicionados 100 µL do inóculo em cada orifício (A a H; colunas 1 a 8).

Tabela 11 - Concentrações do Hidrocloridrato de fluoxetina obtidas pelas diluições em série na microplaca, para as diferentes linhas.

Concentrações iniciais (µg/100µL)	Concentração ppm (µg/mL)
Linha A – 25	Linha A – 250
Linha B – 20	Linha B – 200
Linha C – 12	Linha C – 125
Linha D – 6,25	Linha D – 62,5
Linha E – 3,125	Linha E – 31,25
Linha F – 1,562	Linha F – 15,62
Linha G – 0,781	Linha G – 7,81
Linha H – 0,3906	Linha H – 3,91

A coluna 11 foi utilizada para controle de esterilidade do meio de cultura + fármaco e a coluna 12 para o controle do inóculo. As colunas 09 e 10 não foram utilizadas no ensaio.

A placa de Elisa foi incubada por 24h a 37°C em incubadora Fanen 502. Após este período foi adicionado 50µL de uma solução indicadora de atividade metabólica, TTC 0,1% (cloreto de trifenil tetrazolium), seguindo-se reincubação por um período de 3 horas. O revelador (solução TTC 0,1%) permite observar os orifícios onde houve crescimento (biodegradação), pois as células com atividade respiratória coram-se de vermelho. Do mesmo modo, foi possível avaliar as concentrações onde houve inibição do crescimento.

5.6.1.2 Preparação do inóculo

Foi coletado cerca de 1 litro de lodo proveniente da mistura completa do tanque de aeração, de uma estação de tratamento de esgoto (ETE Samambaia, Campinas-SP). A amostra foi levada para o laboratório e mantida sob aerobiose com auxílio de ar comprimido com uma vazão de aproximadamente 4L/min. por um período de 4h, em seguida a amostra foi homogeneizada sob agitação magnética por 3 minutos.

Em seguida o material foi centrifugado a 10.000 G por 20 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada, Incibrás, modelo Spin VI, sendo o sobrenadante desprezado. O “pelet” obtido foi utilizado para a realização dos ensaios de MIC e respirometria.

Para a realização do ensaio de MIC uma pequena alíquota (5ml) do pelet foi lavada com água destilada seguido de centrifugação por 3 vezes para garantir a retirada de compostos que possam estar aderidos aos flocos. Após este processo o pelet foi ressuscitado em 50ml de água destilada, o que constituiu a solução de inóculo a ser utilizada. Esta solução apresenta uma quantidade de células de $2,8 \times 10^6$ UFC/ml, medido através de plaqueamento em meio PCA.

5.7 Teste da biodegradabilidade imediata em sistema fechado, baseado no Teste de Gledhill-modificado, 1988 (IBAMA).

O teste de biodegradabilidade imediata constitui um teste respirométrico (biodegradação), que avalia a habilidade da substância de ser metabolizada por microrganismos, em condições similares às do ambiente. Este ensaio foi baseado no método E1.1.3.- IBAMA, 1998.(Teste de Gledhill-modificado e adaptado)

O hidrocloreto de fluoxetina foi submetido à metabolização por uma cultura mista de microrganismos oriundos de amostras de lodo, provenientes da mistura completa do tanque de aeração da ETE-Samambaia, localizada na cidade de Campinas-SP, em solução nutriente mineral, conforme descrito na Tabela 12, em um frasco fechado, com 2/3 de volume de ar.

O ensaio iniciou-se com a preparação do inóculo (item 5.6.1.2), que foi ressuscitado em volume de solução nutriente, conforme descrito pelo Método E1.1.3.- (IBAMA, 1998), e a determinação das 5 concentrações utilizadas do fármaco, tendo sido baseadas no método da microdiluição (MIC), CLSI, 2005, ficando assim constituído: 200µg/ml; 125µg/ml; 62,5µg/ml; 31,25µg/ml e 15,62µg/ml.

Paralelamente ao ensaio respirométrico realizou-se o acompanhamento do pH e desenvolvimento dos microrganismos envolvidos no processo de biodegradação, através do plaqueamento em meio PCA (Plate count agar).

Toda vidraria foi lavada com uma solução HCl-5N + etanol, na proporção 1:9, com objetivo de livrar a vidraria, a ser utilizada, de traços de carbono orgânico solúvel e materiais tóxicos. Após a lavagem com a solução de limpeza todo material passou por sucessivas lavagens com água destilada para garantir limpeza dos materiais.

Todos os reagentes utilizados foram preparados utilizando balança analítica, SHIMADZIU, mod.AX200, água milliQ, Deionizador MILLIPORE, mod.Simplicity, e

vidraria analítica Pyrex. A solução nutriente foi constituída adicionando-se 1ml de cada solução estoque, preparada por litro de água deionizada. A constituição da solução nutriente é indicada na Tabela 12.

Inicialmente foi preparado 500ml de solução nutriente + 10ml de inóculo, cobertos frouxamente com papel alumínio e pré-incubadas por 24h em agitador orbital, Tecnal, modelo TE420, a 100rpm, com controle de temperatura, mantida 20-25°C, visando a metabolização de substâncias orgânicas, que porventura estivessem adsorvidas aos microrganismos do inóculo.

Tabela 12 – Soluções estoque para preparo da solução nutriente (conforme descrito nos item 4.4 do método E.1.1.3 – IBAMA, 1988)

Soluções estoque (conforme descrito no item 4.4.2)	Solução de fosfato e amônio P.A Solução de Sulfato de magnésio heptahidratado P.A Solução Cloreto de cálcio P.A Solução de Cloreto Férrico P.A Solução de elementos traços
--	--

Após as 24h de pré-incubação das soluções nutrientes inoculadas foi adicionado o fármaco em estudo, para cada concentração a ser trabalhada, sendo devidamente homogeneizados e identificados.

Teste de respirometria em sistema fechado Amostra: Fármaco Comercial - 200µg/m - (AMOSTRA 1) Início: 16/07/2008 Volume total: 500ml
Teste de respirometria em sistema fechado Amostra: Fármaco Comercial - 125µg/ml - (AMOSTRA 2) Início: 16/07/2008 Volume total: 500ml

Teste de respirometria em sistema fechado Amostra: Fármaco Comercial - 62,5µg/ml - (AMOSTRA 3) Início: 16/07/2008 Volume total: 500ml
Teste de respirometria em sistema fechado Amostra: Fármaco Comercial-31,25µg/ml - (AMOSTRA 4) Início: 16/07/2008 Volume total: 500ml
Teste de respirometria em sistema fechado Amostra: Fármaco Comercial-15,62µg/ml - (AMOSTRA 5) Início: 16/07/2008 Volume total: 500ml

Partindo-se dos frascos anteriormente preparados, amostras de 1 a 5, o sistema foi fracionado em 10 frascos 100ml, contendo 50ml de solução pré-incubadas e introduzido, a cada amostra assim preparada, um frasco de Duran, com capacidade 5ml.

A cada frasco de Duran foi adicionado 4ml de solução de hidróxido de bário-0,2N, visando absorver o CO₂ produzido durante a biodegradação (sistema de absorção de CO₂).

Este procedimento foi repetido para todas as concentrações e frascos fracionandos. Desta forma totalizou-se 50 frascos de amostras, que foram avaliados durante o período máximo previsto para o ensaio, 28 dias.

Cada frasco foi devidamente identificado, conforme demonstrado abaixo, e incubado a 100-150rpm, numa câmara a 20-25°C, em agitador orbital, Tecnal, modelo TE420.

Diariamente a solução de hidróxido de bário, contida no frasco de Duran era substituída por uma nova alíquota de 4ml, visando evitar a saturação da mesma com o CO₂ produzido e conseqüente diminuição do valor pH do meio.

Identificação dos frascos do Teste de respirometria.

Teste de respirometria em sistema fechado Amostra: Fármaco Comercial - 200µg/ml Início: 16/07/2008 Volume total: 50ml nº da amostra: (1.1 a 1.10)	Teste de respirometria em sistema fechado Amostra: Fármaco Comercial - 125µg/ml Início: 16/07/2008 Volume total: 50ml nº da amostra: (2.1 a 2.10)
Teste de respirometria em sistema fechado Amostra: Fármaco Comercial - 62,5µg/ml Início: 16/07/2008 Volume total: 50ml nº da amostra: (3.1 a 3.10)	Teste de respirometria em sistema fechado Amostra: Fármaco Comercial - 31,25µg/ml Início: 16/07/2008 Volume total: 50ml nº da amostra: (4.1 a 4.10)
Teste de respirometria em sistema fechado Amostra: Fármaco Comercial - 15,62µg/ml Início: 16/07/2008 Volume total: 50ml nº da amostra: (5.1 a 5.10)	

Durante os 7 primeiros dias do ensaio, foram retiradas amostras, de cada concentração (frascos), `a cada 2 dias e após este período em intervalos de 5-7dias até o final do período do ensaio.

A cada retirada do conjunto de amostras do sistema, foi realizada uma sequência de tratamento que compreendeu os seguintes procedimentos:

- Retirada do sistema absorção de CO₂;
- Aferição do pHmetro, DIGIMED – mod.DM20, solução tampão marca Synth pH=7,0 e pH=4,0;
- Medida e registro do pH da amostra;
- Plaqueamento, em meio PCA; e,
- Filtração em membrana, Millipore, HABGA 04700, HA 0,45µ (47mm); sistema de filtração Millipore .

As amostras filtradas foram transferidas para frascos identificados, resfriadas e congeladas, para posteriormente serem utilizadas nas análises de CLAE, DQO e toxicidade.

5.8 Avaliação dos microrganismos durante os ensaios de respirometria por plaqueamento.

A avaliação dos microrganismos durante os ensaios de respirometria foi realizada através de plaqueamento “pour plate” em placas de Petri em meio de cultivo PCA.

O plaqueamento foi realizado utilizando 1 mL das amostras provenientes do sistema de biodegradação as quais foram submetidas a diluições seriadas e 100µL, destas diluições foram transferidas para placas de Petri contendo cerca de 20 mL de meio PCA. Os plaqueamentos foram feitos em capela de fluxo laminar.

As placas devidamente preparadas e identificadas foram incubadas durante 24hs, 30°C, em estufa bacteriológica, Fanen 502. Passado o período de incubação foi realizada a contagem das colônias nas placas e estas expressas em Unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

5.9 Avaliação da capacidade de remoção da hidrocloridrato de fluoxetina, através de análise quantitativa – cromatografia (CLAE/EM).

O método de análise utilizado para a quantificação do hidrocloridrato de fluoxetina foi baseado no procedimento HPLC/UV -USP, Ed.29, p.940, 2006.

Solução padrão: Realizou-se o preparo de solução estoque 200 µg/mL, a partir do hidrocloreto de fluoxetina **CAS 56296-78-7** adquirido através da Sigma com grau de pureza de >90%. A partir da solução estoque foram preparados padrões nas concentrações 2; 4; 20; 50; 80; 100 e 200 µg/mL, as quais foram utilizadas no preparo da reta.

As amostras provenientes do ensaio de respirometria foram submetidas a análise em sistema cromatográfico LC-DAD Alliance Waters, composto por bomba Waters 2695; Detector Waters 2996 e software Empower; Coluna: NovaPak C-8 (150 x 3,9 mm, 4 µm); Fase movel: Acetonitrila/Trietilamina 0,07M (pH = 6, com H₃PO₄) = (35:65); Temperatura: 30°C; Fluxo: 0,8 mL/min; Detecção: $\lambda_{\text{leitura}} = 230 \text{ nm}$ (varredura=200 a 400nm); Volume de injeção: 20µL.

Todas as vidrarias utilizadas durante os experimentos cromatográficos, foram lavadas com solvente de grau HPLC antes da utilização.

5.10 Avaliação da concentração de compostos de carbono através de análise quantitativa DQO (Demanda Química de Oxigênio)

As avaliações da DQO realizadas nas amostras provenientes dos ensaios respirométricos foram executadas segundo o método do fabricante (HACH), n.2710 adaptado da AWWA, 2007- Ed.21, Método 5220D.

Condições da análise quantitativa DQO: Espectrofotômetro HACH – modelo DR4000; Digestor HACH – Kit HACH concentração 0-150 ppm; detecção $\lambda_{\text{leitura}} = 420 \text{ nm}$. DRB-20; Reagentes: Cat. 21258-25.

5.11 Testes de toxicidade

Fase IV – Nesta última etapa, foram realizados os ensaios de toxicidade aguda utilizando duas classes de organismos teste.

Os ensaios de toxicidade realizados neste trabalho, organismos teste e respectivas metodologias são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Ensaios de toxicidade utilizando o Hidrocloridrato de Fluoxetina.

Toxicidade	Organismo-teste	Tempo de exposição	Atividade	Medida Final	Método
Aguda	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	24/48 h	Imobilidade e mortalidade	CE50	NBR 13373, ABNT, 2006
Aguda	<i>Vibrio Fischeri</i>	15 min	bioluminescência	CE50	NBR 15411-2 ABNT, 2006

CE50-Concentração efetiva do efeito observado em 50% dos organismos teste

5.11.1 Ensaio de toxicidade aguda do Hidrocloridrato de Fluoxetina utilizando a *Ceriodaphnia dubia*: método NBR 13373 (ABNT, 2006).

Para realização do ensaio de toxicidade aguda, foi utilizada a *Ceriodaphnia dubia*. O método utilizado para a realização dos testes esta descrito na Tabela 14.

Tabela 14 - Condições teste – Toxicidade aguda *Ceriodaphnia dubia*.

Condições-teste	<i>Ceriodaphnia dubia</i>
Sistema de teste	Estático
Duração	24/48 horas
Temperatura	25 ± 1 ⁰ C
Intensidade luminosa	500 a 1000 lux
Fotoperíodo	16 h luz
Tamanho do frasco-teste	Frascos 50 ml
Volume da solução-teste	20 ml
Renovação da solução-teste	Não
Idade dos organismos	≤ 24 horas
Nº de organismos/réplica	01
Nº réplicas/concentração	10
Alimentação durante o teste	Sim
Água de cultivo	Natural reconstituída com dureza ajustada para 42-46 mg CaCO ₃ /L. Conforme descrito ABNT, 2006.
Critério de avaliação de efeito	Sobrevivência
Expressão dos resultados	Quantitativo: CE50 Qualitativo: efeito tóxico ou não tóxico
Critério de aceitação do teste	> 80% de sobrevivência

Fonte: ABNT, 2006.

A Figura 16 apresenta uma foto do organismo teste utilizado nos experimentos.



Figura 16 - Foto da *Ceriodaphnia dubia* – organismo-teste empregado na avaliação de efeito da droga a organismos aquáticos.

Inicialmente foram realizados ensaios preliminares visando avaliar a toxicidade do fármaco, estes testes compreendem os ensaios 01 e 02 descritos a seguir.

ENSAIO 01 - As soluções do fármaco foram preparadas dissolvendo-se uma quantidade conhecida do composto em um volume de água milliQ, respeitando a constante de solubilidade da Hidrocloridrato de Fluoxetina ($C_s=5$ mg/mL). Para a realização dos ensaios foi utilizado o fármaco na forma comercial contendo 20 mg do princípio ativo/cápsula. O procedimento para o preparo da “solução 01” assim como as diluições efetuadas seguiram as seguintes etapas:

- a) Abertura de 2 cápsulas (20 mg cada) do fármaco analisado procedendo-se a diluição em 200 mL de água milliQ, desta forma obteve-se uma solução 200mg/L, sendo esta designada como “solução 01”;
- b) Partindo-se da “solução 01” procedeu-se a diluição visando obter soluções nas concentrações: 100, 50 e 25 mg/L. Para este procedimento foram utilizadas micropipetas de volume variável (Eppendorf)
- 200 mg/L – 10 mL solução 01 (solução 01.1)
- 100 mg/L – 5 mL solução 01 + 5 mL de água de diluição (solução 01.2)
- 50 mg/L - 2,5 mL solução 01 + 7,5 mL de água de diluição (solução 01.3)
- 25 mg/L - 1,25 mL solução 01 + 8,75 mL de água de diluição (solução 01.4)

ENSAIO 02 - Realizou-se um teste de toxicidade, utilizando-se uma amostra proveniente do sistema de respirometria (21/07/08), que apresentou concentração 204,25 µg/mL, conforme a análise de cromatografia (CLAE). A referida amostra recebeu a denominação de “solução 02”

O experimento foi conduzido adicionando-se 10 mL da amostra (“solução 02”) e 6 organismos-teste. O mesmo procedimento foi repetido, utilizando-se a amostra diluída em 50%, apresentando uma concentração aproximada de 102,12 µg/mL (solução 02.1).

Após a avaliação dos resultados apresentados nos ensaios preliminares, e consulta na literatura científica, procedeu-se o preparo de uma série de diluições visando à obtenção de concentrações adequadas para realização dos ensaios posteriores.

Foram realizados 3 ensaios posteriores, partindo-se de uma solução-inicial, conforme demonstrado abaixo:

ENSAIO 03 – Amostra proveniente da solução 1

ENSAIO 04 – Amostra proveniente do sistema de respirometria 16/07/2008.

ENSAIO 05 – Amostra proveniente do sistema de respirometria 05/08/2008.

Partindo-se da “solução-inicial”, dos ensaios 03,04 e 05, procedeu-se a diluição visando-se obter uma solução que apresentasse concentração adequada para realização dos ensaios, de acordo com a prévia avaliação dos resultados e literatura científica.

Este procedimento foi realizado tomando-se uma alíquota de 2 mL da “solução-inicial” de cada ensaio (03, 04 e 05) e completado com água de cultivo para um volume final de 200 mL de solução. Desta forma foram obtidas as soluções 03, 04 e 05, respectivamente.

ENSAIO 03 Partindo-se da “solução 03” procedeu-se a diluição visando-se obter soluções nas concentrações: 1,0, 0,5 e 0,25 mg/L, utilizando-se micropipetas (Eppendorf) de volume variável conforme demonstrado abaixo:

- [1 mg/L] – 1mL da solução 03 + volume suficiente de água de cultivo para 200mL solução (Solução 03.1)
- [0,5 mg/L] – 0,5mL solução 03 + volume suficiente de água de cultivo para 200mL solução (Solução 03.2)
- [0,25 mg/L] – 1mL solução 03 + volume suficiente de água de cultivo para 200mL solução (Solução 03.3)

As diluições referentes aos ensaios 04 e 05, seguiram o mesmo procedimento realizado para o ensaio 03.

As soluções 03, 04 e 05, e suas respectivas diluições, foram utilizadas para a realização dos ensaios 03, 04 e 05, respectivamente, assim como uma solução controle, constituída apenas por água de cultivo. Os organismos testes utilizados nos ensaios foram, cuidadosamente, adicionados às soluções anteriormente preparadas, assim como a uma solução controle.

A Figura 17 apresenta foto do ensaio de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia dubia*.



Figura 17 – Foto de montagem do ensaio de toxicidade aguda.

5.11.2 Ensaio de toxicidade aguda com a bactéria marinha *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox). Método: 15411-2 (ABNT, 2006a).

O método consiste na inibição da luminescência da bactéria marinha *Vibrio fischeri* causada pela exposição a diferentes concentrações do agente tóxico, por um período de 15 e 30 min de exposição ou, opcionalmente, 5 min, a 15°C, nas condições prescritas no método NBR 15411-2, (Parte II – Utilizando bactérias desidratadas), ABNT, 2006a. A Figura 18 apresenta a foto do organismo teste utilizado no ensaio.

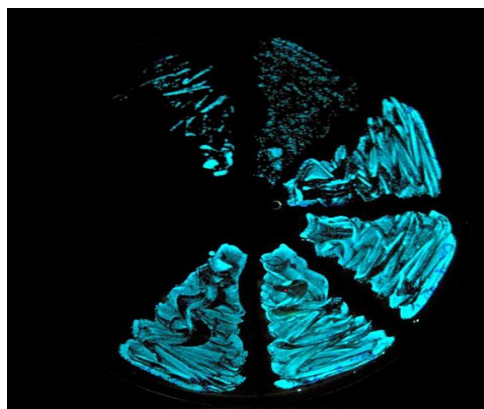


Figura 18 – Foto de *Vibrio fischeri* em placa de petri visualizada em luz Ultra Violeta.

O equipamento utilizado para ensaios com *V.fischeri*, foto na Figura 19, é um fotômetro específico onde podem ser posicionadas até 30 cubetas de vidro. Este equipamento é composto de um espaço especial para o estoque do reagente (bactéria hidratada, 4°C; e um poço para a leitura do sinal (luminescência bacteriana).



Figura 19 - Analisador de Toxicidade por fotoluminescência bacteriana - Modelo M 500 Microbics.

As soluções do fármaco foram preparadas dissolvendo uma quantidade conhecida do composto em 80% de um volume especificado de água milliQ . Não foram utilizados nestes ensaios, solventes para a preparação das substâncias teste respeitando a constante de solubilidade da hidrocloridrato de fluoxetina ($C_s=5 \text{ mg/mL}$). Estas soluções foram utilizadas para a realização dos ensaios, simplesmente misturando os volumes necessários aos organismos testes utilizados.

Para a realização destes testes preliminares foram utilizados os fármacos na forma comercial e um genérico contendo 20 mg do princípio ativo/cápsula, ensaio 01, 02 e 03.

As soluções do fármaco foram preparadas dissolvendo uma quantidade conhecida do composto, $200 \mu\text{g/mL}$ (mg/L), solução-estoque, e procedendo as diluições conforme NBR 15411-2, ABNT, 2006a.

Posteriormente o teste foi realizado utilizando as amostras geradas pelo sistema de respirometria, As soluções foram preparadas dissolvendo uma quantidade conhecida do composto, conforme resultados obtidos nas análises de CLAE e amostra do hidrocloridrato de fluoxetina, com grau de pureza $>90\%$, na concentração inicial 200

µg/mL, solução-estoque, e procedendo as diluições conforme NBR 15411-2, ABNT, 2006a. Esses testes correspondem aos ensaios 04 a 08.

5.12 Descarte do material utilizado durante a realização da pesquisa

Todas as soluções e outros materiais gerados durante este experimento foram descartados conforme procedimentos específicos para cada situação ou classe de composto gerado.

A seguir são descritos os métodos utilizados para o descarte do material:

5.12.1 Material biológico

Todo o material biológico gerado nos ensaios de respirometria, ensaios de Determinação da Concentração mínima inibitória (MIC), contagem em placas foram submetidos a processo de esterilização em autoclave (120 °C, 15 min.) e posteriormente separados e acondicionados em lixo comum. Vidraria e outros utensílios de laboratório foram lavados com detergente e água.

Ensaio de toxicidade Para realização do ensaio de toxicidade aguda, *Ceriodaphnia dubia*, foi utilizado copinhos descartáveis os quais são pré-lavados com água destilada antes do ensaio. Posteriormente as soluções-teste foram segregadas em frascos específicos e os copos descartáveis seguem para o descarte de resíduo de laboratório. Cubas e vidraria de soluções estoque seguem procedimento da ABNT específica para cada ensaio.

Para realização do ensaio de toxicidade aguda, *Vibrio fischeri*, as cubetas do “microtox” são esterilizadas em autoclave e descartadas.

5.12.2 Material químico

Todo o material químico (soluções e reagentes), utilizado nos experimentos de cromatografia, DQO, foram segregados e acondicionados em frascos de vidro e encaminhados para o depósito de descarte de resíduos químicos do CPQBA. A destinação final destes resíduos segue procedimentos específicos para cada classe de composto químico gerado.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Dados sobre o local de estudo

- **A cidade de Amparo-SP**

Prefeito 2009/12: **Paulo Miotta** - PT

Estimativa Populacional **IBGE-2008**: 65.466 hab. (*)
(*) População Estimada

Prefeito 2005/08: **Cesar Jose Bonjuani Pagan** - PT

Área da unidade territorial: 446 km²

Latitude do distrito sede do município: 22,70111 °

Longitude do distrito sede do município: 46,76444 °

Altitude: 674 m

Estimativa Populacional **IBGE-2007**: 62.852 hab. (*)
(*) População Estimada

Estimativa Populacional **IBGE-2006**: 67.505 hab.

Estimativa Populacional **IBGE-2005**: 66.423 hab.

Estimativa Populacional **IBGE-2004**: 65.333 hab.

- **Resultados do Universo do Censo 2000:** População residente - Total: 60.404

Conforme resultados apresentados pelo Universo do Censo 2000, www.nossosaopaulo.com.br/Reg_10/Reg10_Amparo.htm. A cidade em questão apresenta uma população residente de 60.404 habitantes, sendo que a população que apresenta 10 anos ou mais de idade compreende 51.063 habitantes e somente 43.357 habitantes residem na zona urbana,

6.2. Avaliação do consumo do hidrocloridrato de fluoxetina na cidade de Amparo/SP.

Os dados foram obtidos através dos livros C1, Portaria 344/98 - SVS/ MS, que se refere ao controle das substâncias psicotrópicas, em farmácias na cidade de Amparo, estado de São Paulo, Brasil.

O município foi avaliado durante o período de Junho/2006 à Junho/2008, os valores obtidos foram expressos em mg do fármaco consumido a cada mês (Figura 20), Tabelas 15, 16; a relação dose/habitantes/mês, Tabelas 17, 18; Dose Diária Definida (DDD) habitantes/dia, Tabelas 18 e 19; e, Tabelas 20 e 21 a estimativa da dose. diária/habitante.esgoto.µg/L, considerando o consumo de 100 Litros de água/dia/habitante, para a especialidade farmacêutica Hidrocloridrato de Fluoxetina, considerando as formas farmacêuticas similares mais prescritas e consumidas.

Em relação ao local avaliado, o problema é agravado visto que inexistente uma Estação de Tratamento de Esgotos e o curso do rio atravessa vários municípios próximos, conforme pode ser observado no mapa, Figura 20. Outro aspecto importante, diz respeito à água enviada para a Estação de Tratamento de Água, que é captada do mesmo corpo receptor em questão, em observação feita pela Agência Nacional das Águas (ANA), documento n.1664/2006, Anexo I, ficha n.15, pg.33 e 34, Relatório de vistoria aos usuários da bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí 12 a 16 de

dezembro de/2005: “O esgoto sanitário é coletado e lançado em mais de 100 pontos difusos *in natura*”, o relatório completo pode ser consultado www.ana.gov.br/gestaoecondricos/cobrancauso/baciaPCJ.asp. Atualmente a cidade encontra-se em processo de implantação da estação de tratamento de esgotos, com entrega prevista para 2008.

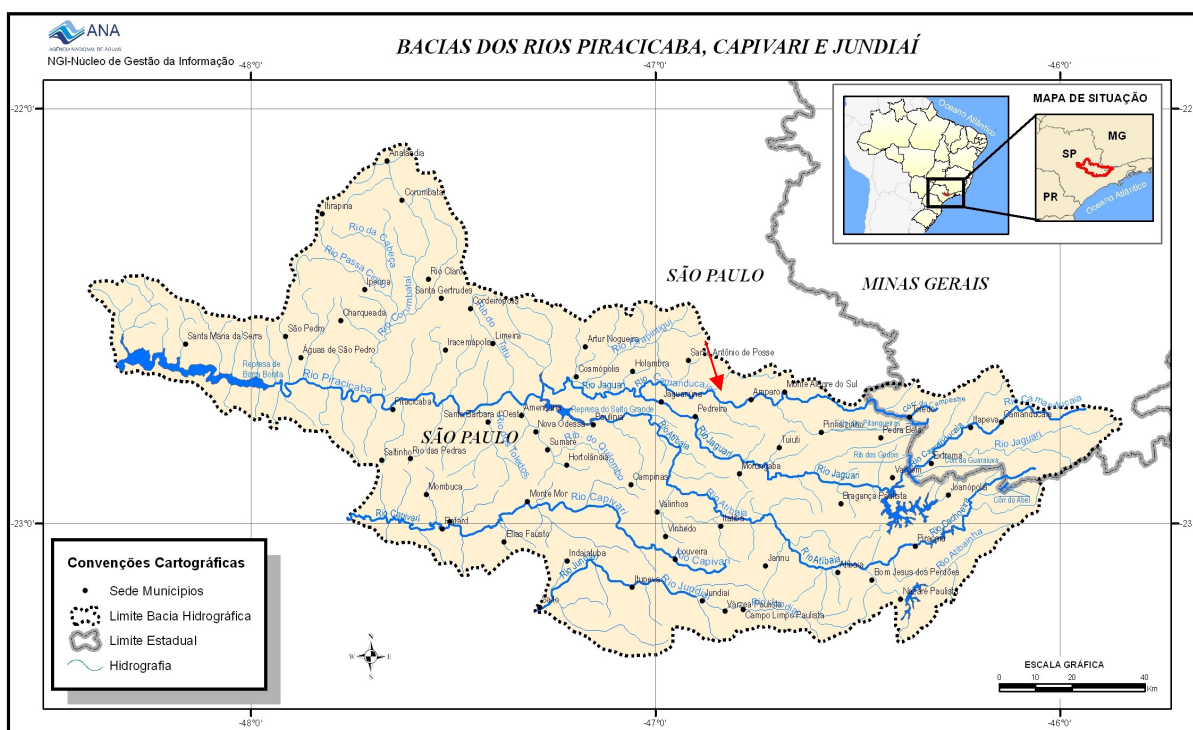


Figura 20 – Bacias dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá. A seta indica a área de estudo.

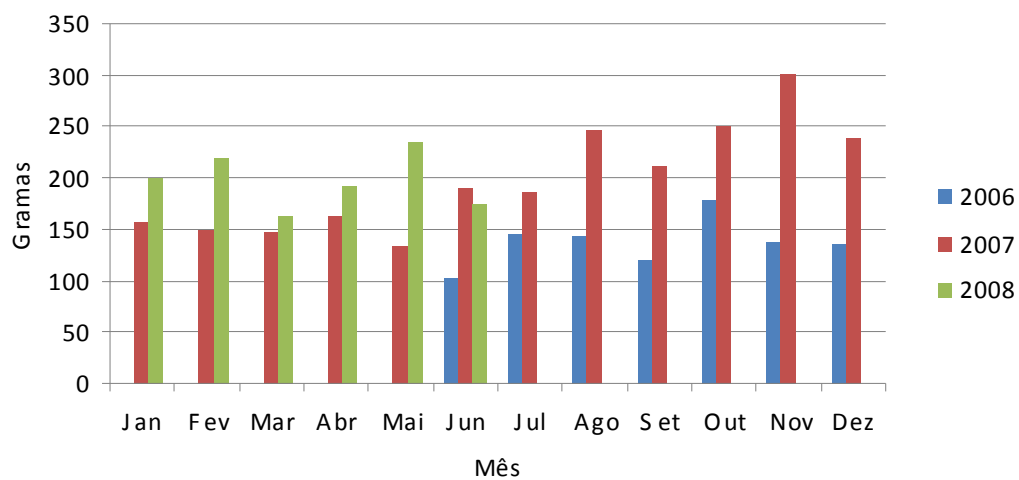


Figura 21 – Avaliação do consumo do hidrocloridrato de fluoxetina durante o período junho/2006 à junho 2008.

Tabela 15 - Valores expressos em mg das formas farmacêuticas mais prescritas e consumidos mensalmente, durante o período avaliado (Junho/06 à Maio/07).

FORMAS FARMACÊUTICAS	DADOS EXPRESSOS em mg (mês/ano)											
	06/06	07/06	08/06	09/06	10/06	11/06	12/06	01/07	02/07	03/07	04/07	05/07
Daforin 10 mg (cx.c/20 comp)	4200	3000	3400	2800	2800	5200	2200	5200	2800	3000	3000	2800
Daforin 20 mg (cx.c/20 comp)	29200	24400	34000	23600	42800	36000	31200	36000	34000	29200	42800	36000
Daforin 20 mg (cx.c/30 comp)	13200	33600	31200	36000	54000	26400	31200	33600	31200	31200	54000	26400
Fluoxene 10 mg (cx.c/28 comp)	840	1120	840	1120	840	1120	1400	1120	1400	1400	1120	1400
Fluoxene 20 mg (cx.c/14 comp)	4200	6440	7000	5600	4480	2240	1960	6440	5600	7000	6440	7000
Fluoxene 20 mg (cx.c/28 comp)	1120	2800	1680	5600	6720	1120	1120	5600	2800	2800	1120	5600
Fluox 20 mg(cx.c/28 comp).	47040	68320	59920	42560	62160	61040	60480	62160	68320	67200	48160	49280
Prozac 20 mg (cx.c/14 comp)	560	840	840	560	840	560	840	1600	840	2000	1200	800
Prozac 20 mg (cx.c/28 comp)	2400	4000	3200	2400	4000	3200	4000	4000	2400	3200	4000	3200
Prozac 90 mg(cx.c/04 comp).	1080	1080	1140	1140	1080	1140	1140	1140	1080	1080	1140	1140
TOTAL	103840	145600	143220	121380	179720	138020	135540	156860	150440	148080	162980	133620

Fonte. Farmácias e drogarias da cidade Amparo-SP, durante período Junho/06 à Maio 2007, conforme dados obtidos Livros de controle C1- Portaria 344/98 Ministério da Saúde..

Tabela 16 - Valores expressos em mg das formas farmacêuticas mais prescritas e consumidos mensalmente, durante o período Avaliado (Junho/07 à Junho/08).

FORMAS FARMACÊUTICAS	DADOS EXPRESSOS em mg (mês/ano)												
	06/07	07/07	08/07	09/07	10/07	11/07	12/07	01/08	02/08	03/08	04/08	05/08	06/08
Daforin 10 mg (cx.c/20 comp)	2286	3428	2572	2857	3143	4286	3714	3714	3428	2857	2572	4000	2857
Daforin 20 mg (cx.c/20 comp)	20000	12571	27605	26857	26857	42857	29715	29143	26857	20000	18857	30286	21714
Daforin 20 mg (cx.c/30 comp)	53143	50571	66000	52285	53143	63429	46286	42857	61714	35143	36000	49714	36857
Fluoxene 10 mg (cx.c/28 comp)	2000	2800	2400	2000	2400	1600	3600	2400	2800	2000	1600	2400	2000
Fluoxene 20 mg (cx.c/14 comp)	2800	2400	3200	3600	2400	3200	3600	2000	2800	2400	3600	3200	4800
Fluoxene 20 mg (cx.c/28 comp)	35200	33600	44800	51200	38400	34400	28800	28000	33600	32800	36000	29600	28000
Fluox 20 mg(cx.c/28 comp).	69600	76000	95200	67200	117600	145600	118400	86400	83200	62400	88000	108800	74400
Prozac 20 mg (cx.c/14 comp)	1200	800	1600	1200	2000	1200	1600	2000	1200	800	1600	2000	1200
Prozac 20 mg (cx.c/28 comp)	4000	3200	2400	4000	3200	4000	2400	2400	3200	3200	4000	4000	2400
Prozac 90 mg(cx.c/04 comp).	1140	1080	1080	1140	1080	1140	1080	1140	1080	1140	1140	1140	1080
TOTAL	191369	186450	246857	212339	250223	301712	239195	200054	219879	162740	193369	235140	175308

Fonte. Farmácias e drogarias da cidade Amparo-SP, durante período Junho 2007 à Junho 2008, conforme dados obtidos Livros de controle C1- Portaria 344/98 Ministério da Saúde..

Com os valores obtidos nas tabelas 15 e 16 foi possível estimar a relação dose/habitante/mês para o período avaliado. Foram considerados, para efeito dos cálculos, apenas os habitantes com 10 anos ou mais e moradores da zona urbana do município de Amparo-SP, correspondente a 43.357 habitantes, conforme dados obtidos Censo 2000. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 17 e 18.

Tabela 17 - Relação dose hidrocloridrato de fluoxetina/habitante/mês para o período avaliado (Junho/06 à Maio/07).

HIDROCLORIDRATO DE FLUOXETINA	RELAÇÃO DOSE /HABITANTE/MÊS (mg/hab)											
	06/06	07/06	08/06	09/06	10/06	11/06	12/06	01/07	02/07	03/07	04/07	05/07
	2,39	3,36	3,30	2,80	4,14	3,18	3,13	3,62	3,47	3,41	3,76	3,08

Fonte. Farmácias e drogarias da cidade Amparo-SP, durante período Junho 2006 à Maio 2007, conforme dados obtidos Livros de controle C1- Portaria 344/98 Ministério da Saúde..

Tabela 18 - Relação dose hidrocloridrato de fluoxetina /habitante/mês para o período avaliado (Junho/07 à Junho/08).

HIDROCLORIDRATO DE FLUOXETINA	RELAÇÃO DOSE /HABITANTE/MÊS (mg/hab)												
	06/07	07/07	08/07	09/07	10/07	11/07	12/07	01/08	02/08	03/08	04/08	05/08	06/08
	4,41	4,30	5,69	4,90	5,77	6,96	5,52	4,61	5,07	3,75	4,46	5,42	3,86

Fonte. Farmácias e drogarias da cidade Amparo-SP, durante período Junho 2007 à Junho 2008, conforme dados obtidos Livros de controle C1- Portaria 344/98 Ministério da Saúde..

Através dos dados obtidos nas Tabelas 17 e 18, foi possível estimar a relação dose diária definida, considerando o número de dias de cada mês, obtendo-se uma relação media de **0,13 mg/dia/habitante/mês**.

Tabela 19 - Relação dose hidrocloreto de fluoxetina diária definida para o período avaliado (Junho/06 à Maio/07).

HIDROCLORIDRATO DE FLUOXETINA	RELAÇÃO DDD (Dose Diária Definida) – mg/habitante											
	06/06	07/06	08/06	09/06	10/06	11/06	12/06	01/07	02/07	03/07	04/07	05/07
	0,08	0,11	0,11	0,09	0,13	0,10	0,10	0,12	0,12	0,11	0,12	0,10

Fonte. Farmácias e drogarias da cidade Amparo-SP, durante período Junho 2006 à Maio 2007, conforme dados obtidos Livros de controle C1- Portaria 344/98 Ministério da Saúde..

Tabela 20 - Relação dose hidrocloreto de fluoxetina diária definida para o período avaliado (Junho/07 à Junho/08).

HIDROCLORIDRATO DE FLUOXETINA	RELAÇÃO DDD (Dose Diária Definida) – mg/habitante												
	06/07	07/07	08/07	09/07	10/07	11/07	12/07	01/08	02/08	03/08	04/08	05/08	06/08
	0,15	0,14	0,18	0,16	0,19	0,23	0,18	0,15	0,17	0,12	0,15	0,17	0,13

Fonte. Farmácias e drogarias da cidade Amparo-SP, durante período Junho 2007 à Junho 2008, conforme dados obtidos Livros de controle C1- Portaria 344/98 Ministério da Saúde..

Analisando os dados das Tabelas 19 e 20 pode-se observar que na Tabela 19 a média da relação dose diária definida para o período foi em torno de **0,10 mg/hab**, e que no período seguinte analisado (Tabela 20) esta relação apresentou um acréscimo com média de **0,60 mg/hab**. Isto corresponde a um aumento do consumo do fármaco de 60%.

Considerando-se que 50-90% da dose ingerida é eliminada inalterada MULROY (2001), pode-se estimar a concentração do fármaco que estaria presente no corpo receptor, considerando-se um consumo de 100 litros de água/dia/habitante e, assim prever um provável efeito tóxico. As Tabelas 21 e 22 apresentam a estimativa dose diária/habitante.esgoto.µg/L, considerando o consumo de 100 Litros de água/dia/ habitante , para o período avaliado. (Junho/06 à Junho/08).

Tabela 21 - Estimativa dose diária/habitante µg/L esgoto, considerando o consumo de 100 Litros de água/dia/ habitante , para o período avaliado. (Junho/06 à Maio/07). Considerando a faixa variável 50-90%.

HIDROCLORIDRATO DE FLUOXETINA	RELAÇÃO dose diária/habitante µg/L esgoto											
	06/06	07/06	08/06	09/06	10/06	11/06	12/06	01/07	02/07	03/07	04/07	05/07
	0,40-0,72	0,55-0,99	0,55-0,99	0,45-0,81	0,65-1,17	0,50-0,90	0,50-0,90	0,60-1,08	0,60-1,08	0,55-0,99	0,60-1,08	0,50-0,90

Fonte. Farmácias e drogarias da cidade Amparo-SP, durante período Junho 2006 à Maio 2007, conforme dados obtidos Livros de controle C1 - Portaria 344/98 Ministério da Saúde..

Tabela 22 - Estimativa dose diária/habitante µg/L esgoto, considerando o consumo de 100 Litros de água/dia/ habitante , para o período avaliado (Junho/07 à Junho/08). Considerando a faixa variável 50-90%.

HIDROCLORIDRATO DE FLUOXETINA	RELAÇÃO dose diária/habitante µg/L esgoto												
	06/07	07/07	08/07	09/07	10/07	11/07	12/07	01/08	02/07\8	03/08	04/08	05/08	06/08
	0,50-0,90	0,70-1,26	0,90-1,62	0,80-1,44	0,95-1,71	1,15-2,07	0,90-1,62	0,75-1,35	0,85-1,53	0,60-1,08	0,75-1,35	0,85-1,53	0,65-1,17

Fonte. Farmácias e drogarias da cidade Amparo-SP, durante período Junho 2007 à Junho 2008, conforme dados obtidos Livros de controle C1 - Portaria 344/98 Ministério da Saúde..

Os dados apresentados nas Tabelas 21 e 22 demonstram uma faixa média 0,67-1,17 µg/L esgoto em relação à dose diária/habitante, que seria lançada no corpo receptor, considerando-se os 25 meses avaliados

Conforme dados apresentados pelo modelo Q'SAR (item 6.3 abaixo) e teste de respirometria (item 6.4) o fármaco é parcialmente biodegradado, apresentando um percentual aproximado de 27 a 32%..

Os dados sugerem que na faixa de concentração média 0,67-1,17 µg/L de esgoto poderá ocorrer um possível efeito tóxico aos organismos aquáticos, pois permaneceria no corpo receptor diariamente uma concentração média aproximada variando entre 0,45-0,85 µg/L esgoto (dose diária/habitante).

É importante ressaltar que os valores estimados neste trabalho foram baseados em apenas sete formulações farmacêuticas, indicando que os mesmos podem ser muito superiores ao apresentado, visto que são encontrados em torno de 65 fármacos que utilizam como princípio ativo o hidrocloreto de fluoxetina, www.consultaremedios.com.br visitado em 22/10/2008.

Além das várias formas farmacêuticas existentes, não foram considerados neste estudo os fármacos provenientes de postos de saúde, hospitais e farmácias de manipulação, os produtos fora do prazo de validade que são descartados indevidamente no lixo doméstico, produtos de uso veterinário, nem tão pouco o volume que é dispensado sem o devido registro nos livros de psicotrópicos.

Um outro agravante são os fármacos falsificados, contrabandeados, e comercializado em farmácias "virtuais" as quais vendem medicamentos controlados sem que haja fiscalização, conforme constatação que pode ser feita acessando o endereço www.farmaciaviverbememcasa.com.br visitado em 19/10/2008. No referido site é possível adquirir os medicamentos, sem qualquer prescrição ou controle, e recebê-los em casa via sedex.

O problema do consumo de medicamentos é tão sério e preocupante que a ANVISA alerta os consumidores para a venda de medicamentos pelo internet pelo site www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2003/240403_1.htm visitado em 18/10/2008.

6.3 Avaliação do potencial de biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina utilizando o modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade (QSAR'S).

O potencial de biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina foi avaliado pelo programa de modelagem Q-SARS utilizado pela U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), visto que a literatura científica consultada não apresenta dados sobre aspectos de biodegradação, bioacumulação e comportamento em estações de tratamento de efluentes. Este programa tem sido extensivamente utilizado e validado por diversos pesquisadores em seus trabalhos (MOORE et al., 2003; SANDERSON et al., 2004; TERNES 2004).

Segundo os dados obtidos pelo programa o coeficiente de partição octanol/água desta molécula é $Kow = 4,65$. O fator de bioacumulação calculado é de $FBC = 262,1$. Isto indica que o hidrocloridrato de fluoxetina apresenta um potencial altamente acumulativo. NENDZA, (1991) Apud: ZAGATTO (2006) descreve que estas duas variáveis, Kow e FBC , são fundamentais para a determinação do potencial de bioacumulação de uma molécula, onde assume-se que, compostos com valores de $Kow < 3,0$ ($FBC < 100$) não apresentam bioconcentração substancial, já os que possuem Kow entre 3 e 6 ($FBC > 100$) são classificados como altamente acumulativos.

O comportamento deste fármaco em estações de tratamento de efluentes apresenta uma remoção total de 32,4% sendo desta, 32% aderido ao lodo e 0,4% é biodegradável pelo lodo ativado. A maior parcela 67,6% encontra-se solúvel no efluente tratado o qual é despejado a jusante da estação de tratamento.

O modelo de fugacidade previsto pelo programa aponta que cerca de 11% desta molécula pode ser encontrada dispersa na água e 84% no solo com uma meia-vida de 2 meses.

Os efeitos toxicológicos apontados pelo programa mostram que o hidrocloreto de fluoxetina apresenta uma toxicidade crônica para peixes e algas verdes com um CE50 de 1 a 2 mg/L. Ensaios realizados com *Daphnia* mostram uma toxicidade de CE50 0,18 mg/L.

6.4 Avaliação da biodegradação do Hidrocloreto de fluoxetina, por respirometria e quantificação por cromatografia líquida (CLAE), Demanda Química de Oxigênio (DQO), acompanhamento pH e plaqueamento em meio PCA.

6.4.1 Determinação da Concentração mínima inibitória (MIC) para seleção das concentrações do Fármaco Comercial, com atividade microbiana (CLSI, 2005).

Os resultados obtidos pelo ensaio mostraram que concentrações maiores ou iguais 250 e inferiores a 15,62 µg/mL não apresentaram crescimento bacteriano satisfatório. Os resultados de MIC podem ser observados nas Figuras 22.

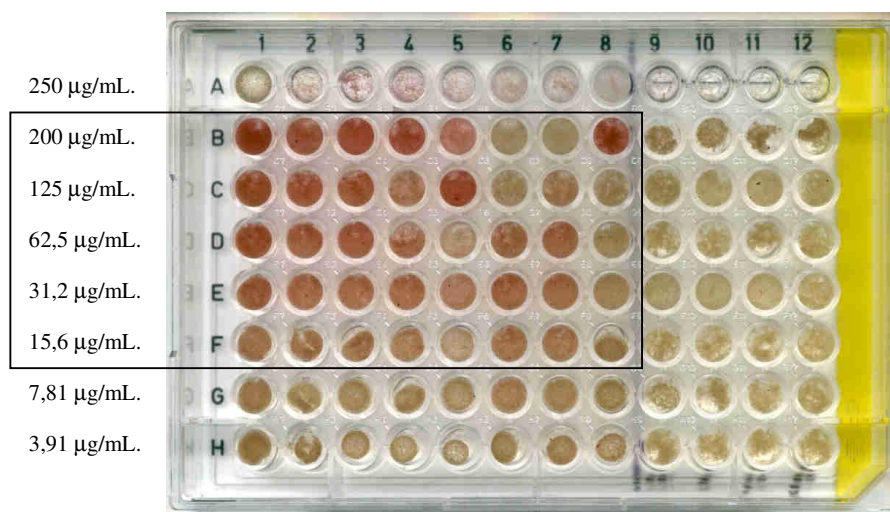


Figura 22 – Ensaio de MIC. Avaliação das concentrações do hidrocloreto de fluoxetina que apresentam crescimento microbiano.

A Figura 23 apresenta o ensaio de MIC com as concentrações que apresentaram resultados de crescimento microbiano no ensaio anterior, avaliando também a qualidade do inoculo e esterilidade da água de diluição.

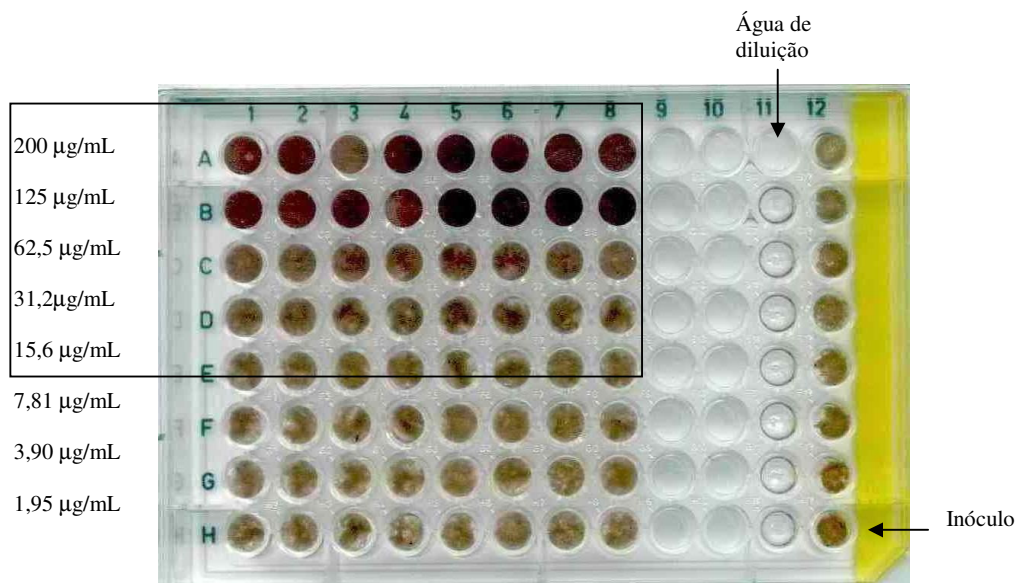


Figura 23 – Ensaio de MIC. Avaliação do crescimento microbiano em concentrações de 200 a 1,95 µg/mL.

Na Figura acima pode-se observar as concentrações que apresentaram melhor desenvolvimento microbiano foram as de 200 a 15 µg/mL. Concentrações inferiores a esta não foi observado crescimento bacteriano satisfatório indicando que nestas concentrações os microrganismos presentes no inoculo não possuem capacidade de utilizar o composto como fonte de carbono e energia.

6.4.2 Ensaio de respirometria em sistema fechado.

Através da análise quantitativa, foi possível avaliar o teor ativo do fármaco comercial, um genérico e a evolução de consumo do fármaco, pelos microrganismos presentes no inoculo, durante o teste de biodegradação. As amostras são provenientes dos frascos-teste do ensaio de respirometria (ETAPA II, Fase III).

O método IBAMA, 1988, prevê a quantificação através de dosagens do CO₂ desprendido, por titulação de neutralização. Devido às baixas concentrações utilizadas na realização dos ensaios a quantificação do hidrocloreto de fluoxetina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo avaliada a percentagem de fármaco consumido durante o período do teste.

6.4.2.1 Quantificação do consumo do fármaco por cromatografia (CLAE).

Com os resultados obtidos nas análises quantitativas, realizadas por cromatografia, foi possível avaliar a evolução de consumo do fármaco pelos microrganismos durante o período de ensaio, conforme demonstrado na Tabela 23.

Tabela 23 - Consumo do fármaco, pelos microrganismos presentes no inóculo (período avaliado: 16/07/2008 a 05/08/2008). Concentração µg/mL.

Amostras	Concentração					% remoção
	16/07/2008	21/07/2008	28/07/2008	05/08/2008	12/08/2008	
200	214,49	204,55	195,00	155,83	203,02	27,35
125	140,55	127,87	119,22	129,70	129,01	7,72
62,5	74,07	73,63	61,28	72,20	69,82	2,52
31,25	33,93	35,33	32,52	32,47	33,69	4,30
15,62	16,33	15,96	15,05	15,27	14,63	6,49

Pode-se observar pelos resultados apresentados na Tabela 23 que o fármaco em estudo apresentou uma degradação variável dependendo da concentração inicial utilizada. Os melhores resultados foram observados em concentrações de 200 µg/ml com redução de 27%. Concentrações mais baixas demonstram uma pequena utilização do composto com remoção média 4,2%. Os resultados estão de acordo com o que foi predito pelo modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade (Q SARS), em torno de 32% e também confirmado pelos ensaios de MIC.

Em paralelo ao ensaio de respirometria foi realizada a determinação da concentração do princípio ativo do produto comercial e medicamento genérico adquiridos no mercado local. Os resultados obtidos na cromatografia (CLAE) mostraram concentrações de 21,70mg e 22,85mg respectivamente por cápsula. Estas análises foram realizadas para confirmação da quantidade do princípio-ativo presentes nas formulações comerciais.

Com os dados da Tabela 23 foram obtidas as curvas da Figura 24, nela pode ser detectado o processo de biodegradação que pode ser melhor visualizado, e que a partir do 21º dia (05/08/2008) as concentrações do fármaco não sofrem alterações significativas até o 28º dia, o que demonstra que o processo de biodegradação atingiu o equilíbrio.

O ensaio não foi submetido a um período mais prolongado devido ao embasamento do método utilizado que prevê o ensaio por um período máximo de 28 dias para a avaliação da biodegradação.

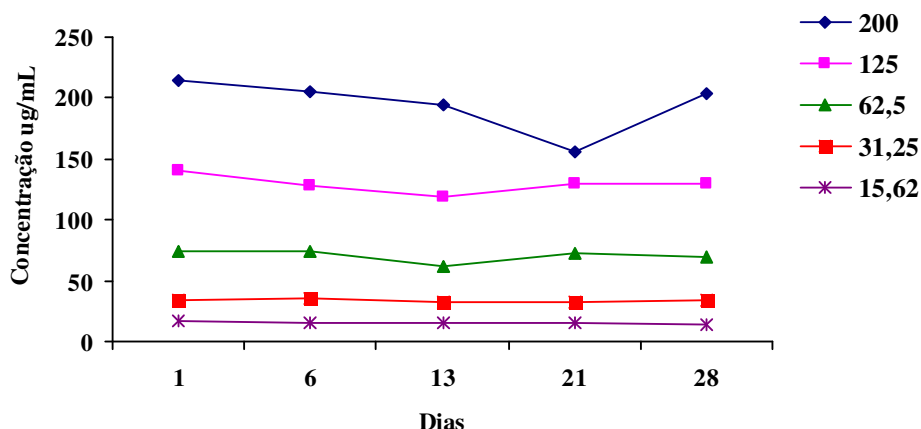


Figura 24 – Avaliação da biodegradação do hidrócloridrato de fluoxetina durante o período de 28 dias do ensaio respirométrico.

6.4.2.2 Análise quantitativa DQO (Demanda Química de Oxigênio)

A análise de DQO foi realizada com o intuito de acompanhar o processo de degradação do fármaco pelos microrganismos durante o período de ensaio. Observando os resultados apresentados, podemos notar que os valores iniciais de DQO foram mais elevados em relação aos resultados das análises cromatográficas. Isto provavelmente se deve aos excipientes presentes na formulação comercial dos fármacos utilizados, que também contribuem como fonte de carbono. Os resultados são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Análise quantitativa-Demanda Química de Oxigênio (DQO) do processo de degradação do Hidrocloridrato de fluoxetina. Concentração em µg/mL

Amostras	Resultados				
	16/07/2008	21/07/2008	28/07/2008	05/08/2008	12/08/2008
200	470	237	197	362	1246
125	653	223	162	140	954
62,5	317	248	74	72	846
31,25	206	105	ND	ND	766
15,62	258	117	ND	ND	651

ND = não detectado

Os valores finais da DQO observados até o 21º dia (05/08/2008) estão de acordo com os resultados cromatográficos apresentados na Tabela 23 com uma redução da DQO de 22,9% na concentração de 200 µg/mL. Os outros valores apresentam valores de redução maiores que os observados na cromatografia, este fato pode estar associado à presença dos excipientes oriundos da formulação comercial.

Os dados referentes ao 28º dia (12/08/2008) sugerem a interferência de outras fontes de carbono provenientes do processo de respirometria.

6.4.2.3 Acompanhamento da variação do valor de pH durante o período do teste de respirometria

Os resultados obtidos durante o ensaio de respirometria demonstram que no primeiro dia (16/07/2008) de avaliação, 24 horas após a inoculação, o pH apresentou uma acidificação do meio, proveniente do início da degradação do composto e conseqüente produção de CO₂.

As demais avaliações demonstraram estabilidade do sistema, não tendo ocorrido variações bruscas (Tabela 25). A estabilidade do ensaio foi decorrente da adição de uma solução de hidróxido de bário para absorção do CO₂ formado. Esta solução, periodicamente, era renovada, evitando-se a acidificação do meio. É importante ressaltar que, em nenhum momento, foi feita a correção do pH do mesmo.

Tabela 25 - Acompanhamento da variação do valor de pH durante o período do teste de respirometria.

Amostras (µg/L)	pH				
	16/07/2008	21/07/2008	28/07/2008	05/08/2008	12/08/2008
200	3,24	5,17	6,25	6,24	7,04
125	4,40	6,36	6,45	6,97	7,14
62,5	3,95	5,74	6,51	6,98	7,33
31,25	4,23	6,24	7,26	7,38	7,77
15,62	5,74	6,40	6,91	7,17	7,54

6.4.2.4 Plaqueamento em meio PCA

A avaliação do processo de biodegradação do fármaco indicou que durante o ensaio ocorreu uma diminuição gradativa dos microrganismos do meio medidos por

plaqueamento em meio sólido expressos em UFC (Unidade formadora de colônias), e variação na sucessão de colônias microbianas.

Os resultados da contagem das colônias (UFC) estão colocados nos dados da Tabela 26 e nas Figuras 25 e 26 que ilustram as observações realizadas na variedade de colônias durante o período experimental.

Tabela 26 – Contagem de colônias microbianas durante o ensaio de respirometria. Plaqueamento meio PCA, 24 horas, 37 °C, valores expressos em UFC.

Amostras (µg/L)	Unidades formadoras de colônia				
	16/07/2008	21/07/2008	28/07/2008	05/08/2008	12/08/2008
200	$6,6 \times 10^9$	$4,6 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
125	$5,7 \times 10^9$	$3,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$0,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
62,5	$4,8 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$0,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
31,25	$7,6 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$0,4 \times 10^8$	$0,4 \times 10^8$
15,62	$3,1 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$0,4 \times 10^9$	$0,1 \times 10^8$	$0,1 \times 10^8$

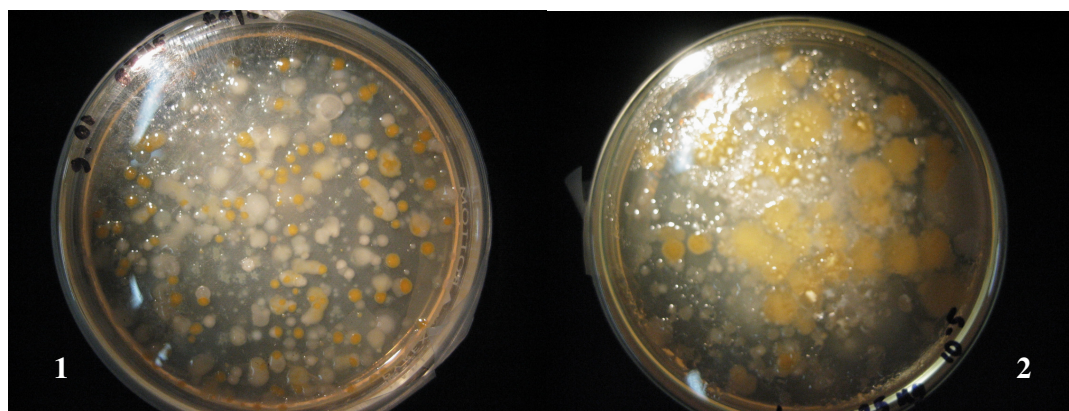


Figura 25 – Ilustração da diversidade microbiana observada durante o período do ensaio de respirometria. 1 = 125 µg/L, diluição: 10^{-6} , leitura em 21/07/08; 2 = 125 µg/L, diluição: 10^{-5} , leitura em 21/07/08;

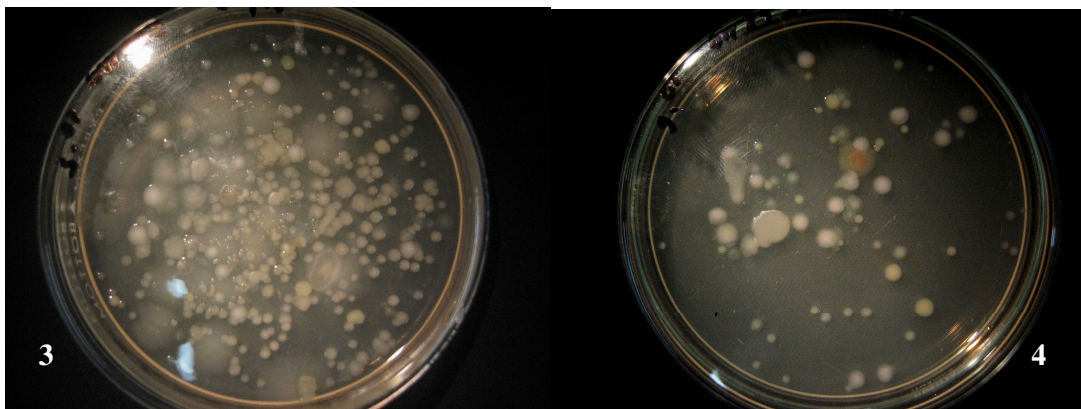


Figura 26 - Ilustração da diversidade microbiana observada durante o período do ensaio de respirometria. 3 = 62,5 µg/L, diluição: 10^{-5} , leitura em 21/07/08; 4 = 62,5 µg/L, diluição: 10^{-6} , leitura em 21/07/08;

Conforme observado nos resultados apresentados e, em concordância com o tema, ZAGATTO, 2006, descreve que a biodegradação de um composto orgânico não é decorrente da atividade de um organismo específico, mas resulta da participação de uma cadeia de microrganismos, que atuam sinergicamente, utilizando diferentes vias metabólicas e processos enzimáticos, o que é demonstrado nas Figuras 24 e 25.

De acordo com a classificação proposta pelo método E.1.1.3-IBAMA, o composto analisado, hidrocloreto de fluoxetina, seria classificado como substância não facilmente biodegradável, obedecidos os critérios de interpretação, pois não teria atingido o valor mínimo de 70% de degradação.

6.5 Avaliação da toxicidade do hidrocloreto de fluoxetina

Em parceria com o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), localizado na Cidade Universitária, São Paulo, com a Universidade de São Paulo (USP) foram realizados os ensaios de toxicidade com dois organismos teste: *Ceriodaphnia dubia* e *Vibrio fischeri*, para a avaliação da toxicidade do fármaco Hidrocloreto de fluoxetina, na forma comercial e um genérico.

6.5.1 Testes preliminares

6.5.1.1 Teste preliminar de toxicidade aguda com microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*, NBR 13373 (ABNT, 2005)

Foram realizados dois ensaios preliminares (ensaio 01 e 02) utilizando-se amostras provenientes da forma farmacêutica comercial e amostra proveniente do sistema de respirometria (21/07/08), que apresentou concentração 200µg/ml(mg/l) e 204,25µg/ml, conforme CLAE, respectivamente.

Transcorrido o período de 4 horas e assegurada às condições do teste, foi constatada a ausência total de sobrevivência dos organismos testes, demonstrando efeito tóxico nas concentrações utilizadas, para os 2 ensaios.

6.5.1.2 Teste preliminar de toxicidade aguda com a bactéria marinha *Vibrio fischeri*, NBR 15411-2 (ABNT, 2006)

Foram realizados três ensaios preliminares (ensaio 01, 02 e 03) utilizando-se amostras provenientes da forma farmacêutica comercial e genérico.

Os resultados obtidos indicam que os fármacos analisados apresentam toxicidade aos organismos teste nas concentrações utilizadas, sendo que o fármaco na forma de apresentação “genérica” demonstrou ser mais tóxico. Os resultados dos ensaios preliminares podem ser visualizados nas Tabelas 27 a 29.

Tabela 27 - Ensaio 01 – Fármaco comercial - Solução 01- 200µg/mL.

Diluições	Controle	10,23%	20,47%	40,95%	81,90%
Concentrações µg/ml	Zero	20,47	40,95	81,90	163,8
I₀	95	99	93	89	89
I₁₅	95	82	60	24	05

Resultado: CE50 – 47,74% (35,13 – 64,87) – 95,48 ppm (70,26 – 129,74ppm)

Tabela 28 - Ensaio 02 - Fármaco comercial - Solução 01- 200µg/mL.

Diluições	Controle	10,23%	20,47%	40,95%	81,90%
Concentrações µg/ml	Zero	20,47	40,95	81,90	163,8
I₀	101	103	92	83	88
I₁₅	92	76	54	23	05

Resultado: CE50 – 48,07% (33,42 – 69,16) – 96,14 ppm (66,84 – 138,32ppm)

Tabela 29 - Ensaio 03 – Medicamento genérico – Hidrocloridrato de fluoxetina 200µg/mL.

Diluições	Controle	10,23%	20,47%	40,95%	81,90%
Concentrações µg/ml	Zero	20,47	40,95	81,90	163,8
I₀	96	99	99	94	96
I₁₅	94	75	60	20	0,1 [*]

Resultado: CE50 – 37,76% (6,50 – 219,41) – 75,52 ppm (13,00 – n.d. ppm)

O valor mais adequado seria $40,95 < CE50 < 81,90$. Assumindo uma luminescência na última concentração igual 0,1

Através da consulta no bulário, de cada uma das formas farmacêuticas, constatou-se diferença na formulação quanto à composição dos excipientes, sendo a forma comercial constituída por amido em pó e amido em pó com 5% de silicone q.s.p e a forma genérica constituída de amido de milho e óleo vegetal hidrogenado q.s.p. As diferenças apresentadas quanto à toxicidade pode estar baseada nesta variedade de excipientes apresentada pelas formas farmacêuticas distintas.

CARLSON et al, 2005 e CARLSON et al, 2005a, avaliaram em seus trabalhos os riscos associados aos excipientes contidos nos fármacos e que os mesmos podem apresentar efeitos tóxicos em vários organismos.

6.5.2 Avaliação da toxicidade do hidrocloreto de fluoxetina

Os ensaios posteriores foram realizados utilizando-se amostras geradas a partir de ensaio de respirometria em sistema fechado, Etapa 2, fase III, tendo sido escolhida a concentração que apresentou melhor eficiência no sistema (200µg/mL), para os testes realizados com os dois organismos. A Tabela 30 apresenta os dados gerais para a concentração escolhida.

Tabela 30- Dados gerais - Concentração em 200µg/mL.

Análises	Amostras provenientes do sistema respirometria				
	16/07/2008	21/07/2008	28/07/2008	05/08/2008	12/08/2008
CLAE	214,49	204,55	195,00	155,83	203,02
DQO	470	237	197	362	1246
UFC	$6,6 \times 10^9$	$4,6 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
pH	3,24	5,17	6,25	6,24	7,04

6.5.2.1 Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*.

O teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*, foi realizado utilizando amostras geradas pelo sistema de respirometria referentes ao 1º (16/07/2008), 6º (21/07/2008) e 21º dia (05/08/2008), que correspondem aos ensaios 3, 4 e 5). Os resultados referentes aos ensaios realizados podem ser visualizados na Tabelas 31 em relação CE50, para os períodos de 24 e 48 horas, tendo sido avaliado imobilidade/mortalidade.

Os ensaios foram realizados segundo o método NBR 13373, ABNT,2006. Características da água de diluição pH 7,8, dureza 45 ppm CaCO₃, lote 05/2008, manancial coletada no reservatório Paiva castro, em Mairiporã, São Paulo. Água classificada como água natural com ajuste de dureza.

Tabela 31 - Teste de toxicidade aguda com microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*, resultados referentes aos ensaios 03, 04 e 05.

Amostra	Concentração mg/l	Réplicas										Total jovens vivas
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Controle 01	--	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	10
		☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	10
Controle 02	--	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	10
		☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	10
Fármaco comercial 21/07/08 (ensaio 3)	2,0	☺	☺	†	☺	†	†	☺	†	†	†	4
		†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	0
	1,0	☺	☺	†	†	☺	☺	†	†	†	†	4
		☹	☹	†	†	☹	☹	†	†	†	†	4
	0,5	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	†	☺	☺	9
		☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	†	☹	☹	9
	0,25	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	☺	10
		☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	10
Fármaco comercial 16/07/08 (ensaio 4)	2,0	†	†	☹	†	†	†	†	☹	☹	☹	4
		†	†	☹	†	†	†	†	†	☹	†	2
	1,0	☺	☺	☹	†	☹	☹	☹	†	†	†	6
		☹	†	☹	†	☹	☹	☹	†	†	†	5
	0,5	☺	☺	☹	†	☹	†	☹	†	†	☹	6
		☹	☹	☹	†	☹	†	☹	†	†	☹	6
	0,25	☺	☺	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	10
		☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	10
Fármaco comercial 05/08/08 (ensaio 5)	2,0	†	†	†	†	☹	†	†	†	†	☹	2
		†	†	†	†	☹	†	†	†	†	†	2
	1,0	☺	†	☺	☹	☹	?	☺	†	†	☹	6
		☹	†	☹	☹	☹	?	†	†	†	†	4
	0,5	☺	†	☺	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	9
		☹	†	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	9
	0,25	☺	☺	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	10
		☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	☹	10

Observações: Organismos imobilidade/mortalidade (☺=vivos; † mortos)

- Azul (leitura 24 horas)
- Vermelho (leitura 48 horas)

Os resultados de CE50 foram obtidos através do Método estatístico (Trimmed Sperman Karber, Hamilton, 1978) podem ser visualizados na Tabela 32.

Tabela 32 – Resultados da concentração efetiva para o teste de toxicidade aguda utilizando o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*.

AMOSTRAS	CE50 – 24 horas	CE50 – 48 horas
Ensaio 3 – Fármaco comercial 21/07/08	0,87 ppm (0,61-1,23)	0,87 ppm(0,68-1,12)
Ensaio 4 – Fármaco comercial 16/07/08	1,41 ppm (0,66-3,02)	0,84 ppm(0,51-1,39)
Ensaio 5 – Fármaco comercial 05/08/08	1,16 ppm (0,86-1,55)	0,95 ppm(0,70-1,30)

Os resultados do teste de toxicidade, considerando o equilíbrio do processo de biodegradação (05/08/2008), utilizando o organismo teste *Ceriodaphnia dubia*, demonstram efeitos tóxicos agudos, CE50=1,16 ppm (0,86-1,55) – 24 horas e 0,95 ppm(0,70-1,30) – 48 horas, tendo apresentado resultados semelhantes aos apresentadas por outros pesquisadores, Henry (2004) e Brooks (2003).

HENRY, 2004, discute que trabalhos relacionados a avaliação da toxicidade para os organismos aquáticos quanto a presença dos ISRS não é bem documentado na literatura. Alguns pesquisadores investigaram a toxicidade para a fluoxetina efeitos dessa droga a organismos aquáticos, em vertebrados e invertebrados aquáticos, em testes padronizados foram determinados concentração de efeito não observado (CENO) de 56 µg/L para a reprodução em *Ceriodaphnia dubia*.

HENRY, 2004 demonstra em seu trabalho que a exposição crônica reduziu o número médio de neonatos produzidos *por C.* durante o período de 7 – 8 dias. Para fluoxetina, a CENO, para a média do número de nascidos vivos, foi de 0,089 mg / L, que era similar a CENO (0,056 mg / L fluoxetina HCl) relatada por Brooks, 2003 utilizando o mesmo padrão 7-dias de ensaio para toxicidade crônica com *C.*

Foi relatado que a fluoxetina foi detectada na concentração de 0,012 µg/L em córregos nos Estados Unidos durante os anos 1999 e 2000 e, de 0,013 a 0,099 mg/L no tratamento de efluentes de esgoto perto dos Grandes Lagos, Canada. Em levantamento realizado pelo NDCHealth (Atlanta, GA, E.U.A.), a fluoxetina foi classificada em 34^º substância com base nas 200 prescrições mais dispensadas nos Estados Unidos durante o ano de 2003, (em [http:// www.rxlist.com/ top200.htm](http://www.rxlist.com/top200.htm)), KNOW, 2006.

Embora estes resultados sugerem que a presença de ISRS no ambiente em concentrações detectadas anteriormente poderiam ou não afetar negativamente os organismos aquáticos, reais condições ambientais são diferentes, pois os organismos são expostos a uma mistura diversificada de contaminantes (incluindo ISRS), podendo ocorrer efeitos sinérgicos, potencializadores, antagônicos, entre outros e o fato da exposição ocorrer durante várias gerações.

Pesquisas futuras devem investigar os efeitos das misturas de ISRSs nos organismos aquáticos e dos efeitos da exposição em múltiplas gerações.(HENRY, 2004).

6.5.2.2 Teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha *Vibrio fischeri* (Sistema Microtox)

O teste de toxicidade com a bactéria *Vibrio fischeri*, evidenciou não apenas a toxicidade do hidrocloreto de fluoxetina e a diminuição desta frente ao processo de biodegradação, mas também, o problema inerente ao tipo de excipiente utilizado nas várias formas farmacêuticas.

Os compostos analisados apresentaram toxicidades diferentes, sendo o medicamento genérico mais tóxico que a forma comercial e o fármaco puro (teor < 90%) que apresentou a menor toxicidade. Os resultados dos ensaios podem ser visualizados nas Tabelas 33 a 37 e ilustrado na Figura 26.

Tabela 33 - Ensaio 04 - Fármaco comercial - 214,49µg/ml – amostra 16/07/2008.

Diluições	Controle	5,11%	10,23%	20,47%	40,95%
Concentrações µg/ml	Zero	10,96	21,94	43,91	87,83
I ₀	97	75	87	85	84
I ₁₅	84	54	46	27	08

Resultado: CE50 – 28,50% (23,81 -34,11) – 61,13 ppm (51,07 – 73,16 ppm)

Tabela 34 - Ensaio 05 - Fármaco comercial - 204,55µg/ml – amostra 21/07/2008.

Diluições	Controle	5,11%	10,23%	20,47%	40,95%
Concentrações µg/ml	Zero	10,45	20,92	41,87	83,76
I ₀	81	78	82	76	72
I ₁₅	55	45	42	26	08

Resultado: CE50 – 35,84% (24,83 – 51,74) – 73,31 ppm (50,79 – 105,83 ppm)

Tabela 35 - Ensaio 06 - Fármaco comercial - 195µg/ml – amostra 28/07/2008.

Diluições	Controle	5,11%	10,23%	20,47%	40,95%
Concentrações µg/ml	Zero	9,96	19,95	39,92	79,85
I ₀	89	84	79	84	82
I ₁₅	58	49	42	35	16

Resultado: CE50 – 50,79% (38,59 – 66,84) – 99,04 ppm (75,25 – 130,34 ppm)

Tabela 36 - Ensaio 07 - Fármaco comercial - 155,83µg/ml – amostra 05/08/2008.

Diluições	Controle	5,11%	10,23%	20,47%	40,95%
Concentrações µg/ml	Zero	7,96	15,94	31,90	63,81
I ₀	109	98	97	77	74
I ₁₅	110	98	89	56	23

Resultado: CE50 – 40,92% (30,08 – 55,67) – 63,77 ppm (46,87 – 86,75 ppm)

Tabela 37 - Ensaio 08 - Hidrocloridrato de Fluoxetina CAS 56296-78-7 adquirido através da Sigma com grau de pureza de >90% - 200µg/mL.

Diluições	Controle	5,11%	10,23%	20,47%	40,95%
Concentrações µg/ml	Zero	10,22	20,46	40,94	81,90
I ₀	101	93	96	99	99
I ₁₅	112	100	101	85	35

Resultado: CE50 – 66,24% (39,05 – 112,37) – 132,48 ppm (78,10 – 224,74 ppm)

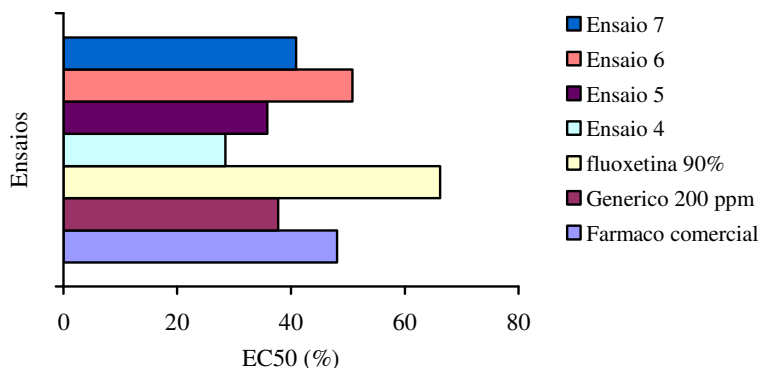


Figura 27 – Ensaio de toxicidade aguda (*Vibrio fischeri*) avaliando o hidrocloridrato de fluoxetina puro, formulação comercial e amostras provenientes da respirometria.

Segundo HENRY (2004), a contaminação das águas superficiais por farmoquímicos tem suscitado preocupações entre cientistas ambientais devido ao potencial de efeitos negativos sobre os organismos aquáticos. De particular importância são compostos farmacêuticos que afetam o sistema endócrino ou nervoso pela possibilidade de causar efeitos em organismos aquáticos mesmo em baixas concentrações ambientais.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível observar que o consumo da substância em estudo na cidade de referência apresentou ser um aspecto ambiental considerável com uma média anual aproximada de 250g. Cabe ressaltar que este valor está sub estimado, visto que neste estudo não foi avaliado o consumo em hospitais, farmácias de manipulação ou outras formas de obtenção deste medicamento (compras on-line).

O sistema de respirometria demonstrou que o fármaco em estudo foi parcialmente degradado pelos organismos no sistema teste com uma remoção aproximada de 27%.

O ensaio de Demanda Química de Oxigênio não se faz necessário para a avaliação da biodegradação, pois apresenta resultados não significativos e margem de erro muito elevada, 20% erro.

Os ensaios ecotoxicológicos preliminares indicaram que os fármacos apresentam toxicidades diferentes entre as formulações estudadas, sugerindo que a forte interferência na formulação do composto, responsável pela toxicidade apresentada é quanto ao excipiente utilizado.

A avaliação da toxicidade das amostras geradas pelo sistema de respirometria indica uma diminuição da toxicidade à medida que a biodegradação se processa, no entanto o residual ainda apresenta valores significativos quanto aos possíveis efeitos deletérios aos organismos aquáticos.

O presente estudo procurou, com os dados obtidos, demonstrar a necessidade de novas pesquisas quanto ao desenvolvimento de processos visando

minimizar a presença destes compostos ou diminuir os efeitos tóxicos que estes apresentam ao ambiente.

Foi observado que o alto consumo aliado ao descarte inadequado contribui para a presença deste fármaco no ambiente aquático podendo causar um potencial de acumulação no ambiente, visto que este é parcialmente removido como demonstrado neste trabalho.

7.1 Propostas para trabalhos futuros

O desenvolvimento de novas metodologias para realização dos ensaios de respirometria, com a utilização de pequenos volumes e conseqüente diminuição na geração de resíduos e análise quantitativa mais eficiente, visto que o método o qual foi baseado o ensaio de respirometria neste trabalho encontra-se desatualizado e ineficiente.

Devido a necessidade de novos estudos, no que se refere a presença e remoção dos fármacos nas várias matrizes ambientais, pode-se sugerir:

- Processo alternativos de oxidação do composto;
- Estudos de atividade enzimática dos organismos e avaliação da expressão gênica dos organismos por técnicas moleculares;
- Avaliação dos sub-produtos gerados durante o processo oxidativos ou processos biológicos; entre outros.

Importante ressaltar que qualquer que seja o processo a ser desenvolvido, deve ser acompanhado por uma avaliação ecotoxicológica .

REFERÊNCIAS

ABICALIL, M.T.O. O pensamento do setor de saneamento no Brasil: Cobertura dos serviços de água e esgoto. São Paulo, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR-15411-2**: Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente) Parte 2: Método utilizando bactérias desidratadas. Rio de Janeiro, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR-13373**: Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2005.

ANDRADE M.F; ANDRADE R.C.G; SANTOS V. Prescrição de psicotrópicos: Avaliação das informações contidas em receitas e notificações. Revista Brasileira de ciências Farmacêuticas. Vol.40; nº 4; out/dez. 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004.

AZEVEDO F.A e CHASSIN A.A.M. As bases toxicológicas da Ecotoxicologia. São Carlos-SP. RiMa .2003.

AWWA/APHA/WEF. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 21th ed. Washington, DC:APHA, 2005.

BALDESSARINI R.J. Depressão e distúrbios de ansiedade. In: GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 10^a edição. Rio de Janeiro-RJ. 2003. Cap. 19; págs. 339-364.

BRASIL, LEIS, DECRETOS, ETC. 1996. PORTARIA NORMATIVA IBAMA Nº 84, DE 15/12/1996, DISPÕE SOBRE PROCEDIMENTOS PARA REGISTRO E AVALIAÇÃO DO PPA. PUBLICADA NO D.O.U. EM 18/10/96 E 23/10/96.

BROOKS, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slaterry, M., La Point, T.W., Huggett, D.B.. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. Chemosphere (in press). 2003.

BROOKS, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.W., Huggett, D.B..Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Chemosphere* (in press). 2002.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos; série manuais. São Paulo-SP, 1990a.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos; série manuais. São Paulo-SP, 1990b.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Relatório das águas interiores. 2000.

CARSLOON, Carina, JOHANSSON, Anna-Karin, ALVAN, Gunnar, BERGMAN, Kerstin, KUHLE, Thomas. Are Pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the Total environment* 364: 67-87.2006a.

CARSLOON, Carina, JOHANSSON, Anna-Karin, ALVAN, Gunnar, BERGMAN, Kerstin, KUHLE, Thomas. Are Pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part II: Environmental risk assessments of selected pharmaceutical excipients. *Science of the Total environment* 364: 88-95.2006b.

CLASSIC, In: Giddings, J.M. (Ed.), Community Level Aquatic System Studies—Interpretation Criteria. SETAC. 2002

CLINICAL AND LABORATORIAL STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos – Norma M7-A6, Vol.23,no.2,2005.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA (CFF). Portaria nº 344/98 – SVS/MS de 12 de maio de 1998. Aprova Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. *Organização Jurídica da Profissão Farmacêutica. Conselho Federal de Farmácia*. 2 ed., Brasília, 1999/2000.

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO (CREMESP) – Jornal do CREMESP. Edição nº 183. nov. 2002-Disponível em: <http://ser1.cremesp.org.br> Acesso em: 17/abril/2007.

CRAIG, Freudenrich, Ph.D.. "HowStuffWorks - Como funcionam os antidepressivos". Publicado em 20 de setembro de 2007 (atualizado em 15 de novembro de 2007) <http://saude.hsw.uol.com.br/antidepressivos3.htm> (15 de outubro de 2008)

DAUGHTON, C.G. and Ternes, T.A., Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environ. Health Perspect.* 107 6, pp. 907–938. 1999.

DAUGHTON, C.G., Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. 1. Rationale for and avenues toward a green pharmacy. *Environ. Health Perspect.* 111, 757–774, 2003.

FENT K.; WESTON A.A.; CAMINADA D. Ecotoxicology of human. *Aquatic Toxicology*, 76, 122–159; 2005.

FLAHERTY, C.M., Kashian, D.R., Dodson, S.I.,. Ecological impacts of pharmaceuticals on zooplankton: the effects of three medications on *Daphnia magna*. Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Baltimore, MD. 2001.

FONG PP. Zebra mussel spawning is induced in low concentration of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biol Bull* 194: 143–149.1998.

FONG, P.P.,. Antidepressants in aquatic organisms: a wide range of effects. In: Daughton, C.G. and Jones-Lepp, T.L., Editors, 2001. *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*, American Chemical Society, Washington, D.C, pp. 264–281. 2001.

FRANCISCHI, N.J. A farmacologia em nossa vida. Editora UFMG. Belo Horizonte-MG.2005.

GONÇALVES, Fernando Koshiba. O descarte de medicamentos vencidos e aspectos toxicológicos da incineração. *Revista Brasileira de Toxicologia*, volume 16, n.1, pg.60, São Paulo-SP.2003.

HALLING-SORENSEN, B., Nors-Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten-Lutzhoft, H.C. and Jorgensen, S.E.,. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. *Chemosphere* 36 2, pp. 357–393. 1998.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R.V. (1977). Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* v. 11, n.7,p.714, 1978.

HENRY TB, Kwon J-W, Armbrust KL, Black MC.. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ Toxicol Chem* 23:2229–2233, 2005.

HOLM, J.V., Rugge, K., Bjerg, P.L., Christensen, T.H.,. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic-compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci. Technol.* 29 (5), 1415–1420, 1995

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Teste da biodegradabilidade imediata pela medida do dióxido de carbono desprendido em sistema fechado. Ensaio E.1.1.3, 1988.

JONES-LEPP, T.L., Alvarez, D.A., Petty, J.D., Osemwengie, L.I., Daughton, C.G.,. Analytical chemistry for mapping trends of pharmaceutical and personal care product pollution from personal use: some current research and future needs. 10th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography, Mainz/Wiesbaden, Germany. 2001.

JONES O.A.H.; VOULVOULIS N.; LESTER J.N.; Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res.* 36, 5013–5022; 2002.

JONES O.A.H.; VOULVOULIS N., LESTER J.N. Human pharmaceuticals in the aquatic environment—a review. *Environ. Technol.* 22, 1383–1394; 2001

JORGENSEN S.E.; HALLING-SORENSEN B. Editorial: drugs in the environment. *Chemosphere* 40, 691–699; 2000

KOLPIN, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. and Buxton, H.T.. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Tech.* 36 6, pp. 1202–1211. 2002.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H.; Química Farmacêutica. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro-RJ.1988.

KWON J.W. and ARMBRUST K.L. Laboratory Persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments *Environ Toxicol Chem* v 25:2561–2568, 2006.

LANGE H.J. de el al. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustácea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. 2006.

LEMOS, Noelle Giacomini; MANTOVANI, Mário Sérgio; VICENTINI, Verônica E.P. Avaliação do efeito genotóxico do Prozac (fluoxetina), sem e com adição de vitaminas A e C, através do teste do cometa em cultura de células CHO-K1. *Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v.26, n.2, p.95-100, jul./dez.2005.

MORAIS, Jomar .Viciados em remédios. *Revista Superinteressante*. Editora Abril, edição 185, São Paulo, fev.2003.

MULROY A; *WATER ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY*; 13,32; 2001.

NEGRÃO, Márcio Mário. Transtornos do humor I. *Clinica Orgone*. Curitiba-PR. Disponível em www.orgone.com.br. Consultado em 10/11/2007.

POVINELLI, J., MATHEUS, C. E. & FRAGIACOMO, P. – Aclimação de um resíduo industrial. *Revista DAE*, 49(154):24-28, 1989.

RICHARDS, S.M., Wilson, C.W., Johnson, D.J., Castle, D.M., Lam, M., Mabury, S.A., Sibley, P.K., Solomon, K. Effects of pharmaceuticals in aquatic ecosystems. (Submitted for publication). 2003.

SANDERSON H.; JOHNSON D.; REITSMA J.; BRAIN R.A.; WILSON C.J.; SOLOMON K.R. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* ,39, 158–183; 2004.

SANDERSON H.; JOHNSON D.; WILSON C.; BRAIN, R.; SOLOMON K.R. Probabilistic hazard ASSESSMENT of environmentally ccurring pharmaceuticals acute toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicol. Lett.* 144, 383–395; 2003.

SANDERSON H. Design, analysis and interpretation of higher tier risk assesment of chemicals in aquatic microcosms. Doctoral dissertation. University of Roskilde, Denmark.2002. <http://www.ruc.dk/teksam/phdinfo/hans> acessado em: 24/abril/2007.

SEILER J.P. Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology can the two be connected? *toxicolo. Lett.* 131, 105-115. 2002.

STUMPF M.; TERNES T.A.; HABERER K.; SEEL P.; BAUMANN W. Determination of pharmaceutics in sewage plants and river water. *Vom Wasser* ;86:291–303; 1996.

TAVANO, Silvana. Voce precisa mesmo de antidepressivos.Revista Marie Claire, Editora Globo, São Paulo, n.192, março 2007.

TERNES T. Occurrence of pharmaceuticals in surface waters (Vorkommen von Pharmaka in Gew.assern). *Wasser and Boden*; 53(4):9–14; 2001.

USEPA. Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, 2nd Edition. EPA 600/4-89-001. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, OH. 1989.

USEPA. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents Receiving waters to Freshwater and Marine Organisms, 4th Edition. EPA/600/4-90/027. 1991.

U.S. PHARMACOPHEIA. The United States Pharmacopeia, USP 29/The National Formulary, NF 22; Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., p940,2006.

WESTON, J.J., Foran, C.M., Slattery, M., Brooks, B.W., Huggett, D.B. Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine exposure. (Submitted for publication). 2003.

WESTON, J.J., Huggett, D.B., Rimoldi, J., Foran, C.M., Stattey, M., Determination of fluoxetine (Prozac™) and norfluoxetine in the aquatic environment. Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Baltimore, MD. 2001.

ZAGATTO P.A; BERTOLETTI E; *Ecotoxicologia Aquática. Princípios e aplicações.* São Carlos-SP.Rima. 2006.

ZUCCATO E.; CASTIGLIONI S.; FANELLI R. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials.* 122, 205–209; 2005.

ZUCCATO E.; CALAMARI D.; NATANGELO M.; FANELLI R. Presence of therapeutic drugs in the environment. Lancet 355, 1789–1790; 2000.

www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2003/240403_1.htm consultado em 18/10/2008

www.clinicamillerdepaiva.com consultado em 20/07/2008

www.consultaremedios.com.br consultado em 22/10/2008.

www.editoraglobo.com.br consultado em 15/10/2008.

www.epa.gov/oppt/exposure/docs/episuitedi.htm. consultado em 20/10/2006

www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedi.htm. consultado em 20/10/2006

www.farmacioviverbememcasa.com.br consultado em 19/10/2008

www.merck-chemicals.com: consultado em 01/02/2008.

www.nossosaopaulo.com.br/Reg_10/Reg10_Amparo.htm consultado em 19/08/2008 e 10/10/2008.

www.orgone.com.br consultado em 10/06/2008.

www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/multimedia/paginacartilha/docs/FTN.pdf consultado em 23/10/2008.

www.toxinet.nlm.nih.gov consultado em 20/10/2006

GLOSSÁRIO

Acatisia: Incapacidade de sentar-se; ansiedade intensa referente a permanecer sentado.

Ação tóxica aditiva: Toxicidade de uma mistura de agentes químicos que é equivalente àquela esperada pela soma das toxicidades conhecidas dos agentes químicos individuais presentes na mistura.

Ação tóxica antagônica: Fenômeno no qual a toxicidade da mistura de agentes químicos é menor do que aquela que seria esperada da simples soma das toxicidades dos agentes químicos individuais presentes na mistura.

Ação tóxica sinérgica: Fenômeno no qual a toxicidade da mistura de agentes químicos é maior que aquela que seria esperada da simples soma das toxicidades dos agentes químicos individuais presentes na mistura.

Água de diluição: Água utilizada para manutenção de culturas de organismos e para a realização de testes de toxicidade.

Antagonista: Medicamento que se opõe aos efeitos de outro por efeito fisiológico, químico ou mediante medicamento competitivo.

Antidepressivo: Qualquer medicamento utilizado para o tratamento da depressão

Antidepressivo tricíclicos: Medicamento utilizado para o tratamento da depressão, fazendo parte da classe dos compostos relacionados com os

Bioacumulação: Termo genérico que descreve um processo pelo qual agentes químicos são absorvidos e retidos pelos organismos, a partir do ambiente em que vivem ou através da sua alimentação.

Biodisponibilidade: Propriedade do agente químico que determina o efeito tóxico ao organismo; a redução da biodisponibilidade do agente químico resulta na diminuição do seu efeito tóxico.

CE50 (Concentração efetiva média):Concentração do agente tóxico que causa efeito agudo (imobilidade) a 50% dos organismos em 24 ou 48 horas de exposição, nas condições-teste.

CENO (Concentração de efeito não observado): Maior concentração do efeito tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo, na sobrevivência e reprodução dos organismos, em sete dias de exposição, nas condições-teste.

CEO (Concentração de efeito observado): Menor concentração do efeito tóxico que causa efeito, na sobrevivência e reprodução dos organismos, em sete dias de exposição, nas condições-teste.

CL50 (Concentração letal média): Concentração do agente tóxico que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos em 24 ou 96 horas de exposição, nas condições-teste.

Depressão: Tristeza extrema, melancolia ou abatimento que, ao contrário do pesar, são irreais e fora de proporção com qualquer causa alegada; pode ser um sintoma de qualquer transtorno psiquiátrico ou a manifestação primordial de uma reação psicótica depressiva ou de uma neurose.

Estimulantes psicomotores: referente tanto a atividade mental como a motora, particularmente em relação ao desenvolvimento psicomotor.

MAO – monoaminoxidase - enzima hepática

Neuroléptico (antipsicótico): 1. Referente às ações de um medicamento que determinam em conjunto a melhora de pacientes com transtornos mentais. 2. Medicamento que por suas características e ações é útil no tratamento de transtornos mentais, mormente psicoses.

Psicose: Transtorno mental caracterizado por desintegração da personalidade e seu conflito com a realidade.

Sedativo: qualquer medicamento que aquieta o sistema nervoso central, especialmente sem provocar sono nem analgesia.

ANEXO A

Ensaio 01 - Fármaco comercial - Solução 01- 200µg/ml(mg/l)

IPEN	FICHA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA TOXICIDADE AGUDA - MICROTOX		Nº Amostra
			Ensaio 01
Procedência:	Unicamp	Bactéria (reagente) IPEN ACV10-02	
Data:	10/8/2008		

TABELA DOS RESULTADOS OBSERVADOS E CALCULADOS:

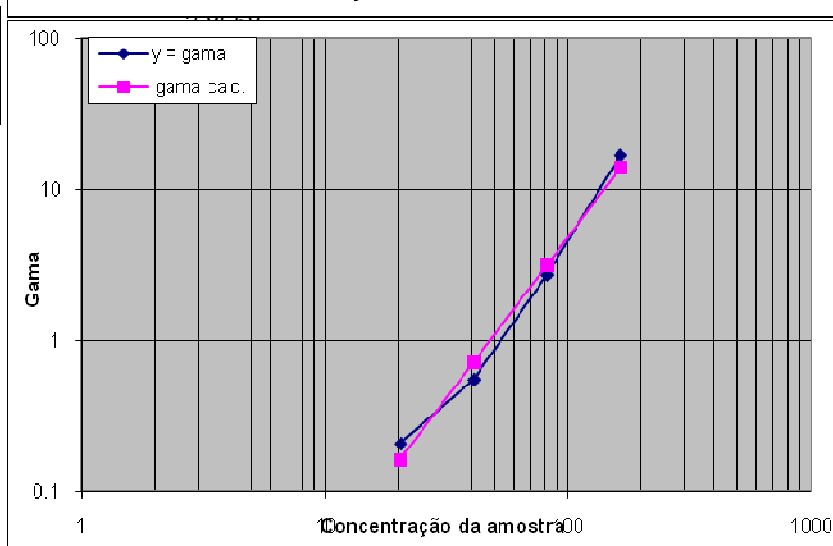
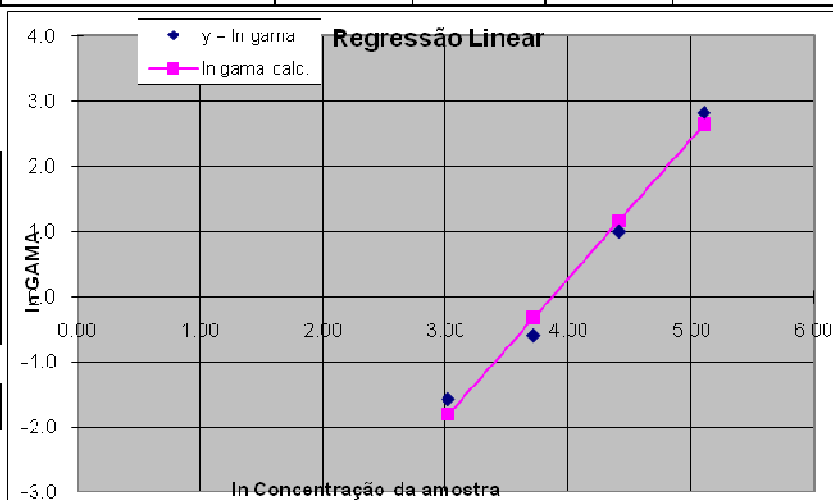
Cubeta		Leit. Inicial	5 minutos	15 minutos		
b1		95	0	95		
	Concentração da amostra	Média razão dos brancos	0.0000	1.0000	Efeito Gama(5)	Efeito Gama(15)
b2	20.4700	99	0	82	#DIV/0!	0.2073
b3	40.9500	93	0	60	#DIV/0!	0.5500
b4	81.9000	89	0	24	#DIV/0!	2.7083
b5	163.8000	89	0	5	#DIV/0!	16.8000

RESULTADO:

CE 50=	47.7414
Intervalo de confiança	
35.1320	64.8766
U.T.=	2.09

Fat. conf.=	1.3589
--------------------	---------------

CE 20=	24.9166
Intervalo de confiança	
18.3356	33.8595



Ensaio 02 - Fármaco comercial - Solução 01- 200µg/ml

IPEN	FICHA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA TOXICIDADE AGUDA - MICROTOX		Nº Amostra Ensaio 02
Procedência:	Unicamp	Bactéria (reagente) IPEN ACV10-02	
Data:	10/8/2008		

TABELA DOS RESULTADOS OBSERVADOS E CALCULADOS:

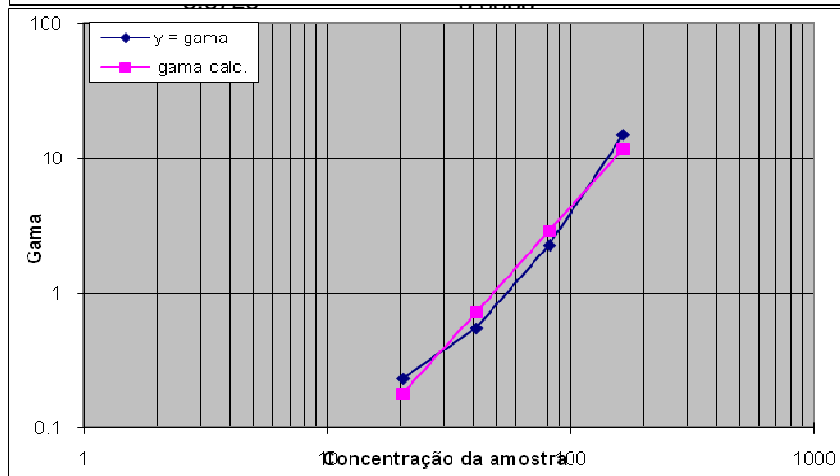
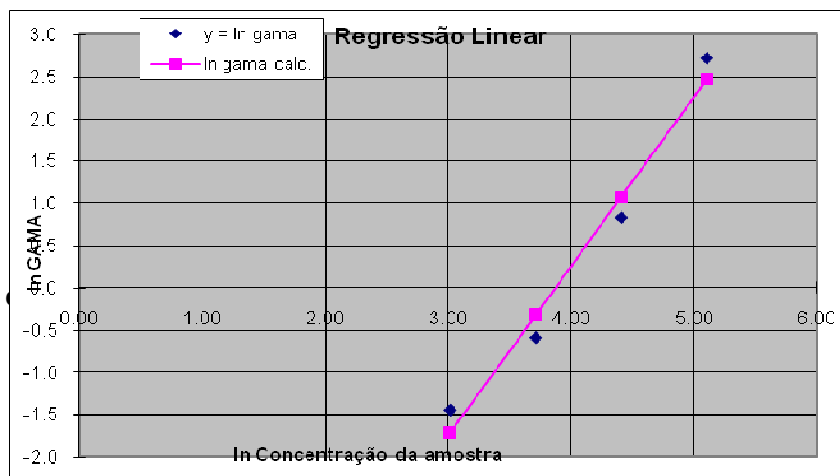
Cubeta		Leit. Inicial	5 minutos	15 minutos		
b1		101	0	92		
	Concentração da amostra	Média razão dos brancos	0.0000	0.9109	Efeito Gama(5)	Efeito Gama(15)
b2	20.4700	103	0	76	#DIV/0!	0.2345
b3	40.9500	92	0	54	#DIV/0!	0.5519
b4	81.9000	83	0	23	#DIV/0!	2.2871
b5	163.8000	88	0	5	#DIV/0!	15.0317

RESULTADO:

CE 50=	48.0763
Intervalo de confiança	
33.4199	69.1604
U.T.=	2.08

Fat. conf.=	1.4386
-------------	--------

CE 20=	24.0844
Intervalo de confiança	
16.7421	34.6467



Ensaio 03 – Medicamento genérico – Hidrocloridrato de fluoxetina 200µg/ml

IPEN	FICHA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA TOXICIDADE AGUDA - MICROTOX		Nº Amostra
			Ensaio 03
Procedência:	Unicamp	Bactéria (reagente) IPEN ACV10-02	
Data:	10/8/2008		

TABELA DOS RESULTADOS OBSERVADOS E CALCULADOS:

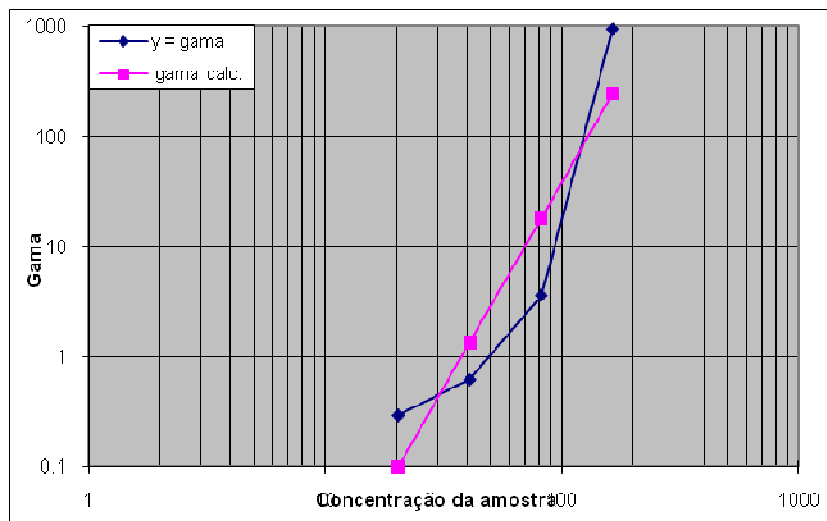
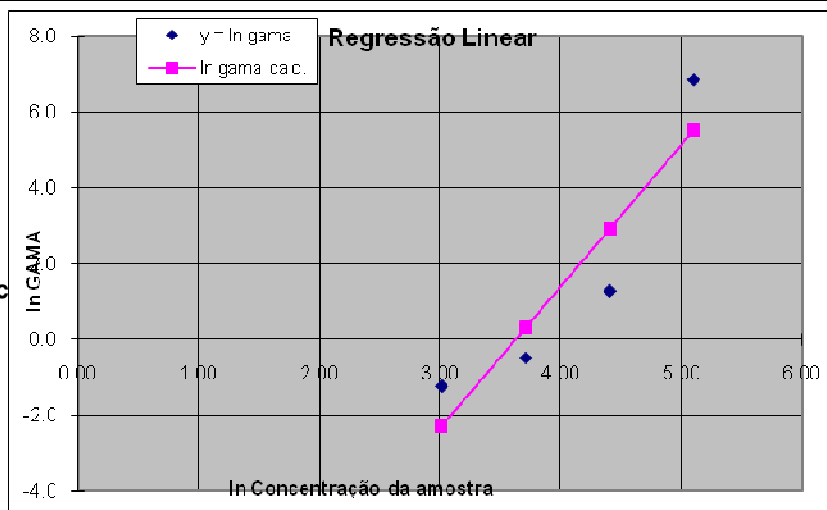
Cubeta		Leit. Inicial	5 minutos	15 minutos		
b1		96	0	94		
	Concentração da amostra	Média razão dos brancos	0.0000	0.9792	Efeito Gama(5)	Efeito Gama(15)
b2	20.4700	99	0	75	#DIV/0!	0.2925
b3	40.9500	99	0	60	#DIV/0!	0.6156
b4	81.9000	94	0	20	#DIV/0!	3.6021
b5	163.8000	96	0	0.1	#DIV/0!	939.0000

RESULTADO:

CE 50=	37.7611
Intervalo de confiança	
6.4988	219.4080
U.T.=	2.65

Fat. conf.=	5.8104
--------------------	---------------

CE 20=	26.0884
Intervalo de confiança	
4.4899	151.5851



Ensaio 04 - Fármaco comercial - 214,49µg/ml – amostra 16/07/2008

IPEN	FICHA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA TOXICIDADE AGUDA - MICROTOX	Nº
		Amostra Ensaio 04

Procedência:	Unicamp	Bactéria (reagente) IPEN ACV10-02
Data:	08/10/2008	

TABELA DOS RESULTADOS OBSERVADOS E CALCULADOS:

Cubeta		Leit. Inicial	5 minutos	15 minutos		
b1		97	0	84		
	Concentração da amostra	Média razão dos brancos	0.0000	0.8660	Efeito Gama(5)	Efeito Gama(15)
b2	10.9600	75	0	54	#DIV/0!	0.2027
b3	21.9400	87	0	46	#DIV/0!	0.6378
b4	43.9100	85	0	27	#DIV/0!	1.7262
b5	87.8300	84	0	8	#DIV/0!	8.0928

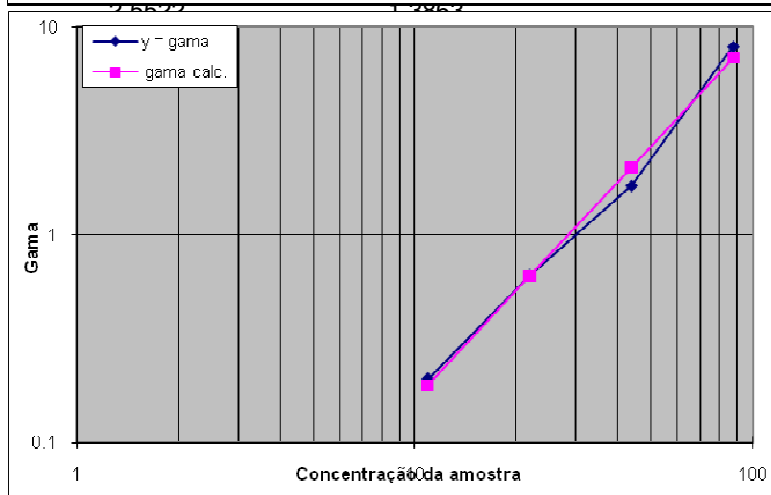
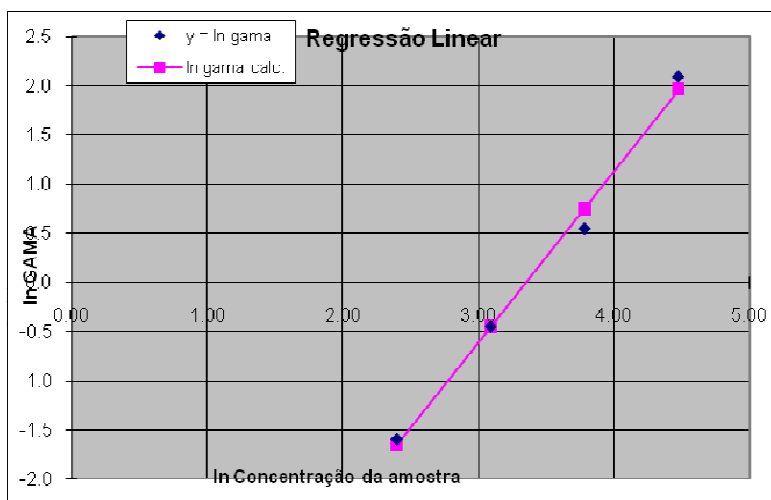
RESULTADO:

CE 50=	28.5011
Intervalo de confiança	
23.8128	34.1124

U.T.=	3.51
-------	------

Fat. conf.=	1.1969
-------------	--------

CE 20=	12.8355
Intervalo de confiança	
10.7241	15.3625



Ensaio 05 - Fármaco comercial - 204,55µg/ml – amostra 21/07/2008

IPEN	FICHA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA TOXICIDADE AGUDA - MICROTOX	Nº Amostra Ensaio 05
------	---	-------------------------

Procedência:	Unicamp	Bactéria (reagente) IPEN ACV10-02
Data:	08/10/2008	

TABELA DOS RESULTADOS OBSERVADOS E CALCULADOS:

Cubeta		Leit. Inicial	5 minutos	15 minutos		
b1		81	0	55		
	Concentração da amostra	Média razão dos brancos	0.0000	0.6790	Efeito Gama(5)	Efeito Gama(15)
b2	10.4500	78	0	45	#DIV/0!	0.1770
b3	20.9200	82	0	42	#DIV/0!	0.3257
b4	41.8700	76	0	26	#DIV/0!	0.9848
b5	83.7600	72	0	8	#DIV/0!	5.1111

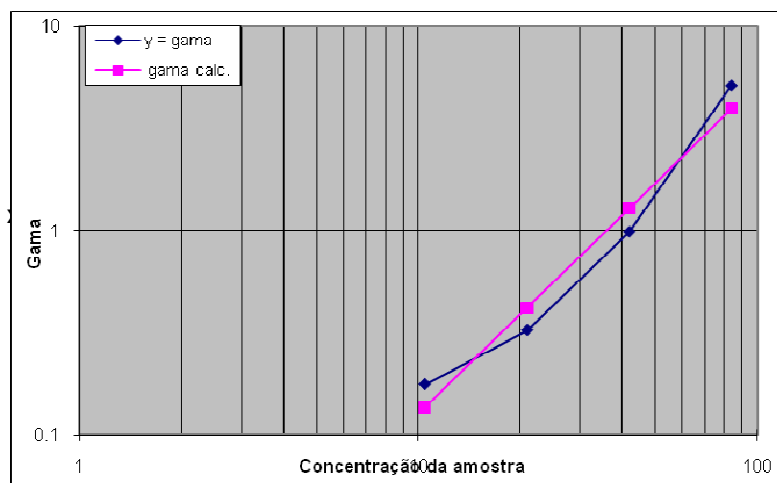
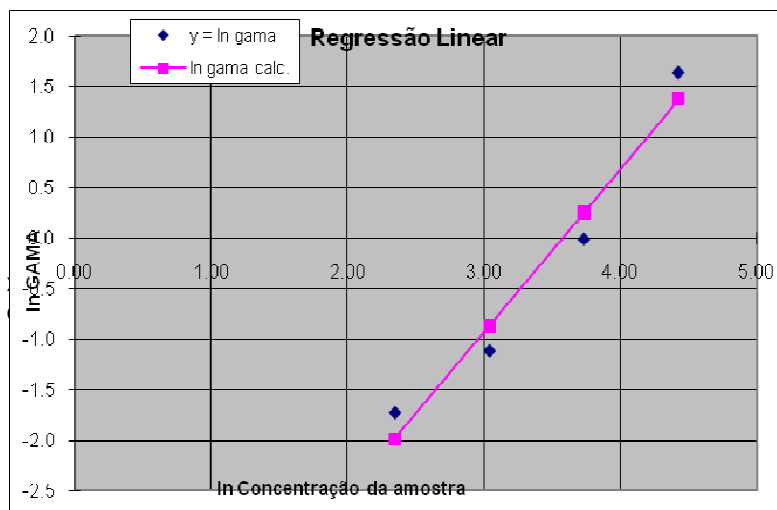
RESULTADO:

CE 50=	35.8443
Intervalo de confiança	
24.8334	51.7374

U.T.=	2.79
-------	------

Fat. conf.=	1.4434
-------------	--------

CE 20=	15.1820
Intervalo de confiança	
10.5183	21.9136



Ensaio 06 - Fármaco comercial - 195µg/ml – amostra 28/07/2008

IPEN	FICHA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA TOXICIDADE AGUDA - MICROTOX	Nº Amostra
		ensaio 06

Procedência:	Unicamp	Bactéria (reagente) IPEN ACV10-02
Data:	08/10/2008	

TABELA DOS RESULTADOS OBSERVADOS E CALCULADOS:

Cubeta		Leit. Inicial	5 minutos	15 minutos		
b1		89	0	58		
	Concentração da amostra	Média razão dos brancos	0.0000	0.6517	Efeito Gama(5)	Efeito Gama(15)
b2	9.9600	84	0	49	#DIV/0!	0.1172
b3	19.9500	79	0	42	#DIV/0!	0.2258
b4	39.9200	84	0	35	#DIV/0!	0.5640
b5	79.8500	82	0	16	#DIV/0!	2.3399

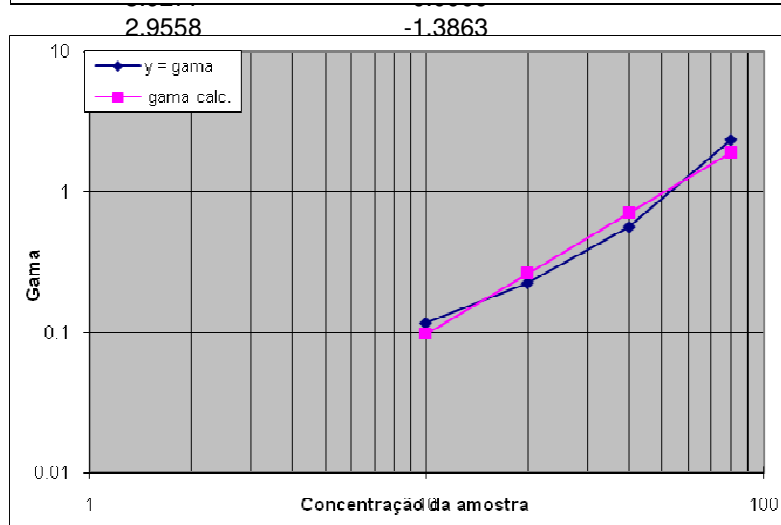
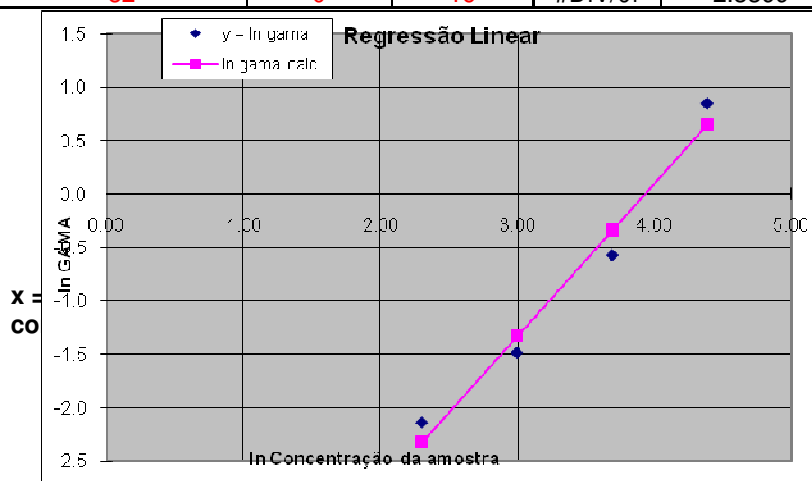
RESULTADO:

CE 50=	50.7878
Intervalo de confiança	
38.5932	66.8358

U.T.=	1.97
-------	------

Fat. conf.=	1.3160
-------------	--------

CE 20=	19.2175
Intervalo de confiança	
14.6032	25.2898



Ensaio 07 - Fármaco comercial - 155,83µg/ml – amostra 05/08/2008

IPEN	FICHA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA TOXICIDADE AGUDA - MICROTOX	Nº Amostra
		ensaio 07

Procedência:	Unicamp	Bactéria (reagente) IPEN ACV10-02
Data:	08/10/2008	

TABELA DOS RESULTADOS OBSERVADOS E CALCULADOS:

Cubeta		Leit. Inicial	5 minutos	15 minutos		
b1		109	0	110		
	Concentração da amostra	Média razão dos brancos	0.0000	1.0092	Efeito Gama(5)	Efeito Gama(15)
b2	7.9600	98	0	98	#DIV/0!	0.0092
b3	15.9400	97	0	89	#DIV/0!	0.0999
b4	31.9000	77	0	56	#DIV/0!	0.3876
b5	63.8100	74	0	16	#DIV/0!	3.6674

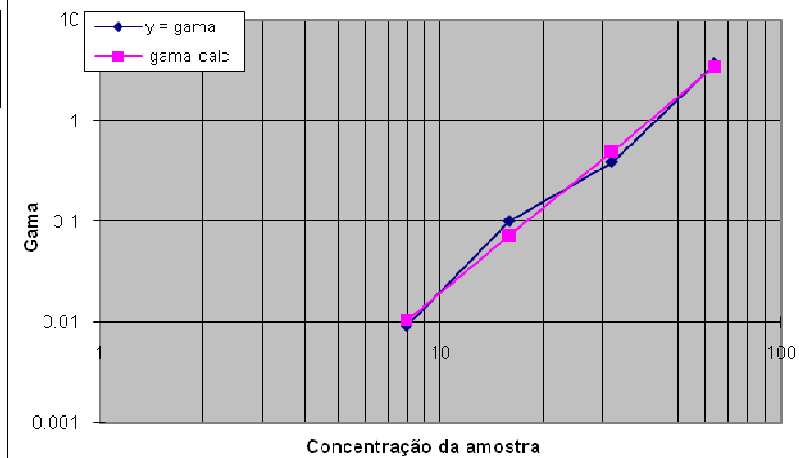
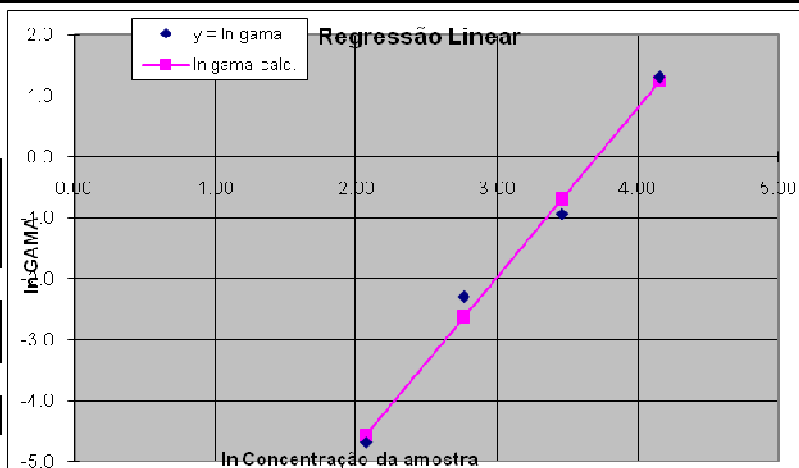
RESULTADO:

CE 50=	40.9199
Intervalo de confiança	
30.0780	55.6699

U.T.=	2.44
--------------	-------------

Fat. conf.=	1.3605
--------------------	---------------

CE 20=	24.8782
Intervalo de confiança	
18.2866	33.8458



Ensaio 08 - Hidrocloridrato de Fluoxetina CAS 56296-78-7 adquirido através da Sigma com grau de pureza de >90%

IPEN	FICHA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA TOXICIDADE AGUDA - MICROTOX	Nº Amostra
		ensaio 08

Procedência:	Unicamp	Bactéria (reagente) IPEN ACV10-02
Data:	08/10/2008	

TABELA DOS RESULTADOS OBSERVADOS E CALCULADOS:

Cubeta		Leit. Inicial	5 minutos	15 minutos		
b1		101	0	112		
	Concentração da amostra	Média razão dos brancos	0.0000	1.1089	Efeito Gama(5)	Efeito Gama(15)
b2	10.2200	93	0	100	#DIV/0!	0.0313
b3	20.4600	96	0	101	#DIV/0!	0.0540
b4	40.9400	99	0	85	#DIV/0!	0.2916
b5	81.9000	99	0	35	#DIV/0!	2.1366

RESULTADO:

CE 50=	66.2447
Intervalo de confiança	
39.0536	112.3676

U.T.=	1.51
-------	------

Fat. conf.=	1.6962
-------------	--------

CE 20=	33.9028
Intervalo de confiança	
19.9869	57.5075

