



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental



**Aplicação dos ensaios *Salmonella*/microsoma e MTT para avaliação da
mutagenicidade e citotoxicidade de águas submetidas à cloração e
fotocatálise**

Cássia Cabral e Souza

Ouro Preto, MG

2014



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental



Cássia Cabral e Souza

**Aplicação dos ensaios *Salmonella*/microsoma e MTT para avaliação da
mutagenicidade e citotoxicidade de águas submetidas à cloração e
fotocatálise**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Prof^ª. Dr.^a. Silvana de Queiroz Silva

Ouro Preto, MG
2014

S729a

Souza, Cássia Cabral e.

Aplicação dos ensaios *Salmonella*/microsoma e MTT para avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade de águas submetidas à cloração e fotocatalise. [manuscrito] / Cássia Cabral e Souza - 2014.

113f. : il., color.; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Tecnologias Ambientais.

1. Fármacos - Teses. 2. Testes de mutagenicidade - Teses. 3. Água – Estações de tratamento - Teses. 4. Cloração - Teses. I. Silva, Silvana de Queiroz . II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 628.161.3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB



Aplicação dos ensaios Salmonella/microsoma e MTT para avaliação da mutagenicidade e citotoxicidade de águas submetidas à cloração e fotocátalise

Autora: Cássia Cabral e Souza

Dissertação defendida e aprovada, em 17 de julho de 2014, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Professora Dr.ª. Silvana de Queiroz Silva - Orientadora
Universidade Federal de Ouro Preto

Gisele A. Rodrigues de Oliveira
Professora Dr.ª. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira
Universidade Federal de Goiás

Professor Dr. Sérgio Francisco de Aquino
Universidade Federal de Ouro Preto

**Dedico este trabalho aos meus pais
Olímpio e Maria do Carmo. Um
mínimo de gratidão ao amor
concedido!**

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela proteção, força e sabedoria.

Aos meus pais Olímpio e Maria do Carmo pelo amor incondicional, pelo apoio infundável, pela confiança, pelas oportunidades cedidas e por me ensinarem o valor dos estudos e do trabalho.

Às minhas irmãs e cunhados, Júnia e Rodrigo, Júlia e Sérgio, e Carolina. Às nossas amigas, cumplicidade, pela torcida e ótima convivência.

Aos meus sobrinhos, Eduardo, Pedro, César e Antônio que mesmo não apoiando diretamente me proporcionaram imensa alegria nos momentos de convivência.

Ao meu namorado Natan Barros, pelo grande amor, amizade maior que todas, por me fazer acreditar na minha capacidade, pelos inúmeros incentivos, pelos momentos mais do que agradáveis, leves e “abrandadores” de qualquer preocupação e descontentamento. E ainda, pela paciência e carinho.

A minha orientadora Profa. Silvana de Queiroz Silva pela oportunidade de trabalharmos juntas, pela paciência, compreensão da minha ansiedade, nervosismo e erros, pelas orientações/ensinamentos essenciais para a conclusão desse trabalho.

Aos amigos do PROAMB: Amanda, Francine, Kelly, Marina e Wellington pelos momentos de descontração com muitos “comes e bebes” e pela amizade.

A Julia Lino pelas amostras geradas, pela parceria e amizade.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida profissional e me incentivaram a seguir meus sonhos e a vida acadêmica, em especial a Profa. Elizete Rizzo e o Prof. Fausto Britto, ambos da UFMG.

Aos alunos do LBTM pelo companheirismo, amizade, pelos mutirões formados para me ajudar e pelos momentos convvidos – Ana Cláudia, Ana Luíza, Cyntia, Denise, Érica, Fernanda, Franciele, Laysa, Letícia, Paola, Rafael e Zé. Às professoras do LBTM – Cíntia e Célia, e ao professor Breno pela parceria no projeto e concessão das células.

Aos professores e professoras do PROAMB por me conduzirem a um novo aprendizado. A secretaria Vânia por sempre nos atender com muita educação e prontidão.

Aos Profs. Sérgio Aquino e Robson Afonso pela parceria e colaboração.

A Profa. Gisele Augusto pela ajuda que foi fundamental para o “desenrolar” do ensaio de mutagenicidade e que gentilmente esteve sempre disposta.

As minhas amigas pelas boas conversas, pela amizade de longa data e pelo companheirismo – Ana Cecília, Ana Emília, Deise, Lúcia, Luíza e Renata.

A Capes pela bolsa concedida.

A todos que colaboraram para que este trabalho fosse concluído!

RESUMO

Diversas classes de fármacos têm sido detectadas no ambiente em baixas concentrações (ng/L a µg/L), e mais recentemente em amostras de água tratada. A maioria das ETAs no Brasil opera com tratamento convencional da água sem a implantação de etapas específicas para a remoção de microcontaminantes. Quando fármacos entram em contato com o cloro, como o hipoclorito de sódio, na desinfecção podem ser oxidados e transformados em subprodutos com estrutura química e potencial tóxico algumas vezes desconhecidos. Os Processos Oxidativos Avançados (POA) como a fotocatalise com TiO₂/UV-C têm sido pesquisados como alternativa à cloração para aumentar a eficiência de remoção de tais compostos. Neste trabalho foi padronizada e implementada a técnica *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) para avaliação da mutagenicidade e aplicado o ensaio colorimétrico do MTT em células HepG2 para verificar a citotoxicidade dos fármacos captopril (CPT), diclofenaco (DCF) e sulfametoxazol (SMX) e dos seus possíveis subprodutos formados após cloração e fotocatalise com TiO₂/UV-C. As concentrações dos fármacos testadas foram 1, 0,75, 0,50, 0,25 e 0,01 mg/L e os tempos de contato de 5 e 30 min para a cloração e 120 min para a fotocatalise. A dose de cloro foi 1mg/L para o DCF e SMX e para o CPT 10 mg/L. A concentração de TiO₂ foi 120 mg/L. Os resultados do ensaio de mutagenicidade foram avaliados adotando três variáveis para interpretação dos dados (ANOVA, relação dose-resposta e razão de mutagenicidade). Com base nestas variáveis, os três fármacos e suas amostras cloradas e após fotocatalise não induziram mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura e substituição dos pares de base nas cepas TA98 e TA100 da bactéria *S. typhimurium* com (+S9) e sem (-S9) metabolização (mistura S9) nas doses testadas. Estes resultados estão de acordo com os dos testes de viabilidade celular por MTT em que os tratamentos da água com cloro e TiO₂/UV-C não causaram efeito tóxico para os fármacos CPT e DCF. Após o tratamento da água com estes fármacos observou-se um aumento da viabilidade celular sugerindo que ambos não induzem ação tóxica às células nas doses investigadas (0,8, 20, 40, 60, 80 ng/poço). Os resultados da citotoxicidade do SMX foram inconclusivos uma vez que apenas a dose intermediária (40 ng/poço) mostrou diminuição da viabilidade celular, o que indicaria um possível efeito tóxico após o tratamento com cloro.

Palavras-chave: Fármacos. Cloração. Fotocatalise. Subprodutos. Tratamento da Água. Mutagenicidade. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Several classes of drugs have been detected in the environment at low concentrations (ng/L a µg/L), and more recently in samples of treated water. Most Brazilian Water Treatment Plant (WTP) operates with conventional water treatment without the deployment of specific steps for removing microcontaminants. When drugs come into contact with chlorine as sodium hypochlorite for disinfection, they can be oxidized and transformed into products wich sometimes have unknown structure and toxic potential. The Advanced Oxidative Processes (AOP) as TiO₂/UV-C photocatalysis have been tested by different research groups to increase the efficiency of removal of such compounds. For this work was standardized and implemented *Salmonella* / microsome assay (Ames test) for evaluation of mutagenicity and applied the MTT colorimetric assay in HepG2 cells to verify the cytotoxicity of drugs captopril (CPT), diclofenac (DCF) and sulfamethoxazole (SMX) and the possible products formed after chlorination and photocatalysis with TiO₂/UV-C. The concentrations of the drugs tested were 1, 0,75, 0,50, 0,25 and 0,01 mg/L and contact time 5 and 30 min for chlorination and 120 min for photocatalysis. The dosage of chlorine was 1mg/L for DCF and SMX and for CPT was 10 mg/L. The concentration of TiO₂ was 120 mg/L. The results of the mutagenicity test were evaluated taking three variables for the interpretation of the data (ANOVA, dose-response relationship and mutagenicity ratio). Based on this approach, drugs and their chlorinated samples and after photocatalysis did not induce frameshift and base-pair substitution mutations in TA98 and TA100 strains of *S. typhimurium* bacteria with (+S9) and without (-S9) metabolic activation system (mix S9) at the doses tested. These results are in agreement with tests of cell viability by MTT in the treatment of water with chlorine and TiO₂/UV-C did not cause toxic effects to the cells for CPT and DCF drugs. After the water treatment with these drugs it was observed an increase in cell viability suggesting that both contaminant do not induce toxic effect to the cells at the doses investigated (0,8, 20, 40, 60, 80 ng/well). The results of the cytotoxicity of SMX were not conclusive since only the intermediate dose (40 ng/well) showed a decreased cell viability, which would indicate a possible toxic effect after treatment with chlorine.

Key-words: Drugs. Chlorination. Photocatalysis. By-products. Water Treatment. Mutagenicity. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estrutura molecular dos fármacos estudados.....	9
Figura 3.2 - Distribuição dos fármacos (e outros contaminantes emergentes), as principais transformações no ambiente, nas ETAs e ETEs.....	13
Figura 3.3 - Tipos de mutações detectadas pelas bactérias TA100 (a) e TA98 (b).....	32
Figura 3.4 - Estrutura molecular dos sais MTT e formazan.....	36
Figura 3.5 - Representação esquemática do mecanismo de redução do MTT.....	37
Figura 4.1 - Equipamento de <i>Jar test</i> utilizado para realização dos ensaios de cloração de amostras de água acrescidas dos fármacos.....	40
Figura 4.2 - Fotocatálise heterogênea com dióxido de titânio ativado por luz ultravioleta.....	41
Figura 4.3 - Esquema do procedimento do protocolo de pré-incubação para o ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma.....	48
Figura 4.4 - Modelos de relação dose-resposta. a) Constante (amostra negativa). b) Linear simples. c) Lintox1 (Linear atenuado por toxicidade exponencial simples). d) Lintox2 (Linear atenuado por toxicidade exponencial a segunda potência). X = doses de amostra. Y = média do número de revertentes por placa.....	50
Figura 4.5 - Layout de uma microplaca de 96 poços usada no ensaio de MTT com células HepG2, para três amostras com cinco doses e poços controle, todos em quintuplicata.....	54
Figura 5.1 - Média de revertentes e desvio padrão para as linhagens TA98 (a,b) e TA100 (c,d) da bactéria <i>Salmonella typhimurium</i> tratadas com cinco doses do captopril (CPT) e captopril clorado (CPT/NaClO), na presença (S9+) e ausência (S9-) de metabolização. **Diferente estatisticamente da respectiva amostra não clorada ($p < 0,05$).....	61
Figura 5.2 - Média de revertentes e desvio padrão para as linhagens TA98 (a,b) e TA100 (c,d) da bactéria <i>Salmonella typhimurium</i> tratadas com cinco doses do captopril (CPT) e captopril fotocatalisado (CPT/ TiO ₂ /UV-C), na presença (S9+) e ausência (S9-) de metabolização. **Diferente estatisticamente da respectiva amostra não clorada ($p < 0,05$).....	65
Figura 5.3 - Média de revertentes e desvio padrão para as linhagens TA98 (a,b) e TA100 (c,d) da bactéria <i>Salmonella typhimurium</i> tratadas com cinco doses do diclofenaco (DCF) e diclofenaco clorado (DCF/NaClO), na presença (S9+) e ausência (S9-) de metabolização. **Diferente estatisticamente da respectiva amostra não clorada ($p < 0,05$).....	70

- Figura 5.4** - Média de revertentes e desvio padrão para as linhagens TA98 (a,b) e TA100 (c,d) da bactéria *Salmonella typhimurium* tratadas com cinco doses do sulfametoxazol (SMX) e sulfametoxazol clorado (SMX/NaClO), na presença (S9+) e ausência (S9-) de metabolização. **Diferente estatisticamente da respectiva amostra não clorada ($p < 0,05$).....**75**
- Figura 5.5** - Viabilidade celular (%) de células HepG2 por massa de fármaco adicionado antes e após a cloração e fotocatalise. **Diferente estatisticamente da respectiva amostra não tratada ($p < 0,05$).....**81**

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Tabela 3.1** – Exemplos de trabalhos publicados com dados de detecção dos fármacos DCF e SMX em afluentes e efluentes de ETE, águas superficiais e água tratada, em diversos países.....**14**
- Tabela 3.2** - Genótipo das cepas TA98 e TA100 usadas para detectar mutagenicidade no presente trabalho.....**29**
- Tabela 4.1** - Características dos ensaios de cloração para cada fármaco estudado – Captopril, Diclofenaco e Sulfametoxazol.....**39**
- Tabela 5.1** - Taxa de reversão espontânea para as linhagens TA98 e TA100 da bactéria *Salmonella typhimurium* em número de revertentes por placa.....**57**
- Tabela 5.2** - Número de revertentes por placa induzidos pelos fármacos captopril original (CPT) e captopril clorado (CPT/NaClO) com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência e na presença de ativação metabólica exógena (S9).....**60**
- Tabela 5.3** - Número de revertentes por placa induzidos pelos fármacos captopril original (CPT) e captopril fotocatalisado (CPT/TiO₂/UV-C) com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência e na presença de ativação metabólica exógena (S9).....**64**
- Tabela 5.4** - Número de revertentes por placa induzidos pelos fármacos diclofenaco original (DCF) e diclofenaco clorado (DCF/NaClO) com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência e na presença de ativação metabólica exógena (S9).....**69**
- Tabela 5.5** - Número de revertentes por placa induzidos pelos fármacos sulfametoxazol original (SMX) e sulfametoxazol clorado (SMX/NaClO) com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência e na presença de ativação metabólica exógena (S9).....**74**
- Tabela 5.6** - Efeito dos fármacos originais (CPT, DCF e SMX), dos fármacos clorados (CPT/NaClO, DCF/NaClO e SMX/NaClO) e do captopril fotocatalisado (CPT/ TiO₂/UV-C) na citotoxicidade de células HepG2 testados em cinco doses em quintuplicata. Valores apresentados como média da absorbância ± desvio padrão (DP) e porcentagem de viabilidade celular.....**80**
- Tabela 5.7** - Potência mutagênica expressa em revertentes por nanograma (rev./ng) para os fármacos e fármacos após tratamento com cepas TA98 e TA100 da bactéria *Salmonella typhimurium*, na ausência (-S9) e na presença (+S9) de ativação metabólica.....**83**
- Tabela 5.8** - Resumo dos resultados obtidos no ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma e no ensaio de citotoxicidade pelo MTT, antes e após cloração e fotocatalise.....**86**

Quadro 3.1 - Ensaio de toxicidade para avaliação de compostos teste e amostras ambientais.....**25**

Quadro 3.2 - Resumo de trabalhos publicados utilizando o ensaio *Salmonella*/microsoma com diferentes formas para análise dos resultados.....**33**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
CAG	Carvão Ativado Granular
CAP	Carvão Ativado em Pó
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPT	Captopril
CPT/NaClO	Captopril Clorado
CPT/ TiO ₂ /UV-C	Captopril após fotocatalise
cm ²	centímetros quadrados
DCF	Diclofenaco
DCF/NaClO	Diclofenaco Clorado
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
Formazan	1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan
FPCP	Fármacos e Produtos de Cuidado Pessoal
HAP	Hydrocarboneto aromático policíclico
HepG2	<i>Human hepatocellular liver carcinoma cell line</i> (Hepatoma humano)
L	Litro (s)
LC-MS	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i> (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas)
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Concentração em mol / L
mg	Miligrama
mg/Kg	Miligrama por quilo
mg/L	Miligrama por litro
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
MN	Micronúcleos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo

µg/mL	Micrograma por mililitro
µg/L	Micrograma por litro
µg/placa	Micrograma por placa
µL	Microlitro (s)
µM	Micromolar
NaClO	Hipoclorito de Sódio
Na ₂ SO ₃	Tiosulfato de Sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
ng/L	Nanograma por litro
ng/poço	Nanograma por poço
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução salina fosfatada)
PCP	Produtos de Cuidado Pessoal
PE	Perturbador Endócrino
POA	Processos Oxidativos Avançados
q.s.p	Quantidade suficiente para
rev./ng	Revertentes por nanograma
RM	Razão de Mutagenicidade
SFB	Soro Fetal Bovino
SMX	Sulfametoxazol
SMX/NaClO	Sulfametoxazol Clorado
S9	Fração microsomal de fígado de rato
TCI	Troca entre cromátides irmãs
TiO ₂ /UV-C	Dióxido de Titânio
•OH	Radical hidroxila
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas e quadros.....	v
Lista de abreviaturas e siglas.....	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Geral.....	3
2.2 Específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Contaminação dos recursos hídricos por microcontaminantes	4
3.2 Características Gerais dos Fármacos estudados.....	7
3.3 Ocorrência dos fármacos no ambiente	9
3.4 Remoção de Fármacos no Tratamento da Água (Métodos Convencionais e Avançados).....	14
3.5 Avaliação Toxicológica dos Fármacos	19
4 MÉTODOS	39
4.1 Procedimentos de preparo das amostras	39
4.1.1 Ensaios de cloração	39
4.1.2 Fotocatálise do Captopril.....	40
4.1.3 Amostras de fármacos sem tratamento	41
4.2 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	41
4.2.1 Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma	41
4.2.2 Ensaio de Citotoxicidade pela técnica do MTT.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Implementação do ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma.....	56

5.2 Efeito da cloração e fotocatalise dos fármacos na mutagenicidade	57
5.2.1 Captopril	58
5.2.2 Diclofenaco.....	66
5.2.3 Sulfametoxazol	71
5.3 Efeito da cloração e fotocatalise dos fármacos na citotoxicidade	76
5.4 Considerações dos ensaios Salmonella/microsoma e do MTT para os fármacos estudados antes e após cloração e fotocatalise.....	83
6 CONCLUSÕES	88
7 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICES	103

1 INTRODUÇÃO

O aumento da contaminação dos corpos d'água por milhares de compostos químicos, sintéticos e naturais, tem se tornado um dos problemas ambientais mais preocupantes da humanidade. Muitos compostos são encontrados em baixas concentrações, na faixa de ng/L a µg/L, sendo, portanto, denominados microcontaminantes.

Dentre estes compostos são preocupantes os contaminantes como os fármacos, pelo potencial de afetarem a saúde da população, a biota aquática e os usos a que os recursos hídricos são destinados.

Os fármacos após administrados são eliminados juntamente com seus metabólitos via urina e fezes atingindo os corpos d'água pelo lançamento de esgoto. Além disso, o uso inapropriado, a disposição descontrolada, a ausência de regulamentações e o aumento excessivo no consumo de produtos farmacêuticos têm contribuído para maior ocorrência dessa classe de microcontaminantes no ambiente e os riscos à exposição. Os impactos dos fármacos no ambiente aquático e os efeitos na saúde humana são ainda pouco conhecidos (KÜMMERER, 2010).

A presença de fármacos nas águas superficiais indica a persistência ambiental e algumas vezes ao lançamento de esgoto *in natura*. Quando presentes nas águas submetidas ao tratamento nas Estações de Tratamento de Água (ETA) os fármacos não são completamente removidos (LIMA et al., 2014), podendo alcançar a água de consumo humano (STACKELBERG et al., 2004). No entanto, ainda não estão claras as implicações associadas à exposição crônica por meio do consumo de água potável para fármacos (BENOTTI et al., 2009) o que aumenta a preocupação da presença de tais compostos na água.

Nos processos convencionais do tratamento de água, quando em contato com os compostos de cloro, os fármacos e outros microcontaminantes orgânicos podem ser oxidados e convertidos em subprodutos. Estudos já apontaram efeitos, como genotoxicidade e toxicidade aguda, provenientes da desinfecção com cloro de compostos orgânicos (RICHARDSON et al., 2007), no entanto, estes estudos com fármacos precisam ser complementados. Os riscos aumentam em países como o Brasil onde a grande maioria das ETAs emprega a desinfecção com cloro. Os efeitos tóxicos e quais os subprodutos formados a partir da cloração dos fármacos captopril (CPT), diclofenaco (DCF) e sulfametoxazol (SMX) estão sendo investigados e estudos adicionais devem, portanto, ser implementados.

Métodos analíticos, como análises químicas, podem ser utilizados para avaliar a presença de fármacos e seus subprodutos em baixas concentrações e em diversas matrizes ambientais. No entanto, tais técnicas não permitem uma investigação completa da ameaça potencial em relação aos riscos que estes microcontaminantes representam. Por isso, ensaios biológicos têm sido mais empregados e estão sendo considerados instrumentos valiosos para avaliar os efeitos adversos de microcontaminantes. Estudos de mutagenicidade, genotoxicidade, toxicidade aguda e citotoxicidade de microcontaminantes como os fármacos estão sendo mais usualmente empregados.

Desde o ano de 2006 nossa equipe tem desenvolvido trabalhos que envolvem o diagnóstico da presença de microcontaminantes orgânicos em mananciais de abastecimento e em água para consumo humano, bem como a avaliação de sistemas convencionais e o desenvolvimento de tecnologias avançadas de tratamento de água para a remoção de tais contaminantes. Dentre os diversos contaminantes orgânicos estudados, destacam-se as classes de fármacos e perturbadores endócrinos.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi analisar o potencial tóxico dos fármacos captopril, diclofenaco e sulfametoxazol, e dos possíveis subprodutos formados pela cloração e fotocatalise heterogênea em induzirem mutagenicidade pelo ensaio *Salmonella*/microsoma e citotoxicidade pelo ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar o potencial mutagênico e citotóxico de três fármacos representantes das classes antibiótico (sulfametoxazol), antihipertensivo (captopril) e antiinflamatório (diclofenaco) bem como de seus subprodutos em amostras de água submetidas à dois distintos processos de tratamento .

2.2 Específicos

- Implementar ensaios biológicos de mutagenicidade pelo ensaio *Salmonella*/microsoma (teste de Ames).
- Avaliar a mutagenicidade dos três fármacos e dos subprodutos nas amostras de água submetidas à cloração e TiO₂/UV-C pelo teste de Ames utilizando as cepas TA98 e TA100 da bactéria *Salmonella typhimurium*, na presença e ausência de metabolização.
- Avaliar a citotoxicidade dos fármacos e dos subprodutos nas amostras de água submetidas à cloração e TiO₂/UV-C pelo teste do MTT

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Contaminação dos recursos hídricos por micropoluentes

Os problemas de qualidade da água são preocupações que a humanidade continua enfrentando no século XXI. Como um dos determinantes da saúde humana, os impactos se dão devido à ausência de saneamento adequado e, relacionado a isso, à ausência de segurança da água fornecida, o que afeta parte considerável da população mundial (SCHWARZENBACH et al., 2010).

O aumento desordenado dos centros urbanos e a ausência de investimentos em infraestrutura, atrelado ao incremento dos processos industriais e da agricultura, têm levado à contaminação da água por meio do despejo de efluentes *in natura* ou com tratamento ineficaz, prejudicando a biota aquática, a saúde do ser humano e a qualidade ambiental das águas. Não admiravelmente a poluição química das águas naturais é uma das principais preocupações em quase todas as partes do mundo. No Brasil, embora a disponibilidade hídrica superficial seja considerável, principalmente quando comparada a outros países, a distribuição das águas é muito desigual. Além disso, a falta de legislação e de monitoramento a compostos específicos pode comprometer os corpos d'água brasileiros com a presença de diversos contaminantes, levando a um prejuízo da qualidade das águas no país.

O avanço tecnológico no campo da síntese química contribuiu para a inserção no mercado de milhares de novos compostos para diversos fins, os quais alcançam os corpos d'água, aumentando a exposição humana a substâncias muitas vezes desconhecidas. São especialmente preocupantes substâncias conhecidas como contaminantes emergentes que, no geral, não estão regulamentadas e, portanto, não tem os níveis permitidos determinados para ambientes específicos, estando ausentes ainda nos programas de monitoramento (CABEZA et al., 2012; DIRTU et al., 2012).

Quando encontradas em baixas concentrações no ambiente ($\mu\text{g/L}$ ou ng/L) são também denominadas microcontaminantes, porém muitas vezes o suficiente para causar efeitos adversos nos organismos expostos (JARDIM et al., 2012; KÜMMERER, 2010; SODRÉ et al., 2009).

Os contaminantes emergentes constituem uma categoria ampla de produtos químicos previamente desconhecidos ou não reconhecidos como sendo de grande preocupação, mas que estão sob crescente estudo científico (DIRTU et al., 2012). Como não estão

regulamentados, os níveis permitidos não foram ainda estabelecidos e não são rotineiramente monitorados. A Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), que dispõe sobre o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano, e a Resolução 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2011), que estabelece os padrões de lançamento de efluentes, apesar de apresentarem limites para algumas classes de substâncias químicas com risco potencial a saúde, não apresentam limites para todos os contaminantes emergentes. Atualmente a inclusão de limites para tais contaminantes encontra-se em discussão pelo Ministério da Saúde. Dentre os aspectos discute-se que limites poderiam ser estabelecidos desde que estudos acerca da ocorrência, dinâmica destes no ambiente, sua remoção em sistemas de tratamentos de água e, principalmente, estudos sobre a sua toxicidade fossem realizados (Sérgio F. Aquino, comunicação pessoal). Como estes contaminantes são amplamente usados podem contribuir para maior exposição humana. Algumas lacunas ainda estão presentes com relação a alguns destes compostos, como a toxicidade, bioacumulação, exposição humana, ocorrência, mecanismos de transporte e biotransformação (DIRTU et al., 2012).

Alguns exemplos de poluentes emergentes são: fármacos (analgésicos, antiinflamatórios, drogas psiquiátricas, antilipêmicos e antibióticos), produtos de diagnóstico (por exemplo, agentes de contraste de raios-X), esteróides e hormônios, anti-sépticos, ingredientes de produtos de cuidados pessoais (PCP, por exemplo, agentes de proteção ao sol e perfumes), aditivos de gasolina, surfactantes, novos pesticidas, perturbadores endócrinos e subprodutos da desinfecção da água e do esgoto (CABEZA et al., 2012; FARRÉ et al., 2008).

Sobre esta classe de compostos antropogênicos é importante o conhecimento sobre a exposição e predição dos efeitos, monitoramento nas diversas matrizes ambientais, investigação das fontes de poluição, estabelecimento dos limites de exposição para a proteção do meio ambiente e da saúde humana.

A forma como estes contaminantes orgânicos entram no ambiente depende do padrão de uso e modo de aplicação, isto é, lançamento dos efluentes doméstico, industrial e da agricultura, excreção (no caso dos fármacos) e derramamento acidental (FARRÉ et al., 2008). Microcontaminantes têm sido amplamente encontrados em águas naturais nos últimos 25 anos, tanto em áreas industriais quanto em ambientes remotos (SCHWARZENBACH et al., 2006).

Contaminantes emergentes como fármacos e metabólitos, produtos de cuidado pessoal (PCP), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), pesticidas e perturbadores endócrinos

(PE), dentre outros têm sido detectados em efluentes, águas superficiais, água tratada e potável (CABEZA et al., 2012; BENOTTI et al., 2009; KOLPIN et al., 2002; HIRSCH et al., 1999; TERNES et al., 1999).

A não remoção de muitos destes compostos do esgoto nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) faz com que os mesmos sejam lançados nos corpos d'água. Somado a isso, muitos deles possuem natureza recalcitrante, persistindo ao longo do tratamento, sendo lançados muitas vezes inalterados. Estes corpos d'água servem, muitas vezes, de fonte de abastecimento para as Estações de Tratamento de Água (ETAs).

Somado a isso, microcontaminantes podem ser apenas parcialmente removidos nas ETAs, podendo alcançar a água tratada e a de abastecimento à população. Além de não serem regulamentados na portaria que define o padrão de potabilidade da água, outro grande problema atrelado ao tratamento da água é que quando estes compostos entram em contato com o cloro, um forte oxidante, na etapa de desinfecção, podem formar subprodutos muitas vezes de natureza desconhecida.

Embora a maioria dos compostos se encontre em baixas concentrações, muitos deles aumentam consideravelmente a preocupação toxicológica, sobretudo quando encontrados em misturas complexas (SCHWARZENBACH et al., 2006). Algumas das questões que deve ser levada em consideração com relação aos poluentes ambientais são os efeitos adversos que eles podem causar aos organismos expostos. Quanto aos fármacos, os danos causados pela exposição crônica ainda não estão claros, assim como para o conjunto de contaminantes traços.

Os organismos aquáticos e o ser humano estão suscetíveis aos microcontaminantes isolados e à mistura complexa de compostos químicos. A adição ou efeitos sinérgicos de tais misturas pode torná-las perigosas (SCHWARZENBACH et al., 2006). Os perigos relacionados à saúde humana ainda não são satisfatoriamente conhecidos.

Com relação aos fármacos estudados no presente trabalho e pelo nosso grupo de pesquisa, poucos estudos apontam para os efeitos dos mesmos no ambiente e em contato com o ser humano em longo prazo, e ainda, os efeitos dos subprodutos da degradação no organismo para a maioria deles ainda são pouco conhecidos.

3.2 Características Gerais dos Fármacos estudados

No grupo dos contaminantes emergentes os fármacos pertencem a uma classe de microcontaminantes conhecida como “Fármacos e Produtos de Cuidado Pessoal” proveniente do termo em inglês “*Pharmaceuticals and personal care products*” (DAUGHTON, 2005). Os produtos farmacêuticos assim como os produtos de cuidado pessoal têm recebido atenção especial nos últimos anos, devido à intensa produção e, principalmente, ao uso generalizado e contínuo em humanos e animais (DAUGHTON, 2002).

Vários estudos, em vertentes diversas, estão sendo conduzidos com os fármacos, pois por ano são produzidas toneladas de medicamentos usados tanto na medicina humana quanto veterinária, e seu descarte inapropriado ou a não remoção nos processos de tratamento de esgoto tem levado à contaminação das águas superficiais (BILA e DEZOTTI, 2003).

Um fármaco pode ser denominado como toda substância de estrutura química definida, capaz de modificar ou explorar o sistema fisiológico ou estado patológico, em benefício do organismo receptor (OGA, 2003).

Os fármacos são substâncias químicas moderadamente solúveis em água, lipofílicas e biologicamente ativas usadas para o tratamento de doenças. Esses compostos são classificados pela atividade biológica, pela estrutura química ou modo de ação. Quanto à atividade biológica podem ser divididos em analgésicos, antitérmicos, antiinflamatórios, antiepiléticos, antibióticos, anti-hipertensivos, hormônios, dentre outros (KÜMMERER, 2010).

Os mecanismos de ação dos fármacos são diversificados, variando de acordo com a classe pertencente. Uma vez administradas essas substâncias são absorvidas no organismo, sendo parcialmente metabolizadas e então excretadas nas formas original, associada ou como metabólitos. Quando essas substâncias são excretadas pela urina e fezes, de seres humanos e animais, alcançam o esgoto doméstico (MELO et al., 2009; BILA & DEZOTTI, 2003).

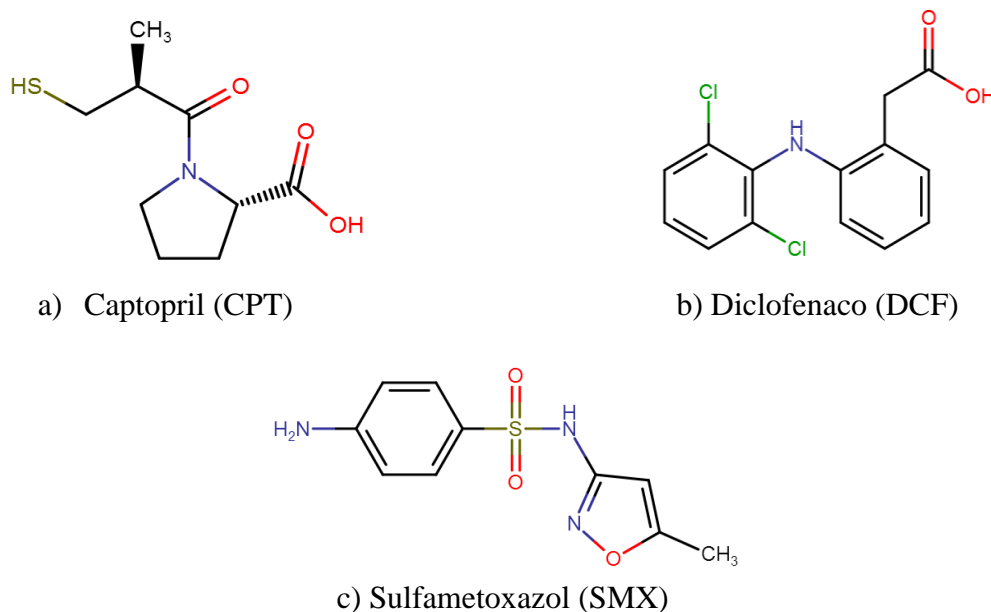
Os fármacos estudados no presente trabalho foram Captopril, Diclofenaco e Sulfametoxazol. As principais características deles estão descritas a seguir.

O Captopril (CPT) (FIG. 3.1a) é um fármaco utilizado no tratamento da hipertensão e em insuficiência cardíaca após infarto do miocárdio. A droga é em grande parte excretada na urina, sendo cerca de 40-50% na forma inalterada, e o restante como dissulfeto e outros metabólitos (SWEETMAN, 2009). A hipertensão é o maior problema de saúde por todo mundo, devido alta prevalência e associação com aumento do risco de doenças cardiovasculares (MAHMOUD & KÜMMERER, 2012).

O diclofenaco (DCF) (FIG. 3.1b) é um antiinflamatório não esteroideal sintético e um dos mais prescritos no Brasil. Quando administrado ele é rapidamente absorvido no corpo onde é metabolizado e então excretado na forma de conjugados, principalmente através da urina (cerca de 60%), mas também pela bile (cerca de 35%). Menos de 1% do diclofenaco é excretado na forma inalterada (SWEETMAN, 2009).

O sulfametoxazol (SMX) (FIG. 3.1c) é um antibiótico pertencente à classe das sulfonamidas utilizado para o tratamento de infecções respiratórias, urinárias, gastrintestinais e outros tipos de infecções. Quando o fármaco é ministrado ele é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal. O SMX é normalmente administrado via oral com uma dose inicial de 2g, seguido por 1g duas vezes ao dia. Quando o paciente apresenta infecções severas é medicado com 1g três vezes ao dia. Cerca de 80% a 100% da dose é excretada na urina, da qual aproximadamente 60% na forma de derivados com um restante de fármaco inalterado (35-50%) (SWEETMAN, 2009). A principal ação do SMX é bacteriostática, embora o fármaco possa também ser bactericida, quando associado à trimetropina. O SMX age sobre vários tipos de micro-organismos como cocos gram-positivos e gram-negativos, cocobacilos gram-negativos, dentre outros. No grupo das Enterobacteriaceae a sensibilidade varia entre as bactérias. Cepas de *Salmonella* são na maioria das vezes sensíveis ao fármaco (SWEETMAN, 2009). Como todos os antibióticos, a preocupação com esses fármacos no ambiente está relacionada aos problemas ambientais como a contaminação dos recursos hídricos, e aumento da resistência das bactérias em contato com os mesmos (BILA & DEZOTTI, 2003).

Figura 3.1 - Estrutura molecular dos fármacos estudados.



Fonte: TOXNET – Toxicology Data Network. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/>

3.3 Ocorrência dos fármacos no ambiente

A presença de fármacos no esgoto e nas águas naturais é esperada devido à alta produção e uso difundido, além de baixa biodegradabilidade e alta solubilidade. O Brasil é um dos dez maiores consumidores de produtos farmacêuticos do mundo, junto com os Estados Unidos, França e Alemanha (BERMUDEZ et al., 2000; STUMPF et al., 1999), sendo que muitas vezes estes produtos são usados sem prescrição médica. Arelado a isso, muitos fármacos são produzidos para serem relativamente estáveis e polares para alcançarem os órgãos alvo. Por isso, são parcialmente metabolizados no corpo e excretados no esgoto (excreção metabólica), com porcentagem considerável na forma inalterada. Isto pode ser confirmado pelos dados de metabolização descritos para CPT, DCF e SMX no tópico anterior.

A principal rota de entrada de resíduos de fármacos no ambiente é o lançamento de esgotos domésticos, tratados ou *in natura*, nos cursos d'água. No caso dos fármacos consumidos pelo ser humano parte deles entra no sistema aquático na forma inalterada ou como metabólito, após passagem pela ETE, pois devido às suas estabilidades, são apenas parcialmente removidos durante o tratamento na ETE (GARTISER et al., 2012; MELO et al.,

2009). Além disso, deve-se considerar a produção do esgoto hospitalar, o lançamento de fármacos sem ser consumidos ou fora do prazo de validade e os de uso veterinário, quando as drogas são deliberadamente introduzidas no ambiente (FIG.3.2) (DELGADO et al., 2012; FARRÉ et al., 2008; TERNES et al., 2002).

Diversos estudos detectaram a presença de fármacos e seus metabólitos, além de outros microcontaminantes, em concentrações na faixa de ng/L a µg/L, de classes distintas, em afluentes e efluentes de ETEs confirmando a remoção incompleta nos processos de tratamento de esgoto (GARTISER et al., 2012; CARBALLA et al., 2004; TERNES, 1998). Além disso, os fármacos podem ser transformados no tratamento de esgoto em produtos da transformação (PT), devido à ação biocida ou à estrutura química complexa que não permite mineralização, e essa mudança estrutural resulta em novos químicos com novas propriedades (KÜMMERER, 2010; MELO et al., 2009).

O tratamento do efluente engloba etapas para remoção de sólidos grosseiros (tratamento preliminar), remoção de sólidos sedimentáveis (tratamento primário) e a remoção da matéria orgânica pelo tratamento secundário onde predomina o processo biológico. Algumas vezes é implementado ainda o tratamento terciário para a remoção de poluentes específicos. O sistema de lodos ativados, o mais empregado no Brasil para tratamento do esgoto doméstico, utiliza o tratamento aeróbio do esgoto, e consiste na recirculação do lodo no reator biológico. Este tipo de tratamento, não dimensionado especificamente para remoção de poluentes traço, não remove completamente os contaminantes emergentes oriundos do afluente, alcançando algumas vezes uma remoção máxima de 65% para fármacos, incluindo antiinflamatórios (DCF) e antibióticos (SMX) (CARBALLA et al., 2004). Ingerslev & Halling-Sorenses (2000) observaram que doze diferentes sulfonamidas não foram biodegradadas no sistema de lodos ativados. Num estudo de revisão Aquino, Brandt & Chernicharo (2013) apontaram que para os fármacos mais comumente detectados no esgoto, a eficiência de remoção no sistema de lodos ativados variou de intermediária (20 a 80%) a baixa (< 20%). A possibilidade dos fármacos serem removidos no sistema de lodos ativados é através da adsorção em partículas (interações hidrofóbicas e eletrostáticas) ou pela biontransformação (SEDLAK & PINKSTON, 2001). No entanto, infelizmente pode ocorrer o aumento da concentração de alguns fármacos, como DCF e SMX, ao longo do tratamento, atribuído ao fenômeno de hidrólise de conjugados presentes no esgoto ou a degradação incompleta de precursores (AQUINO, BRANDT & CHERNICHARO, 2013).

Algumas opções de tratamento adicional estão sendo estudadas e aos pouco adotadas para remover tais compostos. Alguns exemplos de complementação ao tratamento de lodos ativados são a ozonização, carvão ativado e processos de membranas (osmose reversa e nanofiltração). Um estudo de monitoramento de fármacos de diversas classes, incluindo o sulfametoxazol, em afluente e efluente de uma planta piloto, adotando uma combinação de bioreator de membrana e osmose reversa demonstrou uma remoção de até 99% (DOLAR et al., 2012). Neste trabalho, os autores observaram uma remoção superior a 99% para contaminantes emergentes, entre eles o antibiótico sulfametoxazol, quando combinado um bioreator de membrana com osmose reversa. Estudos já mostraram, no entanto, que embora o tratamento avançado do esgoto, com ultra filtração, osmose reversa e desinfecção com UV possa proporcionar uma alta taxa remoção a mesma não alcança 100% no tratamento de tais compostos (CABEZA et al., 2012).

No ambiente, poluentes emergentes estão sujeitos a processos como biodegradação, degradação química e fotoquímica, hidrólise, dentre outros processos (FARRÉ et al., 2008). No entanto, a mineralização completa destes compostos pode não ocorrer (MAHMOUD & KÜMMERER, 2012). A ocorrência de fármacos no ambiente aquático pode indicar então além da elevada aplicação e excreção, uma estabilidade relativamente elevada desses compostos em condições ambientais (TERNES, 1998).

Inúmeros estudos já demonstraram a presença de fármacos e outros microcontaminantes em águas superficiais no Brasil e em diversos países do mundo. Isto se deve principalmente ao lançamento dos efluentes das ETEs como exposto anteriormente.

Quando os corpos d'água, com potencial para abastecimento, são contaminados por fármacos e outros microcontaminantes aumentam-se os riscos à população exposta caso os mesmos não sejam removidos à valores permitidos pela legislação no tratamento da água na Estação de Tratamento de Água (ETA). O que mantém segura a saúde da população abastecida é uma eficiente remoção de diversos compostos durante o tratamento.

Nos últimos anos, com o avanço da tecnologia e maior preocupação com a exposição aos compostos orgânicos emergentes, eles tem sido analisados em águas tratadas, destinadas ao consumo humano. No entanto, são ainda escassas as informações sobre a ocorrência de produtos farmacêuticos e até mesmo outros contaminantes emergentes nestas águas (DELGADO et al., 2012). Os poucos dados de detecção de fármacos e outros poluentes orgânicos obtidos na água tratada indicam que estes passaram pelo tratamento da água sem serem removidos.

O fator de maior influência na eficiência de remoção de poluentes da água é a interação com partículas sólidas naturais (sedimentos e micro-organismos) ou adicionadas ao meio (carvão ativado e coagulantes), devido esta habilidade alguns compostos podem ser removidos por processos físico-químicos (CARBALLA et al., 2004). Além disso, os poluentes podem ser oxidados pelo cloro levando à remoção dos mesmos.

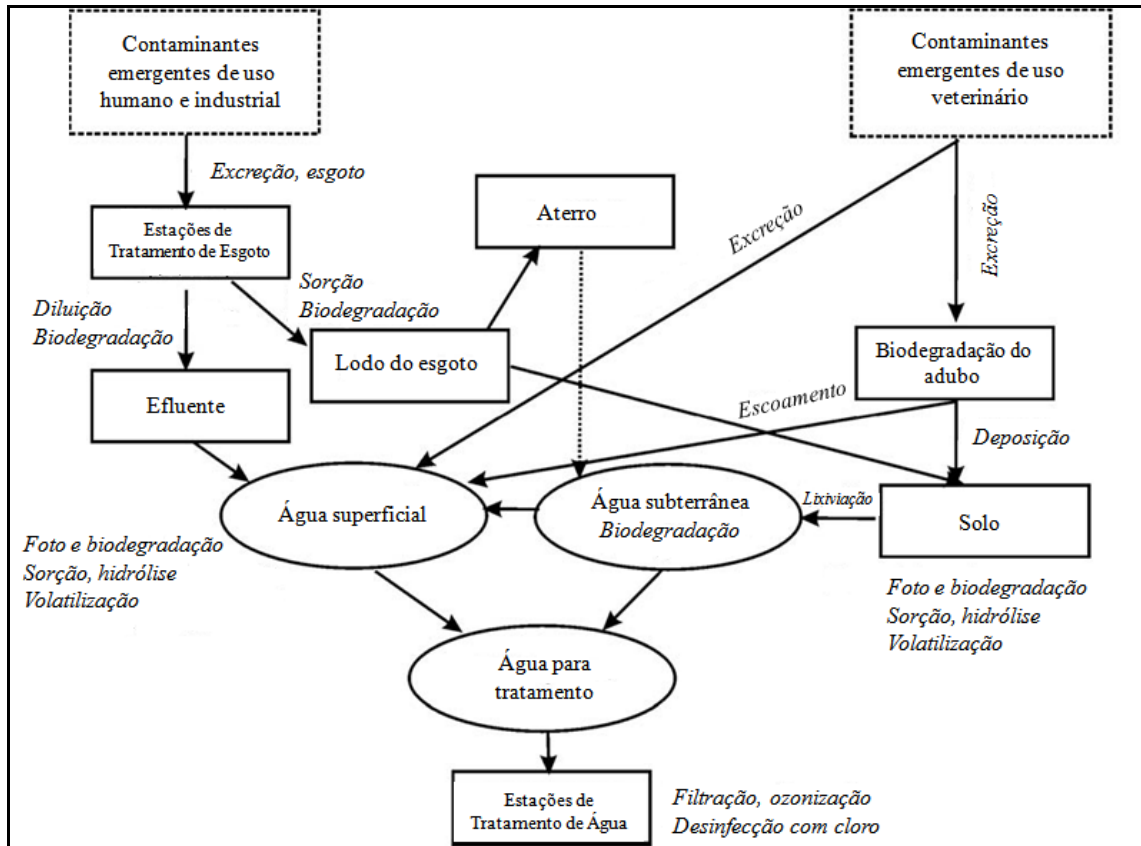
Alguns compostos presentes nestas águas tanto no Brasil, como em outros países, aumenta a preocupação do possível risco à saúde. Poluentes emergentes podem ser transformados no tratamento da água da mesma forma como do esgoto, gerando produtos que podem diferir em seu comportamento no ambiente e no perfil eco-toxicológico.

Embora os dados para fármacos na água potável sejam ainda incipientes e os compostos que já foram detectados sempre estiveram em baixas concentrações, a situação futura será mais preocupante se os corpos d'água seguirem esta tendência de contaminação e a distância entre ETEs e fontes de captação se tornarem menores.

Um breve resumo de dados de detecção dos fármacos DCF e SMX em afluentes e efluentes de ETE, águas superficiais e água tratada está representado na TAB. 3.1. A distribuição dos fármacos e seus metabólitos e as principais transformações está representada na FIG.3.2.

O antihipertensivo captopril não foi detectado nas matrizes ambientais (afluente e efluente de ETE, águas superficiais e água tratada) levantadas no presente trabalho e apresentadas na TAB.3.1. Vale ressaltar a escassez de dados para este fármaco e o único trabalho localizado para o mesmo foi o estudo do comportamento do CPT e do seu metabólito (dissulfeto de captopril) na biodegradação e fotodegradação (MAHMOUD & KÜMMERER, 2012).

Figura 3.2 - Distribuição dos fármacos (e outros contaminantes emergentes), as principais transformações no ambiente, nas ETAs e ETEs.



Fonte: FARRÉ et al. (2008) traduzido e adaptado.

Tabela 3.1 – Exemplos de trabalhos publicados com dados de detecção dos fármacos DCF e SMX em afluente e efluente de ETE, águas superficiais e água tratada, em diversos países.

Condições	Localidade	Compostos e Concentrações	Referência	
Afluente	Espanha	SMX: 0,6 µg/L	CARBALLA et al., 2004	
	Brasil (RJ)	(DCF: 0,8 µg/L)	STUMPF et al., 1999	
ETEs	Espanha	DCF: 60,5 a 263,5 ng/L e SMX: 65 a 102,25 ng/L	CABEZA et al., 2012	
	Efluente	Espanha	DCF: 320-460 ng/L	QUINTANA et al., 2010
		Espanha	SMX: 0,25 µg/L	CARBALLA et al., 2004
		Alemanha	SMX: 0,40 µg/L	HIRSCH et al., 1999
		Brasil (RJ)	DCF: 0,02-0,06 µg/L	STUMPF et al., 1999
Alemanha	DCF: 0,81 µg/L	TERNES, 1998		
Águas superficiais	Alemanha	SMX: 0,03 µg/L	HIRSCH et al., 1999	
	Alemanha	DCF: 0,01-0,06 µg/L	STUMPF et al., 1999	
	Brasil (RJ)	DCF: 0,15 µg/L	TERNES, 1998	
	Espanha	DCF: 1,1 ng/L; SMX: 12 ng/L	BENOTTI et al., 2009	
	Brasil	SMX: 0,15 µg/L	KOLPIN et al., 2002	
	Brasil	DCF e SMX: >100 ng/L	SACHER et al., 2001	
Água tratada	Espanha	Concentração média SMX: 0,39 ng/L e 0,32 ng/L no sistema de distribuição	BENOTTI et al., 2009	
	Brasil (SP)	DCF: 1 ng/L; SMX: 0,8 ng/L	VULLIET et al., 2011	
	França	SMX: 2 ng/L	KLEYWEGT et al., 2011	

3.4 Remoção de Fármacos no Tratamento da Água (Métodos Convencionais e Avançados)

Os dados de detecção de compostos no ambiente indicam que é cada vez mais difícil encontrar fontes de água livre de poluentes, inclusive as destinadas ao abastecimento populacional. Para que os fármacos e outros microcontaminantes não sejam encontrados na água potável eles devem ser removidos durante o tratamento nas estações de tratamento de água (ETAs).

No Brasil, a maioria das ETAs opera com tratamento convencional da água cujos principais processos são: clarificação (coagulação, floculação e sedimentação), filtração e

desinfecção (cloração). Juntos estes processos consistem numa barreira à passagem de partículas suspensas e dissolvidas e micro-organismos para a água tratada (LIBÂNIO, 2010).

A clarificação remove sólidos suspensos e parcela dos sólidos dissolvidos, que são precipitados, agregados e sedimentados no processo. É durante a filtração que sólidos dissolvidos e alguns micro-organismos são extraídos da água. A última etapa, a desinfecção, consiste na inativação dos micro-organismos (LIBÂNIO, 2010). No tratamento convencional não há nenhuma etapa específica para remoção de microcontaminantes como os fármacos. Contudo, estes podem se adsorver às partículas presentes na água e às partículas hidróxido de metal formadas na coagulação. Dessa forma, a precipitação química pode remover moderadamente contaminantes emergentes que são então adsorvidos (SNYDER et al., 2003), além disso, parte dos fármacos e outros microcontaminantes podem sofrer oxidação.

Dados da literatura apontam, no entanto, que os processos convencionais de tratamento de água são substancialmente ineficientes para reduzir as concentrações de fármacos em água (BENOTTI et al., 2009; BILA e DEZOTTI, 2003; U.S.EPA, 2001).

Se os fármacos e outros microcontaminantes passarem pela clarificação sem serem removidos tais compostos alcançam as etapas finais do tratamento e podem ser, portanto, removidos através da oxidação com cloro aplicado na última etapa do tratamento.

Um estudo da avaliação de remoção de 20 fármacos e 25 perturbadores endócrinos (PE) por Benotti et al. (2009) demonstrou que os fármacos diclofenaco e sulfametoxazol foram mais eficientemente removidos quando tratados com ozônio em relação ao cloro. A remoção de fármacos e produtos de cuidado pessoal (FPCP) e PE foi analisada no tratamento convencional e após adição de carvão ativado em pó (CAP) e ozônio (WESTERHOFF et al., 2005). Foi observada uma baixa remoção no tratamento convencional e um aumento substancial após adição de CAP e ozônio.

Os parâmetros microbiológicos da água sempre foram tema de maior preocupação, frente à contaminação química, tendo em vista a grande incidência de doenças infecciosas de veiculação hídrica no Brasil. Com isso, a desinfecção com cloro, já empregada há centenas de anos, sempre atendeu a principal demanda para promover uma água de qualidade para a população brasileira.

A cloração tem extrema importância no tratamento da água, devido a esta remoção de micro-organismos patogênicos, reduzindo as taxas de mortalidade por doenças veiculadas pela água, melhorando assim as condições de saúde pública. O cloro é um forte oxidante capaz de reagir com compostos químicos orgânicos e inorgânicos, sendo que o cloro livre é

capaz de oxidar compostos fenólicos (ALUM et al., 2004; HU et al., 2002). A reação resulta numa sucessiva adição de cloro ao anel aromático seguida pela clivagem do mesmo (SNYDER et al., 2003). Os fármacos diclofenaco e sulfametoxazol apresentam alta reatividade com cloro. Isto foi atribuído a presença de amins primárias ou secundárias e pode ser comprovado num estudo quando após tempo de contato com o desinfetante foram removidos para abaixo dos limites de detecção (WESTERHOFF et al., 2005).

Além das cinéticas de oxidação do cloro para remoção dos microcontaminantes, a formação de subprodutos também deve ser analisada, pois para todos agentes de desinfecção numerosos subprodutos são gerados (GARTISER et al., 2012). Embora mais de 600 subprodutos emergentes tenham sido reportados na literatura (RICHARDSON et al., 2007) menos de 100 foram analisados quantitativamente quanto à ocorrência ou os efeitos na saúde (HEBERT et al., 2010). Subprodutos dos fármacos diclofenaco (QUINTANA et al., 2010) e sulfametoxazol (DODD & HUANG, 2004) resultantes da reação com cloro na desinfecção foram detectados por análises químicas confirmando a formação destes compostos.

Os estudos para subprodutos dos fármacos são relativamente recentes e pouco se sabe sobre os seus efeitos toxicológicos. Apesar da resolução vigente no Brasil para potabilidade da água registrada pela Portaria 2914 do Ministério da Saúde estabelecer limites para produtos secundários da desinfecção, os mesmos se referem à apenas subprodutos formados pela cloração da matéria orgânica natural presente em concentrações na faixa de mg/L na água.

A influência das técnicas do tratamento da água na remoção de microcontaminantes e/ou formação de subprodutos recebeu pouca atenção por muitos anos. No entanto, recentemente uma maior preocupação tem sido atribuída a estes compostos e aos riscos provenientes dos mesmos. A identidade dos produtos de degradação dos fármacos e os riscos associados são ainda pouco conhecidos (KÜMMERER, 2010; MELO et al., 2009).

A maioria dos estudos epidemiológicos e toxicológicos sobre cloração da água é baseada, principalmente, nos diferentes tipos de desinfetantes de cloro e nos compostos halogenados, como os trihalometanos (THM) e ácidos haloacéticos, formados a partir da cloração de águas naturais contendo compostos orgânicos como ácidos húmicos e fúlvicos, e material algal (GOPAL et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007; WHO, 2004; MONARCA et al., 1998). Já na década de 1980 os efeitos negativos do cloro sobre estas substâncias e a formação de compostos genotóxicos foram levantados (MEIER, 1988). Além disso, os efeitos dos subprodutos da cloração destas substâncias foram estudados e já foram observadas mutagenicidade e carcinogenicidade (GUZZELLA et al., 2004). Neste mesmo trabalho os

autores investigaram a genotoxicidade, através do emprego de testes *in vitro*, da água após a cloração com três diferentes desinfetantes. Eles observaram que o efeito foi aumentado após o uso do NaClO e ClO₂, e ligeiramente reduzido com ácido peracético (PAA).

Subprodutos e metabólitos da degradação são preocupantes, pois eles podem apresentar uma toxicidade similar ou maior que os compostos que os originam. No entanto, informações sobre os efeitos tóxicos da maioria destes compostos sobre os organismos vivos é ainda muito limitada (NIKOLAOU et al., 2007; DELGADO et al., 2012). Inúmeros efeitos tóxicos como mutagenicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade e/ou citotoxicidade, foram relatados por HEBERT et al. (2010) para diversos subprodutos gerados a partir de agentes de desinfecção como cloro, dióxido de cloro, cloraminas, ozônio e a combinação deles. Neste trabalho os autores destacam que como a maioria dos dados é resultante das análises experimentais, estudos epidemiológicos tendem a destacar outros efeitos, os quais são provavelmente relacionados a exposição a longo prazo da população para misturas complexas.

Para aumentar a eficiência de remoção de compostos naturais ou químicos orgânicos da água, como os fármacos, que podem ser nocivos ao ser humano, processos adicionais têm sido estudados e aos poucos empregados. Alguns exemplos de processos para remoção destes compostos são: carvão ativado granular (CAG) ou em pó (CAP), processos oxidativos avançados (POA), nanofiltração/osmose reversa, membranas, dentre outros.

A U.S.EPA (2001) indica o CAG, um tipo de tratamento de adsorção em coluna de carvão, como uma alternativa para remover estes tipos de substâncias. Ternes et al. (2002) observaram uma elevada remoção de fármacos pelo CAG, incluindo o antiinflamatório diclofenaco. No entanto, fármacos e produtos ativos farmaceuticamente já foram identificados em água tratada com adição de CAG e CAP, antecedendo ou precedendo a filtração em areia, somado aos demais processos do tratamento como clarificação e desinfecção (VULLIET et al., 2011; STACKELBERG et al., 2004; 2007). Adams et al. (2002) observaram uma remoção superior a 90% de sete antibióticos comumente utilizados em água tratada com CAP.

Os POA que utilizam diversos agentes oxidantes têm sido amplamente estudados para remoção de poluentes químicos. Agentes oxidantes como os radicais hidroxila (\bullet OH) têm demonstrado uma degradação considerável de tais compostos e até mesmo dos subprodutos que podem ser formados durante o tratamento. Quando conjugados com outros processos como carvão ativado granular (GAC) podem alcançar altas taxas de remoção de compostos na água (GUZZELLA et al., 2002).

Um exemplo de POA empregado para remoção de microcontaminantes é a fotocatalise com dióxido de titânio (TiO_2). O TiO_2 é um dos fotocatalisadores mais promissores devido sua estabilidade e ausência de toxicidade. Quando o semicondutor é irradiado com luz UV ocorre a formação de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) potencialmente capazes de oxidar contaminantes orgânicos. Estes radicais são fortes agentes oxidantes que reagem não seletivamente com a maioria dos compostos orgânicos (LEE & VON GUNTEN, 2010; WESTERHOFF et al., 2005). A fotocatalise com TiO_2 se mostrou uma técnica altamente eficiente para remoção de distintos compostos orgânicos (HABIBI & VOSOOGHIAN, 2005).

O ozônio (O_3) tem sido aplicado ao tratamento da água como desinfetante e agente oxidante (SNYDER et al., 2003). A ozonização e outros processos oxidativos avançados têm mostrado efetividade na remoção de microcontaminantes como, diclofenaco (remoção de mais de 90%) e etinilestradiol, como pôde ser observado no estudo de Ternes et al. (2002). No entanto, algumas drogas já se mostraram resistentes ao CAG e O_3 , provavelmente devido às propriedades físico-químicas como alta solubilidade em água e/ou baixa degradabilidade (JONES et al., 2005).

Huerta-Fontela et al. (2011) reportaram uma remoção de 95% de produtos farmacologicamente ativos, hormônios e seus metabólitos no tratamento com pré-cloração, coagulação, filtração em areia, ozonização, adsorção por CAG e pós-cloração.

Dentre os métodos avançados para remoção de fármacos da água destacam-se ainda as membranas de filtração. Para obter uma elevada eficiência de remoção de fármacos e outros microcontaminantes os mesmos devem estar associados com a matéria orgânica coloidal e outras partículas, devido o pequeno tamanho destes contaminantes. Além disso, a eficiência de remoção está associada às propriedades da membrana (SNYDER et al., 2003).

O que pode ser observado é que a combinação de tratamentos pode ser necessária para remoção mais eficiente de fármacos presentes na água. No entanto, a implementação de processos oxidativos avançados e os demais processos adicionais tem um custo elevado e é ainda incipiente no Brasil.

Diante do exposto, nota-se a importância em avaliar o potencial tóxico dos subprodutos dos fármacos formados após os ensaios de cloração, aproximando uma situação típica de uma ETA. Para isso, a escolha dos métodos para as análises é de crucial importância no que tange a rapidez, confiabilidade dos resultados e baixo custo. Ensaios biológicos são

fundamentais na medida e predição destes efeitos causados por fármacos e seus subprodutos formados na desinfecção.

3.5 Avaliação Toxicológica dos Fármacos

A poluição dos corpos d'água por fármacos e a ampla distribuição destes compostos no ambiente podem aumentar o risco de toxicidade aos seres humanos e aos organismos aquáticos. Muitos destes compostos aumentam consideravelmente a preocupação toxicológica, especialmente quando os valores referentes ao risco à saúde não estão disponíveis. Os efeitos potenciais à saúde de fármacos, seus metabólitos e subprodutos presentes na água têm sido pouco avaliados e os padrões legais não estão estabelecidos.

A toxicologia é uma ciência remota e em grande expansão que apresenta valiosa importância para estudar estes efeitos. Esta foi denominada por Oga (2003) como “a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo”. A importância da toxicologia pode ser notada pela inclusão de testes de toxicidade pelas autoridades governamentais em vários países, tanto de medicamentos como substâncias de outras categorias as quais o ser humano entra em contato como usuário, pelos processos de fabricação e no ambiente. No Brasil a Resolução 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2011) que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes estabelece que “o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor”, e que os critérios de ecotoxicidade devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos.

Uma das áreas da toxicologia, a Toxicologia Ambiental, é a responsável por estudar os efeitos nocivos causados em organismos vivos, principalmente seres humanos, pelas substâncias químicas presentes no meio ambiente.

Fármacos têm sido desenvolvidos para produzir um efeito biológico, mas seus resíduos, metabólitos e produtos da degradação no ambiente podem causar diferentes efeitos ecotoxicológicos que são difíceis de prever, principalmente em matrizes complexas (FARRÉ et al., 2008). Há ainda poucos estudos referentes ao potencial de fármacos no suprimento de água potável, que poderia ser uma rota direta destes compostos para dentro do corpo (JONES et al., 2005).

Métodos analíticos como cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas têm demonstrado sensibilidade na detecção de compostos orgânicos emergentes e os produtos

da transformação a níveis traços. No entanto, é notório que parte fundamental do levantamento de fármacos, seus metabólitos e os subprodutos da degradação no ambiente se dá pelo conhecimento dos efeitos ao ecossistema, e sobretudo, ao ser humano. Desta forma, ensaios biológicos, são de grande importância para compreender os possíveis prejuízos causados por estas substâncias no ambiente e quando submetidos ao tratamento da água.

3.5.1 Ensaios Biológicos para Determinar a Toxicidade dos Fármacos

É muito mais difícil avaliar o efeito no ambiente aquático de milhares de contaminantes traços ou microcontaminantes, sintéticos e naturais, do que dos macropoluentes cuja fonte, comportamento e tratamento são relativamente bem conhecidos (SCHWARZENBACH et al., 2006). Para investigar o risco potencial de poluentes ambientais, análises químicas e testes biológicos estão sendo continuamente desenvolvidos para quantificar os poluentes e avaliar os efeitos adversos em diversas matrizes (PARRELLA & LAVORGNA, 2013).

Métodos analíticos são fundamentais para detectar e quantificar microcontaminantes no ambiente, no entanto, os efeitos adversos causados por essas substâncias não podem ser medidos por essas análises (BISTAN et al., 2012). Além disso, as análises químicas exigem além dos profissionais qualificados, como em testes biológicos, a análise apenas de compostos selecionados (SODRÉ et al., 2010), necessitando de outras ferramentas para estudar tais compostos.

Os ensaios biológicos podem fornecer informações sobre os efeitos biológicos causados pelas substâncias no meio, podendo ser realizados *in vitro* ou *in vivo*, servindo então como uma complementação valiosa aos métodos analíticos. Somente os testes biológicos podem avaliar precisamente os efeitos dos fármacos e seus subprodutos individualmente e até mesmo em misturas complexas.

Inúmeros ensaios biológicos para avaliar o potencial eco-toxicológico de diversas classes de fármacos e amostras ambientais já foram realizados com organismos teste distintos (QUADRO 3.1). Entre eles podem-se destacar os ensaios de toxicidade aguda, testes de toxicidade crônica, testes de genotoxicidade, mutagenicidade, citotoxicidade, dentre outros. Isidori et al. (2005) empregaram diversos testes de toxicidade aguda e crônica para avaliar os efeitos de seis antibióticos de diversas classes, incluindo o sulfametoxazol (QUADRO 3.1). Os autores observaram que os ensaios crônicos são mais apropriados para detectar os impactos de fármacos em relação aos agudos, pois os efeitos foram observados em

concentrações na ordem de µg/L enquanto os agudos em mg/L. DellaGreca et al. (2003) avaliaram a toxicidade aguda e crônica do fármaco prednisona e não observaram valores mensuráveis de toxicidade aguda, exceto para rotíferos. Os autores atribuíram ao fato de que o modo de ação do fármaco sobre espécies não alvo, especialmente invertebrados, além de ser desconhecida, os organismos podem responder diferentemente.

Num estudo dos efeitos de quatro classes de fármacos para o ser humano e ao ambiente, os antibióticos foram considerados através de uma análise qualitativa como os mais perigosos, seguido pelos hormônios, cardiovasculares e antineoplásicos (SANDERSON et al., 2004). Um estudo de revisão com uma avaliação dos fármacos como potenciais poluentes ambientais, o antiinflamatório diclofenaco (DCF) foi considerado como um composto perigoso para o ambiente aquático e que pode causar efeitos adversos em longo prazo (CARLSSON et al., 2006). Os autores concluíram que embora os efeitos agudos algumas vezes não sejam observados, os crônicos não podem ser excluídos, pois os dados são ainda escassos. A toxicidade do diclofenaco já foi testada em diversos organismos aquáticos (QUADRO 3.1) (LA FARRÉ et al., 2001; FERRARI et al., 2003). A bactéria marinha *Vibrio fischeri* foi a mais sensível para o DCF, entre os organismos testados nos testes agudos. Segundo os autores os testes crônicos demonstraram maior toxicidade que os agudos (FERRARI et al., 2003).

A toxicidade de nove fármacos, com diferentes modos de ação, para crustáceo, alga e macrófitas foi testada, entre eles o DCF e o antihipertensivo captopril. Os efeitos dos fármacos foram classificados de acordo com as diretrizes da Comissão das Comunidades Européias (1996) (EU-Directive 93/67/EEC). Segundo esta, um composto é considerado muito tóxico quando o valor de EC₅₀ é menor que 1 mg/L, tóxico de 1 a 10 mg/L e perigoso quando a concentração varia de 10 a 100 mg/L. Com base nesta classificação, o DCF foi considerado perigoso para as três espécies analisadas e o CPT foi considerado perigoso somente para as macrófitas (CLEUVERS, 2003). O autor destacou que embora os efeitos agudos sejam algumas vezes improváveis quando os compostos são testados individualmente, o estudo da combinação dos efeitos é um fator de extrema importância. Os dados coletados estão apresentados no QUADRO 3.1.

Uma ferramenta para avaliar o potencial de genotóxico de compostos é a aplicação do teste SOS Cromoteste, que utiliza bactérias *Escherichia coli* geneticamente modificadas, denominadas PQ37. O teste *in vitro* é um ensaio colorimétrico que mede a expressão de genes induzidos por agentes genotóxicos na bactéria pela fusão com o gene da β-galactosidase.

Outras mutações estão presentes nas bactérias para aumentar a resposta a compostos mutagênicos (MERSCH-SUNDERMANN, KEVEKORDES, & MOCHAYEDI, 1991). Uma coloração azul observada no meio indica genotoxicidade pelo composto. Isidori et al. (2005) testaram a toxicidade de seis antibióticos e dentre estes apenas a ofloxacina apresentou resposta positiva no SOS Cromoteste (QUADRO 3.1).

O teste com *Allium cepa* se baseia no contato direto de raízes da cebola com as amostras com o objetivo de avaliar a citogenotoxicidade medida pelas alterações cromossômicas e as da divisão das células meristemáticas desta estrutura do vegetal. Um estudo com as drogas anti-retrovirais zidovidina e nevirapina demonstrou que os dois fármacos inibem o crescimento em comprimento da raiz, mudanças no índice mitótico e indução de aberrações cromossômicas em *A. cepa* (ONWUAMAH et al., 2014) (QUADRO 3.1.).

O ensaio Cometa é um teste toxicogenético para avaliar lesões genômicas. Células com o DNA danificado formam um cometa quando colocadas em agarose e submetidas à eletroforese. Esta estrutura de cometa consiste da cabeça (matriz nuclear) e da cauda (DNA quebrado). A extensão do DNA que migrou está correlacionada com o dano ocorrido (TICE et al., 2000). A trimetropina, um fármaco amplamente usado no tratamento de infecções bacterianas, foi testada quanto ao seu potencial de induzir danos no DNA. Este efeito foi observado em linfócitos humanos em concentrações específicas como mostrado no Quadro 3.1 (ABOU-EISHA, 2006).

Um teste para avaliar a presença e extensão de danos cromossômicos em células expostas a agentes genotóxicos é o teste de micronúcleos (MN) (BONASSI et al., 2007). Os micronúcleos são corpos contendo cromatina, separados do núcleo principal, formados quando fragmentos de cromossomos não se incorporam no núcleo das células-filhas durante a divisão celular (HOSSEINIMEHR & KARAMI, 2005). Efeitos mutagênicos, expressos pela formação de micronúcleos, já foram observados com o antibiótico adriamicina (AL-HARBI, 1993), a trimetropina (ABOU-EISHA, 2006), a ciclofosfamida (HOSSEINIMEHR & KARAMI, 2005) usada no combate ao câncer e o antiinflamatório indometacina (DEVI & POLASA, 1987) (QUADRO 3.1).

O teste para avaliar a atividade mutagênica através da mutação reversa de bactérias *E. coli* (WP2), auxotróficas para o aminoácido triptofano, é algumas vezes empregado concomitantemente a outros testes, como o teste de Ames (MORTELMANS & RICCIO, 2000). O potencial mutagênico das substâncias é observado quando as bactérias são revertidas

por estes compostos e se tornam capazes de crescer em meio com quantidades traço de triptofano. O resultado pode ser analisado através da contagem de colônias revertentes no meio de cultura. A bactéria de *E.coli* WP2 detecta mutágenos que causam substituição dos pares de bases. O teste já foi usado para avaliar a mutagenicidade de antiinflamatórios como apresentado no QUADRO 3.1 (KADOTANI, ARISAWA, & MARUYAMA, 1984).

Para avaliação da mutagenicidade o teste de “Troca entre cromátides irmãs” (TCI) proveniente do termo em inglês “*Sister chromatid exchange assay*” (SCE) têm sido aplicado. O ensaio identifica o potencial de mutagenicidade cromossômica de agentes químicos através do dano no DNA (STULTS, KILLEN, & PIERCE, 2014) pela recombinação mitótica. Embora seja um evento normal da divisão celular, a frequência em que ocorre quando as células estão em contato com compostos tóxicos é aumentada. Uma investigação do potencial em induzir danos no DNA do paracetamol em células da medula óssea de camundongos demonstrou que além de provocar aberrações cromossômicas o fármaco aumentou a frequência da troca entre cromátides irmãs (GIRI, SIVAM, & KHAN, 1992), este efeito também foi observado para três diferentes antiinflamatórios sobre células da medula óssea (PHILIPOSE et al.,1997) (QUADRO 3.1).

O ensaio *Salmonella*/microsoma, mais conhecido como teste de Ames, é amplamente utilizado para avaliar a mutagenicidade de diversos compostos dentre eles os fármacos. Para o teste são utilizadas cepas da bactéria *Salmonella typhimurium* geneticamente modificadas para detecção de compostos mutagênicos. O analgésico dipirona já foi testado pelo teste de Ames com cepas TA98 e TA100 da bactéria (IZUMI et al., 1991). Os resultados demonstraram que a dipirona foi fracamente mutagênica para a cepa TA100 na presença e ausência de metabolização (QUADRO 3.1).

Um dos métodos para avaliar a citotoxicidade é através da quantificação dos danos e da integridade da membrana. Quando uma célula é danificada ocorre a liberação da enzima intracelular lactato desidrogenase (LHD) para o sobrenadante celular. Uma forma de avaliar o dano citotóxico por este método é através da oxidação do NADH para NAD⁺, medido cineticamente no sobrenadante, e correlacionado com a quantidade de LDH liberada. A viabilidade celular é inversamente proporcional à quantidade de LDH liberada. O efeito do fármaco amiodarona (antiarrítmico) sobre a liberação de LDH em mitocôndrias demonstrou que o mesmo inibiu a atividade destas enzimas com uma relação dose-dependente, demonstrando sua citotoxicidade através de danos na membrana (DZIMIRI & ALMOTREFI, 1993) (QUADRO 3.1).

O ensaio do MTT foi empregado para avaliar a citotoxicidade de oito antiinflamatórios não esteroidais em células de adenocarcinoma ileocecal humana (HCT-8) (ALLEN et al., 1991). Os antiinflamatórios foram testados em concentrações de 10 µM-10 mM. Os autores observaram que até 1 mM nenhum dos fármacos induziu efeitos citotóxicos, e todos eles induziram na maior concentração (10 mM) (QUADRO 3.1).

No presente trabalho foram selecionados dois ensaios biológicos para investigar se os fármacos analisados e/ou seus subprodutos da cloração e da fotocatalise apresentam potencial mutagênico e citotóxico. São estes o teste de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) e o ensaio colorimétrico do MTT, descritos em detalhes nos tópicos seguintes.

Quadro 3.1 – Ensaio de toxicidade para avaliação de compostos teste e amostras ambientais.

Tipo de ensaio	Nome do ensaio / Organismo teste	Parâmetros testados (Efeitos tóxicos) / Tempo	Substância (s) testada (s)	Concentração	Referência
Agudo	<i>Vibrio fischeri</i> (bactéria bioluminescente)	Luminescência EC ₅₀ ^a - 30'	Antibióticos	SMX: 23,3 mg/L 64,50 mg/L a > 100 mg/L ^b	ISIDORI et al., 2005
		EC ₅₀ - 30'	Diclofenaco	11,45 mg/L	FERRARI et al., 2003
		EC ₅₀ - 30'	Diclofenaco	13,7 mg/L	LA FARRÉ et al., 2001
Agudo	<i>Brachionus calyciflorus</i> (rotífero)	Mortalidade - LC ₅₀ ^c 24h	Antibióticos	SMX: 26,27 mg /L 24,94-35,46 mg/L ^b	ISIDORI et al., 2005
		Mortalidade - LC ₅₀ 24h	Prednisona (corticóide)	152,2 µM	DELLAGRECA et al., 2003
Agudo	<i>Thamnocephalus platyurus</i> (Crustáceo)	Mortalidade - LC ₅₀ 24h	Antibióticos	SMX: 35,36 mg /L 17,68-35,36 mg/L ^b	ISIDORI et al., 2005
		Mortalidade - LC ₅₀ 24h	Prednisona (corticóide)	VNM ^d	DELLAGRECA et al., 2003
Agudo	<i>Daphnia magna</i> (crustáceo)	Imobilização - EC ₅₀ 24h	Antibióticos	SMX: 25,2 mg /L 22,45-31,75 mg/L ^b	ISIDORI et al., 2005
		Imobilização - EC ₅₀ 24h - 48h	Prednisona (corticóide)	VNM ^d	DELLAGRECA et al., 2003
		Imobilização - EC ₅₀ 48h	Diclofenaco	224,3 mg /L	FERRARI et al., 2003
		Imobilização - EC ₅₀ 24h	Diclofenaco Captopril	68 mg /L > 100 mg /L	CLEUVERS, 2002
Agudo	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (Crustáceo)	Mobilidade - EC ₅₀ 48h	Antibióticos	SMX: 15,51 mg /L 10,23-18,66 mg/L ^b	ISIDORI et al., 2005
Agudo	<i>Danio rerio</i> (peixe)	Mortalidade - LC ₅₀ 24h - 96h	Antibióticos	SMX: >1000 mg /L >1000 mg/L ^b	ISIDORI et al., 2005
Agudo	<i>Lemna minor</i> (macrófita)	Inibição do crescimento	Diclofenaco	7,5 mg/L	CLEUVERS, 2002
			Captopril	25 mg/L	

Quadro 3.1 – Ensaio de toxicidade para avaliação de compostos teste e amostras ambientais (continuação).

Tipo de ensaio	Nome do ensaio / Organismo teste	Parâmetros testados (Efeitos tóxicos) / Tempo	Substância (s) testada (s)	Concentração	Referência
Agudo	<i>Desmodemus subspicatus</i> (alga)	Inibição do crescimento EC ₅₀	Diclofenaco	72 mg/L	CLEUVERS, 2002
			Captopril	168 mg/L	
Crônico	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (alga)	Inibição do crescimento EC ₅₀	Antibiótico	SMX: 0,52 mg/L 0,0020-1,44 mg/L ^b	ISIDORI et al., 2005
		Inibição do crescimento EC ₅₀	Diclofenaco	LOEC: 20 mg/L ^E NOEC: 10 mg/L ^F	FERRARI et al., 2003
		Inibição do crescimento EC ₅₀	Prednisona (corticóide)	85,5µM	DELLAGRECA et al., 2003
Crônico	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (crustáceo)	Inibição do crescimento EC ₅₀ (3d)	Antibiótico	SMX: 0,21 mg/L 0,18-8,16 mg/L ^b	ISIDORI et al., 2005
		Inibição do crescimento EC ₅₀ (7d)	Prednisona (corticóide)	> 5,58µM	DELLAGRECA et al., 2003
Genotóxico	SOS Cromoteste <i>Escherichia coli</i> (PQ37)	Atividade genotóxica	Antibióticos	SMX (negativo) Ofloxacina: 6,25 – 100mg/L	ISIDORI et al., 2005
Citotóxico/ Genotóxico	Allium teste <i>Allium cepa</i> (cebola)	Alterações cromossômicas / Diminuição dos índices mitóticos	Anti-retrovirais	Zidovidina: 65 µM Nevirapina: 92,5 µM	ONWUAMAH et al., 2014
Genotóxico	Ensaio Cometa Células eucarióticas	Danos cromossomais (DNA)	Antibiótico	Trimetropina: 25-150 µg/mL	ABOU-EISHA, 2006

Quadro 3.1 – Ensaio de toxicidade para avaliação de compostos teste e amostras ambientais (final).

Tipo de ensaio	Nome do ensaio / Organismo teste	Parâmetros testados (Efeitos tóxicos) / Tempo	Substância (s) testada (s)	Concentração	Referência
Mutagênico	Micronúcleos (MN) Células eucarióticas	Efeitos clastogênicos ^g ou aneugênicos ^h	Adriamicina ⁱ	Efeitos observados com 15 mg	AL-HARBI, 1993
			Ciclofosfamida ^j (anti-câncer)	Efeitos observados com 50 mg	HOSSEINIMEHR & KARAMI, 2005
			Indometacina ^k (antiinflamatório)	Efeitos observados com 36 mg	DEVI & POLASA, 1987
Mutagênico	Ensaio de Mutação Reversa Bacteriana <i>Escherichia coli</i> WP2	Taxa de mutação reversa	Antiinflamatórios	Todos apresentaram resultados negativos ^l	KADOTANI, ARISAWA, & MARUYAMA, 1984
Mutagênico	Troca entre cromátides irmãs (TCI) Células eucarióticas	Troca de DNA entre cromátides irmãs	Analgésico	Paracetamol: 50-400 mg ^m	GIRI, SIVAM, & KHAN, 1992
			Antiinflamatórios	Ibuprofeno: 50-100 mg/Kg	PHILIPOSE et al.,1997
				Ketoprofeno: 50- 100mg/Kg	
				Naproxeno: 100 mg/kg Paracetamol: 50-400 mg ^m	
Mutagênico	Ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma (Teste de Ames)	Mutação reversa em bactérias <i>S. typhimurium</i>	Dipirona (analgésico)	TA100 ⁿ : 5 – 10 mg/placa	IZUMI et al., 1991
Citotóxico	Lactato Desidrogenase Extracelular	Liberação do LDH / Oxidação do NADH a NAD ⁺	Antiarrítmico	Amiodarona: 7.2 µM a 2.5 mM	DZIMIRI & ALMOTREFI, 1993
Citotóxico	Ensaio colorimétrico do MTT	Viabilidade de células vivas(atividade de desidrogenases mitocondriais)	Antiinflamatórios ^o	10 mM	ALLEN et al., 1991

^a: EC₅₀: concentração que causa 50% do efeito; ^b: Para outros antibióticos analisados (eritromicina, oxitetraciclina, ofloxacina, lincomicina e claritromicina); ^c: Concentração que causa 50% de morte; ^d:VNM: valor não mensurável; ^e: LOEC: menor concentração com efeito observável; ^f: NOEC: concentração sem efeito observável; ^g: fragmentos cromossômicos que não são incorporados no núcleo das células-filhas durante a divisão celular; ^h: cromossomos inteiros que não completam a migração na anáfase da divisão celular; ^{ijk}: estudo conduzido avaliando eritrócitos de camundongos (mg fármaco/kg peso animal); ^l: indometacina (5-5000 µg/placa), carprofeno (1,25-1250 µg/placa), tenoxicam (1-1000 µg/placa); ^m: estudo conduzido *in vivo* avaliando células da medula óssea de camundongos (50-400 mg/kg peso animal); ⁿ: detecta mutágenos que causam substituição dos pares de bases; ^o: indometacina, ácido mefenêmico, ketoprofeno, ibuprofeno, sulindaco, aspirina, fenilbutazona e naproxeno.

3.5.1.1 Ensaio *Salmonella*/microsoma (teste de Ames)

O ensaio *Salmonella*/microsoma também conhecido como teste de Ames foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames na década de 1970. Desde então, foi amplamente empregado e demonstrou ser eficiente para detectar a mutagenicidade de centenas de compostos (AMES et al., 1975; MARON & AMES, 1983).

O método detecta se os compostos, muitas vezes presentes no meio ambiente e em contato com o ser humano, causam mutação gênica. A mutagênese refere-se à propriedade que as substâncias químicas apresentam de provocar modificações no material genético das células, de modo que estas sejam transmitidas às novas células durante a divisão celular (OGA, 2003).

O ensaio *Salmonella*/microsoma foi um dos testes *in vitro* pioneiros e tem sido utilizado para determinar mutagenicidade de misturas ambientais complexas e biológicas, e é eficiente para detectar uma variedade de compostos mutagênicos (UMBUZEIRO et al., 2009). O ensaio está incluído no *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) como proposta de teste de mutagenicidade, e permite prever carcinogenicidade de amostras submetidas a ele (AMES et al., 1973; MONARCA et al., 1998). A importância do teste foi ressaltada por Claxton, Umbuzeiro & DeMarini (2010) quando foi considerado o estetoscópio da toxicologia genética do século 21.

O teste emprega linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas¹ para histidina (His-, histidina dependentes), com diferentes mutações no operon² responsável pela síntese deste aminoácido. As cepas da bactéria são carentes da enzima fosforibosil ATP sintetase, necessária para síntese de histidina (OGA, 2003). Esta alteração genética faz com que as bactérias sejam incapazes de crescer e formar colônias em meio de cultura sem este aminoácido (UMBUZEIRO et al., 2004; VALENT, 1990). No entanto, compostos mutagênicos podem causar novas mutações que invertem a mutação original e a síntese da histidina é restaurada permitindo as bactérias de crescerem em meio com baixas concentrações do aminoácido. A frequência de mutação reversa das cepas é

¹ Auxotróficos: micro-organismo mutante que apresenta requerimentos nutricionais ausentes nos progenitores.

² Operon: sítios formados por operador, promotor e genes que os primeiros controlam (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012).

medida pela contagem de colônias macroscópicas que crescem no meio mínimo após a exposição das células ao agente mutagênico.

Além da mutação no operon da histidina, as cepas apresentam outras mutações que aumentam a capacidade/sensibilidade para detectar mutágenos. A mutação *rfa* causa perda parcial da barreira de lipopolissacarídeos³ (LPS) aumentando a permeabilidade de moléculas grandes que não penetram na parede da célula sem a mutação. As cepas apresentam ainda a mutação *uvrB* que é uma deleção do gene que codifica o sistema de reparo por excisão do DNA tornando-as mais sensíveis para detectar mutágenos (AMES et al., 1975; MARON e AMES, 1983). A mutação *uvrB* se estende através do gene *bio* e como consequência as bactérias se tornam dependentes da biotina para crescerem. Algumas cepas apresentam o plasmídeo R-fator pKM101 que as tornam ainda mais sensíveis a uma variedade de mutágenos; este plasmídeo confere às bactérias resistência ao antibiótico ampicilina quando mantido no interior das células. Além destas, outras mutações podem ser observadas entre as linhagens já desenvolvidas para o teste. Na Tabela 3.2 está o resumo das mutações presentes especificamente nas linhagens TA98 e TA100 usadas nos experimentos deste trabalho e indicadas para testes de mutagenicidade gerais, de rotina e amostras ambientais (APHA, 2005; MARON & AMES, 1983; SERRES & SHELBY, 1979).

Tabela 3.2 - Genótipo das cepas TA98 e TA100 usadas para detectar mutagenicidade no presente trabalho.

Linhagem	Mutação para histidina ¹ (Gene afetado)	Mutações Adicionais			Mutágenos que detecta ⁵
		LPS ²	Reparo ³	R-fator ⁴	
TA98	hisD3052	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	+ R	DQL
TA100	hisG46	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	+ R	SPB

As cepas são derivadas da *S. typhimurium* LT2. 1. Mutações no gene responsável pela síntese da histidina; 2. Permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos (LPS), a mutação *rfa* causa perda parcial da barreira e facilita difusão de moléculas grandes; 3. Deleção do gene *uvrB* causa perda da capacidade de reparo por excisão e aumento da sensibilidade para detectar mutágenos. A deleção (Δ) no *uvrB* se estende pelo gene da biotina; 4. Presença do plasmídeo pKM101 confere resistência a ampicilina. R = pKM101; 5. Tipos de mutações/mutágenos que detectam: deslocamento quadro de leitura (DQL) e substituição de pares de base (SPB).

Fonte: AMES et al. (1975) adaptado.

³ Lipopolissacarídeo: molécula que consiste em um lipídeo e um polissacarídeo, formando a membrana externa da parede celular de bactérias gram-negativas (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012).

As bactérias fornecem informações sobre os tipos de mutações que os compostos podem causar isto porque a mutação é revertida pelo composto de acordo com o modo de interação do mesmo na célula. A mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre no gene *hisG* que codifica para a primeira enzima da biosíntese da histidina. Esta mutação substitui a leucina GAG (CTC), no organismo selvagem, pela prolina GGG (CCC), no organismo mutante. Portanto, cepas com esta mutação detectam mutágenos que causam substituição dos pares de bases, principalmente nos pares G-C. A cepa TA98 apresenta a mutação *hisD3052*, no gene que codifica para histidinol desidrogenase. Esta cepa detecta mutágenos que causam deslocamento no quadro de leitura. Os mutágenos ao entrarem em contato com a bactéria podem restaurar a leitura para biossíntese da histidina. O desenho esquemático destas mutações pode ser observado na FIG. 3.3.

Algumas substâncias para agirem no DNA precisam ser metabolizadas nos organismos. Essas substâncias são conhecidas como promutágenos ou mutágenos indiretos, pois *per si* não alteram o DNA. Para que as mutações ocorram através desses promutágenos são necessárias reações com enzimas. O fígado de rato foi apontado como a melhor fonte de enzimas de ativação e o mais eficiente para detectar diferentes classes de carcinógenos. Por isso, nos teste *in vitro* são incluídos homogenados de fígado de rato centrifugado a 30,000 x g (microsomas), denominado fração S9, induzidos por bifenilas policloradas (PCB) – Aroclor 1254. Além da fração S9 o sistema de ativação metabólica é composto por cofatores, como glicose-6-fosfato e NADPH (CLAXTON et al., 2010; MARON & AMES, 1983). O sistema de metabolização empregado é denominado mistura S9. Como algumas substâncias podem ser inativadas pelo sistema de metabolização, nos ensaios os compostos são testados tanto na presença quanto na ausência da mistura S9.

O ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma têm se demonstrado uma ferramenta útil para indicar a presença de compostos mutagênicos em amostras de águas superficiais (UMBUZEIRO et al., 2010; 2001), subterrâneas (VALENTE-CAMPOS et al., 2009), água tratada (GARTISER et al., 2012; TAKANASHI et al., 2011), sedimentos (UMBUZEIRO et al., 2004) e efluentes (MASOOD & MALIK, 2013).

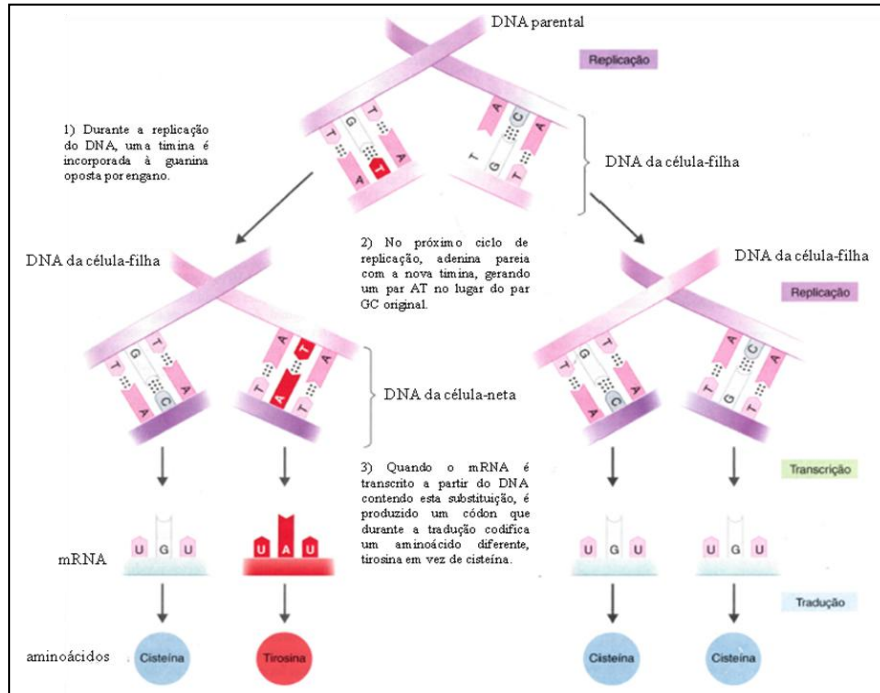
Importantes compostos mutagênicos não estão regulamentados e o teste de Ames pode ser uma ferramenta útil para avaliar esta atividade em amostras de água usadas para abastecimento. A Companhia de Saneamento do Estado de São Paulo (CETESB) emprega desde a década de 1970 o ensaio *Salmonella*/microsoma no monitoramento das águas superficiais do estado. Segundo Umbuzeiro et al. (2001) o programa permitiu além da

detecção de mutagenicidade na água, a implementação de ações de prevenção o que não teria sido possível sem a adoção do teste.

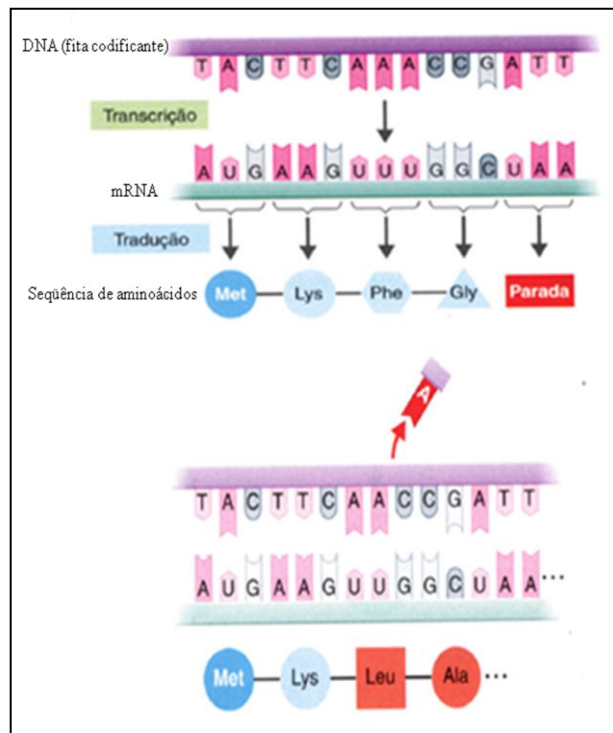
Na literatura podem ser encontradas diferentes formas para interpretação dos dados, e logo, do resultado final para o ensaio *Salmonella*/microsoma (teste de Ames). Alguns trabalhos empregam três variáveis para resultado final do teste (ANOVA, relação dose-reposta e razão de mutagenicidade). Por outro lado, podem ser encontrados na literatura trabalhos cujos dados são analisados sem o emprego simultâneo das três variáveis, neste caso, os resultados são apresentados com base em dois e, às vezes, apenas um parâmetro. Um resumo de trabalhos publicados usando os três parâmetros simultaneamente ou alguns deles pode ser observado no QUADRO 3.2.

O teste de Ames é um teste considerado de fácil execução, sensível, que produz uma rápida resposta e de custo relativamente baixo quando comparado com os testes *in vivo* e estudos epidemiológicos (AMES et al., 1975; ZHANG & WANG, 2000). No entanto, quando há a necessidade de testar a mutagenicidade para muitas amostras o teste pode ser demorado e oneroso. O teste de Ames pode ser uma ferramenta promissora para avaliar se os subprodutos dos fármacos captopril, diclofenaco e sulfametoxazol induzem atividade mutagênica. Além disso, prevê o desenvolvimento de câncer, pois uma das teorias da carcinogênese química indica o desenvolvimento de uma mutação como evento inicial deste processo (OGA, 2003).

Figura 3.3 - Tipos de mutações detectadas pelas bactérias TA100 (a) e TA98 (b).



a) Substituição de pares de bases



b) Deslocamento do quadro de leitura

a) Em uma substituição de bases, uma única base em um ponto na sequência do DNA é substituída por uma base diferente. Quando o DNA se replica, o resultado é uma substituição de um par de bases. Esta mutação leva a uma proteína alterada em uma célula. **b)** Na mutação de deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) um ou alguns pares de nucleotídeos são removidos ou inseridos no DNA. Isto leva a uma alteração nos aminoácidos à jusante do local da mutação original.

Fonte: TORTORA, FUNKE & CASE (2012).

Quadro 3.2 - Resumo de trabalhos publicados utilizando o ensaio *Salmonella*/microsoma com diferentes formas para análise dos resultados.

Características gerais da publicação	Referência
<ul style="list-style-type: none"> • Água superficial. <p>- Resultado positivo quando $RM \geq 2$, houve efeito dose-resposta (modelos Linear, Lintox1, Lintox2 e Bernstein) e ANOVA significativa.</p> <p>- Índícios de mutagenicidade quando o $RM < 2$, mas os dados encaixaram no modelo linear com dose-resposta $\leq 0,05$</p> <p>- Usou o Salanal^a</p> <p>- Resultados dados em Rev./L^b.</p>	VALENT, 1990
<ul style="list-style-type: none"> • Água subterrânea. <p>- Resultado positivo quando houve diferença estatística entre o controle e amostra (ANOVA), efeito dose-resposta significativo e $RM \geq 2$.</p> <p>- Quando o $RM < 2$ experimento repetido, se mantido, resultado era positivo. Se não foi repetido, inconclusivo.</p> <p>- Usaram Salanal e Bernstein.</p> <p>- Resultados em Rev./L.</p>	VALENTE-CAMPOS et al., 2009
<ul style="list-style-type: none"> • Orientações da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA). <p>- Resultado positivo quando ANOVA for significativa ($p < 0,05$), $RM = 2$ e efeito dose-resposta significativamente positivo ($p < 0,05$).</p> <p>- Resultado inconclusivo quando ANOVA for significativa ($p < 0,05$), $RM < 2$ e efeito dose-resposta significativamente positivo ($p < 0,05$) (Caso a repetição não seja possível).</p> <p>- Resultados em Rev./unidade de amostra, quando positivo ou com indícios (amostras ambientais).</p>	UMBUZEIRO et al., 2009
<ul style="list-style-type: none"> • Efluente industrial <p>- Adotaram RM, potencial mutagênico (porção linear da curva dose-resposta), fator de indução* e ANOVA</p>	MASOOD & MALIK, 2013

^aSalanal (*Salmonella Assay Analysis*): programa estatístico especialmente desenvolvido para o teste de Ames pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA. Para cada dose analisada a média de revertentes é comparada ao respectivo controle negativo e avaliado pela análise de variância ANOVA e relação dose-resposta.

^b Indica o número de revertentes induzidos por unidade de amostra.

Quadro 3.2 - Resumo de trabalhos publicados utilizando o ensaio *Salmonella*/microsoma com diferentes formas para análise dos resultados (continuação).

Características	Referência
<ul style="list-style-type: none"> • Águas intersticiais - Resultado positivo quando o RM > 2 e teve significativa relação dose-resposta (usaram Dunnett's e Tukey, não adotaram Salanal). 	PARRELLA & LAVORGNA, 2013
<ul style="list-style-type: none"> • Efluente têxtil (Azo corantes) - Resultado positivo quando ANOVA e efeito dose-resposta foram significativos. - Sem RM. - Usaram Salanal e Bernstein. - Resultados dados em Rev./µg. 	OLIVEIRA et al., 2010
<ul style="list-style-type: none"> • Fármacos (antibióticos) - Resultado positivo quando o RM > 2 e teve significativa relação dose-resposta - Resultados dados em Rev./µg. - Sem adotar o Salanal 	ISIDORI et al., 2005
<ul style="list-style-type: none"> • Águas superficiais e tratadas, efluentes e sedimentos. - Resultado dado como negativo ou positivo (aumento da potência mutagênica - Rev./unidade de amostra). - Sem citar ANOVA e sem RM. - Usaram Salanal e Bernstein. - Resultados dados em Rev./µg ou Rev./L. 	UMBUZEIRO et al., 2004
<ul style="list-style-type: none"> • Comparação entre desinfetantes (tratamento de água) - Resultado positivo quando duas doses produzem uma resposta pelo menos duas vezes maior que o controle (similar ao RM), e no mínimo duas doses mostrarem relação dose-resposta. - Sem adotar o Salanal 	GUZZELLA et al., 2004 APHA, 2005

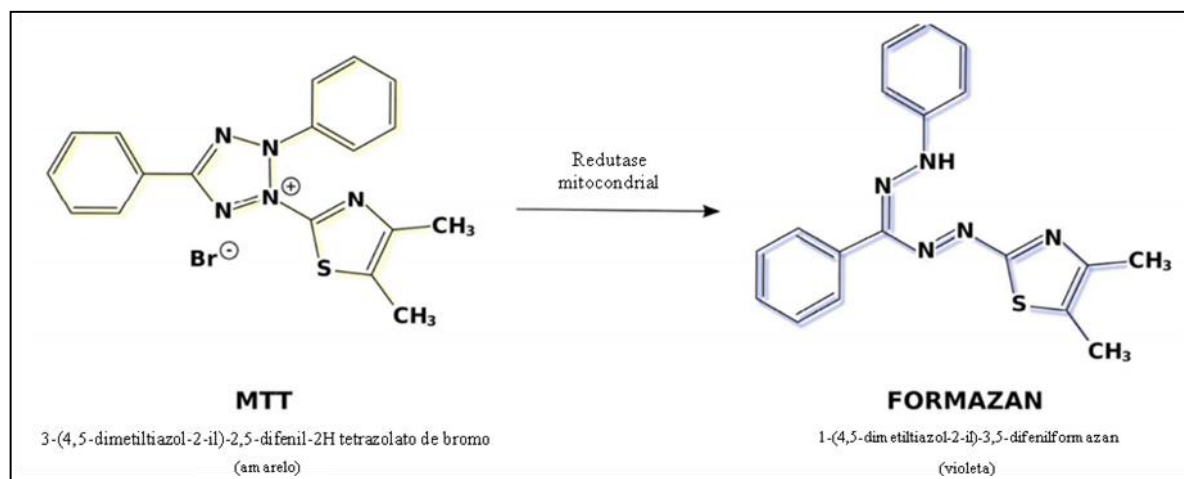
Quadro 3.2 - Resumo de trabalhos publicados utilizando o ensaio *Salmonella*/microsoma com diferentes formas para análise dos resultados (final).

Características	Referência
<ul style="list-style-type: none"> • Águas superficiais. - Resultado dado como negativo ou positivo (aumento da potência mutagênica - Rev./unidade de amostra). - Sem citar ANOVA e sem RM. - Usaram Salanal e Bernstein. - Resultados dados em Rev./L. 	UMBUZEIRO et al., 2001
<ul style="list-style-type: none"> • Plantas nativas brasileiras - Citaram Salanal e RM, no entanto, os resultados foram dados apenas com base na RM. - Sem menção à relação dose-resposta. 	MOREIRA et al., 2002
<ul style="list-style-type: none"> • Plantas - Resultado positivo quando $RM \geq 2$ e significativa relação dose-resposta. - Índícios de mutagenicidade quando apenas um dos parâmetros foi atendido. - Adotou Salanal e Bernstein 	OLIVEIRA, 2010
<ul style="list-style-type: none"> • Remoção de microcontaminantes da água bruta (GAC e POA) - Resultado positivo $RM > 2$ (comparam atividade mutagênica com RM). - Sem adotar o Salanal e os modelos. 	GUZZELLA, FERETTI, & MONARCA, 2002
<ul style="list-style-type: none"> • Águas superficiais - Resultado positivo quando o $RM > 2$ e curva dose-resposta positiva (Rev./mL). - Índícios de mutagenicidade quando apenas um dos critérios foi atendido (sem Rev./mL) - Negativo quando o $RM < 2$ e não houve citotoxicidade pelas amostras. - Usaram Salanal e os modelos: Linear, Lintox1, Lintox2 e Bernstein. - Sem ANOVA. - Resultados dados em RM e Revertentes por unidade de amostra quando encontrado. 	VARGAS, MOTTA, & HENRIQUES, 1993

3.5.1.2 Ensaio de citotoxicidade pelo MTT

Entre os ensaios para avaliar a citotoxicidade de compostos individuais ou misturas complexas através da conversão de um substrato em produto cromogênico por células vivas, o ensaio colorimétrico do MTT desenvolvido por Mosmann (1983) é possivelmente um dos mais versáteis e empregados na literatura. O ensaio detecta somente células vivas e o sinal gerado é dependente do grau de ativação das células. O método pode ser usado para medir a citotoxicidade, proliferação ou ativação celular (MOSMANN, 1983).

Figura 3.4 - Estrutura molecular dos sais MTT e formazan.

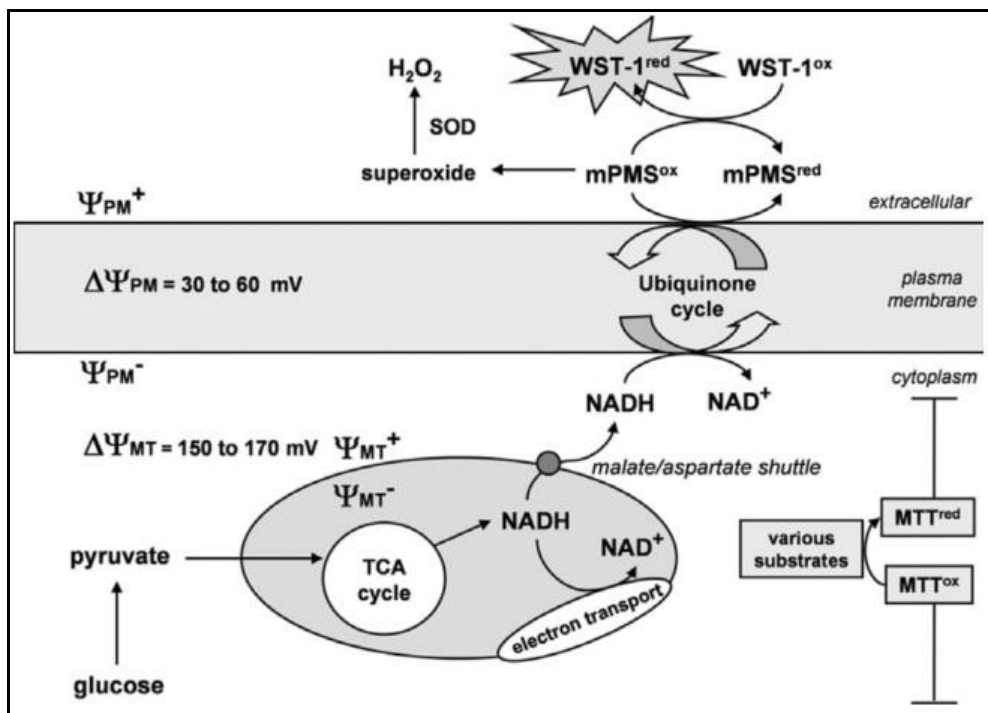


Fonte: OZBIOSCIENCES. Disponível em: <http://www.ozbiosciences.com/>

O ensaio do MTT baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. Células vivas utilizam o MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo, um sal solúvel em água de coloração amarela, como substrato e o reduz através da clivagem do anel pela atividade de desidrogenases mitocondriais, presentes e funcionais exclusivamente nestas células vivas, a um produto de cor violácea e insolúvel em água o sal formazan 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan (FIG.3.4).

A carga positiva do anel tetrazolato com quatro átomos de nitrogênio, cercado por grupos aromáticos, facilita a captação celular do corante via potencial de membrana de células viáveis (BERRIDGE, HERST, & TAN, 2005). Se não for reduzido no citoplasma o tetrazolato atravessa a membrana mitocondrial onde é então reduzido. O sal tetrazolato MTT é reduzido intracelularmente, sendo a mitocôndria o principal local de redução, processo este realizado por enzimas oxidoreduções, principalmente o NADH. Esta coenzima é derivada principalmente do ciclo ácido cítrico ou ciclo de Krebs (TCA). Um esquema da redução do MTT pode ser analisado na FIG. 3.5.

Figura 3.5 - Representação esquemática do mecanismo de redução do MTT.



Fonte: BERRIDGE, HERST & TAN (2005)

Pelo esquema acima nota-se que o metabolismo dos glicídeos é fundamental para a geração dos elétrons que serão responsáveis pela redução do MTT a formazan. Quando as células sofrem algum dano decorrente do contato com as amostras ensaiadas, o metabolismo dos glicídeos é alterado levando a uma queda/bloqueio da produção de elétrons e assim da atividade das desidrogenases mitocondriais, o que não permite ou diminui a redução do MTT a formazan. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular é proporcional à quantidade de formazan reduzido a partir do MTT, ou seja, do nível do metabolismo energético na célula. A coloração amarela da solução de MTT em placa quando

substituída por uma coloração arroxeadada pela formação dos cristais de formazan indica a presença de células metabolicamente ativas. Após a solubilização do formazan uma medida espectrofotométrica do MTT-formazan a 570 nm permite a quantificação da viabilidade celular, e a absorvância observada é diretamente proporcional a quantidade de células viáveis.

O teste quantitativo é considerado um ensaio colorimétrico que proporciona rapidez, versatilidade e precisão na leitura espectrofotométrica (MOSMANN, 1983), e ainda permite a análise concomitante de várias amostras, uma vez que é realizado em microplacas.

Uma redução na viabilidade celular por um agente pode ser considerada como um efeito citotóxico decorrente da presença de substâncias tóxicas. Zegura et al. (2009) analisando amostras de água tratada, superficial e efluentes consideraram uma redução de 30% na viabilidade celular de células HepG2 como um efeito citotóxico. Ensaio de citotoxicidade utilizando o ensaio de MTT têm sido amplamente empregados utilizando células HepG2, que podem ser usadas para avaliação do risco químico (ZEGURA et al., 2009; MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004). Brevemente, estas células foram isoladas em 1979 a partir de um hepatoblastoma (ADEN et al., 1979) e mantêm ativas enzimas envolvidas na ativação e detoxificação de carcinógenos (UHL, HELMA, & KNASMÜLLER, 2000). O tempo de geração das células HepG2 varia de 20 a 28 horas.

O ensaio de MTT já foi empregado para avaliar a citotoxicidade de efluentes, águas superficiais e tratadas (ZEGURA et al., 2009), microcontaminantes após o tratamento avançado do efluente com O₃ e UV/H₂O₂ (RICHARD et al., 2013), de compostos químicos (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006; MCGUIGAN & LI, 2014), fármacos (AYAKI et al., 2010; ALLEN et al., 1991), dentre outros compostos e misturas.

4 MÉTODOS

4.1 Procedimentos de preparo das amostras

4.1.1 Ensaio de cloração

Os ensaios de cloração foram realizados em escala de bancada, utilizando equipamento de *Jar test* da marca Nova Ética[®] (FIG. 4.1), no Laboratório de Controle Ambiental do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas / UFOP. De acordo com a Portaria 2.914/2011 para garantir uma eficiente desinfecção com 1 mg/L de cloro, temperatura da água a 20°C e pH igual a 7 o tempo de contato mínimo deve ser de 9 minutos. Para aproximar à realidade das estações de tratamento de água do Brasil, que operam com tempo de contato de aproximadamente 30 minutos, o mesmo tempo foi adotado nos ensaios com diclofenaco (DCF) e sulfametoxazol (SMX). Para o captopril (CPT) o tempo de cloração foi de 5 minutos, uma vez que em tempos maiores o fármaco era completamente degradado e não era observada a formação de subprodutos do fármaco e nem residual de cloro (TAB. 4.1).

Em cada jarro do equipamento foi adicionado 2 L de água Milli-Q, 1mg/L de diclofenaco e sulfametoxazol em separado, e 6 mL de solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1 mg/L. Para o captopril a concentração do fármaco e do NaClO foi de 10 mg/L cada (TAB.4.1). Esta variação com este fármaco se deu pela rápida oxidação e desaparecimento do mesmo em concentrações menores, o que não permitiria a formação de compostos residuais. Durante o tempo de oxidação o gradiente de velocidade da mistura foi de 120 rpm.

Tabela 4.1 - Características dos ensaios de cloração para cada fármaco estudado – Captopril, Diclofenaco e Sulfametoxazol.

	Captopril	Diclofenaco	Sulfametoxazol
Concentração do fármaco	10 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
Concentração de NaClO	10 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
Tempo de contato	5 min	30 min	30 min
Gradiente de Velocidade	120 rpm ^a	120 rpm	120 rpm

^arpm: rotações por minuto

Decorrido o tempo de agitação coletou-se 10 mL de amostra do jarro e transferiu para um frasco estéril. Neste adicionou-se 53 µl do agente redutor tiosulfato de sódio (Na_2SO_3) a uma concentração de 1 mol/L para neutralizar o cloro residual. Este procedimento está de acordo com o *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) e tem a finalidade de eliminar o desinfetante residual, e logo, sua toxicidade tanto para as bactérias quanto para as células.

Posteriormente, foram feitas as diluições da amostra para outros frascos estéreis obtendo desta forma cinco concentrações de cada amostra de fármaco clorado: 1 mg/L, 0,75 mg/L, 0,50 mg/L, 0,25 mg/L e 0,01 mg/L. Estas diluições foram escolhidas em função das baixas concentrações encontradas no ambiente.

Figura 4.1 - Equipamento de *Jar test* utilizado para realização dos ensaios de cloração de amostras de água acrescidas dos fármacos.



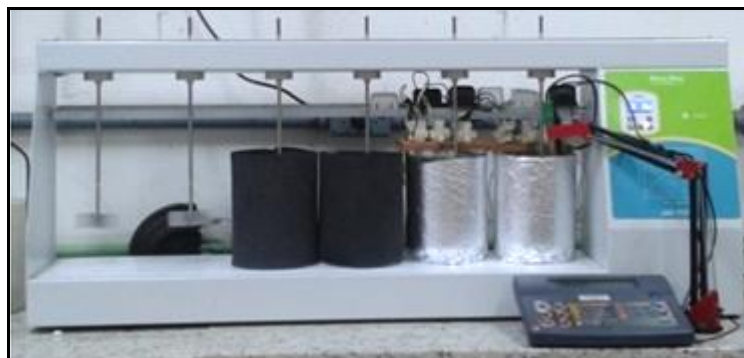
Fonte: DA AUTORA

4.1.2 Fotocatálise do Captopril

Amostras de 10 mg/L captopril foram submetidas à fotocatalise heterogênea com dióxido de titânio ($\text{TiO}_2/\text{UV-C}$). O semicondutor foi ativado por luz ultravioleta (UV-C) permitindo a formação de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), responsáveis pela oxidação do fármaco (FIG. 4.2). Para isso, foram utilizadas lâmpadas fluorescentes germicidas com potência nominal de 9W (potência total de 27 W), que emitem luz no comprimento de onda na faixa de 100 a 279 nm (UV-C) (FREITAS, 2014). O tempo de contato do semicondutor a 120 mg/L com o fármaco foi de 120 minutos. Estas amostras foram gentilmente cedidas pelo Prof. Robson Afonso e maiores detalhes podem ser obtidos em FREITAS (2014). As amostras foram

diluídas e as cinco concentrações obtidas – 1 mg/L, 0,75 mg/L, 0,50 mg/L, 0,25 mg/L e 0,01 mg/L – foram posteriormente submetidas aos ensaios *in vitro*.

Figura 4.2 - Fotocatálise heterogênea com dióxido de titânio ativado por luz ultravioleta.



Fonte: FREITAS (2014)

4.1.3 Amostras de fármacos sem tratamento

Amostras com os fármacos, nas concentrações de 1 mg/L, 0,75 mg/L, 0,50 mg/L, 0,25 mg/L e 0,01 mg/L em água Milli-Q, sem passar pela cloração e pela fotocatalise, foram testadas em cada ensaio biológico com o objetivo de analisar o efeito dos mesmos sem as etapas dos tratamentos. No ensaio *Salmonella*/microsoma foi testada ainda a concentração de 10 mg/L de cada fármaco a fim de avaliar se nesta concentração os fármacos seriam tóxicos para as bactérias.

Todas as amostras da cloração e da fotocatalise foram preparadas no mesmo dia da realização dos ensaios, sem armazenamento, para evitar perda de possíveis compostos mutagênicos e/ou citotóxicos.

4.2 Ensaio biológicos in vitro

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos (LBTM) do Departamento de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da UFOP.

4.2.1 Ensaio *Salmonella*/microsossoma

Para realização do ensaio *Salmonella*/microsossoma foi utilizado o mesmo protocolo de pré-incubação adotado pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, e elaborado por Elisa Raquel Anastácio Ferraz. Os meios de cultura, soluções e procedimento de ensaio condizem com o descrito por Maron & Ames (1983) e com as orientações do *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). Os meios de cultura e soluções estão detalhados no Apêndice A.

4.2.1.1 Isolamento e estoque das bactérias

Para a realização do teste foram utilizadas as linhagens TA98 e TA100 da bactéria *Salmonella typhimurium* adquiridas na Molttox – Molecular Toxicology Inc. As bactérias foram recebidas em forma de pequenos discos de papel saturados com as culturas bacterianas, selados em sacos plásticos com um pouco de ágar e liofilizados. Os discos foram mantidos em geladeira a 4°C até o momento do uso.

Para ressuspensão dos discos de bactérias os mesmos foram colocados em Erlenmeyers estéreis, em separado para cada linhagem, com 20 mL de caldo nutriente e ampicilina numa concentração de 25 µg/mL. Os frascos foram incubados com agitação entre 150-170 rpm, a 37°C por no máximo 16 horas.

Para isolamento das colônias de bactérias estriou-se, utilizando alça de platina, o caldo de cultura em placas de ágar nutriente. Após este procedimento as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. De cada linhagem foram selecionadas, ao acaso, cinco colônias isoladas que foram inoculadas em tubos de ensaio estéreis contendo 5 ml de caldo nutriente sem ampicilina, uma a uma. Para todas estas colônias inoculadas nos tubos de ensaio realizaram-se as provas genéticas descritas no item a seguir.

4.2.1.2 Verificação das características genéticas das linhagens

Os genótipos das cepas devem ser confirmados de acordo com a rotina de cada laboratório. Para verificar se os mesmos mantinham-se após a ressuspensão dos discos de bactérias e antes da realização dos ensaios, alíquotas das culturas crescida nos 5 mL de caldo nutriente foram submetidas às provas genéticas descritas a seguir. O método empregado foi o mesmo descrito por Maron & Ames (1983).

➤ **Mutação *rfa***

Linhagens de bactérias que possuem a mutação *rfa* devem ser testadas com relação à sensibilidade ao cristal violeta. Com esta mutação, moléculas grandes como o cristal violeta podem penetrar na célula. Para testar esta mutação com o uso de zaragatoas estéreis inocularam-se as culturas crescidas nos tubos de ensaio em placas com ágar nutriente. Em seguida adicionaram-se discos de papel filtro estéreis embebidos com solução cristal violeta a 1%. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após este período as colônias que apresentavam um halo de inibição, de aproximadamente 14 mm, ao redor do disco indicavam a presença da mutação que permite que moléculas grandes como o cristal violeta penetre na célula e inibam seu crescimento.

➤ **Plasmídeo pKM101**

Cepas da bactéria com presença do plasmídeo de resistência a ampicilina devem ser testadas, pois o mesmo pode ser perdido. Para isso, em placas contendo ágar nutriente foram feitas linhas da solução de ampicilina (8 mg/8 mL) sobre as quais estriaram-se as culturas crescidas no caldo nutriente, uma a uma em separado. As linhagens que mantinham o plasmídeo de resistência à ampicilina cresciam sobre estas linhas após incubação das placas a 37°C por 24 horas.

➤ **Deleção *uvrB***

A mutação *uvrB* pode ser confirmada demonstrando a sensibilidade das bactérias pela luz UV. Estrias de cada colônia foram feitas em linhas horizontais em placas com ágar nutriente. Em seguida, a placa foi exposta aberta à luz ultravioleta da capela de fluxo laminar por 15 segundos a 33 centímetros de distância, com metade da mesma coberta por gaze. Após incubação por 24 horas a 37°C as colônias cuja deleção era mantida não cresceram no lado irradiado da placa.

➤ **Dependência da histidina**

Para confirmar a dependência da histidina as culturas crescidas em caldo nutriente foram inoculadas em placas contendo ágar mínimo suplementado somente com biotina (controle) e placas com ágar mínimo suplementado com biotina e excesso de histidina. As linhagens que mantinham a dependência ao aminoácido cresceram nas placas com excesso de

histidina e não cresceram nas placas somente com biotina, após incubação por 24 horas (MARON & AMES, 1983).

➤ **Reversão espontânea**

Para avaliação da taxa de reversão espontânea 100 µL de cultura de cada cepa foi inoculado em 2 mL de ágar de superfície (47°C) e após homogeneização vertidos em placa de ágar mínimo com biotina-histidina 0,5 mM. Para cada colônia selecionada e crescida nos 5 mL de caldo nutriente o ensaio foi feito em triplicata, totalizando 15 placas para cada linhagem. Após 66 horas de incubação o número de revertentes por placa foi contado manualmente, e calculada a média de revertentes por colônia. A taxa de reversão espontânea observada para cada cepa, e esperada para o laboratório onde foram realizados os experimentos, foi da menor média a maior média encontrada para cada linhagem.

Segundo Maron & Ames (1983) a reversão espontânea pode variar entre diferentes laboratórios, mas deve ser relativamente constante no mesmo laboratório.

As colônias isoladas e então submetidas aos testes para confirmação dos genótipos e cujas mutações se mantinham foram utilizadas para preparar as alíquotas de bactérias.

Foram preparados duas diferentes alíquotas para cada linhagem e colônia. Em ampolas estéreis colocaram-se 0,9 mL de cultura (crescida em caldo nutriente) e 0,1 mL de DMSO (agente crioprotetor), denominadas cultura de cultivo permanente. Para a realização de cada teste de mutagenicidade foram utilizadas as culturas estocadas e mantidas em ampolas com 180 µL de cultura e 20 µL de DMSO, denominadas de uso rotineiro.

4.2.1.3 Ativação metabólica

Para composição do sistema de ativação metabólica utilizou-se a fração microssomal de células de fígado do rato *Sprague-Dawley* (fração S9) tratado com agentes indutores de enzimas, PCB – Aroclor 1254. A fração microssomal foi obtida da Moltox – Molecular Toxicology Inc. A mistura foi composta pela fração S9 e de cofatores conforme descrito no Apêndice A. Durante o ensaio, colocou-se um béquer estéril em banho de gelo onde foi preparada a mistura. Os compostos individualmente foram armazenados, quando necessário, mas o volume total da mistura era preparado de acordo com a demanda no experimento, sem armazenamento. O sistema S9 indica se a amostra é originalmente mutagênica ou necessita ser metabolizada para se tornar.

4.2.1.4 Controles positivo e negativo

Os controles foram empregados na presença e na ausência de ativação metabólica, neste último caso utilizando tampão fosfato 0,2 M, para cada ensaio realizado.

Os controles negativos foram realizados em quintuplicata com água Milli-Q, o mesmo solvente utilizado para dissolver as amostras, para cada cepa com e sem ativação metabólica. A inclusão do controle negativo em cada ensaio é necessária para estabelecer o número de colônias que surgem espontaneamente para cada linhagem testada (MARON & AMES, 1983).

O controle positivo foi composto por substâncias comprovadamente mutagênicas e é empregado para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa, além de demonstrar a eficácia da mistura S9 (MARON & AMES, 1983). Na ausência de metabolização utilizou-se de 2,5 a 5 µg por placa de azida sódica para TA100, e na presença de metabolização de 5 a 10 µg de fluorenamina para TA98. Os controles positivos foram realizados em duplicata em cada experimento.

4.2.1.5 Crescimento das culturas para o ensaio

Alíquotas de uso rotineiro foram utilizadas para realização dos ensaios. 100 µL de cada cultura foram inoculados em 20 mL de caldo nutriente em Erlenmeyers estéreis, em separado para cada linhagem. Os frascos foram incubados com agitação entre 150-170 rpm, a 37°C por no máximo 16 horas.

4.2.1.6 Análise das amostras

As amostras investigadas foram testadas em cinco doses com três repetições cada, conforme orientações da Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (UMBUZEIRO et al., 2009).

As soluções dos fármacos estudados (CPT, DCF e SMX) e destes submetidos à cloração ou fotocátalise, foram testadas nas seguintes doses: 1 ng/placa; 25 ng/placa; 50 ng/placa; 75 ng/placa; 100 ng/placa e 1000 ng/placa, a fim de investigar presença de mutagenicidade dos mesmos e/ou dos possíveis subprodutos formados a partir da desinfecção com cloro ou pela fotocátalise. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.1.

4.2.1.7 Procedimentos do ensaio

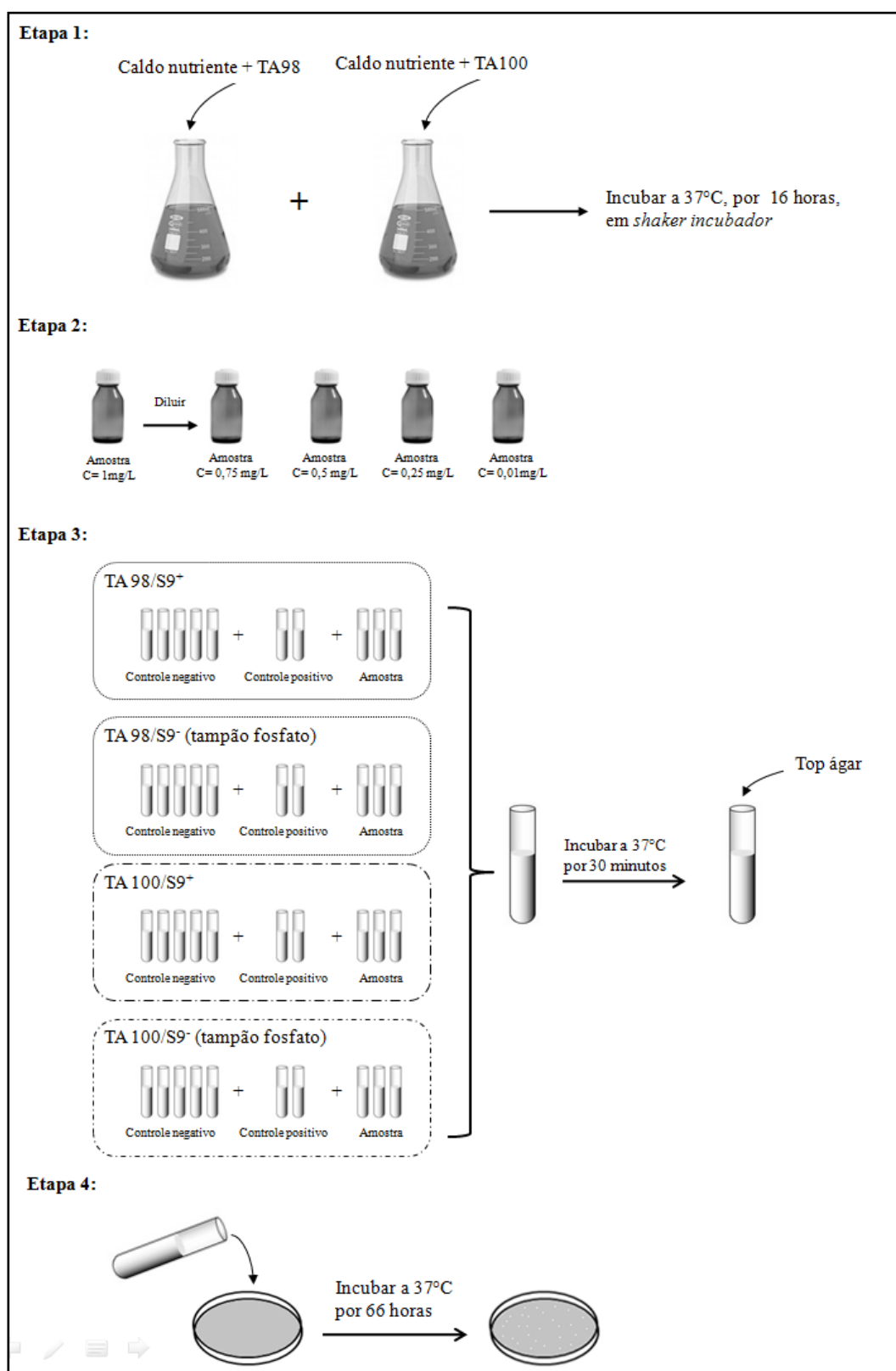
Para o ensaio de mutagenicidade adotou-se uma das modificações metodológicas do procedimento padrão, descrito primeiramente por Yahagi et al. (1975) e denominado de teste de Pré-incubação. Neste procedimento o composto teste, a bactéria e a mistura S9 são adicionadas a um tubo de ensaio e incubadas a 37°C por um período de 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se o ágar de superfície e o conteúdo foi vertido na placa com ágar mínimo. Um esquema do ensaio está ilustrado na FIG. 4.3.

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar com materiais estéreis e está descrito a seguir:

- ✓ Os tubos de ensaio estéreis foram devidamente identificados.
- ✓ As culturas bacterianas foram transferidas para a capela de fluxo laminar.
- ✓ A mistura S9 foi preparada em banho de gelo.
- ✓ Os tubos com amostra na presença de ativação metabólica receberam: 100 µL de cultura bacteriana, 100 µL da amostra nas cinco diferentes doses (em separado) e 500 µL de mistura S9.
- ✓ Os tubos sem ativação metabólica receberam: 100 µL de cultura bacteriana, 100 µL da amostra nas cinco diferentes doses e 500 µL de tampão fosfato 0,2 M.
- ✓ Cada dose do composto teste foi ensaiada em triplicata, na presença e ausência de ativação metabólica.
- ✓ Nos tubos para controle negativo foram adicionados: 100 µL de cultura bacteriana, 100 µL de água Milli-Q e 500 µL de mistura S9 ou tampão fosfato 0,2 M.
- ✓ Para cada linhagem, com e sem S9, o controle negativo foi realizado em quintuplicata.
- ✓ Nos tubos do controle positivo, na presença de ativação metabólica, foram colocados 100 µL de cultura bacteriana, 500 µL de mistura S9 e 10 µL da solução fluorenamina.
- ✓ Nos tubos do controle positivo, na ausência de ativação metabólica, foram colocados 100 µL de cultura bacteriana, 500 µL de tampão fosfato 0,2 M e 10 µL da solução de azida sódica.
- ✓ Para cada linhagem, com e sem S9, o controle positivo foi realizado em duplicata.

- ✓ Após a pipetagem de todos os compostos nos devidos tubos de ensaio, os mesmos foram fechados com tampa de rosca e incubados por 30 minutos em estufa a 37°C
- ✓ Quando retirados da estufa cada tubo recebeu 2 mL de ágar de superfície, previamente derretido em microondas, e mantido em banho-maria.
- ✓ Após homogeneização o conteúdo de cada tubo foi vertido em placa contendo ágar mínimo.
- ✓ Após solidificação do ágar as placas foram incubadas invertidas por 66 horas a 37°C.
- ✓ As colônias revertentes em cada placa do composto teste foram contadas manualmente e comparadas ao controle negativo como explicitado no item Análise dos resultados.

Figura 4.3 - Esquema do procedimento do protocolo de pré-incubação para o ensaio *Salmonella*/microsossoma.



Fonte: FREITAS (2014)

4.2.1.8 Análise dos resultados

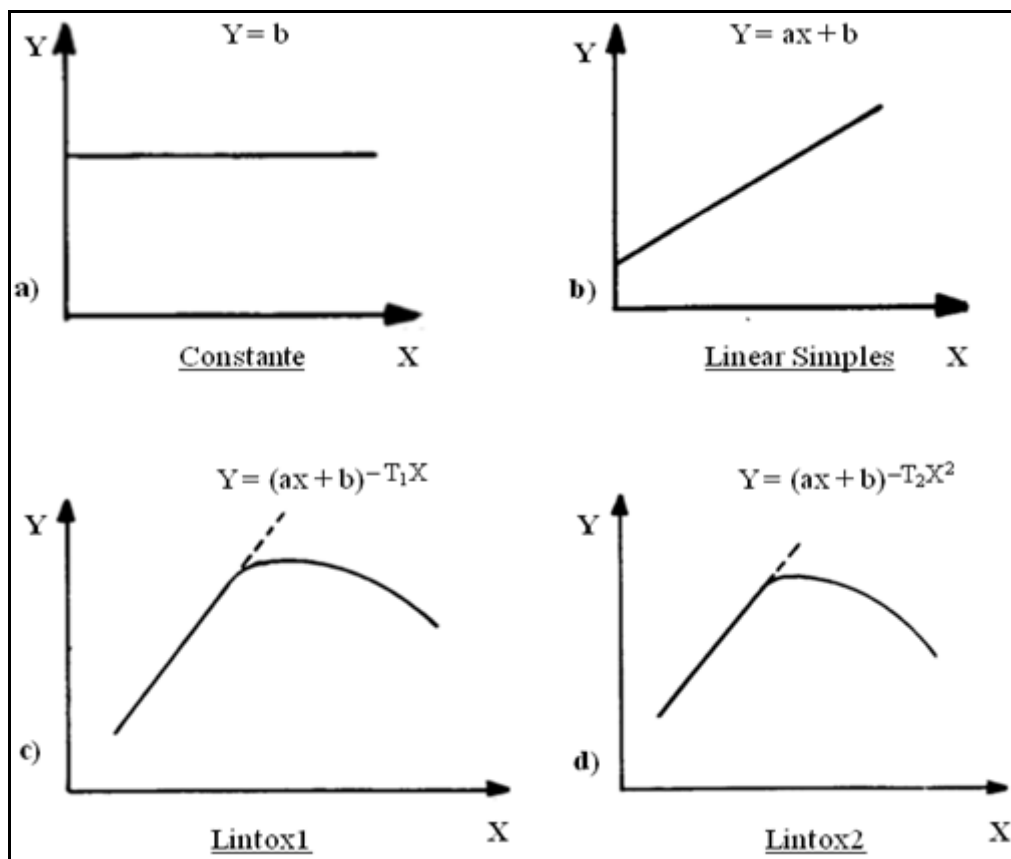
Para análise dos resultados a maioria dos trabalhos publicados utiliza o programa Salanal (*Salmonella Assay Analysis*). Este foi elaborado e especialmente desenvolvido para o teste pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA. No programa as médias de revertentes em cada dose analisada são comparadas aos respectivos controles negativos e avaliados pela análise de variância ANOVA e pela relação dose-resposta. Esta relação foi estudada por Myers e quando um dos modelos propostos – Linear Simples, Lintox1 ou Lintox2 se ajustam aos dados, indicam atividade mutagênica com $p \leq 0,05$. A ausência de atividade mutagênica é representada pelo modelo Constante (FIG.4.4). Quando nenhum dos modelos anteriores se encaixa aos dados, o programa utiliza o modelo de Bernstein, uma variação do modelo linear, que usa regressão linear e ANOVA.

Pelo programa pode-se identificar qual o modelo mais aceitável aos dados analisados, o valor da análise de variância (ANOVA - teste F) e o efeito dose-resposta (obtido na origem da curva). O programa calcula ainda a inclinação da reta da parte linear da curva dose-resposta, este valor corresponde ao número de revertentes induzidos por unidade de amostra analisada. Estes parâmetros devem ser analisados com cautela uma vez que fazem mais sentido quando há uma diferença estatística entre o número de revertentes nas doses analisadas e quando a inclinação na origem da curva dose-resposta é positiva (ambos com $p \leq 0,05$), ou seja, quando a amostra é mutagênica.

Uma complementação à análise estatística pode ser obtida através do cálculo da Razão de Mutagenicidade (RM) para cada dose, utilizando a seguinte equação:

$$RM = \frac{\text{média do número de revertentes na placa teste}}{\text{média do número de revertentes por placa no controle negativo}}$$

Figura 4.4 - Modelos de relação dose-resposta. a) Constante (amostra negativa). b) Linear simples. c) Lintox1 (Linear atenuado por toxicidade exponencial simples). d) Lintox2 (Linear atenuado por toxicidade exponencial a segunda potência). X = doses de amostra. Y = média do número de revertentes por placa.



Fonte: VALENT (1990)

As diferentes formas para interpretação dos dados do ensaio *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) encontradas na literatura foram analisadas e para a interpretação dos resultados do presente trabalho adotou-se o que apresenta um maior nível de exigência. Neste caso, um resultado é positivo quando os dados se encaixam em um dos modelos (Linear, Lintox1, Lintox2 ou Bernstein), com análise de variância (ANOVA) significativa ($p \leq 0,05$), relação dose-resposta positiva ($p \leq 0,05$) e quando razão de mutagenicidade for maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses. Se o RM for menor que 2, mas a amostra tiver relação linear, com ANOVA e relação dose-resposta significativas ($p \leq 0,05$), o resultado é dado como indícios de mutagenicidade.

Segundo documento elaborado por Umbuzeiro et al. (2009) com orientações básicas para execução de testes de mutagenicidade, como o teste de Ames, uma amostra deve ser considerada positiva com ANOVA significativa ($p < 0,05$), RM igual a 2 e efeito dose-

resposta significativamente positiva ($p < 0,05$). Caso a ANOVA e a dose-resposta forem significativas e o RM não seguir o mesmo padrão deve-se repetir o ensaio. Caso a repetição não seja possível o resultado deve ser considerado inconclusivo.

Os trabalhos publicados que utilizaram todas estas variáveis para resultado final do teste podem ser consultados na revisão de literatura deste trabalho na seção 3.5.1.1 (QUADRO 3.2).

Para interpretação dos resultados reportados neste trabalho todos os parâmetros descritos acima foram considerados para resultado final. Quando apenas um dos parâmetros não atendeu aos requisitos o resultado foi considerado negativo. Os dados obtidos pelo ensaio para os fármacos adotados no presente trabalho foram analisados através do software Salanal. Em alguns casos o programa informa a potência mutagênica do composto estudado, que é expressa pelo número de revertentes por unidade de amostra, no caso deste trabalho como revertentes/ng (rev./ng), que indica a potência do composto em induzir atividade mutagênica.

Para comparação do número de revertentes antes e após os tratamentos (cloração e fotocatalise) os dados foram submetidos ao programa estatístico Graph Pad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA,USA) à análise de variância ANOVA (assumindo $p < 0,05$) seguida pelo pós-teste de Tukey para comparação da mutagenicidade entre as amostras.

4.2.2 Ensaio de Citotoxicidade pela técnica do MTT

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados de acordo com Mosmann (1983) com pequenas modificações. A composição e detalhes do preparo dos meios de cultura e das soluções usadas estão descritos no Apêndice B.

4.2.2.1 Manutenção das Células

Para o ensaio de citotoxicidade pela técnica do MTT utilizou-se células HepG2 que foram gentilmente cedidas pelo Prof. Breno de Mello Silva do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos da UFOP.

As células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² com 15 mL de meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de antibióticos (penicilina-estreptomicina). Os frascos foram conservados em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂.

Para manutenção das células o repique celular foi realizado periodicamente, especialmente quando a densidade das células na monocamada estava elevada, aproximadamente 90%.

No repique celular, o meio de cultura do frasco era descartado e as células lavadas duas vezes com PBS, com o objetivo de remover completamente o meio restante. Em seguida, adicionava 750 μL de tripsina e aguardava a dissociação das células. A visualização no microscópio invertido era realizada para garantir que as células estavam soltas da monocamada. Após este processo adicionava o volume de meio para realizar o repique e fazia a homogeneização com pipeta, desfazendo os grumos formados. Parte do meio com células era descartado, e então, o meio de cultura era completado para 15 mL. Os frascos foram mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO_2 .

4.2.2.2 Preparo das Células HepG2 para os ensaios

Foram realizados todos os passos do repique celular descritos anteriormente até a tripsinização. Adicionou 3 mL de meio de cultura e após homogeneização e desfazimento dos grumos de células retirou-se 2 mL de meio com células e transferiu 1 mL para dois microtubos estéreis. Para o frasco de cultura prosseguiu com o repique como citado no tópico acima.

Em um terceiro microtubo estéril foi adicionado 50 μL do conteúdo de um dos microtubos e 450 μL de PBS. Após leve homogeneização coletou uma alíquota que foi adicionada à câmara de Neubauer.

Após a contagem das células determinou-se o volume de suspensão celular que seria necessário para obter uma densidade de células de 1×10^4 em cada poço da microplaca. As células foram então semeadas em uma placa de 96 poços (TPP) de fundo chato. O volume de suspensão celular e meio em cada poço foi sempre de 200 μL .

4.2.2.3 Amostras

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.1. Para serem usadas no teste as mesmas foram acondicionadas em frascos estéreis e, em capela de fluxo laminar, filtradas através de filtro seringa de 0,2 μm para microtubos estéreis.

Soluções dos fármacos estudados (CPT, DCF e SMX) e destes submetidos à cloração ou fotocatalise, foram testadas em cinco diferentes doses: 0,8 ng/poço; 20 ng/poço; 40 ng/poço; 60 ng/poço e 80 ng/poço, respectivamente provenientes das soluções com

concentrações de 0,01 mg/L, 0,25 mg/L, 0,50 mg/L, 0,75 mg/L e 1 mg/L, a fim de investigar presença de citotoxicidade dos mesmos e dos possíveis subprodutos formados a partir dos tratamentos. As amostras foram analisadas em quintuplicata.

4.2.2.4 Controle

Poços controle foram ensaiados em quintuplicata e constituídos por 40% do volume de água Milli-Q (mesmo solvente das amostras) e 60% de meio de cultura, num volume total de 200 µL. A adição do meio de crescimento controle e água permitiram excluir os possíveis efeitos de diluição do meio (ZEGURA et al., 2009).

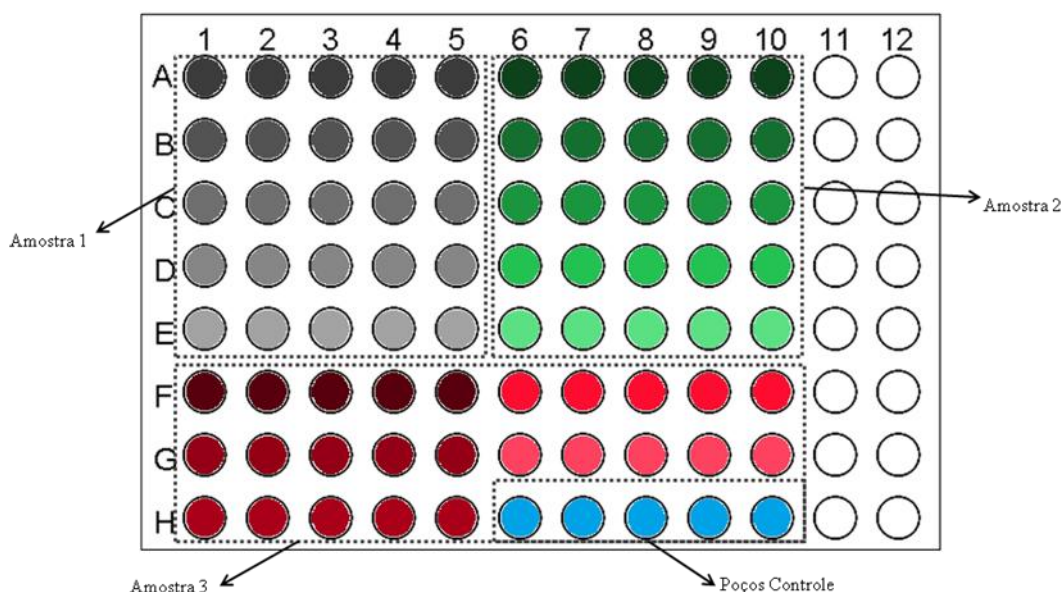
4.2.2.5 Procedimentos do ensaio

Todo procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar, utilizando microplacas de 96 poços de fundo chato (FIG.4.5), seguindo os passos:

- ✓ Após determinado o volume celular para obter 1×10^4 células / poço, as células foram semeadas nos poços da microplaca.
- ✓ O volume de células foi completado com meio DMEM suplementado com SFB (15%) e solução de antibióticos (1%).
- ✓ O volume total da suspensão celular foi de 200 µL / poço.
- ✓ As placas foram incubadas na estufa de CO₂ a 37°C com 5% CO₂ por 4 horas para adesão das células.
- ✓ Após este período o meio foi completamente removido.
- ✓ Aos poços com amostra adicionou-se um volume total de 200 µL de meio com amostra nas cinco doses (0,8 ng/poço; 20 ng/poço; 40 ng/poço; 60 ng/poço e 80 ng/poço), sendo 60% de meio DMEM sem SFB e 40% da amostra.
- ✓ Aos poços controle adicionou-se um volume total de 200 µL, sendo 60% de meio DMEM sem SFB e 40% de água Milli-Q.
- ✓ As placas foram incubadas por 20 horas.
- ✓ O conteúdo dos poços foi removido.
- ✓ Adicionou-se 200 µL de solução de MTT em PBS a uma concentração de 0,5 mg / mL por poço.
- ✓ As células foram incubadas por 3 horas a 37°C.
- ✓ Retirou-se a solução de MTT.

- ✓ Os poços foram lavados duas vezes com PBS.
- ✓ Adicionou-se em todos os poços 200 μ L de DMSO puro.
- ✓ A placa foi agitada manualmente até os cristais de formazan desaparecerem.
- ✓ Após estabilização da cor, mediu-se a absorbância a 570 nm no equipamento Spectra MAX – 340PC da marca Molecular Devices.

Figura 4.5 - Layout de uma microplaca de 96 poços usada no ensaio de MTT com células HepG2, para três amostras com cinco doses e poços controle, todos em quintuplicata.



Nota: As concentrações foram decrescentes dos poços A em direção ao E para amostras 1 e 2, e dos poços F em direção ao H para amostra 3. Os poços de 6H a 10H corresponderam ao controle do experimento correspondendo a meio DMEM e água Milli-Q.

4.2.2.6 Análise dos Resultados

A viabilidade foi determinada comparando a absorbância dos poços contendo células tratadas com amostras com a dos poços com células expostas a água Milli-Q em meio de crescimento (controle). A média da absorbância dos poços controle foi considerada como 100% de viabilidade e uma regra de três foi calculada para saber a porcentagem da média dos poços com amostra para cada concentração.

Uma redução de 30% na viabilidade, pela amostra, foi considerada uma resposta citotóxica. Para avaliar diferença estatística na citotoxicidade antes e após os tratamentos (cloração e fotocátalise) os resultados foram comparados usando teste-*t* (assumindo $p < 0,05$) através do programa estatístico Graph Pad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA,USA). Para avaliar relação dose-resposta os valores de viabilidade das doses foram

comparados através da análise de variância ANOVA (assumindo $p < 0,05$) seguida pelo pós-teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Implementação do ensaio *Salmonella*/microsoma

Para a execução deste trabalho o ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma (teste de Ames) foi implementado no Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microorganismos (LBTM/UFOP) onde todos os ensaios biológicos foram realizados. Para isso, as duas linhagens selecionadas da bactéria *Salmonella typhimurium* foram isoladas em ágar nutriente e, posteriormente, as características genotípicas foram testadas, o que deve ser realizado após recebimento das cepas, antes de iniciar os ensaios e para preparo das culturas estoque (MARON & AMES, 1983). As características genotípicas testadas foram dependência da histidina, mutação *rfa*, deleção *uvrB* e a presença do plasmídeo pKM101 de resistência à ampicilina. Bactérias com dependência da histidina cresceram nas placas com excesso deste aminoácido e não cresceram nas que tinham somente biotina. A mutação *rfa* foi confirmada pela presença de um halo de inibição ao redor de um disco de papel embebido com solução cristal violeta 1%. A deleção *uvrB* foi confirmada pela ausência de crescimento das bactérias em um lado da placa de petri contendo ágar nutriente após irradiação por luz UV. A manutenção do plasmídeo de resistência à ampicilina foi observada quando as bactérias cresceram após serem estriadas sobre uma linha de solução do antibiótico em ágar nutriente. Um registro dos resultados obtidos está apresentado no Apêndice C. Os métodos para confirmação dos genótipos estão descritos na seção 4.2.1.2. Somente após a confirmação dos mesmos os testes foram realizados.

A taxa de reversão espontânea das cepas para independência da histidina foi uma das características analisadas e é expressa em número de revertentes por placa. Os procedimentos para esta análise estão descritos no item 4.2.1.2 e os resultados obtidos em nosso laboratório para as cepas TA98 e TA100 estão expressos na TAB. 5.1.

Tabela 5.1 - Taxa de reversão espontânea para as linhagens TA98 e TA100 da bactéria *Salmonella typhimurium* em número de revertentes por placa.

Linhagem	Taxa de Reversão Observada
TA98	34 - 44
TA100	35 - 205

*Taxa de reversão observada na ausência de ativação metabólica.

5.2 Efeito da cloração e fotocatalise dos fármacos na mutagenicidade

Dados de mutagenicidade para os fármacos estudados são relativamente incipientes. Segundo a base de dados *Toxicology Data Network* (ToxNet) da United States National Library of Medicine ainda não há na literatura trabalhos adotando o ensaio *Salmonella*/microsoma para o Captopril (CPT) e para o Diclofenaco (DCF) e o Sulfametoxazol (SMX) apenas um único trabalho de cada fármaco foi publicado até o momento. A mutagenicidade e outros efeitos tóxicos destes fármacos após a desinfecção com cloro e dos subprodutos precisam ser mais investigados.

O cloro residual das amostras destinadas ao teste de mutagenicidade foi neutralizado por tiosulfato de sódio (Na_2SO_3) para evitar a toxicidade do desinfetante para as bactérias. Um teste preliminar com o tiosulfato foi realizado com as duas linhagens adotadas (TA98 e TA100), na presença e ausência de metabolização, e demonstrou que o agente redutor não induz deslocamento do quadro de leitura e substituição de pares de bases com e sem S9 (dados não mostrados). Portanto, o tiosulfato foi adicionado em todas as amostras antes de submetidas aos ensaios

Os dados da média do número de revertentes por placa, desvio padrão (DP), a razão de mutagenicidade (RM) e o modelo mais aceitável para as amostras antes e após cloração, com as linhagens TA98 e TA100 da bactéria *Salmonella typhimurium* na presença (+S9) e ausência de metabolização (-S9) estão apresentados nas TAB.5.2 (CPT e CPT/ NaClO), 5.3 (CPT/ TiO_2 /UV-C), 5.4 (DCF e DCF/ NaClO) e 5.5 (SMX e SMX/ NaClO).

5.2.1 Captopril

As amostras de captopril (CPT) e captopril clorado (CPT/NaClO) não induziram atividade mutagênica nas cepas TA98 e TA100, com (S9+) e sem (S9-) metabolização. Isto porque os três parâmetros não atenderam aos requisitos para positividade das amostras, ou seja, ANOVA e a relação dose-reposta significativos ($p \leq 0,05$) e RM maior ou igual a 2. Embora em algumas situações algum parâmetro fosse significativo, a análise individual não pode indicar atividade mutagênica da amostra. O observado indica que tanto o fármaco original quanto os possíveis subprodutos formados pela oxidação com o cloro não induzem deslocamento do quadro de leitura e substituição dos pares de bases, tanto na presença quanto na ausência de metabolização.

A quantificação dos subprodutos do captopril após a cloração por membros do nosso grupo de pesquisa apontou aproximadamente cinco subprodutos deste processo, contudo, sem a identificação da estrutura química até o momento (FREITAS, comunicação pessoal). A FIG. 5.1 mostra o efeito o captopril, antes e após cloração, sobre a média do número de revertentes para as linhagens. O gráfico aponta que com a cepa TA98/S9+ (FIG.5.1a) o número de revertentes diminuiu significativamente ($p < 0,05$) após a cloração, informação complementada e de acordo com os dados da TAB. 5.2.

A Figura 5.1 (c,d) mostra que a média de revertentes para a cepa TA100, na presença e ausência de metabolização, aumentou após o tratamento, embora sem diferença estatística em relação a amostra não clorada.

As doses do captopril administradas para adultos com quadros de hipertensão, insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio podem variar de 6,25 a 150 mg diárias, podendo chegar a 450 mg por dia em pacientes com hipertensão incontrolada em doses baixas (SWEETMAN, 2009). Sabe-se que de 40-50% da droga é liberada inalterada pelo paciente, portanto, de 75 a 225 mg/dia/paciente pode ser excretado no esgoto. Considerando as taxas de remoção apresentadas na revisão de literatura (item 3.3) deste trabalho para outros fármacos (65-80%), já que não foram encontrados na literatura estudos similares para o captopril, de 15 a 78 mg do fármaco podem ser liberados com o efluente e lançado nas águas superficiais.

Estudos para avaliação da mutagenicidade do medicamento pela indústria farmacêutica, através do teste de micronúcleos, e do seu potencial de redução deste efeito, estimulado por outros fármacos, demonstraram que além de não aumentar a

incidência destas estruturas extranucleares o antihipertensivo reduziu sua formação quando as células eram testadas com as outras drogas (HOSSEINIMEHR & KARAMI, 2005; AL-HARBI, 1993).

Estudos com diversos inibidores de angiotensina, entre eles o captopril, demonstraram que alguns deles possuem efeitos contra o câncer. No caso do CPT foi observada uma inibição na proliferação de células de ductos mamários (SMALL et al., 1997), da córnea (VOLPERT et al., 1996), pancreáticas (REDDY et al., 1995) do pulmão (PRONTERA et al., 1999) e renais (HII et al., 1998) através de ensaios *in vivo* e *in vitro*. Embora alguns trabalhos já tenham demonstrado estes efeitos, estudos experimentais adicionais são necessários para confirmar as informações (ROSENTHAL & GAVRAS, 2009).

Nenhuma evidência de carcinogênese foi observada em ratos e camundongos administrados diariamente com doses de captopril de 50-1350 mg.kg⁻¹.d⁻¹ durante dois anos (MCEVOY, 1999). A maior dose testada é muito maior que a máxima administrada a um paciente (450 mg) o que pode minimizar a preocupação inerente a esta alteração.

Como não há na literatura dados de mutagenicidade para o fármaco com o teste *Salmonella*/microsoma, indicamos a repetição do ensaio para confirmar os resultados obtidos neste trabalho.

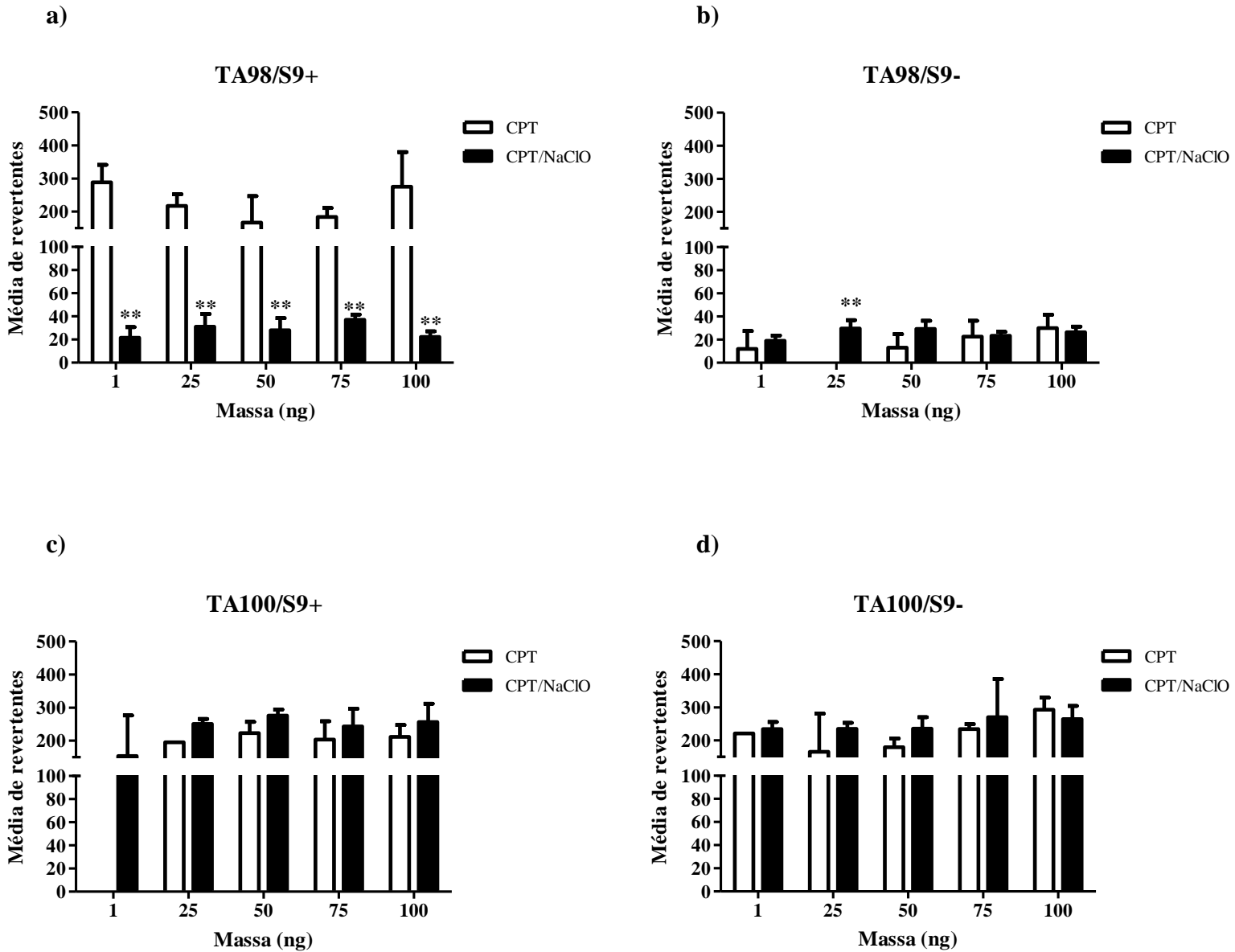
A toxicidade do CPT foi testada em organismos aquáticos, como macrófitas, crustáceos e algas, e os efeitos foram observados nas concentrações de 25 mg/L, 100 mg/L e 168 mg/L, respectivamente (CLEUVERS, 2002). Isto demonstra uma diferença na sensibilidade do organismo teste, e ainda com relação ao ensaio de mutagenicidade adotado, utilizando bactérias *Salmonella typhimurium*, em que as concentrações com efeitos observáveis foram bem inferiores.

Tabela 5.2 - Número de revertentes por placa induzidos pelos fármacos captopril original (CPT) e captopril clorado (CPT/NaClO) com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência e na presença de ativação metabólica exógena (S9).

Número de revertentes / placa								
Amostra (ng/placa)	TA98 (média ± DP)				TA100 (média ± DP)			
	- S9	RM	+ S9	RM	- S9	RM	+ S9	RM
CAPTOPRIL								
0	28,20 ± 5,36	-	37,00 ± 3,67	-	269,80 ± 40,11	-	277,40 ± 21,73	-
1	12,00 ± 15,56	0,43	288,33 ± 53,16**	7,79	221,00 ± 0,00	0,82	-	-
25	-		217,33 ± 34,93**	5,87	165,67 ± 114,94	0,61	195,00 ± 0,00	0,70
50	13,00 ± 11,79	0,46	166,67 ± 80,39	4,50	179,33 ± 26,27	0,66	223,00 ± 33,94	0,80
75	22,67 ± 13,58	0,80	183,67 ± 27,47**	4,96	234,00 ± 15,13	0,87	203,00 ± 55,57	0,73
100	30,00 ± 11,53	1,06	275,00 ± 105,06*	7,43	292,67 ± 36,46	1,08	211,33 ± 36,20	0,76
1000	36,33 ± 12,86	1,30	152,67 ± 37,85*	4,13	398,67 ± 151,31	1,48	269,00 ± 20,22	0,97
Análise Estatística	ANOVA: 16,8% (ns) Linear / Bernstein: 21,10% Relação dose-resposta: p=6,5% (ns) Revertentes/ng: 0,016		ANOVA: 0,1% (*) - - -		ANOVA: 6,0% (ns) Linear / Bernstein: 22,1% Relação dose-resposta: p=0,7% (*) Revertentes/ng: 0,1898		ANOVA: 7,2% (ns) Linear / Bernstein: 6,7% Relação dose-resposta: p=9,4% (ns) Revertentes/ng: 0,0365	
CAPTOPRIL CLORADO								
0	19,50 ± 9,75	-	33,80 ± 6,14	-	278,60 ± 57,74	-	235,60 ± 38,58	-
1	19,00 ± 4,58	0,97	21,50 ± 9,19	0,64	234,00 ± 21,63	0,84	153,33 ± 122,90	0,65
25	29,67 ± 7,09	1,52	31,00 ± 11,00	0,92	235,00 ± 18,19	0,84	250,67 ± 15,31	1,06
50	29,33 ± 7,02	1,50	28,00 ± 10,54	0,83	235,33 ± 34,93	0,84	275,67 ± 18,18	1,17
75	23,33 ± 3,51	1,20	37,00 ± 4,58	1,09	270,33 ± 115,09	0,97	243,00 ± 53,67	1,03
100	26,33 ± 4,93	1,35	22,33 ± 4,73	0,66	264,33 ± 39,80	0,95	256,00 ± 53,65	1,09
Análise Estatística	ANOVA: 29,7% (ns) Lintox1: 67,9% Relação dose-resposta: p=4,8% (*) Revertentes/ng: 0,709		ANOVA: 15,4% (ns) Linear / Bernstein: 11,7% Relação dose-resposta: p=78,5% (ns) Revertentes/ng: -		ANOVA: 78,6% (ns) Linear / Bernstein: 67,7% Relação dose-resposta: p=41,6% (ns) Revertentes/ng: 0,074		ANOVA: 24,3% (ns) Linear / Bernstein: 33,7% Relação dose-resposta: p=6,2% (ns) Revertentes/ng: 0,704	

Os dados são apresentados como média de revertentes ± desvio padrão (DP) e RM (razão de mutagenicidade) para cada linhagem, com e sem S9, no controle negativo e nas cinco doses analisadas. Análise estatística com valor da análise de variância (ANOVA), modelo mais aceitável, valor da relação dose-resposta (p) e revertentes/ng. ** p < 0,01 estatisticamente diferente do respectivo controle negativo. * p < 0,05 estatisticamente diferente do respectivo controle negativo. ns: não significativo.

Figura 5.1 - Média de revertentes e desvio padrão para as linhagens TA98 (a,b) e TA100 (c,d) da bactéria *Salmonella typhimurium* tratadas com cinco doses do captopril (CPT) e captopril clorado (CPT/NaClO), na presença (S9+) e ausência (S9-) de metabolização. **Diferente estatisticamente da respectiva amostra não clorada ($p < 0,05$).



Apesar dos resultados mostrarem $RM > 2$ e relação dose-resposta significativa ($p < 0,05$) com a cepa TA98/S9+, estes parâmetros sozinhos não podem indicar a presença de mutagenicidade. Assim, as amostras de captopril fotocatalisado, e logo, os subprodutos formados não induziram deslocamento do quadro de leitura (TA98) e substituição dos pares de bases (TA100), na presença ou ausência de metabolização (TAB.5.3).

A média de revertentes após o tratamento foi inferior para a linhagem TA98/S9+ (FIG.5.2a) e para a linhagem TA100 na presença e ausência de metabolização (FIG.5.2c,d).

As amostras de captopril submetidas à fotocatalise por 120 minutos com dióxido de titânio ($TiO_2/UV-C$) foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) (FREITAS, 2014). Através desta análise química pôde-se observar a formação de 11 subprodutos a partir da oxidação do antihipertensivo pelo semicondutor que foi previamente ativado por luz ultravioleta e não foi observado um residual do fármaco inalterado ao final do processo. Vale ressaltar que provavelmente a identificação dos subprodutos da fotocatalise do CPT foi realizada pela primeira vez pelo nosso grupo de pesquisa. Os subprodutos formados por este processo não foram, até o momento, reportados na literatura.

Os radicais hidroxila demonstraram efetividade na oxidação/remoção do captopril em água, já que o fármaco não foi observado após o tratamento pela análise cromatográfica. A eficiência destes radicais em oxidar fármacos já foi demonstrada na literatura (HUBER et al., 2003).

A modificação de compostos como os fármacos pela oxidação pode levar a formação de subprodutos tóxicos, portanto, a aplicação de diferentes estudos de toxicidade para avaliar todos os possíveis efeitos destes compostos é uma alternativa para minimizar os efeitos inesperados em longo prazo.

A eficiência do processo fotocatalítico com dióxido de titânio já foi demonstrada para sulfetos orgânicos (HABIBI & VOSOOGHIAN, 2005), para diminuição da toxicidade de fármacos degradados (CALZA et al., 2006) e de corantes presentes em efluentes (BIZANI et al., 2006), para reduzir a estrogenicidade de compostos sintéticos presentes em água como o bisfenol-A (NOMIYAMA et al., 2007), dentre outros. Os resultados aqui apresentados coincidem com os dados da literatura em que após a fotocatalise nenhum subproduto gerado no processo ocasionou mutações nas bactérias *S. typhimurium* aqui empregadas. A fotocatalise com TiO_2 juntamente com outros processos oxidativos (fotoeletrocatalise e eletro-oxidação) reduziram o potencial mutagênico em bactérias TA98 e TA100 de efluente de

indústria petroquímica, com eficiência e mecanismos de degradação distintos (LI et al., 2007). A fotoeletrocatalise (Ti/TiO_2) já foi comprovadamente mais eficiente que a cloração para reduzir a mutagenicidade de compostos que apresentam este potencial (azo corantes) e de gerar subprodutos menos tóxicos que o desinfetante, analisados pelo ensaio *Salmonella*/microsoma (OLIVEIRA et al., 2012).

No presente estudo a toxicidade do $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ não foi testada já que o semicondutor foi removido das amostras antes de submetidas aos ensaios.

Estudos adicionais da remoção deste antihipertensivo no tratamento do esgoto são fundamentais, além do comportamento do fármaco e dos seus metabólitos no tratamento da água.

Como não foram encontrados na literatura estudos para detecção do captopril em efluentes, águas superficiais e tratadas, os riscos ao ser humano quando expostos por estas fontes, principalmente pela água de consumo, fica difícil de ser avaliado.

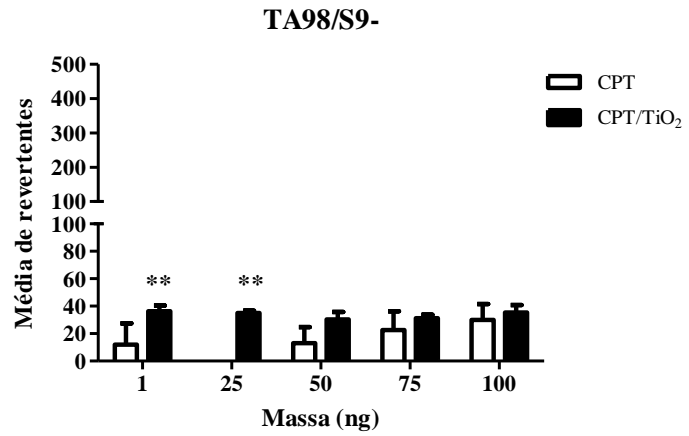
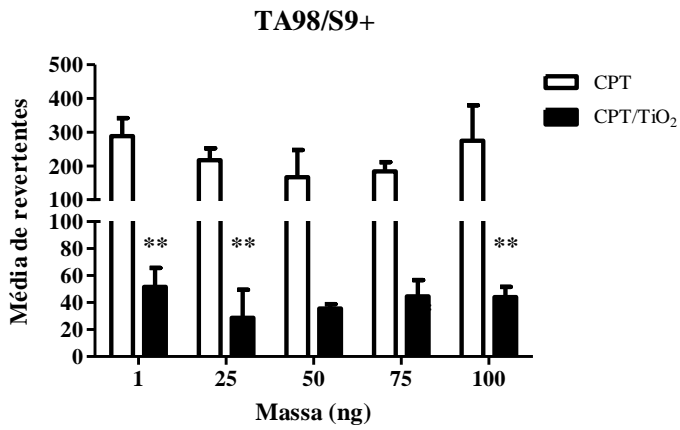
Tabela 5.3 - Número de revertentes por placa induzidos pelos fármacos captopril original (CPT) e captopril fotocatalisado (CPT/TiO₂/UV-C) com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência e na presença de ativação metabólica exógena (S9).

Número de revertentes / placa								
Amostra (ng/placa)	TA98 (média ± DP)				TA100 (média ± DP)			
	- S9	RM	+ S9	RM	- S9	RM	+ S9	RM
CAPTOPRIL								
0	28,20 ± 5,36	-	37,00 ± 3,67	-	269,80 ± 40,11	-	277,40 ± 21,73	-
1	12,00 ± 15,56	0,43	288,33 ± 53,16 ^{**}	7,79	221,00 ± 0,00	0,82	-	-
25	-		217,33 ± 34,93 ^{**}	5,87	165,67 ± 114,94	0,61	195,00 ± 0,00	0,70
50	13,00 ± 11,79	0,46	166,67 ± 80,39	4,50	179,33 ± 26,27	0,66	223,00 ± 33,94	0,80
75	22,67 ± 13,58	0,80	183,67 ± 27,47 ^{**}	4,96	234,00 ± 15,13	0,87	203,00 ± 55,57	0,73
100	30,00 ± 11,53	1,06	275,00 ± 105,06 [*]	7,43	292,67 ± 36,46	1,08	211,33 ± 36,20	0,76
1000	36,33 ± 12,86	1,30	152,67 ± 37,85 [*]	4,13	398,67 ± 151,31	1,48	269,00 ± 20,22	0,97
Análise Estatística	ANOVA: 16,8% (ns) Linear / Bernstein: 21,10% Relação dose-resposta: p=6,5% (ns) Revertentes/ng: 0,016		ANOVA: 0,1% (*) - - -		ANOVA: 6,0% (ns) Linear / Bernstein: 22,1% Relação dose-resposta: p=0,7% (*) Revertentes/ng: 0,1898		ANOVA: 7,2% (ns) Linear / Bernstein: 6,7% Relação dose-resposta: p=9,4% (ns) Revertentes/ng: 0,0365	
CAPTOPRIL FOTOCATALISADO								
0	36,20 ± 7,43	-	22,40 ± 16,70	-	119,80 ± 24,96	-	109,00 ± 26,19	-
1	36,33 ± 4,04	1,00	51,67 ± 14,05	2,31	132,00 ± 14,18	1,10	152,33 ± 51,07	1,40
25	35,00 ± 1,73	0,97	28,67 ± 20,79	1,28	119,00 ± 4,24	0,99	91,33 ± 15,50	0,84
50	30,33 ± 5,51	0,84	35,67 ± 3,21	1,59	111,00 ± 10,44	0,93	77,00 ± 48,51	0,71
75	31,33 ± 2,52	0,87	44,67 ± 11,93	1,99	121,67 ± 13,05	1,02	136,67 ± 27,54	1,25
100	35,33 ± 5,51	0,98	44,00 ± 7,55	1,96	116,67 ± 30,86	0,97	132,00 ± 15,39	1,21
Análise Estatística	ANOVA: 53,1% (ns) Linear / Bernstein: 55,1% P dose-resposta: p=84,8% (ns) Revertentes/ng: -		ANOVA: 21,3% (ns) Linear / Bernstein: 37,4% P dose-resposta: p=3,9% (*) Revertentes/ng: 0,196		ANOVA: 88,6% (ns) Linear / Bernstein: 85% P dose-resposta: p=70,8% (ns) Revertentes/ng: -		ANOVA: 11,1% (ns) Linear / Bernstein: 7,1% P dose-resposta: p=39,4% (ns) Revertentes/ng: 0,061	

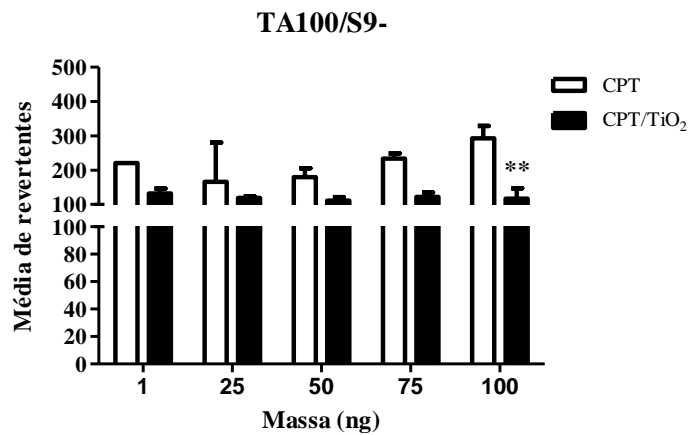
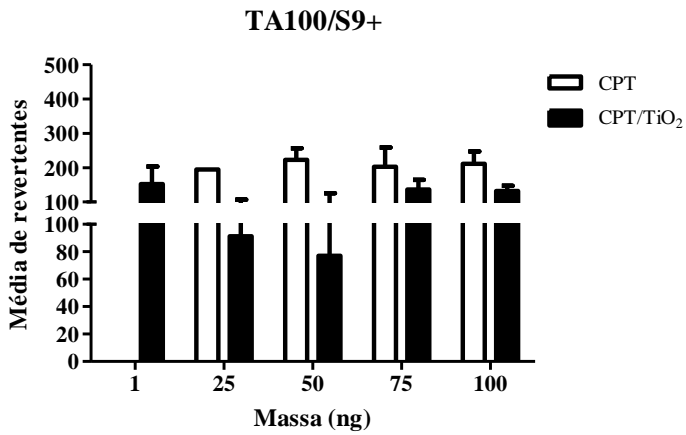
Os dados são apresentados como média de revertentes ± desvio padrão (DP) e RM (razão de mutagenicidade) para cada linhagem, com e sem S9, no controle negativo e nas cinco doses analisadas. Análise estatística com valor da análise de variância (ANOVA), modelo mais aceitável, valor da relação dose-resposta (p) e revertentes/ng. ^{**} p < 0,01 estatisticamente diferente do respectivo controle negativo. ^{*} p < 0,05 estatisticamente diferente do respectivo controle negativo. ns: não significativo.

Figura 5.2 - Média de revertentes e desvio padrão para as linhagens TA98 (a,b) e TA100 (c,d) da bactéria *Salmonella typhimurium* tratadas com cinco doses do captopril (CPT) e captopril fotocatalisado (CPT/ TiO₂/UV-C), na presença (S9+) e ausência (S9-) de metabolização. **Diferente estatisticamente da respectiva amostra não clorada (p < 0,05).

a) b)



c) d)



5.2.2 Diclofenaco

Embora em algumas situações a razão de mutagenicidade (RM) foi superior a 2 e os valores obtidos da ANOVA e relação dose-resposta foram significativos ($p < 0,05$) (TAB.5.4), as amostras de diclofenaco (DCF) não foram mutagênicas para ambas as linhagens da bactéria, antes e após cloração, na presença e ausência de metabolização, pois nenhum dos parâmetros analisados individualmente pode ser indicativo de presença de mutagenicidade. Desta forma, o fármaco original e seus subprodutos que são possivelmente formados na oxidação com cloro não apresentam capacidade de deslocamento de quadro de leitura e substituição dos pares de bases nas condições testadas.

O perfil de revertentes antes e após cloração aponta que com a cepa TA98/S9+ o número aumenta com a cloração, com diferença estatística na dose de 75 ng/placa. Na ausência de metabolização (TA98/S9-) um aumento no número de revertentes também foi observado, no entanto, sem diferença estatística em relação ao fármaco testado individualmente. Para a linhagem TA100 o número de revertentes após a cloração, com e sem metabolização, foi significativamente ($p < 0,05$) menor em todas as doses testadas indicando que o tratamento pode reduzir as possibilidades de mutação do tipo substituição dos pares de bases (FIG.5.3 cd). Não foi realizada análise química para os subprodutos da cloração do DCF.

O único relato de experimento com o teste de Ames para amostras do medicamento (DCF) apresentou resultado negativo para as cepas TA98 e TA100 com doses que variaram de 4,5 a 4520 $\mu\text{g/placa}$, com e sem ativação metabólica (KADOTANI, ARISAWA, & MARUYAMA, 1984). As doses empregadas foram muito maiores que as analisadas no presente trabalho, portanto, os resultados analisados com base nos três parâmetros é possivelmente a melhor opção para diagnóstico dos resultados. As doses no presente trabalho foram adotadas com o intuito de aproximar às encontradas em efluentes de ETE, águas superficiais e água tratada, como demonstrado no QUADRO 3.1. Tanto as doses testadas no presente trabalho quanto aquelas relatadas por KADOTANI, ARISAWA, & MARUYAMA (1984) são inferiores às administradas a pacientes. Neste último caso, as doses variam de 75 a 150 mg por dia, podendo chegar a 200 mg (SWEETMAN, 2009). Como a mutagenicidade com elevadas doses, como as prescritas aos pacientes, não foi ainda reportada, tal efeito nestas condições é difícil de ser previsto.

Dados de mutagenicidade para o diclofenaco apontam que o antiinflamatório foi negativo para o ensaio de mutação reversa com *E.coli* WP2, na presença e ausência de ativação metabólica, com doses de até 4520 µg/placa (KADOTANI, ARISAWA, & MARUYAMA, 1984) e não induziu troca entre cromátides irmãs (TCI) em ensaio *in vitro* com linfócitos humanos (KULLICH & KLEIN, 1986). O “Departamento de Saúde e Serviços Humanos” dos EUA (*U.S.Department of Health and Human Services*) apresenta dados toxicológicos, genotoxicidade e carcinogenicidade, dentre outros, do DCF através do site da *U.S Food and Drug Administration* (FDA). Segundo informações da base de dados, o diclofenaco não demonstrou evidências de carcinogenicidade em ratos e camundongos administrados com doses menores e superiores às de humanos, não foi genotóxico em ensaios *in vitro* para avaliar mutação de ponto em células de linfoma de camundongo, não induziu o aumento da frequência de micronúcleos em células da medula óssea de ratos e aberrações cromossômicas em células do ovário e em células da medula óssea de *hamsters* através de testes *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Com base nestes resultados vale ressaltar novamente que os parâmetros analisados simultaneamente (ANOVA, relação dose-resposta e RM) são mais confiáveis para o resultado final dos experimentos do presente trabalho.

As concentrações para os efeitos tóxicos observados em organismos aquáticos variaram entre os grupos testados (QUADRO 3.1). Crustáceos e algas foram menos sensíveis ao diclofenaco (FERRARI et al., 2003; CLEUVERS, 2002) quando comparados as macrófitas (CLEUVERS, 2002) e bactérias marinhas (FERRARI et al., 2003; LA FARRÉ et al., 2001). Este fato demonstra a importância da escolha do método e do organismo teste para analisar os efeitos de um composto.

Como menos de 1% do DCF é eliminado inalterado e considerando a prescrição de 75 a 200 mg/dia/paciente (SWEETMAN, 2009) as concentrações do fármaco detectadas no esgoto afluente a uma ETE são baixas como demonstrado na revisão deste trabalho em que 0,8 µg/L foi detectado em uma estação no Brasil (QUADRO 3.1). Os dados de detecção do diclofenaco no efluente (60 ng/L a 0,81 µg/L) e em águas superficiais (0,06 µg/L) demonstram concentrações muito inferiores às testadas no presente trabalho. Dessa forma, os efeitos tóxicos aos organismos aquáticos não serão possivelmente observados já que as concentrações para que as alterações ocorram são muito maiores. Da mesma forma, as possibilidades de concentrações elevadas de DCF alcançarem uma ETA e sofrerem reação com cloro são baixas, assim como do fármaco inalterado e dos possíveis subprodutos formados alcançarem a água de consumo e induzirem efeitos como mutagenicidade. No

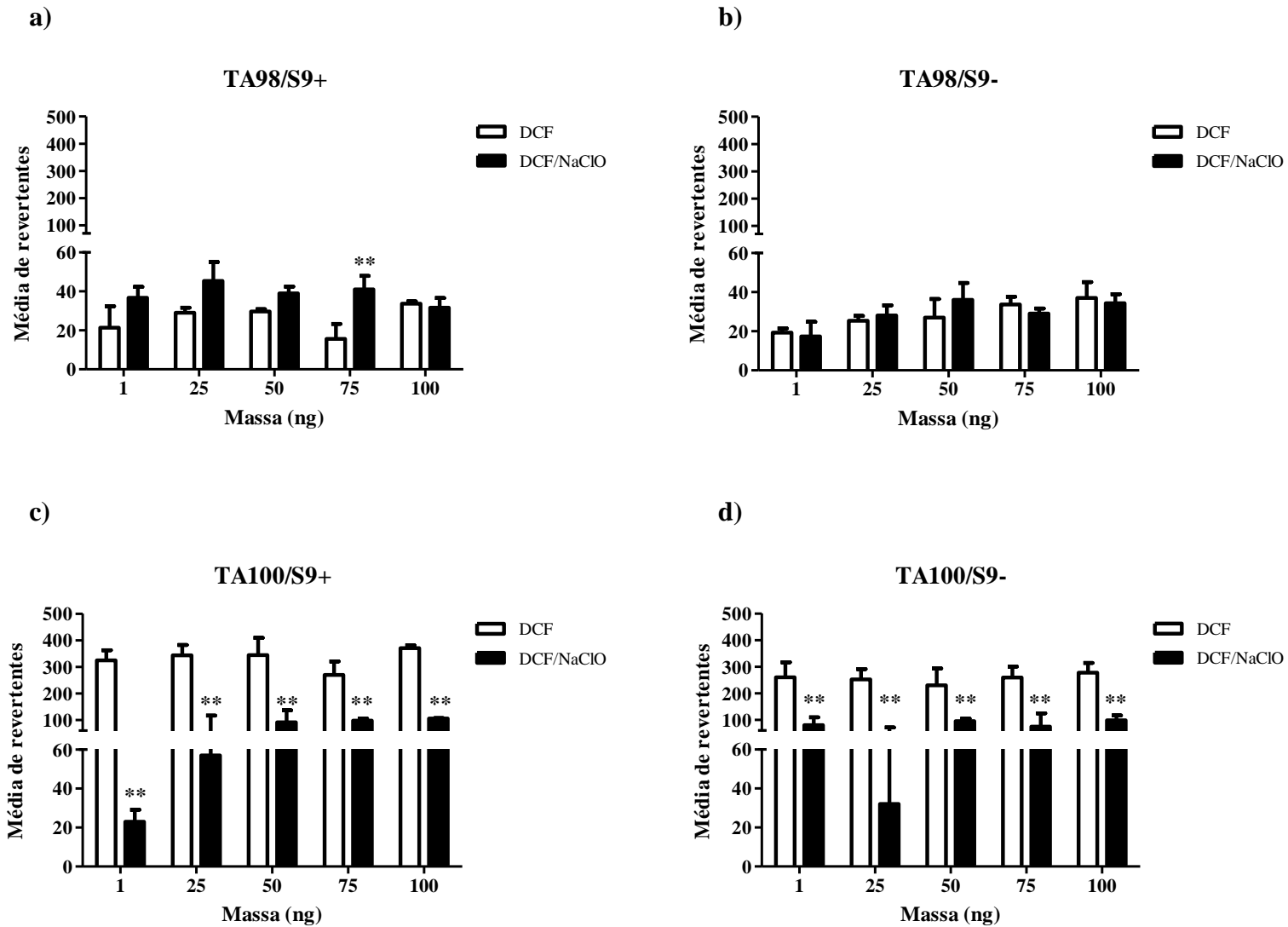
entanto, sabe-se que a reação de oxidação do diclofenaco pelo cloro desencadeia numa via de degradação com substituição de um hidrogênio pelo cloro (QUINTANA et al., 2010). Neste trabalho, os autores detectaram ainda para o antiinflamatório outro subproduto da cloração (Cl_2) proveniente da decarboxilação/hidroxilação do anel diclorado. Os tempos de reação dos experimentos foram variáveis e a formação de subprodutos dependeu da concentração de cloro adicionada que variou de 1 a 10 mg/L. A toxicidade dos subprodutos da oxidação do DCF, a uma concentração de 10 mg/L, pelo dióxido de cloro (ClO_2) foi avaliada através da inibição da bioluminescência da bactéria *Vibrio fischeri*. Observou-se que durante a degradação foram formados compostos mais tóxicos que o diclofenaco, proporcionando uma inibição superior a 50% na bioluminescência por estes subprodutos ou sinergismo entre eles (WANG et al., 2014). Os efeitos dos conjugados, maioria eliminado pelo corpo, no ambiente aquático e após a cloração precisam ser avaliados.

Tabela 5.4 - Número de revertentes por placa induzidos pelos fármacos diclofenaco original (DCF) e diclofenaco clorado (DCF/NaClO) com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência e na presença de ativação metabólica exógena (S9).

Número de revertentes / placa								
Amostra (ng/placa)	TA98 (media ± DP)				TA100 (media ± DP)			
	- S9	RM	+ S9	RM	- S9	RM	+ S9	RM
DICLOFENACO								
0	32,60 ± 3,36	-	44,20 ± 5,89	-	297,80 ± 30,93	-	297,20 ± 83,03	-
1	19,33 ± 2,08	0,59	21,33 ± 11,06	0,48	260,33 ± 56,41	0,87	324,33 ± 38,37	1,09
25	25,33 ± 2,52	0,78	29,00 ± 2,65	0,66	252,00 ± 39,15	0,85	343,33 ± 38,55	1,16
50	27,00 ± 9,54	0,83	29,67 ± 1,15	0,67	230,00 ± 63,22	0,77	344,00 ± 65,05	1,16
75	33,67 ± 4,04	1,03	15,67 ± 7,64	0,35	259,00 ± 41,22	0,87	269,33 ± 50,80	0,91
100	37,00 ± 8,19	1,13	33,67 ± 1,15	0,76	277,67 ± 36,12	0,93	370,00 ± 10,54	1,24
1000	132,00 ± 18,52**	4,05	101,33 ± 3,21**	2,29	294,00 ± 41,51	0,99	336,33 ± 54,60	1,13
Análise Estatística	ANOVA: 4,7% (*)		ANOVA: 2,1% (*)		ANOVA: 44,1% (ns) Linear / Bernstein: 42,2% Relação dose-resposta: p=17,5% (ns) Revertentes/ng: 0,029		ANOVA: 41,8% (ns) Linear / Bernstein: 34,2% Relação dose-resposta: p=29,2% (ns) Revertentes/ng: 0,022	
DICLOFENACO CLORADO								
0	19,50 ± 9,75	-	33,80 ± 6,14	-	95,20 ± 27,92	-	142,00 ± 24,85	-
1	17,33 ± 7,51	0,89	36,67 ± 5,69	1,08	80,00 ± 29,70	0,84	23,00 ± 6,08	0,16
25	28,00 ± 5,20	1,44	45,33 ± 9,71	1,34	32,00 ± 39,60	0,34	57,00 ± 59,40	0,40
50	36,00 ± 8,66	1,85	39,00 ± 3,46	1,15	95,67 ± 9,02	1,00	91,33 ± 45,01	0,64
75	29,00 ± 2,65	1,49	41,00 ± 6,93	1,21	75,00 ± 49,49	0,79	97,67 ± 7,77	0,69
100	34,33 ± 4,62	1,76	31,67 ± 4,93	0,94	98,33 ± 18,50	1,03	105,33 ± 2,08	0,74
Análise Estatística	ANOVA: 5% (ns) Linear / Bernstein: 41,8% Relação dose-resposta: p=0,3% (*) Revertentes/ng: 0,167		ANOVA: 15,6% (ns) Lintox1: 49,9% Relação dose-resposta: p=1,2% (*) Revertentes/ng: 0,902		ANOVA: 6,9% (ns) Bernstein: 6,5% Relação dose-resposta: p=51,7% (ns) Revertentes/ng: -		ANOVA: 0,2% (*) - - -	

Os dados são apresentados como média de revertentes ± desvio padrão (DP) e RM (razão de mutagenicidade) para cada linhagem, com e sem S9, no controle negativo e nas cinco doses analisadas. Análise estatística com valor da análise de variância (ANOVA), modelo mais aceitável, valor da relação dose-resposta (p) e revertentes/ng. ** p < 0,01 estatisticamente diferente do respectivo controle negativo. * p < 0,05 estatisticamente diferente do respectivo controle negativo. ns: não significativo.

Figura 5.3 - Média de revertentes e desvio padrão para as linhagens TA98 (a,b) e TA100 (c,d) da bactéria *Salmonella typhimurium* tratadas com cinco doses do diclofenaco (DCF) e diclofenaco clorado (DCF/NaClO), na presença (S9+) e ausência (S9-) de metabolização. **Diferente estatisticamente da respectiva amostra não clorada ($p < 0,05$).



5.2.3 Sulfametoxazol

O antibiótico sulfametoxazol (SMX) é um antibacteriano pertencente ao grupo das sulfonamidas que inibe a síntese de ácido fólico, um composto essencial para a sobrevivência bacteriana (ISIDORI et al., 2005). Como explicitado no item 3.2 bactérias do gênero *Salmonella* são na maioria das vezes sensíveis ao SMX, que tem ação bactericida exclusivamente quando associado à trimetropina, portanto, já que este segundo antibiótico não foi utilizado nos ensaios este efeito não foi considerado. E ainda, as doses de SMX testadas foram inferiores às aquelas comumente prescritas aos pacientes e, portanto, o potencial bacteriostático, característico do fármaco agindo individualmente, sobre as cepas de *S.typhimurium* pode ser descartado neste trabalho.

A Tabela 5.5 mostra a média de revertentes das triplicatas, desvio padrão (DP), razão de mutagenicidade (RM) e análise estatística para o SMX e SMX/NaClO com as linhagens TA98 e TA100 da bactéria *Salmonella typhimurium*, na ausência (S9-) e presença (S9+) de ativação metabólica.

O antibiótico SMX não foi mutagênico nas condições testadas, antes e após cloração, para as cepas TA98 e TA100 com (S9+) e sem (S9-) ativação metabólica. Para a linhagem TA98/S9+ foi observado RM foi maior que 2 em uma das doses testadas e a relação dose-resposta foi significativa, no entanto, apenas os dois parâmetros não podem indicar mutagenicidade da amostra. O SMX apresenta alta reatividade com o cloro (WESTERHOFF et al., 2005) e quando é oxidado por ele produz subprodutos clorados e não clorados (DODD & HUANG, 2004). Os resultados do ensaio apontam que os possíveis subprodutos formados pela oxidação do desinfetante com o antibiótico não foram mutagênicos para as linhagens da bactéria nas condições testadas. Para o presente trabalho não foram realizadas análises químicas dos subprodutos da cloração deste antibiótico.

O perfil de revertentes antes e após a cloração para a cepa TA98 na presença (S9+) (FIG.5.4a) e na ausência (S9-) (FIG.5.4b) de ativação metabólica indica um aumento ligeiro após o tratamento, mas sem diferença estatística com a amostra do SMX antes da cloração.

Embora com resultado negativo, a potência mutagênica para a cepa TA100 nas amostras cloradas, mais do que dobrou com a presença da ativação metabólica (de 0,647 rev./ng para 1,314 rev./ng) (TAB.5.5). Isto pode indicar que se mutagênicos estiverem presentes, talvez ao testar concentrações maiores do fármaco, eles serão ativados pela mistura S9 e causarão substituição de pares de bases.

Pode-se notar pelos gráficos (FIG. 5.4c,d) uma redução na média de revertentes na maioria das doses para a cepa TA100 (S9+ e S9-) após a cloração, contudo, só foi observada diferença estatística em relação à amostra não clorada na dose 75 ng/placa (TA100/S9-).

Os dados de mutagenicidade para o SMX pelo ensaio *Salmonella*/microsoma do presente trabalho inicialmente contrastam com o artigo encontrado na literatura de Isidori et al. (2005). Os resultados desta pesquisa apontaram substituição dos pares de bases e deslocamento do quadro de leitura pelo antibiótico com as bactérias TA100 e TA98, respectivamente, com concentrações variando de 6,25 a 100 mg/L. As concentrações em que estes efeitos foram observados chegam a ser até dez vezes superiores que a maior dose testada desse trabalho, o que pode ter levado a uma diferença nos resultados. As doses adotadas no presente trabalho visam aproximar ao máximo as concentrações reais de SMX no meio. Doses superiores àquelas detectadas em diversas matrizes ambientais, e, sobretudo na água tratada, cujo máximo observado foi 2 ng/L (KLEYWEGT et al., 2011) (TAB.3.1) foram aqui adotadas para que fosse possível ocorrer à reação com o cloro e formação de subprodutos, cujo potencial mutagênico objetiva-se testar.

Estudos iniciais de genotoxicidade demonstraram que tanto o SMX, quanto este fármaco associado à trimetopina, não causaram danos excessivos em cromossomos de linfócitos humanos, em experimentos *in vitro* e *in vivo* (STEVENSON et al., 1973). Posteriormente, uma avaliação da genotoxicidade do SMX em linfócitos pelos ensaios de troca entre cromátides irmãs (TCI) e de micronúcleos (MN) apontou que o fármaco é capaz de induzir um ligeiro aumento da frequência destes danos, sobretudo nas maiores concentrações testadas (100 e 500 µg/mL) (ABOU-EISHA, 2006). Os autores ressaltam que os dados de genotoxicidade do SMX são ainda inconclusivos já que efeitos positivos e negativos têm sido reportados. O antibiótico SMX não induziu genotoxicidade para bactérias *Escherichia coli* (PQ37) pelo teste SOS Cromoteste (ISIDORI et al., 2005).

A toxicidade do SMX foi testada em diversos ensaios de toxicidade aguda e crônica com diferentes classes de organismos, como pôde ser observado na revisão deste trabalho (QUADRO 3.1). Os resultados ecotoxicológicos apontam que nos testes agudos as concentrações com efeitos tóxicos observáveis são maiores que nos crônicos, mesmo levantamento feito por Isidori et al. (2005) nos testes empregados. Para os grupos de invertebrados analisados nos testes agudos, as concentrações não foram muito discrepantes, variando de 25,2 mg/L a 35,36 mg/L (ISIDORI et al., 2005) entre as espécies de crustáceos. Estas concentrações também não diferem muito daquela com efeito tóxico para a bactéria

marinha *V.fischeri* (23,3 mg/L). No entanto, teste agudo com o peixe *Danio rerio* demonstrou que concentrações superiores a 1000 mg/L são necessárias para que os efeitos sejam evidentes (ISIDORI et al., 2005). Estas observações confirmam que a escolha do organismo teste, para representar os efeitos tóxicos de um composto, é decisiva no diagnóstico do resultado.

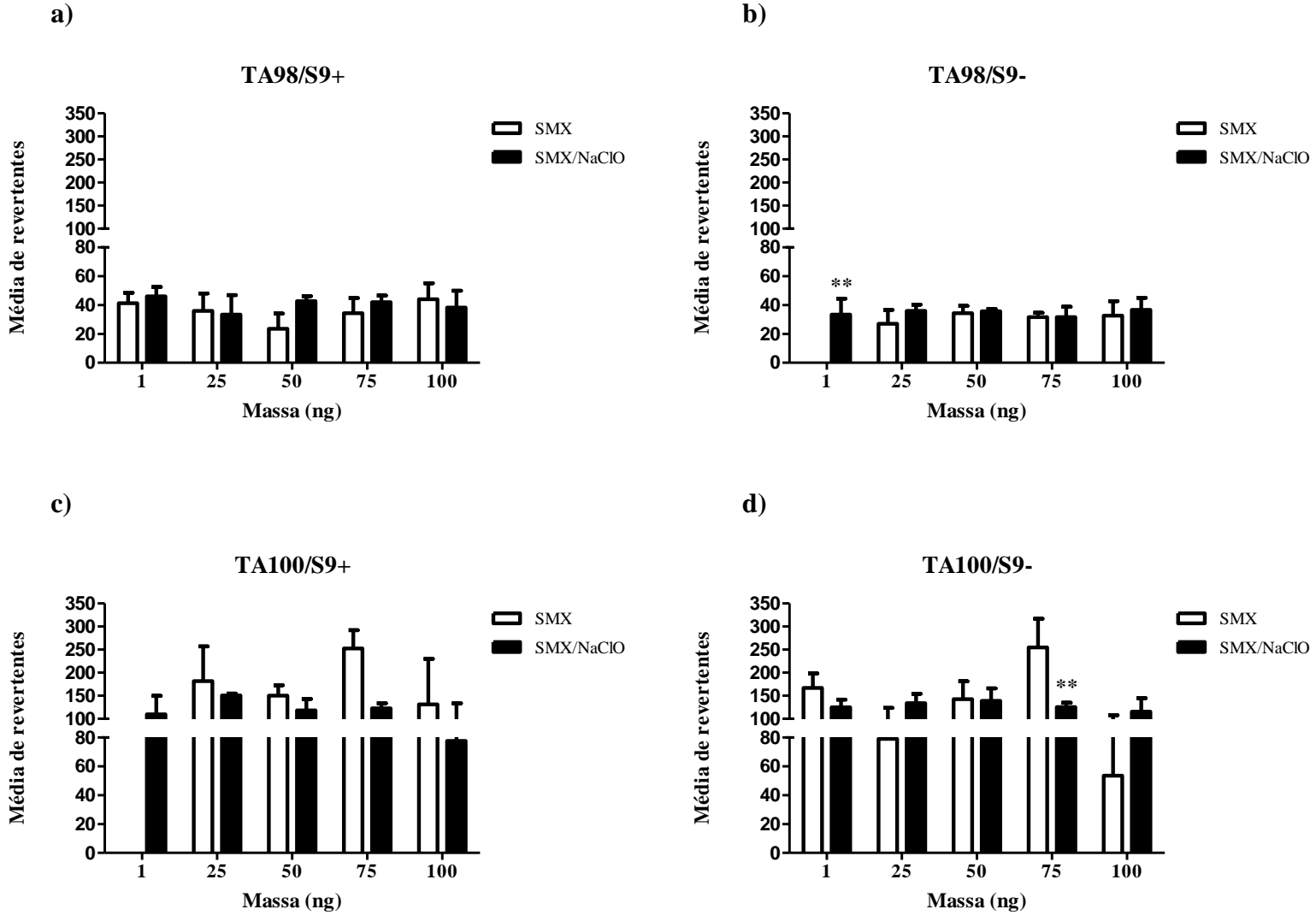
Os dados de detecção do sulfametoxazol em efluentes de ETE e águas superficiais apontam baixas concentrações do fármaco nestas matrizes, variando de 0,065 µg/L a 0,40 µg/L e 0,012 µg/L a 0,15 µg/L, respectivamente, característica de um microcontaminante (TAB.3.1). Com isso, os riscos ambientais são menos preocupantes, sobretudo considerando os organismos aquáticos já testados e aqui apontados. Contudo, um problema decorrente da presença de SMX no ambiente é a possibilidade de estimular a disseminação de resistência entre a população nativa de bactérias por ser um antibiótico (DODD et al., 2004). Da mesma forma, as concentrações já observadas em água tratada (0,39 a 0,80 ng/L) são muito inferiores às testadas no ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma do presente trabalho e dos demais estudos reportados na literatura, o que diminui a preocupação ao risco de mutagenicidade. Como parte do SMX é metabolizado e eliminado pelo corpo como metabólitos (cerca de 60%), a toxicidade destes compostos e dos seus subprodutos formados após a cloração devem também ser investigados.

Tabela 5.5 - Número de revertentes por placa induzidos pelos fármacos sulfametoxazol original (SMX) e sulfametoxazol clorado (SMX/NaClO) com as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*, na ausência e na presença de ativação metabólica exógena (S9).

Número de revertentes / placa								
Amostra (ng/placa)	TA98 (média ± DP)				TA100 (média ± DP)			
	- S9	RM	+ S9	RM	- S9	RM	+ S9	RM
SULFAMETOXAZOL								
0	36,20 ± 7,43	-	22,40 ± 16,70	-	297,80 ± 30,93	-	297,20 ± 83,03	-
1	-	-	41,33 ± 7,23	1,85	166,67 ± 31,90	0,56	-	-
25	27,00 ± 9,64	0,75	36,00 ± 12,00	1,61	79,00 ± 44,84	0,27	181,67 ± 75,18	0,61
50	34,33 ± 5,13	0,95	23,50 ± 10,61	1,05	142,67 ± 38,42	0,48	150,00 ± 22,87	0,50
75	31,67 ± 3,06	0,87	34,33 ± 10,50	1,53	254,67 ± 62,36	0,86	252,33 ± 39,80	0,85
100	32,67 ± 10,07	0,90	44,00 ± 11,14	1,96	53,50 ± 54,45	0,18	131,33 ± 98,43	0,44
1000	22,33 ± 11,24 ^a	1,39	31,00 ± 10,54 ^b	1,12	178,67 ± 154,60	0,60	168,67 ± 129,07	0,57
Análise Estatística	ANOVA: 54,4% (ns) Linear / Bernstein: 40,5% P dose-resposta: 60,1% (ns) Revertentes/ng: -		ANOVA: 31,7% (ns) Linear / Bernstein: 36,2% P dose-resposta: 10% (ns) Revertentes/ng: 0,124		ANOVA: 95,9% (ns) - - -		ANOVA: 20,4% (ns) Linear / Bernstein: 14,3% P dose-resposta: 68% (ns) Revertentes/ng: -	
SULFAMETOXAZOL CLORADO								
0	36,20 ± 7,43	-	22,40 ± 16,70	-	119,80 ± 24,96	-	109,00 ± 26,19	-
1	33,33 ± 11,15	0,92	46,00 ± 6,56	2,05	125,00 ± 16,46	1,04	109,67 ± 40,20	1,01
25	36,00 ± 4,36	0,99	33,33 ± 13,58	1,49	134,00 ± 20,07	1,12	150,67 ± 4,04	1,38
50	35,67 ± 1,53	0,99	42,67 ± 3,51	1,90	139,00 ± 26,89	1,16	118,33 ± 24,79	1,09
75	31,67 ± 7,23	0,87	42,00 ± 4,58	1,88	125,33 ± 9,50	1,05	122,67 ± 11,06	1,13
100	36,67 ± 8,33	1,01	38,33 ± 11,55	1,71	115,67 ± 29,02	0,97	77,67 ± 55,90	0,71
Análise Estatística	ANOVA: 93,7% (ns) Linear / Bernstein: 87,5% P dose-resposta: 55,5% (ns) Revertentes/ng: -		ANOVA: 17,6% (ns) Linear / Bernstein: 29,7% P dose-resposta: 3,9% (*) Revertentes/ng: 0,161		ANOVA: 80,7% (ns) Lintox2: 97,4% P dose-resposta: 10,3% (ns) Revertentes/μg: 0,647		ANOVA: 28,5% (ns) Lintox2: 76,3% P dose-resposta: 7,1% (ns) Revertentes/μg: 1,314	

Os dados são apresentados como média de revertentes ± desvio padrão (DP) e RM (razão de mutagenicidade) para cada linhagem, com e sem S9, no controle negativo e nas cinco doses analisadas. Análise estatística com valor da análise de variância (ANOVA), modelo mais aceitável, valor da relação dose-resposta (p) e revertentes/ng. ** p < 0,01 estatisticamente diferente do respectivo controle negativo. * p < 0,05 estatisticamente diferente do respectivo controle negativo. ns: não significativo. ^{ab}: experimento realizado em separado com controles negativos 16,00 ± 9,33 (ANOVA: 45,4 % - ns) e 27,60 ± 2,97 (ANOVA: 49,6% - ns), respectivamente.

Figura 5.4 - Média de revertentes e desvio padrão para as linhagens TA98 (a,b) e TA100 (c,d) da bactéria *Salmonella typhimurium* tratadas com cinco doses do sulfametoxazol (SMX) e sulfametoxazol clorado (SMX/NaClO), na presença (S9+) e ausência (S9-) de metabolização. **Diferente estatisticamente da respectiva amostra não clorada ($p < 0,05$).



5.3 Efeito da cloração e fotocatalise dos fármacos na citotoxicidade

A citotoxicidade das amostras sobre células HepG2 foi analisada pelo ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo) que mede a atividade de enzimas mitocondriais em células vivas. O ensaio colorimétrico quantifica a atividade daquelas enzimas através da redução do MTT (sal amarelo) a formazan (sal arroxeadado). A quantidade de formazan formada é proporcional a viabilidade da célula medida por uma análise espectrofotométrica.

Para neutralização do cloro residual dos processos de desinfecção, utilizou-se o agente redutor tiosulfato de sódio (Na_2SO_3). Como nas amostras cloradas além do fármaco este composto estava presente, testou-se a sua citotoxicidade nas concentrações em que era adicionado a cada uma das cinco diluições (Tópico 4.1.1). O tiosulfato não reduziu significativamente a viabilidade celular e, portanto, não induziu danos às células (dados não mostrados). Desta forma, o agente redutor foi acrescentado em todas as amostras para remoção do cloro residual, antes de submetidas às análises.

Nas amostras do captopril (CPT) e do captopril clorado (CPT/ NaClO) não foi observada toxicidade celular (redução de 30% na viabilidade) em nenhuma das doses testadas, assim como diferença estatística ($p < 0,05$) antes e após cloração (TAB. 5.6). Estudo conduzido com células da medula óssea de camundongos (eritrócitos) demonstrou que o captopril não induziu citotoxicidade nas células, analisada pela razão entre eritrócitos policromáticos (células jovens) e normocromáticos (células maduras) (AL-HARBI, 1993). A análise da citotoxicidade de inibidores de angiotensina sobre hepatócitos de ratos demonstrou que o captopril (1 a 50 mM) apesar de ter sido o menos tóxico para as células, induziu este efeito assim como quinapril, fosinopril e enalapril (JURIMA-ROMET & HUANG, 1993). Segundo os autores o mecanismo de dano desta classe de fármaco sobre o fígado é desconhecido (JURIMA-ROMET & HUANG, 1994). Contraditoriamente, o captopril foi efetivo na melhoria da toxicidade induzida pelo herbicida paraquat em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (GHAZI-KHANSARI & MOHAMMADI-BARDBORI, 2007) e na citotoxicidade deste herbicida em hepatócitos, neste último caso protegendo contra o estresse oxidativo induzido pelo contaminante (POURAHMAD et al., 2011; ELMI et al., 2007). Trabalhos com estudos conduzidos para avaliar a citotoxicidade do CPT em células HepG2 e/ou através do ensaio de MTT não foram encontrados na literatura. Para explorar mais os resultados obtidos neste trabalho, uma avaliação da viabilidade celular antes e após cloração

foi concomitantemente realizada sem analisar somente a redução de 30%. Desta forma, os dados do CPT indicam que após o tratamento a viabilidade foi aumentada, embora sem diferença estatística, principalmente em três doses, e pode ser um indicativo que os subprodutos da degradação deste fármaco são menos citotóxicos que o fármaco em si (TAB.5.6; FIG.5.5a). Tanto para as amostras do fármaco quanto as amostras do mesmo clorado não foi observada diferença estatística entre as doses.

As amostras de captopril fotocalisado pelo $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ não induziram efeitos citotóxicos nas células HepG2, considerando a redução de 30% na viabilidade (TAB. 5.6). Como descrito anteriormente o CPT não foi citotóxico para a maioria das células já testadas e os resultados obtidos no presente trabalho apontam que além do antihipertensivo, seus subprodutos da oxidação por radicais hidroxila não reduzem consideravelmente a viabilidade das células HepG2 (TAB.5.6). Pela análise dos dados pode-se perceber que a viabilidade das células aumenta após o tratamento em três doses, da mesma forma que este fármaco clorado, e com diferença estatística na dose 80 ng/placa (FIG.5.5b). O observado indica que os onze subprodutos formados prejudicam menos o metabolismo celular, e apresentou a mesma vantagem que a amostra clorada deste fármaco. Não foi observada diferença estatística na viabilidade celular entre as doses do CPT/ $\text{TiO}_2/\text{UV-C}$.

Apesar do CPT não ter sido citotóxico para as células HepG2 pode-se observar que tanto a cloração quanto a fotocatalise levaram à formação de compostos menos tóxicos, representados pelo aumento da viabilidade após estes tratamentos.

As amostras de diclofenaco, antes e após cloração, não induziram toxicidade às células HepG2, uma vez que não foi observada redução superior a 30% na viabilidade em nenhuma das doses testadas (TAB. 5.6). Da mesma forma que para o CPT, um aumento na viabilidade foi analisada nas amostras de DCF após a cloração indicando que a oxidação deste fármaco pelo cloro leva a um menor dano nas células HepG2, embora sem diferença estatística (FIG. 5.5c). Não foi observada diferença estatística entre as doses, no entanto, uma redução da viabilidade de 136% (0,8 ng/poço) para 78% (80 ng/poço) após a cloração (DCF/ NaClO) indica uma tendência de aumento do dano, embora não citotóxico, com o aumento da dose (TAB.5.6).

A citotoxicidade de doze antiinflamatórios não esteroidais em culturas primárias de hepatócitos de ratos foi comparada e determinada medindo a liberação da lactato desidrogenase (LDH) (JURIMA-ROMET, CRAWFORD, & HUANG, 1994). O diclofenaco (0,2 a 0,8 Mm) foi um dos quatro mais citotóxicos para as células, seguido pela idometacina,

ácido mefenâmico e diflunisal. O efeito citotóxico do diclofenaco através dos ensaios colorimétricos do MTT e LDH sobre hepatócitos de ratos foi testado e comparado ao efeito em células não hepáticas (MDCK – células renais) e células HepG2 para avaliar se a citotoxicidade é específica a hepatócitos (PONSODA et al., 1995). Observou-se que os hepatócitos foram mais sensíveis ao DCF que as células MDCK e HepG2, isto porque as últimas não apresentam o citocromo P450C envolvido no metabolismo do DCF cujo metabólito (CYP450) foi mais citotóxico que o fármaco em si. Ainda neste artigo e estudos adicionais demonstraram que os efeitos tóxicos do DCF estão relacionados a uma depleção na concentração de ATP pelas mitocôndrias (alvo da toxicidade do fármaco) nos hepatócitos, seguido por morte celular, uma dilatação da organela devido à indução da permeabilidade da membrana (MASUBUCHI, YAMADA, & HORIE, 2000; O'CONNOR, DARGAN, & JONES, 2003) e um consumo extra de NADPH (BORT et al., 1999).

Para outros antiinflamatórios um estudo da citotoxicidade com dois diferentes ensaios, entre eles o do MTT, demonstrou que este foi o mais sensível para detecção do dano sugerindo que a perturbação da função mitocondrial pode ser o evento inicial no dano induzido por esta classe de fármacos (ALLEN et al., 1991).

Uma combinação de parâmetros funcionais (consumo/secreção de glicose e liberação de LDH e γ -glutamil transferase) foi empregada para avaliar a citotoxicidade do DCF (100-1000 μ M), propranolol e paracetamol em hepatócitos de ratos e células HepG2. Observou-se que os fármacos induziram citotoxicidade através dos parâmetros empregados (XU, MA, & PURCELL, 2003). A citotoxicidade do DCF foi demonstrada ainda em pré-adipócitos 3T3-L1 de camundongos a uma concentração de 200 μ g/mL pela técnica do MTT (SATHISHKUMAR et al., 2014).

A não observação de danos pelo DCF no presente estudo pode estar mais relacionada a não formação de metabólitos tóxicos a células HepG2 do que as concentrações testadas. E ainda, a oxidação do fármaco pelo cloro foi menos citotóxica que antes do tratamento. Os dados levantados da literatura ilustram que uma única avaliação da citotoxicidade, através de um único método, pode não ser fundamental para avaliar este dano pelo composto no organismo.

O antibiótico sulfametoxazol não foi citotóxico para as células, uma vez que não reduziu a viabilidade celular para valores menores de 70% (TAB.5.6).

Após a cloração do SMX pode-se observar um efeito citotóxico dos compostos gerados durante este tratamento na dose de 40 ng/poço, com viabilidade inferior a 70% e

diferença estatística em relação à amostra não clorada. As razões pelas quais esta dose induziu um efeito ao invés de doses superiores são desconhecidas. O ideal neste caso seria a repetição do ensaio, contudo, isto não foi possível durante a execução deste projeto. Na dose de 20 ng/poço foi também observada uma redução significativa na viabilidade celular após a cloração (TAB.5.6). Diferentemente da cloração do CPT e DCF, a viabilidade em células HepG2 pelo SMX clorado só foi consideravelmente maior em uma única dose, indicando que a oxidação pelo cloro deste fármaco pode ser mais citotóxico que para os demais (FIG.5.5d). Só foi observada diferença estatística entre as doses 40 ng/poço e 80 ng/poço, provavelmente devido ao efeito citotóxico na menor dose.

Efeitos citotóxicos / citostáticos do sulfametoxazol na dose de 500 µg/mL foram reportados por Abou-Eisha, Marcos & Creus (2004) em linfócitos humanos através da diminuição do índice proliferativo (mede a taxa proliferativa) e índice de proliferação de bloqueio da citocinese (mede a cinética de proliferação celular). O metabólito hidroxalamina do sulfametoxazol (SMX-HA) foi identificado como agente citotóxico a células mononucleares sanguíneas periféricas, em contraste ao fármaco testado individualmente (HESS et al., 1999). Em duas diferentes linhagens de hepatócitos de peixes os antibióticos SMX e amoxicilina não induziram citotoxicidade analisada pela técnica do MTT, o mesmo resultado não foi observado para outros fármacos como fenofibrato e clofibrato (combate o colesterol), propranolol (antihipertensivo), carbamazepina (combate epilepsia), dentre outros (LAVILLE et al., 2004). Os resultados deste experimento junto com os dados levantados da literatura provam que a escolha do modelo celular é o que melhor representa o dano a que o homem está mais suscetível quando exposto ao fármaco no ambiente. A avaliação da citotoxicidade dos subprodutos da oxidação do SMX pelo cloro é importante para identificar possíveis efeitos no consumo da água contendo quantidades traço do fármaco. Após a ozonização os produtos da degradação do SMX não afetaram negativamente a proliferação de células HepG2 avaliada pelo ensaio do MTT (YARGEAU et al., 2008).

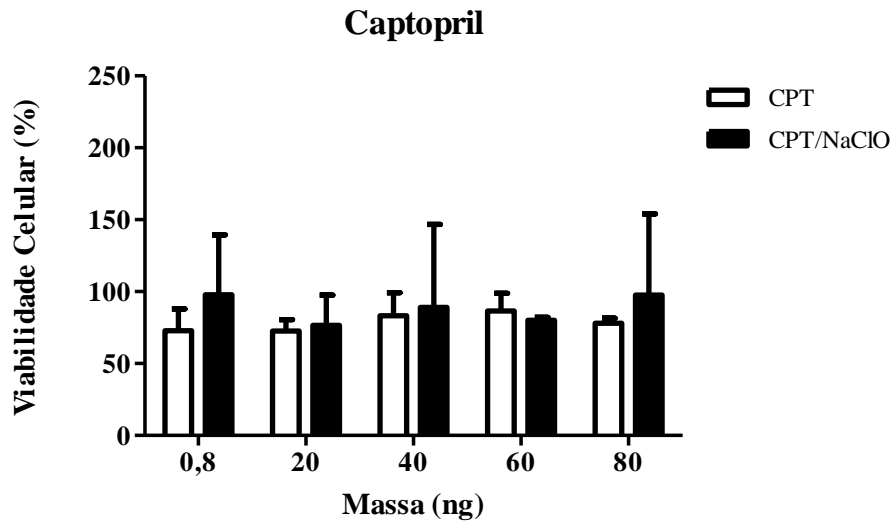
Tabela 5.6 - Efeito dos fármacos originais (CPT, DCF e SMX), dos fármacos clorados (CPT/NaClO, DCF/NaClO e SMX/NaClO) e do captopril fotocatalisado (CPT/ TiO₂/UV-C) na citotoxicidade de células HepG2 testados em cinco doses em quintuplicata. Valores apresentados como média da absorbância ± desvio padrão (DP) e porcentagem de viabilidade celular.

Viabilidade Celular (HepG2)										
	0,8 ng / poço (média ± DP)	%	20 ng / poço (média ± DP)	%	40 ng / poço (média ± DP)	%	60 ng / poço (média ± DP)	%	80 ng / poço (média ± DP)	%
CPT	0,09 ± 0,02	71	0,09 ± 0,01	71	0,10 ± 0,02	81	0,10 ± 0,01	85	0,09 ± 0,00	76
CPT/NaClO	0,08 ± 0,03	99	0,06 ± 0,02	77	0,09 ± 0,03	112	0,06 ± 0,00	81	0,08 ± 0,04	98
CPT/ TiO ₂ /UV-C	0,12 ± 0,03	99	0,11 ± 0,03	91	0,11 ± 0,01	90	0,12 ± 0,03	95	0,11 ± 0,01	91**
DCF	0,07 ± 0,00	83	0,07 ± 0,01	91	0,07 ± 0,02	92	0,06 ± 0,00	76	0,06 ± 0,01	78
DCF/NaClO	0,11 ± 0,04	136	0,07 ± 0,01	86	0,07 ± 0,01	84	0,07 ± 0,01	91	0,06 ± 0,01	78
SMX	0,19 ± 0,04	177	0,14 ± 0,02	125	0,16 ± 0,02	147	0,14 ± 0,03	128	0,11 ± 0,01	102
SMX/NaClO	0,15 ± 0,05	135	0,10 ± 0,01	92**	0,07 ± 0,01	68**^a	0,14 ± 0,05	131	0,18 ± 0,06	168 ^b

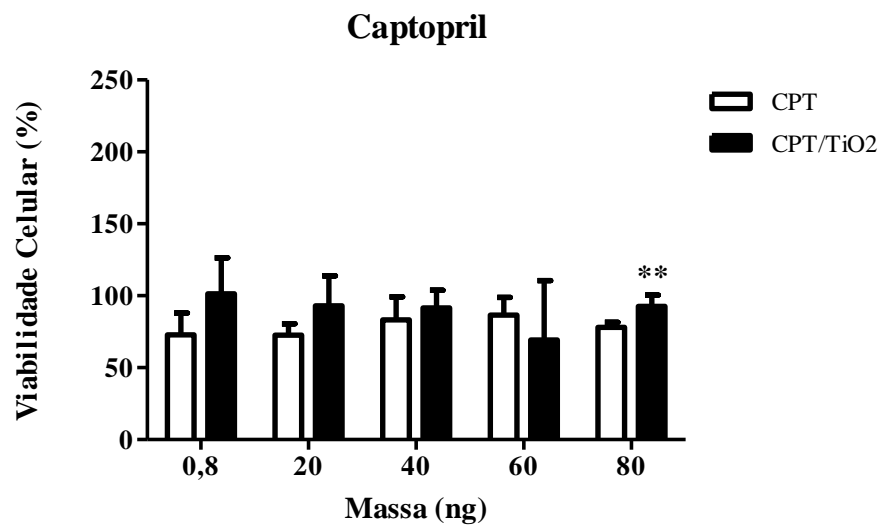
Viabilidade de células HepG2 tratadas com 40% do volume de amostra de fármaco e comparada às células dos poços com amostras de fármacos após tratamento. CPT: captopril, CPT/NaClO: captopril clorado, CPT/ TiO₂/UV-C: captopril fotocatalisado, DCF: diclofenaco, DCF/NaClO: diclofenaco clorado, SMX: sulfametoxazol, SMX/NaClO: sulfametoxazol clorado. ** Diferente estatisticamente da respectiva amostra não tratada. ^{ab}: Diferentes estatisticamente com p < 0,05.

Figura 5.5 - Viabilidade celular (%) de células HepG2 por massa de fármaco adicionado antes e após a cloração e fotocatalise. **Diferente estatisticamente da respectiva amostra não tratada ($p < 0,05$).

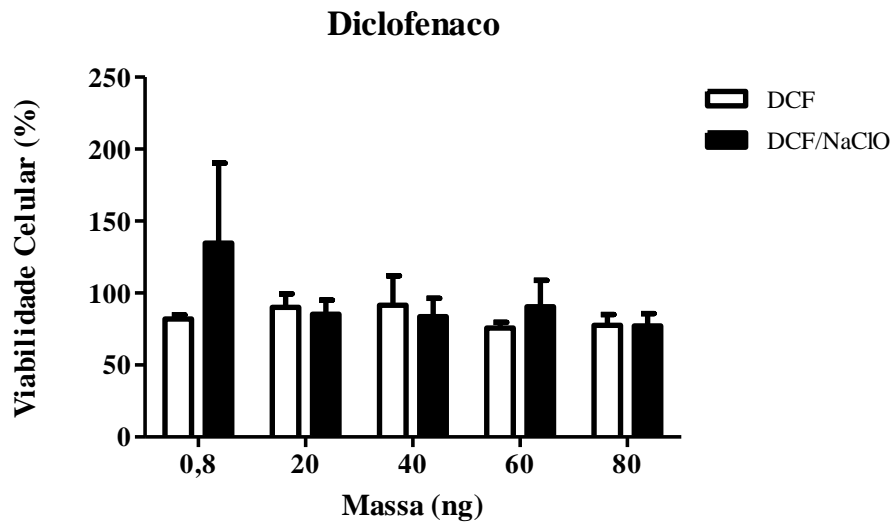
a)



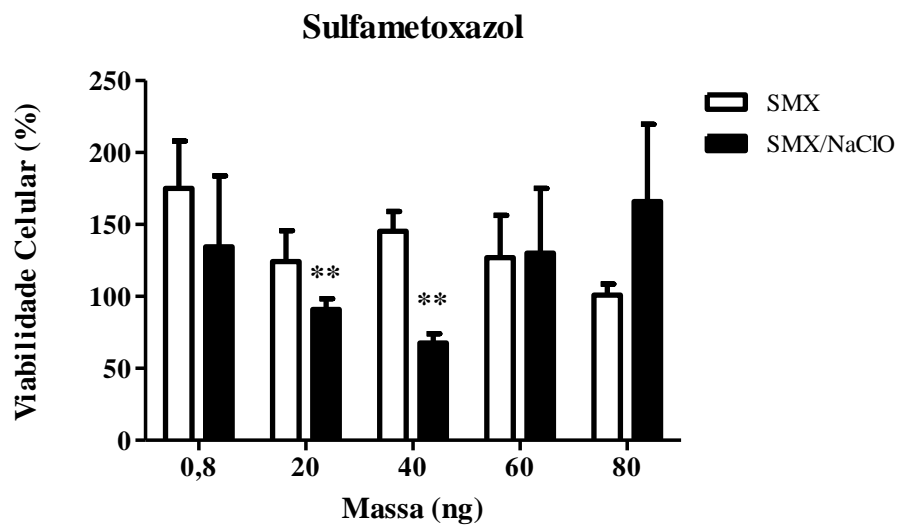
b)



c)



d)



CPT: captopril, CPT/NaClO: captopril clorado, CPT/ TiO₂/UV-C: captopril fotocatalisado, DCF: diclofenaco, DCF/NaClO: diclofenaco clorado, SMX: sulfametoxazol e SMX/NaClO: sulfametoxazol clorado.

5.4 Considerações dos ensaios *Salmonella*/microsoma e do MTT para os fármacos estudados antes e após cloração e fotocatalise

O ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma ou teste de Ames é um teste de mutação reversa para a detecção de uma ampla gama de substâncias químicas, que podem produzir danos que levam a mutações nos genes (MORTELMANS & ZEIGER, 2000). Desde a década de 1970, quando foi proposto por Bruce Ames, tem sido utilizado para análise de diferentes amostras ambientais e compostos específicos.

Para análise dos resultados obtidos no teste foi elaborado o programa de estatística Salanal. Dentre os modelos disponíveis para enquadramento dos dados o modelo de Bernstein é o mais adotado para a análise dos resultados e freqüentemente encontrado na literatura. No entanto, nem sempre este modelo se ajustou aos dados do presente trabalho, e em alguns casos nenhum modelo se ajustou, nestes casos foi apresentada somente a análise de variância (ANOVA). Quando o programa gera a estatística dos dados fornece também a potência mutagênica do composto teste, que é expressa pelo número de revertentes por unidade de amostra. Os valores da potência mutagênica permitem comparar as diferentes situações analisadas e é uma das maneiras de informar o quão mutagênico é um composto. No presente trabalho, a potência mutagênica não pôde ser gerada para todas as amostras, dificultando a análise do potencial de cada fármaco antes e após a cloração e fotocatalise. Os valores de potência mutagênica obtidos pelo programa podem ser analisados na TAB.5.7.

Tabela 5.7 - Potência mutagênica expressa em revertentes por nanograma (rev./ng) para os fármacos e fármacos após tratamento com cepas TA98 e TA100 da bactéria *Salmonella typhimurium*, na ausência (-S9) e na presença (+S9) de ativação metabólica.

Potência Mutagênica em bactérias <i>Salmonella typhimurium</i>				
Amostras	TA98		TA100	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CPT	0,016	-	0,189	0,036
CPT/NaClO	0,709	-	0,074	0,704
CPT/ TiO ₂ /UV-C	-	0,196	-	0,061
DCF	-	-	0,029	0,022
DCF/NaClO	0,167	0,902	-	-
SMX	-	0,124	-	-
SMX/NaClO	-	0,161	0,647	1,314

CPT: captopril, CPT/NaClO: captopril clorado, CPT/ TiO₂/UV-C: captopril fotocatalisado,

DCF: diclofenaco, DCF/NaClO: diclofenaco clorado, SMX: sulfametoxazol e SMX/NaClO: sulfametoxazol clorado.

(-) valores não obtidos pelo programa Salanal

Com os valores demonstrados na TAB.5.7 pode-se concluir que a potência mutagênica do captopril após a cloração (CPT/NaClO) para a cepa TA98/S9- aumentou mais de 40 vezes em relação ao fármaco original, indicando que se compostos que causam deslocamento do quadro de leitura forem formados durante o tratamento na presença do antihipertensivo eles não necessitam ser ativados pelo sistema de metabolização exógena. No caso da cepa TA100/S9+ a cloração aumentou quase 20 vezes a potência mutagênica, o que indicaria a formação de compostos indiretos que causam substituição dos pares de bases após o tratamento. No entanto, o resultado para o CPT foi negativo para as duas linhagens nas condições testadas.

A ausência de dados da potência mutagênica para as amostras de captopril fotocatalisado (CPT/ TiO₂/UV-C) (TAB. 5.7), após submissão dos dados no Salanal dificulta a análise após este tratamento. Apenas para a cepa TA100/S9+ pode-se observar que a potência mutagênica aumentou ligeiramente após o tratamento, mas não coincide com a redução no perfil de revertentes nestas condições.

Nas amostras de diclofenaco clorado (DCF/NaClO) com a cepa TA98 a potência mutagênica foi cerca de cinco vezes superior na presença de metabolização (TAB.5.7), passando de 0,167 rev./ng para 0,902 rev./ng, indicando que compostos indiretos na amostra são potencialmente mais mutagênicos.

Pouca diferença foi observada após a cloração do sulfametoxazol com a bactéria TA98/S9+ (TAB.5.7). No entanto, pode-se observar que a potência mutagênica desta cepa (0,161 rev./ng) foi muito inferior que para a TA100 (1,314 rev./ng) na presença de metabolização, indicando que os mutágenos indiretos presentes na amostra clorada podem causar substituição dos pares de bases.

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos com base nas três variáveis para interpretação dos resultados – ANOVA, relação dose-resposta e razão de mutagenicidade. Os dados do programa Salanal foram também confrontados com os analisados através da análise de variância (ANOVA) com pós teste de Tukey para compreensão dos efeitos dos tratamentos.

A adoção das três variáveis para análise dos resultados está mais relacionada com os dados da literatura para o CPT em que o fármaco foi negativo para indução da frequência de micronúcleos e sem potencial carcinogênico. O mesmo foi observado para o DCF em que dados apresentados na literatura indicaram resultado negativo para teste de Ames, e para mutação reversa com bactérias *E.coli* WP2 e não carcinogênico. Os resultados negativos

observados na fotocatalise do CPT estão mais de acordo com dados da literatura em que processos oxidativos reduziram o potencial mutagênico de amostras diversas.

Em contraste, os dados aqui obtidos para o SMX não coincidem com os da literatura, onde para as duas bactérias o resultado foi negativo. Há relatos de este fármaco aumentar a frequência de micronúcleos e de troca entre cromátides irmãs, e ainda de induzir atividade mutagênica com as cepas TA98 e TA100. Neste último trabalho doses muito superiores foram analisadas, e, portanto, pode ter sido o fator determinante para esta diferença. Como estas concentrações não são fidedignas às observadas ou possíveis de serem detectadas no meio ambiente e na água tratada, elas não foram aqui adotadas.

A análise dos resultados como foi apresentada na presente discussão, com todas as variáveis consideradas, aproximou mais aos dados apresentados na literatura, ou seja, os fármacos investigados antes e após os tratamentos oxidativos não apresentaram toxicidade celular e mutagenicidade. No entanto, destaca-se a necessidade de repetir os ensaios e no caso do ensaio de mutagenicidade utilizando controles negativos representativos das amostras (água submetida ao tratamento oxidativo, mas na ausência de fármaco). Além disso, recomenda-se que a toxicidade dos fármacos originais às linhagens da bactéria seja testada antes de aplicadas as doses propostas a fim de se obter uma relação entre dose e resposta para ambas as linhagens do teste de Ames.

Uma das dificuldades enfrentadas para a padronização e execução do ensaio *Salmonella*/microsoma no presente trabalho foi o processamento simultâneo de um grande número de amostras, em função das réplicas e das doses exigidas para manter a confiabilidade dos testes. Estes detalhes da técnica acabam por dificultar o estudo da mutagenicidade de um grande número de amostras. Uma das alternativas para contornar estes infortúnios parece ser a miniaturização do teste. Na década de 1990 esta variação do teste de Ames começou a ser aplicada. Para isso, cepas da bactéria *Salmonella typhimurium* bioluminescentes (gene *lux*) foram desenvolvidas e a mutagenicidade de amostras de resíduos industriais foi avaliada em microplacas (CÔTÉ et al., 1995). Já neste estudo os autores ressaltaram a utilidade da então inovação e alteração da técnica. Mais tarde a miniaturização do teste foi novamente reportada e comparada simultaneamente ao teste convencional (FLAMAND et al., 2001). Neste trabalho os autores destacaram uma melhoria na miniaturização na medida em que o teste pode ser aplicado a todas as linhagens da bactéria *S. typhimurium*, o que ainda não era possível. Os autores detectaram uma elevada conformidade entre os resultados do modelo miniaturizado e o convencional. Desta forma recomenda-se que a miniaturização seja

considerada em futuras pesquisas a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados e execução de múltiplas amostras e linhagens simultaneamente.

O ensaio de citotoxicidade pela técnica do MTT foi adotado para as mesmas amostras dos ensaios de mutagenicidade. As desvantagens citadas anteriormente para o teste de Ames não foram encontradas para o ensaio do MTT, pois para o teste podem ser analisadas várias amostras com todas as suas réplicas em uma microplaca de 96 poços. E ainda, o resultado é obtido em apenas dois dias. Nenhum fármaco antes do tratamento induziu efeitos citotóxicos nas células HepG2 (TAB.5.8). Após a cloração apenas o SMX reduziu a viabilidade em mais de 30%, e no geral, não foi observada nenhuma melhoria na viabilidade celular com esta amostra. Da mesma forma como no ensaio de mutagenicidade, recomenda-se para o teste do MTT que o controle negativo seja água submetida ao tratamento oxidativo, mas na ausência de fármacos. Além disso, ressalta-se a necessidade de repetir os ensaios em condições tais que minimizem os erros entre as réplicas (e.g estratégias para uma boa pipetagem).

O emprego de células eucarióticas humanas no ensaio do MTT foi uma das maneiras de aproximar os possíveis danos causados à população e, o uso de dois testes distintos serviu ainda para comparar os resultados dos mesmos. Os resultados do ensaio *Salmonella*/microsoma, todas as amostras negativas, estão de acordo com os obtidos pelo ensaio do MTT, com exceção para o SMX que os resultados não coincidem nem com os dados da literatura. Com isso, pode-se concluir que não houve discrepância entre os resultados dos ensaios aplicados.

Tabela 5.8 - Resumo dos resultados obtidos no ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma e no ensaio de citotoxicidade pelo MTT, antes e após cloração e fotocatalise.

Fármaco	Tratamento	Ensaio <i>Salmonella</i>/microsoma	Ensaio do MTT
Captopril	Sem cloro	Negativo	Negativo
	Com cloro	Negativo	Aumento da viabilidade
Diclofenaco	Sem cloro	Negativo	Negativo
	Com cloro	Negativo	Aumento da viabilidade
Sulfametoxazol	Sem cloro	Negativo	Negativo
	Com cloro	Negativo	Citotóxico (viabilidade inferior a 70%)
Captopril	Sem TiO₂	Negativo	Negativo
	Com TiO₂	Negativo	Aumento da viabilidade

TA98: detecta mutágenos que causam deslocamento no quadro de leitura, TA100: detecta mutágenos que causam substituição dos pares de bases. S9+: presença do sistema de ativação metabólica, S9-: ausência do sistema de ativação metabólica.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi implementado o ensaio *Salmonella*/microsoma, para avaliação da mutagenicidade de amostras de água submetidas a processos oxidativos de tratamento. Ajustes metodológicos necessitam ser executados a fim de garantir reprodutibilidade dos resultados e análise simultânea de múltiplas amostras.

Os resultados dos ensaios de mutagenicidade indicaram que nenhum dos fármacos investigados, captopril, diclofenaco e sulfametoxazol foram mutagênicos nas doses estudadas (1, 25, 50, 75 e 100 ng/placa), tanto antes quanto após o tratamento com cloro ou pela fotocatalise heterogênea com TiO₂/UV-C. Da mesma forma, os testes de viabilidade celular por MTT mostraram que os tratamentos da água acrescida dos fármacos com cloro e TiO₂/UV-C não causaram efeito tóxico para as células considerando os ensaios realizados com Captopril e Diclofenaco. Na verdade em ambos os casos observou-se um aumento da viabilidade celular após os tratamentos sugerindo que estes fármacos não induzem uma ação tóxica às células nas doses investigadas. No caso do sulfametoxazol os resultados são inconclusivos uma vez que apenas a dose intermediária (40 ng/poço) mostrou diminuição da viabilidade celular, o que indicaria um possível efeito tóxico após o tratamento com cloro.

A avaliação dos efeitos dos subprodutos da oxidação de fármacos, assim como de outros microcontaminantes é de crucial importância, uma vez que a toxicidade da água pode estar atribuída muitas vezes a compostos que não estão ainda regulamentados. Embora as concentrações adotadas no presente trabalho sejam muito maiores que as tipicamente detectadas no ambiente, os resultados são importantes para caracterizar a toxicidade relativa de amostras naturais ou tratadas para abastecimento. Trata-se dos primeiros estudos que podem levar à aplicação de medidas preventivas nos sistemas operacionais das ETAs ou medidas corretivas em ambientes naturais.

7 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

A revisão de literatura feita neste trabalho mostrou algumas lacunas nos estudos de toxicologia de fármacos e seus subprodutos da oxidação após tratamento da água. Dessa forma, é necessária a aplicação de ensaios adicionais de toxicologia para avaliar os diversos efeitos que estes microcontaminantes podem causar. Estes ensaios devem ser aplicados a outros fármacos, de outras classes, principalmente os mais comumente detectados no meio. Para o ensaio de mutagenicidade *Salmonella*/microsoma, dado o valor desta análise, deve-se buscar a miniaturização do mesmo, a fim de facilitar a avaliação de um número maior de amostras.

REFERÊNCIAS

- ABOU-EISHA, A. (2006). Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antibacterial drug, trimethoprim. **Toxicology in Vitro**, 20(5), 601–607.
- ADAMS, C., WANG, Y., LOFTIN, K., & MEYER, M. (2002). Removal of Antibiotics from Surface and Distilled Water in Conventional Water Treatment Processes. *J. Environ.Eng.*, 128(March), 253–260.
- ADEN, D. P., FOGEL, A., PLOTKIN, S., DAMJANOV, I., & KNOWLES, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. **Nature**, 282(6), 615–616.
- AL-HARBI, M. M. (1993). Effect of captopril on the cytological and biochemical changes induced by adriamycin. **Food and Chemical Toxicology**, 31(3), 209–212.
- ALLEN, C. N., HARPUR, E. S., GRAY, T. J., & HIRST, B. H. (1991). Toxic effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in a human intestinal epithelial cell line (HCT-8), as assessed by the MTT and neutral red assays. **Toxicology in Vitro**, 5(3), 183–191.
- ALUM, A., YOON, Y., WESTERHOFF, P., & ABBASZADEGAN, M. (2004). Oxidation of bisphenol A, 17beta-estradiol, and 17alpha-ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity. **Environmental Toxicology**, 19(3), 257–264.
- AMES, B. N., DURSTON, W. E., YAMASAKI, E., & LEE, F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 70(8), 2281–2285.
- AMES, B. N., MCCANN, J., & YAMASAKI, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, 31, 347–363.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AWWA - American Water Works Association; WEF - Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater (2005), 21sted. 2414 p. Washington.
- AQUINO, S. F., BRANDT, E. M. F., & CHERNICHARO, C. A. L. (2013). Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto : revisão da literatura. **Engenharia Sanitária E Ambiental**, 18(3), 187–204.
- AYAKI, M., IWASAWA, A., SODA, M., YAGUCHI, S., & LOIDE, R. (2010). Cytotoxicity of five fluoroquinolone and two nonsteroidal anti-inflammatory benzalkonium chloride-free ophthalmic solutions in four corneoconjunctival cell lines. **Clinical Ophthalmology**, 4, 1019–1024.
- BENOTTI, M. J., TRENHOLM, R. A., VANDERFORD, B. J., HOLADY, J. C., STANFORD, B. D., & SNYDER, S. A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine

- disrupting compounds in U.S. drinking water. **Environmental Science & Technology**, 43(3), 597–603.
- BERRIDGE, M., HERST, P., & TAN, A. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**, 11(05), 127–152.
- BILA, D., & DEZOTTI, M. (2003). Fármacos no meio ambiente. **Quim. Nova**, 26(4), 523–530.
- BISTAN, M., PODGORELEC, M., LOGAR, R. M., & TISLER, T. (2012). Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies. **Food Technol. Biotechnol.**, 50(4), 427–433.
- BIZANI, E., FYTIANOS, K., POULIOS, I., & TSIRIDIS, V. (2006). Photocatalytic decolorization and degradation of dye solutions and wastewaters in the presence of titanium dioxide. **Journal of Hazardous Materials**, 136(1), 85–94.
- BONASSI, S., ZNAOR, A., CEPPI, M., LANDO, C., CHANG, W. P., HOLLAND, N., ... FENECH, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, 28(3), 625–631.
- BORT, R., PONSODA, X., JOVER, R., GÓMEZ-LECHÓN, M. J., & CASTELL, J. V. (1999). Diclofenac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 288(1), 65–72.
- CABEZA, Y., CANDELA, L., RONEN, D., & TEIJON, G. (2012). Monitoring the occurrence of emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and 2010. The Baix Llobregat (Barcelona, Spain). **Journal of Hazardous Materials**, 239-240, 32–39.
- CALZA, P., SAKKAS, V., MEDANA, C., BAIOCCHI, C., DIMOU, A, PELIZZETTI, E., & ALBANIS, T. (2006). Photocatalytic degradation study of diclofenac over aqueous TiO₂ suspensions. **Applied Catalysis B: Environmental**, 67(3-4), 197–205.
- CARBALLA, M., OMIL, F., LEMA, J. M., LLOMPART, M., GARCÍA-JARES, C., RODRÍGUEZ, I., ... TERNES, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. **Water Research**, 38(12), 2918–2926.
- CARLSSON, C., JOHANSSON, A.-K., ALVAN, G., BERGMAN, K., & KÜHLER, T. (2006). Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. **The Science of the Total Environment**, 364(1-3), 67–87.
- CLAXTON, L. D., UMBUZEIRO, G. DE A., & DEMARINI, D. M. (2010). The Salmonella Mutagenicity Assay: The Stethoscope of Genetic Toxicology for the 21st Century. **Environmental Health Perspectives**, 118(11), 1515–1522.

- CLEUVERS, M. (2003). Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology Letters**, 142(3), 185–194.
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. (1996). Technical guidance document in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances. Part II; Environmental Risk Assessment. Office for official publications of the European Communities, Luxembourg.
- CONAMA nº 430 - BRASIL - Ministério do Meio Ambiente - MMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA - Resolução nº 430 – Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. De 13 de maio de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, 16 de maio de 2011a, 8 p.**
- CÔTÉ, C., BLAISE, C., DELISLE, C. E., MEIGHEN, E. A., & HANSEN, P. D. (1995). A miniaturized Ames mutagenicity assay employing bioluminescent strains of *Salmonella typhimurium*. **Mutation Research**, 345(3-4), 137–146.
- DAUGHTON, C. (2002). Environmental Stewardship and Drugs as Pollutants, 2002. Environmental Protection Agency. **Lancet**, 360, 1035-1036.
- DAUGHTON, C. G. (2005). “ Emerging ” Chemicals as Pollutants in the Environment : a 21st Century Perspective. **Renewable Resources Journal**, 6-23.
- DELGADO, L. F., CHARLES, P., GLUCINA, K., & MORLAY, C. (2012). The removal of endocrine disrupting compounds, pharmaceutically activated compounds and cyanobacterial toxins during drinking water preparation using activated carbon--a review. **The Science of the Total Environment**, 435-436, 509–525.
- DELLAGRECA, M., FIORENTINO, A., IESCE, M. R., ISIDORI, M., NARDELLI, A., PREVITERA, L., & TEMUSSI, F. (2003). Identification of phototransformation products of prednisone by sunlight: toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22(3), 534–539.
- DEVI, P. S., & POLASA, H. (1987). Evaluation of the anti-inflammatory drug indomethacin, for its genotoxicity in mice. **Mutation Research**, 188(4), 343–347.
- DIRTU, A. C., VAN DEN EEDE, N., MALARVANNAN, G., IONAS, A. C., & COVACI, A. (2012). Analytical methods for selected emerging contaminants in human matrices-a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 404(9), 2555–2581.
- DODD, M. C., & HUANG, C.-H. (2004). Transformation of the antibacterial agent sulfamethoxazole in reactions with chlorine: kinetics, mechanisms, and pathways. **Environmental Science & Technology**, 38(21), 5607–5615.
- DOLAR, D., GROS, M., RODRIGUEZ-MOZAZ, S., MORENO, J., COMAS, J., RODRIGUEZ-RODA, I., & BARCELÓ, D. (2012). Removal of emerging contaminants

- from municipal wastewater with an integrated membrane system, MBR-RO. **Journal of Hazardous Materials**, 239-240, 64–69.
- DZIMIRI, N., & ALMOTREFI, A. (1993). Actions of amiodarone on mitochondrial ATPase and lactate dehydrogenase activities in guinea pig heart preparations. **European Journal of Pharmacology**, 242(2), 113–118.
- ELMI, A, SADEGHI, Z., ELMI, S., DARAEI, B., & GHAZI-KHANSARI, M. (2007). Hepatoprotective role of captopril on paraquat induced hepatotoxicity. **Human & Experimental Toxicology**, 26(10), 789–794.
- FARRÉ, M. LA, PÉREZ, S., KANTIANI, L., & BARCELÓ, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, 27(11), 991–1007.
- FARRÉ, M., ASPERGER, D., KANTIANI, L., GONZÁLEZ, S., PETROVIC, M., & BARCELÓ, D. (2008). Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 390(8), 1999–2007.
- FERRARI, B., PAXÉUS, N., LO GIUDICE, R., POLLIO, A., & GARRIC, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 55(3), 359–370.
- FLAMAND, N., MEUNIER, J., MEUNIER, P., & AGAPAKIS-CAUSSÉ, C. (2001). Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in a prescreening assay for point mutagenesis assessment. **Toxicology in Vitro**, 15(2), 105–114.
- FOTAKIS, G., & TIMBRELL, J. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, 160(2), 171–177.
- FREITAS, J.R.L (2014). **Caracterização dos produtos de degradação do captopril por espectrometria de massas de alta resolução e avaliação da toxicidade após a fotocatalise heterogênea (TiO₂/UV-C): UFOP, 2014. 95 páginas. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Instituto de Ciências Biológicas e Exatas, Ouro Preto - MG.**
- GARTISER, S., HAFNER, C., KRONENBERGER-SCHÄFER, K., HAPPEL, O., TRAUTWEIN, C., & KÜMMERER, K. (2012). Approach for detecting mutagenicity of biodegraded and ozonated pharmaceuticals, metabolites and transformation products from a drinking water perspective. **Environmental Science and Pollution Research International**, 19(8), 3597–3609.
- GHAZI-KHANSARI, M., & MOHAMMADI-BARDBORI, A. (2007). Captopril ameliorates toxicity induced by paraquat in mitochondria isolated from the rat liver. **Toxicology in Vitro**, 21(3), 403–407.

- GIRI, A. K., SIVAM, S. S., & KHAN, K. A. (1992). Sister-chromatid exchange and chromosome aberrations induced by paracetamol in vivo in bone-marrow cells of mice. **Mutation Research**, 278(4), 253–258.
- GOPAL, K., TRIPATHY, S. S., BERSILLON, J. L., & DUBEY, S. P. (2007). Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water. **Journal of Hazardous Materials**, 140(1-2), 1–6.
- GUZZELLA, L., FERETTI, D., & MONARCA, S. (2002). Advanced oxidation and adsorption technologies for organic micropollutant removal from lake water used as drinking-water supply. **Water Research**, 36, 4307–4318.
- GUZZELLA, L., MONARCA, S., ZANI, C., FERETTI, D., ZERBINI, I., BUSCHINI, A., ... RICHARDSON, S. D. (2004). In vitro potential genotoxic effects of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants. **Mutation Research**, 564, 179–193.
- HABIBI, M. H., & VOSOOGHIAN, H. (2005). Photocatalytic degradation of some organic sulfides as environmental pollutants using titanium dioxide suspension. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 174(1), 45–52.
- HEBERT, A., FORESTIER, D., LENES, D., BENANOU, D., JACOB, S., ARFI, C., ... LEVI, Y. (2010). Innovative method for prioritizing emerging disinfection by-products (DBPs) in drinking water on the basis of their potential impact on public health. **Water Research**, 44(10), 3147–3165.
- HERNANDO, M. D., MEZCUA, M., FERNÁNDEZ-ALBA, A R., & BARCELÓ, D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, 69(2), 334–342.
- HESS, D. A., SISSON, M. E., SURIA, H., WIJSMAN, J., PUVANESASINGHAM, R., MADRENAS, J., & RIEDER, M. J. (1999). Cytotoxicity of sulfonamide reactive metabolites: apoptosis and selective toxicity of CD8(+) cells by the hydroxylamine of sulfamethoxazole. **FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, 13(13), 1688–1698.
- HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K., & KRATZ, K. L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **The Science of the Total Environment**, 225(1-2), 109–118.
- HOSSEINIMEHR, S. J., & KARAMI, M. (2005). Chemoprotective effects of captopril against cyclophosphamide-induced genotoxicity in mouse bone marrow cells. **Archives of Toxicology**, 79(8), 482–486.
- HU, J.-Y., AIZAWA, T., & OOKUBO, S. (2002). Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. **Environmental Science & Technology**, 36(9), 1980–1987.

- HUBER, M. M., CANONICA, S., PARK, G.-Y., & VON GUNTEN, U. (2003). Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. **Environmental Science & Technology**, 37(5), 1016–1024.
- HUERTA-FONTELA, M., GALCERAN, M. T., & VENTURA, F. (2011). Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. **Water Research**, 45(3), 1432–1442.
- INGERSLEV, F., & HALLING-SORENSEN, B. (2000). Biodegradability properties of sulfonamides in activated sludge. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19(10), 2467–2473.
- ISIDORI, M., LAVORGNA, M., NARDELLI, A., PASCARELLA, L., & PARRELLA, A. (2005). Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. **The Science of the Total Environment**, 346(1-3), 87–98.
- IZUMI, K., SANO, N., OTSUKA, H., KINOCHI, T., & OHNISHI, Y. (1991). Tumor promoting potential in male F344 rats and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* of dipyrone. **Carcinogenesis**, 12(7), 1221–1225.
- JARDIM, W. F., MONTAGNER, C. C., PESCARA, I. C., UMBUZEIRO, G. A., DI DEA BERGAMASCO, A. M., ELDRIDGE, M. L., & SODRÉ, F. F. (2012). An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, 84, 3–8.
- JONES, O. A., LESTER, J. N., & VOULVOULIS, N. (2005). Pharmaceuticals: a threat to drinking water? **Trends in Biotechnology**, 23(4), 163–167.
- JURIMA-ROMET, M., CRAWFORD, K., & HUANG, H. S. (1994). Comparative cytotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs in primary cultures of rat hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, 8(1), 55–66.
- JURIMA-ROMET, M., & HUANG, H. (1993). Comparative cytotoxicity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cultured rat hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, 46(12), 2163–2170.
- JURIMA-ROMET, M., & HUANG, H. (1994). Comparison of the cytotoxicity of ace inhibitors and effects of cytochrome P-450 and glutathione modulation in primary rat hepatocyte cultures. **Toxicology in Vitro**, 8(4), 529–531.
- KADOTANI, S., ARISAWA, M., & MARUYAMA, H. (1984). Mutagenicity examination of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in bacterial systems. **Mutation Research**, 138, 133–136.
- KLEYWEGT, S., PILEGGI, V., YANG, P., HAO, C., ZHAO, X., ROCKS, C., ... WHITEHEAD, B. (2011). Environment Pharmaceuticals , hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada — Occurrence and treatment efficiency. **Science of the Total Environment**, 409(8), 1481–1488.

- KOLPIN, D. W., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., THURMAN, E. M., ZAUGG, S. D., BARBER, L. B., & BUXTON, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, 36(6), 1202–1211.
- KÜMMERER, K. (2010). Pharmaceuticals in the Environment. **Annual Review of Environment and Resources**, 35(1), 57–75.
- LAVILLE, N., AÏT-AÏSSA, S., GOMEZ, E., CASELLAS, C., & PORCHER, J. M. (2004). Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. **Toxicology**, 196(1-2), 41–55.
- LEE, Y., & VON GUNTEN, U. (2010). Oxidative transformation of micropollutants during municipal wastewater treatment: comparison of kinetic aspects of selective (chlorine, chlorine dioxide, ferrate VI, and ozone) and non-selective oxidants (hydroxyl radical). **Water Research**, 44(2), 555–566.
- LI, G., AN, T., NIE, X., SHENG, G., ZENG, X., FU, J., ... ZENG, E. (2007). Mutagenicity assessment of produced water during photoelectrocatalytic degradation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 26(3), 416–423.
- LIMA, D. R. S., AFONSO, R. J. C. F., LIBÂNIO, M., & AQUINO, S. . (2014). Avaliação da remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em águas de abastecimento por clarificação em escala de bancada. **Quim. Nova**, 37(5), 783–788.
- MAHMOUD, W. M. M., & KÜMMERER, K. (2012). Chemosphere Captopril and its dimer captopril disulfide : Photodegradation , aerobic biodegradation and identification of transformation products by HPLC – UV and LC – ion trap-MS n. **Chemosphere**, 88(10), 1170–1177.
- MARON, D. M., & AMES, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, 113(3-4), 173–215.
- MASOOD, F., & MALIK, A. (2013). Mutagenicity and genotoxicity assessment of industrial wastewaters. **Environmental Science Pollut Research**, 20, 7386–7397.
- MASUBUCHI, Y., YAMADA, S., & HORIE, T. (2000). Possible mechanism of hepatocyte injury induced by diphenylamine and its structurally related nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 292(3), 982–987.
- MCGUIGAN, C., & LI, X. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of phenazine in two human cell lines. **Toxicology in Vitro**, 28(4), 607–615.
- MEIER, J. R. (1988). Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. **Mutation Research**, 196(3), 211–245.
- MELO, S., TROVÓ, A., BAUTILZ, I., & NOGUEIRA, R. (2009). Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, 32(1), 188–197.

- MERSCH-SUNDERMANN, V., KEVEKORDES, S., & MOCHAYEDI, S. (1991). Sources of variability of the *Escherichia coli* PQ37 genotoxicity assay (SOS chromotest). **Mutation Research**, 252(1), 51–60.
- MERSCH-SUNDERMANN, V., KNASMÜLLER, S., WU, X.-J., DARROUDI, F., & KASSIE, F. (2004). Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, 198(1-3), 329–340.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria n. 2914/GM, 12 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União. Brasília, 2011 dezembro, seção 1, p. 39-46.
- MONARCA, S., ZANARDINI, A., FERETTI, D., DALMIGLIO, A., FALISTOCCO, E., MANICA, P., & NARDI, G. (1998). Mutagenicity of extracts of lake drinking water treated with different disinfectants in bacterial and plant tests. **Water Research**, 32(9), 2689–2695.
- MOREIRA, R. R. D., SANTOS, L. E., VARELLA, S. D., VARANDA, E. A., & VILEGAS, W. (2002). Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 12(1), 11–19.
- MORTELMANS, K., & RICCIO, E. S. (2000). The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. **Mutation Research**, 455(1-2), 61–69.
- MORTELMANS, K., & ZEIGER, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, 455(1-2), 29–60.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65(1-2), 55–63.
- NOMIYAMA, K., TANIZAKI, T., KOGA, T., ARIZONO, K., & SHINOHARA, R. (2007). Oxidative degradation of BPA using TiO₂ in water, and transition of estrogenic activity in the degradation pathways. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 52(1), 8–15.
- O'CONNOR, N., DARGAN, P. I., & JONES, A. L. (2003). Hepatocellular damage from non-steroidal anti-inflammatory drugs. **QJMed: An Internacional Journal of Medicine**, 96(11), 787–791.
- OGA,S., C, M. M. A., B, J. A. O. (2003). Grupo de Trabalho Zanini-Oga. Bases da Toxicologia e Toxicologia Ambiental in: **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 474 páginas, 2^a edição.
- OLIVEIRA, A. P. S. (2010). Mutagenicidade e estrogenicidade de plantas da família Eriocaulaceae e relação estrutura-atividade de algumas substâncias isoladas: UNESP,

2010. 204 páginas. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara.

- OLIVEIRA, G. A. R., FERRAZ, E. R. A., CHEQUER, F. M. D., GRANDO, M. D., ANGELI, J. P. F., TSUBOY, M. S., ... OLIVEIRA, D. P. (2010). Chlorination treatment of aqueous samples reduces , but does not eliminate , the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1 , Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 703(2), 200–208.
- OLIVEIRA, R., ANDERSON, M., UMBUZEIRO, G., ZOCCOLO, G., & ZANONI, M. (2012). Assessment of by-products of chlorination and photoelectrocatalytic chlorination of an azo dye. **Journal of Hazardous Materials**, 205-206, 1–9.
- ONWUAMAH, C. K., EKAMA, S. O., AUDU, R. A., EZECHI, O. C., POIRIER, M. C., & ODEIGAH, P. G. C. (2014). Exposure of *Allium cepa* root cells to zidovudine or nevirapine induces cytogenotoxic changes. **PloS One**, 9(3), 1–7.
- PARRELLA, A., & LAVORGNA, M. (2013). Mutagenicity , Genotoxicity , and Estrogenic Activity of River Porewaters. **Environmental Contamination and Toxicology**, 65, 407–420.
- PHILIPOSE, B., SINGH, R., KHAN, K. A, & GIRI, A K. (1997). Comparative mutagenic and genotoxic effects of three propionic acid derivatives ibuprofen, ketoprofen and naproxen. **Mutation Research**, 393(1-2), 123–131.
- PONSODA, X., BORT, R., JOVER, R., GÓMEZ-LECHÓN, M. J., & CASTELL, J. V. (1995). Molecular mechanism of diclofenac hepatotoxicity: Association of cell injury with oxidative metabolism and decrease in ATP levels. **Toxicology in Vitro**, 9(4), 439–444.
- POURAHMAD, J., HOSSEINI, M.-J., BAKAN, S., & GHAZI-KHANSARI, M. (2011). Hepatoprotective activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, captopril and enalapril, against paraquat toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 99(1), 105–110.
- QUINTANA, J. B., RODIL, R., LÓPEZ-MAHÍA, P., MUNIATEGUI-LORENZO, S., & PRADA-RODRÍGUEZ, D. (2010). Investigating the chlorination of acidic pharmaceuticals and by-product formation aided by an experimental design methodology. **Water Research**, 44(1), 243–255.
- RICHARD, J., BOERGERS, A., VOM EYSER, C., BESTER, K., & TUERK, J. (2013). Toxicity of the micropollutants Bisphenol A, Ciprofloxacin, Metoprolol and Sulfamethoxazole in water samples before and after the oxidative treatment. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 217(4-5), 1–9.
- RICHARDSON, S. D., PLEWA, M. J., WAGNER, E. D., SCHOENY, R., & DEMARINI, D. M. (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. **Mutation Research**, 636(1-3), 178–242.

- RODRIGUES, P. M. S. M., SILVA, J. C. G. E., & ANTUNES, M. C. G. (2007). Factorial analysis of the trihalomethanes formation in water disinfection using chlorine. **Analytica Chimica Acta**, 595, 266–274.
- SACHER, F., THOMAS, F. L., BRAUCH, H.-J., & BLANKENHORN, I. (2001). Pharmaceuticals in groundwaters Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany. **Journal of Chromatography A**, 938, 199–210.
- SANDERSON, H., BRAIN, R. A, JOHNSON, D. J., WILSON, C. J., & SOLOMON, K. R. (2004). Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. **Toxicology**, 203(1-3), 27–40.
- SATHISHKUMAR, P., MYTHILI, A., HADIBARATA, T., RAJARAJESWARAN, J., KANTHIMATHI, M., PALVANNAN, T., ... YUSOFF, A. (2014). Laccase mediated diclofenac transformation and cytotoxicity assessment on mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocytes. **Royal Society of Chemistry**, 4(23), 11689–11697.
- Schwarzenbach, R. P., Egli, T., Hofstetter, T. B., von Gunten, U., & Wehrli, B. (2010). Global Water Pollution and Human Health. *Annual Reviews Environmental Resource*, 35, 109–136.
- SCHWARZENBACH, R. P., EGLI, T., HOFSTETTER, T. B., VON GUNTEN, U., & WEHRLI, B. (2010). Global Water Pollution and Human Health. **Annual Reviews Environmental Resource**, 35, 109–136.
- SCHWARZENBACH, R. P., ESCHER, B. I., FENNER, K., HOFSTETTER, T. B., JOHNSON, C. A., VON GUNTEN, U., & WEHRLI, B. (2006). The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**, 313(5790), 1072–1077.
- SEDLAK, D. L., & PINKSTON, K. E. (2001). Factors affecting the concentrations of pharmaceuticals released to the aquatic environment. **Water Research**, 120, 56–64.
- SERRES, F. J., & SHELBY, M. D. (1979). Recommendations on data production and analysis using the *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, 64, 159–165.
- SNYDER, S. A., WESTERHOFF, P., YOON, Y., & SEDLAK, D. L. (2003). Pharmaceuticals Personal Care Products, and Endocrine Disruptors in Water: Implications for the Water Industry. **Environmental Engineering Science**, 20(5), 449–469.
- SODRÉ, F. F., MONTAGNER, C. . . ., LOCATELLI, M. A. F., & JARDIM, W. F. (2007). Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, 2, 187–196.
- SODRÉ, F. F., LOCATELLI, M. A. F., & JARDIM, W. F. (2009). Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, 206(1-4), 57–67.

- SODRÉ, F. F., PESCARA, I. C., MONTAGNER, C. C., & JARDIM, W. F. (2010). Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, 96(1), 92–98.
- STACKELBERG, P. E., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., ZAUGG, S. D., HENDERSON, A. K., & REISSMAN, D. B. (2004). Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. **The Science of the Total Environment**, 329(1-3), 99–113.
- STEVENSON, A., CLARKE, G., PATEL, C., & HUGHES, T. (1973). Chromosomal studies in vivo and in vitro of trimethoprim and sulfamethoxazole (co-trimoxazole). **Mutation Research**, 17, 255–260.
- STULTS, D. M., KILLEN, M. W., & PIERCE, A. J. (2014). The sister chromatid exchange (SCE) assay. In P. Keohavong & S. G. Grant (Eds.), **Molecular Toxicology Protocols, Methods in Molecular Biology**, Vol. 1105, p. 633. Capítulo 32. Totowa, NJ: Humana Press.
- STUMPF, M., TERNES, T. A., WILKEN, R.-D., RODRIGUES, S. V., & BAUMANN, W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, 225(1-2), 135–141.
- TAKANASHI, H., KISHIDA, M., NAKAJIMA, T., OHKI, A., & AKIBA, M. (2011). A level change in mutagenicity of Japanese tap water over the past 12 yr. **Chemosphere**, 83(9), 1208–1213.
- TERNES, T. A., STUMPF, M., MUELLER, J., HABERER, K., WILKEN, R. D., & SERVOS, M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, 225(1-2), 81–90.
- TERNES, T. A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Water Research**, 32(11), 3245–3260.
- TERNES, T. A., MEISENHEIMER, M., MCDOWELL, D., SACHER, F., BRAUCH, H.-J., HAIST-GULDE, B., ... ZULEI-SEIBERT, N. (2002). Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. **Environmental Science & Technology**, 36(17), 3855–3863.
- TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. (2012). **Microbiologia**. Porto Alegre: ArtMed, 934 páginas, 10a edição.
- TICE, R. R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., ... SASAKI, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 35(3), 206–221.

- UHL, M., HELMA, C., & KNASMÜLLER, S. (2000). Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. **Mutation Research**, 468(2), 213–225.
- UMBUZEIRO, G. A., RECH, C. M., CORREIA, S., BERGAMASCO, A. M., CARDENETTE, G. H. L., FLUCKIGER-ISLER, S., & KAMBER, M. (2010). Comparison of the *Salmonella* / Microsome Microsuspension Assay with the new Microplate Fluctuation Protocol for Testing the Mutagenicity of Environmental Samples. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 38, 31–38.
- UMBUZEIRO, G. A., ROUBICEK, D. A., SANCHEZ, P. S., & SATO, M. I. (2001). The *Salmonella* mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. **Mutation Research**, 491(1-2), 119–126.
- UMBUZEIRO, G. D. A., VARGAS, V. M. F., FELZENSZWALB, I., HENRIQUES, J. A. P., & VARANDA, E. (2009). 18 páginas. Testes de Mutagenicidade. **Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA)**. Série de Documentos - SBMCTA.
- UMBUZEIRO, G. DE A., ROUBICEK, D. A., RECH, C. M., SATO, M. I. Z., & CLAXTON, L. D. (2004). Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. **Chemosphere**, 54(11), 1589–1597.
- U.S.EPA. (2001). U.S. Environmental Protection Agency. Removal of Endocrine Disruptor Chemicals Using Drinking Water Treatment Processes, Washington, DC, March. Disponível em: <<http://nepis.epa.gov/Adobe/PDF/30004HGG.pdf>>. Acesso em 12/08/2013.
- VALENT, G. U. (1990). **Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de São Paulo através do teste de Ames**: UNICAMP, 1990. 149 páginas. Dissertação (Doutorado), Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.
- VALENTE-CAMPOS, S., DIAS, C. L., BARBOUR, E. D. A., NASCIMENTO, E. D. S., & UMBUZEIRO, G. A. (2009). The introduction of the *Salmonella* / microsome mutagenicity assay in a groundwater monitoring program. **Mutation Research**, 675, 17–22.
- VARGAS, V. M., MOTTA, V. E., & HENRIQUES, J. A. (1993). Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research**, 319(1), 31–45.
- VULLIET, E., CREN-OLIVE, C., FLORENCE, M., & LOUSTALOT, G. (2011). Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. **Environmental Chem. Lett**, 9, 103–114.

- WANG, Y., LIU, H., LIU, G., & XIE, Y. (2014). Oxidation of diclofenac by aqueous chlorine dioxide: identification of major disinfection byproducts and toxicity evaluation. **The Science of the Total Environment**, 473-474, 437–445.
- WESTERHOFF, P., YOON, Y., SNYDER, S., & WERT, E. (2005). Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. **Environmental Science & Technology**, 39(17), 6649–6663.
- WHO. World Health Organization. (2004). Disinfectants and disinfectant by-products Environmental Healthy Criteria 216. Geneva. Disponível em:<http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_216.pdf>. Acesso em 03/03/2014.
- XU, J., MA, M., & PURCELL, W. M. (2003). Characterisation of some cytotoxic endpoints using rat liver and HepG2 spheroids as in vitro models and their application in hepatotoxicity studies. I. Glucose metabolism and enzyme release as cytotoxic markers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 189(2), 100–111.
- YAHAGI, T., DEGAWA, M., SEINO, Y., MATSUSHIMA, T., NAGAO, M., SUGIMURA, T., & HASHIMOTO, Y. (1975). Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives*. **Cancer Letters**, 1, 91–96.
- YARGEAU, V., HUOT, J., RODAYAN, A., ROULEAU, L., ROY, R., & LEASK, R. (2008). Impact of Degradation Products of Sulfamethoxazole on Mammalian Cultured Cells. **Wiley Periodicals**, 1, 492–498.
- ZEGURA, B., HEATH, E., CERNOSA, A., & FILIPIC, M. (2009). Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, 75(11), 1453–1460.
- ZHANG, G., & WANG, Z. (2000). Mechanism study of the coagulant impact on mutagenic activity in water. **Water Research**, 34(6), 1781–1790.

APÊNDICES

Apêndice A – Soluções e meios de cultura usados no ensaio *Salmonella/microsoma*

1) Soluções

1.1. Solução de Glicose 10%

Glicose.....	100 g
Água Destilada	q.s.p. 1000 mL

1.2. Solução de Vogel Bonner (50x)

Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).....	10 g
Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$).....	91,43 g
Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4).....	500 g
Fosfato de sódio e amônio ($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$).....	175 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL

1.3. Solução de Biotina – Histidina (0,5mM)

L-histidina.....	0,078 g
D-biotina.....	0,122 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL

1.4. Solução de Biotina (0,5mM)

D-biotina.....	0,012 g
Água destilada quente	q.s.p. 100 mL

1.5. Solução de Histidina (26mM)

L-histidina.....	403 mg
Água destilada quente	q.s.p. 100 mL

1.6. Solução de Ampicilina

Ampicilina.....8 mg
Água destilada estéril.....q.s.p. 8 mL

* A ampicilina foi dissolvida em 8 mL de água destilada utilizando um béquer estéril. Em seguida filtrou-se esta solução em membrana 0,22 μ m para um frasco previamente esterilizado.

1.7. Mistura S9 (4%)

1.7.1. Tampão fosfato 0,2M (pH = 7,4)

Solução A.....880 mL

Fosfato de Sódio Dibásico (Na_2HPO_4).....28,4 g
Água destilada.....q.s.p. 1000 mL

Solução B.....120 mL

Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....27,6 g
Água destilada.....q.s.p. 1000 mL

1.7.2. NADP 0,1 M

β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP).....0,7654 g
Água destilada estéril.....q.s.p. 10 mL

* O NADP foi dissolvido em 10 mL de água destilada esterilizada utilizando um béquer estéril. Em seguida filtrou-se esta solução em membrana 0,22 μ m para um frasco previamente esterilizado.

1.7.3. Glicose-6-fosfato 1M

Glicose-6-fosfato.....2,821 g
Água destilada estéril.....q.s.p. 10 mL

* A glicose-6-fosfato foi dissolvida em 10 mL de água destilada esterilizada utilizando um béquer estéril. Em seguida filtrou-se esta solução em membrana 0,22 µm para um frasco previamente esterilizado.

1.7.4. Solução de Sais (KCl 1,65 M e MgCl₂ 0,4 M)

Cloreto de magnésio (MgCl ₂).....	8,13 g
Cloreto de potássio (KCl).....	12,3 g
Água destilada.....	q.s.p. 100 mL

1.7.5. Fração S9 (MOLTOX)

Adquirido liofilizado e armazenado a -20°C. Ressuspendido com 2,1 mL de água destilada estéril no momento do uso.

1.8. Solução de Cristal Violeta 0,1%

Cristal Violeta.....	0,1 g
Água destilada estéril.....	100 mL

1.9. Solução de Fluorenamina

2-Fluorenamina (Merck).....	0,001 g
Dimetilsufóxido (DMSO).....	10 mL

* A fluorenamina foi dissolvida em 10 mL de DMSO utilizando um béquer estéril. Em seguida filtrou-se esta solução em membrana 0,22 µm para um frasco previamente esterilizado.

1.10. Solução de Azida Sódica

Azida sódica (NaN ₃) (Química Moderna)	0,005 g
Água destilada estéril.....	10 mL

* A azida sódica foi dissolvida em 10 mL de água destilada esterilizada utilizando um béquer estéril. A esterilização foi realizada por membrana 0,22 µm para um frasco previamente esterilizado. No momento do uso fez-se a diluição 1:10.

1.11. Solução de Agar (Para agar mínimo)

Bacto Agar.....	15 g
Água destilada.....	780 mL

2) Meios de Cultura

2.1. Agar Mínimo

Solução de Glicose 10%.....	200 mL
Solução de Agar.....	780 mL
Solução de Vogel Bonner (50x).....	20 mL
Solução de Biotina – Histidina (0,5mM).....	12 mL

2.2. Agar Mínimo suplementado com biotina

Solução de Glicose 10%.....	200 mL
Solução de Agar.....	780 mL
Solução de Vogel Bonner (50x).....	20 mL
Solução de Biotina (0,5mM).....	6 mL

2.3. Agar mínimo suplementado com biotina e excesso de histidina

Solução de Glicose 10%.....	200 mL
Solução de Agar.....	780 mL
Solução de Vogel Bonner (50x).....	20 mL
Solução de Biotina (0,5mM).....	6 mL
Solução de Histidina (26mM).....	10 mL

2.4. Caldo Nutriente

Cloreto de Sódio.....	5 g
Lab Lemco Powder (OXOID).....	10 g
Peptona.....	10 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL

2.5. Agar Nutriente

Cloreto de Sódio.....	5 g
-----------------------	-----

Lab Lemco Powder (OXOID).....	10 g
Peptona.....	10 g
Bacto agar.....	15 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL

2.6. Agar de Superfície

Bacto agar.....	6 g
Cloreto de Sódio (NaCl).....	5 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL

* Meios de cultura e soluções foram autoclavados por 20 minutos a 121°C, exceto quando especificado no item.

Apêndice B – Soluções e meio de cultura usados no ensaio de citotoxicidade pela técnica do MTT

1) Soluções

1.1. PBS (1X)

Fosfato de sódio dibásico anidro (Na ₂ HPO ₄).....	0,568 g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄).....	0,272 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	8,768 g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 mL

* O pH foi ajustado para 7,2. A solução foi autoclavada por 20 minutos a 121°C.

1.2. Tripsina

Cloreto de Sódio (NaClO).....	40 g
Cloreto de Potássio (KCl).....	2 g
Glicose.....	5 g
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃).....	2,9 g
Tripsina (Gibco, 1:250).....	2,5 g
Etilenodiamina tetracetato dissódio (EDTA).....	1 g
Solução Vermelho de Fenol 1%.....	2,25 mL
Água Milli-Q	q.s.p. 5000 mL

* A solução foi filtrada em capela de fluxo laminar através de membrana filtrante de 0,22µm. As alíquotas foram mantidas a - 20°C.

1.3. Soro fetal bovino (SFB) (Para meio DMEM)

O soro fetal bovino (Cultilab) foi descongelado em banho-maria a 37°C. Posteriormente foi homogeneizado e aliquotado em capela de fluxo laminar. As alíquotas foram mantidas a - 20°C em frascos estéreis.

1.4. Solução Penicilina - Estreptomicina (Para meio DMEM)

A solução de penicilina-estreptomicina, obtida da Sigma-Aldrich, foi alíquotada em tubos estéreis. Para 100 mL de meio foi adicionado 1 mL da mistura com penicilina a 10^3 U / mL e estreptomicina a 10 mg/mL.

1.5. Solução de Anfotericina B (Para meio DMEM)

Anfotericina B (Cultilab).....	50 mg
Água MilliQ estéril.....	50 mL

* Após solubilização a solução foi alíquotada em microtubos estéreis, e a concentração final obtida foi de 2,5µg / mL. Para 100 mL de meio foi adicionado 40 µL da solução a 5 µg/mL.

1.6. Solução de MTT (0,5mg/mL)

Preparo de solução estoque:

MTT (Sigma-Aldrich).....	0,05 g
PBS estéril.....	10 mL

Preparou-se uma solução estoque de MTT em PBS estéril. Para isso, dissolveu-se o MTT em PBS e filtrou a solução através de membrana filtrante de 0,22µm. A solução foi alíquotada em microtubos estéreis e mantida a -20°C. O preparo da solução final foi realizado por solução estoque de MTT e PBS estéril para obter uma concentração de 0,5mg/mL por poço.

2) Meio de Cultivo

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

DMEM (Cultilab).....	13,42 g
Bicarbonato de sódio.....	3,7 g
Água Milli-Q estéril.....	1000 mL

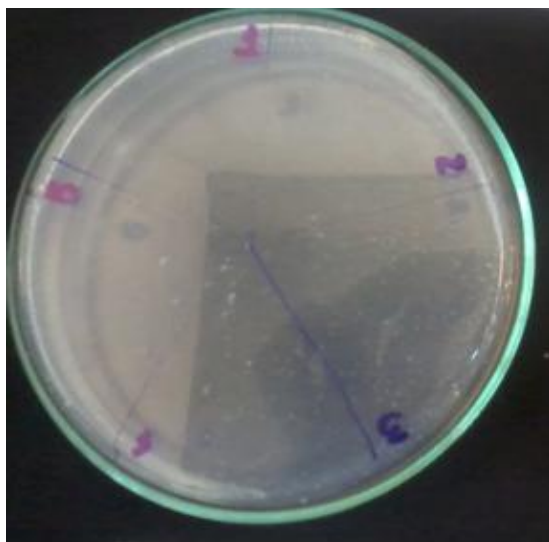
* O meio foi filtrado em membrana filtrante de 0,22 μ m e armazenado a 4°C. As soluções de antibióticos, soro fetal bovino e anfotericina B foram adicionadas em capela de fluxo laminar posteriormente ao preparo do meio.

A manutenção das células foi feita com meio DMEM suplementado com 5% de SFB, para aderência das células à microplaca as mesmas foram semeadas com meio DMEM com 15% de SFB. Nos poços com amostra e poços controle foram adicionados meio DMEM sem SFB.

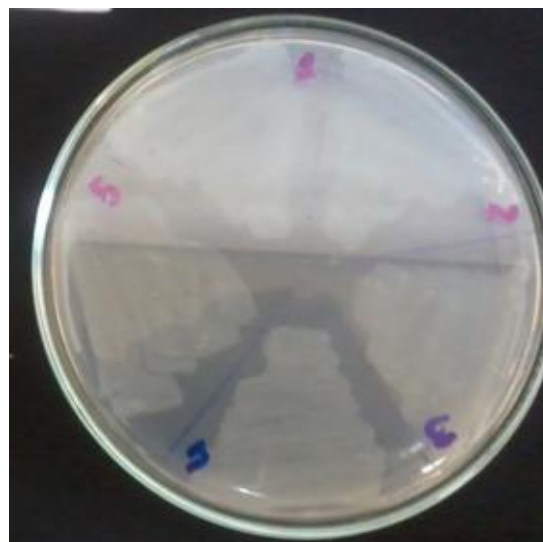
Apêndice C – Registro dos resultados das provas genéticas para a bactéria *Salmonella typhimurium*.

1) Dependência da histidina

a) AM + biotina

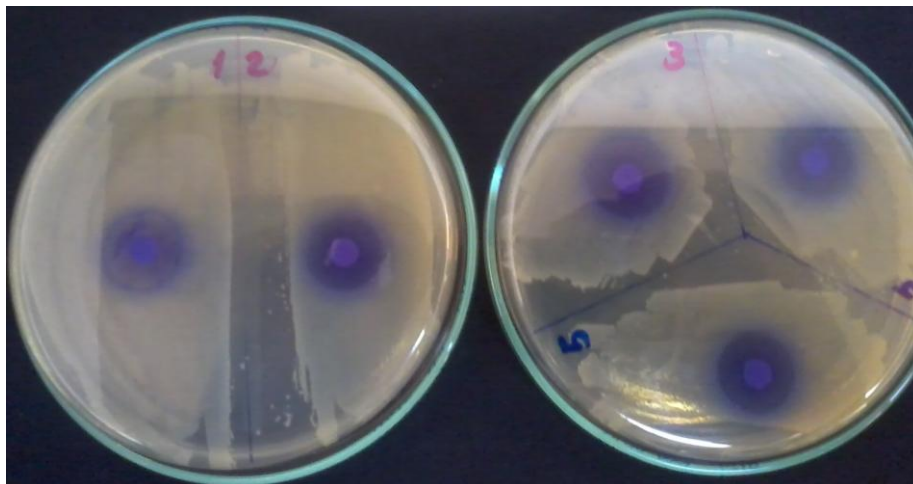


b) AM + biotina + histidina



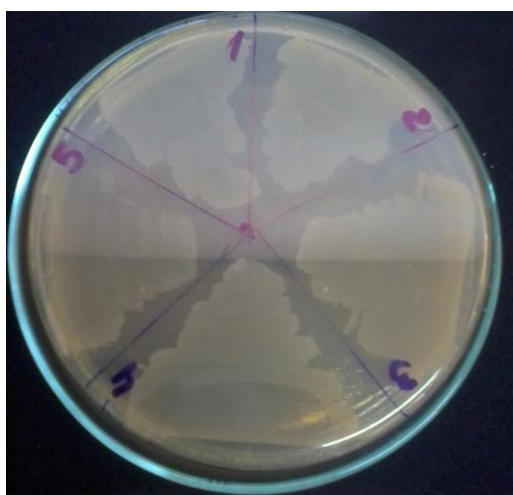
Para verificação da dependência da histidina as colônias de cada bactéria crescidas em caldo nutriente foram estriadas em meio com ágar mínimo contendo apenas biotina (a) e em ágar mínimo contendo biotina e excesso de histidina (b). A ausência de crescimento das bactérias no meio apenas com biotina (a) e o crescimento observado no meio com acréscimo de histidina (b) indica que a dependência a este aminoácido se manteve nas colônias testadas.

2) Mutação *rfa*



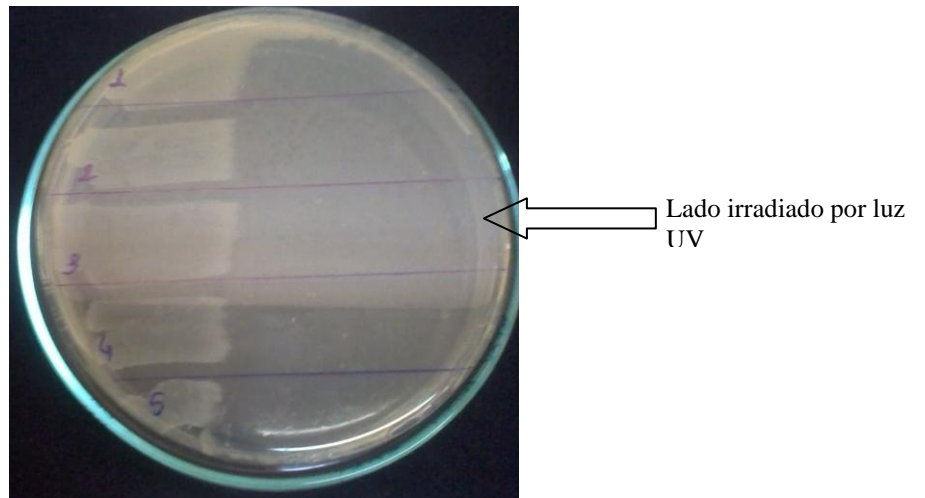
As cinco colônias selecionadas de cada linhagem foram testadas em duas diferentes placas contendo ágar nutriente para verificação da permeabilidade da membrana. Após o estriamento, discos de papel filtro embebidos com solução cristal violeta 1% foram dispostos sobre cada uma delas. Os halos de inibição do crescimento observados ao redor dos discos (foto) indicam que as bactérias mantinham a mutação que aumenta a permeabilidade da membrana e que então permitiu a penetração do cristal violeta inibindo o crescimento bacteriano.

3) Plasmídeo pKM101



As bactérias estriadas e cujo crescimento foi observado sobre linhas de solução do antibiótico ampicilina (8 mg/8 mL) (foto) demonstraram que o plasmídeo de resistência se mantinha nas células.

4) Deleção *uvrB*



A mutação *uvrB* provoca uma deleção do gene que codifica o sistema de reparo por excisão do DNA, e pode ser observada pela sensibilidade à luz UV. As bactérias estriadas em ágar nutriente e, posteriormente, expostas à luz UV não cresceram no lado irradiado (seta). O lado cujo crescimento foi observado (esquerdo) foi coberto durante a irradiação.