

EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DO FÁRMACO METOPROLOL EM EMBRIÕES DO *Danio rerio* COM 1 HORA APÓS FERTILIZAÇÃO

Rebeca Fabbro CUNHA¹; Carla LIMA²; Cintia BADARÓ-PEDROSO³; Débora Rodrigues da Silva COLOMBO⁴; Karen de SOUZA-FERREIRA⁵; Lilian Paula FARIA-PEREIRA⁶; Mônica LOPES-FERREIRA²; Ruan de Oliveira CARNEIRO⁴; Lucas de Melo da SILVA¹; Débora Antonio da SILVA¹; Rodrigo Pereira CAVALCANTE⁷; Amilcar MACHULEK Junior⁸; Silvio César de OLIVEIRA⁸

¹Doutoranda, Instituto de Química da UFMS, Campo Grande, MS rebecafabbro@hotmail.com

²Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, São Paulo, SP

³Instituto de Pesca, Laboratório de Ecotoxicologia – APTA - São Paulo, SP pedrosos@pesca.sp.gov.br

⁴Bolsista PIBIC, Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP

⁵Pós-graduanda, Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP

⁶Assistente técnica de laboratório e Pós-graduanda do Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP

⁷Pós-doutoranda, Instituto de Química da UFMS, Campo Grande, MS

⁸Instituto de Química da UFMS, Campo Grande, MS

Palavras-chave: ecotoxicidade aguda e crônica; β -bloqueador; zebrafish; CL₅₀ e CE₅₀

INTRODUÇÃO

O uso intensivo de fármacos provoca alto impacto ao meio ambiente devido sua alta toxicidade (FATTA-KASSINOS *et al.*, 2011). Uma das principais classes de fármacos que são identificados como contaminantes emergentes são a classe dos β -bloqueadores. Dentre estes, o Metoprolol (MET) é um dos mais utilizados no tratamento de várias doenças do sistema cardiovascular (CAVALCANTE *et al.*, 2015).

O teste “FET” (*Fish Embryo Acute Toxicity*) baseia-se na exposição de ovos recém fertilizados de *Danio rerio* por 96 horas para verificar o efeito letal e subletal de diferentes compostos. O objetivo do presente trabalho foi determinar esses efeitos do MET em embriões do peixe *Danio rerio* com 1 hora após a fertilização (OECD, 2013).

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Centro de Recursos Hídricos no laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Instituto de Pesca seguindo-se as normas da OECD (2013). Os embriões foram obtidos através de duas desovas de reprodutores, com base nos protocolos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2007) e também da Plataforma Zebrafish do Instituto Butantan (Dra Monica LOPES-FERREIRA, *com. pessoal*).

A partir da solução estoque de 100 mg L⁻¹ de MET foram preparadas as concentrações nominais de 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg L⁻¹ de MET em água de abastecimento e Meio E2, (ZIRC, 2013). O monitoramento das concentrações de MET no teste foi realizado com cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (CLAE-DAD, Thermo Scientific), coluna de fase reversa C18, com fase móvel acetonitrila:água acidificada

com H₃PO₄ até pH=3 na proporção de 35:65, respectivamente, fluxo de 0,7 mL min⁻¹. Nestas condições, foi construída uma curva de calibração na faixa de 0,2-40 mg L⁻¹: Área (μAU) = 332599[MET] - 48589, R = 0,9999. As medidas de concentração do MET foram realizadas no laboratório de pesquisa de Fotoquímica e Eletroquímica Aplicada do Instituto de Química, localizado na UFMS.

Tabela 1. Concentrações da solução de MET utilizadas no experimento.

	Concentração de Metoprolol (mg L ⁻¹)					
Nominais	100	50	25	12,5	6,25	3,12
Experimental	83,83	44,91	22,37	11,51	6,75	2,49

Experimental = Resultado obtido por CLAE.

Foram 15 replicatas por concentração de MET em placas de cultivo celular com 24 poços, sendo 1 ovo para cada 2 mL de solução. Ao término desse processo todas foram armazenadas em incubadora, na temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12h claro: 12h escuro. Durante as leituras, feitas em 48 e 96h, os parâmetros observados foram: a mortalidade, verificada através da presença de ovo coagulado, cauda não separada e ausência de batimento cardíaco; e os parâmetros subletais, como deformações da cabeça e da cauda, edemas no coração e saco vitelínico, escoliose, eclosão, pouca pigmentação, natação lenta e errática, e tombamento, os quais foram quantificados. No controle também foram avaliados a porcentagem de sobrevivência e eclosão. As determinações dos valores das CL₅₀ (concentração letal em 50% dos indivíduos do teste) e CE₅₀ (concentração que causa efeito em 50% dos indivíduos do teste) nos tempos de 48 e 96h foram feitas utilizando-se o programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios agudos com MET em água de abastecimento e meio E2 não foram observados efeitos letais em nenhuma das concentrações testadas. Os valores das CL₅₀ 96h em meio E2 e em água, foram maiores que 44,91 mg L⁻¹ e que 83,83 mg L⁻¹, respectivamente.

Segundo a OECD (2013), um dos parâmetros considerados para a aceitabilidade do ensaio é a sobrevivência no controle com água de diluição que deverá ser ≥ 90%. Em ambos os controles obteve-se 100% de sobrevivência em 96 h. No controle e em todas as concentrações testadas a porcentagem de eclosão foi ≥ 93% após 96h de exposição. O único parâmetro subletal que resultou em efeito observado, a partir do tratamento de 21,26 mg L⁻¹ de metoprolol foi a natação lenta e errática e pode ser considerado o mais sensível para esta substância. Os resultados das CE₅₀ 96h são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados das CE₅₀ 96h após exposição dos embriões com 1 hpf (horas após a fertilização) ao MET (mg L⁻¹) em água de torneira e em meio E2.

Água de diluição	CE ₅₀ 96h (mg L ⁻¹)	Intervalo de confiança
Água de torneira	29,05	(21,26 - 39,67)
Meio E2	31,97	(29,94 - 34,15)

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos de CL₅₀ e CE₅₀ neste trabalho, pode-se observar que o MET não apresenta toxicidade aguda nas condições analisadas, mas apresenta toxicidade crônica a partir de concentrações medianas de 21,26 mg L⁻¹. Portanto, nestas concentrações, o fármaco pode apresentar efeitos nocivos em embrião de *Danio rerio*, sendo um indicativo de preocupação ambiental o descarte de águas contendo este composto.

REFERÊNCIAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2007 *Ecotoxicologia Aquática - Ecotoxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes*. ABNT, NBR 15499.
- CAVALCANTE, R.P.; DANTAS, R.F.; WENDER, H.; BAYARRI, B.; GONZALEZ, O.; GIMENEZ, J.; ESPLUGAS, S.; MACHULEK, A.J. 2015 Photocatalytic treatment of metoprolol with B-doped TiO₂: Effect of water matrix, toxicological evaluation and identification of intermediates. *Applied Catalysis B: Environmental*, 176-177: 173-182.
- FATTA-KASSINOS, D.; VASQUEZ, M.I.; KÜMMERER, K. 2011 Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere*, 85: 693-709.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. 1977 Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11(7): 714-719.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. 2013 - *Guidelines for the testing of chemicals - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*.
- ZIRC - Zebrafish International Resource Center. 2013 E2 Embryo Media with Methylene Blue. Disponível em: <https://zebrafish.org/documents/protocols/pdf/Fish_Nursery/E2_solution>. Acesso em: janeiro de 2017.