

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Renata Alice Campos

**Eco-Cito-Genotoxicidade de misturas dos fármacos metformina, valsartana e
atenolol.**

Juiz de Fora

2025

Renata Alice Campos

Eco-Cito-Genotoxicidade de misturas dos fármacos metformina, valsartana e atenolol.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini

Coorientador: Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Campos, Renata Alice.

Eco-Cito-Genotoxicidade de misturas dos fármacos metformina, valsartana e atenolol / Renata Alice Campos. -- 2025.

103 p. : il.

Orientador: Lyderson Facio Viccini

Coorientador: José Marcello Salabert de Campos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2025.

1. contaminantes emergentes. 2. PhACs. 3. citogenotoxicidade. 4. risco ecotoxicológico. I. Facio Viccini, Lyderson, orient. II. Salabert de Campos, José Marcello, coorient. III. Título.

Renata Alice Campos

Eco-Cito-Genotoxicidade de misturas dos fármacos metformina, valsartana e atenolol

Dissertação apresentada Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
da Universidade Federal
de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas. Área de
concentração: Genética e Biotecnologia.

Aprovada em 07 de agosto de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof(a) Dr(a) Michele Munk Pereira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof(a) Dr(a) Tatiana da Silva Souza
Universidade Federal do Espírito Santo



Documento assinado eletronicamente por **Renata Alice Campos, Usuário Externo**, em 12/08/2025, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tatiana DA SILVA SOUZA, Usuário Externo**, em 12/08/2025, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Marcello Salabert de Campos, Professor(a)**, em 17/08/2025, às 13:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Servidor(a)**, em 26/08/2025, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lyderson Facio Viccini, Professor(a)**, em 26/08/2025, às 14:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2548120** e o código CRC **DFDF3A5A**.

*À minha família, que me ensinou o significado e o valor da vida
muito antes da biologia.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, pelo amor, apoio e paciência em todos os momentos. Vocês me ensinaram o valor da persistência e foram meu alicerce ao longo dessa jornada. Agradeço por cada momento com vocês. Mãe, você é e sempre será minha maior inspiração. Sua coragem, ternura e fé me guiaram mesmo nos dias em que eu mesma duvidei. Obrigada por me ensinar com o exemplo e estar presente em cada passo meu.

À minha avó, Darcy Riani, que partiu no final desta caminhada, deixo meu carinho eterno. Obrigada por tantas lembranças boas, que seguem vivas e irão me acompanhar com afeto e saudade.

À minha companheira de vida, Bárbara, se existe alguém que pode resgatar minha fé no mundo é você. Obrigada por ser minha maior incentivadora, todos os dias, durante 730 dias, você foi essencial neste período.

Aos meus orientadores, Prof. Lyderson e Prof. José Marcello pela oportunidade concedida, pela confiança, incentivo, conversas e discussões científicas. Prof. José Marcello agradeço pela orientação desde os primeiros passos, na iniciação científica até a finalização desta dissertação. Sua dedicação e ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos colegas do laboratório de Genética, Elyabe por toda ajuda durante esses anos, Juliana M. pela ajuda nos experimentos, e aos demais pela parceria, conversas e trocas.

À Universidade Federal de Juiz de Fora e às agências de fomento, CAPES e FAPEMIG por terem possibilitado a realização deste projeto.

RESUMO

Compostos farmacêuticos ativos (PhACs) são considerados contaminantes emergentes, para os quais ainda são necessárias regulamentações e uma maior compreensão de seus efeitos no meio ambiente. Devido ao uso excessivo, grande produção e emissão contínua, são recorrentes os relatos desses contaminantes em ambientes aquáticos. Este estudo teve como objetivo investigar os impactos ecotoxicológicos e citogenotóxicos da exposição a misturas de três fármacos amplamente consumidos: metformina, valsartana e atenolol. Para determinar as concentrações dos fármacos investigados, utilizamos o banco de dados PHARMS-UBA (2024), que compila registros globais da presença de PhACs no ambiente. Os tratamentos foram preparados com as misturas das maiores concentrações dos fármacos, seguidas por diluições subsequentes, até alcançarmos as menores concentrações registradas (PHARMS-UBA, 2024). No total, foram obtidos 16 tratamentos. As análises de ciclo celular, conduzidas por meio do crescimento radicular em *Lactuca sativa* e citometria de fluxo em modelos vegetais (*L. sativa* e *Allium cepa*), revelaram um padrão bifásico de resposta, típico da hormese. Os tratamentos T5, T6 e T7 estimularam a divisão celular, evidenciada pelo aumento do crescimento radicular em *Lactuca sativa* e pelo aumento do percentual de núcleos em G2/M observado na citometria de fluxo em *L. sativa* e *Allium cepa*. Em contraste, os tratamentos mais concentrados (T14, T15 e T16) inibiram o crescimento radicular de *L. sativa* em cerca de 30%. Já pela citometria, a partir do tratamento T12 (T12-T16) foram observados efeitos inibitórios, com alterações significativas em fases do ciclo celular, como a redução das populações em G1 e G2/M. Adicionalmente, observou-se alterações nos marcadores associados a indução de efeitos adversos e morte celular, como aumento no percentual de sub-G1, redução do tamanho (FSC) e da complexidade nuclear (SSC). Além dos ensaios realizados com *Lactuca sativa*, a ecotoxicidade foi também avaliada por meio do teste agudo de imobilização com *Daphnia magna*. Nesse ensaio, o T11 foi identificado como correspondente à CE₅₀, imobilizando 50% dos organismos, nas concentrações de 31,26 µg/L (metformina), 11,57 µg/L (valsartana) e 36,84 µg/L (atenolol). Já os tratamentos mais concentrados (T15 e T16) resultaram em imobilização total dos organismos. A citogenotoxicidade foi ainda avaliada em *Allium cepa* por meio de análise citogenética, ensaio cometa, eletroforese de DNA e TUNEL. A análise citogenética revelou redução progressiva no índice mitótico à medida que aumentavam as concentrações dos fármacos. As alterações cromossômicas identificadas apresentaram um perfil majoritariamente aneugênico, relacionado a disfunções no fuso mitótico. Esse padrão foi corroborado pelo ensaio cometa, que não indicou danos significativos para os tratamentos

avaliados, sugerindo a ausência de quebras no DNA. Nos tratamentos mais concentrados (T14 a T16), a citometria de fluxo e análise citogenética apontaram marcadores consistentes com a indução de morte celular. Esse efeito foi confirmado pela eletroforese de DNA, que revelou um padrão típico de DNA *laddering*, característico de morte celular programada, bem como pela marcação positiva no ensaio TUNEL. Desse modo, a exposição à mistura de PhACs pode afetar diferentes organismos não-alvo, causando danos eco-cito-genotóxicos, evidenciando o risco relacionado à presença destes contaminantes nos ambientes.

Palavras-chave: PhACs; contaminantes emergentes; danos ao DNA; risco ecotoxicológico; citogenotoxicidade.

ABSTRACT

Pharmaceutical active compounds (PhACs) are currently classified as emerging contaminants, for which regulatory frameworks and a better understanding of their environmental impacts are still lacking. Due to their widespread use, high production, and continuous emission, these substances are frequently reported in aquatic environments. This study aimed to investigate the ecotoxicological and cytogenotoxic effects of exposure to mixtures of three widely used pharmaceuticals: metformin, valsartan, and atenolol. The concentrations applied were selected based on the PHARMS-UBA (2024) database, which compiles global records of PhAC occurrence in the environment. Treatments were prepared using the highest concentrations reported worldwide, followed by successive dilutions down to the lowest detected levels, resulting in 16 treatment groups. Cell cycle analyses were conducted through root growth assessment in *Lactuca sativa* and flow cytometry in both *L. sativa* and *Allium cepa*, revealing a biphasic response pattern consistent with hormesis. Treatments T5, T6, and T7 stimulated cell division, evidenced by enhanced root growth in *L. sativa* and increased percentages of nuclei in G2/M phase observed via flow cytometry in both plant models. In contrast, higher concentration treatments (T14, T15, and T16) inhibited root growth in *L. sativa* by approximately 30%. From treatment T12 onwards (T12-T16), flow cytometry revealed inhibitory effects, with significant alterations in cell cycle phases, particularly reduced proportions of cells in G1 and G2/M. Additionally, changes were observed in markers associated with adverse effects and cell death, such as increased sub-G1 population and decreased cell size (FSC) and nuclear complexity (SSC). Beyond the plant assays, ecotoxicity was also assessed through the acute immobilization test with *Daphnia magna*. In this assay, treatment T11 corresponded to the EC₅₀, immobilizing 50% of the organisms at concentrations of 31.26 µg/L (metformin), 11.57 µg/L (valsartan), and 36.84 µg/L (atenolol). The most concentrated treatments (T15 and T16) resulted in complete immobilization, indicating high toxicity of the mixtures at elevated doses. Cytogenotoxicity was further evaluated in *A. cepa* using cytogenetic analysis, comet assay, DNA electrophoresis, and the TUNEL assay. The cytogenetic analysis revealed a progressive decrease in mitotic index with increasing concentrations, highlighting the cytotoxic potential of the mixtures. Chromosomal alterations were predominantly aneugenic, suggesting mitotic spindle dysfunction. This pattern was supported by the comet assay, which showed no significant DNA strand breaks, indicating the absence of clastogenic damage. In the most concentrated treatments (T14 to T16), both flow cytometry and cytogenetic data indicated markers consistent with cell death, confirmed by the

appearance of DNA laddering in electrophoresis and positive labeling in the TUNEL assay. These findings demonstrate that exposure to PhAC mixtures can adversely affect non-target organisms, causing eco-cyto-genotoxic damage and highlighting the environmental risks associated with the presence of these contaminants.

Keywords: PhACs; emerging contaminants; DNA damage; ecotoxicological risk; cytogenotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Distribuição das quantificações dos fármacos descritos no banco de dados PHARMS-UBA.....	25
Figura 2	– Fontes de liberação de componentes farmacêuticos no ambiente aquático. Algumas das diferentes rotas responsáveis pela ocorrência de fármacos em águas residuais, superficiais e água potável.....	27
Figura 3	– Resumo gráfico do planejamento e estratégias experimentais empregadas no projeto.....	38
Figura 4	– Placas de petri contendo sementes de <i>L. sativa</i> expostas por 96h às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.....	40
Figura 5	– Taxa de germinação (%) de sementes de <i>Lactuca sativa</i> após 96h de exposição às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.....	49
Figura 6	– Tratamentos selecionados para experimentos subsequentes, com base nos efeitos observados em <i>Lactuca sativa</i>	53
Figura 7	– Distribuição do Índice Mitótico (IM) nos diferentes tratamentos avaliados.....	54
Figura 8	– Percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes misturas de metformina, atenolol e valsartana.....	55
Figura 9	– Imagens representativas de alterações citogenéticas em <i>Allium cepa</i> comumente observadas nos tratamentos T11, T12 e T13.....	57
Figura 10	– Imagens representativas de alterações citogenéticas em <i>Allium cepa</i> observadas nos tratamentos T15 e T16.....	58
Figura 11	– Percentual de cada tipo de alteração cromossômica observado em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> após 48h de exposição às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.....	59

Figura 12 – Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> após exposição às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.....	61
Figura 13 – Porcentagem de DNA na cauda de nucleoides obtidos de células de <i>Allium cepa</i> expostas às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.....	62
Figura 14 – Imagens representativas de nucleoides obtidos por ensaio cometa em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	63
Figura 15 – Eletroforese demonstrando a ocorrência de <i>DNA-laddering</i> em meristemas radiculares de <i>A. cepa</i> após exposição às misturas dos fármacos metformina, valsartana e atenolol.....	64
Figura 16 – Percentual médio de imobilização de <i>Daphnia magna</i> nos diferentes tratamentos avaliados, após a exposição a misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.....	67
Quadro 1 – Produtos farmacêuticos encontrados em corpos d'água de diferentes localidades.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Variação percentual na taxa de germinação e no crescimento radicular de <i>Lactuca sativa</i> após exposição a misturas dos fármacos, em comparação ao controle negativo.....	50
Tabela 2	– Variáveis analisadas por citometria de fluxo em folhas de <i>Lactuca sativa</i> após 192h de exposição às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.....	52
Tabela 3	– Variáveis analisadas por citometria de fluxo em meristemas radiculares de <i>Allium cepa</i> após 48h de exposição às misturas dos fármacos metformina, valsartana e atenolol.....	60
Tabela 4	– Células meristemáticas de <i>A. cepa</i> TUNEL-positivas após exposição às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.....	65
Tabela 5	– Imobilização em <i>D. magna</i> após exposição à tratamentos com misturas dos fármacos metformina, valsartana e atenolol.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Alterações Cromossômicas
AL-PCD	Morte Celular Programada Semelhante a Apoptose (do inglês, <i>Apoptotic-like Programmed Cell Death</i>)
ANOVA	Análise de Variância
CAT	Catalase
CE	Concentração Efetiva
cm	Centímetros
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
CTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
CV	Coefficiente de Variação
DP	Desvio padrão
ECs	Contaminantes Emergentes (do inglês, <i>Emerging Contaminants</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FSC	Tamanho Relativo dos Núcleos em G1
G2/M	Fase do ciclo celular G2/Mitose
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa
g	Gramas
GPx	Glutathione Peroxidase
h	Horas
HCL	Ácido Clorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IFa	Intensidade Média de Fluorescência dos Núcleos em G1
IM	Índice Mitótico
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligramas
min	Minutos

MCP	Morte Celular Programada
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMS	Metilmetanosulfonato
MN	Micronúcleos
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
NOEC	Concentração de Efeito Não Observado (do inglês, <i>No Observed Effect Concentration</i>)
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês, <i>Organization for economic co-operation and development</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato (do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCPs	Produtos de Cuidado Pessoal
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PhACs	Compostos Farmacêuticos Ativos
PHARMS -UBA	Banco de dados - Fármacos no Meio Ambiente da Agência Ambiental Alemã (do inglês, <i>Pharmaceuticals in the Environment of the German Environment Agency - Umweltbundesamt</i>)
p	p-value
pH	Potencial de Hidrogênio
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Rotação por Minuto
SOD	Superóxido Dismutase
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
SSC	Complexidade (granulosidade e/ou densidade nuclear/celular) de núcleos em G1
TBE	Tampão de Eletroforese Tris-Borato-EDTA
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
V	Volts
v/v	Volume por Volume
WPB	Tampão de Extração Celular (do inglês, <i>Woody Plant Buffer</i>)

ΔC	Variação percentual no Crescimento Radicular
ΔG	Variação percentual na Germinação
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μm	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
μ	Micro
n	Nano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	CONTAMINANTES EMERGENTES.....	17
2.2	COMPOSTOS FARMACÊUTICOS ATIVOS.....	19
2.2.1	Biomonitoramento e ensaios biológicos na eco-cito-genotoxicologia.....	28
2.2.2	Metformina, Valsartana e Atenolol.....	33
3	OBJETIVO GERAL.....	36
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	37
4.2	COMPOSTOS TESTADOS E CONCENTRAÇÕES INVESTIGADAS.....	39
4.3	ENSAIO DE ECOTOXICIDADE EM <i>Lactuca sativa</i>	39
4.3.1	Avaliação de fitotoxicidade.....	39
4.3.2	Avaliação de citogenotoxicidade por citometria de fluxo.....	41
4.4	ENSAIO DE CITOGENOTOXICIDADE EM <i>Allium cepa</i>	41
4.4.1	Análise citogenética.....	42
4.4.2	Citometria de fluxo.....	43
4.4.3	Ensaio cometa.....	44
4.4.4	Eletroforese de DNA.....	45
4.4.5	TUNEL.....	46
4.5	ENSAIO DE ECOTOXICIDADE EM <i>Daphnia magna</i>	47
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5	RESULTADOS.....	49
5.1	ENSAIO DE ECOTOXICIDADE EM <i>Lactuca sativa</i>	49
5.1.1	Ensaio de germinação e crescimento radicular em <i>L. sativa</i>	49
5.1.2	Análise do ciclo celular por citometria de fluxo em <i>L. sativa</i>	51
5.2	ENSAIOS EM <i>Allium cepa</i>	54
5.2.1	Análise de citogenotoxicidade por citogenética em <i>A. cepa</i>	54
5.2.2	Análise de citogenotoxicidade por citometria de fluxo em <i>A. cepa</i>	59
5.2.3	Análise de genotoxicidade pelo ensaio cometa em <i>A. cepa</i>	62
5.2.4	Análise de fragmentação do DNA por eletroforese.....	63

5.2.5	TUNEL.....	64
5.3	ENSAIO DE ECOTOXICIDADE EM <i>Daphnia magna</i>.....	65
6	DISCUSSÃO.....	67
7	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE A – Material Suplementar.....	96

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, uma ampla variedade de substâncias sintéticas e naturais tem sido continuamente liberadas no ambiente, intensificando a problemática global relacionada à contaminação dos recursos hídricos. Dentre esses compostos, destacam-se os chamados contaminantes emergentes (ECs, do inglês “*Emerging Contaminants*”). Os ECs constituem um grupo de substâncias químicas, naturais ou sintéticas, recentemente reconhecidos e por essa razão, ainda são pouco estudados, monitorados e regulamentados (Hou et al., 2024; Naidu et al., 2016; Sultan; Anik; Rahman, 2024; Taheran et al., 2018).

Os contaminantes emergentes têm despertado crescente interesse da comunidade científica em virtude do seu potencial em causar impactos negativos à integridade dos ecossistemas e à saúde humana (Chowdhury; Mandal; Mondal, 2020; Kasonga et al., 2021; Koch et al., 2021; Lu et al., 2024; Xu et al., 2015; Yao et al., 2024). Evidências recentes demonstram que tais compostos podem provocar efeitos biológicos relevantes mesmo quando presentes em concentrações extremamente baixas (da ordem de $\mu\text{g/L}$ a ng/L) (Afsa et al., 2020; Prichard; Granek, 2016). Grande parte dos ECs são considerados onipresentes, sendo detectados em diferentes matrizes ambientais, incluindo águas superficiais, águas residuais, sedimentos, solos e até mesmo em água potável (Rodriguez-Narvaez et al., 2017; Sudarsan et al., 2024; Wang et al., 2024). Segundo o SNIS (Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento) (2022), 81,6% do esgoto coletado no Brasil é tratado. No entanto, considerando todo o esgoto gerado (incluindo o não coletado), apenas 52,2% recebem tratamento. Esse dado evidencia que uma parcela significativa das águas residuais produzidas no país ainda é lançada no meio ambiente sem qualquer tipo de tratamento, contribuindo para a contínua liberação de poluentes nos corpos hídricos. Além disso, mesmo quando tratadas, os métodos convencionais empregados nas ETEs (Estação de Tratamento de Esgoto) não são plenamente eficazes na remoção de determinados poluentes já regulamentados, e tampouco de substâncias recentemente identificadas como os contaminantes emergentes (Saidulu et al., 2021).

Os compostos farmacêuticos ativos (PhACs, do inglês “*Pharmaceutical Active Compounds*”) integram a ampla categoria dos contaminantes emergentes (Neha et al., 2021). Historicamente, a indústria farmacêutica exerceu papel central na prevenção e tratamento de doenças, contribuindo significativamente para o avanço socioeconômico e o aumento da

expectativa de vida (González-González et al., 2022). No entanto, o desenvolvimento acelerado desse setor, o uso excessivo e, muitas vezes, indiscriminado de medicamentos por parte da população, atrelados ao descarte inadequado e a dificuldade de remoção destes compostos em corpos d'água, tem resultado na liberação contínua e no acúmulo de PhACs potencialmente perigosos nos ecossistemas aquáticos (Sonal et al., 2024).

A literatura científica apresenta uma ampla quantidade de estudos voltados à detecção e quantificação de fármacos no ambiente (PHARMS-UBA database, 2025), porém, ainda são escassas as investigações que se aprofundam nos impactos ecotoxicológicos associados à presença desses contaminantes. Apesar da abundância de dados analíticos, observa-se uma carência de informações sobre os efeitos adversos desses compostos em organismos não alvo, bem como às possíveis implicações ecossistêmicas decorrentes dessa exposição.

Quadra et al. (2021) investigaram a presença de micropoluentes no Rio Paraibuna, em Juiz de Fora – MG, detectando nove substâncias em concentrações entre 11 e 4471 ng/L. Entre as maiores concentrações relatadas, destacaram-se três fármacos: metformina, valsartana e atenolol, que foram selecionados para investigação no presente estudo. Dessa forma, o trabalho de Quadra et al. (2021) foi fundamental para o planejamento e execução desta pesquisa. Além de terem sido identificados em águas superficiais de Juiz de Fora, esses compostos já foram reportados em diferentes matrizes ambientais em diversas regiões do mundo (PHARMS-UBA, 2025). A valsartana e o atenolol são amplamente utilizados no tratamento da hipertensão, enquanto a metformina é prescrita para o controle do diabetes, doenças crônicas de alta prevalência global (OMS, 2023). Apesar do elevado consumo mundial, dados sistemáticos de monitoramento ambiental estes PhACs no meio ambiente ainda são limitados.

Esse cenário contraria os princípios estabelecidos pela Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, sobretudo no que tange à preservação dos corpos hídricos e à proteção ambiental (ONU, 2015). A complexidade do problema se intensifica diante do fato de que, no ambiente, os contaminantes raramente ocorrem de forma isolada. Ainda são poucos os estudos que consideram a avaliação de misturas de micropoluentes, apesar de essa ser a forma mais comum de exposição na natureza (Cleuvers, 2003). A exposição simultânea a múltiplos micropoluentes pode alterar significativamente sua toxicocinética, potencializando ou atenuando os efeitos tóxicos observados em condições experimentais com compostos isolados (Karbalaei et al., 2021). Investigações que considerem essas interações tornam-se, portanto,

fundamentais para fornecer uma visão mais realista e abrangente sobre os riscos ambientais associados à poluentes, como os PhACs.

Diante disso, o presente estudo dialoga com os princípios estabelecidos pela Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, composta por 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), que integram as dimensões ambiental, social e econômica. Contribuindo para o cumprimento de metas como: ODS 6 (Água limpa e saneamento), ODS 12 (Produção e consumo responsáveis), ODS 14 (Vida na água) e ODS 15 (Vida terrestre). Os resultados obtidos podem subsidiar estratégias voltadas ao aprimoramento do monitoramento ambiental, à promoção do uso responsável de medicamentos e à conservação dos ecossistemas aquáticos e terrestres. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos eco-cito-genotóxicos de misturas de fármacos de alta recorrência ambiental, como metformina, valsartana e atenolol sobre organismos não alvo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

A contaminação dos recursos hídricos constitui um dos mais relevantes desafios ambientais em escala global (Fuller et al., 2022). As atividades antrópicas desempenham um papel central nesse contexto, sendo responsáveis por grande parte dos impactos negativos, incluindo a poluição e degradação de diversos ecossistemas (Bashir et al., 2020). Tal contaminação compromete de maneira significativa a saúde humana, a biodiversidade vegetal e animal, além de desequilibrar ecossistemas aquáticos.

A água é um recurso essencial para a manutenção da vida em todas as suas formas. No entanto, sua disponibilidade é limitada, uma vez que apenas cerca de 3% da água presente na superfície terrestre corresponde a água doce (Nasrollahi; Vatanpour; Khataee, 2022). Nesse contexto, esse recurso tem se tornado progressivamente mais valorizado em razão da crise global de escassez hídrica, intensificada pelas mudanças climáticas, pelo crescimento populacional e pelo consequente aumento da contaminação dos corpos d'água (Kathi; El Din Mahmoud, 2024). Fatores que comprometem de maneira significativa a disponibilidade de água com qualidade adequada, afetando tanto os ecossistemas como as atividades humanas (Kurniawan et al., 2024; Shehu et al., 2022). Dessa forma, assegurar o fornecimento de água potável e segura, especialmente em países em desenvolvimento, constitui um desafio e uma necessidade premente (Levin et al., 2024).

Nas últimas décadas, uma ampla quantidade de substâncias, tanto sintéticas quanto naturais, têm sido liberadas no meio ambiente, contribuindo para a contaminação e causando impactos significativos nos corpos d'água (Noguera-Oviedo; Aga, 2016). Essas substâncias, denominadas contaminantes emergentes, distinguem-se por sua alta persistência, baixa taxa de degradação e potencial para gerar efeitos adversos. Embora muitos desses compostos não sejam recentes no mercado, sua relevância tem aumentado nas últimas décadas em função do impacto crescente em diferentes ecossistemas, consolidando-se como uma preocupação ambiental emergente (Wang et al., 2024). Historicamente, a concepção de Contaminantes Emergentes remonta à Revolução Industrial, um período marcado pela introdução em larga escala de diversas substâncias no meio ambiente, incluindo metais pesados, compostos inorgânicos,

poluentes orgânicos persistentes (POPs), partículas poluentes e outros (Li et al., 2024; Richardson; Kimura, 2017). Durante o século XX em diante, com o crescimento exponencial da população e consequente aumento da demanda, a produção e a liberação de novos produtos químicos sintéticos se intensificaram ainda mais (Wang et al., 2024). No entanto, embora presentes no ambiente há vários anos, somente no final do século XX a conscientização e o entendimento sobre os ECs evoluíram de maneira significativa. Esse progresso foi impulsionado pelos avanços nas técnicas analíticas, que permitiram a detecção de concentrações menores de novos produtos químicos (Ramírez-Malule; Quiñones-Murillo; Manotas-Duque, 2020). Anteriormente, o foco principal estava nos poluentes convencionais, como os POPs e metais pesados. No entanto, esses compostos tornaram-se menos relevantes para países industrializados, em função da sua substituição por outras substâncias e da adoção de medidas adequadas que visam reduzir significativamente as emissões (Petrovic, 2003).

No início do século XXI, a percepção sobre os contaminantes emergentes (ECs) mudou de forma significativa. Esse avanço foi impulsionado pelo progresso científico e pelo desenvolvimento de novas ferramentas analíticas. Entre elas, destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e a cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS). Essas técnicas possibilitaram a detecção e quantificação precisa de contaminantes específicos em amostras complexas, como águas superficiais e residuais (Agüera; Bueno; Fernández-Alba, 2013). Desse modo, atualmente, os contaminantes emergentes são definidos como compostos potencialmente perigosos que, apesar de sua persistência no meio ambiente, ainda não são amplamente estudados e monitorados, carecendo de maior atenção, quanto a sua toxicidade, e de regulamentações mais específicas, quanto à presença no ambiente (Hou et al., 2024; Sultan; Anik; Rahman, 2024). Este grupo inclui substâncias amplamente utilizadas no dia a dia, como medicamentos humanos e veterinários, produtos de cuidado pessoal (PCPs), drogas de abuso, surfactantes e seus resíduos, plastificantes, aditivos industriais, nanomateriais etc. Alguns países desenvolvidos como França, Alemanha e Suíça começaram a criar estratégias para gerenciar a poluição de ECs, enquanto países em desenvolvimento continuam sem normas regulatórias definidas (Gogoi et al., 2018; Puri; Gandhi; Kumar, 2023).

Os contaminantes emergentes são substâncias com potencial para causar efeitos adversos tanto aos ecossistemas como à saúde humana (Naidu et al., 2016; Taheran et al., 2018).

Estudos recentes demonstram que esses poluentes podem impactar organismos vivos mesmo em concentrações extremamente baixas, na ordem de $\mu\text{g/L}$ a ng/L (Afsa et al., 2020; Prichard; Granek, 2016). Em virtude desses impactos, os ECs têm atraído a atenção da comunidade científica, especialmente devido às suas propriedades tóxicas, como toxicidade aquática, citotoxicidade, genotoxicidade, indução de distúrbios endócrinos em organismos não-alvo e promoção da seleção de bactérias resistentes (Chowdhury; Mandal; Mondal, 2020; Kasonga et al., 2021; Koch et al., 2021; Lu et al., 2024; Xu et al., 2015; Yao et al., 2024). Esses compostos são reconhecidos como onipresentes, sendo encontrados em diversos compartimentos ambientais, como águas superficiais (rios e lagos), águas residuais – incluindo esgotos brutos e tratados –, sedimentos, solos e até mesmo na água potável (Rodriguez-Narvaez et al., 2017; Sudarsan et al., 2024; Wang et al., 2024). Além disso, sua detecção em matrizes ambientais é particularmente desafiadora devido às baixas concentrações em que ocorrem e à complexidade das amostras. Embora avanços tecnológicos tenham permitido identificar e quantificar muitos desses compostos, ainda existem lacunas significativas no entendimento de seus efeitos cumulativos e interativos, bem como na padronização de métodos analíticos para seu monitoramento (Bolong et al., 2009; Petrie et al., 2015).

2.2 COMPOSTOS FARMACÊUTICOS ATIVOS

Os compostos farmacêuticos ativos (PhACs) fazem parte da ampla lista de poluentes emergentes. Este tipo de composto, que apresenta potenciais produtos bioquímicos ativos, tem se mostrado de grande interesse na ciência ambiental, uma vez que são continuamente liberados em diferentes matrizes ambientais (Neha et al., 2021). No entanto, de todos os ecossistemas potencialmente impactados, os corpos d'água são os compartimentos ambientais mais afetados (Sadutto; Picó, 2020). A ocorrência de diversas classes de PhACs, incluindo anti-inflamatórios, analgésicos, reguladores de lipídios, antidepressivos, antiepilépticos, antimicrobianos, entre outros, tem sido amplamente documentada em corpos d'água ao redor do mundo (De Carvalho et al., 2024; Hernández-Tenorio et al., 2024; Klanovicz; Pinto, 2024; Mompelat; Le Bot; Thomas, 2009). Exemplos de estudos disponíveis na literatura comprovam a presença de PhACs nestes ambientes (Quadro 1).

Quadro 1 - Produtos farmacêuticos encontrados em corpos d'água de diferentes localidades.

Localidade	Substância	Concentração (ng/L ⁻¹)	Referência
Rio Brahmaputra (Bangladesh)	Metronidazol	13,51 ^a	Hossain et al. (2018)
	Trimetoprima	17,20 ^a	
	Sulfametoxazol	7,24 ^a	
	Sulfadiazina	0,58 ^a	
	Sulfametazina	4,19 ^a	
	Sulfametizol	11,35 ^a	
	Eritromicina	6,46 ^a	
	Tilosina	16,68 ^a	
	Carbamazepina	8,80 ^a	
Rio Tejo (Espanha)	Valsartana	1147 ± 1428 ^b	Royano et al. (2023)
	Irbesartana	404 ± 452 ^b	
	O-desmetilvenlafaxina	593 ± 663 ^b	
	Venlafaxina	168 ± 190 ^b	
	Fluconazol	530 ± 1345 ^b	
	Gemfibrozila	228 ± 285 ^b	
	Paracetamol	56 ± 180 ^b	
	Ibuprofeno	150 ± 300 ^b	
	Cetoprofeno	67 ± 136 ^b	
	Naproxeno	80 ± 102 ^b	
	Carbamazepina	65 ± 62 ^b	
	Sulfametoxazol	101 ± 162 ^b	
	Trimetoprima	44 ± 58 ^b	
	Atenolol	244 ± 422 ^b	
	Metoprolol	25 ± 30 ^b	
	Tiabendazol	17 ± 21 ^b	
Rio Sava (Eslovênia e Croácia)	Ibuprofeno	262 ^a	Česen et al. (2019)
	Naproxeno	20,4 ^a	
	Ketoprofeno	52,7 ^a	
	Diclofenaco	4,62 ^a	
	Carbamazepina	18,4 ^a	
Rio Paraopeba (Brasil)	Acetaminofeno	1699,9 ^a	De Barros et al. (2018)
	Bezafibrato	133,1 ^a	

(continua)

Localidade	Substância	Concentração (ng/L ⁻¹)	Referência
Rio Paraopeba (Brasil)	Diclofenaco	2625,7 ^a	De Barros et al. (2018)
	Diltiazem	170,8 ^a	
	Fluconazol	98,7 ^a	
	Linezolida	2,6 ^a	
	Miconazol	116,9 ^a	
	Ondansetrona	55,7 ^a	
	Trimetoprima	123,7 ^a	
Rios Burka, Naura, Themí e Kijenge (Tanzânia)	Amoxicilina	162 ^a	Kundu et al. (2024)
	Cafeína	520 ^a	
	Carbamazepina	8,8 ^a	
	Ciprofloxacino	411 ^a	
	Cetirizina	486 ^a	
	Doxiciclina	200 ^a	
	Ibuprofeno	184 ^a	
	Metronidazol	178 ^a	
	Paracetamol	160,6 ^a	
	Sulfametoxazol	6,2 ^a	
	Trimetoprima	16 ^a	
Rios afluentes - Baia de Jiaozhou (China)	Estrona	48,8 ^a	Lu et al. (2023)
	17β-Estradiol	14,1 ^a	
	Estriol	55,6 ^a	
	17α-Etinilestradiol	7,14 ^a	
	Dietilestilbestrol	8,44 ^a	
	Bisfenol A	304 ^a	
	Amoxicilina	1334 ^a	
	Cloranfenicol	7,25 ^a	
	Florfenicol	116 ^a	
	Eritromicina-H2O	4,02 ^a	
Rio Paraibuna (Brasil)	Acessulfame	921 ^a	Quadra et al. (2021)
	Atenolol	106 ^a	
	Cafeína	1763 ^a	
	Carbamazepina	26 ^a	
	Gabapentina	46 ^a	
	Hidroclorotiazida	79 ^a	
	Metformina	4471 ^a	
	Valsartana	110 ^a	
	Ácido da valsartana	13 ^a	

(conclusão)

Localidade	Substância	Concentração (ng/L ⁻¹)	Referência
Águas residuais - afluente e efluente de ETEs (Quênia)	Carbamazepina	350 ^a	K'oreje et al. (2016)
Rio Las Vegas Wash (Estados Unidos)	Atenolol	114 ^a	Sims et al. (2024)
	Metapropanol	884 ^a	
	Carbamazepina	216 ^a	
	Naproxeno	121 ^a	
	Diclofenaco	192 ^a	
		Concentração (µg/L ⁻¹)	
Rio Yamuna (Índia)	Aspirina	1,34 ^a	Mutiyyar et al. (2018)
	Ibuprofeno	2,30 ^a	
	Paracetamol	1,70 ^a	
	Ranitidina	0,43 ^a	
	Diclofenaco	1,70 ^a	
	Carbamazepina	1,35 ^a	
	Codeína	0,26 ^a	
	Diazepam	0,30 ^a	
Rio Ngong, Rio Auji, Rio Kisat (Quênia)	Lamivudina	167 ^a	K'oreje et al. (2016)
	Zidovudina	17 ^a	
	Nevirapina	6 ^a	
	Sulfametoxazol	39 ^a	
	Trimetoprima	7 ^a	
	Paracetamol	107 ^a	
	Ibuprofeno	17 ^a	
Águas residuais - afluente e efluente de ETEs (Quênia)	Paracetamol	160 ^a	K'oreje et al. (2016)
Água subterrânea (Quênia)	Nevirapina	1,6 ^a	

Notas: ^a valor máximo; ^b concentração média ± DP. Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Além dos exemplos citados aqui, muitos outros trabalhos podem ser encontrados no site “PHARMS-UBA”. A UBA (do alemão, *Umweltbundesamt*) é Agência de Proteção Ambiental da Alemanha. Este banco de dados possui 276.895 registros da presença e quantificação de fármacos no ambiente (no mundo todo), a partir de 2062 trabalhos publicados. No total, 992 diferentes fármacos foram detectados ao redor do mundo. O Brasil possui pouca participação, sendo apenas 4% dos trabalhos oriundos do nosso país.

Entre os estudos mencionados acima (Quadro 1) o trabalho de Quadra et al. (2021), tem particular importância no planejamento e execução do presente trabalho. Estes autores analisaram a presença de micropoluentes no Rio Paraibuna no município de Juiz de Fora-MG. Em amostras de água superficial, foram encontradas 9 substâncias variando entre 11 e 4471 ng/L. Os fármacos encontrados em maiores concentrações nestas amostras foram a metformina, a valsartana e o atenolol, que escolhemos para investigar neste trabalho.

Ao investigar as informações relativas aos fármacos metformina, valsartana e atenolol detectados por Quadra et al. (2021) em Juiz de Fora-MG, no banco de dados “PHARMS-UBA” (acesso em maio de 2025), encontramos o seguinte cenário descrito a seguir.

Foram 720 registros de quantificação para a metformina em diferentes matrizes ambientais, em trabalhos realizados nos EUA, Canadá, França, Portugal, Alemanha, Holanda, Bélgica, Suíça, Suécia, Grécia, Polônia, Áustria, Reino Unido, Eslovênia, Romênia, Sérvia, Croácia, Hungria, Malásia, Tailândia, Brasil, África do Sul, Vietnam, China, Arábia Saudita, Irã, Camarões, Egito, Japão, México e Moldova. A maior quantidade de metformina relatada foi de 250,10 µg/L em um trabalho realizado na Alemanha (Oertel; Baldauf; Rossmann, 2018). Este valor alto de metformina foi encontrado na entrada da Estação de Tratamento de Esgoto da cidade de Dresden (Alemanha). Curiosamente o único trabalho brasileiro citado para a metformina neste banco de dados também veio de investigações no estado de Minas Gerais, em Belo Horizonte (Reis et al., 2019). Seis diferentes Estações de Tratamento de Esgoto foram analisadas e a maior concentração de metformina relatada foi de 0,203 µg/L. Já Quadra et al. (2021) detectou a presença de 4,47 µg/L no rio Paraibuna em Juiz de Fora-MG.

Para o fármaco valsartana, foram 731 registros inseridos de quantificação no PHARMS-UBA. Os resultados são obtidos de análises também em diferentes matrizes ambientais, com trabalhos destinados de: Reino Unido, Alemanha, República Tcheca, Eslovênia, Hungria, Croácia, Sérvia, Romênia, Letônia, Moldova, Espanha, Polônia, Suécia, Holanda, Suíça,

Grécia, Portugal, China, EUA, México, Colômbia, Canadá, Brasil e África do Sul. A maior concentração de valsartana relatada foi em um trabalho realizado na Polônia (Styszko et al., 2021). Realizado na segunda maior cidade do país, Krakow, no Rio Drwina, foi observado 92,52 µg/L de valsartana. No Brasil, a valsartana já foi detectada em alguns locais, especificamente no estado de São Paulo. Roveri et al. (2020) avaliaram a presença e quantificaram a dosagem de diversas substâncias nas praias no Guarujá-SP. A valsartana foi detectada em concentrações variando entre 0,02 e 0,8 µg/L. Em outro trabalho, estes mesmos autores relataram no máximo 0,01 µg/L, também em Guarujá-SP (Roveri et al., 2021). Na Baía de Santos – SP foram detectados no máximo 0,08 µg/L de valsartana. Já, Quadra et al. (2021) relataram 0,110 µg/L de valsartana (Rio Paraibuna, Juiz de Fora-MG).

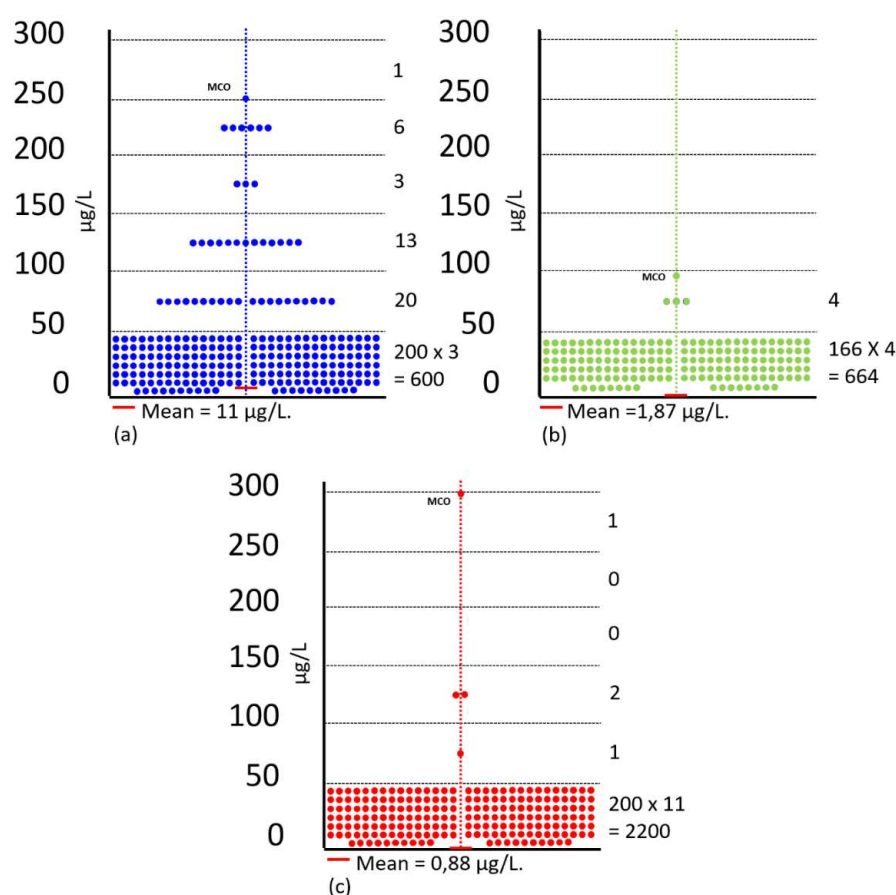
Já para o atenolol, encontramos 2519 registros de quantificação (PHARMS, UBA). Os dados vêm de trabalhos realizados em diferentes países como, Holanda, Suécia, Reino Unido, Alemanha, Espanha, França, República Tcheca, Eslováquia, Hungria, Eslovênia, Croácia, Sérvia, Romênia, Noruega, Letônia, Itália, Turquia, Portugal, Finlândia, Moldova, Bélgica, Suíça, Grécia, EUA, Canadá, Brasil, Argentina, México, Uruguai, China, Vietnã, República da Coreia, Índia, Líbano, Singapura, Tailândia, Taiwan, Japão, Arábia Saudita, Malásia, Emirados Árabes Unidos, Camarões, Tunísia, África do Sul e Austrália. Em um trabalho realizado na Índia foi observada a maior concentração do atenolol já relatada, de 294,70 µg/L (Mohapatra et al., 2016). No Brasil, Maldaner e Jardim (2012) quantificaram o atenolol em 5 pontos de amostragem de água em Campinas – SP. As quantificações variaram entre 46 e 300 µg/L. Também em 2012, um grupo de pesquisadores avaliaram a quantidade de β-bloqueadores (incluindo o atenolol) em efluente de um hospital universitário (Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Rio Grande do Sul), sendo o valor máximo observado de 4,5 µg/L (Wilde; Kümmerer; Martins, 2012). No estudo de Quadra et al. (2021), foi registrada uma concentração de 0,106 µg/L de atenolol em Juiz de Fora-MG.

Dados representativos da distribuição de quantificações dos fármacos metformina, valsartana e atenolol no banco de dados PHARMS-UBA (2025) são demonstrados na Figura 1. Note que para os três fármacos, a grande maioria das concentrações relatadas estão na faixa entre 0 e 50 µg/L. Para os dados de metformina, 93,31% das quantificações estão nesta faixa. Para valsartana, este dado é de 99,40% e de 99,77% para atenolol. As médias de quantificações para estes fármacos são respectivamente de 11; 1,87 e 0,88 µg/L (Figura 1). Sendo a MOC (a

maior concentração relatada no banco de dados), 250,10 $\mu\text{g/L}$ para metformina, 92,52 $\mu\text{g/L}$ para valsartana e 294,70 $\mu\text{g/L}$ para atenolol.

Nesta escala de concentrações, as encontradas em Juiz de Fora-MG por Quadra et al. (2021) podem ser consideradas como concentrações muito baixas.

Figura 1 – Distribuição das quantificações dos fármacos descritos no banco de dados PHARMS-UBA.



Notas: PHARMS-UBA – banco de dados (acesso em maio de 2025). MCO – Maior concentração relatada; Mean – Média de todas as quantificações dos fármacos: (a) metformina; (b) valsartana e (c) atenolol.

Ao longo da história do desenvolvimento global, a indústria farmacêutica teve um papel fundamental no tratamento e prevenção de diversas doenças, contribuindo significativamente tanto para o progresso econômico quanto para a melhora da expectativa de vida humana (González-González et al., 2022). Porém, o desenvolvimento acelerado da indústria farmacêutica, o uso excessivo e indiscriminado de fármacos pela população, atrelados ao

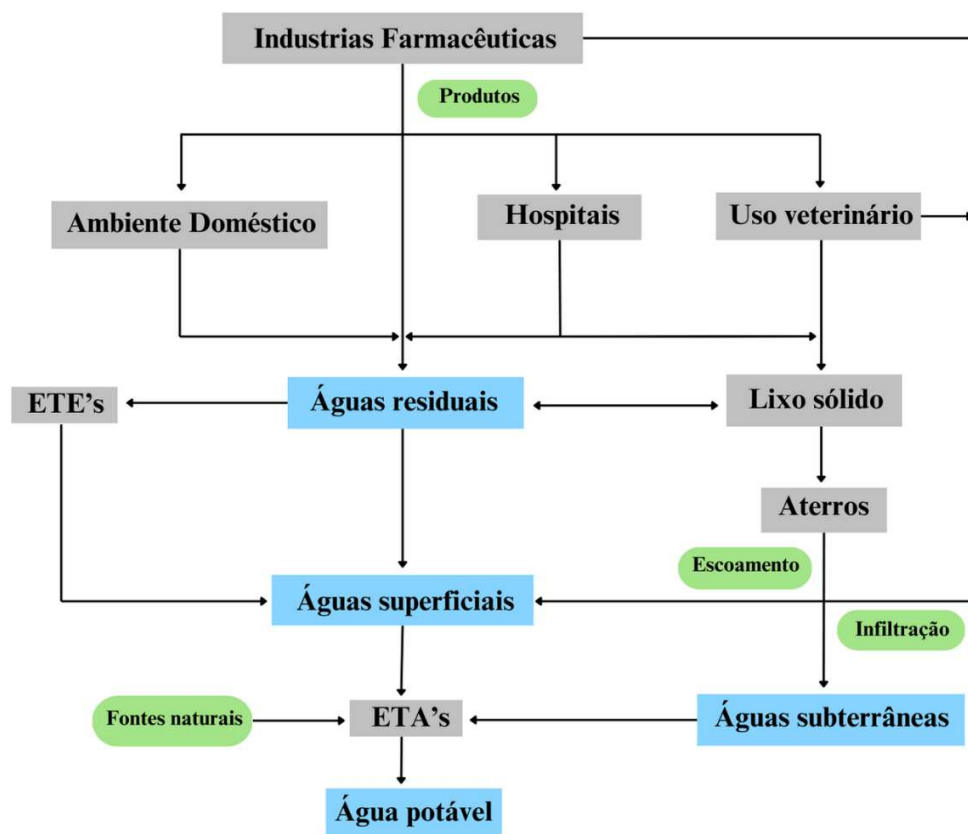
descarte inadequado dos mesmos, resultam na liberação e no acúmulo de quantidades massivas de resíduos farmacêuticos potencialmente perigosos nas matrizes aquáticas (Sonal et al., 2024). Soma-se a esse cenário, o contínuo avanço nos processos de desenvolvimento, teste e lançamento de novos medicamentos, impulsionado pela crescente demanda global por cuidados de saúde diante do aumento da longevidade populacional (OCDE, 2018).

As principais fontes de liberação de PhACs no meio ambiente incluem fluxos residuais industriais, domésticos e hospitalares (Figura 2) (Dos Santos et al., 2021). O descarte de efluentes provenientes de sistemas de criação intensiva de gado e aquicultura, embora restrita a áreas específicas, também representa uma fonte significativa. Outros processos indiretos, como escoamento e drenagem, que transportam esses compostos para o solo e diferentes matrizes aquáticas, contribuem ainda para a intensificação da contaminação ambiental (Figura 2) (Ebele; Abou-Elwafa Abdallah; Harrad, 2017; Saidulu et al., 2021; Wang et al., 2021).

A maioria dos produtos farmacêuticos consumidos é apenas parcialmente metabolizada ou retida pelo organismo, sendo predominantemente excretada pela urina na forma de metabólitos ativos, que podem permanecer inalterados ou conjugados a moléculas polares (Valdez-Carrillo et al., 2020). Assim, esses PhACs são liberados no ambiente por meio de lançamentos diretos em corpos d'água, como rios, ou são encaminhados para estações de tratamento de águas residuais (lançamentos indiretos), além de serem introduzidos em ambos os meios através de descartes inadequados. Como agravante, as próprias Estações de Tratamento de Esgoto (ETE's) e Estações de Tratamento de água (ETA's) são consideradas como uma fonte, por serem muitas vezes incapazes de remover ou transformar completamente alguns PhACs (ou seus subprodutos e metabólitos) devido à sua natureza química estável e recalcitrante que potencializam a eficácia farmacológica (Gao et al., 2021; Hu et al., 2019).

Dessa forma, a remoção de compostos farmacêuticos representa um grande desafio, não apenas devido às características desses contaminantes, mas também, e principalmente, devido às suas baixas concentrações. Métodos como extração líquido-líquido, adsorção sólida (especialmente em carvão ativado), biorreatores de membrana, processos de oxidação avançada, uso de *wetlands* construídos e a integração destes diferentes sistemas estão entre as abordagens mais estudadas na tentativa de remover eficientemente PhACs do ambiente (Mendes et al., 2024; Saidulu et al., 2021).

Figura 2 - Fontes de liberação de componentes farmacêuticos no ambiente aquático. Algumas das diferentes rotas responsáveis pela ocorrência de fármacos em águas residuais, superficiais e água potável.



Legenda: ETE's: Estações de Tratamento de Esgoto; ETA's: Estações de Tratamento de água. Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Um dos métodos convencionais de tratamento de águas residuais, o sistema de lodo ativado, é um dos mais utilizados devido à sua eficiência na remoção de matéria orgânica e nutrientes, e custo-benefício quando comparado aos métodos mais avançados. Entretanto, quando se trata da remoção de produtos farmacêuticos esse sistema pode não ser igualmente eficiente (Tiwari et al., 2017). Santos et al. (2020) monitoraram, durante um ano, a presença de 28 PhACs em quatro diferentes fontes de águas superficiais e tratadas de quatro ETAs (Estação de Tratamento de Água) brasileiras. Os autores detectaram, em todas as fontes avaliadas, níveis vestigiais de PhACs tanto na água superficial quanto na potável. A capacidade das ETAs de remover esses compostos foi apenas parcial, observando-se assim contaminação, mesmo na água tratada. Furlong et al. (2017) conduziram uma investigação nos Estados Unidos, dividida

em duas fases: I) avaliação da presença de fármacos em águas brutas; e II) análise das amostras após o tratamento, abrangendo 25 estações de tratamento de água potável. O estudo identificou dezenas de compostos em águas brutas, com concentrações que chegaram a 46.000 ng/L^{-1} , para o lítio, além de compostos como carbamazepina, bupropiona, cotinina, metoprolol e cafeína. A análise de fase II revelou ainda que embora o tratamento tenha reduzido parte da carga contaminante, diversos compostos persistiram mesmo após o processo convencional de purificação, evidenciando a limitação das tecnologias utilizadas para remover completamente esses contaminantes emergentes. Pivetta et al. (2020), investigaram a presença de dez medicamentos psicotrópicos amplamente consumidos no Brasil (alprazolam, amitriptilina, bupropiona, carbamazepina, clonazepam, escitalopram, fluoxetina, nortriptilina, sertralina e trazadona) em cinco ETE's localizadas na região metropolitana de Campinas (Estado de São Paulo, Brasil). As tecnologias das estações de tratamento analisadas não funcionaram como barreiras eficazes para remover os compostos detectados de efluentes, resultando na sua liberação nos corpos d'água receptores.

Em países em desenvolvimento como o Brasil, o cenário é ainda mais preocupante. O foco principal continua sendo nos danos ambientais e à saúde ocasionados por macropoluentes, uma vez que, segundo o SNIS (Brasil, 2022), apenas 52,2% dos esgotos do país são tratados. Assim, a negligência com o saneamento básico resulta na falta de tratamento de grande parte das águas residuais do país, mesmo que por métodos tradicionais, o que intensifica o lançamento de PhACs em corpos d'água naturais.

2.2.1 Biomonitoramento e ensaios biológicos na eco-cito-genotoxicologia

Uma vez introduzidos nos ecossistemas, os PhACs permanecem como moléculas bioativas. Devido à emissão contínua e aos tempos de degradação que variam de dias a meses (Royano et al., 2023), esses compostos podem interagir com organismos não-alvo, causando efeitos agudos e crônicos.

Apesar da relevância das análises físico-químicas – que fornecem informações importantes sobre a natureza química da amostra testada – elas não refletem o impacto gerado pelos contaminantes no ambiente (Gu; Mitchell; Kim, 2004). Nesse contexto, o biomonitoramento ambiental, que consiste na utilização da biota para avaliar e rastrear

mudanças nos ecossistemas, torna-se essencial (Friberg et al., 2011). Para isso, são utilizados bioindicadores - organismos vivos capazes de detectar alterações em ambientes naturais, sejam elas impactos negativamente ou positivamente (Parmar; Rawtani; Agrawal, 2016).

Dentre os efeitos adversos à biodiversidade devido à exposição aos fármacos, podemos citar: alterações do comportamento e da fisiologia, do sucesso reprodutivo, mortalidade, impactos sobre o crescimento, feminização em peixes, mudanças histológicas e em órgãos, seleção de populações resistentes, alterações de estrutura populacional, alterações cognitivas, bioacumulação e biomagnificação, entre outros (Nunes, 2014; Payal et al., 2022). Adicionalmente nós temos ainda os efeitos, ditos, citogenotóxicos, ou seja, aqueles que induzem alterações a níveis celulares ou ao genoma (material genético de células) (Leme; Marin-Morales, 2009). Em conjunto, todos estes efeitos podem ser incluídos em um único termo, o de ecotoxicologia (Moreira et al., 2021).

Ensaio de ecotoxicologia, que avaliam o impacto de contaminantes ambientais nos ecossistemas e seres vivos, podem ser realizados usando organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos, como microrganismos, flora, invertebrados e vertebrados (Pérez-Pereira et al., 2024). As espécies podem responder de forma distinta, dependendo do seu nicho. Diante disso, é essencial que estudos ecotoxicológicos abranjam diferentes organismos, especialmente de níveis tróficos e taxonômicos distintos (Reque et al., 2021). Para isso, diversos organismos-modelo podem ser empregados, tais como: *Daphnia magna* Straus (crustáceo), *Allium cepa* L. (planta), *Drosophila melanogaster* Meigen (inseto) e *Danio rerio* Hamilton (peixe), e etc (Canedo et al., 2021; Leme; Marin-Morales, 2009; Pashaei et al., 2023; Reyes-Rodríguez et al., 2021).

Entre os ensaios ecotoxicológicos, dois modelos são amplamente utilizados, *Lactuca sativa* e *Daphnia magna*.

Daphnia magna é um microcrustáceo planctônico, presente em quase todos os corpos de água doce e estuários e é um dos organismos zooplânctônicos mais utilizados na pesquisa ecotoxicológica (Reilly et al., 2023). Sua relevância ecológica nos ambientes aquáticos deve-se ao fato de atuarem como consumidores de algas e constituírem uma importante base alimentar para pequenos peixes (Dalla Bona et al., 2016). Além disso, graças à transparência natural do corpo de *Daphnia*, é relativamente simples estudar seus órgãos internos. Isso os torna uma escolha popular para estudos sobre o efeito de certos produtos químicos na frequência

cardíaca, por exemplo, drogas cardioativas (Villegas-Navarro; Rosas-L; Reyes, 2003). Outros parâmetros de toxidez em *Daphnia* são também investigados, tais como, parâmetros reprodutivos (produção de prole, número de proles anormais, taxa reprodutiva), parâmetros agudos (imobilização e mortalidade), parâmetros fisiológicos (taxas de alimentação e filtração, frequência de saltos, velocidade de natação) (Tkaczyk et al., 2021).

L. sativa (alface) foi reconhecida pela Diretriz 208 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) como organismo-teste devido à sua sensibilidade a estressores ambientais (Hulzebos et al., 1993), sendo comumente utilizada em testes de fitotoxicidade que consideram a germinação e o crescimento das raízes como indicadores de respostas biológicas (Visioli et al., 2014). Este tipo de ensaio, possibilita a análise de efeitos adversos em estágios iniciais do desenvolvimento da semente, tornando o processo significativamente mais simples e rápido (Palmieri et al., 2014). Entretanto, alguns poluentes, a depender de sua concentração, podem não impactar diretamente o desenvolvimento das plantas, mas ainda assim provocar alterações nas células/material genético dos organismos expostos (Braga et al., 2024). Dessa forma, plantas superiores também são utilizadas para investigação de efeitos citogenotóxicos devido às suas características que as tornam modelos genéticos eficientes na detecção de poluentes. Entre esses atributos destacam-se a sensibilidade para identificar agentes mutagênicos em distintos ambientes e a capacidade de avaliar uma multiplicidade de variáveis genéticas, desde mutações pontuais até alterações cromossômicas, em células de diferentes tecidos, como folhas, raízes e pólen (Grant, 1994). Acrescenta-se ainda a facilidade de cultivo, o baixo custo e a boa correlação com outros sistemas teste (Fiskesjö, 1985).

A. cepa é outro modelo consagrado para a avaliação de danos cromossômicos e alterações no ciclo celular, devido às suas características cromossômicas favoráveis, como cromossomos grandes e em número reduzido ($2n = 16$) (Fiskesjö, 1985). Com isso, a análise do ciclo celular é uma ferramenta amplamente utilizada para investigar não apenas os efeitos genotóxicos de diversos agentes, mas também seus mecanismos de ação, quanto aos seus efeitos clastogênicos ou aneugênicos (Leme; Angelis; Marin-Morales, 2008). Agentes físicos e químicos podem promover alterações cromossômicas por diferentes vias, atuando de forma clastogênica ou aneugênica. As ações clastogênicas envolvem a quebra de cromossomos durante a divisão celular, enquanto as aneugênicas estão relacionadas à disfunção de estruturas

celulares, como o fuso mitótico, resultando em perdas cromossômicas ou em segregações anormais (Ateeq et al., 2002; Fernandes; Mazzeo; Marin-Morales, 2009; Leme; Angelis; Marin-Morales, 2008). O ensaio é realizado a partir da ponta de raízes, onde se encontra o meristema radicular, composto por células com intensa divisão celular. De acordo com Fiskejö (1988), a raiz é, na maioria das vezes, a primeira parte da planta a entrar em contato com agentes tóxicos presentes no solo ou na água, sendo, portanto, um método rápido e direto para o monitoramento da toxicidade do agente testado.

As alterações cromossômicas, são definidas como mudanças na estrutura ou no número de cromossomos, que podem ocorrer de forma espontânea ou em decorrência da exposição a agentes tóxicos. Tais alterações podem indicar a presença de efeitos de citogenotoxicidade, uma vez que envolvem danos ao DNA ou distúrbios no ciclo celular, e podem ser induzidas por agentes químicos, biológicos ou físicos (Natarajan, 2002), como os próprios PhACs, os quais já se tem relatos deste tipo de efeito na literatura (Dos Santos et al., 2021; Kalauz; Kapui, 2022).

Embora a análise citogenética seja amplamente empregada neste modelo, ensaios que buscam investigar a indução de morte celular também são recorrentes. Em vegetais, o processo de morte celular programada (MCP) apresenta semelhanças com o dos animais, mas não é completamente idêntico. As principais características citológicas da MCP incluem a condensação da cromatina e a fragmentação do núcleo e da célula (Van Doorn, 2011). Em nível bioquímico, um dos principais indicativos da MCP é a fragmentação do DNA por endonucleases, fenômeno conhecido como *DNA laddering*, assim chamado porque, em eletroforese em gel de agarose, a molécula adquire um padrão característico em formato de escada.

Além disso, outro ensaio amplamente empregado é o ensaio cometa, uma técnica que permite a avaliação quantitativa de danos primários ao DNA (quebra de DNA ou formação de sítios alcalino-lábeis) em células individuais (Lanier et al., 2015). Este teste possibilita a estimativa do grau de dano ao DNA por meio da análise de imagens formadas após a corrida eletroforética. Quando há quebras na fita de DNA, os fragmentos migram do núcleo lisado em direção ao ânodo, formando um padrão característico conhecido como "cauda do cometa". Quanto maior e mais intensa for a cauda, consequentemente maior o nível de dano ao DNA (Collins, 2004). Assim, o teste do cometa é uma ferramenta útil para complementar análises citogenotóxicas, por citometria de fluxo e avaliações com marcadores moleculares, pois permite

identificar danos no DNA provocados por agentes com potencial genotóxico. Porém, ao contrário das mutações, os danos genômicos observados nesse ensaio podem ser reparados pela célula.

A técnica de TUNEL (do inglês, *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) também é comumente utilizada na investigação de mecanismos de morte celular. A técnica se baseia na detecção de quebras na fita de DNA pela marcação com fluorocromos, podendo ser identificadas por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência (Darzynkiewicz et al., 2008). A marcação de TUNEL depende da capacidade da enzima terminal desoxinucleotidil transferase de incorporar dUTP marcado em terminais 3'-OH livres gerados pela fragmentação de DNA genômico, sendo, portanto, usada para detecção de apoptose (Loo, 2002).

Ensaio com *A. cepa* tem sido utilizados há anos como biomarcadores de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, devido à sua sensibilidade e confiabilidade (Caritá; Mazzeo; Marin-Morales, 2019; Fiskesjö, 1993; Grant, 1994; Pesnya et al., 2017; Sommaggio et al., 2018). Além disso, a aplicação combinada desses bioensaios é vantajosa, pois permite a avaliação de diferentes tipos de alterações celulares de forma complementar.

Apesar de ser menos explorada em relação a outros critérios de toxicidade, a genotoxicidade é reconhecida como um indicador confiável para avaliar os efeitos tóxicos dos PhACs (Dos Santos et al., 2021). A citogenotoxicidade de alguns fármacos, como a carbamazepina, já foi relatada. Este fármaco demonstrou induzir estresse oxidativo no modelo testado (*Allium cepa*) em concentrações entre 1 e 31,36 $\mu\text{g/L}^{-1}$, (García-Medina et al., 2020). Além disso, Chowdhury et al. (2020) avaliaram o impacto genotóxico da amoxicilina em embriões de *D. rerio* e a mesma foi considerada como um contaminante genotóxico. Parrella et al. (2015) realizaram experimentos com os crustáceos *D. magna* e *C. dubia*, expondo-os a seis fármacos quimioterápicos (5-fluorouracil, capecitabina, cisplatina, doxorubicina, etoposídeo e imatinibe) por um período de 24 horas. Os resultados indicaram que todos os compostos testados promoveram um aumento nos danos ao DNA, detectados por meio do ensaio cometa, em concentrações variando de 0,01 a 120 $\mu\text{g/L}^{-1}$, níveis considerados preocupantes para o meio ambiente (European Commission, 1996). Drzymala e Kalka (2024) investigaram os efeitos tóxicos do diclofenaco, do sulfametoxazol e de sua mistura, em concentrações ambientais, na planta *Vicia faba*. Foram observados efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, incluindo

a redução do índice mitótico, o aumento do percentual de micronúcleos e a ocorrência de alterações cromossômicas. Também foram identificadas alterações na atividade de enzimas antioxidantes, como a redução da atividade da catalase e o aumento na superóxido dismutase.

Além disso, no campo da ecotoxicologia aquática, as respostas comportamentais das espécies têm sido utilizadas há décadas como um meio de monitoramento ambiental (Scherer, 1992). Outros parâmetros, como comprometimento bioquímico, metabólico, neurotoxicidade, dentre outros, são também investigados. O importante é que esses testes sejam validados internacionalmente, como por exemplo, pelos padrões estabelecidos pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD).

Outro aspecto relevante a ser considerado nas avaliações de impacto de contaminantes ambientais, como os PhACs, é que, no ambiente aquático, eles geralmente ocorrem em misturas, e não de forma isolada. Exposições no ambiente real são caracterizadas pela co-ocorrência de dezenas de fármacos diferentes, juntamente com muitos outros produtos químicos ambientais, o que chamamos de misturas complexas (Kidd et al., 2024). Segundo Cleuvers (2003), o efeito combinado de produtos farmacêuticos detectados juntos em amostras de água devem ser determinados para obter uma melhor avaliação do potencial ecotoxicológico de PhACs no ambiente aquático. No entanto, poucos estudos avaliam os efeitos dessas combinações. Além disso, os PhACs estão sujeitos a interações e transformações que podem intensificar ou reduzir sua toxicidade (Dos Santos et al., 2024). Nesse contexto, pesquisas sobre os impactos de misturas de compostos químicos fornecem uma avaliação mais precisa dos riscos potenciais, representando com maior fidelidade as condições dos ecossistemas naturais. Afinal, a exposição combinada de micropoluentes e outros contaminantes pode modificar sua toxicocinética, influenciando seus efeitos no ambiente (Karbalaei et al., 2021).

2.2.2 Metformina, Valsartana e Atenolol

Os fármacos avaliados neste estudo, metformina, valsartana e atenolol, foram selecionados com base no trabalho de Quadra et al. (2021). A pesquisa demonstrou que o Rio Paraibuna (Juiz de Fora, Minas Gerais) recebe uma ampla variedade de micropoluentes, principalmente de origem urbana, com predominância de compostos/resíduos farmacêuticos. Dentre eles, metformina, valsartana, atenolol, cafeína e acessulfame estavam entre os

compostos em maiores concentrações. A cafeína e o acessulfame não serão abordados em detalhes neste estudo, uma vez que seus consumos estão associados a fins recreativos. Além disso, suas altas frequências de detecção em amostras de água têm sido atribuída a outras fontes, além do uso em medicamentos (Fu et al., 2020; Klanovicz; Pinto, 2024).

A metformina, um medicamento em uso desde a década de 1950, tornou-se a terapia de primeira linha para o controle do diabetes tipo 2 (Bailey, 2017), devido à sua eficácia na redução da glicose, ao perfil de segurança bem estabelecido e ao custo relativamente baixo (LaMoia; Shulman, 2021). Segundo estimativas do Estudo *Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors* (GBD, 2019), o diabetes foi a oitava principal causa de morte e incapacidade combinadas no mundo, afetando aproximadamente 460 milhões de pessoas em todas as faixas etárias e países naquele ano. Com o passar dos anos, a doença mantém-se como problema significativo de saúde pública. Em 2021, a prevalência global de diabetes na população entre 20 e 79 anos foi estimada em 10,5% (536,6 milhões de pessoas), com projeções indicando um aumento para 12,2% (783,2 milhões) até 2045 (Sun et al., 2022). Esse crescimento tem impulsionado o aumento do uso de fármacos antidiabéticos, incluindo a metformina.

Assim como a maioria dos medicamentos, a metformina não é completamente metabolizada pelo organismo humano, sendo excretada principalmente na urina e nas fezes (Zheng et al., 2024). Como consequência, há relatos bem documentados sobre a presença desse fármaco no meio ambiente em diversas partes do mundo, frequentemente em concentrações relativamente elevadas (Elizalde-Velázquez; Gómez-Oliván, 2020). Embora a metformina não substitua integralmente a insulina, seu baixo custo e ampla disponibilidade a tornam um dos fármacos mais produzidos e consumidos globalmente (Sebastine; Wakeman, 2003). Apesar do elevado consumo global, dados sistemáticos de monitoramento ambiental da metformina só começaram a ser disponibilizados recentemente. No Brasil, que ocupa a quarta posição mundial em número de diabéticos, segundo a Federação Internacional de Diabetes, ainda não há registros oficiais sobre a presença desse fármaco no ambiente (Ambrosio-Albuquerque et al., 2021).

Já a valsartana e o atenolol são medicamentos anti-hipertensivos. A valsartana é um bloqueador dos receptores de angiotensina II que funciona bloqueando substâncias que contraem os vasos sanguíneos, permitindo que o sangue flua mais suavemente e deixe o coração bombear com mais eficiência, e o atenolol membro do grupo dos β -bloqueadores – age

principalmente nos receptores β 1-adrenérgicos do coração, reduzindo a atividade simpática. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2023), o número de pessoas vivendo com hipertensão, ou que fazem uso de medicamentos para tratar a condição, dobrou entre 1990 e 2019, passando de 650 milhões para 1,3 bilhão. Nos últimos anos, houve um aumento global no consumo de valsartana, com vendas superando os dois bilhões de dólares nos EUA e ultrapassando os seis bilhões em todo o mundo (2010) (Medici et al., 2024). Da mesma forma, o atenolol é frequentemente recomendado como tratamento de primeira linha para pacientes hipertensos com condições cardiovasculares, sendo amplamente utilizado. Devido ao seu uso generalizado e ao metabolismo humano limitado – com menos de 10% do fármaco sendo metabolizado no fígado e aproximadamente 85-95% excretado inalterado na urina (El-waey et al., 2024), os β -bloqueadores, como o atenolol, são comumente detectados em matrizes aquáticas (Haro et al., 2017; Hu et al., 2019, 2015).

Portanto, devido à onipresença no ambiente e resistência à biodegradação dos PhACs – é importante investigar se esses compostos podem atuar como agentes capazes de induzir danos aos ecossistemas e consequentemente aos organismos expostos.

3 OBJETIVO GERAL

Considerando a lacuna de conhecimento sobre os riscos dos PhACs presentes nos ambientes aquáticos, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito eco-cito-genotóxico dos compostos metformina, valsartana e atenolol.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar se a exposição a misturas dos fármacos metformina, valsartana e atenolol causa efeitos ecotoxicológicos em níveis fenotípicos e comportamentais, em organismos modelo como *Lactuca sativa* e *Daphnia magna*.
- b) Verificar se as misturas são capazes de induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos em *Allium cepa*, com ênfase em parâmetros relacionados ao ciclo celular, integridade do DNA e indução de morte celular.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

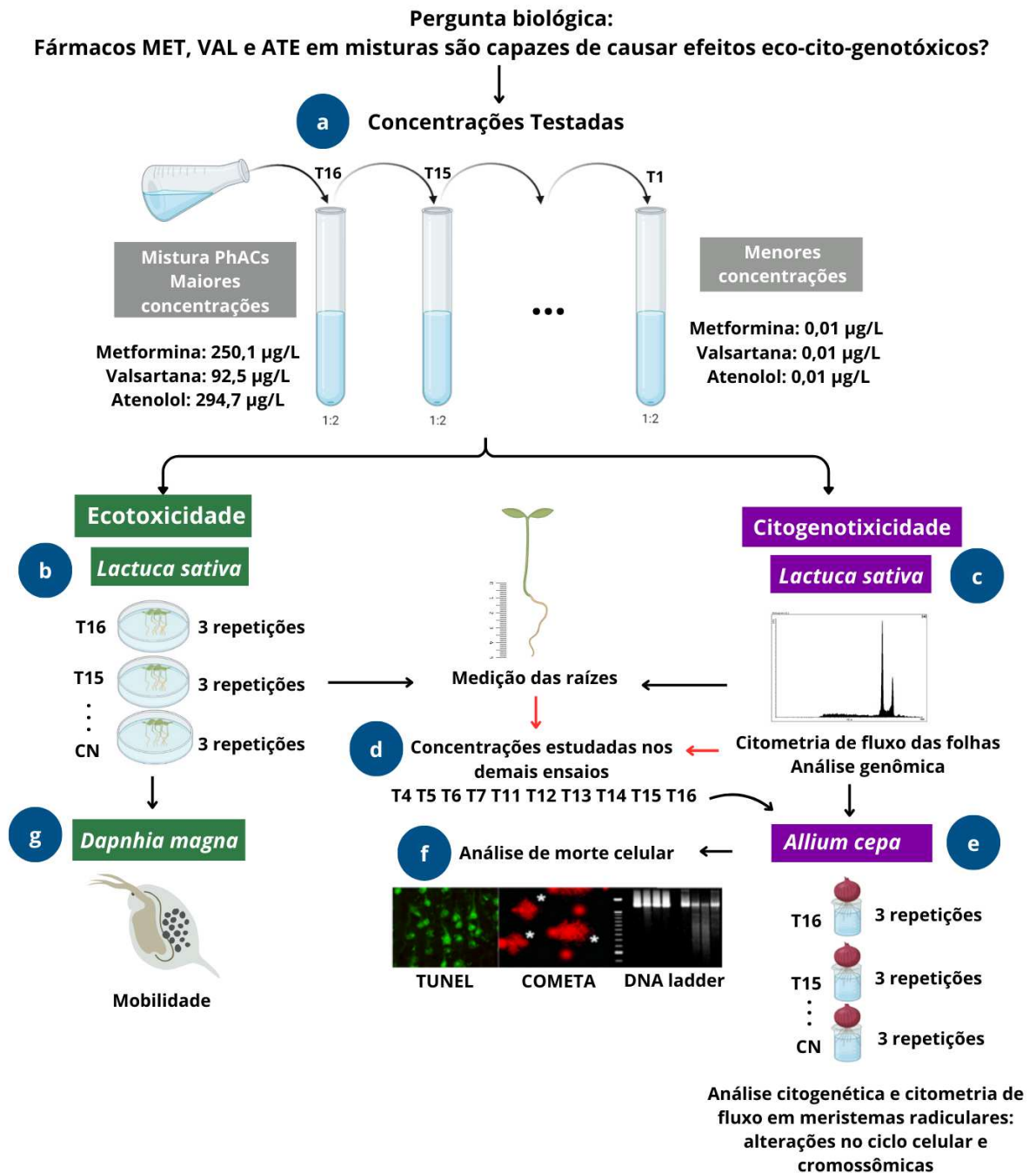
Para responder às questões científicas propostas neste estudo, foi adotada uma abordagem experimental baseada na exposição de organismos modelo a misturas dos fármacos metformina, valsartana e atenolol, em concentrações ambientalmente relevantes.

Na primeira etapa, foi conduzida a avaliação de ecotoxicidade em *Lactuca sativa*, por meio de ensaios de germinação e crescimento radicular (Figura 3b). No mesmo organismo, os efeitos citogenotóxicos foram analisados a partir das folhas por citometria de fluxo (Figura 3c). Esses ensaios iniciais tiveram como finalidade principal a triagem dos tratamentos com maior potencial de causar efeitos adversos, de modo a direcionar a aplicação nas etapas subsequentes (Figura 3d). Essa estratégia permitiu a definição de uma faixa de concentrações mais representativa e com maior probabilidade de evidenciar respostas biológicas, considerando que o elevado número inicial de tratamentos (16 tratamentos) (Figura 3a) inviabilizaria a análise detalhada de todos os grupos experimentais em alguns dos ensaios previstos.

Posteriormente, *Allium cepa* foi utilizada para investigação de citogenotoxicidade, empregando uma combinação de métodos: análise citogenética (índice mitótico e alterações cromossômicas), citometria de fluxo (parâmetros do ciclo celular e morte celular) (Figura 3e), ensaio cometa, eletroforese de DNA e ensaio TUNEL para detecção de quebras e danos no material genético (Figura 3f). Os ensaios iniciais em *A. cepa* (análise citogenética e por citometria de fluxo) (Figura 3e) juntamente com os dados de *L. sativa*, auxiliariam na seleção de tratamentos para os ensaios posteriores (Figura 3; f e g), sendo definidos de acordo com a necessidade metodológica e com o tipo de resposta a ser investigado.

Por fim, a ecotoxicidade também foi avaliada em *Daphnia magna*, por meio do teste agudo de imobilização, permitindo detectar alterações comportamentais associadas à mobilidade (Figura 3g). Essa estratégia permitiu avaliar, de forma integrada, diferentes tipos de respostas e danos frente à exposição a esses contaminantes.

Figura 3 - Resumo gráfico do planejamento e estratégias experimentais empregadas no projeto.



Notas: *MET: Metformina, VAL: Valsartana, ATE: Atenolol.

4.2 COMPOSTOS TESTADOS E CONCENTRAÇÕES INVESTIGADAS

No presente trabalho foram investigados os fármacos metformina, valsartana e atenolol, todos eles adquiridos da Sigma Aldrich®. As concentrações investigadas nos ensaios foram determinadas conforme informação já relatada no referencial teórico: as maiores concentrações encontradas no banco de dados PHARMS-UBA (2024) foram de 250,10 µg/L para metformina, 92,52 µg/L para valsartana e 294,70 µg/L de atenolol. Uma mistura destes 3 fármacos nestas concentrações constituiu o tratamento 16 (T16). A partir deste tratamento, realizamos uma diluição seriada (reduzindo a concentração em 50% a cada tratamento subsequente) até o tratamento 1 (T1), com concentrações dos fármacos próximas a 0,0. No total foram 16 tratamentos com fármacos acrescidos do controle (Figura 3a). Todos estes tratamentos foram utilizados nos ensaios de fitotoxicidade e de citometria de fluxo em *Lactuca sativa* (descritos adiante). Água destilada foi utilizada como controle negativo. As concentrações dos fármacos utilizados em cada tratamento estão detalhadas no Apêndice A (Tabela S1).

4.3 ENSAIO DE ECOTOXICIDADE EM *Lactuca sativa*

4.3.1 Avaliação de fitotoxicidade

Sementes de *Lactuca sativa* L. var. Mônica (alface), adquiridas comercialmente (Feltrin®, Brasil), foram utilizadas como material biológico. O protocolo de análise aqui utilizado seguiu as diretrizes da OECD 208 (2003). As sementes foram dispostas em placas de Petri de polietileno (9 cm de diâmetro), contendo papel filtro embebido com 3 mL dos diferentes tratamentos (CN e T1-T16), que foram renovados a cada 24 horas. As placas foram mantidas no escuro, à temperatura ambiente, durante todo o experimento.

O experimento foi disposto no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Cada repetição consistiu em uma placa de Petri contendo 30 sementes. A germinação foi avaliada após 96 horas de exposição aos tratamentos, sendo considerada germinada a semente que apresentasse protrusão radicular. Concomitantemente, o crescimento radicular foi avaliado mediante registro fotográfico das placas, seguido de aferição do comprimento com auxílio do programa ImageJ (Figura 4).

Figura 4 – Placas de petri contendo sementes de *L. sativa* expostas por 96h às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.



Legenda: (a) Placa de Petri para análise do percentual de germinação e (b) Medição das raízes no software ImageJ. Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Os resultados foram avaliados com base na comparação entre o número médio de sementes germinadas e o comprimento médio das raízes obtido nas três repetições do controle e de cada tratamento. O efeito percentual das misturas dos fármacos sobre a germinação das sementes ($\Delta G\%$) e o crescimento radicular ($\Delta C\%$) foi calculado por meio da seguinte fórmula (Han et al., 2023):

$$\Delta G \text{ ou } \Delta C (\%) = \frac{(B - A)}{A} \times 100$$

onde A , representa o número médio de sementes germinadas ou o comprimento médio das raízes no grupo controle, e B corresponde aos respectivos valores obtidos sob os diferentes tratamentos. Os índices $\Delta G (\%)$ e $\Delta C (\%)$ expressam a variação percentual na taxa de germinação e no crescimento radicular, respectivamente, em relação ao controle. Valores positivos elevados indicam efeito estimulatório dos tratamentos, ao passo que valores negativos acentuados indicam inibição em comparação ao grupo controle. Foram considerados como efeitos, valores de ΔG ou ΔC maiores ou menores do que 30% (Calabrese et al., 2019). Tratamentos com valores maiores ou menores de 30% para ΔG ou ΔC foram selecionados para os experimentos posteriores.

4.3.2 Avaliação de citogenotoxicidade por citometria de fluxo

Após a análise de fitotoxicidade, as plântulas de *L. sativa* permaneceram expostas às misturas dos fármacos por um período adicional de 96 horas, totalizando 192 horas de exposição (CN, T1–T16). Nesse intervalo, as raízes tornaram-se excessivamente finas, o que dificultaria a separação da região meristemática. Dessa forma, optou-se pela utilização das folhas desenvolvidas a partir das plântulas para a realização da citometria de fluxo

Para a obtenção das amostras a serem submetidas à citometria de fluxo, folhas das plântulas de *L. sativa* foram maceradas em placas de Petri mantidas sob gelo, com o auxílio de um bisturi, em 300 µL de tampão de extração celular (WPB). Essa solução foi filtrada em malha de 40 µm e posteriormente coletada em um tubo de citometria de fluxo, resultando em uma suspensão nuclear. A essa solução foram adicionados 25 µL de iodeto de propídeo. As suspensões com os núcleos corados foram levadas ao citômetro CytoFlex para leitura. Uma folha foi utilizada por repetição (amostra), e um total de três repetições foram analisadas por tratamento. Foram determinadas as frequências dos núcleos nas diferentes fases do ciclo celular: G1 (conteúdo de DNA 2C), S (conteúdo de DNA entre 2C e 4C) e G2 (conteúdo de DNA 4C), bem como a presença de partículas sub-G1, correspondentes a populações celulares com intensidade de fluorescência inferior à dos núcleos em G1. As variações na medição do conteúdo de DNA foram expressas por meio do coeficiente de variação da fase G1 (CV), calculado como o desvio padrão dividido pela média da intensidade de fluorescência. Também foi registrada a intensidade média de fluorescência dos núcleos em G1 (IFa). Outros parâmetros morfométricos foram anotados, tais como tamanho relativo dos núcleos em G1, identificado pelo detector de fluorescência frontal (forward scatter – FSC) e a complexidade (granulosidade e/ou densidade nuclear/celular) dos núcleos em G1 pelo detector de luz de espalhamento lateral (side scatter – SSC). Tratamentos com efeitos estatisticamente significativos foram também escolhidos para os experimentos posteriores.

4.4 ENSAIO DE CITOGENOTOXICIDADE EM *Allium cepa*

Bulbos de cebola (*Allium cepa*, 2n = 16), com diâmetro entre 1,5 e 2,0 cm, foram adquiridos comercialmente. Para todos os ensaios em *A. cepa*, antes do início do experimento,

as cascas externas e raízes mortas foram cuidadosamente removidas, a fim de favorecer o desenvolvimento adequado de novas raízes. Em seguida, os bulbos foram mantidos em água destilada por um período de 48 horas (pré-exposição) para permitir a emergência das raízes. Após esse período, os bulbos que apresentaram emissão radicular foram selecionados e submetidos aos tratamentos por 48h. Para as análises citogenética e por citometria de fluxo, foram testados os tratamentos T4, T5, T6, T7 e T10 a T16, escolhidos a partir dos resultados obtidos com *Lactuca sativa*. Inicialmente, T4 e T11 foram considerados concentrações NOEC (maior concentração sem efeito observado). Porém, como o tratamento T11 apresentou efeitos nos ensaios em *A. cepa*, ele foi substituído por T10, sendo assim T4 e T10 definidos como NOEC.

4.4.1 Análise citogenética

Para a análise microscópica, foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso composto por 3 repetições, cada uma delas composta pela análise de 3 lâminas. Três bulbos diferentes constituíram as repetições. Nove raízes foram analisadas, portanto, por tratamento. As raízes foram submetidas aos tratamentos por 48h de exposição. Pós-tratamento, as raízes foram fixadas em uma solução de álcool etílico e ácido acético (3:1, v/v) e armazenadas por, no mínimo, 24h a -20°C . Água destilada foi utilizada como controle negativo e MMS (metilmetanossulfonato) 10 mg/L como controle positivo (Rank; Nielsen, 1997).

A preparação das lâminas foi realizada com base no método descrito por Fiskesjö (1985), com algumas adaptações. Inicialmente, as raízes foram lavadas em água corrente por 10 minutos e, em seguida, submetidas à hidrólise em ácido clorídrico (HCl) 5M por 20 minutos. Após esse processo, as raízes foram lavadas em água destilada e cuidadosamente secas com papel filtro. A avaliação citogenotóxica foi realizada utilizando-se a região meristemática, sendo analisada uma raiz por lâmina. As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento, no qual o meristema foi esmagado entre lâmina e lamínula com o auxílio de uma gota de ácido acético a 45%. Para a remoção da lamínula, as lâminas foram imersas em nitrogênio líquido por 1 minuto e, em seguida, a lamínula foi cuidadosamente retirada com o auxílio de lâmina de barbear. Após secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram novamente imersas em ácido acético a 45% por 1 minuto e deixadas secar naturalmente. Por

fim, foram coradas com solução de Giemsa a 5% por um período de 5 a 10 minutos. As análises foram realizadas em microscópio óptico, com aumento de 400×. A citotoxicidade foi avaliada por meio do índice mitótico (IM), obtido a partir da análise de seis campos por lâmina, totalizando entre 1.000 e 2.000 células por lâmina (3.000 a 6.000 células por repetição, considerando as três repetições). O cálculo do IM foi realizado pela seguinte fórmula:

$$\text{Índice mitótico (IM)\%} = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{total de células avaliadas}} \times 100$$

A genotoxicidade foi analisada com base na contagem de células portadoras de alterações cromossômicas e nucleares, percorrendo toda a extensão da lâmina para garantir maior representatividade amostral. As alterações cromossômicas (AC) investigadas foram divididas em dois grupos: aneugênicas, relacionados ao mau funcionamento do fuso mitótico, (como c-metáfase, perda cromossômica, multipolaridade, segregação tardia e cromossomos aderentes) e clastogênicas, resultantes de quebras no DNA (como pontes cromossômicas e fragmentos). Além disso, foi avaliada a presença de micronúcleos, como indicativo de efeito mutagênico. O percentual de alterações cromossômicas foi calculado seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{Alterações cromossômicas (AC)\%} = \frac{\text{número de células alteradas}}{\text{total de células avaliadas}} \times 100$$

Os percentuais totais de alterações clastogênicas, aneugênicas e micronúcleos foram relatados.

4.4.2 Citometria de fluxo

A obtenção dos núcleos de *A. cepa* para a análise por citometria de fluxo foi realizada a partir das raízes expostas aos tratamentos por 48h. Os meristemas radiculares foram cuidadosamente separados do restante da raiz e macerados em placas de Petri mantidas sob gelo, com o auxílio de um bisturi, em 300 µL de tampão de extração celular (WPB). Para cada repetição experimental, foram utilizados nove meristemas, totalizando três repetições por tratamento (3 amostras). As suspensões nucleares obtidas foram filtradas por malha de náilon com poro de 40 µm, a fim de remover detritos celulares e isolar os núcleos. Em seguida, as

amostras foram coradas com 25 μL de iodeto de propídeo (1 mg/mL^{-1}) e analisadas em citômetro de fluxo CytoFLEX (Galbraith et al., 1983). Os parâmetros avaliados foram: % sub-G1, % G1, % S, % G2, FSC, SSC, IFa e coeficiente de variação (CV).

4.4.3 Ensaio cometa

Para o ensaio cometa, foi realizada uma seleção representativa dos tratamentos com efeitos inibitórios previamente selecionados pelos ensaios iniciais em *L. sativa* e *A. cepa* (T11 a T16), juntamente com a concentração NOEC (T10). Optou-se pela análise de três tratamentos (T10, T13 e T16), escolhidos com intervalo regular de três em três unidades, a fim de representar diferentes níveis de resposta observados nos ensaios anteriores.

As raízes foram expostas aos tratamentos por 48h e, em seguida, coletadas para análise utilizando o protocolo descrito por Jovtchev et al. (2001), com algumas adaptações. Água destilada foi utilizada como controle negativo. Como controle positivo, utilizou-se solução de NaCl 250 mM, com tempo de exposição de 24h, conforme o procedimento proposto por Oliveira (2015), no qual foram observados cometas indicativos de dano ao DNA (classe 4).

As suspensões nucleares foram obtidas a partir das raízes tratadas. Para cada repetição/lâmina, aproximadamente 40 meristemas foram utilizados, sendo utilizado 3 repetições por tratamento, totalizando 3 lâminas analisadas por tratamento.

Os meristemas foram macerados em 300 μL de tampão PBS 1 $\times$ (4°C), com auxílio de uma lâmina de barbear. A suspensão obtida foi então filtrada em rede de náilon com malha de 40 μm . Em seguida, 30 μL da suspensão foram homogeneizados com 30 μL de agarose de baixo ponto de fusão a 1% (1:1), e a mistura foi aplicada sobre lâminas de pré-cobertura previamente preparadas, cobertas com uma fina camada de gel de agarose normal a 1%. A gota foi espalhada com auxílio de uma lamínula plástica, e as lâminas foram mantidas sob refrigeração por 5 minutos para solidificação da agarose. Decorrido esse tempo, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas incubadas em solução de lise (30 mM NaOH, 0,5 mM EDTA, pH 11,8) por 20 minutos, a 4°C . As lâminas foram então lavadas três vezes em tampão TBE 1 $\times$ gelado (Tris-base, Ácido Bórico, EDTA, pH 8) por 5 minutos cada.

Em seguida, as lâminas foram posicionadas na cuba de eletroforese preenchida com tampão TBE 1 $\times$ gelado, em volume suficiente para cobrir completamente as lâminas. A

eletroforese foi conduzida por 15 minutos, a 25 V (300 mA), à temperatura ambiente. Após a corrida, as lâminas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos e secas ao ar.

Cada lâmina foi corada com 50 µL de iodeto de propídeo (20 µg/mL) e analisada em microscópio de fluorescência. Por lâmina, foram avaliados de 50 a 100 nucleíodes, sendo classificados em escores de 0 a 4, de acordo com a intensidade da cauda, considerando-se a porcentagem de DNA presente nessa região (Garcia et al., 2007; Noroozi; Angerson; Lean, 1998). A porcentagem de DNA na cauda dos nucleíodes foi calculado com auxílio do software de imagens, ImageJ (Kumaravel et al., 2009).

4.4.4 Eletroforese de DNA

Os tratamentos mais concentrados (T14, T15 e T16) foram previamente associados à indução de morte celular pela análise citogenética. Para representar essa faixa de concentrações, foi realizada a extração de DNA seguida de eletroforese em gel de agarose nos tratamentos T14 e T16. O DNA total foi extraído a partir de aproximadamente 1g de meristemas frescos de *Allium cepa* expostos às soluções-teste por 48h, utilizando o método descrito por Doyle e Doyle (1987), com adaptações. Água destilada foi utilizada como controle negativo e NaCl 250 mM (com 24h de exposição) como controle positivo.

Para a extração, o tampão de lise contendo CTAB 2× (brometo de hexadeciltrimetilamônio) e PVP (polivinilpirrolidona) a 1% foi previamente preparado e aquecido a 65 °C. Para cada 10 mL de tampão, foram adicionados 0,1g de PVP. Durante o preparo, também foi incorporado β-mercaptoetanol (0,2%) imediatamente antes do uso, na proporção de 20 µL para cada 10 mL de tampão.

Os meristemas foram inicialmente separados da raiz sob gelo e triturados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, foram adicionados 800 µL da solução de CTAB-PVP-BME a cada amostra obtida. As amostras foram incubadas a 65 °C por pelo menos 30 minutos, com inversões ocasionais a cada 5 minutos. Após esse período, foi adicionado clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v), em volume equivalente a 2/3 do volume da amostra (aproximadamente 500 µL), seguido de homogeneização por inversão suave dos tubos. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos, e a fase aquosa superior foi cuidadosamente transferida para um novo tubo.

Para a remoção de contaminantes de RNA, foi adicionado 10 µL de RNase às amostras, com incubação a 37°C por 30min. Posteriormente, para a precipitação do DNA, adicionou-se acetato de amônio 7,5 M na proporção de 0,08 volumes, seguido de isopropanol gelado (0,54 volumes). As amostras foram incubadas a -20 °C, overnight. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm, observando-se a formação do pellet. O sobrenadante foi descartado com cuidado, e o pellet foi lavado com 700 µL de etanol 70% gelado e secos ao ar.

Por fim, os *pellets* foram ressuspensos em 30-50 µL de água Milli-Q. Para garantir a completa solubilização do DNA, os tubos foram mantidos a 4 °C por no mínimo 30 minutos, preferencialmente overnight. A concentração e a pureza do DNA extraído foram avaliadas em espectrofotômetro Nanodrop. A fragmentação do DNA (*DNA laddering*) foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1×, com coloração utilizando 10 µL de SYBR Green e visualização sob luz UVB.

4.4.5 TUNEL

Para o ensaio TUNEL, assim como na eletroforese (item 4.4.4), a fim de representar a faixa de concentração dos tratamentos mais concentrados (T14, T15 e T16) previamente associados à indução de morte celular, foram analisados os tratamentos T14 e T16. As raízes foram expostas aos tratamentos por 48h. Água destilada, que foi utilizada como controle negativo e NaCl 250 mM (com 24h de exposição) como controle positivo.

Na análise de fragmentação de DNA por citometria de fluxo, foi utilizado o Kit APO-BRDU da Invitrogen (Catalog. No. KHO1001 (KHO1001CR & KHO1001FZ) específico para técnica de TUNEL. Os procedimentos seguiram o protocolo do fabricante. Resumidamente, para a obtenção da suspensão nuclear, aproximadamente 40 meristemas radiculares de *Allium cepa* por repetição, com 3 repetições por tratamento. Os meristemas foram macerados com auxílio de um bisturi, em tampão WPB sob gelo. A solução resultante foi filtrada em malha de 40µm e centrifugada em 300g por 10 min, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida, as células foram fixadas em solução de 1% de paraformaldeído em tampão PBS (pH 7,4) por 60 minutos sobre gelo e lavadas com PBS. A seguir, as amostras foram incubadas com a solução de marcação de DNA contendo a enzima TdT e o nucleotídeo BrdUTP por 1 hora a 37 °C. Após

as lavagens, as células foram incubadas com anticorpo anti-BrdU por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Posteriormente, adicionou-se tampão de coloração contendo iodeto de propídeo, com nova incubação de 30 minutos. Por fim, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

4.5 ENSAIO DE ECOTOXICIDADE EM *Daphnia magna*

Os ensaios realizados em *Daphnia magna* seguiram o guideline OECD 202 (Acute immobilisation test). Foram testados neste ensaio os tratamentos controle negativo (CN), T10, T11, T12, T13, T14, T15 e T16. As concentrações das misturas testadas em *Daphnia magna* foram definidas com base nos resultados prévios obtidos em *Lactuca sativa* (T11 a T16), onde avaliamos germinação, crescimento radicular e alterações celulares por citometria de fluxo em folhas. Com resultados obtidos em *A. cepa*, o tratamento T10 também foi adicionado, desse modo foram avaliados os tratamentos T10 a T16. Essa abordagem permitiu identificar faixas de concentração biologicamente ativas e guiar o delineamento do teste com *Daphnia*, respeitando o princípio dos 3Rs e evitando concentrações arbitrárias. Ainda que haja diferenças fisiológicas e de sensibilidade entre os modelos, a escolha baseada em resposta biológica inicial aumentou a relevância ecológica e toxicológica das concentrações testadas nos organismos animais.

No início do ensaio, todos os indivíduos de *D. magna* possuíam menos de 24h de vida, sendo o meio utilizado nos ensaios (M4) o mesmo para manutenção da população anterior mantida em cultura, sem a necessidade de um período prévio de aclimatização. Todos os recipientes utilizados nos ensaios foram de vidro sendo lavados anteriormente por procedimentos padrões. Os recipientes (Béquer de vidro) receberam os volumes apropriados de água destilada e das concentrações em mistura dos fármacos investigados. Vinte animais foram utilizados em cada tratamento, sendo estes colocados em 4 grupos, cada um contendo 5 animais. Cada grupo de 5 animais foram expostos a 10 mL de solução por 48h, para determinação da CE50% (concentração efetiva) que causa 50% do efeito. Os ensaios foram realizados em temperatura de 20°C, com fotoperíodo de 16h de luz e 8h no escuro. Indivíduos imobilizados foram avaliados a cada 24 horas, sendo também registrados eventuais comportamentos anormais.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os percentuais de germinação e crescimento radicular (cm) foram considerados efeitos aquelas variações acima ou abaixo de 30% em relação ao controle negativo. Os dados de imobilização de *Daphnia magna* foram analisados de forma descritiva, uma vez que os tratamentos corresponderam a misturas com concentrações dos três fármacos avaliados, não permitindo o ajuste convencional de modelos concentração-resposta. Para cada tratamento, foram calculadas as médias e porcentagens de organismos imobilizados. Com base nesses valores, foi estimado o valor de CE₅₀ empírico (concentração efetiva associada a 50% de imobilização). Os demais experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA (Oneway) seguida de teste de Dunnet ($p < 0.05$). Todas as análises estatísticas realizadas foram conduzidas por meio do software estatístico de código aberto R (R Core Team, 2023).

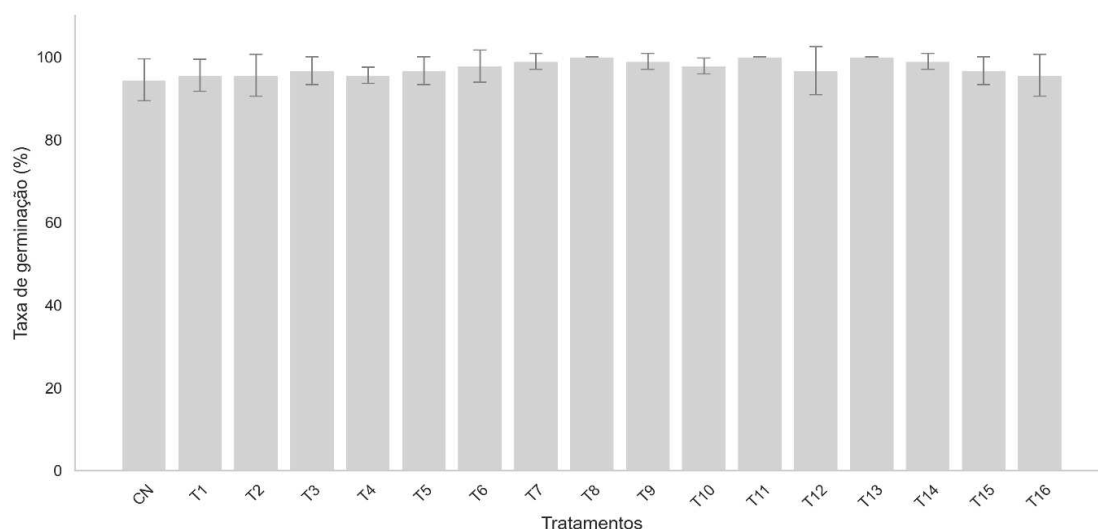
5 RESULTADOS

5.1 ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE EM *Lactuca sativa*

5.1.1 Ensaio de germinação e crescimento radicular em *L. sativa*

No teste de fitotoxicidade, as taxas de germinação observadas em todos os tratamentos permaneceram superiores a 80% (Figura 5). Dessa forma, conforme apresentado na Tabela 1, não foram evidenciados efeitos inibitórios ou estimulatórios sobre a germinação (ΔG) em nenhum dos tratamentos analisados.

Figura 5 - Taxa de germinação (%) de sementes de *Lactuca sativa* após 96h de exposição às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.



Legenda: CN – controle negativo; T1 – 0.01 $\mu\text{g/L}$ de metformina, 0.00 $\mu\text{g/L}$ de valsartana e 0.01 $\mu\text{g/L}$ de atenolol; T2 – 0.02, 0.00 e 0.02 $\mu\text{g/L}$ respectivamente; T3 – 0.03, 0.01 e 0.04 $\mu\text{g/L}$; T4 – 0.06, 0.02 e 0.07 $\mu\text{g/L}$; T5 – 0.12, 0.05 e 0.14 $\mu\text{g/L}$; T6 – 0.25, 0.09 e 0.29 $\mu\text{g/L}$; T7 – 0.49, 0.18 e 0.58 $\mu\text{g/L}$; T8 – 0.98, 0.36 e 1.16 $\mu\text{g/L}$; T9 – 1.96, 0.73 e 2.31 $\mu\text{g/L}$; T10 – 3.91, 1.45 e 4.61 $\mu\text{g/L}$; T11 – 7.82, 2.90 e 9.21 $\mu\text{g/L}$; T12 – 15.63, 5.79 e 18.42 $\mu\text{g/L}$; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 $\mu\text{g/L}$; T14 – 62.53, 23.13 e 73.68 $\mu\text{g/L}$; T15 – 125.05, 46.26 e 147.35 $\mu\text{g/L}$; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 $\mu\text{g/L}$. Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Em relação ao crescimento radicular, observou-se uma variação percentual mais acentuada em comparação ao controle (ΔC). Enquanto alguns tratamentos estimularam o alongamento das raízes, outros resultaram em redução do seu crescimento (Tabela 1). Para fins

de seleção dos tratamentos a serem investigados nos demais ensaios, estabeleceu-se um critério de estímulo $\geq 30\%$ em relação ao controle, ou inibição $\leq 30\%$. Após 96h de exposição, os tratamentos T6 e T7 apresentaram aumentos no crescimento radicular, com valores médios de 4,79 cm e 4,60 cm, respectivamente, em comparação ao controle (3,40 cm), o que representa aumentos no ΔC de 40,88% para T6 e 35,29% para T7 (Tabela 1). Por outro lado, os tratamentos com maiores concentrações dos compostos testados (T14, T15 e T16), os valores médios de crescimento radicular foram de 2,38 cm para T14; 2,20 cm para T15 e 2,32 cm para T16, resultando em reduções no ΔC de -30,0%, -35,29% e -31,76%, respectivamente, em comparação ao controle.

Tabela 1 – Variação percentual na taxa de germinação e no crescimento radicular de *Lactuca sativa* após exposição a misturas dos fármacos, em comparação ao controle negativo.

Tratamentos	ΔG (%)	ΔC (%)
CN	0.0 ± 1.53	0.0 ± 0.4
T1	1.18 ± 1.15	22.65 ± 0.08
T2	1.18 ± 1.53	17.06 ± 0.22
T3	2.35 ± 1.0	11.76 ± 0.34
T4	1.18 ± 0.58	20.59 ± 0.92
T5	2.35 ± 1.0	24.12 ± 0.95
T6	3.53 ± 1.15	40.88 ± 0.44 ($\geq 30\%$)
T7	4.71 ± 0.58	35.29 ± 0.59 ($\geq 30\%$)
T8	5.88 ± 0.0	5.59 ± 0.58
T9	4.71 ± 0.58	3.24 ± 1.03
T10	3.53 ± 0.58	0.88 ± 0.17
T11	5.88 ± 0.0	-21.76 ± 0.1
T12	2.35 ± 1.73	-19.12 ± 0.21
T13	5.88 ± 0.0	-12.35 ± 0.2
T14	4.71 ± 0.58	-30.0 ± 0.04 ($\leq 30\%$)
T15	2.35 ± 1.0	-35.29 ± 0.02 ($\leq 30\%$)
T16	1.18 ± 1.53	-31.76 ± 0.23 ($\leq 30\%$)

Notas: ΔG (%) $\pm$ DP: variação percentual média na germinação em relação ao controle $\pm$ Desvio padrão; ΔC (%) $\pm$ DP: variação percentual média no crescimento radicular em relação ao controle $\pm$ Desvio

padrão. Valores negativos indicam inibição. CN – controle negativo; T1 – 0.01 µg/L de metformina, 0.00 µg/L de valsartana e 0.01 µg/L de atenolol; T2 – 0.02, 0.00 e 0.02 µg/L respectivamente; T3 – 0.03, 0.01 e 0.04 µg/L; T4 – 0.06, 0.02 e 0.07 µg/L; T5 – 0.12, 0.05 e 0.14 µg/L; T6 – 0.25, 0.09 e 0.29 µg/L; T7 – 0.49, 0.18 e 0.58 µg/L; T8 – 0.98, 0.36 e 1.16 µg/L; T9 – 1.96, 0.73 e 2.31 µg/L; T10 – 3.91, 1.45 e 4.61 µg/L; T11 – 7.82, 2.90 e 9.21 µg/L; T12 – 15.63, 5.79 e 18.42 µg/L; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L; T14 – 62.53, 23.13 e 73.68 µg/L; T15 – 125.05, 46.26 e 147.35 µg/L; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L. Fonte: Elaborada pela autora (2025).

5.1.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo em *L. sativa*

Após 192 horas de exposição aos tratamentos com os fármacos, as folhas das plântulas de *L. sativa* foram analisadas por citometria de fluxo. Alterações no comportamento do ciclo celular e evidências da ocorrência de morte celular foram evidenciadas (Tabela 2). Nesta tabela são demonstrados apenas os tratamentos que evidenciaram pelo menos algum efeito significativo (Dunnet $p < 0,05$).

Na análise de ciclo celular, o tratamento T5, aumentou o percentual de núcleos indicativos de entrada em divisão celular (G2/M), indicado por um valor 1,20 vezes maior do que no controle negativo. Para essa mesma variável, valores reduzidos em relação ao controle negativo foram encontrados para todos os tratamentos a partir do T13. No T13 o valor de G2/M foi 1,28 vezes menor, chegando a um valor de 2,16 vezes menor no tratamento T16 (Tabela 2).

No quesito de indícios de morte celular, a partir do tratamento T12 ocorrem aumentos nos percentuais de subpartículas-G1. Em T12 este aumento em relação ao controle é de 72,50%, mas chega a um aumento de 587,10% após exposição ao tratamento T16.

As variáveis FSC (tamanho nuclear), SSC (complexidade nuclear), IFa (Índice de fluorescência) e CV (coeficiente de variação) também são indicativas de ocorrência de morte celular. Os dois tratamentos com maiores concentrações (T15 e T16) demonstraram efeitos significativos para todas essas variáveis (Tabela 2).

Tabela 2 - Variáveis analisadas por citometria de fluxo em folhas de *Lactuca sativa* após 192h de exposição às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.

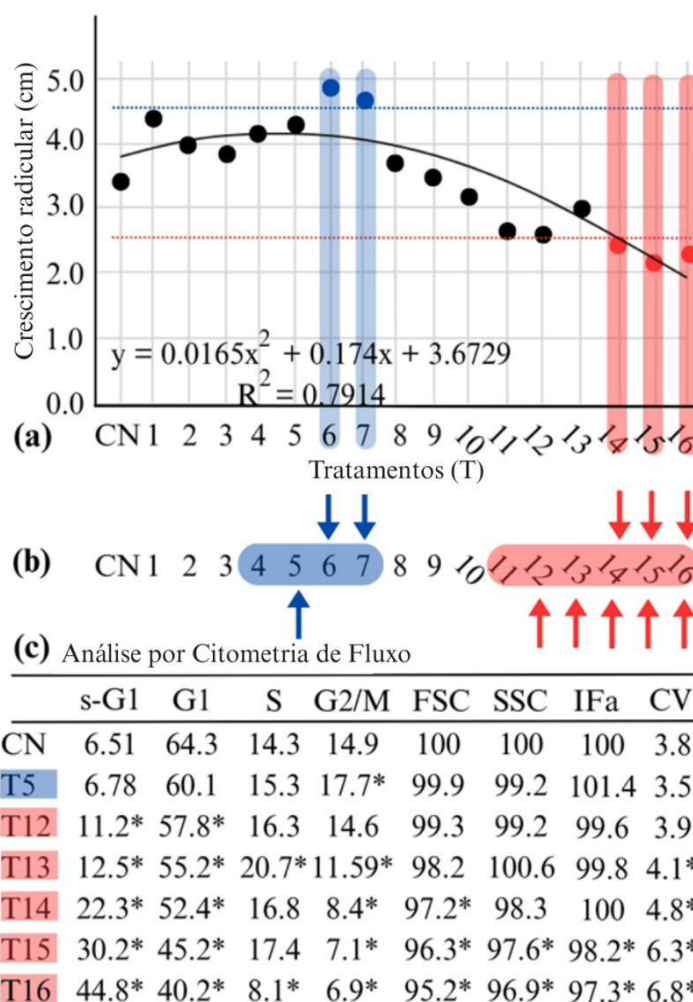
Tratamentos	% SubG1	% G1	%S	G2	FSC	SSC	IFa	CV
CN	6.51	64.32	14.32	14.85	100	100	100	3.78
T5	6.78	60.11	15.34	17.77*	99.98	99.23	101.45	3.45
T12	11.23*	57.77*	16.34	14.66	99.32	99.23	99.59	3.89
T13	12.45*	55.23*	20.73*	11.59*	98.23	100.67	99.78	4.11*
T14	22.33*	52.45*	16.79	8.43*	97.22*	98.34	99.99	4.78*
T15	30.21*	45.23*	17.44	7.12*	96.32*	97.67*	98.23*	6.34*
T16	44.78*	40.21*	8.12*	6.89*	95.24*	96.9*	97.34*	6.78*

Notas: (*) Diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA; Dunnet, $p < 0,05$). Somente os tratamentos que apresentaram diferença significativa em alguma variável são mostrados na tabela. CN – controle negativo; T5 – 0.12 µg/L de metformina, 0.05 µg/L de valsartana e 0.14 µg/L de atenolol; T12 – 15.63, 5.79 e 18.42 µg/L; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L; T14 – 62.53, 23.13 e 73.68 µg/L; T15 – 125.05, 46.26 e 147.35 µg/L; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L. S-G1 – subpartículas com intensidade de fluorescência inferior à G1; G1 – núcleos em G1 do ciclo celular; S – Núcleos em S do ciclo celular; G2/M – Núcleos em G2 ou início de prófase do ciclo celular; FSC – Diâmetro nuclear; SSC – Complexidade nuclear; IFa – Intensidade de fluorescência dos núcleos G1; CV – Coeficiente de variação dos núcleos em G1.

Na Figura 6 observamos todos os tratamentos que demonstraram efeito significativo, tanto pelo crescimento radicular quanto pela citometria de fluxo nos ensaios em *Lactuca sativa*.

No ensaio de fitotoxicidade, T6 e T7 demonstraram estímulo no crescimento radicular (Figura 6) juntamente com T14, T15 e T16 demonstrando inibição do crescimento radicular. Já pela citometria de fluxo encontramos efeitos estatísticos significativos (Dunnet; $p < 0,05$) nos tratamentos T5 e T12-T16 (Figura 6). T4 e T11 foram incluídos como tratamentos selecionados, pois foram adicionados como tratamentos NOEC ("No Observed Effect Concentration") ou maior concentração com efeito não observado. Assim, os tratamentos selecionados para as análises iniciais em *A. cepa* (citogenética e citometria de fluxo) foram: T4, T5, T6, T7, T11, T12, T13, T14, T15 e T16. A partir desses experimentos, os tratamentos aplicados nos ensaios subsequentes foram definidos de acordo com a necessidade metodológica e com o tipo de resposta a ser investigado (como mencionado no item 4.1).

Figura 6 – Tratamentos selecionados para experimentos subsequentes, com base nos efeitos observados em *Lactuca sativa*.



Legenda: Em a) Crescimento radicular em *Lactuca sativa* após exposição às misturas de fármacos metformina, valsartana e atenolol. b) Tratamentos escolhidos para os demais ensaios. c) Análise por citometria de fluxo em *Lactuca sativa* após exposição às misturas de fármacos metformina, valsartana e atenolol. Asterisco (*) sinaliza diferença estatística em relação ao controle negativo (ANOVA; Dunnett, $p < 0,05$). CN – Controle negativo; T1 – 0.01 µg/L de metformina, 0.00 µg/L de valsartana e 0.01 µg/L de atenolol; T2 – 0.02, 0.00 e 0.02 µg/L respectivamente; T3 – 0.03, 0.01 e 0.04 µg/L; T4 – 0.06, 0.02 e 0.07 µg/L; T5 – 0.12, 0.05 e 0.14 µg/L; T6 – 0.25, 0.09 e 0.29 µg/L; T7 – 0.49, 0.18 e 0.58 µg/L; T8 – 0.98, 0.36 e 1.16 µg/L; T9 – 1.96, 0.73 e 2.31 µg/L; T10 – 3.91, 1.45 e 4.61 µg/L; T11 – 7.82, 2.90 e 9.21 µg/L; T12 – 15.63, 5.79 e 18.42 µg/L; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L; T14 – 62.53, 23.13 e 73.68 µg/L; T15 – 125.05, 46.26 e 147.35 µg/L; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L. S-G1 – subpartículas com intensidade de fluorescência inferior à G1; G1 – núcleos em G1 do ciclo celular; S – Núcleos em S do ciclo celular; G2/M – Núcleos em G2 ou início de prófase do ciclo celular; FSC – Diâmetro nuclear; SSC – Complexidade nuclear; IFa – Intensidade de fluorescência dos núcleos G1; CV – Coeficiente de variação dos núcleos em G1. Fonte: Elaborada pela autora (2025).

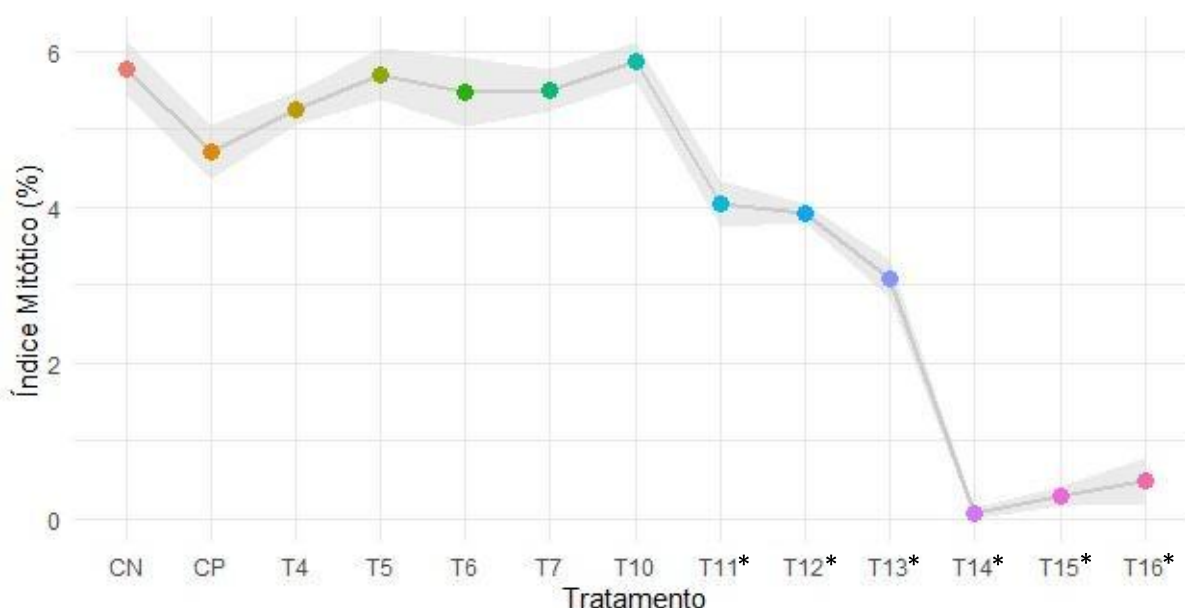
5.2 ENSAIOS EM *Allium cepa*

5.2.1 Análise de citogenotoxicidade por citogenética em *A. cepa*

A análise citogenética foi conduzida em células meristemáticas de *Allium cepa* com o objetivo de investigar potenciais efeitos citogenotóxicos dos tratamentos. Os resultados referentes ao índice mitótico (IM), estão apresentados na Figura 7. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os tratamentos de menor concentração (T4 a T7). Esses tratamentos mantiveram percentuais de células em divisão próximos ao controle negativo.

Por outro lado, os tratamentos com concentrações mais elevadas, a partir do T11, apresentaram reduções significativas no índice mitótico em comparação ao controle negativo, indicando um efeito inibitório dependente da concentração (Figura 7). Notadamente, os tratamentos T14, T15 e T16 exibiram os menores índices mitóticos, sendo o T14 o mais afetado, com apenas 0,07% de células em divisão. Esses resultados evidenciam uma inibição acentuada da atividade mitótica. Além disso, o controle positivo (MMS – 10 mg/L) apesar de aumentar o percentual de alterações nas células, não afetou o IM.

Figura 7 – Percentual mitótico nos diferentes tratamentos avaliados.

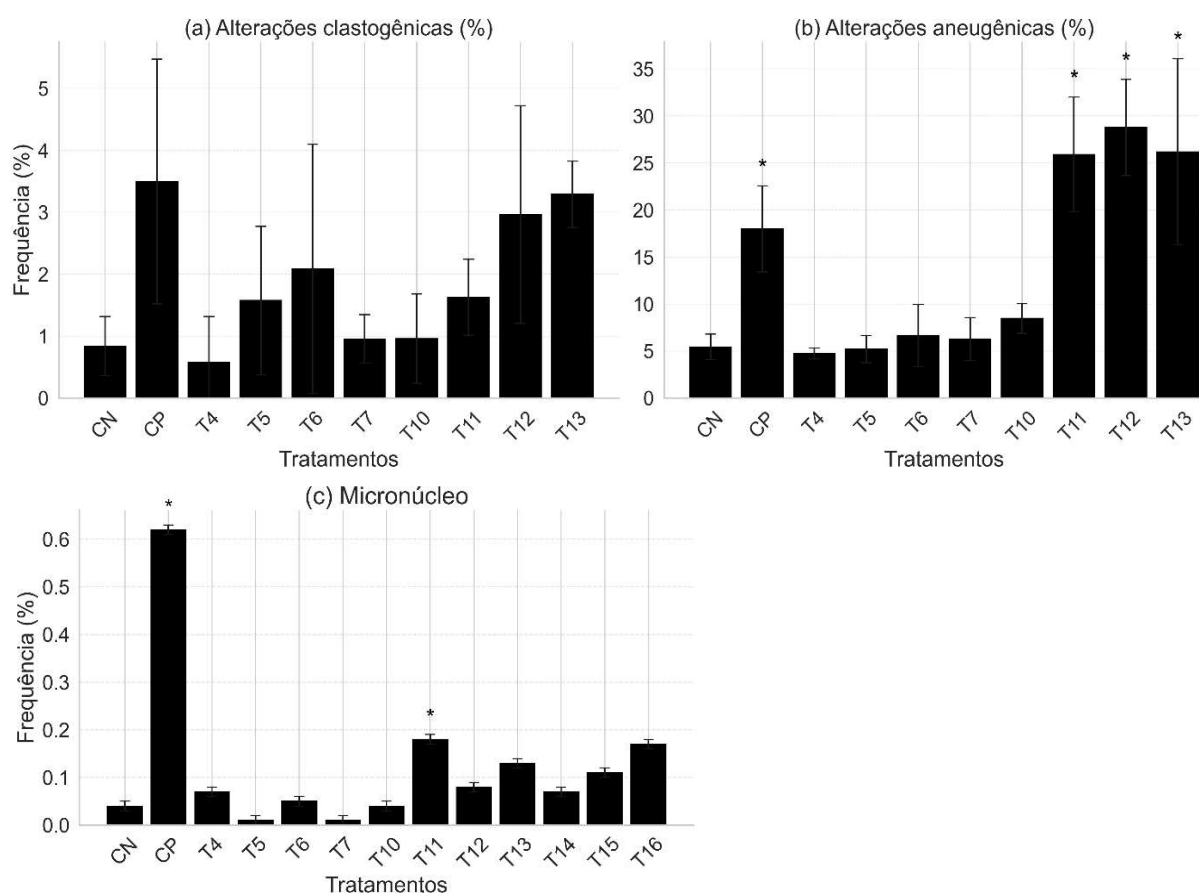


Legenda: Tratamentos seguidas de asterisco (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo (ANOVA; Dunnet; $p < 0.05$). A faixa sombreada representa o desvio padrão. CN – controle negativo; CP – controle positivo (MMS – 10 mg/L); T4 – 0.06 µg/L de

metformina, 0.02 µg/L de valsartana e 0.07 µg/L de atenolol; T5 – 0.12, 0.05 e 0.14 µg/L respectivamente; T6 – 0.25, 0.09 e 0.29 µg/L; T7 – 0.49, 0.18 e 0.58 µg/L; T8 – 0.98, 0.36 e 1.16 µg/L; T9 – 1.96, 0.73 e 2.31 µg/L; T10 – 3.91, 1.45 e 4.61 µg/L; T11 – 7.82, 2.90 e 9.21 µg/L; T12 – 15.63, 5.79 e 18.42 µg/L; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L; T14 – 62.53, 23.13 e 73.68 µg/L; T15 – 125.05, 46.26 e 147.35 µg/L; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L. Fonte: autoral (2025).

Outra análise realizada foi em relação aos percentuais de alterações cromossômicas (Figura 8). As alterações foram agrupadas como aneugênicas (relacionadas com mau funcionamento do fuso mitótico) ou clastogênicas resultantes de quebras no DNA. Além disso, foi avaliado a frequência de micronúcleos. O percentual de alterações aneugênicas foi superior ao de clastogênicas (Figura 8).

Figura 8 - Percentual de alterações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes misturas de metformina, atenolol e valsartana.



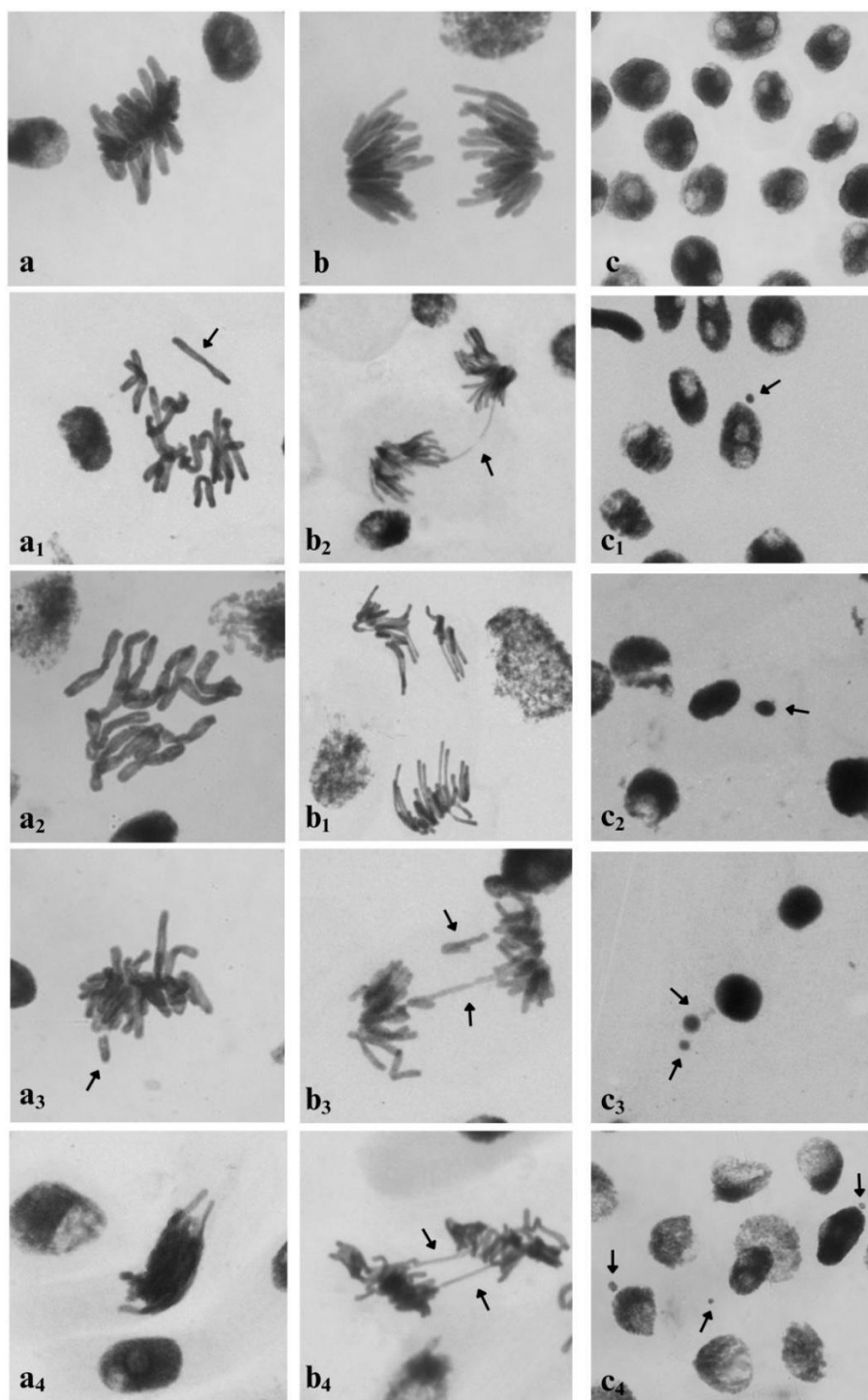
Legenda: (a) Alterações classificadas como clastogênicas; (b) alterações aneugênicas; (c) percentual total de micronúcleos. Barras seguidas de asterisco (*) indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo (ANOVA, Dunnett, $p < 0,05$). CN – controle negativo; CP – controle positivo (MMS- 10 mg/L); T4 – 0.06 µg/L de metformina, 0.02 µg/L de valsartana e 0.07 µg/L de

atenolol; T5 – 0.12, 0.05 e 0.14 µg/L respectivamente; T6 – 0.25, 0.09 e 0.29 µg/L; T7 – 0.49, 0.18 e 0.58 µg/L; T8 – 0.98, 0.36 e 1.16 µg/L; T9 – 1.96, 0.73 e 2.31 µg/L; T10 – 3.91, 1.45 e 4.61 µg/L; T11 – 7.82, 2.90 e 9.21 µg/L; T12 – 15.63, 5.79 e 18.42 µg/L; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L; T14 – 62.53, 23.13 e 73.68 µg/L; T15 – 125.05, 46.26 e 147.35 µg/L; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L. Fonte: autoral (2025).

As alterações clastogênicas não demonstraram efeitos significativos (Dunnet; $p < 0,05$). Em relação às alterações aneugênicas, os tratamentos T11, T12 e T13 apresentaram médias significativamente maiores em comparação ao controle negativo (CN) (Figura 8). Esses resultados indicam uma predominância de efeitos aneugênicos induzidos pela exposição à mistura dos fármacos metformina, valsartana e atenolol. Quanto à frequência de micronúcleos, o tratamento T11, além do controle positivo, também apresentou diferenças significativas (Figura 8). Imagens representativas das alterações observadas estão ilustradas na Figura 9.

Ressalta-se que os tratamentos T14, T15 e T16 não foram incluídos na análise estatística das alterações cromossômicas, apenas para presença de micronúcleos, devido à baixa quantidade amostral, decorrente do índice mitótico próximo a zero (Figura 7). No entanto, em algumas lâminas destes tratamentos, especialmente T15 e T16, observou-se elevada condensação cromossômica, acompanhada de alterações sugestivas de efeitos aneugênicos ou de indução de morte celular (Figura 10). Dentre essas alterações, destacam-se modificações em metáfases, como a presença de metáfases com morfologia cromossômica atípica (Figura 10).

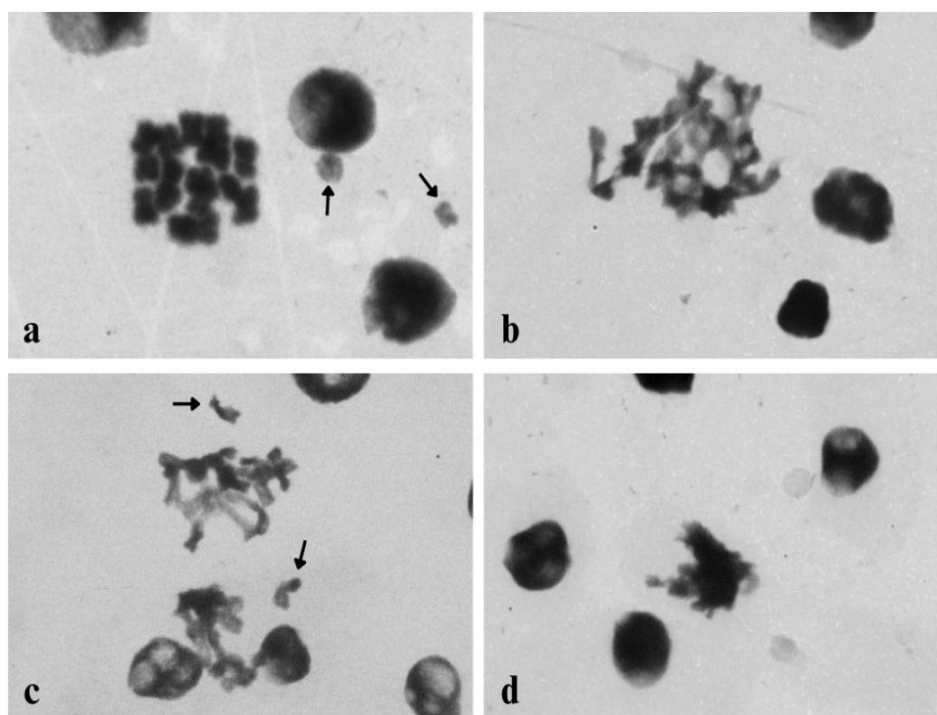
Figura 9 - Imagens representativas de alterações citogenéticas em *Allium cepa* comumente observadas nos tratamentos T11, T12 e T13.



Legenda: (a) metáfase normal; (a₁) metáfase com perda cromossômica; (a₂) c-metáfase; (a₃) metáfase com fragmento cromossômico; (a₄) metáfase com cromossomo aderente; (b) anáfase normal; (b₁) anáfase com segregação tardia; (b₂) anáfase multipolar; (b₃) anáfase com ponte e perda cromossômica; (b₄) anáfase com pontes cromossômicas; (c) núcleos interfásicos normais; (c₁-c₄) núcleos interfásicos

portadores de micronúcleos de diferentes tamanhos. T11 – 7.82 µg/L de metformina; 2.90 µg/L de valsartana e 9.21 µg/L de atenolol; T12 – 15.63, 5.79 e 18.42 µg/L, respectivamente; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L. Fonte: autoral (2025).

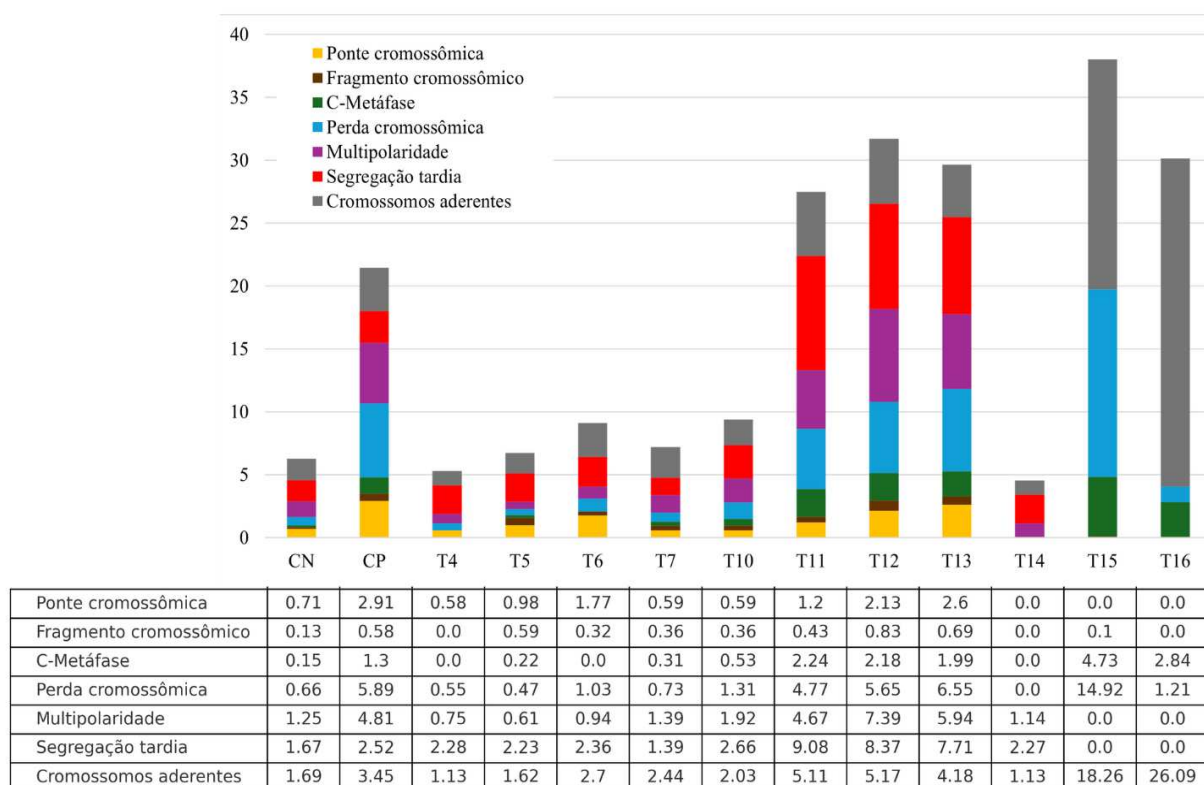
Figura 10 - Imagens representativas de alterações citogenéticas em *Allium cepa* observadas nos tratamentos T15 e T16.



Legenda: (a) c-metáfase com alta condensação cromossômica e núcleos interfásicos portadores de micronúcleos; (b) metáfase com morfologia cromossômica alterada; (c) metáfases com perdas cromossômicas; (d) metáfase com cromossomos aderentes. T15 – 125.05 µg/L de metformina, 46.26 µg/L de valsartana e 147.35 µg/L de atenolol; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L, respectivamente. Fonte: autoral (2025).

A frequência de cada tipo de alteração avaliada encontra-se descrita na Figura 11. Entre as alterações observadas, a aderência cromossômica foi a mais recorrente, seguida por perda cromossômica e pela segregação tardia. Nos tratamentos T15 e T16, observou-se uma frequência absoluta elevada de alterações cromossômicas, uma vez que praticamente todas as poucas células em divisão apresentaram anomalias. As alterações relatadas na imagem 10, referentes a anomalias na morfologia cromossômica foram incluídas na categoria: cromossomos aderentes. Além disso, é possível notar que a frequência de alterações nos tratamentos T11, T12 e T13 foram mais elevadas que o próprio controle positivo, sendo a segregação tardia a alteração mais recorrente nestes tratamentos.

Figura 11 - Percentual de cada tipo de alteração cromossômica observado em células meristemáticas de *Allium cepa* após 48h de exposição às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.



Legenda: CN – controle negativo; CP – controle positivo (MMS – 10 mg/L); T4 – 0.06 µg/L de metformina, 0.02 µg/L de valsartana e 0.07 µg/L de atenolol; T5 – 0.12, 0.05 e 0.14 µg/L respectivamente; T6 – 0.25, 0.09 e 0.29 µg/L; T7 – 0.49, 0.18 e 0.58 µg/L; T8 – 0.98, 0.36 e 1.16 µg/L; T9 – 1.96, 0.73 e 2.31 µg/L; T10 – 3.91, 1.45 e 4.61 µg/L; T11 – 7.82, 2.90 e 9.21 µg/L; T12 – 15.63, 5.79 e 18.42 µg/L; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L; T14 – 62.53, 23.13 e 73.68 µg/L; T15 – 125.05, 46.26 e 147.35 µg/L; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L. Fonte: autoral (2025).

5.2.2 Análise de citogenotoxicidade por citometria de fluxo em *A. cepa*

De maneira similar aos demais ensaios, a análise por citometria de fluxo em meristemas radiculares de *Allium cepa*, após 48 horas de exposição às misturas dos fármacos revelou interferências na progressão do ciclo celular e indícios de morte celular (Tabela 3). Os tratamentos intermediários, como T5, T6 e T7, estimularam a entrada das células em divisão, evidenciada pelo aumento dos percentuais de núcleos nas fases S e G2/M. O tratamento T7, por exemplo, elevou esses percentuais para 27,66% (fase S) e 29,56% (fase G2/M). Por outro lado, concentrações mais altas, a partir do tratamento T11, resultaram em efeito oposto, com reduções

progressivas nos percentuais dessas fases. Entre os tratamentos T11 e T16, a redução da fase S variou de 1,11 vezes menor (T11) até 5,73 vezes menor (T16), em comparação com o controle. Para G2/M, reduções significativas foram observadas a partir do tratamento T13, alcançando uma diminuição de 12,07 vezes menor em T16, em comparação com o controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Variáveis analisadas por citometria de fluxo em meristemas radiculares de *Allium cepa* após 48h de exposição às misturas dos fármacos metformina, valsartana e atenolol.

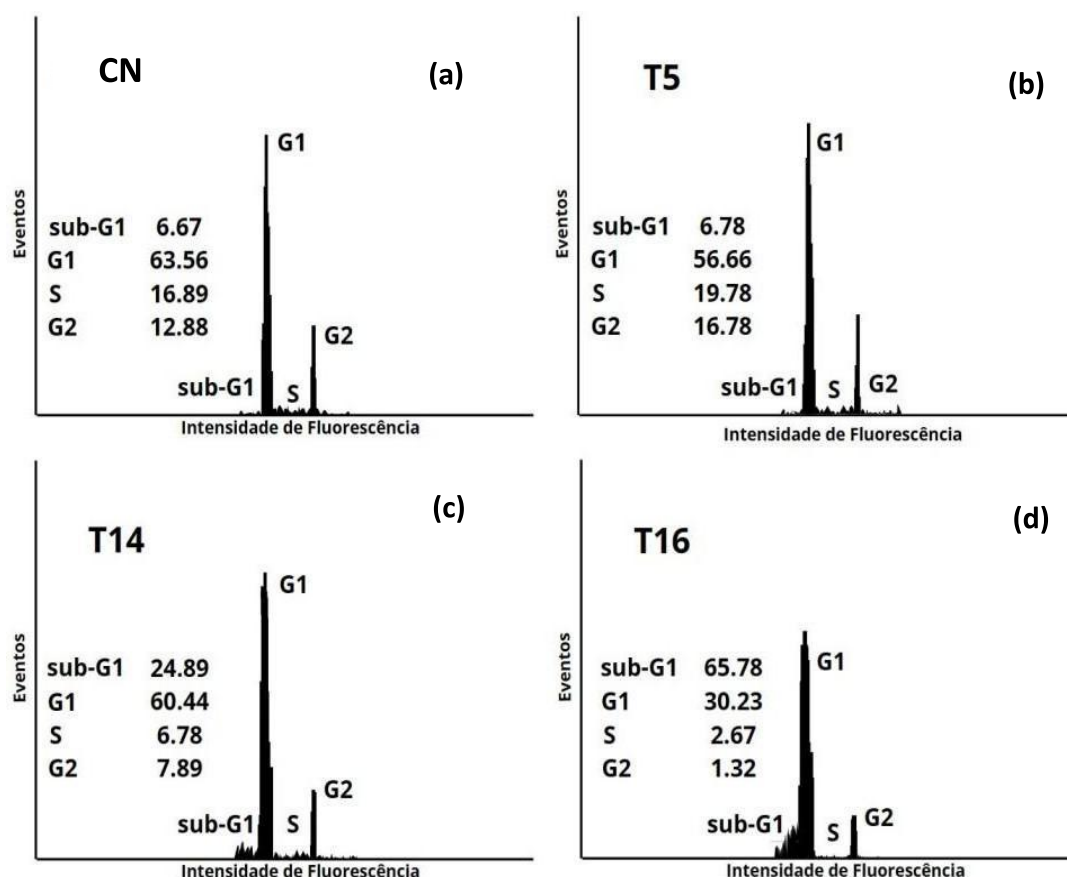
Tratamentos	% SubG1	% G1	% S	% G2	FSC	SSC	IFa	CV
CN	6.66	63.23	16.34	13.77	100	100	100	3.88
T4	6.85	60.97	17.13	15.05	100.33	99.78	100.56	3.74
T5	6.97	57.16*	19.43*	16.44*	99.15	98.88	99.52	4.06
T6	7.13	55.66*	20.06*	17.15*	100.37	99.11	99.29	3.8
T7	6.74	54.56*	20.86*	17.84*	99.81	99.93	99.7	4.39
T10	7.32	61.4	16.92	14.36	99.42	99.17	99.77	3.95
T11	6.97	65.21	14.07*	13.75	99.8	99.37	99.56	3.94
T12	7.74	65.54	13.17*	13.55	98.53	99.89	100.7	5.03*
T13	15.30*	65.9	9.00*	9.81*	97.50*	98.15	99.68	5.93*
T14	24.59*	61.93	6.73*	6.75*	95.73*	96.59*	96.07*	6.75*
T15	34.26*	55.71*	6.22*	3.81*	94.89*	91.85*	93.63*	6.33*
T16	65.47*	30.54*	2.85*	1.14*	93.15*	90.58*	90.62*	7.18*

Notas: (*) Diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA, Dunnet, $p < 0,05$). CN – Controle negativo; T5 – 0.12 µg/L de metformina, 0.05 µg/L de valsartana e 0.14 µg/L de atenolol; T6 – 0.25, 0.09 e 0.29 µg/L respectivamente; T7 – 0.49, 0.18 e 0.58 µg/L; T8 – 0.98, 0.36 e 1.16 µg/L; T9 – 1.96, 0.73 e 2.31 µg/L; T10 – 3.91, 1.45 e 4.61 µg/L; T11 – 7.82, 2.90 e 9.21 µg/L; T12 – 15.63, 5.79 e 18.42 µg/L; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L; T14 – 62.53, 23.13 e 73.68 µg/L; T15 – 125.05, 46.26 e 147.35 µg/L; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L. S-G1 – subpartículas com intensidade de fluorescência inferior à G1; G1 – núcleos em G1 do ciclo celular; S – Núcleos em S do ciclo celular; G2/M – Núcleos em G2 ou início de prófase do ciclo celular; FSC – Diâmetro nuclear; SSC – Complexidade nuclear; IFa – Intensidade de fluorescência dos núcleos G1; CV – Coeficiente de variação dos núcleos em G1.

Além disso, as variáveis sub-G1 (subpartículas-G1), FSC (tamanho nuclear), SSC (complexidade nuclear), IFa (intensidade de fluorescência) e CV (coeficiente de variação) podem ser indicativas de morte celular e/ou efeitos citogenotóxicos. Alterações significativas nessas variáveis foram observadas a partir do tratamento T12 (Tabela 3). O coeficiente de variação, por exemplo, aumentou de 3,88% (CN) para 5,03% (T12), representando um

acréscimo de 29,64%. A partir do T13, todos os tratamentos induziram aumentos progressivos no CV, atingindo 85,05% no T16. Esse mesmo ponto de corte (T13) marcou o início de efeitos significativos nas variáveis sub-G1 e FSC. O tratamento T13 elevou os valores de sub-G1 em 5,14 vezes, enquanto o T16 alcançou 9,83 vezes. Já os núcleos do tratamento T13 apresentaram redução de 2,50% no FSC, chegando a 6,85% em T16 (Tabela 3). Por fim, SSC e IFa mostraram alterações estatisticamente significativas apenas a partir do tratamento T14 (Tabela 3). Histogramas representativos dessas análises estão apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Histogramas representativos da análise por citometria de fluxo em células meristemáticas de *Allium cepa* após exposição às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.



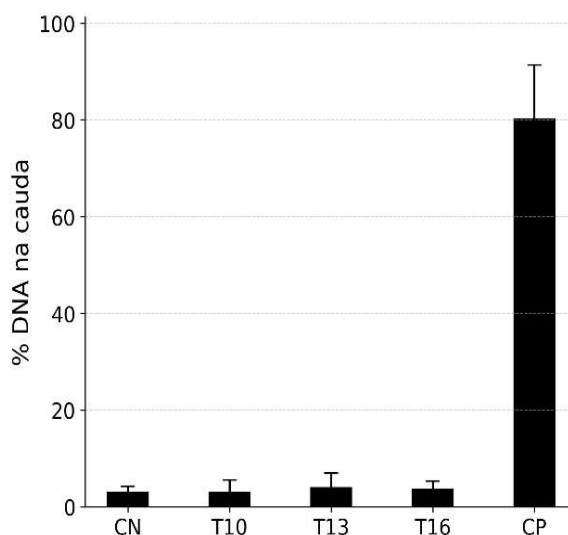
Legenda: Em (a) histograma mostrando cada fase celular do tratamento controle negativo (CN) (G1, S, G2). (b) Histograma mostrando núcleos de *A. cepa* expostos ao Tratamento T5 (0.12 µg/L de metformina, 0.05 µg/L de valsartana e 0.14 µg/L de atenolol). Observe em (b) a diminuição de núcleos em G1 e consequente aumento da porcentagem de núcleos em G2. Em (c) e (d), células expostas aos tratamentos T14 (62.53 µg/L de metformina, 23.13 µg/L de valsartana e 73.68 µg/L de atenolol) e T16

(250.1 µg/L de metformina, 92.52 µg/L de valsartana e 294.7 µg/L de atenolol), respectivamente. Percebe-se um aumento de subpartículas-G1; diminuição de núcleos em G2/M e aumento em CV para os núcleos em G1.

5.2.3 Análise de genotoxicidade pelo ensaio cometa em *A. cepa*

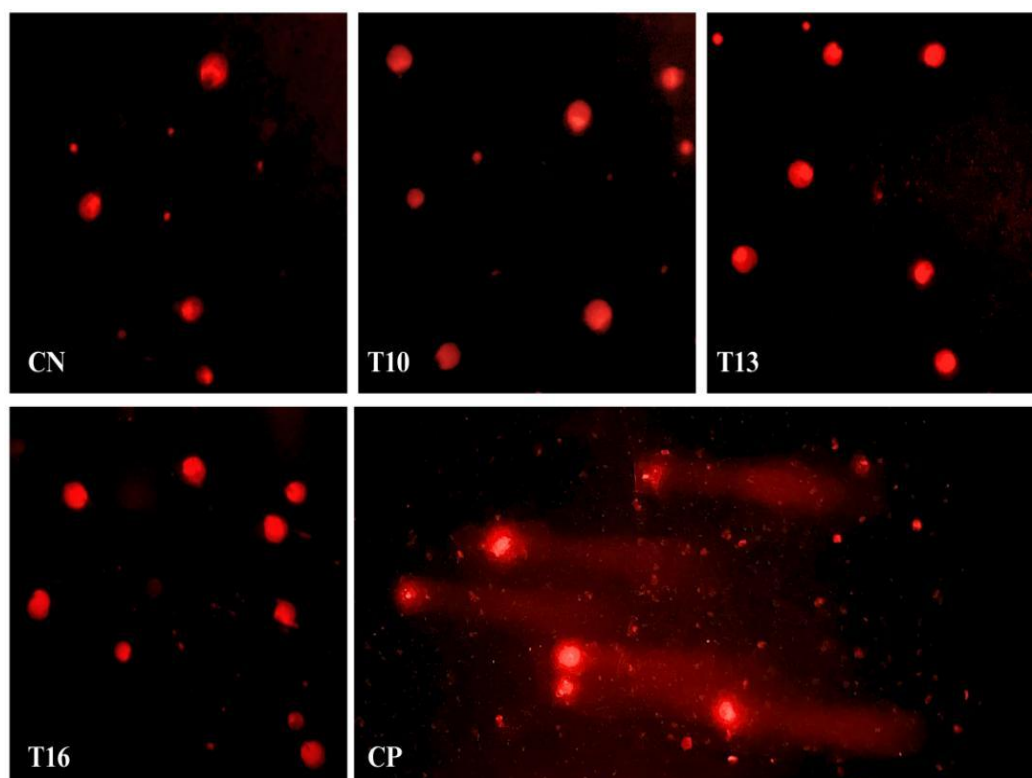
Danos ao DNA, evidenciados pela elevada porcentagem de DNA presente na cauda dos cometas, foi reportada apenas para o controle positivo (Figura 13). A exposição ao NaCl resultou em níveis elevados de dano, com porcentagens de DNA na cauda superiores a 70% e nucleoides classificados no escore 4. A Figura 14 (CP) apresenta um exemplo representativo de cometas classe 4, observado após o tratamento com 250 mM de NaCl por 24 horas. Por outro lado, as células pertencentes ao controle negativo, bem como aos tratamentos T10, T13 e T16, após 48h de exposição, mantiveram-se morfologicamente íntegras, sem evidência de danos significativos ao DNA (com porcentagens de DNA na cauda inferiores a 5%). (Figura 13; Figura 14).

Figura 13 - Porcentagem de DNA na cauda de nucleoides obtidos de células de *Allium cepa* expostas às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.



Legenda: CN – controle negativo; CP – controle positivo (NaCl – 250 mM); T10 – 3.91 µg/L de metformina, 1.45 µg/L de valsartana e 4.61 µg/L de atenolol; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L, respectivamente; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L. Fonte: Elaborada pela autora (2025).

Figura 14 – Imagens representativas de nucleoides obtidos por ensaio cometa em células meristemáticas de *Allium cepa* às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.



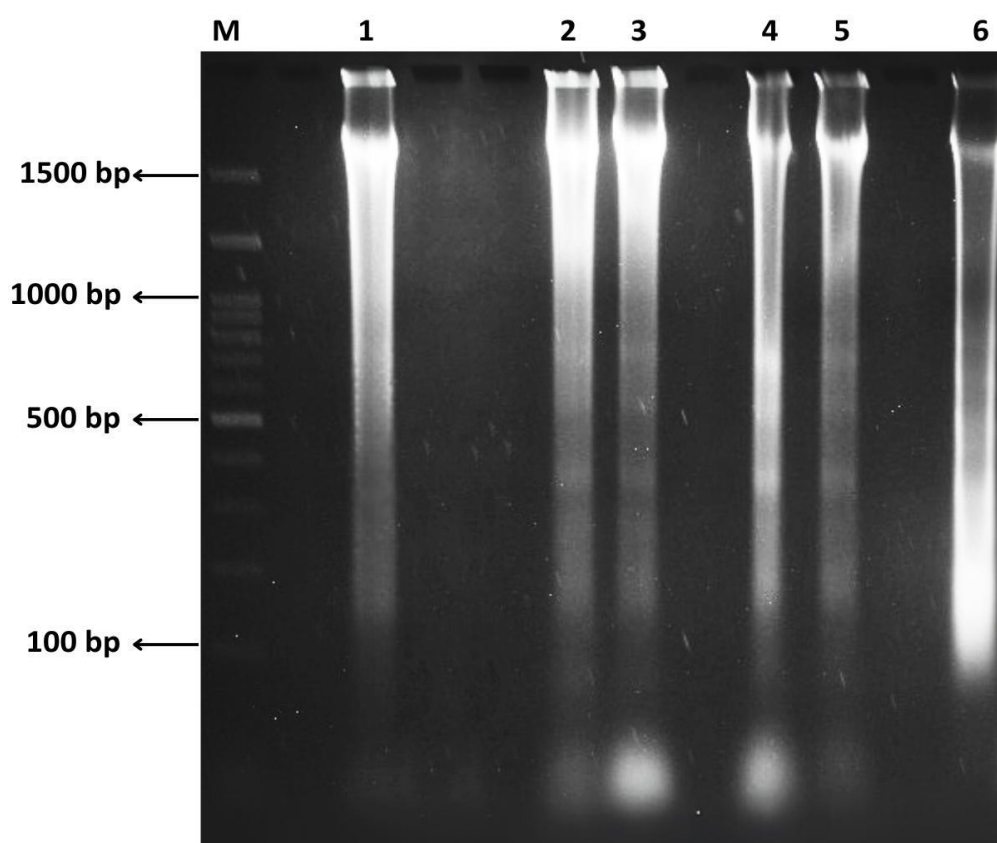
Legenda: Classes de dano ao DNA de acordo com a porcentagem de DNA presente na cauda. (CN; T10; T13; T16): Escore 0 – sem danos observado (<5%). (CP): Escore 4 – alto nível de dano (>70%). CN – controle negativo; CP – controle positivo (NaCl 250 mM); T10 – 3.91 µg/L de metformina, 1.45 µg/L de valsartana e 4.61 µg/L de atenolol; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L, respectivamente; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L. Fonte: autoral (2025).

5.2.4 Análise de fragmentação do DNA por eletroforese

Por meio da análise em gel de agarose, foi possível observar, nas linhas correspondentes aos tratamentos investigados (2 a 5), a formação de um padrão de bandas característico de *DNA laddering*, indicativo de fragmentação internucleossomal associada à apoptose (Figura 15).

Em contraste, o controle positivo (linha 6) apresentou um arraste difuso pronunciado, especialmente nas regiões de baixa massa molecular, compatível com danos genotóxicos severos (Figura 15).

Figura 15 – Eletroforese demonstrando a ocorrência de *DNA-laddering* em meristemas radiculares de *A. cepa* após exposição às misturas dos fármacos metformina, valsartana e atenolol.



Legenda: Linhas: (M) Marcador de 100 bp; (1) Controle negativo; (2)–(3) Células expostas ao Tratamento 14; (4)–(5) Células expostas ao Tratamento 16; (6) Controle positivo. Observa-se a formação de *DNA ladder* nas linhas 2 a 5, indicativa de fragmentação internucleossomal. Na linha 6, nota-se um arraste difuso na extremidade inferior do gel, sugerindo fragmentação e degradação extensiva do material genético induzida pelo controle positivo. CN – controle negativo; CP – controle positivo (NaCl – 250 mM); T14 – 62.53 µg/L de metformina, 23.13 µg/L de valsartana e 73.68 µg/L de atenolol; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L, respectivamente. Fonte: autoral (2025).

5.2.5 TUNEL

O processo de morte nas células meristemáticas expostas às misturas dos PhAcs foi também verificado pelo ensaio TUNEL, avaliado por citometria de fluxo. Foi possível observar um aumento no percentual de núcleos positivos para marcação TUNEL após as 48h de exposição. O tratamento T14 apresentou um aumento percentual de 121,34% em comparação com o controle negativo, enquanto o T16, 183,15% (Tabela 4).

Tabela 4 – Células meristemáticas de *A. cepa* TUNEL-positivas após exposição às misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.

Tratamentos	(%) Núcleos TUNEL-positivos
CN	14.56
CP	61.23*
T14	32.23*
T16	41.22*

Notas: (*) Diferenças significativas em relação ao controle negativo (ANOVA, Dunnet, $p < 0,05$). CN: controle negativo; CP – controle positivo (NaCl – 250 mM); T14 – 62.53 µg/L de metformina, 23.13 µg/L de valsartana e 73.68 µg/L de atenolol; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L, respectivamente.

5.3 ENSAIO DE ECOTOXICIDADE EM *Daphnia magna*

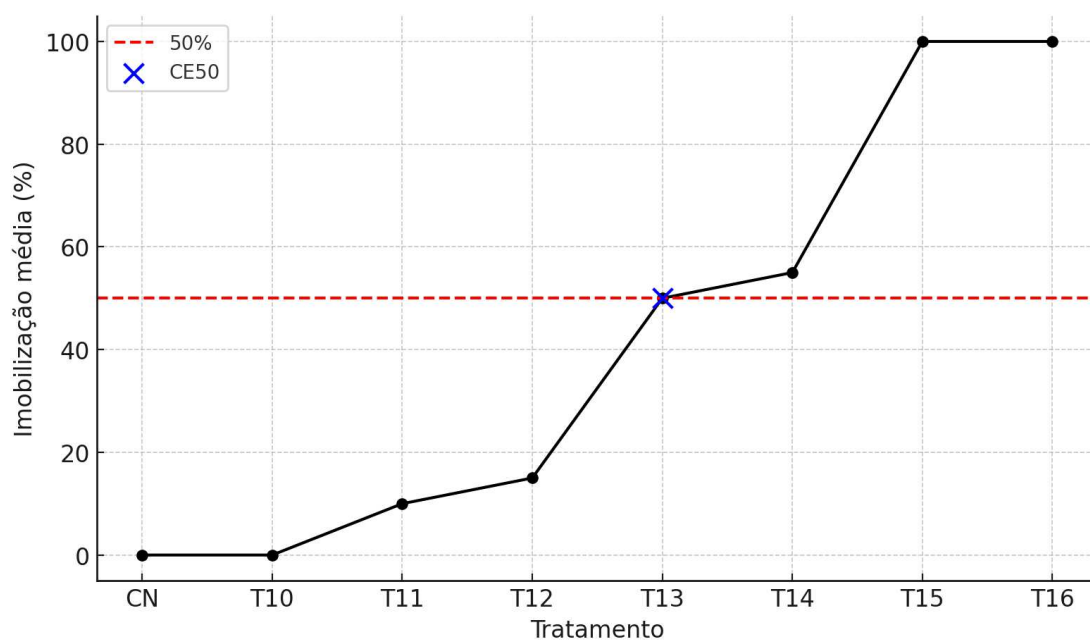
Os resultados do teste de imobilização aguda em *D. magna* são mostrados na Tabela 5. Os primeiros efeitos de imobilização aparecem no tratamento 11, com 10% dos indivíduos investigados apresentando imobilização. O tratamento T13, apresentou 50% de imobilização em relação ao controle negativo, sendo este tratamento considerado como uma estimativa empírica da CE_{50} da mistura dos três fármacos, com base nos efeitos observados (Figura 16). Este tratamento possui 31,26 µg/L de metformina, 11,57 µg/L de valsartana e 36,84 µg/L de atenolol. As maiores concentrações testadas, T15 e T16 inibiram por completo a mobilidade dos animais (Tabela 5, Figura 16).

Tabela 5 – Imobilização em *D. magna* após exposição à tratamentos com misturas dos fármacos metformina, valsartana e atenolol.

Tratamentos	Média ± DP	Percentual (%)
CN	0.00 ± 0.00	0
T10	0.00 ± 0.00	0
T11	0.50 ± 0.58	10
T12	0.75 ± 0.50	15
T13	2.50 ± 0.58	50
T14	2.75 ± 0.50	55
T15	5.00 ± 0.00	100
T16	5.00 ± 0.00	100

Legenda: Média de imobilização ± Desvio padrão; CN – controle negativo; T10 – 3.91 µg/L de metformina, 1.45 µg/L de valsartana e 4.61 µg/L de atenolol; T11 – 7.82, 2.90 e 9.21 µg/L, respectivamente; T12 – 15.63, 5.79 e 18.42 µg/L; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L; T14 – 62.53, 23.13 e 73.68 µg/L; T15 – 125.05, 46.26 e 147.35 µg/L; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L.

Figura 16 - Percentual médio de imobilização de *Daphnia magna* nos diferentes tratamentos avaliados, após a exposição a misturas dos fármacos, metformina, valsartana e atenolol.



Legenda: CE50 – concentração efetiva que causa 50% de imobilização; CN – controle negativo; T10 – 3.91 µg/L de metformina, 1.45 µg/L de valsartana e 4.61 µg/L de atenolol; T13 – 31.26, 11.57 e 36.84 µg/L, respectivamente; T16 – 250.1, 92.52 e 294.7 µg/L. Fonte: Elaborada pela autora (2025).

6 DISCUSSÃO

Metformina, Valsartana e Atenolol são compostos farmacologicamente ativos (PhACs) produzidos para induzir respostas biológicas em organismos alvo (Barros et al., 2022). No entanto, a exposição de organismos não-alvo a esses compostos representa um risco. Estudos têm demonstrado que PhACs podem influenciar o ecossistema, mesmo em baixas concentrações (Afsa et al., 2020; Prichard; Granek, 2016). Apesar da presença de PhACs no meio ambiente ser bem documentada na literatura, encontra-se ainda uma lacuna a respeito dos seus efeitos adversos, como efeitos ecotóxicos ou citogenotóxicos, principalmente sendo avaliados em misturas, que é a forma como são encontrados no ambiente (Cleuvers, 2003). Desse modo, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito eco-cito-genotóxico de misturas dos fármacos, metformina, atenolol e valsartana, em diferentes organismos modelo (*Lactuca sativa*, *Daphnia magna* e *Allium cepa*).

Os resultados obtidos mostraram que à exposição às misturas dos PhACs conduz a danos eco-cito-genotóxicos. O desenvolvimento das plantas é um dos parâmetros mais diretos e visuais para avaliar a toxicidade causada por poluentes (Haider et al., 2021). Diante disso, avaliamos primeiramente os efeitos das misturas dos PhACs sobre a germinação e crescimento radicular em *Lactuca sativa*.

Em relação à germinação das sementes, não foram observadas variações significativas no número de sementes germinadas nos tratamentos avaliados quando comparados ao controle negativo, indicando que a mistura dos fármacos não teve nenhum efeito adverso na germinação, o que está de acordo com vários estudos que também relataram a falta de sensibilidade da germinação de sementes em estudos ecotoxicológicos (Han et al., 2023; Pino et al., 2016; Priac; Badot; Crini, 2017; Rede et al., 2019). Apesar da taxa de germinação ser uma variável comumente utilizada, ela não é uma das mais sensíveis. A germinação das sementes é um processo altamente conservado entre as espécies vegetais, no qual os tecidos embrionários utilizam os nutrientes de reserva, como carboidratos e proteínas, previamente armazenados, para sustentar as fases iniciais do desenvolvimento. A emergência da plântula depende desses recursos, especialmente durante os primeiros estágios. Nesse contexto, o alongamento inicial da radícula ocorre predominantemente por expansão celular, e não por divisão celular (Hillis et al., 2011; Leather; Einhellig, 1988). Além disso, na maioria das sementes, incluindo as de

alface, os tecidos embriogênicos são fisicamente protegidos por tegumentos, tecidos estes que conferem proteção e têm permeabilidade diferencial a uma variedade de substâncias (Soares et al., 2016). Por outro lado, estes autores acreditam que o alongamento da raiz seja uma variável um pouco mais sensível (Hillis et al., 2011; Leather; Einhellig, 1988; Soares et al., 2016).

No presente estudo, conforme ilustrado na Tabela 1, foram observadas variações mais acentuadas no crescimento radicular. A partir do tratamento T11, verificou-se uma diminuição no tamanho radicular em relação ao grupo controle, com destaque para os tratamentos T14, T15 e T16, que apresentaram as maiores taxas de variação no crescimento (ΔC), em torno de 30%. Em contrapartida, tratamentos com concentrações mais baixas, como T6 e T7, promoveram um aumento no crescimento radicular, sendo o tratamento T6 responsável pelo maior ΔC registrado (40,88%). Desse modo, nota-se um padrão de resposta bifásico.

Em relação ao estímulo e respostas bifásicas, Pino et al. (2016) encontraram resultados semelhantes, onde a exposição à ibuprofeno resultou em um aumento significativo do desenvolvimento da raiz de *L. sativa* em comparação ao controle. Migliore et al. (2003) também relataram efeito similar, no qual o antibiótico enrofloxacino em altas concentrações (5000 $\mu\text{g/L}$) causaram efeitos tóxicos, com redução significativa no crescimento radicular e foliar; e em baixas concentrações (50–100 $\mu\text{g/L}$) induziram efeitos horméticos, estimulando o crescimento de algumas estruturas vegetais; em quatro espécies de plantas cultivadas (*Lactuca sativa*, *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris* e *Raphanus sativus*). Além disso, no estudo de Pan e Chu (2016), os antibióticos tetraciclina, sulfametazina, norfloxacina e eritromicina provocaram efeitos bifásicos em diferentes culturas vegetais, estimulando o crescimento de raízes e caules em baixas concentrações (0,01 mg/L), seguidos por inibição em doses mais elevadas – padrão típico de hormese. Segundo Calabrese et al. (2019), as curvas de dose-resposta com padrão hormético geralmente apresentam estímulo discreto, com efeito máximo variando entre 30% e 60% em relação às respostas do grupo controle, padrão semelhante ao observado no presente estudo. Entretanto, de acordo com Morales (2004) o alongamento diferencial da raiz não deve ser interpretado como um efeito favorável ou estimulante, a menos que seja avaliada de maneira conjunta com os efeitos registrados em outros testes. Este efeito bifásico foi percebido em dois outros ensaios;

Por meio da citometria de fluxo realizada em folhas de *L. sativa*, na qual observamos um aumento do percentual de núcleos em G2 para o tratamento T5 (Tabela 2). Núcleos na fase

G2/M na citometria indicam células com DNA duplicado (4C), prontas para entrar na mitose, sendo um marcador importante de proliferação celular e ciclo celular ativo (Darzynkiewicz; Huang; Zhao, 2017). Por outro lado, os tratamentos mais concentrados (T13, T14, T15 e T16) apresentaram inibição expressiva da população de núcleos em G2, sugerindo comprometimento da entrada de núcleos em divisão celular. Tal efeito indica redução no número de núcleos em divisão celular nas folhas de *L. sativa*. Adicionalmente, esses tratamentos, e neste caso também o T12, induziram, de forma geral, aumento da população de sub-G1, redução nos parâmetros de FSC, SSC e IFa além do aumento do coeficiente de variação (CV).

De forma complementar, a análise citométrica conduzida em meristemas radiculares de *Allium cepa* também evidenciou esse padrão bifásico. Observou-se um estímulo à divisão celular nos tratamentos T5, T6 e T7, com aumento nos percentuais de núcleos em fases S e G2, acompanhado da redução de núcleos em G1 (Tabela 3). As proporções de núcleos nas fases S, G2 e início da prófase (representadas pela soma S + G2/M) correspondem a núcleos comprometidas no processo de divisão celular. Já as fases de metáfase, anáfase e telófase não são detectadas na citometria de fluxo convencional, uma vez que a ausência da membrana nuclear impede a marcação e análise (Marques et al., 2025). Por outro lado, os efeitos inibitórios foram semelhantes aos verificados em *L. sativa*: houve redução dos núcleos em S (de T11 a T16) e em G2 (de T13 a T16), acompanhada de aumento de sub-G1 (de T13 a T16), diminuição dos valores de FSC (de T13 a T16), SSC e IFa (de T14 a T16) e aumento do CV (de T12 a T16).

A ativação dos pontos de verificação do ciclo celular é um mecanismo essencial para garantir a sobrevivência celular frente a danos. No entanto, em casos de lesões mais severas, vias de morte celular são ativadas, podendo ser detectadas por citometria de fluxo por meio de alterações nos parâmetros FSC, SSC e na intensidade de fluorescência dos núcleos em G1 (IFa) (Marques et al., 2025; Miranda et al., 2023). O FSC detecta valores médios de diâmetros nucleares menores do que os observados no controle negativo, indicando a presença de núcleos condensados, que é um dos primeiros estágios do processo de morte celular (Andrade-Vieira; De Campos; Davide, 2012). Da mesma maneira, quando iniciado o processo apoptótico, a condensação faz com que os núcleos tenham sua complexidade (SSC) reduzida. A diminuição do IFa também pode ser associada à condensação dos núcleos, pois dificulta que o corante utilizado para quantificar o DNA (iodeto de propídeo) penetre nos núcleos (Souza et al., 2023).

Além disso, as subpartículas-G1 (sub-G1) representam fragmentos celulares e nucleares, que emitem fluorescência ao entrarem em contato com iodeto de propídeo. No entanto, essas partículas apresentam intensidade de fluorescência inferior à observada na fase G1, pois tendem a ser menores do que núcleos intactos em G1 (Moreira; Lima; Sakamoto-Hojo, 2021). Com isso, aumentos no percentual sub-G1 sugerem a ocorrência de morte celular, já que a fragmentação do DNA se caracteriza como uma das etapas da apoptose (Kajstura et al., 2007; Andrade-Vieira; De Campos; Davide, 2012; Moreira; Lima; Sakamoto-Hojo, 2021). Além disso, o aumento do CV em G1, sugere que a exposição aos contaminantes pode provocar danos clastogênicos ou aneugênicos, ou seja, a presença de núcleos com alterações, como quebras de DNA, fragmentos, perdas cromossômicas, que causam variações nas quantidades de DNA nucleares (Fioresi et al., 2020; Monteiro et al., 2010). Desse modo, as alterações relatadas para estes parâmetros são consistentes com a indução de morte celular ou evidenciam um efeito tóxico sobre o ciclo celular e material genético do organismo exposto (Moreira; Lima; Sakamoto-Hojo, 2021).

Diante disso, os fármacos estudados demonstraram ter um efeito bifásico no desenvolvimento e ciclo celular das plantas avaliadas, caracterizado por uma resposta hormética: com estímulo em baixas concentrações e inibição em concentrações elevadas. A hormese é definida como uma resposta adaptativa de células e organismos a um estresse moderado (Calabrese et al., 2007). As vias de sinalização celular e os mecanismos moleculares que medeiam as respostas horméticas vem sendo elucidados, uma vez que os mecanismos específicos que originam esse tipo de resposta dose-dependente variam de acordo com as condições experimentais. Dessa forma, não existe um mecanismo único ou universal capaz de explicar a ampla diversidade de padrões de resposta hormética observados, embora normalmente envolvam enzimas responsáveis pela produção de proteínas citoprotetoras e restauradoras nas células (Mattson, 2008). Assim, a hormese é um mecanismo de defesa ativado por exposições leves a agentes potencialmente tóxicos, que, em doses baixas, estimulam vias de sinalização celular protetoras e aumentam a resistência a estresses mais severos (Calabrese, 2008).

Nos demais ensaios realizados, observou-se predominantemente um efeito inibitório. Em relação à citogenotoxicidade, a análise citogenética realizada em *A. cepa*, os tratamentos T5, T6 e T7 não diferiram significativamente do controle negativo. Assim, o efeito estimulante

previamente relatado não foi observado neste ensaio. Essa ausência de detecção pode estar relacionada à menor sensibilidade da técnica, uma vez que, na citometria de fluxo, por exemplo, onde o estímulo foi evidenciado, o número de núcleos avaliados é consideravelmente maior, podendo alcançar até 10.000 células. Já em relação aos efeitos inibitórios, um decréscimo significativo no índice mitótico (IM), a partir do tratamento T1 (Figura 7). O IM de um conjunto de células representa o percentual de células em divisão (mitose) na região meristemática, sendo um parâmetro importante para se avaliar o efeito citotóxico (Kassa, 2021). Alterações no IM são indicadores significativos de citotoxicidade e têm sido amplamente empregados em estudos de monitoramento ambiental (Bhat et al., 2017). A diminuição do índice mitótico pode estar associada à interferência no funcionamento de enzimas essenciais à progressão do ciclo celular, como DNA e RNA polimerases, girase e diversas quinases. Esse comprometimento enzimático pode acarretar a inibição da síntese de DNA, no bloqueio das fases G1 e G2 e na interrupção da formação de microtúbulos, afetando diretamente a divisão celular (Aslantürk, 2024; Türkoğlu, 2012). Efeitos citogenotóxicos de medicamentos já foram relatados anteriormente. Das e Ray (2024) avaliaram a citogenotoxicidade da bleomicina, um quimioterápico. Os resultados demonstraram um declínio no índice mitótico com o aumento das concentrações de bleomicina e do tempo de exposição e frequências elevadas de várias anormalidades cromossômicas também foram observadas.

A avaliação do percentual de alterações cromossômicas também é uma ferramenta útil e confiável para testar o efeito genotóxico de uma substância, além de possibilitar a avaliação de suas ações clastogênicas e aneugênicas (Rank; Nielsen, 1997). Alterações cromossômicas, como pontes e fragmentos indicam alterações clastogênicas, enquanto segregação tardia, perdas, multipolaridade, aderência e c-metáfase resultam de alterações aneugênicas. No presente estudo, verificamos que o percentual total de alterações aneugênicas foi maior que o de clastogênicas, indicando que o efeito da mistura dos fármacos tem uma ação predominantemente aneugênica. A taxa de alterações clastogênicas não apresentou diferenças estatísticas. Ao passo que, nas aneugênicas essa diferença foi observada a partir do tratamento T11. Dentre as alterações quantificadas no estudo, as mais recorrentes foram cromossomos aderentes, perda cromossômica, segregação tardia e multipolaridade.

De acordo com Fiskesjo e Levan (1993) e Türkoğlu (2007), a aderência cromossômica é uma alteração frequentemente associada a efeitos tóxicos intensos. Resulta da perda da

capacidade normal de condensação dos cromossomos, levando à formação de aglomerados e podendo provocar danos irreversíveis no material genético, o que pode desencadear processos de morte celular. Além disso, segundo Marcano (2004), a aderência cromossômica pode dar ainda, origem a pontes cromossômicas, frequentemente múltiplas (conforme ilustrado na Figura 9b₄), que, por sua vez, podem resultar em quebras cromossômicas.

Já a perda cromossômica, segregação tardia e multipolaridade indicam falhas na formação do fuso mitótico, possivelmente causadas pela ação direta de agentes tóxicos, neste caso das misturas dos fármacos, que interferem na dinâmica dos microtúbulos, comprometendo seus processos de polimerização e despolimerização (Leme; Marin-Morales, 2008). Cromossomos que não se alinham adequadamente podem não ser reincorporados ao núcleo principal durante a divisão celular, sendo excluídos do conjunto cromossômico e originar estruturas denominadas micronúcleos (MN) (Fenech, 2000). Desse modo, os MN podem se originar a partir de fragmentos acêntricos (agente clastogênico) ou cromossomos inteiros (agente aneugênico), e são formados em células-filhas como resultado de danos ao material genético que não foram devidamente reparados, ou que foram corrigidos de forma incorreta durante a divisão celular (Fernandes; Mazzeo; Marin-Morales, 2007), por essa razão a presença de micronúcleos é frequentemente associado a efeito mutagênicos (Leme; Marin-Morales, 2009). Segundo Yamamoto e Kikuchi (1980), a análise do diâmetro dos micronúcleos pode auxiliar na distinção entre agentes clastogênicos e aneugênicos. De modo geral, os autores observaram que os MN gerados por compostos clastogênicos tendem a apresentar tamanhos menores do que aqueles formados por agentes com ação aneugênica. No presente estudo, apenas o tratamento T11, além do CP, apresentou frequência de micronúcleos estatisticamente significativa. Embora as demais concentrações tenham exibido valores mais baixos, foi possível observar micronúcleos de diferentes tamanhos nos tratamentos avaliados, conforme ilustrado na Figura 9c.

Desse modo, observamos que a exposição às misturas dos fármacos pode estar afetando principalmente a função dos microtúbulos ou das proteínas associadas ao fuso mitótico, impedindo a separação adequada dos cromossomos, já que possui efeito predominantemente aneugênico. Fármacos como a metformina são conhecidos por interagir com várias vias metabólicas e podem modular a atividade de proteínas-chave que controlam o ciclo celular, como ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDKs) (Mallik; Chowdhury, 2018). Tal interferência indireta no ciclo celular, pode levar a uma desregulação da mitose, resultando em

falhas na distribuição cromossômica. Além disso, a exposição combinada aos PhACs (metformina, valsartana e atenolol) pode induzir estresse oxidativo nas células, danificando proteínas associadas ao fuso mitótico ou o próprio DNA, o que compromete a correta segregação dos cromossomos durante a divisão celular. Esse mecanismo está diretamente relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que afetam estruturas celulares essenciais à divisão celular. Gómez-Oliván et al. (2014) demonstraram que anti-inflamatórios como diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno e ácido acetilsalicílico induziram estresse oxidativo significativo no microcrustáceo *Hyaella azteca*, tanto em exposições isoladas quanto em misturas binárias. Foram observados aumentos na peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, além de alterações nas enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), indicando que mesmo em concentrações subletais, esses fármacos podem comprometer a integridade celular por meio da geração excessiva de EROs.

Como mencionado anteriormente, em função do baixo índice mitótico, os tratamentos T14, T15 e T16 não foram incluídos na avaliação de genotoxicidade, sendo considerados apenas na análise de mutagenicidade por meio da presença de micronúcleos, a qual não revelou diferenças significativas em relação ao controle. IM tão baixos podem estar associados a indução de morte celular. De acordo com Souza et al. (2020) é crucial considerar apenas concentrações que demonstrem viabilidade celular superior a 80% para a análise de genotoxicidade, uma vez que a quebra do DNA pode ser uma consequência secundária da citotoxicidade. Portanto, a utilização de concentrações citotóxicas pode gerar resultados falso-positivos. No entanto, algumas alterações características de dano genético acumulado e indução de morte celular programada foram observadas especialmente nos tratamentos T15 e T16, como alterações na estrutura do cromossomo, degradação da cromatina, c-metáfases com cromossomos altamente condensados e metáfases aderentes (Figura 10), que como mencionado, são sinais característicos de toxicidade no material genético, muitas vezes resultando em danos irreversíveis. Zabka et al. (2017) encontraram resultados semelhantes, investigando os efeitos da sanguinarina, um alcaloide natural derivado das raízes de *Sanguinaria canadenses*, em células meristemáticas de *A. cepa*, no qual o estresse oxidativo induzido em células tratadas, resultaram em estruturas de cromatina alteradas e “degeneradas”, dentre outros achados, que são característicos de morte celular programada semelhante a apoptose (AL-PCD, do inglês *apoptotic-like programmed cell death*). Segundo Watanabe et al. (2002) dentre as

características morfológicas da AL-PCD, as alterações nucleares são a marca registrada mais proeminente desse processo.

A morte celular programada (MPC) possui funções biológicas essenciais para organismos vivos, podendo ser resultado da senescência de tecidos e células, mas também funciona como um mecanismo de defesa, respondendo, por exemplo, tanto a infecções por patógenos (Künstler et al., 2016), quanto a danos ao DNA e alterações cromossômicas, com o objetivo de eliminar células mutantes e impedir que essas anomalias sejam transmitidas às células-filha (Palmieri et al., 2014). No presente trabalho, a MPC para os tratamentos mais concentrados (T14, T15 e T16) foi confirmada por meio da eletroforese de DNA. Foi possível observar um padrão de DNA *laddering*, evidenciando a fragmentação característica do apoptose. A apoptose, uma forma específica de MPC, é um processo altamente regulado, iniciado pela ativação de proteases endógenas, que levam à desorganização do citoesqueleto (Pennell; Lamb, 1997). Esse tipo de morte celular é caracterizado por redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA em múltiplos de aproximadamente 180 pares de bases – um padrão típico resultante da ação de endonucleases específicas que cortam o DNA nas regiões internucleossômicas (Majtnerová; Roušar, 2018). Por outro lado, no controle positivo, que provocou um estresse celular mais intenso, foi observado um padrão de *"smear"* no gel, indicativo de quebras aleatórias do DNA. Esse resultado sugere a ocorrência de necrose, uma forma não programada de morte celular e altamente inflamatória (Staley; Blaschke; Chun, 1997; Valenzuela et al., 2000).

Além disso, o ensaio TUNEL reforçou a ocorrência de MCP para estes tratamentos (T14 a T16), uma vez que as células meristemáticas expostas aos PhACs apresentaram um aumento progressivo na proporção de núcleos TUNEL-positivos conforme aumento da concentração. Células TUNEL-positivas indicam um aumento de extremidades 3'-OH nas fitas de DNA, consequência da fragmentação característica de processos de morte celular programada (Katsuhara, 1997). Embora células expostas ao controle positivo (NaCl) também sejam TUNEL-positivas, não há nenhuma outra característica proeminente de apoptose nessas células, indicando um possível processo necrótico, como observado pela eletroforese. Segundo Behboodi e Samadi (2004), a elevada fragmentação de DNA durante os estágios finais da necrose é responsável pela alta e inesperada positividade para o TUNEL. Desse modo, embora a reação de TUNEL seja amplamente utilizada como marcador de fragmentação de DNA

durante a morte celular programada em plantas, sua aplicação isolada não é suficiente para confirmar a ocorrência de apoptose (Gavrieli; Sherman; Ben-Sasson, 1992; Kelly et al., 2003). No presente estudo, resultados obtidos através da análise citogenética, citometria de fluxo, eletroforese e TUNEL confirmaram a indução de apoptose para as maiores concentrações das misturas.

Já em relação ao ensaio cometa, não foram observadas formações de cauda nos tratamentos testados. O ensaio cometa é sensível à detecção de lesões primárias no DNA, como quebras de fita simples e duplas, que representam os estágios iniciais do dano genotóxico (Tice et al., 2000). Essas lesões podem ser transitórias e são passíveis de reparo (Møller et al., 2025). Neste estudo, não foram observados danos nos núcleos analisados, sugerindo que os tratamentos não induziram quebras de DNA significativas ou que estas foram prontamente reparadas. Alguns autores sugeriram que cometas com alto grau de fragmentação de DNA poderia estar associados a núcleos de células em apoptose (Florent et al., 1999; Godard et al., 1999; Olive; Fraser; Banáth, 1993). No entanto, evidências mais recentes indicam que o ensaio cometa não é adequado para detectar apoptose de forma específica. Isso porque o ensaio cometa detecta quebras dispersas e aleatórias ao longo da molécula de DNA (Lorenzo et al., 2013). Além disso, estudos demonstraram que, após exposição a agentes genotóxicos como o peróxido de hidrogênio, os cometas altamente danificados (classe 4) podem desaparecer em análises subsequentes, sugerindo que os danos inicialmente observados foram revertidos por mecanismos de reparo celular (Collins et al., 2008). Desse modo, o resultado negativo obtido no ensaio cometa neste estudo sugere que os danos ao DNA induzidos pelos tratamentos testados não decorrem de quebras aleatórias e difusas típicas de genotoxicidade primária, mas sim de um processo organizado e irreversível de fragmentação nucleossômica, compatível com morte celular por apoptose. Além disso, não foram observadas alterações clastogênicas significativas, o que reforça a ausência de danos estruturais fixados no material genético. Esses achados sustentam a hipótese de que as misturas testadas atuam predominantemente por mecanismos citotóxicos apoptóticos nas maiores concentrações (T14, T15 e T16), evidenciado pela presença de cromossomos aderentes (indicativo de dano tóxico intenso) observada na análise citogenética, bem como por alterações em parâmetros indicativos de morte celular, detectadas por citometria de fluxo. Nas concentrações intermediárias (T11, T12 e T13), os

efeitos observados apontam principalmente para a atuação de mecanismos aneugênicos, conforme previamente discutido.

A ecotoxicidade foi também avaliada pelo ensaio agudo de imobilização com *Daphnia magna*, indicou que o tratamento T13 corresponde à CE_{50} , ou seja, foi capaz de imobilizar 50% dos organismos após as 48 horas de exposição. Além disso, foi possível notar um aumento progressivo da imobilização conforme o aumento da concentração, sendo os tratamentos mais concentrados (T15 e T16) prejudiciais à sobrevivência dos organismos, causando 100% de imobilização, o que evidencia o risco dessas substâncias à cadeia trófica aquática, dado o papel ecológico de *D. magna* como recurso alimentar para diversos consumidores secundários. Resultados semelhantes foram observados por Yisa et al. (2023), que relataram taxas de imobilização de 60% com amoxicilina (272 $\mu\text{g/L}$) e 85% com ciprofloxacina ($\leq 6500 \mu\text{g/L}$), ambas em concentrações ambientalmente relevantes. No estudo, os autores atribuíram essas elevadas taxas de imobilização à indução de estresse oxidativo e a alterações bioquímicas significativas em *Daphnia magna*. Embora a ecotoxicidade de alguns fármacos já tenha sido documentada na literatura, o valor de CE_{50} para a mistura obtida no presente estudo (31,26 $\mu\text{g/L}$ de metformina, 11,57 $\mu\text{g/L}$ de valsartana e 36,84 $\mu\text{g/L}$ de atenolol) foram significativamente inferiores aos previamente reportados para os compostos isolados. A título de comparação, Markiewicz et al. (2017) relataram um CE_{50} de 64 mg/L para a metformina, valor substancialmente mais elevado que o observado neste estudo. Já, Minguez et al. (2016) avaliaram a toxicidade de 48 PhACs, entre eles, valsartana e atenolol, ambos os compostos apresentaram baixa toxicidade aguda para *Daphnia magna* nas condições testadas, sendo classificados como “não tóxicos” de acordo com os critérios da Comissão Europeia (1996), que considera compostos com $CE_{50} > 100 \text{ mg/L}$ como não tóxicos para organismos aquáticos. A avaliação do risco ecológico baseada em fármacos isolados pode subestimar os impactos reais causados por misturas presentes nos ecossistemas aquáticos (Godoy et al., 2019). Nesse sentido, os achados do presente estudo reforçam o risco potencial associado à presença de múltiplos fármacos no ambiente, já que tais combinações podem causar efeitos adversos mesmo em concentrações muito baixas. Montiel-Mora et al. (2024), por exemplo, investigaram a toxicidade de 27 PhACs e os efeitos de interações entre misturas binárias em dois organismos modelo: *Daphnia magna* e *Aliivibrio fischeri*. Os autores identificaram um efeito sinérgico na

combinação fluoxetina + difenidramina, indicando que o impacto conjunto dessa mistura foi superior à soma dos efeitos individuais dos compostos.

Por fim, nota-se que o tratamento T10, composto por 3,91 µg/L de metformina; 1,45 µg/L de valsartana e 4,61 µg/L de atenolol (Tabela S1), representou a combinação mais concentrada que não apresentou efeitos adversos detectáveis em nenhum dos ensaios empregados. No entanto, devido à lipofilicidade da maioria dos produtos farmacêuticos, eles podem persistir no ambiente aquático por períodos prolongados, mesmo em baixas concentrações, aumentando a probabilidade de efeitos nocivos crônicos em vez de agudos, o que reforça a necessidade de investigações futuras voltadas à avaliação de efeitos crônicos e de longo prazo (Custodio; Peñaloza; La Cruz, 2025; González-González et al., 2022). Além do efeito hormético, que gerou um estímulo nas baixas concentrações (T5, T6 e T7), mas que pode ser interpretado como resultado de uma resposta adaptativa ao estresse, ou seja, uma reação celular frente à exposição aos fármacos, culminando em alterações no ciclo celular.

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a exposição à mistura dos fármacos metformina, valsartana e atenolol induz efeitos eco-citogenotóxicos em organismos não alvo. Os PhACs interferiram no desenvolvimento das plantas avaliadas (*Lactuca sativa* e *Allium cepa*), apresentando um perfil de resposta compatível com o fenômeno da hormese – caracterizado pelo estímulo à divisão celular em concentrações mais baixas e efeitos inibitórios em doses mais elevadas.

Embora as concentrações mais altas utilizadas ainda sejam consideradas baixas em termos absolutos, compatíveis com níveis encontrados em ambientes aquáticos contaminados, estas foram suficientes para provocar efeitos adversos significativos. Tais efeitos ocorreram, predominantemente, por meio de mecanismos citotóxicos e aneugênicos, evidenciando o potencial dessas substâncias em comprometer processos celulares fundamentais, mesmo em níveis traço. Além de causar imobilização em *D. magna*, organismo-chave na cadeia trófica aquática, reforçando o potencial ecotóxico dos compostos.

Além disso, os resultados obtidos reforçam a importância de se ampliar o conhecimento sobre os efeitos ecotoxicológicos de compostos farmacêuticos no ambiente aquático, já que a presença contínua desses contaminantes representa não apenas um risco à biodiversidade e à saúde dos ecossistemas, mas também constitui um entrave significativo ao cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Especificamente, comprometem-se metas associadas ao ODS 6 (Água Limpa e Saneamento), ODS 12 (Produção e Consumo Responsáveis), ODS 14 (Vida na Água) e ODS 15 (Vida Terrestre), evidenciando a necessidade de monitoramento contínuo e da implementação de políticas regulatórias adequadas, com o objetivo de assegurar o acesso universal à água limpa e de qualidade, além de mitigar os impactos ambientais e preservar a integridade dos ecossistemas.

REFERÊNCIAS

AFSA, Sabrina *et al.* Occurrence of 40 pharmaceutically active compounds in hospital and urban wastewaters and their contribution to Mahdia coastal seawater contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 2, p. 1941–1955, 1 jan. 2020.

AGÜERA, Ana; BUENO, María Jesús Martínez; FERNÁNDEZ-ALBA, Amadeo R. New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 6, p. 3496–3515, jun. 2013.

AMBROSIO-ALBUQUERQUE, Eliane Papa *et al.* Metformin environmental exposure: A systematic review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 83, p. 103588, 1 abr. 2021.

ANDRADE-VIEIRA, Larissa Fonseca; DE CAMPOS, José Marcello Salabert; DAVIDE, Lisete Chamma. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Management**, v. 107, p. 140–146, set. 2012.

ASLANTÜRK, Özlem Sultan. Cytotoxic and genotoxic effects of triphenyl phosphate on root tip cells of *Allium cepa* L. **Toxicology in Vitro**, v. 94, p. 105734, 1 fev. 2024.

ATEEQ, Bushra *et al.* Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 514, n. 1, p. 105–113, 15 fev. 2002.

BAILEY, Clifford J. Metformin: historical overview. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1566–1576, 1 set. 2017.

BARROS, Susana *et al.* Metformin disrupts *Danio rerio* metabolism at environmentally relevant concentrations: A full life-cycle study. **Science of The Total Environment**, v. 846, p. 157361, 10 nov. 2022.

BASHIR, Ishrat *et al.* Concerns and Threats of Contamination on Aquatic Ecosystems. In: HAKEEM, Khalid Rehman; BHAT, Rouf Ahmad; QADRI, Humaira (Orgs.). **Bioremediation and Biotechnology: Sustainable Approaches to Pollution Degradation**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 1–26.

BHAT, Sartaj Ahmad *et al.* Genotoxicity monitoring of industrial wastes using plant bioassays and management through vermitechnology: A review. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, n. 5, p. 325–337, 1 out. 2017.

BEHBOODI, Behrooz Sh.; SAMADI, Leili. Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. **Plant Science**, v. 167, n. 3, p. 411–416, 1 set. 2004.

BOLONG, N. *et al.* A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, n. 1, p. 229–246, 2009.

BRAGA, Ana Paula Andrade *et al.* A study on phytogenotoxicity induced by biogenic amines: cadaverine and putrescine. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 21, p. 30902–30913, 1 maio 2024.

CALABRESE, Edward J. *et al.* Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 222, n. 1, p. 122–128, 1 jul. 2007.

CALABRESE, Edward J. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1451–1474, 1 jul. 2008.

CALABRESE, Edward J. *et al.* Estimating the range of the maximum hormetic stimulatory response. **Environmental Research**, v. 170, p. 337–343, 1 mar. 2019.

CANEDO, Aryelle *et al.* Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. **Environmental Pollution**, v. 290, p. 118019, 1 dez. 2021.

CARITÁ, Renata; MAZZEO, Dânia Elisa Christofolletti; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Comparison of the toxicogenetic potential of sewage sludges from different treatment processes focusing agricultural use. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 21, p. 21475–21483, 1 jul. 2019.

ČESEN, Marjeta *et al.* The occurrence of contaminants of emerging concern in Slovenian and Croatian wastewaters and receiving Sava river. **Science of The Total Environment**, v. 650, p. 2446–2453, 10 fev. 2019.

CHOWDHURY, Jayanta; MANDAL, Tapan Kumar; MONDAL, Sandhimita. Genotoxic impact of emerging contaminant amoxicillin residue on zebra fish (*Danio rerio*) embryos. **Heliyon**, v. 6, n. 11, p. e05379, 1 nov. 2020.

CLEUVERS, Michael. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology Letters**, Hot Spot Pollutants: Pharmaceuticals in the Environment. v. 142, n. 3, p. 185–194, 15 maio 2003.

COLLINS, Andrew R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–261, 1 mar. 2004.

COLLINS, Andrew R. *et al.* The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–151, 1 maio 2008.

CUSTODIO, María; PEÑALOZA, Richard; LA CRUZ, Heidi De. Risk assessment of heavy metals and pharmaceutically active compounds in river water from the central region of Peru. **Environmental Challenges**, v. 19, p. 101152, 1 jun. 2025.

DARZYNKIEWICZ, Zbigniew; GALKOWSKI, Dariusz; ZHAO, Hong. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. **Methods, Apoptosis**, v. 44, n. 3, p. 250–254, 1 mar. 2008.

DARZYNKIEWICZ, Zbigniew; HUANG, Xuan; ZHAO, Hong. Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. **Current Protocols in Immunology**, v. 119, n. 1, p. 5.7.1-5.7.20, 2017.

DAS, Ria; RAY, Sanjib. *Allium cepa* tests: Exploring bleomycin induced cyto-genotoxicity and altered cell cycle kinetics in root tips meristematic cells. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 828, p. 111851, 1 jan. 2024.

DE BARROS, André Luis Correa *et al.* Determination of nine pharmaceutical active compounds in surface waters from Paraopeba River Basin in Brazil by LTPE-HPLC-ESI-MS/MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 20, p. 19962–19974, 1 jul. 2018.

DE CARVALHO, Ana Carla Coleone *et al.* The presence of pharmaceuticals and caffeine in water, as well as the methods used to eliminate them. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 39, p. 100550, 1 jun. 2024.

DALLA BONA, Mirco *et al.* Increasing toxicity of enrofloxacin over four generations of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 132, p. 397–402, 1 out. 2016.

DOS SANTOS, Carolina Rodrigues *et al.* Aquatic concentration and risk assessment of pharmaceutically active compounds in the environment. **Environmental Pollution**, v. 290, p. 118049, 1 dez. 2021.

DOS SANTOS, Carolina Rodrigues *et al.* Ecotoxicological study of seven pharmaceutically active compounds: Mixture effects and environmental risk assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 275, p. 107068, 1 out. 2024.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **PHYTOCHEMICAL BULLETIN**, 1987.

DRZYMAŁA, J.; KALKA, J. Assessment of genotoxicity, mutagenicity, and cytotoxicity of diclofenac and sulfamethoxazole at environmental concentrations on *Vicia faba*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 21, n. 4, p. 3633–3648, 1 fev. 2024.

EBELE, Anekwe Jennifer; ABOU-ELWafa ABDALLAH, Mohamed; HARRAD, Stuart. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, v. 3, n. 1, p. 1–16, 1 mar. 2017.

ELIZALDE-VELÁZQUEZ, Gustavo Axel; GÓMEZ-OLIVÁN, Leobardo Manuel. Occurrence, toxic effects and removal of metformin in the aquatic environments in the world:

Recent trends and perspectives. **Science of The Total Environment**, v. 702, p. 134924, 1 fev. 2020.

EL-WAEY, Alaa *et al.* Green spectrofluorimetric method for determination of atenolol in pharmaceutical tablets and human urine. **Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 80–91, 1 maio 2024.

EUROPEAN COMMISSION. *Technical guidance document in support of Commission Directive: risk assessment for new notified substances and Commission Regulation EC no. 1488*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 1996.

FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 81–95, 20 nov. 2000.

FERNANDES, Thaís C. C.; MAZZEO, Dânia Elisa C.; MARIN-MORALES, Maria A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, 1 jul. 2007.

FERNANDES, Thaís Cristina Casimiro; MAZZEO, Dânia Elisa Christofolletti; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 1 set. 2009.

FIORESI, Vinicius Sartori *et al.* Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 22, p. 28066–28076, 1 ago. 2020.

FISKESJÖ, Geirid. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985.

FISKESJÖ, Geirid. The *Allium* test — an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 197, n. 2, p. 243–260, 1 fev. 1988.

FISKESJÖ, Geirid. The *allium* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 8, n. 3, p. 291–298, 1993.

FISKESJÖ, Geirid; LEVAN, Albert. Evaluation of the First Ten MEIC Chemicals in the *Allium* Test. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 21, n. 2, p. 139–149, 1 abr. 1993.

FLORENT, M. *et al.* Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation. **Cell Biology and Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 185–192, 1 jun. 1999.

FRIBERG, Nikolai *et al.* Biomonitoring of Human Impacts in Freshwater Ecosystems: The Good, the Bad and the Ugly. In: WOODWARD, Guy (Org.). **Advances in Ecological Research**. [S.l.]: Academic Press, 2011. v. 44 p. 1–68.

FU, Kehan *et al.* Sucralose and acesulfame as an indicator of domestic wastewater contamination in Wuhan surface water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 109980, 1 fev. 2020.

FULLER, Richard *et al.* Pollution and health: a progress update. **The Lancet Planetary Health**, v. 6, n. 6, p. e535–e547, 1 jun. 2022.

FURLONG, Edward T. *et al.* Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States: Pharmaceuticals. **Science of The Total Environment**, v. 579, p. 1629–1642, 1 fev. 2017.

GALBRAITH, David W. *et al.* Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. **Science**, v. 220, n. 4601, p. 1049–1051, 3 jun. 1983.

GAO, Peng *et al.* A critical review on bismuth oxyhalide based photocatalysis for pharmaceutical active compounds degradation: Modifications, reactive sites, and challenges. **Journal of Hazardous Materials**, v. 412, p. 125186, 15 jun. 2021.

GARCIA, Omar *et al.* Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 2, p. 186–190, 5 mar. 2007.

GARCÍA-MEDINA, Sandra *et al.* The relationship between cyto-genotoxic damage and oxidative stress produced by emerging pollutants on a bioindicator organism (*Allium cepa*): The carbamazepine case. **Chemosphere**, v. 253, p. 126675, 1 ago. 2020.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **The Journal of cell biology**, v. 119, n. 3, p. 493–501, 1 nov. 1992.

GODARD, Thierry *et al.* Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet and annexin V assays. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 112, n. 2, p. 155–161, 1 ago. 1999.

GODOY, Aline Andrade *et al.* Single and mixture toxicity of four pharmaceuticals of environmental concern to aquatic organisms, including a behavioral assessment. **Chemosphere**, v. 235, p. 373–382, 1 nov. 2019.

GOGOI, Anindita *et al.* Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 6, p. 169–180, 2018.

GÓMEZ-OLIVÁN, Leobardo Manuel *et al.* Binary mixtures of diclofenac with paracetamol, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid and these pharmaceuticals in isolated form induce oxidative stress on *Hyalella azteca*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 11, p. 7259–7271, 1 nov. 2014.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Reyna Berenice *et al.* Persistence, environmental hazards, and mitigation of pharmaceutically active residual contaminants from water matrices. **Science of The Total Environment**, v. 821, p. 153329, 2022.

GRANT, William F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175–185, 16 out. 1994.

GU, Man Bock; MITCHELL, Robert J.; KIM, Byoung Chan. Whole-Cell-Based Biosensors for Environmental Biomonitoring and Application. *In*: ZHONG, Jian-Jiang (Org.). **Biomanufacturing**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004. p. 269–305.

HAIDER, Fasih Ullah *et al.* Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 211, p. 111887, 15 mar. 2021.

HAN, Uijeong *et al.* Mitigation of benzoic acid-driven autotoxicity in waste nutrient solution using O₃ and O₃/H₂O₂ treatments: Seed germination and root growth of *Lactuca sativa* L. **Environmental Pollution**, v. 331, p. 121930, 15 ago. 2023.

HARO, Nathalia K. *et al.* Removal of atenolol by adsorption – Study of kinetics and equilibrium. **Journal of Cleaner Production**, v. 154, p. 214–219, 15 jun. 2017.

HERNÁNDEZ-TENORIO, Rafael *et al.* Priority list of pharmaceutical active compounds in aquatic environments of Mexico considering their occurrence, environmental and human health risks. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 110, p. 104502, 1 set. 2024.

HILLIS, Derek G. *et al.* Effects of Ten Antibiotics on Seed Germination and Root Elongation in Three Plant Species. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 220–232, 1 fev. 2011.

HOSSAIN, Anwar *et al.* Occurrence and ecological risk of pharmaceuticals in river surface water of Bangladesh. **Environmental Research**, v. 165, p. 258–266, 1 ago. 2018.

HOU, Renjie *et al.* The boom era of emerging contaminants: A review of remediating agricultural soils by biochar. **Science of The Total Environment**, v. 931, p. 172899, 25 jun. 2024.

HU, Jinyuan *et al.* BiOCl facilitated photocatalytic degradation of atenolol from water: Reaction kinetics, pathways and products. **Chemosphere**, v. 220, p. 77–85, 1 abr. 2019.

HU, Yingmo *et al.* Adsorption of Atenolol on Kaolinite. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2015, n. 1, p. 897870, 2015.

HULZEBOS, E. M. *et al.* Phytotoxicity studies with *Lactuca sativa* in soil and nutrient solution. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 1079–1094, 1 jun. 1993.

JOVTCHEV, Gabriele; MENKE, Merten; SCHUBERT, Ingo. The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 493, n. 1, p. 95–100, 27 jun. 2001.

KATSUHARA, Maki. Apoptosis-Like Cell Death in Barley Roots under Salt Stress. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, n. 9, p. 1091–1093, 1 jan. 1997.

- KAJSTURA, Malgorzata *et al.* Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. **Cytometry Part A**, v. 71A, n. 3, p. 125–131, 2007.
- KALAUZ, Andrea; KAPUI, Imre. Determination of potentially genotoxic impurities in crotamiton active pharmaceutical ingredient by gas chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 210, p. 114544, 20 fev. 2022.
- KARBALAEI, Samaneh *et al.* Toxicidade de microplásticos de poliestireno em juvenis *de Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) após exposição individual e combinada com clorpirifós. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 123980, 5 fev. 2021.
- KASONGA, Teddy Kabeya *et al.* Endocrine-disruptive chemicals as contaminants of emerging concern in wastewater and surface water: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 277, p. 111485, 2021.
- KASSA, Belay Anelay. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de águas residuais municipais descarregadas na nascente do rio Nilo Azul usando o teste *Allium Cepa*. **Scientific African**, v. 13, p. e00911, 1 set. 2021.
- KATHI, Srujana; EL DIN MAHMOUD, Alaa. Trends in effective removal of emerging contaminants from wastewater: A comprehensive review. **Desalination and Water Treatment**, v. 317, p. 100258, 1 jan. 2024.
- KELLY, K. J. *et al.* A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 284, n. 5, p. C1309–C1318, maio 2003.
- KIDD, Karen A. *et al.* Environmental Risks of Pharmaceutical Mixtures in Aquatic Ecosystems: Reflections on a Decade of Research. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 549–558, 2024.
- KLANOVICZ, Natalia; PINTO, Carolina Afonso. Occurrence of pharmaceutically active compounds in groundwater and their effects to the human health. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 23, p. 33223–33238, 1 maio 2024.
- KOCH, Niharika *et al.* Environmental antibiotics and resistance genes as emerging contaminants: methods of detection and bioremediation. **Current research in microbial sciences**, v. 2, p. 100027, 2021.
- K'OREJE, K. O. *et al.* Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya. **Chemosphere**, v. 149, p. 238–244, 1 abr. 2016.
- KUMARAVEL, T. S. *et al.* Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 53–64, 1 fev. 2009.

KUNDU, Mercy Nasimiyu; KOMAKECH, Hans C.; SANG, Joseph. Spatial occurrence and variation of the active pharmaceutical compounds in rivers and groundwater systems in Arusha City, Tanzania. **Heliyon**, v. 10, n. 12, 30 jun. 2024.

KÜNSTLER, András *et al.* Staying alive – is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 93, p. 75–84, 1 jan. 2016.

KURNIAWAN, Tonni Agustiono *et al.* Implications of climate change on water quality and sanitation in climate hotspot locations: A case study in Indonesia. **Water Supply**, v. 24, n. 2, p. 517–542, 24 jan. 2024.

LAMOIA, Traci E.; SHULMAN, Gerald I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. **Endocrine Reviews**, v. 42, n. 1, p. 77–96, 1 fev. 2021.

LANIER, Caroline *et al.* The comet assay in higher terrestrial plant model: Review and evolutionary trends. **Environmental Pollution**, v. 207, p. 6–20, 1 dez. 2015.

LEATHER, Gerald R.; EINHELLIG, Frank A. Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 10, p. 1821–1828, 1 out. 1988.

LEME, Daniela Morais; ANGELIS, Dejanira de Franceschi de; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 214–219, 30 jul. 2008.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80–86, 31 jan. 2008.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 1 jul. 2009.

LEVIN, Ronnie *et al.* US drinking water quality: exposure risk profiles for seven legacy and emerging contaminants. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 34, n. 1, p. 3–22, jan. 2024.

LI, Xingyu *et al.* Comprehensive review of emerging contaminants: Detection technologies, environmental impact, and management strategies. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 278, p. 116420, 15 jun. 2024.

LOO, Deryk T. TUNEL Assay. In: DIDENKO, Vladimir V. (Org.). **In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. p. 21–30.

LORENZO, Yolanda *et al.* The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. **Mutagenesis**, v. 28, n. 4, p. 427–432, 1 jul. 2013.

LU, Shuang *et al.* Comprehensive profiling of the distribution, risks and priority of pharmaceuticals and personal care products: A large-scale study from rivers to coastal seas. **Water Research**, v. 230, p. 119591, 15 fev. 2023.

LU, Tingyu *et al.* Disruption of zebrafish sex differentiation by emerging contaminants hexafluoropropylene oxides at environmental concentrations via antagonizing androgen receptor pathways. **Environment International**, p. 108868, 2024.

MAJTNEROVÁ, Pavlína; ROUŠAR, Tomáš. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 5, p. 1469–1478, 1 out. 2018.

MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel C. S. F. Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 100, p. 38–44, 15 out. 2012.

MALLIK, Ritwika; CHOWDHURY, Tahseen A. Metformin in cancer. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 143, p. 409–419, 1 set. 2018.

MARCANO, L. *et al.* Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, n. 2, p. 221–226, 1 fev. 2004.

MARQUES, Helen Gonçalves *et al.* Biomonitoring of the Paraopeba river: Cytotoxic, genotoxic and metal concentration analysis three years after the Brumadinho dam rupture - Minas Gerais, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 964, p. 178618, 10 fev. 2025.

MATTSON, Mark P. Hormesis defined. **Ageing Research Reviews**, Hormesis. v. 7, n. 1, p. 1–7, 1 jan. 2008.

MARKIEWICZ, Marta *et al.* Ultimate biodegradability and ecotoxicity of orally administered antidiabetic drugs. **Journal of Hazardous Materials**, v. 333, p. 154–161, 5 jul. 2017.

MEDICI, Antonio *et al.* Advanced oxidation process of valsartan by activated peroxymonosulfate: Chemical characterization and ecotoxicological effects of its byproducts. **Science of The Total Environment**, v. 908, p. 168337, 15 jan. 2024.

MENDES, Felisberto S. *et al.* On the diffusion of carbamazepine, acetaminophen and atenolol in water: An experimental and theoretical approach. **Fluid Phase Equilibria**, v. 580, p. 114056, 1 maio 2024.

MIGLIORE, Luciana; COZZOLINO, Salvatore; FIORI, Maurizio. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1233–1244, 1 ago. 2003.

MINGUEZ, Laetitia *et al.* Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 6, p. 4992–5001, 1 mar. 2016.

MIRANDA, Luanna Alves *et al.* Phytotoxicity and cytogenotoxicity of pesticide mixtures: analysis of the effects of environmentally relevant concentrations on the aquatic environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 52, p. 112117–112131, 1 nov. 2023.

MOHAPATRA, Sanjeeb *et al.* Occurrence and fate of pharmaceuticals in WWTPs in India and comparison with a similar study in the United States. **Chemosphere**, v. 159, p. 526–535, 1 set. 2016.

MØLLER, Peter *et al.* Slightly increased level of DNA migration in the comet assay: does statistical significance equal biological significance? **Mutagenesis**, v. 40, n. 2, p. 99–110, 1 abr. 2025.

MOMPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, Pharmaceutical products in the environment: trends toward lowering presence and impact. v. 35, n. 5, p. 803–814, 1 jul. 2009.

MONTEIRO, M. S. *et al.* Flow cytometric assessment of Cd genotoxicity in three plants with different metal accumulation and detoxification capacities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 6, p. 1231–1237, 1 set. 2010.

MORALES, Gabriela Castillo. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. [S.l.]: Idrc, 2004.

MOREIRA, NCS; LIMA, JEBF; SAKAMOTO-HOJO, ET. Citometria de fluxo—fundamentos, aplicações e análise do ciclo celular e apoptose. **Da Toxicogenética à Toxicogenômica**. Santos, RA, v. 1, 2021.

MUTIYAR, Pravin K.; GUPTA, Sanjay Kumar; MITTAL, Atul Kumar. Fate of pharmaceutical active compounds (PhACs) from River Yamuna, India: An ecotoxicological risk assessment approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 150, p. 297–304, 15 abr. 2018.

NAIDU, Ravi *et al.* Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. **Chemosphere**, v. 154, p. 350–357, jul. 2016.

NASROLLAHI, Nazanin; VATANPOUR, Vahid; KHATAEE, Alireza. Removal of antibiotics from wastewaters by membrane technology: Limitations, successes, and future improvements. **Science of The Total Environment**, v. 838, p. 156010, 10 set. 2022.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1–2, p. 3–16, jul. 2002.

NEHA, Rajendran *et al.* Nano-adsorbents an effective candidate for removal of toxic pharmaceutical compounds from aqueous environment: A critical review on emerging trends. **Chemosphere**, v. 272, p. 129852, 1 jun. 2021.

NOGUERA-OVIEDO, Katia; AGA, Diana S. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 316, p. 242–251, 5 out. 2016.

NOROOZI, M.; ANGERSON, Wj; LEAN, Me. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 6, p. 1210–1218, jun. 1998.

NUNES, Bruno. Pharmaceutical drugs and other substances with pharmacological activity in the environment: a threat to biodiversity? **Conservation Science**, v. 2, n. 1, p. 12–16, 2014.

OERTEL, Reinhard; BALDAUF, Julien; ROSSMANN, Julia. Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantification of the antidiabetic drug metformin and six others pharmaceuticals in wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 1556, p. 73–80, 29 jun. 2018.

OLIVE, Peggy L.; FRASER, Garnet; BANÁTH, Judit P. Radiation-Induced Apoptosis Measured in TK6 Human B Lymphoblast Cells Using the Comet Assay. **Radiation Research**, v. 136, n. 1, p. 130–136, 1 out. 1993.

OLIVEIRA, Cynthia Elaine de. Citometria de fluxo como metodologia para análise de citogenotoxicidade em *Allium cepa* L.: uma abordagem comparativa com a citogenética. 2015. 90 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Genética e Biotecnologia)** – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

OMS, 2023. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global report on hypertension: the race against a silent killer. 19 set. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/teams/noncommunicable-diseases/hypertension-report>. Acesso em: 08 Julho 2024.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). **Agenda 2030**. New York: ONU, 2015. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>. Acesso em: 29 fev 2024.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**: Test No. 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. Paris: OECD Publishing, 2004.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Pharmaceutical innovation and access to medicines. Paris: OECD Publishing, 2018. (OECD Health Policy Studies).

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). No. 208. Terrestrial plants, growth test. In: **Guideline for testing of chemicals**. Adopted April 4, 1984. Paris: OECD, 1984. p. 1-6.

PALMIERI, Marcel José *et al.* Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 763, p. 30–35, 15 mar. 2014.

PAN, Min; CHU, L. M. Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 228–237, 1 abr. 2016.

PARMAR, Trishala K.; RAWTANI, Deepak; AGRAWAL, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n. 2, p. 110–118, 2 abr. 2016.

PARRELLA, Alfredo *et al.* Eco-genotoxicity of six anticancer drugs using comet assay in daphnids. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 573–580, 9 abr. 2015.

PASHAEI, Reza *et al.* Acute toxicity of triclosan, caffeine, nanoplastics, microplastics, and their mixtures on *Daphnia magna*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 192, p. 115113, 1 jul. 2023.

PAYAL, Miss *et al.* A Review on Ecopharmacovigilance and their Major Impact on Bio-Diversity. **International Journal of Scientific Research in Science and Technology**, p. 687–691, jun. 2022.

PENNELL, RI; LAMB, C. Programmed Cell Death in Plants. **The Plant Cell**, v. 9, n. 7, p. 1157–1168, jul. 1997.

PETRIE, Bruce; BARDEN, Ruth; KASPRZYK-HORDERN, Barbara. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, Occurrence, fate, removal and assessment of emerging contaminants in water in the water cycle (from wastewater to drinking water). v. 72, p. 3–27, 1 abr. 2015.

PÉREZ-PEREIRA, A. *et al.* Enantioselectivity in ecotoxicity of pharmaceuticals, illicit drugs, and industrial persistent pollutants in aquatic and terrestrial environments: A review. **Science of The Total Environment**, v. 912, p. 169573, 20 fev. 2024.

PESNYA, Dmitry S. *et al.* Genotoxic effects of *Heracleum sosnowskyi* in the *Allium cepa* test. **Caryologia**, v. 70, n. 1, p. 55–61, 2 jan. 2017.

PETROVIC, M. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 685–696, nov. 2003.

PINO, Ma Rosa *et al.* Phytotoxicity of 15 common pharmaceuticals on the germination of *Lactuca sativa* and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 22, p. 22530–22541, 1 nov. 2016.

PIVETTA, Rhannanda Copetti *et al.* Tracking the occurrence of psychotropic pharmaceuticals in Brazilian wastewater treatment plants and surface water, with assessment of environmental risks. **Science of The Total Environment**, v. 727, p. 138661, 20 jul. 2020.

PRIAC, Anne; BADOT, Pierre-Marie; CRINI, Grégorio. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188–194, 1 mar. 2017.

PRICHARD, Emma; GRANEK, Elise F. Effects of pharmaceuticals and personal care products on marine organisms: from single-species studies to an ecosystem-based approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 22, p. 22365–22384, 1 nov. 2016.

PURI, Mehak; GANDHI, Kavita; KUMAR, M. Suresh. Emerging environmental contaminants: A global perspective on policies and regulations. **Journal of Environmental Management**, v. 332, p. 117344, 2023.

QUADRA, Gabrielle Rabelo *et al.* Temporal and Spatial Variability of Micropollutants in a Brazilian Urban River. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 142–154, 1 jul. 2021.

RAMÍREZ-MALULE, Howard; QUIÑONES-MURILLO, Diego H.; MANOTAS-DUQUE, Diego. Emerging contaminants as global environmental hazards. A bibliometric analysis. **Emerging Contaminants**, v. 6, p. 179–193, 2020.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on *N*-methyl-*N*-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 390, n. 1, p. 121–127, 24 abr. 1997.

REDE, Diana *et al.* Individual and mixture toxicity evaluation of three pharmaceuticals to the germination and growth of *Lactuca sativa* seeds. **Science of The Total Environment**, v. 673, p. 102–109, 10 jul. 2019.

REILLY, Katie *et al.* *Daphnia* as a model organism to probe biological responses to nanomaterials—from individual to population effects via adverse outcome pathways. **Frontiers in Toxicology**, v. 5, 14 abr. 2023.

REIS, Eduarda O. *et al.* Occurrence, removal and seasonal variation of pharmaceuticals in Brazilian drinking water treatment plants. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 773–781, 1 jul. 2019.

REQUE, Regiane *et al.* Ecotoxicity of losartan potassium in aquatic organisms of different trophic levels. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 87, p. 103727, 1 out. 2021.

REYES-RODRÍGUEZ, María de los Ángeles *et al.* Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of two thallium compounds using the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. **Heliyon**, v. 7, n. 5, p. e07087, 1 maio 2021.

RICHARDSON, Susan D.; KIMURA, Susana Y. Emerging environmental contaminants: Challenges facing our next generation and potential engineering solutions. **Environmental Technology & Innovation**, v. 8, p. 40–56, 1 nov. 2017.

RODRIGUEZ-NARVAEZ, Oscar M. *et al.* Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 323, p. 361–380, 2017.

ROVERI, Vinicius *et al.* Occurrence and ecological risk assessment of pharmaceuticals and cocaine in a beach area of Guarujá, São Paulo State, Brazil, under the influence of urban surface runoff. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 36, p. 45063–45075, 1 dez. 2020.

ROVERI, Vinicius *et al.* Occurrence and risk assessment of pharmaceuticals and cocaine around the coastal submarine sewage outfall in Guarujá, São Paulo State, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 9, p. 11384–11400, 1 mar. 2021.

ROYANO, Silvia *et al.* Pharmaceutically active compounds (PhACs) in surface water: Occurrence, trends and risk assessment in the Tagus River Basin (Spain). **Science of The Total Environment**, v. 905, p. 167422, 20 dez. 2023.

SADUTTO, Daniele; PICÓ, Yolanda. Sample Preparation to Determine Pharmaceutical and Personal Care Products in an All-Water Matrix: Solid Phase Extraction. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 5204, jan. 2020.

SAIDULU, Duduku *et al.* A review on occurrences, eco-toxic effects, and remediation of emerging contaminants from wastewater: Special emphasis on biological treatment based hybrid systems. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105282, 1 ago. 2021.

SANTOS, Amanda Vitória *et al.* Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in water supply systems in Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 746, p. 141011, 1 dez. 2020.

SCHERER, E. Behavioural responses as indicators of environmental alterations: approaches, results, developments. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 8, n. 1–4, p. 122–131, 1992.

SEBASTINE, I. M.; WAKEMAN, R. J. Consumption and Environmental Hazards of Pharmaceutical Substances in the UK. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 81, n. 4, p. 229–235, 1 jul. 2003.

SHEHU, Zaccheus *et al.* Overview of African water resources contamination by contaminants of emerging concern. **Science of The Total Environment**, v. 852, p. 158303, 15 dez. 2022.

SIMS, D. B. *et al.* Occurrence, source, and ecological risk of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water in Las Vegas, USA. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 21, n. 12, p. 7865–7880, 1 ago. 2024.

SOARES, Cristiano *et al.* Ecotoxicological relevance of nano-NiO and acetaminophen to *Hordeum vulgare* L.: Combining standardized procedures and physiological endpoints. **Chemosphere**, v. 165, p. 442–452, 1 dez. 2016.

SOMMAGGIO, Lais Roberta Deroldo *et al.* Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 550–557, 1 jan. 2018.

SONAL, Dubey *et al.* Pharmaceutical Waste a Global Challenge to Ecosystem. 2024.

SOUZA, Victor Ventura de *et al.* Ecogenotoxicity of environmentally relevant atrazine concentrations: A threat to aquatic bioindicators. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 189, p. 105297, 1 jan. 2023.

SOUZA, Patrícia Moraes Sinohara *et al.* PBAT biodegradable mulch films: Study of ecotoxicological impacts using *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and HepG2/C3A cell culture. **Chemosphere**, v. 256, p. 126985, out. 2020.

STALEY, Kristina; BLASCHKE, Anne J.; CHUN, Jerold. Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semi-quantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. **Cell Death & Differentiation**, v. 4, n. 1, p. 66–75, jan. 1997.

STYSZKO, Katarzyna *et al.* Occurrence of pharmaceutical residues, personal care products, lifestyle chemicals, illicit drugs and metabolites in wastewater and receiving surface waters of Krakow agglomeration in South Poland. **Science of The Total Environment**, v. 768, p. 144360, 10 maio 2021.

SUDARSAN, Jayaraman Sethuraman *et al.* Tricks and tracks of prevalence, occurrences, treatment technologies, and challenges of mixtures of emerging contaminants in the environment: With special emphasis on microplastic. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 265, p. 104389, 1 jul. 2024.

SULTAN, Maisha Binte; ANIK, Amit Hasan; RAHMAN, Md. Mostafizur. Emerging contaminants and their potential impacts on estuarine ecosystems: Are we aware of it? **Marine Pollution Bulletin**, v. 199, p. 115982, 1 fev. 2024.

SUN, Hong *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 183, p. 109119, 1 jan. 2022.

TAHERAN, Mehrdad *et al.* Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 10, p. 122–126, dez. 2018.

The UBA database – “Pharmaceuticals in the environment”. Text. Disponível em: <<https://www.umweltbundesamt.de/en/database-pharmaceuticals-in-the-environment-0>>. Acesso em: 26 maio. 2025.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–221, 2000.

TIWARI, Bhagyashree *et al.* Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 1–12, 1 jan. 2017.

TKACZYK, Angelika *et al.* *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. **Science of The Total Environment**, v. 763, p. 143038, 1 abr. 2021.

TÜRKOĞLU, Şifa. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, n. 1, p. 4–14, 10 jan. 2007.

TÜRKOĞLU, Şifa. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 3, p. 224–230, 1 jul. 2012.

VALDEZ-CARRILLO, Melissa *et al.* Pharmaceuticals as emerging contaminants in the aquatic environment of Latin America: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 36, p. 44863–44891, 1 dez. 2020.

VALENZUELA, María Teresa *et al.* Capillary electrophoresis of DNA damage after irradiation: apoptosis and necrosis. **Journal of Chromatography A**, v. 871, n. 1, p. 321–330, 25 fev. 2000.

VAN DOORN, Wouter G. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 14, p. 4749–4761, 1 out. 2011.

VILLEGAS-NAVARRO, Arturo; ROSAS-L, Esperanza; REYES, José L. The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 136, n. 2, p. 127–134, 1 out. 2003.

VISIOLI, Giovanna *et al.* Germination and Root Elongation Bioassays in Six Different Plant Species for Testing Ni Contamination in Soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 92, n. 4, p. 490–496, 1 abr. 2014.

WANG, Fang *et al.* Emerging contaminants: A One Health perspective. **The Innovation**, v. 5, n. 4, p. 100612, jul. 2024.

- WANG, Huan *et al.* Ecotoxicological effects, environmental fate and risks of pharmaceutical and personal care products in the water environment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 788, p. 147819, 20 set. 2021.
- WATANABE, Masami *et al.* Apoptosis-Like Cell Death of Brassica napus Leaf Protoplasts. **The New Phytologist**, v. 156, n. 3, p. 417–426, 2002.
- WILDE, Marcelo L.; KÜMMERER, Klaus; MARTINS, Ayrton F. Multivariate optimization of analytical methodology and a first attempt to an environmental risk assessment of β -blockers in hospital wastewater. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1732–1740, set. 2012.
- XU, Jian *et al.* Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. **Chemosphere**, v. 119, p. 1379–1385, 2015.
- YAMAMOTO, Koichi I.; YASUMOTO, Kikuchi. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 71, n. 1, p. 127–131, 1 jun. 1980.
- YAO, Sicong *et al.* Nano-sized natural organic matter interacts with bisphenol A and decreases cytotoxicity to human cells. **Environmental Chemistry Letters**, 2024.
- YISA, Abraham Gana *et al.* Immobilization, oxidative stress and antioxidant response of *Daphnia magna* to Amoxicillin and Ciprofloxacin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 98, p. 104078, 1 mar. 2023.
- ŽABKA, Aneta *et al.* Sanguinarine-induced oxidative stress and apoptosis-like programmed cell death(AL-PCD) in root meristem cells of *Allium cepa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 112, p. 193–206, 1 mar. 2017.
- ZHENG, Yueyue *et al.* Metformin as an Emerging Pollutant in the Aquatic Environment: Occurrence, Analysis, and Toxicity. **Toxics 2024, Vol. 12, Page 483**, v. 12, n. 7, p. 483, jul. 2024.

APÊNDICE A – Material Suplementar

Tabela S1 - Diferentes concentrações em µg/L dos 3 PhACs avaliados em cada um dos tratamentos.

Tratamentos	Metformina	Valsartana	Atenolol
T16	250.1	92.52	294.7
T15	125.05	46.26	147.35
T14	62.53	23.13	73.68
T13	31.26	11.57	36.84
T12	15.63	5.79	18.42
T11	7.82	2.9	9.21
T10	3.91*	1.45	4.61
T9	1.96	0.73	2.31
T8	0.98	0.36	1.16
T7	0.49	0.18	0.58
T6	0.25	0.09*	0.29
T5	0.12	0.05	0.14
T4	0.06	0.02	0.07*
T3	0.03	0.01	0.04
T2	0.02	0	0.02
T1	0.01	0	0.01
CN	0	0	0

Notas: (*) Concentrações dos fármacos próximas as relatadas em Juiz de Fora (QUADRA et., 2021).