AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Avaliação do risco ambiental da fluoxetina em sedimentos marinhos para
invertebrados aquáticos**

DYMES RAFAEL ALVES DOS SANTOS LARANJEIRA

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientador:
Prof. Dr. Jose Roberto Rogero**

**#
#**

**São Paulo
2019**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Avaliação do risco ambiental da fluoxetina em sedimentos marinhos para
invertebrados aquáticos**

DYMES RAFAEL ALVES DOS SANTOS LARANJEIRA

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

Orientador:
Prof. Dr. Jose Roberto Rogero
#
#

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2019

Fonte de Financiamento: CAPES

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

ALVES DOS SANTOS LARANJEIRA, D. R. . ***Avaliação do risco ambiental da fluoxetina em sedimentos marinhos para invertebrados aquáticos***. 2019. 115 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Alves dos Santos Laranjeira, Dymes Rafael
Avaliação do risco ambiental da fluoxetina em sedimentos
marinhos para invertebrados aquáticos / Dymes Rafael Alves
dos Santos Laranjeira; orientador Jose Roberto Rogero. -- São
Paulo, 2019.
115 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia
Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e
Nucleares, São Paulo, 2019.

1. Fluoxetina. 2. Avaliação de risco ambiental. 3.
Biomarcadores. 4. Sedimentos. 5. Emissário submarino de
santos. I. Rogero, Jose Roberto, orient. II. Título.

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda”.

Prof. Dr. Mário Sergio Cortella

AGRADECIMENTOS

Sou grato por tudo, mas principalmente por todas as pessoas que a natureza inseriu em meu caminho ao longo de minha vida, sem as quais este trabalho não seria possível.

Agradeço à minha mãe Maria Alves dos Santos, por todo amor incondicional e principalmente por todo o seu esforço e sacrifício que me possibilitaram à correr atrás de meus sonhos e ideais. Este trabalho também é seu mãe!

À minha amada esposa Maria Eduarda Alves Laranjeira (Duda), que tornou minha vida um lugar mais feliz e mais iluminado! Te amo!

Aos “Laranjeiras”, seu Mário, Dona Alice, Elizabeth (Sogrinha), Maria Alice, Mário, Ariane, Melissa e Marina, minha nova família. Saibam que eu tenho muito amor por vocês todos!

Agradeço ao meu padrasto, Olavo, e minha família por todo amor, carinho e apoio.

Aos meus irmãos Edu, Gustavon, Vini (cacocho), Bruno (baiano), Allan, Hugo e Caio (gorfo) que ao longo dessa trajetória estiveram sempre ao meu lado, me apoiando fielmente. TMJ! Aos meus queridos amigos, Mari, Lorena, Luan, Vic, Gio, Ric, Rita, Farah, JP, Jonny, Lula (+ urratu + Socorro), Greg, Thainá, Viola, Fran, Tati, Bá, Ben, Katie, Meaghan, Dima e todos os outros seres mais loucos e maravilhosos que entraram na minha vida e criaram raízes no meu coração! Não podia pedir mais!

À Patricia e Miriam, que me são mais que minhas tias, são minhas “outras mães”, este trabalho também é fruto de todo esse amor que vocês sempre me transmitiram! Amo vocês!

Aos meus amigos educadores Fábio, Tiago, Felipe, Spinga, Kelly, Thiaguinho, Bruno, Jesus, Rodger, Andréia, Saito, Diniz, Bill, Dalê, Elísio, Sandra, Rafael, Ingrid, Rodrigo, Fernanda e todos os outros que de alguma forma contribuíram na minha formação não apenas como docente, mas também como pessoa. Muito obrigado!

Ao meu orientador Prof. Dr. Jose Roberto Rogero e sua esposa MSc. Sizue Ota Rogero, por todo carinho, suporte, amizade, dedicação a este trabalho e acima de tudo pela sua paciência e compreensão. Seu prazer em dedicar-se à Ciência e à Educação são inspiradores! Se minha carreira como professor e Biólogo chegar à 10% de suas conquistas já serei uma pessoa extremamente realizada. A confiança depositada por vocês desde o início foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado pela oportunidade!

Ao meu amigo e “co-orientador” Prof. Dr. Augusto Cesar por todo apoio e companheirismo, que há muitos anos inspira, incentiva e auxilia minha carreira como Biólogo. Sem a sua ajuda nada disso seria possível!

Ao Prof. Dr. Fábio Hermes Pusceddu, que não apenas foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, mas também me ajudou e me motivou nas horas difíceis. Sou muito grato por ter um amigo, ou melhor um irmão, como você em minha vida! Você é realmente um ser especial!

Ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), e ao Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) pela oportunidade e disponibilização da infraestrutura para a realização deste trabalho.

Ao grupo de Ecotoxicologia da Baixada Santista (UNISANTA e UNESP):

Aos amigos “família ECOTOX” da Universidade Santa Cecília, Tio Aldo, Fábio, Fernando, Camilo e Augusto por todos os ensinamentos, pela paciência, , amizade, incentivo e oportunidades desde o início. A Bia, Caio, Jonas, Helô, Matheus, Thierry, Mari e Aline, pela imensa ajuda dentro do laboratório e por todos os momentos vividos junto com vocês fora dele! À todos os estagiários do laboratório que contribuíram de uma forma ou de outra com a execução deste trabalho e compartilharam de momentos desta etapa ao longo dos últimos anos. À Gisela que também faz parte dessa família e que tanto me ajudou ao longos desses anos.

Ao Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa pelo apoio, aprendizado e disponibilização do seu laboratório para realização dos biomarcadores, e à toda sua equipe do Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA) da UNESP – Campus Litoral Paulista. Ao Lucas (Balu), Lucas (Geleia), Carol, Sinhá (Bruno), Mayana, Paloma (Diogo), Ney, Guacira, Giuliana (Malária), Mayra, Júlia, Heitor, Giam, Gabriel (Bodeia), Andrey (Buzina) e especialmente a Prof^a Dra. Luciane Alves Maranhão (Maranhola) por toda ajuda e apoio com os esanios de biomarcadores.

Aos colegas e amigos do Centro de Química e Meio Ambiente do IPEN: Marycel, Denise, Elias, Cris, Nilce, Hélio, Davi, Carina, Ju Izidoro, Gisela e especialmente à Dra. Maria Aparecida Faustino Pires e Dra. Elaine Arantes Jardim Martins, por todo apoio, dicas e contribuições ao trabalho.

À minha querida amiga Msc. Flávia Junqueira (*in memoriam*), que ajudou de todas as formas possíveis durante o pequeno período que esteve neste mundo. Saiba que você fez e faz muita falta!

À equipe do Centro de Espectrometria de Massas Aplicadas (CEMSA) pela parceria na realização das análises químicas, especialmente aos amigos Mestres Daniel Temponi Lebre e Renan de Azevedo Silva.

Agradeço especialmente à Msc. Caroline Lima de Oliveira, uma pessoa maravilhosa que por muitos anos me ajudou e me incentivou. Sem você este trabalho não teria o mesmo prestígio e valor. Agradeço também a sua família Dona Iraci, Seu Waldir e Conrado, vocês sempre ocuparão um lugar especial no meu coração!

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processos nº 481553/2012-6; nº 481358/2012-9) pelo apoio financeiro.

A CAPES - Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – que gentilmente viabilizou a execução desse trabalho por seu apoio financeiro.

A todos que não foram citados aqui, mas que de uma forma ou de outra foram importantes durante a realização deste trabalho.

Avaliação do risco ambiental da fluoxetina em sedimentos marinhos para invertebrados aquáticos

Dymes Rafael Alves dos Santos Laranjeira

RESUMO

O uso acentuado de fármacos e produtos de cuidado pessoal (FPCP) por grande parcela da população, associado ao aumento do número de habitantes, principalmente, em regiões costeiras, gera uma consequente e contínua entrada destas substâncias no ambiente. Com isso há uma necessidade crescente de se investigar a presença e o comportamento desta classe de contaminantes, principalmente em sedimentos, uma vez que estes são capazes de acumular e apresentar concentrações relativamente perigosas a organismos não-alvos. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o risco ambiental do fármaco fluoxetina (FLU) presente em sedimentos marinhos da região de Santos/SP, Brasil, por meio de ensaios ecotoxicológicos integrados à análises químicas para quantificação deste fármaco no ambiente marinho. Para tanto foram utilizados invertebrados marinhos, espécie *Mytella charruana* para a caracterização de citotoxicidade e atividade de biomarcadores, e as espécies *Perna perna* e *Echinometra lucunter* em ensaios de desenvolvimento embriolarval. Todos os organismos-teste foram expostos à sedimentos marinhos previamente marcados com FLU. Por meio de técnicas de HPLC-ESI-MS/MS, foram identificadas e quantificadas concentrações da ordem de 10,4 ng.g⁻¹ em sedimentos coletados no entorno do emissário submarino de esgoto de Santos (Baía de Santos, São Paulo - Brasil). A FLU apresentou efeitos sobre o desenvolvimento embriolarval de *E. lucunter* e *P. perna* e efeitos cito-genotóxicos para a espécie *M. charruana*, em concentrações ambientalmente relevantes. Segundo o método utilizado para avaliação de risco ambiental, a fluoxetina pode ser considerada como substância potencialmente perigosa para invertebrados aquáticos.

Palavras – chave: biomarcadores; toxicidade; avaliação de risco ambiental; invertebrados aquáticos; sedimentos; emissário submarino de santos; fluoxetina.

Environmental risk assessment of fluoxetine in marine sediments to aquatic invertebrates

Dymes Rafael Alves dos Santos Laranjeira

ABSTRACT

The high consumption of pharmaceutical and personal care products (PPCP) by a significant part of the human population, associated with the increase in the number of inhabitants, mainly in coastal regions, causes a continuous entry of these substances into the environment. Thus, there is a growing need to investigate the presence and behavior of this class of contaminants, especially in sediments, since they can accumulate and create relatively hazardous concentrations to non-target organisms. Therefore, the objective of this study was to evaluate the environmental risk of fluoxetine (FLU) present in marine sediments from the region of Santos/SP, Brazil, using ecotoxicological assays with chemical analyses so the amount of this pharmaceutical drug in the marine environment could be quantified. For this purpose, the marine invertebrates *Mytella charruana* species were used for the characterization of citotoxicity and endpoints using biomarkers, and the species *Perna perna* and *Echinometra lucunter* in embryo larval tests. All organisms used in the experiments were exposed to marine sediments previously spiked with known concentrations of FLU. Using LC-ESI-MS/MS, the environmental levels of FLU were quantified in marine sediments from the vicinities of the Santos submarine sewage outfall (Bay of Santos, São Paulo, Brazil) at 10.4ng.g^{-1} . The fluoxetine has presented effects over the embryo larval development of *E. lucunter* and *P. perna* as such genotoxic and citotoxic effects for the *M. charruana* species at environmentally relevant concentrations. According to the employed ERA method, fluoxetine can be considered as a potentially dangerous substance for aquatic invertebrates.

Key words: Biomarkers; toxicity; environmental risk assessment; aquatic invertebrates; sediments; fluoxetine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. REGIÃO METROPOLITANA DA BAIXADA SANTISTA.....	5
3.2. EMISSÁRIO SUBMARINO DE SANTOS/SP	5
3.3. FÁRMACOS E PRODUTOS DE CUIDADO PESSOAL.....	6
3.3.1. Fluoxetina.....	8
3.4. ENSAIOS ECOTÓXICOLÓGICOS	10
3.4.1. Ensaios de desenvolvimento embrionário	10
3.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	11
3.5.1. Ensaio do tempo de retenção do vermelho neutro.....	11
3.5.2. Ensaios com biomarcadores	11
3.6. AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1. ORGANISMOS-TESTE.....	16
4.1.1. <i>Mytella charruana</i>	16
4.1.2. <i>Perna perna</i>	17
4.1.3. <i>Echinometra lucunter</i>	18
4.2. FÁRMACO ALVO DO ESTUDO: FLUOXETINA.....	19
4.3. AVALIAÇÃO ECOTÓXICOLÓGICA DO SEDIMENTO	19
4.3.1. Coleta e caracterização sedimentológica.....	19
4.3.2. Marcação de sedimento	22
4.4. ANÁLISES QUÍMICAS DOS SEDIMENTOS.....	25
4.5.1. Ensaio de desenvolvimento embrionário com <i>Perna perna</i>	28
4.5.2. Ensaio de desenvolvimento embrionário com <i>E. Lucunter</i>	30
4.5.3. Ensaio por exposição ao sedimento integral.....	33
4.5.4. Ensaio de citotoxicidade com mexilhão <i>Mytella charruana</i>	34
4.5.4.1. Preparação das lâminas.....	34
4.5.4.2. Preparação das soluções.....	35
4.5.4.2.1. Solução fisiológica	35
4.5.4.2.2. Corante Vermelho Neutro (VN)	35

4.5.4.2.3. Solução-estoque	35
4.5.4.2.4. Solução de trabalho.....	36
4.5.4.3. Extração da hemolinfa	36
4.5.4.3.1. Manuseio da hemolinfa	37
4.5.4.4. Incubação dos hemócitos	38
4.6. ENSAIOS COM BIOMARCADORES	40
4.6.1. Glutathione-S-transferase (GST)	41
4.6.2. Glutathione Peroxidase (GPX)	42
4.6.3. Glutathione Redutase (GR).....	42
4.6.4. Peroxidação lipídica (LPO)	42
4.6.5. Danos em DNA	42
4.6.6. Colinesterase (ChE).....	43
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4.8. AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL	44
5. RESULTADOS	45
5.1. CARACTERIZAÇÃO SEDIMENTOLÓGICA	45
5.2. ANÁLISES QUÍMICAS	46
5.2.1. Análises químicas para detecção e quantificação de fluoxetina em sedimentos do ESS	48
5.3. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE COM MEXILHÃO <i>PERNA PERNA</i>	50
5.4. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE COM OURIÇO-DO-MAR <i>ECHINOMETRA</i> <i>LUCUNTER</i>	52
5.5. RESULTADOS DE CITOTOXICIDADE PARA MEXILHÃO <i>MYTELLA CHARRUANA</i>	54
5.6. RESULTADOS DAS ANÁLISES DE BIOMARCADORES.....	55
6. DISCUSSÃO	69
6.1. BIOMARCADORES	76
6.2. AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL	84
7. CONCLUSÕES	88
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta do sedimento do ESS.....	21
TABELA 2 - Equipamentos e materiais utilizados nas análises.....	27
TABELA 3 – Condições para realização e critérios de aceitabilidade dos ensaios de desenvolvimento embriolarval com mexilhão <i>P. perna</i>	29
TABELA 4 – Condições para realização e critérios de aceitabilidade dos ensaios de desenvolvimento embriolarval com ouriço-do-mar <i>Echinometra lucunter</i>	32
TABELA 5 – Critérios para diferenciação de células saudáveis e estressadas.....	39
TABELA 6 - Caracterização do sedimento (Toque Toque Grande, São Sebastião - SP) de acordo com a escala de Wentworth (1922).....	46
TABELA 7 - Resultados de exatidão observada para os pontos considerados nas curvas analíticas de fluoxetina no modo positivo.....	48
TABELA 8 - Resultados da quantificação de fármacos em amostra de sedimento do ESS pelo método EM/EM em modo de operação Multiple Reaction Monitoring (MRM).....	50
TABELA 9 - Ocorrência de ISRSs e seus metabólitos (expressos em um intervalo de concentração ou concentração média) em águas residuais e águas superficiais de diferentes países.....	70

TABELA 10 - Concentrações onde não são previstos efeitos (PNECs) obtidas a partir dos ensaios com ISA (Interface sedimento-água), ELU (Elutriato) e SI (Sedimento integral), e os quocientes de risco (QR) para a fluoxetina (MEC = 10,4 ng.g ⁻¹), detectada no entorno do ESS.....	85
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fórmula estrutural da fluoxetina (CAS 54910-89-3) (Kosjek & Heath, 2010; Silva <i>et al.</i> , 2012).....	9
FIGURA 2 – Mexilhão <i>Mytella charruana</i>	17
FIGURA 3 – Mexilhão <i>Perna perna</i>	18
FIGURA 4 - Ouriço do mar <i>E. lucunter</i>	18
FIGURA 5 - Localização dos pontos de coleta de sedimentos: A) Posição na América do Sul; B) Ponto controle localizado na praia de Toque Toque Grande, São Sebastião/SP; C) Emissário Submarino de Santos (ESS).....	21
FIGURA 6 – Homogeneizador mecânico de sedimentos do tipo Jar-rolling de duas rotações (Pusceddu, 2016).....	22
FIGURA 7 – Teste pelo método de interface sedimento-água.....	23
FIGURA 8 – Preparo do elutriato por agitação mecânica.....	24
Figura 9 – Sistema de exposição - método de Sedimento Integral (SI) - de mexilhões <i>Mytella charruana</i> , ao sedimento marcado com fluoxetina por período de 48h.....	34
Figura 10 - Hemócitos saudáveis de <i>Mytella charruana</i> , observadas ao microscópio óptico (aumento de 40x e de 100x, respectivamente), coradas por vermelho neutro....	40
Figura 11 - Hemócitos estressados de <i>Mytella charruana</i> , observadas ao microscópio óptico (aumento de 40x e de 100x, respectivamente), coradas por vermelho neutro....	40

Figura 12 - Caracterização do risco ambiental elaborado a partir da Diretiva da EMEA (2006).....	45
Figura 13 - Cromatograma obtido para a fluoxetina, modo positivo.....	47
Figura 14 - Representação gráfica da linearidade para quantificação de fluoxetina em sedimento marinho.....	47
FIGURA 15 - Cromatograma obtido para quantificação de fluoxetina em sedimento marinho da região do ESS, Santos/SP.....	49
Figura 16 - Resultado dos ensaios de toxicidade crônica pelo método de interface sedimento-água, para o mexilhão <i>Perna perna</i> após 48 horas de exposição ao sedimento marcado com fluoxetina (ng.g ⁻¹). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....	51
Figura 17 - Resultado dos ensaios de toxicidade crônica pelo método de elutriato, para o mexilhão <i>Perna perna</i> após 48 horas de exposição ao sedimento marcado com fluoxetina (ng.g ⁻¹). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....	51
FIGURA 18. Resultado dos ensaios de toxicidade crônica pelo método de interface sedimento-água, para ouriço-do-mar <i>Echinometra lucunter</i> após 40 horas de exposição ao sedimento marcado com fluoxetina (ng.g ⁻¹). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....	53
Figura 19. Resultado dos ensaios de toxicidade crônica pelo método de interface sedimento-água, para ouriço-do-mar <i>Echinometra lucunter</i> após 40 horas de exposição ao sedimento marcado com fluoxetina (ng.g ⁻¹). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....	53
Figura 20. Ensaios de citotoxicidade em hemócitos do molusco bivalve <i>Mytella charruana</i> após 48 horas de exposição ao sedimento marcado com fluoxetina (ng.g ⁻¹). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....	55

Figura 21. Média e erro padrão para atividade de Glutathione S-Transferase de brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}).. (ANOVA – $p \leq 0,05$).....56

Figura 22. Média e erro padrão para atividade de Glutathione S-Transferase de glândulas digestivas de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....57

Figura 23. Média e erro padrão para atividade de Glutathione S-Transferase de brânquias e glândulas digestivas de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}).....58

FIGURA 24 - Média e erro padrão para atividade de Glutathione Peroxidase de brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....58

FIGURA 25 - Média e erro padrão para atividade de Glutathione Peroxidase de glândula digestiva de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}) (ANOVA – $p \leq 0,05$).59

Figura 26. Média e erro padrão para atividade de Glutathione Peroxidase de glândula digestiva e de brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}) (ANOVA – $p \leq 0,05$).....59

FIGURA 27 - Média e erro padrão da atividade de Glutathione Redutase em brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....60

Figura 28. Média e erro padrão para atividade de Glutathione Redutase em glândula digestiva de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}) (ANOVA – $p \leq 0,05$).....61

Figura 29 . Média contendo erro padrão para atividade de Glutathione Redutase de glândula digestiva e de brânquias de <i>Mytella charruana</i> após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}) (ANOVA – $p \leq 0,05$).....	61
Figura 30. Média e erro padrão para avaliação da peroxidação lipídica (LPO) em brânquias de <i>Mytella charruana</i> após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}) (ANOVA – $p \leq 0,05$).....	62
Figura 31. Média e erro padrão para avaliação da peroxidação lipídica (LPO) em glândulas digestivas de <i>Mytella charruana</i> após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....	63
Figura 32. Média contendo erro padrão para avaliação da peroxidação lipídica em glândulas digestivas e brânquias de <i>Mytella charruana</i> após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....	63
Figura 33. Média e erro padrão para danos em DNA (quebra de fita) em brânquias de <i>Mytella charruana</i> após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}) (ANOVA – $p \leq 0,05$).	64
Figura 34. Média e erro padrão para danos em DNA (quebra de fita) em glândulas digestivas de <i>Mytella charruana</i> após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}) (ANOVA – $p \leq 0,05$).....	65
Figura 35. Média e erro padrão para danos em DNA (quebra de fita) em glândulas digestivas de <i>Mytella charruana</i> após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}) (ANOVA – $p \leq 0,05$).....	66

Figura 36. Média e erro padrão para atividade da colinesterase em brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$).....67

Figura 37. Média e erro padrão para atividade da colinesterase em glândulas digestivas de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....67

Figura 38. Média e erro padrão para atividade da colinesterase em glândulas digestivas e brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina (ng.g^{-1}). (ANOVA – $p \leq 0,05$).....68

LISTA DE ABREVIATURAS

CE50 – Concentração de efeito a 50% dos organismos expostos
CEO – Concentração de efeito observado
CENO – Concentração de efeito não observado
CI50 – Concentração de inibição a 50% dos organismos expostos
ChE – Colinesterase
DSS – Dodecil Sulfato de Sódio
EFS – Extração em fase sólida
ELU – Elutriato
ERA – *Environmental risk assessment*
ERO – Espécie reativa de oxigênio
ESS – Emissário submarino de Santos
ETE – Estação de tratamento de esgoto
ETA – Estação de tratamento de água
FDA – Food and Drug Administration
FPCP – Fármacos e produtos de cuidados pessoais
GPx – Glutathione peroxidase
GST – Glutathione S-transferase
ISA – Interface sedimento-água
LPO – Peroxidação lipídica
OMS – Organização Mundial de Saúde
MEC – *Mensured environmental concentration*
MRM – *Multiple reaction monitoring*
PEC – *Predicted environment concentration*
PNEC – *Predicted no effect concentration*
QR – Quociente de risco
SI – Sedimento integral
TRCVN – Tempo de retenção do corante Vermelho Neutro
USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da água é uma das principais abordagens de gestão de risco ambiental defendidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA). Onde é defendido que as águas residuais devem ser tratadas a fim de satisfazerem certos critérios de qualidade para evitar qualquer risco, especialmente à saúde humana (Victor *et al.*, 2008).

Indo mais além, esta abordagem convida os países a considerarem suas condições culturais, socioeconômicas e ambientais para otimizarem o desenvolvimento e implementação de uma gestão de risco ambiental mais eficiente (Sato *et al.*, 2013).

Áreas costeiras são frequentemente alvo de poluentes e tal fato se tornou um problema de caráter mundial. Um dos principais fatores para tal agravamento vem da entrada excessiva de macronutrientes, por exemplo Nitrogênio e Fósforo, principalmente por aporte de efluentes domésticos sem tratamento em corpos hídricos (Richardson & Jorgensen, 1996).

Atualmente, há um aumento da preocupação com a presença de fármacos e produtos de cuidado pessoal (FPCP), os quais apesar de normalmente serem relatados em pequenas concentrações podem apresentar baixa biodegradabilidade no meio ambiente. Tais substâncias são caracterizadas como contaminantes de preocupação emergente, sobre os quais existe pouco conhecimento sobre possíveis efeitos gerados em populações marinhas não – alvo e riscos ecológicos para o meio aquático.

Dentro da classe dos contaminantes emergentes, os fármacos de utilização humana são considerados um dos grupos de substâncias ambientalmente mais relevantes, pelo fato de sua produção e utilização ocorrerem em grandes volumes. Por conta disso e por possuírem propriedades físico-químicas (e.g. coeficiente de partição e pKa) que lhes conferem resistência à biotransformação e aos processos de tratamento de água e esgoto, eles são hoje considerados micropoluentes com elevada persistência ambiental (Mulroy, 2001; Bottoni *et al.*, 2010; Barreiro & Fraga, 2015).

Enquanto novos compostos surgem como possíveis medicamentos para problemas de saúde, seus efeitos desconhecidos, produtos de degradação metabólica e possível acumulação geram uma grande preocupação sobre o meio ambiente (Prasse *et al.*, 2015).

A principal rota de entrada de resíduos de fármacos no ambiente é o lançamento de esgotos sanitários, tratados ou não, no meio aquático (Melo *et al.*, 2009). Em 1987 a agência americana Food and Drug Administration (FDA) aprovou o medicamento Prozac[®] que tem como princípio ativo a fluoxetina (FLU), para o tratamento de doenças de caráter depressivo. Desde então a fluoxetina se tornou um fenômeno mundial de vendas e prescrição médica (Healy, 1997). Em países como o Brasil, que possuem sistemas públicos de saúde deficientes e com baixa capacidade de monitoramento de pacientes a longo prazo, a prescrição de antidepressivos, inclusive entre a população de elevada faixa etária, é comum (Fulone & Lopes, 2017).

Dentro deste cenário de crescimento populacional e aumento da utilização de antidepressivos pela população em geral, regiões costeiras, mais especificamente a “Baixada Santista” localizada no litoral sul do estado de São Paulo/Brasil merece destaque, pois apresenta diferentes emissários submarinos de efluentes com baixa qualidade de tratamento. Dentre estes, destaca-se aquele localizado na cidade de Santos/SP, Brasil, tanto pelo volume de lançamento de efluente diário quanto pelo elevado número populacional da cidade, o que gera uma maior preocupação quanto à possível entrada de fármacos no ambiente marinho. Em função disso e da presença de fármacos em sedimentos marinhos reportada na literatura científica para vários países (Moreno-González *et al.*, 2015; Arpin-Pont *et al.*, 2016) grande ênfase tem sido dada para a avaliação de impacto ambiental com base em dados ecotoxicológicos sobre estes micropoluentes, pois ainda são escassas as informações sobre os possíveis efeitos e riscos à biota aquática.

Cabe ressaltar que, enquanto linha de evidência de monitoramento ambiental, tais estudos podem fornecer um maior conhecimento da qualidade de águas e sedimentos marinhos ajudando na regulamentação e definição de bases legais que

estabeleçam limites para o lançamento de efluentes domésticos contendo fármacos, definindo áreas críticas e minimizando possíveis impactos ambientais.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo identificar a ocorrência do fármaco fluoxetina em sedimentos da baía de Santos/SP, Brasil, bem como o risco ambiental gerado para espécies aquáticas.

2.1. Objetivos específicos

- Identificar e quantificar a fluoxetina em sedimentos do entorno do ESS;
- Caracterizar os efeitos da toxicidade da fluoxetina, em sedimento marcado, sobre o desenvolvimento de embriões de *Perna perna* e *Echinometra lucunter*;
- Avaliar as respostas bioquímicas de mexilhões *Mytella charruana*, após serem expostos ao sedimento marcado com fluoxetina;
- Avaliar o risco ambiental da fluoxetina em sedimentos marinhos, relacionando as concentrações ambientais encontradas com as respostas biológicas obtidas para os invertebrados aquáticos, *Perna perna*, *Echinometra lucunter* e *Mytella charruana*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Região Metropolitana da Baixada Santista

A baixada santista (RMBS) é uma região metropolitana do litoral Sul do estado de São Paulo, composta por nove municípios que juntos representam uma das áreas mais populosas do Brasil, com cerca de 1,5 milhões de habitantes até o ano de 2000 (Jakob, 2003).

O município de Santos está localizado na RMSB, latitude de 23°56'27"S e longitude de 45°19'48"W. Sua área compreende 280,674 km² e uma população residente estimada em 419.400 habitantes e densidade demográfica de 1.494,26 (habitante/km²) (IBGE, 2015; Freitas *et al.*, 2017). A região insular de Santos possui aproximadamente 39 km² e é caracterizada por ser extremamente urbanizada e responsável por abrigar a maior parte de sua população (Negreiros, 1992).

A proximidade do litoral com a capital paulista e o aumento da frota de veículos possibilitaram a expansão do turismo e fizeram com que o mercado imobiliário na RMBS expandisse o setor de construção, loteando e verticalizando a orla marítima (Cabianca & Souza, 2017). Com isso, há um recorrente fenômeno de flutuação populacional em determinados períodos do ano, em que um grupo de indivíduos que possuem domicílio na RMBS, mas que não fazem uso dele continuamente, ou seja, não têm nela sua residência fixa se desloca para o litoral (Instituto Polis, 2014). A população flutuante ocupa domicílios ocasionalmente, principalmente em datas festivas e feriados. Portanto, esses domicílios assumem a função de casas de veraneio, que por sua vez gera um aumento do volume de efluentes domésticos destinados ao ESS.

3.2. Emissário Submarino de Santos/SP

O Emissário Submarino de Santos (ESS), localizado na praia do José Menino, Santos/SP, é caracterizado por destinar efluentes domésticos ao ambiente marinho, após prévia passagem pela estação de tratamento de esgotos (ETE), provenientes em sua maior parte das residências e comércios do município. Construído pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (Sabesp) em 1979, é uma tubulação

de aço com diâmetro interno de 1,75m e revestido externamente por concreto, de modo a garantir um peso aderente de 150 kg/m na água do mar e de extensão total aproximada de 4 km (Mandaji, 2008).

O ponto para lançamento dos efluentes da baía de Santos foi inicialmente determinado com base em critérios físicos, ecológicos, técnicos e econômicos, como ponto mais próximo para os efluentes alcançarem correntes marinhas superficiais a fim de se obter as melhores condições de diluição inicial e assim garantir uma diluição total em possíveis ocorrências de correntes convergentes para a costa (Mandaji, 2008).

A estação da Sabesp recebe efluentes da cidade de Santos e parte do esgoto da cidade de São Vicente, onde são submetidos a um pré condicionamento antes de serem encaminhados ao ESS.

Em alta temporada é lançado ao mar, pelo emissário, em média, 192.670 m³/dia de esgoto e em baixa temporada este volume fica na casa dos 165.700 m³/dia, em média. De acordo com Relatório Qualidade das águas litorâneas no estado de São Paulo apresentado pela Cetesb (2005), diversas análises foram realizadas em anos anteriores para verificar a qualidade do efluente que chega à Estação de Pré-Condicionamento. Porém, ainda hoje não é utilizado como parâmetro de qualidade ambiental a presença de FPCP no efluente do ESS.

3.3. Fármacos e produtos de cuidado pessoal

A degradação contínua da parte abiótica do ambiente aquático, destacando-se o ambiente marinho de regiões costeiras, tem ocorrido de forma global o que pode acarretar em uma interferência da homeostase da biota aquática marinha. Tal fato parece estar intimamente relacionado com o aumento do impacto antrópico sobre o ambiente.

Dentre a diversidade de substâncias sintéticas produzidas, atualmente recebem destaque os FPCP, reconhecidos também como contaminantes de preocupação emergente.

O consumo de fármacos é bastante significativo e tal fato pode ser verificado pelo crescente aumento da arrecadação pela venda de fármacos em diferentes países, um exemplo disso pode ser visto na União Européia onde aproximadamente 3.000 diferentes substâncias são usadas em medicamentos para consumo humano, como antidepressivos, hormônios, analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, β -bloqueadores, reguladores de lipídios, dentre outros (Petrović *et al.*, 2014).

Geralmente FPCPs podem atingir corpos hídricos por excreção (urina/fezes) após uso terapêutico, eliminação direta de drogas domésticas, efluentes de ETEs, descarte inadequado após a expiração do prazo de validade, disposição em aterros (Kummerer, 2009), aquicultura, bem como a utilização de águas residuárias para irrigação (Xu *et al.*, 2009).

Dessa forma o aumento da utilização de fármacos tem gerado cada vez mais destaque, pois eles também tem sido mais detectados em corpos hídricos em quantidades relevantes, trazendo como consequência potenciais riscos ecológicos para o ambiente aquático (Ternes *et al.*, 2002; Braga *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010; Pintado-Herrera *et al.*, 2014; Pimentel *et al.*, 2016).

Somado à isso, estas substâncias ainda não são monitoradas com frequência apropriada no ambiente, uma vez que não são inseridos nas legislações atuais que regulamentam a qualidade da água e sedimento. Contudo é descrito na literatura que tal classe de compostos possui moléculas extremamente ativas biologicamente e propriedades físico-químicas (lipofilidade, resistência à biotransformação e aos processos de tratamento) que lhes conferem capacidade de acumular não apenas em corpos hídricos, mas também em sedimentos e tecidos, principalmente de regiões próximas de áreas de descarte de efluentes domésticos com ou sem tratamento (Bottoni *et al.*, 2010).

Novas tecnologias em detecção e quantificação de substâncias orgânicas no ambiente aquático, possibilitaram uma melhor correlação entre concentrações ambientais e efeitos gerados à organismos não alvos. Além disso, permitiram encontrar concentrações de FPCP (ng.L^{-1}) especialmente em águas residuárias tratadas ou não, águas superficiais e sedimentos marinhos próximos a ETEs e locais de lançamentos de efluentes e mesmo em água potável da rede de distribuição (Bila & Dezotti, 2003; Roberts & Thomas, 2006; Benotti *et al.*, 2009; Petrović *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2016; Cortez *et al.*, 2014; Pusceddu *et al.*, 2018).

3.3.1. Fluoxetina

A fluoxetina (cloridrato de N-metil- γ -[4-(trifluorometil) fenoxi]-benzenopropanamina) (Figura 1) foi o primeiro medicamento desenvolvido e comercializado dentro da categoria de fármacos destinados ao tratamento de enfermidades mentais (Eli Lilly & CO., 2011). Com a finalidade de atuar em fendas sinápticas entre neurônios a fim de inibir a recaptação de serotonina a fluoxetina é mundialmente prescrita como medicamento psicotrópico em tratamentos de transtornos depressivos e de ansiedade em geral (Dulawa *et al.*, 2004; Mennigen *et al.*, 2011; Winder *et al.*, 2012). A fluoxetina, assim como fármacos em geral, possui baixa biodegradabilidade, uma vez que é desenvolvida para ser persistente, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico (Kallenborn *et al.*, 2008; Mulroy, 2001).

FIGURA 1 – Fórmula estrutural da fluoxetina (CAS 54910-89-3) (Kosjek & Heath, 2010; Silva *et al.*, 2012).

A taxa de degradação de fármacos em sedimentos varia de acordo com o tempo de meia-vida de cada composto. A fluoxetina apresenta tempo de meia vida de 2 à 4 dias, podendo gerar como metabólito ativo a norfluoxetina que por sua vez possui meia vida de 7 à 15 dias, no organismo de mamíferos (Gury & Cousin, 1999; Hiemke & Härtter, 2000). No ambiente aquático a fluoxetina também possui tempo de meia vida próximo à 4 dias e somado a isso apresenta elevado coeficiente de sorção ($\log K_{oc}$) que é o coeficiente que gera estimativa da tendência de partição de compostos orgânicos da fase líquida para a matéria orgânica do sedimento. O valor de K_{oc} para a fluoxetina é reportado na literatura variando entre 3,82 a 5,63 (Johnson *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012), o que a caracteriza como uma substância persistente. Segundo USEPA, (2007) na ausência de outros processos de degradação, as meias-vidas de substâncias químicas no ambiente podem aumentar por conta de sua adsorção ao sedimento.

3.4. Ensaios Ecotóxicológicos

Análises ecotóxicológicas são geralmente baseadas em ensaios de toxicidade, que são procedimentos nos quais as respostas dos organismos aquáticos são usadas para detectar e medir os efeitos de uma ou mais substâncias, resíduos, ou fatores ambientais, sozinhos ou em combinação, durante um determinado período. Estes métodos são muito empregados para avaliação de efeitos de xenobióticos no ambiente aquático, sendo que alguns parâmetros como toxicidade aguda (letalidade) e crônica (inibição de reprodução ou desenvolvimento) já são previstos na Legislação Brasileira (CONAMA 430/2011 e CONAMA 454/2012) e são utilizados para avaliação de risco ambiental e regulação de concentrações de compostos no ambiente aquático (Pereira, 2008).

3.4.1. Ensaios de desenvolvimento embriolarval

Concentração e tempo de exposição estão diretamente relacionados aos ensaios de toxicidade e, portanto, altas concentrações podem ter efeitos prejudiciais em tempos de exposição extremamente curtos (Fonseca, 1991). Porém concentrações baixas podem produzir efeitos crônicos sub-letais ou, até mesmo, letais caso a exposição ao agente tóxico ocorra por um longo período (Cesar *et al.*, 1997).

Ensaios de toxicidade crônica permitem avaliar tais efeitos sub-letais de efluentes, amostras ambientais e substâncias químicas (isoladas ou combinadas) solúveis, dispersas em água ou associadas ao sedimento (Rand & Petrocelli, 1985). Estes efeitos de longa duração são relatados como uma mudança no metabolismo, crescimento, reprodução, mutações e até mesmo morte dos organismos-teste (Cesar *et al.*, 1997).

3.5. Ensaios biológicos

3.5.1. Ensaio do tempo de retenção do vermelho neutro

O ensaio para avaliação do TRCVN baseia-se no princípio de que os lisossomos de células saudáveis conseguem reter o corante vermelho neutro por um certo período de tempo, enquanto que danos na integridade e estabilidade da membrana lisossomal causados pelo acúmulo de xenobióticos diminuem o tempo de retenção do corante, induzindo o vazamento de componentes do lisossoma para o citosol mais rapidamente (Dailianis *et al.*, 2003).

O corante vital vermelho neutro é uma substância química que possui a capacidade de passar pela membrana celular fosfolipídica e por isso adentrar células. Ao entrar no citoplasma o corante é incorporado aos lisossomos. Por isso o ensaio do tempo de retenção do vermelho neutro em hematócitos pode ser utilizado para a detecção de alterações na membrana lisossômica, as quais podem ser relacionadas à exposição de organismos vivos à xenobióticos como fármacos e consequentemente levar ao aumento de processos de degeneração celular.

3.5.2. Ensaios com biomarcadores

Marcadores biológicos ou biomarcadores são moléculas que indicam a ocorrência de um determinado processo bioquímico em um organismo e que podem ser identificadas e quantificadas experimentalmente.

Quando em contato com um organismo vivo, contaminantes persistentes, como herbicidas ou fármacos, podem ser biotransformados por mecanismos celulares que atuam de modo a tornar estes xenobióticos substâncias menos tóxicas e facilitar a sua excreção (Santos & Martinez, 2012).

Biomarcadores enzimáticos podem agir por diferentes vias metabólicas (por exemplo, neuronais, metabolismo energético e estresse oxidativo) e por isso são capazes de avaliar respostas iniciais de exposição à fármacos (Nunes *et al.*, 2006).

Como exemplo neste processo, pode-se destacar a atuação de duas enzimas, a citocromo P450 e a glutathione-S-transferase (GST), que são encontradas em moluscos e com isso podem ser utilizadas como marcadores biológicos (Van Der Oost *et al.*, 2003; Grosnick *et al.*, 2006).

As isoenzimas da glutathione S-transferases (GSTs) são um grupo de enzimas que catalisam a conjugação da glutathione com xenobióticos, incluindo pesticidas organofosforados, e os aldeídos citotóxicos produzidos na peroxidação lipídica (Booth & O'halloran, 2001). A glutathione peroxidase (GPx) desempenha um papel protetor importante, agindo como depuradora para níveis elevados de peróxido de hidrogênio; durante este processo, a glutathione é oxidada e perde o seu potencial antioxidante protetor (Nunes *et al.*, 2006).

As defesas antioxidantes enzimáticas são fundamentais, onde as principais enzimas antioxidantes são: a superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) (Parolini & Binelli, 2014). A SOD é uma metaloenzima que age sobre o radical O_2^- dismutando-o a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e protegendo em até 95% os alvos do ataque do ânion superóxido. Está presente no citosol a forma SOD-CuZn (possui cobre e zinco em seu sítio ativo) enquanto que na mitocôndria está a SOD-Mn (com manganês em seu sítio ativo). Para a eliminação de peróxidos existem duas enzimas principais, a CAT e a GPx. A CAT tem como função dismutar o H_2O_2 em $2 H_2O$ e O_2 , e está localizada em maior abundância em peroxissomos, já a GPx pertence a uma classe de enzimas capazes de remover o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos através do acoplamento da redução de água à oxidação da glutathione reduzida (GSH) (Halliwell & Gutteridge, 2007; Cominetti *et al.*, 2011).

Além disso, esta age de maneira importante na proteção celular dos organismos quanto às mudanças oxidativas, especialmente na prevenção da peroxidação lipídica por hidroperóxidos lipídicos, sendo este um dos mecanismos de defesa antioxidantes mais relevantes do sistema biológico. A atividade destas enzimas como biomarcador tem sido largamente utilizada na detecção precoce de respostas oxidativas em plantas e animais para diferentes poluentes (Stegeman *et al.*, 1992).

Processos oxidativos celulares e a atividade GPx geram o dissulfeto da glutathione ou glutathione oxidada (GSSG). Para a manutenção do ambiente redutivo intracelular a razão entre glutathione reduzida e oxidada (GSH/GSSG) é mantida em níveis muito altos (Sies & Moss, 1978). Para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutathione redutase (GR) reduz a GSSG à custa de NADPH, regenerando a GSH e mantendo desta forma o estado redox intracelular.

Uma vez que as perturbações ocorridas pela exposição a contaminantes evidenciadas pelas alterações nos diferentes processos bioquímicos podem resultar em danos celulares, especial atenção também tem sido dada a técnicas de avaliação de peroxidação lipídica, danos em DNA e em organelas (Pereira, 2008).

O metabolismo do oxigênio nas mitocôndrias origina uma grande quantidade de (ROS). Esses radicais altamente reativos, como $\text{OH}^\bullet$, frequentemente interagem com moléculas biológicas incluindo lípidos, se ligam ao hidrogênio destas e induzem à peroxidação lipídica (LPO) (Winston & Di Giulio, 1991)

A exposição à xenobióticos normalmente desencadeiam a produção excessiva de ROS. Esse excesso impede o sistema antioxidante de neutralizar todas essas espécies reativas resultando no acúmulo de danos celulares classificados como LPO (Halliwell & Chirico, 1993; Van der Oost *et al.*, 2003).

O aumento da ocorrência de lesões em membrana celulares, que são constituídas fundamentalmente por fosfolípidos, podem ser ocasionadas por enzimas fosfolipases, presentes nos leucócitos e plaquetas, resultando na produção de ácido araquidônico e consequente aumento da atividade de enzimas cicloxigenases (Cox). As quais são capazes de indicar, portanto variações de processos inflamatórios.

3.6. Avaliação de risco ambiental

Em seu trabalho, Pusceddu (2016) define que o estabelecimento de risco ambiental relativo aos FPCP em sistemas aquáticos constitui uma tarefa complexa,

uma vez que são escassas ou ausentes informações importantes que permitam avaliar de forma robusta o comportamento e efeito destes compostos no ambiente aquático em geral e, principalmente, no ambiente marinho.

Assim torna-se cada vez mais importante que as análises de identificação e quantificação de substâncias potencialmente tóxicas sejam integradas com análises ecotóxicológicas em diferentes níveis de organização biológica, a fim de se entender como fármacos, por exemplo, podem influenciar no metabolismo e consequentemente na sobrevivência de organismos não alvos.

As diretrizes existentes para este tipo de regulação, como a publicada pela Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency*) (EMA, 2006) e o Documento Guia Técnico (TGD) na Diretiva de Apoio de Comissões 93/67/EEC de Avaliação de Risco Ambiental para as Novas Substâncias Notificadas, sugerem um processo de avaliação de risco ambiental a partir de análises preliminares, seguindo a partir deste ponto para posteriores análises mais específicas caso seja identificada a mínima possibilidade de risco em potencial.

A EMA, responsável pela proteção da saúde animal e pública através da investigação científica e supervisão de medicamentos, publicou a diretiva EMA/CHMP/SWP/4447/00 que descreve recomendações para a avaliação de risco ambiental de medicamentos de uso humano (EMA, 2006). Esse guia leva em consideração diferentes dados, como concentrações ambientais mensuradas ou estimadas, resultados de ensaios de toxicidade com diferentes organismos, características químicas dos compostos analisados e fatores de avaliação, que são expressões do grau de incerteza na extrapolação dos dados dos ensaios de toxicidade com um número relativamente limitado de espécies quando comparado ao ambiente natural. Além disso, o fator de avaliação considera variações nas diferenças de sensibilidade interespecies, na variabilidade intraespecies, e a extrapolação de dados gerados em laboratório para o ambiente natural (EMA, 2006).

A avaliação de risco proposta pela EMA (2006) é dividida basicamente em duas fases. A Fase I, considerada “pre-screening”, consiste na determinação (Measured

environmental concentration – MEC) ou estimativa (Predicted environmental concentration - PEC) das concentrações ambientais dos compostos estudados. Quando a concentração do composto no ambiente for maior que $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$, deve ser realizada avaliação de risco ambiental - Fase II. Em alguns casos, esse limite não precisa ser aplicado, pois alguns fármacos podem afetar a reprodução de vertebrados ou invertebrados em concentrações mais baixas do que $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$. Neste caso, estas substâncias devem entrar diretamente na Fase II da estratégia de avaliação de risco. Vale ressaltar que a avaliação de risco de compostos altamente lipofílicos e potenciais desreguladores endócrinos podem ser realizadas independentemente da quantidade liberada no ambiente. A Fase II é dividida em duas etapas, denominadas TIER A e B. No TIER A, é feito o levantamento de um conjunto de dados, que prevê informações sobre as propriedades físico-químicas, o destino da substância no ambiente, e os efeitos em organismos aquáticos. Nesta avaliação, são propostos ensaios de toxicidade crônica para se determinar concentrações onde não são previstos efeitos (Predicted no effect concentration - PNEC), com o objetivo de prever a concentração da substância para a qual não se espera que ocorram efeitos adversos. Se a relação entre a concentração ambiental e a concentração onde não são previstos efeitos (PEC ou MEC / PNEC) do fármaco apresentar quociente de risco (índice para o estabelecimento do risco ambiental) inferior a 1, pode-se concluir que a substância não é susceptível de representar risco para o ambiente aquático. Se a relação for superior a 1, serão necessárias avaliações mais robustas no TIER B. O TIER B é uma avaliação de risco detalhada, com avaliações mais aprofundadas, e pode ser realizada por meio de um PEC mais preciso ou da concentração ambiental mensurada (MEC), da PNEC do composto de origem, e de outros dados relevantes, como efeitos biológicos específicos por meio do uso, por exemplo, de biomarcadores (Pusceddu, 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Organismos-teste

4.1.1. *Mytella charruana*

Os moluscos representam o segundo maior grupo em diversidade animal e, os bivalves marinhos, são os moluscos mais abundantes (Russell & Hunter, 1983).

Muitos moluscos aquáticos, principalmente os bivalves que são os mais explorados, cultivados e consumidos no Brasil e no Mundo, se alimentam por filtração da água, graças ao movimento ciliar de células das brânquias (Klappenbach, 1965; Mora & Alpizar 1998). Com um processo de seleção de partículas alimentares principalmente, em função do tamanho, esses animais acabam por ingerir grande quantidade de dejetos orgânicos e inorgânicos juntamente com a alimentação (baseada principalmente em microalgas). Parte dos componentes ingeridos (as partículas maiores) é eliminado na forma de pseudo-fezes (compostas por “pellets” formados pelas partículas rejeitadas, associadas a muco protéico). Devido ao seu sistema de circulação aberta e corpo todo banhado pela água, boa parte dessas partículas acaba por entrar em contato direto com os tecidos. Isso faz com que ocorra um rápido e fácil acúmulo de qualquer tipo de componente presente na água. A taxa de acúmulo de bactérias e metais pesados, por exemplo, pode ser de 100 a 1000 vezes a quantidade presente na água circundante. Um agravante para os consumidores desses moluscos é que, na maioria das vezes, o acúmulo desse material não chega a causar problema para esses animais. Algumas vezes eles até crescem e engordam mais em ambientes contaminados, porém ficam impróprios para o consumo humano (Ferreira & Magalhães, 2004).

As espécies de mitilídeos (família *Mytilidae*) de interesse comercial que ocorrem no Brasil são: *Mytella charruana* (Figura 2) e *Mytella guyanensis*, de água salobra. Estes mariscos, vivem em manguezais, enterrados no lodo e emaranhados entre as raízes da vegetação.

Segundo Pereira & Lopes (1995), essas espécies estão distribuídas, respectivamente, entre a zona infralitoral e a zona de entremarés e na zona de entremarés, de ambientes estuarinos (Nishida & Leonel, 1995; Marques, 1998).

Figura 2. Mexilhão *Mytella charruana* (Pusceddu, 2016).

4.1.2. *Perna perna*

Mexilhões *Perna perna* (Figura 3) são moluscos filtradores. Esta espécie distribui-se por todo litoral brasileiro, além da costa da Venezuela, Uruguai, Argentina e África do Sul, onde se encontram fixos a rochas formando densos bancos naturais na região entre marés e no infralitoral, geralmente em regiões de alto hidrodinamismo (Rios, 1994).

Seu ciclo sexual, na região sudeste, é praticamente contínuo durante todo o ano, havendo períodos de reprodução mais acentuados no outono e primavera e menos intensos no verão e inverno (Lunetta, 1969). Em função disso é uma espécie que também é bastante comercializada para o consumo humano.

Figura 3. Mexilhão *Perna perna*.

4.1.3. *Echinometra lucunter*

O ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* (Figura 4) possui uma morfologia bastante característica com espinhos grossos, bastante resistentes e coloração variando do marrom escuro ao negro. É bastante abundante na costa brasileira sendo encontrado comumente sobre locas escavadas em rochas, em regiões de mar calmo ou batido. Alimenta-se basicamente de macroalgas e animais incrustantes. Ocorre desde a Flórida (EUA), até o sul do Brasil, bem como em regiões costeiras de ilhas tais como Antilhas, Bermudas, Ascensão, Santa Helena e Angola (Tommasi, 1966 *apud* Prósperi & Araújo, 2002).

Figura 4. Ouriço – do – mar *Echinometra lucunter*.

4.2. Fármaco alvo do estudo: Fluoxetina

A fluoxetina, assim como fármacos em geral, possui baixa biodegradabilidade, uma vez que é desenvolvida para ser persistente, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico (Kallenborn *et al.*, 2008; Mulroy, 2001).

A taxa de degradação de fármacos em sedimentos varia de acordo com o tempo de meia-vida de cada composto. A fluoxetina apresenta tempo de meia vida de 2 à 4 dias, podendo gerar como metabólito ativo a norfluoxetina que por sua vez possui meia vida de 7 à 15 dias, no organismo de mamíferos (Gury & Cousin, 1999; Hiemke & Härtter, 2000). No ambiente aquático a fluoxetina também possui tempo de meia vida próximo à 4 dias e somado a isso apresenta elevado coeficiente de sorção ($\log K_{oc}$) que é o coeficiente que gera estimativa da tendência de partição de compostos orgânicos da fase líquida para a matéria orgânica do sedimento. O valor de K_{oc} para a fluoxetina é reportado na literatura variando entre 3,82 a 5,63 (Johnson *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012), o que a caracteriza como uma substância persistente. Segundo USEPA, (2007) na ausência de outros processos de degradação, as meias-vidas de substâncias químicas no ambiente podem aumentar por conta de sua adsorção ao sedimento.

4.3. Avaliação ecotóxica do sedimento

4.3.1. Coleta e caracterização sedimentológica

O sedimento utilizado nos ensaios ecotoxicológicos foi coletado na praia de Toque-Toque Grande no município de São Sebastião Litoral Norte do Estado de São Paulo, local caracterizado por possuir baixa influência antrópica e portanto elevada qualidade ambiental.

Em 2013, o monitoramento realizado pela CETESB, no que se refere a balneabilidade de praias no litoral de São Paulo, indicou a praia de Toque Toque Grande como “Qualificação Anual Ótima” (CETESB, 2014), o que evidencia pouca influência de esgotos domésticos na região, que é a principal via de entrada dos fármacos. Além disso o sedimento empregado nos ensaios foi caracterizado quanto à umidade, granulometria, matéria orgânica e carbonatos. Estes parâmetros foram avaliados antes dos experimentos, seguindo protocolos padronizados.

A determinação da umidade do sedimento controle e análise de distribuição granulométrica de massa, segundo intervalos definidos na escala de Wentworth (Wentworth, 1922), foram realizadas seguindo os procedimentos descritos na Norma Técnica da CETESB L6.160 (1995). Para medir o teor de matéria orgânica foi utilizado o protocolo descrito por Luczak *et al.*, (1997), enquanto a avaliação do teor de carbonatos seguiu os procedimentos descritos por Hirota & Szyper (1975).

Para análise da presença e quantificação de concentrações ambientais de fluoxetina, foi realizada uma amostragem composta de sedimentos a partir de 5 pontos no entorno do lançamento do esgoto do Emissário Submarino de Santos (ESS), SP (Figura 5). As amostras foram coletadas em fevereiro de 2015 (verão) com auxílio de uma draga do tipo van veen, acondicionadas em sacos plásticos, e mantidas em caixas térmicas com gelo durante o transporte até o laboratório. Em laboratório, as amostras foram mantidas a temperatura de 4°C até a realização das análises químicas por cromatografia de alta potência acoplada ao espectômetro de massas (HPLC/MS). As localizações dos pontos de coleta encontram-se na Figura 5 e as coordenadas geográficas estão descritas na Tabela 1.

Figura 5 - Localização dos pontos de coleta de sedimentos: A) Posição na América do Sul; B) Ponto controle localizado na praia de Toque -Toque Grande, São Sebastião/SP; C) Emissário Submarino de Santos (ESS).

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta do sedimento do ESS.

Locais de amostragem	Latitude	Longitude
Ponto 1	24°00'041"S	46°21'048"W
Ponto 2	23°59'997"S	46°21'664"W
Ponto 3	23°59'858"S	46°20'776"W
Ponto 4	24°00'284"S	46°21'155"W
Ponto 5	23°59'764"S	46°19'227"W

4.3.2. Marcação de sedimento

Este método envolve a adição de uma ou mais substâncias químicas em amostras de sedimento formulado para avaliação dos efeitos do composto testado sobre os organismos expostos. O protocolo empregado para o preparo, equilíbrio e mistura do sedimento com o composto foram embasados no manual técnico da USEPA (2001).

O método de marcação de sedimento envolveu a adição do fármaco fluoxetina em concentrações conhecidas ao sedimento coletado e para tanto foi utilizado um equipamento de agitação mecânica (jar-rolling[®]), que consiste em uma máquina que gira em dois eixos diferentes de forma simultânea (Figura 6) (Pusceddu, 2016). Esta técnica é considerada a mais eficiente para homogeneização de substâncias químicas em grandes volumes de sedimento (USEPA, 2001).

Figura 6 - Homogeneizador mecânico de sedimentos do tipo Jar-rolling de duas rotações (Pusceddu, 2016).

A técnica utilizada consistiu na adição de 500 g de sedimento úmido nos frascos do jar-rolling (1 L), e em seguida foi adicionado ao sedimento 50 mL de solução de fluoxetina para cada concentração desejada. Em seguida, os frascos com a mistura de sedimento e solução dos compostos foram agitados por 15 minutos. Após o procedimento de mistura, os frascos foram mantidos por 7 dias em ambiente com temperatura controlada ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$) e sem iluminação para que se estabelecesse o equilíbrio químico entre as substâncias-teste, o sedimento e a água intersticial (Francis *et al.*, 1984). Após os procedimentos de mistura e equilíbrio, os sedimentos marcados foram utilizados em 3 tipos de exposição: sedimento integral, interface sedimento-água e elutriato.

A exposição ao sedimento integral (SI) visa a exposição direta dos organismos ao sedimento marcado. O sistema de interface sedimento-água (ISA) avalia a toxicidade do sedimento contaminado a partir da solubilização do composto testado, além de fluxos ascendentes de água intersticial contaminada à água de coluna imediatamente superior ao sedimento. Este sistema foi proposto por Anderson *et al.* (1996) e adaptado por Cesar *et al.* (2004), e consiste em tubos de ensaio contendo 2 mL de sedimento marcado e 8 mL de água de diluição, com uma rede de plâncton logo acima do sedimento para facilitar a recuperação das larvas no final do experimento (Figura 7).

Figura 7 - Teste pelo método de interface sedimento-água

O elutriato do sedimento (ELU), que simula um processo de ressuspensão do sedimento e possível solubilização do composto testado, foi obtido por meio da mistura do sedimento marcado com água de diluição na proporção de 1:4 (sedimento-água). Essa mistura foi submetida a agitação com auxílio de um agitador mecânico durante 30 minutos (Figura 8). Após a sedimentação, o sobrenadante foi utilizado para o ensaio.

Figura 8 - Preparo do elutriato por agitação mecânica.

A água de diluição utilizada nos experimentos foi preparada por meio da diluição de sal marinho (Redsea®) em água destilada, com salinidade entre 30 e 36 ppm, variando de acordo com o organismo-teste empregado, e filtrada em membrana de celulose com porosidade de 0,22 μm .

A técnica utilizada consistiu na adição de 500 g de sedimento úmido nos frascos do jar-rolling (1L), e em seguida foi adicionado ao sedimento 50 mL da solução de fluoxetina nas concentrações desejadas. O recipiente com a mistura de sedimento e solução de FLU permaneceu sob agitação por 15 minutos. Após o procedimento de mistura, os frascos foram mantidos por 7 dias em ambiente com temperatura controlada (aproximadamente 4°C) e sem iluminação para o equilíbrio químico da solução de FLU com o sedimento e a água intersticial.

Após os procedimentos de mistura e equilíbrio, foram preparados os sistemas-testes. Para os ensaios de interface sedimento-água, foi adicionada água do mar reconstituída ao sedimento marcado, seguindo a proporção definida pelo método de ensaio uma parte de sedimento para quatro partes de água. O tempo de equilíbrio entre o sedimento e a água foi de no mínimo 12h antes do início dos experimentos.

4.4. Análises Químicas dos Sedimentos

Os procedimentos para as análises químicas dos sedimentos foram conduzidos no Laboratório do CEMSA (Centro de Espectrometria de Massas Aplicada) sob coordenação do Prof. MSc. Daniel Temponi Lebre. As análises químicas dos sedimentos foram realizadas com base no protocolo da USEPA (2007).

Previamente às análises químicas foram realizados: 1) Desenvolvimento e otimização de metodologia analítica para extração e quantificação de Fluoxetina em sedimentos marinhos, pelas técnicas de extração em fase sólida (SPE) e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); 2) Otimização das condições de detecção do sistema de EM/EM em modo de operação Multiple Reaction Monitoring (MRM); 3) Otimização da fonte de íons (ESI ou APCI) para melhor detecção a fluxo cromatográfico determinado; 4) Desenvolvimento e otimização do método cromatográfico com intuito de minimizar efeito de matriz (interferentes presentes nas amostras); 5) Desenvolvimento de método de extração e preparo de amostras a fim de aumentar a recuperação ou exatidão dos resultados na matriz de sedimento marinho.

As amostras de sedimento marcado e as amostras de sedimentos provenientes do ESS (1 g peso/seco) foram homogeneizadas e processadas pelo método de extração ácida, por meio da adição de 10 mL de acetonitrila às amostras. Após este procedimento, as amostras foram levadas a um ultrassom por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos (2500 rpm) e o sobrenadante separado. Os sólidos resultantes da centrifugação foram ressuspensos em 10 mL de tampão fosfato (pH 2,0). Novamente as amostras foram levadas a um

ultrassom por 30 minutos e centrifugadas por 5 min (2500 rpm) e o sobrenadante separado. O processo extrativo foi repetido pela terceira vez, foi adicionado 10 mL de acetonitrila às amostras, as quais foram centrifugadas e o sobrenadante separado.

O sobrenadante acumulado foi misturado e centrifugado por 5 minutos a 2500 rpm. Após este procedimento, 25 mL do sobrenadante centrifugado foi adicionado a 250 mL de água Milli-Q® e em seguida foi realizada a etapa de clean-up (Extração em fase sólida - EFS).

A EFS foi realizada utilizando cartucho Xtrata – X 33 µ Polymeric Reversed Phase (200 mg / 3 mL, Phenomenex). As colunas foram pré-condicionadas com 2 mL de acetonitrila; 2 mL de metanol:isopropanol:acetonitrila (1:1:1); 2 mL de água Milli-Q®. Para etapa de percolação das amostras nos cartuchos foram utilizados 25 mL do extrato e 250 mL de água Milli-Q®. Após este procedimento, os cartuchos foram mantidos por 5 minutos sob secagem a vácuo.

A eluição foi realizada utilizando 3 mL de metanol e 3 mL de acetona:metanol (1:1). Posteriormente o eluato foi levado a secura total sob fluxo suave de ar comprimido a fim de eliminar o solvente orgânico proveniente da etapa de EFS. Em seguida foi retomado com 500 µL de Metanol:H₂O (7:3) e injetado no sistema HPLC-MS/MS em modo de operação MRM (Multiple Reaction Monitoring), com fonte de íons ESI no modo negativo.

As condições utilizadas para separação estão descritas na Tabela 2. A linearidade e exatidão do método foram avaliadas utilizando amostras de sedimento não contaminados (brancos), aos quais foram adicionadas diferentes concentrações de fluoxetina.

Tabela 2 - Equipamentos e materiais utilizados nas análises químicas.

Condições Cromatográficas	
Coluna	<i>Agilent Eclipse XDB-C18 3.0x75 mm, 3.5 μm</i>
Fase móvel A	5mM Acetato de Amônio
Fase móvel B	Metanol
Temp. da coluna	25°C
Vazão	0,4 mL.min ⁻¹
Vol. de injeção	10 μ L
Tempo de corrida	2,5 min
Sol. lavagem de agulha	Acetonitrila:água (60:40) (v/v)

4.5.1. Ensaio de desenvolvimento embriolarval com *Perna perna*

Os ensaios de toxicidade para o desenvolvimento embriolarval com embriões de mexilhão *Perna perna* foram realizados de acordo com o método escrito por Zaroni *et al.* (2005) no laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília (UNISANTA). O método empregado para estes ensaios se baseia na exposição de embriões de *P. perna* a diferentes concentrações de fluoxetina, por meio de exposição a ISA e ELU. Após 48h de exposição foi analisado o desenvolvimento embriolarval.

A técnica utilizada para induzir a liberação dos gametas foi por estímulo físico, por meio da indução termal. Os gametas foram coletados com auxílio de uma pipeta de Pasteur. O líquido espermático coletado foi mantido no gelo até o momento da fecundação. Os ovócitos foram lavados com auxílio de peneira de 350µm e colocados em um béquer com cerca de 1,5 L de água do mar filtrada em membrana Millipore 0,22 µm.

A fecundação foi obtida pela adição de 2 mL da solução espermática à solução de ovócitos, e a densidade de ovos foi estimada pela diluição da concentração de ovos em água do mar e contagens em câmara de Sedgwick-Rafter. Cerca de 500 ovos recém-fertilizados foram inseridos nos frascos-teste, e os ensaios foram mantidos na temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 48 horas, tempo suficiente para o desenvolvimento dos embriões até larva-D. Após o período de desenvolvimento dos embriões, as amostras foram fixadas com 0,5 mL de formol 40% (tamponado com Bórax em pH 7,0) para posterior avaliação das 100 primeiras larvas encontradas em cada amostra. A porcentagem de larvas normais das amostras foi comparada com a porcentagem de larvas normais do grupo controle.

Assim, foi verificado se houve ou não aumento da incidência de anomalias ou retardo no desenvolvimento das larvas, gerando informações sobre a capacidade de desenvolvimento das larvas de mexilhões expostas às diferentes concentrações de fluoxetina.

Em paralelo aos ensaios com sedimento, foram realizados ensaios de sensibilidade com a substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio (DSS). A Tabela 3 apresenta um resumo da metodologia do ensaio.

Tabela 3 - Condições para realização e critérios de aceitabilidade dos ensaios de desenvolvimento embriolarval com mexilhão *P. perna*.

Parâmetros	Condições
Sistema de ensaio	Estático
Concentrações	Controle e 4 concentrações
Substância-teste	Fluoxetina
Temperatura	25 ± 1 °C
Salinidade	32 a 35
Fotoperíodo	16h luz / 8h escuro
Água de diluição	Água marinha reconstituída
Câmera teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15 mL
Volume de água	8 mL
Substrato	2 g de sedimento
Idade do organismo-teste	Ovos recém fecundados
Nº de organismos por réplica	50 organismos por mL
Nº de réplicas por tratamento	4
Alimentação	Ausente
Duração do teste	48 horas
Efeito observado	Retardo ou anormalidade no desenvolvimento embriolarval
Validade do ensaio	≥ 70% de larvas normais no controle

4.5.2. Ensaio de desenvolvimento embriolarval com *E. Lucunter*

Os ensaios de toxicidade para avaliação de efeitos crônicos no desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar *E. lucunter* foram realizados de acordo com os procedimentos descritos pela USEPA (1995), com adaptações para a espécie pela NBR 15350, referentes ao tempo de exposição e temperatura (ABNT, 2012). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília – Unisantia, o qual possui acreditação pelo INMETRO na norma ISO/IEC 17025 para ensaios de avaliação de efeito crônico com *Echinometra lucunter*.

No laboratório os indivíduos foram previamente lavados com água do mar para remoção de detritos e acondicionados em uma bandeja com a superfície aboral voltada para cima. Para a obtenção de gametas cada indivíduo recebeu, através de injeção intracelômica, 2,5 ml de KCl 0,5 mol e, em seguida, os machos foram dispostos com a face aboral voltada para cima, por onde ocorre a liberação de esperma (coloração esbranquiçada) contendo os espermatozóides. A coleta do líquido espermático foi feita com auxílio de pipeta de Pasteur, diretamente dos gonóporos, e em seguida ele foi transferido para um béquero de vidro envolto com gelo, impedindo assim o contato dos espermatozóides com a água de diluição até o início dos experimentos.

Para coleta dos óvulos, identificados por sua coloração amarelo-alaranjados, as fêmeas foram apoiadas com a superfície aboral voltada para baixo em um recipiente menor que o seu diâmetro, com água de diluição à temperatura do ensaio.

No momento da fecundação foi preparada uma solução na proporção de 0,5 mL de espermatozoides para 25 mL de água de diluição. Esta solução foi misturada de modo a proporcionar a dissolução de possíveis grumos. Em seguida, foi acrescentado um volume de 1,2 a 2 mL da solução de esperma ao recipiente contendo os óvulos e aguardado 10 minutos com leve agitação.

Após este período, três sub-amostras de 10 μ L da solução foram colocadas em câmara de Sedgwick-Rafter para contagem e cálculo da porcentagem de fecundação. O critério de aceitabilidade para o ensaio é de no mínimo 80% de ovócitos fertilizados.

Para cada tratamento foram utilizadas 4 réplicas, onde foram inseridos cerca de 300 ovos, e o conjunto mantido de 36 a 42 horas em câmara incubadora com temperatura constante de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 16h/8h (luz-escuro). Após o período de exposição, o ensaio foi encerrado adicionando em todas as réplicas 0,5 mL de formol tamponado com bórax.

Posteriormente, o conteúdo de cada réplica foi observado em microscópio em lâmina de Sedgewick-Rafter. Os primeiros 100 embriões foram contados e seu grau de desenvolvimento analisado. Embriões que atingiram seu estágio de larva Pluteus bem desenvolvido foram considerados normais, enquanto aqueles apresentando alteração morfológica e/ou retardo no desenvolvimento foram considerados anômalos.

Em paralelo aos ensaios com sedimento, foram realizados ensaios de sensibilidade com a substância de referência Sulfato de Zinco. A Tabela 4 apresenta um resumo da metodologia do ensaio.

Tabela 4 - Condições para realização e critérios de aceitabilidade dos ensaios de desenvolvimento embriolarval com ouriço-do-mar *E.lucunter*.

Parâmetros	Condições
Sistema de ensaio	Estático
Concentrações	Controle e 4 concentrações
Substância-teste	Fluoxetina
Temperatura	26 ± 1°C
Salinidade	30 a 36 ppt.
Fotoperíodo	16h luz / 8h escuro
Água de diluição	Água marinha reconstituída
Câmera teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15 mL
Volume de água	8 mL
Substrato	2 g de sedimento
Idade do organismo-teste	Ovos recém fecundados
Nº de organismos por réplica	30 organismos por mL
Nº de réplicas por tratamento	4
Alimentação	Ausente
Duração do teste	36 a 42 horas
Efeito observado	Retardo ou anormalidade no desenvolvimento embriolarval

A coleta dos gametas era interrompida após transcorridos 5 minutos da administração do KCl evitando-se assim a coleta de gametas imaturos. Após decantação, a solução de óvulos foi lavada através da retirada do sobrenadante e avolumação com água do mar, filtração em malha de 150 μm para remoção de partículas; uma sub-amostra foi então retirada para observação ao microscópio óptico, buscando-se identificar óvulos redondos, lisos, e homogêneos, ideais para a fecundação. A fecundação foi realizada através da transferência de cerca de 2 mL da solução de espermatozóides para cerca de 400 mL da suspensão de óvulos e breve agitação mecânica. Uma hora e meia depois, três sub-amostras de 1mL foram retiradas, procedendo-se a contagem dos ovos, identificados pelo aparecimento da membrana de fecundação, utilizando câmara de Sedgewick-Rafter. A média de embriões das três contagens serviu de base para o cálculo da distribuição destes nos recipientes-teste, mantendo-se a densidade de 500 embriões em 10 mL. Cada teste contou com quatro concentrações (0,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$; 1 $\mu\text{g.g}^{-1}$; 10 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$) mais o grupo controle, utilizando-se quatro replicas por concentração.

4.5.3. Ensaio por exposição ao sedimento integral

Previamente aos ensaios de citotoxicidade e análise de biomarcadores, foi realizada a exposição dos organismos-teste a diferentes concentrações-teste de fluoxetina, onde tais concentrações foram definidas a partir de um ensaio preliminar.

Para a realização de cada experimento foram utilizados organismos adultos de *M. charruana* (n=12), os quais foram dispostos em frascos de 3 litros contendo sedimento integral marcado com diferentes concentrações de fluoxetina por um período de 48h, sem alimentação, com fotoperíodo de 16 h luz, com temperatura controlada de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e salinidade de 30 o/oo. Foram utilizadas 4 réplicas por concentração, incluindo o controle, com 300 g de sedimento marcado, na proporção de 1:4 (sedimento-água) (Figura 9).

Figura 9 – Sistema de exposição - método de Sedimento Integral (SI) - de mexilhões *Mytella charruana*, ao sedimento marcado com fluoxetina por período de 48h.

4.5.4 Ensaio de citotoxicidade com mexilhão *Mytella charruana*

O método utilizado para avaliação da citotoxicidade, seguiu os procedimentos descritos por Lowe *et al.* (1995). Dessa forma foi avaliado o tempo de retenção do corante Vermelho Neutro (TRCVN) em lisossomos de hemócitos do mexilhão da espécie *M. charruana*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília – Unisanta.

4.5.4.1. Preparação das lâminas

As lâminas foram preparadas imediatamente antes do experimento. Lâminas com tamanho 76 x 26 mm foram pré-tratadas com solução de Poly-L-lisina para facilitar a adesão dos hemócitos no vidro. A solução foi preparada pela diluição de Poly-L-lisina em água destilada na proporção de 1:10. Com o auxílio de uma micropipeta, foi transferido 10 μ L dessa solução de trabalho sobre cada lâmina, deslizando e espalhando o líquido sobre toda a superfície com auxílio de uma lamínula.

4.5.4.2. Preparação das soluções

4.5.4.2.1. Solução fisiológica

A solução fisiológica foi preparada um dia antes do experimento. Esta solução salina foi utilizada para diluir a hemolinfa dos mexilhões. Foram pesados 4,77 g de HEPES; 25,48 g de cloreto de sódio; 13,06 g de sulfato de magnésio; 0,75 g de cloreto de potássio; 1,47 g de cloreto de cálcio, e adicionado em 1 L de água destilada, em um balão de vidro volumétrico. O pH da solução salina foi ajustado para 7,36 utilizando medidor de pH e, quando necessário, este foi ajustado com NaOH ou HCl. Isto foi feito imediatamente antes de cada uso da solução fisiológica.

4.5.4.2.2. Corante Vermelho Neutro (VN)

A solução de vermelho neutro pode ser preparada até 2 semanas antes do uso. Porém, para maior consistência, uma solução nova foi preparada imediatamente antes do uso, isto é, nos últimos 5 a 10 minutos de tempo em que as células estavam se aderindo nas lâminas.

4.5.4.2.3. Solução-estoque

O VN foi preparado como uma solução-estoque no solvente DMSO. A solução de trabalho foi preparada a partir da solução-estoque, por diluição em solução fisiológica. Foi pesado 28,8 mg de VN (mantido em refrigerador) e colocado em um frasco de vidro âmbar, adicionando 1 mL de DMSO com auxílio de uma pipeta. O VN foi dissolvido no DMSO com uma suave agitação. Esta solução-estoque foi estocada em refrigerador dentro de um recipiente à prova de luz, pois o VN é fotossensível. O estoque é estável por um período de cerca de 2 a 3 semanas.

4.5.4.2.4. Solução de trabalho

Para preparar a solução de trabalho, o estoque foi retirado da geladeira e deixado em temperatura ambiente. Foi tomado o cuidado de manter as soluções ao abrigo da luz. Para se assegurar que nenhum cristal de VN estivesse presente no estoque antes da diluição em solução de trabalho, foi utilizado um agitador por 1-2 minutos para homogeneizar totalmente o estoque. Utilizando uma micropipeta, foi introduzido 5 mL de solução fisiológica em um frasco escuro. Então, com cuidado de inserir a ponteira de micropipeta logo abaixo do menisco da solução estoque dentro do frasco, foi pipetado 10 μ L de solução-estoque. Isto previne que algum cristal não dissolvido presente na solução-estoque contamine a solução de trabalho. Este volume foi adicionado na solução fisiológica previamente pipetada. A solução de trabalho foi mantida em uma câmara úmida e à prova de luz, para prevenir a foto-oxidação. A solução é instável e por isso foi preparada a cada nova bateria de lâminas analisadas.

4.5.4.3. Extração da hemolinfa

Após a exposição dos organismos aos sedimentos marcados com fármaco, foram retiradas amostras da hemolinfa de todos os mexilhões expostos. Para extração da hemolinfa, as valvas do mexilhão foram separadas cuidadosamente por alguns milímetros, inserindo a lâmina de um bisturi ao longo da superfície ventral (o lado de onde partem os fios do bisso, que possui uma depressão natural que facilita este ato). O bisturi foi mantido na posição em que as valvas ficam abertas. A água de dentro das conchas foi drenada para assegurar que todo o líquido extraído fosse hemolinfa e não água do mar. Com o auxílio de uma seringa hipodérmica de 2 mL contendo 0,5 mL de solução fisiológica, coletou-se 0,5 mL de hemolinfa do músculo adutor posterior. A localização do músculo adutor posterior é obtida inserindo suavemente a agulha entre a ponta das valvas, nos primeiros centímetros, e cuidadosamente movendo-a

horizontalmente até encontrar certa resistência, dada pelo toque com o músculo. A agulha foi inserida na superfície do músculo para extração da hemolinfa. Uma extração eficiente pode ser observada quando a seringa é colocada contra a luz e um líquido levemente leitoso (comparado com a solução salina transparente) pode ser observado dentro dela.

4.5.4.3.1. Manuseio da hemolinfa

Após obter uma amostra de hemolinfa, a agulha da seringa foi removida e o conteúdo da seringa transferido para os tubos de microcentrifuga com volume de 2 mL, onde foram mantidos por no máximo 15 a 20 minutos. Este procedimento serve para minimizar as forças de adesão que podem romper as células e facilitar a coagulação. Foi necessário usar tubos siliconados para prevenir os hemócitos de aderirem nas paredes do tubo. O conteúdo dos tubos foi suavemente misturado antes de aplicá-lo sobre a superfície das lâminas. Isto foi feito invertendo-se os tubos de modo suave, para minimizar a possibilidade de coagulação; e como os hemócitos rapidamente precipitam, a aplicação da solução de células foi imediatamente coletada após esta inversão. Foi pipetado cerca de 40 μ L desta solução de células (hemolinfa + solução fisiológica) sobre a superfície de uma lâmina previamente tratada com Poly-L-lisina, usando uma ponteira de pipeta limpa para cada amostra. As lâminas foram colocadas em uma câmara úmida à prova de luz e incubadas por 15 minutos, permitindo que as células ficassem aderidas nas lâminas. Após a incubação, foi retirado o excesso em suspensão e limpa a área ao redor de onde estão as células para remover o excesso de fluido. Isto foi necessário para que os hemócitos aderidos na lâmina estivessem totalmente expostos ao vermelho neutro no próximo estágio, e também eliminou o efeito de flutuar que eventualmente ocorre com a lamínula quando há excesso de líquido. Uma monocamada de hemócitos pôde ser observada como pequenos pontos na lâmina quando esta é colocada contra a luz.

4.5.4.4. Incubação dos hemócitos

Foi pipetado 40 μ L de solução de trabalho de vermelho neutro sobre a camada de hemócitos de cada lâmina, dentro da câmara úmida e à prova de luz. Isto foi feito de modo suave, tocando a superfície da lâmina com a ponta da pipeta e lentamente derramando o corante sobre as células. Após 15 minutos de incubação na câmara o corante penetra nas células. Ao final deste período, a lâmina foi coberta com uma lamínula, com cuidado de evitar bolhas de ar. As lâminas foram sistematicamente examinadas em microscópio a cada 15 minutos até o tempo final de 120 minutos de exposição. As células foram examinadas com lentes com 100 X de aumento. Cada lâmina foi examinada e reposta em 1 minuto. Como o VN é muito sensível à luz, é recomendável que todas as lâminas recebam a mesma exposição à luz durante os exames. A luz do microscópio foi mantida a mais baixa possível para permitir uma boa visualização das células. As células foram examinadas tanto para anormalidades estruturais como para o TRVN. A cada contagem as condições foram anotadas em tabela. O tempo de retenção do VN pelos lisossomos foi obtido pela estimativa da proporção de células exibindo “vazamento” dos lisossomos para o citossol e/ou exibindo anormalidades no tamanho e cor dos lisossomos. A forma das células pode também modificar-se como consequência do impacto causado por contaminantes. A Tabela 5 apresenta os critérios seguidos para diferenciação de células saudáveis (Figura 10) e estressadas (Figura 11).

Tabela 5 - Critérios para diferenciação de células saudáveis e estressadas.

Critério	Células saudáveis	Células estressadas
Formato das células	Irregular	Arredondado
Tamanho das células	Aumentado	Diminuído
Número de lisossomos	Aumentado	Diminuído
Tamanho dos lisossomos	Menores	Alargados/Aumentados
Cor dos lisossomos	Vermelho pálido/rosado	Vermelho ou rosa escuro
Pseudópodes	Não visíveis	Visíveis
Corante extravasado no citosol	Não visíveis	Visíveis

O *end point* foi tomado quando 50% ou mais das células exibiram anomalias estruturais ou perda de material (Fig. 9 e 10). O valor usado para o cálculo do tempo de retenção corresponde ao último período anotado em que não houve evidência de estresse.

Figura 10 - Hemócitos saudáveis de *Mytella charruana*, observadas ao microscópio óptico (aumento de 40x e de 100x, respectivamente), coradas por vermelho neutro.

Figura 11 - Hemócitos estressados de *Mytella charruana*, observadas ao microscópio óptico (aumento de 40x e de 100x, respectivamente), coradas por vermelho neutro.

4.6. Ensaio com biomarcadores

As análises de biomarcadores enzimáticos pela atividade de Glutathione-S-transferase (GST), Glutathione peroxidase (GPX), danos em DNA, peroxidação lipídica (LPO), colinesterase (ChE) e enzimas ciclooxigenases (COX) foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Estudos em Poluição e Ecotoxicologia Aquática (NEPEA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp (Campus Litoral

Paulista), sob coordenação do Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa e da Profa. Dra. Luciane Alves Maranhão.

Para as análises das atividades enzimáticas de *M. charruana*, foram utilizadas as brânquias e as glândulas digestivas dos organismos coletadas imediatamente após a exposição aos sedimentos marcados com fluoxetina. Os tecidos foram dissecados com auxílio de um bisturi e mantidos congelados (-80°C) até a realização das análises.

Os tecidos (brânquias e glândulas digestivas) foram homogeneizados para cada pool de organismos (n = 4). Este procedimento foi realizado em gelo, utilizando um aparelho triturador de tecidos, os quais foram homogeneizados com solução tampão (pH 7,5), contendo 100 mM NaCl, 25 mM Hepes-NaOH, 1 mM EDTA e 1 mM dithiothreitol (DTT) (Gagné *et al.*, 2007). O tecido homogeneizado foi utilizado para análises de peroxidação lipídica e danos em DNA. O restante do tecido homogeneizado foi centrifugado a 12000 g a 4°C durante 20 min para análise dos demais biomarcadores. O sobrenadante utilizado para as análises foi armazenado a -80°C até a realização de cada biomarcador.

As respostas dos biomarcadores foram normalizadas pelo teor de proteínas totais de cada extrato correspondente aos tecidos das brânquias e glândulas digestivas. O teor total de proteína (mg.mL⁻¹) foi determinado para cada extrato de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando soro de bovino para a calibração.

4.6.1. Glutathione-S-transferase (GST)

O procedimento de determinação da atividade da GST foi adaptado de McFarland *et al.* (1999). A atividade foi analisada utilizando 42 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e 1 mM GSH como substrato e medido espectrofotometricamente a 340 nm a cada 5 min durante 30 minutos. Resultados foram expressos em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ proteína total.

4.6.2. Glutathione Peroxidase (GPX)

A atividade de GPX foi determinada pela aplicação do método descrito por McFarland *et al.* (1999). A atividade de GPX foi medida utilizando 1 mM de hidroperóxido de cumeno como substrato, incubado a 30°C por 2 minutos. A GPX foi mensurada pela absorbância a 340 nm a cada 50 segundos durante 5 min. Os resultados foram expressos como $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína total.

4.6.3. Glutathione Redutase (GR)

A atividade enzimática da GR foi medida pela taxa de regeneração da glutathione reduzida (GSH) por ação da glutathione redutase. A absorbância (340 nm) foi medida a cada 2 minutos por 10 min. Os resultados foram expressos como $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína total. (McFarland *et al.* 1999; Maranhão *et al.* 2014).

4.6.4. Peroxidação lipídica (LPO)

A análise de peroxidação lipídica foi realizada mediante o método do ácido tiobarbitúrico (Wills, 1987). Esta determinação foi realizada através da fluorescência empregando 516 nm (excitação) e 600 nm (emissão). Os brancos e os padrões de tetrametoxipropano foram preparados em solução de homogeneização. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M TBARs} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteínas.

4.6.5. Danos em DNA

Os danos no DNA (*strand breaks*) foram avaliados por meio do ensaio de precipitação alcalina, baseado na precipitação, por meio de solução K-SDS, de lise celular, da ligação cruzada DNA-proteína, seguido por detecção de cadeias de DNA (Gagné *et al.*, 1995). Padrões de DNA de espermatozoides de salmão foram utilizados para a

calibração. As leituras de fluorescência foram tomadas a 360 nm (excitação) e 450 nm (emissão). Os resultados foram expressos como $\mu\text{g DNA.mg}^{-1}$ de proteína total.

4.6.6. Colinesterase (ChE)

A atividade da ChE foi determinada utilizando o método descrito por Ellman *et al.* (1961) e adaptado por Guilhermino *et al.* (1996). As enzimas ChE foram degradadas por meio do ácido DTNB (5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico). A absorbância foi medida a 405 nm a cada 1 minuto durante 7 minutos. Os resultados foram expressos como $\text{nmol de DTNB.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína total.

4.7. Análises estatísticas

Para os resultados dos ensaios com *P. perna* e *E. lucunter* foram estabelecidas as concentrações onde não foram detectados efeitos de importância biológica (CENO - concentração de efeito não observado e CEO - concentração de efeito observado) e, as concentrações pontuais que causaram uma porcentagem específica de redução da resposta (CI50 - Concentração de Inibição) através dos teste de hipóteses e do método de estimativa pontual, respectivamente.

Para o estabelecimento da CENO e das variações significativas das análises de biomarcadores, foram analisados os dados quanto a normalidade através do método do Chi-quadrado (χ^2) e também analisados quanto a homocedasticidade através do teste de Bartlett. Após passarem nestes pré-requisitos para aplicação da análise de variância (ANOVA), foi empregado o teste de Dunnett, afim de identificar as concentrações que apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle. Para todas as análises diferenças significativas foram determinadas quando $p \leq 0,05$.

4.8. Avaliação de risco ambiental

O risco ambiental representado pela fluoxetina nos ecossistemas aquáticos foi avaliado por meio do cálculo de quocientes de risco (QR), de acordo com protocolo da Comissão Europeia (EMEA, 2006). Os valores dos quocientes de risco para organismos aquáticos foram calculados a partir da razão entre as concentrações ambientais mensuradas em amostras de sedimentos coletadas no entorno do Emissário Submarino de Santos (MECs) e as concentrações onde não são previstos efeitos (PNECs) dos compostos farmacêuticos (Figura 12). Os PNECs foram calculados por meio da razão entre as menores concentrações de efeito não observado (CENO) nos ensaios, por um fator de avaliação correspondente a 10, que é uma expressão do grau de incerteza na extrapolação dos dados dos ensaios de toxicidade, considerando o princípio de prevenção e precaução. O critério de classificação aplicado foi: $QR < 1$ significa baixo risco, e $QR \geq 1$ significa alto risco ambiental (EMEA, 2006).

Figura 12 - Caracterização do risco ambiental elaborado a partir da Diretiva da EMEA (2006).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização sedimentológica

Os resultados da análise dos sedimentos da área controle (Toque Toque Grande) referentes à umidade, matéria orgânica e carbonatos, foram de 24,5%, 0,36% e 22,1%, respectivamente. Além disso, foi evidenciada uma composição de 7,6% de areia grossa, 27,7% de areia média, 56,8% de areia fina e 7,2% de areia muito fina. Os resultados obtidos pelas análises encontram-se descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Caracterização do sedimento (Toque Toque Grande, São Sebastião - SP)
de acordo com a escala de Wentworth (1922).

Granulometria (mm)	Massa (g)	Porcentagem (%)	Nome do Material
Massa inicial	100	-	-
Maior que 2,0	-	-	-
2,0 a 1,0	-	-	-
1,0 a 0,5	7,65	7,6	Areia grossa
0,5 a 0,25	27,63	27,7	Areia média
0,25 a 0,125	56,75	56,8	Areia fina
0,125 a 0,063	0,72	0,7	Areia muito fina
Menor que 0,063	7,23	7,2	Silte/Argila
Total	99,98	100,0	-

5.2. Análises químicas

A linearidade e a exatidão do método analítico foram avaliadas utilizando amostras de sedimentos marinhos não contaminados e enriquecidos com diferentes concentrações de fluoxetina. Os cromatogramas obtido para fluoxetina estão representados nas Figura 13 e Figura 14, juntamente com o gráfico da linearidade do método analítico. Os resultados da análise de exatidão para o método estão apresentados na Tabela 7. A recuperação obtida para o método foi de 46%, enquanto os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram de $0,62 \text{ ng.g}^{-1}$ e $2,06 \text{ ng.g}^{-1}$, respectivamente. Tais resultados são considerados aceitáveis de acordo com os critérios adotados pela Comissão Europeia (EC, 2010) e a USEPA (2007).

Figura 13 - Cromatograma obtido para a fluoxetina, modo positivo.

Figura 14 - Representação gráfica da linearidade para quantificação de fluoxetina em sedimento marinho.

Tabela 7 - Resultados de exatidão observada para os pontos considerados nas curvas analíticas de fluoxetina no modo positivo.

Pontos	Área do pico do analito (counts)	Altura do pico do analito (cps)	Concentração real (ng/g)	Concentração experimental (ng/g)	Exatidão (%)
P1_POS	1,08E+02	5,63E+01	5	5,09	102
P2_POS	2,53E+03	1,10E+03	10	8,67	86,7
P3_POS	7,89E+03	3,22E+03	15	16,6	110
P4_POS	9,90E+03	4,37E+03	20	19,5	97,7
P5_POS	1,43E+04	5,80E+03	25	26	104
P6_POS	1,83E+04	7,19E+03	30	31,8	106
P7_POS	2,19E+04	8,89E+03	40	37,3	93,2

5.2.1. Análises químicas para detecção e quantificação de fluoxetina em sedimentos do ESS

A análise do sedimento da região do emissário submarino de Santos/SP comprovou a presença do fármaco fluoxetina, o qual se encontrou acima dos valores de limites de quantificação do método. O cromatograma obtido está apresentado na Figura 15.

A metodologia de preparo da amostra bem como a de análise dos compostos foi validada parcialmente e os parâmetros de validação indicaram que a mesma foi adequada para a quantificação do fármaco Fluoxetina. Além do composto Bromo-caféina. O uso do composto Bromo-caféina como controle do processo, reproduziu o fator de recuperação observado no estudo inicial de desenvolvimento de metodologia, indicando uma adequada reprodutibilidade do método.

Figura 15 - Cromatograma obtido para quantificação de fluoxetina em sedimento marinho da região do ESS, Santos/SP.

É apresentado na Tabela 8 os valores de limite detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e a concentração obtida para o fármaco fluoxetina encontrado na amostra de sedimento do emissário submarino de Santos/SP, acima dos valores de limites de quantificação do método.

Tabela 8 - Resultados da quantificação de fármacos em amostra de sedimento do ESS pelo método EM/EM em modo de operação Multiple Reaction Monitoring (MRM).

Composto	LD (ng.g ⁻¹)	LQ (ng.g ⁻¹)	TR	Concentração (ng.g ⁻¹)
Fluoxetina	0,62	2,06	5.49	10,4

*TR = Tempo de retenção da substância.

5.3. Resultados dos ensaios de toxicidade com mexilhão *Perna perna*

Os resultados de toxicidade crônica média para sedimentos contaminados com fluoxetina utilizando embriões do mexilhão *Perna perna*, apresentaram valores de CENO e CEO de 3700 ng.g⁻¹ e 37000 ng.g⁻¹, respectivamente, nos ensaios com interface sedimento-água (n=2) (Figura 16) e CENO e CEO de 37 ng.g⁻¹ e 370 ng.g⁻¹ para as amostras de elutriato (n=2) (Figura 17).

Os valores de CI50 média (48h) para o *Perna perna* foram de 18800 (16700 – 19800) ng.g⁻¹, para o método de interface sedimento água e de 180 (164 x 10³ – 200) ng.g⁻¹ para o método de elutriato.

Figura 16 - Resultados dos ensaios de desenvolvimento embriolarval pelo método de interface sedimento-água, para o mexilhão *P. perna* após 48 horas de exposição ao sedimento marcado com fluoxetina (ng.g⁻¹). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA – $p \leq 0,05$).

Figura 17 - Resultados dos ensaios de desenvolvimento embriolarval pelo método de elutriato, para o mexilhão *P. perna* após 48 horas de exposição ao sedimento marcado com fluoxetina (ng.g⁻¹). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA – $p \leq 0,05$).

Segundo as análises estatísticas realizadas pelo método ANOVA, os resultados obtidos para a espécie de mexilhão *P. perna* exposta à fluoxetina, tanto para o ISA quanto para o elutriato, se mostraram normais e homogêneos.

Em paralelo aos experimentos, foi realizado um ensaio de sensibilidade com os mexilhões *Perna perna* para se verificar a viabilidade dos embriões utilizados nos ensaios. Os resultados de CI50 (48h) foram de 0,462 (0,45 - 0,46) mg.L⁻¹ de DSS. Os resultados obtidos pelo ensaio de sensibilidade ao DSS encontra-se dentro do intervalo de concentrações reportadas na literatura (Zaroni, 2005; Simm, 2009; Cortez, 2011).

Os resultados das análises físico-químicas (salinidade, pH e oxigênio dissolvido) dos ensaios com interface sedimento-água e elutriato estiveram dentro dos limites de tolerância para espécie.

5.4. Resultados dos ensaios de toxicidade com ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*

Os resultados de toxicidade crônica média obtido para sedimentos contaminados com fluoxetina utilizando embriões de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, apresentaram valores de CENO e CEO de 37 e 370 ng.g⁻¹, respectivamente, nos ensaios com interface sedimento-água (n=2) (Figura 18), e CENO e CEO de 370 e 3700 ng.g⁻¹ com as amostras de elutriato (n=2) (Figura 19).

Os valores de CI50 média (40h) para o *Echinometra lucunter* foram de 2030 (1980 – 2040) ng.g⁻¹, para o método de interface sedimento água e de 1870 (1760 – 2010) ng.g⁻¹ para o método de elutriato.

Figura 18 - Resultados dos ensaios de desenvolvimento embriolarval pelo método de interface sedimento-água, para ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* após 40 horas de exposição ao sedimento marcado com fluoxetina (ng.g⁻¹). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA – $p \leq 0,05$).

Figura 19. Resultados dos ensaios de desenvolvimento embriolarval pelo método de interface sedimento-água, para ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* após 40 horas de exposição ao sedimento marcado com fluoxetina (ng.g⁻¹). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (ANOVA – $p \leq 0,05$).

Um ensaio de sensibilidade foi realizado com ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter*, em paralelo aos experimentos, para se verificar a viabilidade dos embriões utilizados nos ensaios. O resultado de CI50 (40h) e os respectivos intervalos de confiança foram de 0,26 (0,26 - 0,37) mg.L⁻¹ de Sulfato de Zinco (ZnSO₄). O valor obtido encontrara-se dentro dos limites estabelecidos para espécie, de acordo com a carta-controle do Laboratório de Ecotoxicologia Prof. Caetano Belliboni – Universidade Santa Cecília.

Segundo as análises estatísticas realizadas pelo método ANOVA, os resultados obtidos para a espécie de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* exposta à fluoxetina, tanto para o ISA quanto para o elutriato, se mostraram normais e homogêneos. Os resultados das análises físico-químicas (salinidade, pH e oxigênio dissolvido) dos ensaios com interface sedimento-água e elutriato estiveram dentro dos limites de tolerância para espécie.

5.5. Resultados de citotoxicidade para mexilhão *Mytella charruana*

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade com fluoxetina estão demonstrados na Figura 20. Após 48 horas de exposição, nos dois ensaios realizados, o tempo de retenção do corante vermelho neutro nos lisossomos diminuiu significativamente nas concentrações de 0,37 e 3,7 ng.g⁻¹ de ambos os ensaios, quando comparado ao grupo controle. A concentração de 0,037 ng.g⁻¹ não apresentou variação estatística significativa em relação ao controle.

Figura 20. Ensaios de citotoxicidade em hemócitos do molusco bivalve *Mytella charruana* após 48 horas de exposição ao sedimento marcado com fluoxetina (ng.g⁻¹). *Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA – $p \leq 0,05$).

Segundo as análises estatísticas realizadas, os resultados obtidos para a espécie de mexilhão *Mytella charruana* exposta à fluoxetina (48h) se mostraram normais e homogêneos.

Os resultados das análises físico-químicas (salinidade, pH e oxigênio dissolvido) dos ensaios com interface sedimento-água e elutriato estiveram dentro dos limites de tolerância para espécie.

5.6. Resultados das análises de biomarcadores

Para avaliação de respostas bioquímicas foram utilizados tecidos (brânquias e glândulas digestivas) de *Mytella charruana* expostos por 48 horas às amostras de sedimentos marcados com fluoxetina. Os resultados obtidos para a atividade de GST, de ambos os tecidos, estão apresentados nas Figuras 21 - 23.

Os valores de GST para brânquias não apresentaram diferença estatística significativa em relação aos valores encontrados para o grupo controle (Figura 21 e Figura 22) . Porém é possível observar na Figura 21 uma tendência de aumento de GST e indicando ativação do sistema antioxidante de fase II em brânquias de *M. charruana* para as concentrações de 0,037 e 3,7 ng.g⁻¹ de FLU .

Figura 21. Média e erro padrão para atividade de Glutathione S-Transferase de brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$).

As análises da atividade de GST realizadas nas glândulas digestivas dos organismos expostos apresentaram resultados semelhantes ao do grupo controle.

Figura 22. Média e erro padrão para atividade de Glutathione S-Transferase de glândulas digestivas de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$).

Não foi possível observar uma variação estatisticamente significativa para a atividade de GST em brânquias e glândulas digestivas dos organismos expostos. Apesar disso, as brânquias foram os órgãos mais responsivos para o fluoxetina após 48h de exposição ao sedimento marcado, inclusive apresentando maior atividade total de GST (Figura 23).

Figura 23. Média e erro padrão para atividade de Glutathione S-Transferase de brânquias e glândulas digestivas de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina.

A análise da atividade de GPX em brânquias dos mexilhões *M. charruana* expostos a fluoxetina por 48h não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Figura 24). Por outro lado a atividade do sistema antioxidante de fase II pela GPX expressou diferença significativa para concentração de 3,7 ng.g⁻¹ para as glândulas digestivas dos animais expostos ao sedimento marcado (Figura 25).

Figura 24. Média e erro padrão para atividade de Glutathione Peroxidase de brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$).

Figura 25. Média e erro padrão para atividade de Glutathione Peroxidase de glândula digestiva de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao controle.

Apesar da atividade da GPX em brânquias do *M. charruana* não ter apresentado variação estatisticamente significativa é possível notar na Figura 26 que houve uma tendência de aumento da atividade dessa enzima em ambos os órgãos estudados.

Figura 26. Média e erro padrão para atividade de Glutathione Peroxidase de glândula digestiva e de brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao controle.

A atividade de GR em brânquias de *M. charruana* expostos à concentração de 0,037 ng.g⁻¹ de fluoxetina, apresentou variação significativa (Figura 27) . Por outro lado não foi possível observar variação estatisticamente significativa em relação ao grupo controle para atividade dessa enzima em glândulas digestivas de *M. charruana* expostos por 48h a sedimentos marcados com fluoxetina (Figura 28).

Figura 27. Média e erro padrão da atividade de Glutathione Redutase em brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

Figura 28. Média e erro padrão para atividade de Glutathione Redutase em glândula digestiva de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$).

Quando comparados os grupos controles de brânquias e glândulas digestivas de *M. charruana* é possível observar uma maior atividade de GR nas brânquias (Figura 29).

Figura 29 . Média contendo erro padrão para atividade de Glutathione Redutase de glândula digestiva e de brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

Pela análise dos resultados das brânquias de *M. charruana* expostos ao sedimento marcado com fluoxetina foi observado um aumento de subprodutos do ácido tiobarbitúrico (TBARS) com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle para as três concentrações utilizadas (Figura 30). Já para as glândulas digestivas não foi possível observar variação estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Figura 31).

Figura 30. Média e erro padrão para avaliação da peroxidação lipídica (LPO) em brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

Figura 31. Média e erro padrão para avaliação da peroxidação lipídica (LPO) em glândulas digestivas de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$).

Os resultados obtidos pela análise da peroxidação lipídica em glândulas digestivas e brânquias, indicaram que este último órgão se mostrou mais responsivo ao método empregado (Figura 32).

Figura 32. Média contendo erro padrão para avaliação da peroxidação lipídica em glândulas digestivas e brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a

sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

Os resultados obtidos para danos em DNA indicaram que não houve variação estatisticamente significativa em relação ao grupo controle quando analisadas as brânquias de *M. charruana* expostos por 48h a sedimento marcado com fluoxetina (Figura 33). Para as glândulas digestivas foi observado um aumento dos danos em DNA para todas as concentrações de fluoxetina (Figura 34).

Figura 33. Média e erro padrão para danos em DNA (quebra de fita) em brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

Figura 34. Média e erro padrão para danos em DNA (quebra de fita) em glândulas digestivas de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

A avaliação da quantidade de danos em DNA foi mais responsiva em glândulas digestivas do que em brânquias para os organismos expostos ao sedimento marcado com fluoxetina. Porém, observando - se o o grupo controle de ambos os órgãos utilizados pode ser observado um maior índice de danos em DNA de brânquias do que de glândulas digestivas (Figura 35).

Figura 35. Média e erro padrão para danos em DNA (quebra de fita) em glândulas digestivas de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

A atividade da colinesterase se mostrou reduzida tanto nas brânquias (Figura 36) quanto nas glândulas digestivas (Figura 37) de *Mytella charruana* expostos a sedimentos marcados com fluoxetina.

Figura 36. Média e erro padrão para atividade da colinesterase em brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

Figura 37. Média e erro padrão para atividade da colinesterase em glândulas digestivas de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

Ambos os órgãos utilizados neste estudo se mostraram responsivos para a atividade da colinesterase após a exposição dos mexilhões *Mytella charruana* (48h) ao sedimento marcado com fluoxetina. É importante salientar que todas as concentrações de fluoxetina empregadas induziram uma redução da atividade dessa enzima em glândulas digestivas e brânquias (Figura 38).

Figura 38. Média e erro padrão para atividade da colinesterase em glândulas digestivas e brânquias de *Mytella charruana* após 48h de exposição a sedimentos marcados com fluoxetina. (ANOVA – $p \leq 0,05$). *Diferença significativa em relação ao grupo controle.

6. Discussão

A capacidade de coleta e tratamento de esgotos domésticos de uma cidade ou região está intimamente ligada à capacidade de reduzir potenciais riscos ambientais causados pela entrada de poluentes. Dentre esses recebem destaque os fármacos que apesar de serem reportados em baixas concentrações podem desempenhar respostas indesejadas em organismos não alvos como a biota marinha e consequentemente aumentar o risco de desequilíbrios em um ecossistema.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 26,6% da população brasileira reside em municípios de regiões costeiras (IBGE, 2010). A tendência de aumento da população costeira no Brasil somado ao aumento do uso de medicamentos, principalmente em regiões com elevada expectativa de vida e consequente envelhecimento da população, como ocorre na cidade de Santos/SP, Brasil (Oliveira, 2007) tem despertado a preocupação para a presença de fármacos como a fluoxetina no ambiente aquático.

Fármacos de uso humano, incluindo antidepressivos como a fluoxetina, chegam ao ambiente principalmente por produtos de humana ou por descarte direto de medicamentos não utilizados ou vencidos (Ruhoy & Daughton, 2008; Schultz, *et al.*, 2010). Estudos recentes tem demonstrado a presença de medicamentos antidepressivos em águas de efluente de ETEs (Schultz, M. M. & Furlong, 2008; Lajeunesse *et al.*, 2008; Metcalfe *et al.*, 2010; Metcalfe, 2014), água de rios, de consumo humano (Metcalfe *et al.*, 2003; Vanderford & Snyder, 2006; Focazio *et al.*, 2008) e águas superficiais marinhas (Moreno-Gonzalez *et al.*, 2015). Porém, poucos dados em relação à presença de antidepressivos em sedimentos marinhos e solo encontram-se disponíveis na literatura (Kinney *et al.*, 2006; Schultz *et al.*, 2010).

Muitos fármacos possuem afinidade por sólidos em suspensão e capacidade de adsorção aos mesmos, inclusive sendo reportado que condições típicas de pH e salinidade da água do mar favorecem tal processo, aumentando a probabilidade de que sedimentos marinhos representem um compartimento viável para acúmulo dessas substâncias (Gilroy *et al.* 2012; Liang *et al.*, 2013). A fluoxetina é reportada na literatura como uma substância estável em solução aquosa sob condições de escuro. Por isso não é facilmente degradada por hidrólise, fotólise e degradação microbiana, possuindo

assim capacidade de sedimentação e meia vida de mais de 100 dias (Kwon & Armbrust, 2006).

A análise química realizada nas amostras de sedimentos coletadas no entorno do ESS demonstrou a ocorrência de fluoxetina na concentração de $10,4 \text{ ng.g}^{-1}$ ($\text{LD} = 0,62 \text{ ng.g}^{-1}$ e $\text{LQ} = 2,06 \text{ ng.g}^{-1}$). A comparação dos resultados obtidos no presente estudo com resultados encontrados na literatura (Tabela 9) permite afirmar que os valores encontrados se mostram próximos à faixa de concentrações reportadas em outros estudos. Assim é coerente afirmar que sedimentos podem atuar como uma fonte de poluição a partir da qual fármacos podem ser liberados se houverem mudanças ambientais de salinidade e pH, por exemplo durante tempestades, mudanças de maré, escavações ou dragagens (Liang *et al.* 2013).

Tabela 9. Ocorrência de ISRSs e seus metabólitos (expressos em um intervalo de concentração ou concentração média) em águas residuais e águas superficiais de diferentes países.

País	ISRS	Tipo de amostra	Concentração (ng.L^{-1} ou ng.g^{-1})	Referência
Canadá	Fluoxetina	Efluente de ETE	50 - 99	Metcalf <i>et al.</i> , 2003
Canadá	Fluoxetina	Efluente de ETE	18	MacLeod <i>et al.</i> , 2007
Canadá	Fluoxetina	Efluente de ETE	14	MacLeod <i>et al.</i> , 2007
Canadá	Fluoxetina	Efluente de ETE	3,1 – 3,5	Lajeunesse <i>et al.</i> , 2008
Canadá	Fluoxetina	Efluente de ETE	2 – 3,7	Lajeunesse <i>et al.</i> , 2008
Canadá	Norfluoxetina	Efluente de ETE	1,8 – 4,2	Lajeunesse <i>et al.</i> , 2008
Canadá	Norfluoxetina	Efluente de ETE	1,7 – 1,8	Lajeunesse <i>et al.</i> , 2008
Canadá	Fluoxetina	Afluente de ETE	20 - 91	Metcalf <i>et al.</i> , 2011
Portugal	Fluoxetina	Efluente de ETE	17 - 3645	Salgado <i>et al.</i> , 2011
Coréia do Sul	Fluoxetina	Efluente de ETE	1,7	Kim <i>et al.</i> , 2007
Espanha	Fluoxetina	Efluente de ETE	19 - 929	M. - Bueno <i>et al.</i> , 2007
Espanha	Fluoxetina	Efluente de Hospital	4 - 100	Gomez <i>et al.</i> , 2007
Espanha	Fluoxetina	Afluente de ETE	26	Gros <i>et al.</i> , 2009

Tabela 9. Ocorrência de ISRSs e seus metabólitos (expressos em um intervalo de concentração ou concentração média) em águas residuais e águas superficiais de diferentes países (Continuação).

País	ISRS	Tipo de amostra	Concentração (ng.L ⁻¹ ou ng.g ⁻¹)	Referência
Noruega	Fluoxetina	Afluente de ETE	1,1 – 18,7	Vasskog <i>et al.</i> , 2008
Canadá	Norfluoxetina	Rio	4	Metcalfe <i>et al.</i> , 2010
Canadá	Fluoxetina	Rio	4 - 11	Metcalfe <i>et al.</i> , 2010
Noruega	Sertralina	Água marinha	<0,16	Vasskog <i>et al.</i> , 2008
Espanha	Fluoxetina	Rio Ebro	3	Gros <i>et al.</i> , 2009
Espanha	Fluoxetina	Rio Jaramas	13 – 16	Alonso <i>et al.</i> , 2010
Espanha	Fluoxetina	Rio Manzanares	22	Alonso <i>et al.</i> , 2010
Espanha	Fluoxetina	Rio Guadarrama	8 – 44	Alonso <i>et al.</i> , 2010
Espanha	Fluoxetina	Rio Henares	11	Alonso <i>et al.</i> , 2010
Espanha	Fluoxetina	Rio Tajo	12	Alonso <i>et al.</i> , 2010
EUA	Fluoxetina	Água superficial	12	Kolpin <i>et al.</i> , 2002
EUA	Fluoxetina	Água superficial	12 – 20	Schultz & Furlong, 2008
EUA	Fluoxetina	Água superficial	<0,5 – 43,2	Schultz <i>et al.</i> , 2010
EUA	Norfluoxetina	Água superficial	0,5 – 13,6	Schultz <i>et al.</i> , 2010
EUA	Fluoxetina	Água de torneira	0,64	Benotti <i>et al.</i> , 2009
EUA	Norfluoxetina	Água de torneira	0,77	Benotti <i>et al.</i> , 2009
Índia	Citalopram	Água de poço para consumo humano	76 - 1400	Fick <i>et al.</i> , 2009
EUA	Fluoxetina	Sedimento de rio	19,3	Schultz <i>et al.</i> , 2010
EUA	Norfluoxetina	Sedimento de rio	3,1	Schultz <i>et al.</i> , 2010
EUA	Sertralina	Sedimento de rio	12,9 – 17,7	Schultz <i>et al.</i> , 2010
EUA	Venlafaxina	Sedimento de rio	22,6 – 24,6	Schultz <i>et al.</i> , 2010
EUA	Citalopram	Sedimento de rio	12,3 – 14,9	Schultz <i>et al.</i> , 2010
Espanha	Fluoxetina	Água superficial marinha	2,4	Moreno-Gonzalez <i>et al.</i> , 2015
Brasil	Fluoxetina	Água superficial marinha	0,58 ng.L ⁻¹	Cortez, 2018

Estudos recentes reportaram a presença de diversos fármacos tanto para a coluna d'água com concentrações que variaram na faixa de 326 ng.L⁻¹ a 2094 ng.L⁻¹ (Pereira *et al* 2016) como para sedimentos, na baía de Santos/SP, indicando para esta matriz a presença de ibuprofeno e triclosan com concentrações de 49 ng.g⁻¹ e 15,14 ng.g⁻¹, respectivamente (Pusceddu *et al.*, 2018). A presença de diferentes classes de fármacos gera preocupação ainda maior por conta das possíveis interações que podem

ocorrer entre as mesmas e um consequente aumento dos efeitos sobre a biota marinha. De fato, organismos no ambiente podem estar expostos a misturas farmacêuticas ao longo de toda sua vida e determinadas combinações específicas podem ser motivo de preocupação.

Gonzalez-Rey *et al.*, (2014), indicaram em seu trabalho que a mistura de diferentes concentrações fluoxetina com ibuprofeno geraram aumento da peroxidação lipídica em células de brânquias do mexilhão marinho *Mytilus galloprovincialis*. Ainda em relação a esta mesma espécie de bivalve, Franzellitti *et al.*, (2013) observaram que a mistura de fluoxetina e propranolol para concentrações de ng.L^{-1} gerou alterações da sinalização celular. O antidepressivo fluoxetina aumenta os níveis de serotonina (5-HT) na fenda sináptica inibindo a recaptação de 5-HT enquanto o propranolol, um betabloqueador também bloqueia receptores 5-HT₁. As alterações de sinalização celular provavelmente desencadeadas pela ocupação dos receptores 5-HT₁ foram identificadas após exposição por 7 dias de *Mytilus galloprovincialis* à mistura de fluoxetina com propranolol. Além disso, é descrito na literatura que a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) está envolvida em mecanismos neuro-endócrinos e desempenha um papel fundamental na regulação da ingestão alimentar, no metabolismo e no sucesso reprodutivo em invertebrados (Tierney, 2001, Fabbri e Capuzzo, 2010). Efeitos em invertebrados expostos a misturas de fármacos são reportados, por exemplo a exposição a uma mistura de cafeína, ibuprofeno, carbamazepina e novobiocina em concentrações de 0,1-50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durante 28 dias gerou uma diminuição significativa da estabilidade da membrana lisossomal no caranguejo *Carcinus maenas* (Aguirre-Martínez *et al.*, 2013),

Guler & Ford, 2008 observaram alterações nos comportamentos de fototaxia e geotaxia do anfípode *Echinogammarus marinus*, após serem expostos à mistura de fluoxetina, carbamazepina e diclofenaco. Porém, vale ressaltar que informações sobre o efeito de misturas de fármacos em sedimentos para bivalves estuarinos é relativamente escassa.

O desenvolvimento embriolarval de invertebrados aquáticos é uma ferramenta amplamente utilizada para avaliação da qualidade de ecossistemas marinhos (água e

sedimentos) principalmente por serem obtidas respostas em tempos relativamente curtos e por conta do método responder de forma adequada a diferentes classes de contaminantes. No presente estudo, a fluoxetina apresentou efeito no desenvolvimento embriolarval de mexilhões *Perna perna* (ISA: CI50 média(48h) = 18800 ng.g⁻¹ – ELU:CI50 média (48h) 180 ng.g⁻¹) e ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* (ISA: CI50 média(40h) = 2030 ng.g⁻¹ – ELU:CI50 média (40h) 1870 ng.g⁻¹), em concentrações próximas às reportadas na literatura. Cabe ressaltar que os efeitos crônicos encontrados estão em concentrações ambientalmente relevantes. Maranhão *et al.* (2015a) realizaram uma bateria de ensaios para avaliação da toxicidade de fármacos em sedimentos com organismos marinhos tradicionalmente utilizados em avaliações ambientais, dentre os resultados obtidos para fluoxetina eles observaram que houve mortalidade significativa para o anfípoda *A. brevicornis* expostos à 10 ng.L⁻¹ de fluoxetina enquanto os ensaios realizados para avaliação do desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* gerou uma resposta ainda mais sensível, com concentrações de efeito de 0,01 ng.g⁻¹ para fluoxetina.

Os ensaios com *Perna perna*, apresentaram diferença na sensibilidade dos organismos em relação aos sistemas de exposição (ISA e ELU) para fluoxetina, onde o elutriato apresentou efeito em concentrações mais baixas comparado ao ISA. Já para o ouriço-do-mar *E. lucunter* não houve diferença significativa em relação aos resultados encontrados para o elutriato e ISA.

Tais resultados alertam tanto para o risco da permanência desse fármaco no sedimento como aumentam a preocupação em relação à sua ressuspensão para a coluna d'água, uma vez que na região é comum a realização do processo de dragagem de sedimentos marinhos por conta das atividades portuárias da mesma.

Bringolf *et al.* (2010) mediram a concentração de fluoxetina em água, sedimento e tecido de mexilhão a jusante do efluente de águas residuais e em mexilhões de água doce (*Elliptio complanata*) vivendo dentro do sedimento. Tecidos de mexilhão acumularam fluoxetina em concentração de 79 ng.L⁻¹ em comparação com a fluoxetina encontrada na água (104-119 ng. L⁻¹) e no sedimento (17,4 ng.L⁻¹). Em laboratório após 96 horas de exposição à concentrações de 300 e 3000 g.L⁻¹ de fluoxetina esses mexilhões tiveram liberação de larvas não viáveis assim como machos

de *E. complanata* expostos à 3000 g.L⁻¹ de fluoxetina liberaram espermatozóides por um período de 48 horas.

Além disso, Hazelton *et al.* (2013) estudou a reprodução e ciclo de vida da espécie *L. fasciola* expostas à fluoxetina. Essa exposição à fluoxetina (29,3 g.L⁻¹) aumentou significativamente a probabilidade de exposição à predadores em comparação com os controles, teoricamente deixando-os mais vulneráveis.

As conseqüências reprodutivas sobre o comportamento de liberação de larvas em momentos inadequados ou de larvas inviáveis ou imaturas pode ter efeitos negativos sobre recrutamento e consequentemente sobre a manutenção das populações desses organismos no ecossistema.

A maioria do ISRS possuem valor de pKa elevado e baixo Kow, por isso esperasse que tenham maior afinidade pela coluna d'água do que pelos sedimentos, a fluoxetina possui pKa = 10,05 (muito elevado) e Kow = 1,2 (baixo) (Vasskog *et al.*, 2006; Kwon & Armbrust, 2008).

Segundo Kwon & Armbrust (2008) espera-se que cada ISRS esteja carregado cationicamente em valores de pH ambientalmente relevantes. Isso explicaria tanto a forte capacidade de adsorção (combinação de ligação iônica + partição de carbono orgânico) e ao mesmo tempo baixo Kow (eles são ionizados), possuindo assim alta probabilidade de que existam vários mecanismos importantes para explicar a elevada capacidade de adsorção, que para os autores foi maior que 90% em sedimentos para a fluoxetina. Além disso, a transformação da fluoxetina em seu metabólito principal norfluoxetina, é capaz de aumentar ligeiramente a hidrofobicidade e assim o potencial de bioacumulação ou adsorção em sedimentos (Neuwoehner *et al.*, 2009). Segundo Oakes *et al.*, 2010, testes adicionais de toxicidade com organismos que vivam associados ao sedimento são necessários levando como base a diretriz europeia de avaliação de risco (EMEA 2006) se mais de 10% da substância permanecer por 14 dias ou mais no sedimento. Vários estudos demonstraram uma rápida partição da fluoxetina da fase aquosa para o sedimento (Yamamoto *et al.* 2005; Sanchez-Arguello *et al.*, 2009), justificando assim a utilização de organismos bentônicos para avaliação do risco ambiental da fluoxetina em sedimentos.

Por um lado, enquanto o mecanismo de sorção para compostos neutros e hidrofóbicos pode estar intimamente relacionado ao teor de carbono orgânico da biomassa, solos ou sedimentos e por isso, é bem correlacionado com o K_{ow} , por outro substâncias ionizáveis, como a fluoxetina, podem exibir mecanismos mistos de sorção, tais como troca de cátions, pontes de cátions em superfícies de argila, complexação de superfície e pontes de hidrogênio mais facilmente que interações hidrofóbicas (Tolls 2001; Cunningham *et al.* 2004; Kwon & Armbrust, 2008).

Portanto, para essas substâncias os valores de K_{ow} e pK_a sozinhos podem não prever adequadamente seus destinos em solos ou sedimentos. Com isso é possível que os resultados obtidos de elutriato com maior toxicidade em comparação aos resultados de ISA para o *Perna perna* se mostrem coerente, pois ao agitar a solução de fluoxetina com o sedimento pode ter havido uma maior quantidade deste fármaco adsorvendo ao sedimento, o que poderia em um segundo momento gerar um aumento da toxicidade. Uma maior quantidade de matéria orgânica no sedimento controle também poderia gerar um aumento da quantidade de fármaco que poderia ter adsorvido ao sedimento após a ressuspensão pelo método de elutriato. Em seu estudo Pusceddu (2016) descreve que a utilização de sedimentos com frações granulométricas menores e com maiores concentrações de matéria orgânica, podem diminuir a perda de fármacos durante o processo de marcação e, inclusive, favorecer a retenção dos compostos no sedimento, diminuindo a solubilização na água nos sistemas de exposição de interface sedimento-água e elutriato.

O sedimento de referência utilizado no processo de marcação (*spiking*) apresentou boa qualidade ambiental, uma vez que o mesmo foi utilizado nos controles dos ensaios, os quais estiveram dentro dos critérios de aceitabilidade dos métodos. Vale ressaltar que os ensaios de toxicidade apresentaram baixos desvios-padrão para as três espécies testadas, demonstrando a eficácia e reprodutibilidade do processo de homogeneização dos sedimentos por meio do uso do equipamento desenvolvido para realização deste estudo, baseado no sistema jar-rolling.

6.1. Biomarcadores

No cenário atual literalmente centenas de FPCP tem como destino final o ambiente aquático e/ou sedimentos. Fármacos que possuem efeito sobre a fisiologia de invertebrados aquáticos são aqueles que poderiam interagir com proteínas transportadoras e receptoras evolutivamente bem conservadas. Assim, organismos como moluscos servem como modelos cujos sistemas fisiológicos e sua regulação por essas proteínas são bem compreendidos (Fong & Ford, 2014).

Moluscos aquáticos são invertebrados não-alvo que são numericamente dominantes e por isso ecologicamente importantes. Além disso, moluscos bivalves são amplamente utilizados como espécies sentinelas em programas de monitoramento e de qualidade ambiental em função de sua capacidade filtradora (Gacic *et al.*, 2014).

Por serem relativamente tolerantes a níveis elevados de poluentes, já que demonstram diversas respostas fisiológicas adaptativas (Gómez-Mendikute *et al.*, 2005), podem ser utilizados como indicadores adequados de níveis de contaminação e dos efeitos gerados à biota marinha e estuarina (Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2010), pois podem apresentar bioacumulação principalmente pelo contato de substâncias dissolvidas com as brânquias e de substâncias adsorvidas em partículas com o trato digestivo, neste órgão em particular, fármacos como a fluoxetina tendem a se acumular na glândula digestiva podendo afetar significativamente alguns parâmetros de funcionalidade dos lisossomos e por consequência interferindo na viabilidade celular (Franzellitti *et al.*, 2015).

Em nível celular, os lisossomos (responsáveis pela digestão intracelular e processos de defesa contra patógenos e transporte de nutrientes) têm sido identificados como alvo de efeito de vários contaminantes. Alterações patológicas nos lisossomos, como mudanças na integridade e permeabilidade de membranas, têm sido utilizadas para identificação dos primeiros sinais de efeitos adversos de substâncias químicas no ambiente aquático (Pereira, 2008; Cortez *et al.*, 2012; Gaspar, 2015; Pusceddu, 2016), uma vez que a integridade e estabilidade de membranas lisossômicas é considerada um indicador de “bem estar” celular (Moore *et al.*, 2007).

Efeitos em lisossomos podem ser avaliados por meio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN), considerado um biomarcador de efeito. O ensaio

para avaliação do TRCVN baseia-se no princípio de que os lisossomos de células saudáveis conseguem reter o corante vermelho neutro, por um certo período de tempo, enquanto danos na integridade e estabilidade da membrana lisossomal, causados pela exposição a xenobióticos, diminui o tempo de retenção do corante, induzindo o vazamento de componentes do lisossoma para o citosol mais rapidamente (Dailianis *et al.*, 2003; Pusceddu, 2016).

O desenvolvimento embriolarval de muitos invertebrados (e.g. ouriços-do-mar, mexilhões, etc.) é dependente de vitelo, que participa do mecanismo de liberação de energia para o embrião em desenvolvimento por meio da degradação do mesmo pelos lisossomos que, por sua vez, se estiverem comprometidos por conta do estresse celular, pode retardar ou inviabilizar o desenvolvimento das larvas (Pusceddu, 2016). Franzellitti *et al.*, (2014) demonstraram que mexilhões *Mytilus galloprovincialis* expostos por sete dias à concentração de 30 ng.L⁻¹ de fluoxetina apresentaram 16,14 ug.kg⁻¹ deste fármaco em suas brânquias. Somado à isso os autores deste estudo ainda observaram redução da estabilidade da membrana lisossômica em hemócitos de mexilhão *Mytilus galloprovincialis* após exposição à 0,03 ng.L⁻¹ de fluoxetina e tal redução foi correlacionada também com concentrações deste fármaco para a glândula digestiva e brânquias.

No presente estudo a fluoxetina apresentou diminuição significativa na estabilidade de membranas lisossômicas dos mexilhões *Mytella charruana* em concentrações ambientalmente relevantes (0,37 e 3,7 ng.g⁻¹). Muitos estudos mostram que a serotonina tem papel fundamental em muitos processos fisiológicos e comportamentais. Este neurotransmissor, influenciado pela ação de ISRS, participa da excitação ciliar em gastrópodes, moluscos marinhos (*Tritonea diomedea*) e moluscos de água doce (*Lymnaea stagnalis*) (Gosselin, 1961; Audesirk *et al.*, 1979; Syed & Winlow, 1989). A serotonina também participa do controle de contrações musculares em bivalves (Aiello, 1970; Saimi *et al.*, 1983), regulação da natação no nudibrânquio *Melibe leonine* (Lewis *et al.*, 2011) e mecanismos reprodutivos em bivalves (Fong *et al.*, 2014).

Recentemente, Pereira *et al.* (2014) demonstraram que o estresse fisiológico está associado a alterações da estrutura da comunidade bentônica e deterioração do

estado ecológico ao longo do tempo. Desta forma, uma vez que o estresse celular pode ser relacionado a efeitos em níveis mais elevados de organização biológica, o que pode afetar a aptidão ecológica dessas populações, o uso de biomarcadores torna-se uma importante linha de evidência para avaliações de risco mais consistentes (Pusceddu *et al.*, 2018).

Em seu estudo Pusceddu *et al.*, (2018) também observou a redução da estabilidade da membrana lisossômica de hemócitos de *M. charruana* expostos por 24 horas à sedimentos contaminados com Triclosan e Ibuprofeno (ng.g^{-1}). Efeitos significativos sobre a estabilidade da membrana lisossômica também foram encontrados por Cortez, 2018, a partir da concentração de 3 ng.L^{-1} de fluoxetina para mexilhões *Perna perna*. Ressaltando assim a importância de análise de misturas farmacêuticas para estes organismos.

Após sua absorção os fármacos sofrem transformações por diferentes mecanismos de defesa celulares responsáveis por toranrem essas substâncias mais fáceis de serem excretadas (Kwon & Armbrust, 2006). Através da ação das enzimas antioxidantes GR, GPX e GST o organismo mantém as concentrações de espécies reativas de oxigênio (ERO) dentro de limites fisiológicos e essas enzimas de fase II são ativadas, geralmente, para fármacos que não são totalmente transformados na fase I (Murray *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2005).

Apesar dos resultados obtidos no presente estudo não indicarem alterações estatisticamente significativas para GST em glândulas digestivas e brânquias de *Mytella. charruana* expostos à fluoxetina, é reportado na literatura que para a espécie de mexilhão *M. galloprovincialis*, exposto à diferentes fármacos, houve aumento de GST em glândula digestiva. Gonzalez-Rey & Bebianno (2013) constataram que a análise de brânquias e glândulas digestivas de *Mytilus galloprovincialis* expostos à fluoxetina durante 15 dias apresentaram valores similares da atividade de GST para o grupo controle e para os organismos expostos à fluoxetina, sem observar variação significativa durante as primeiras 72 horas de exposição, porém com uma redução da atividade de GST em brânquias ao final do dia 15, tal constatação é relacionada a uma parcial metabolização da fluoxetina glândulas digestivas de mexilhões (Canesi *et al.*, 2007). Estudos prévios reportaram diminuição da GPx em siris, mariscos e peixes após

a exposição a pesticidas, PCBs e metais (Faria *et al.*, 2009; Damásio *et al.*, 2010). De acordo com Damásio (2010) e Milan *et al.* (2013), falhas no mecanismo de defesa antioxidante para remoção de espécies reativas de oxigênio produzidas pela exposição a poluentes, seja por inibição ou pelo excesso de radicais livres, pode perturbar o equilíbrio entre o sistema antioxidante / pró-oxidante, gerando estresse oxidativo, o que pode implicar no aumento da peroxidação lipídica.

A glutathiona reduzida (GSH) é um peptídeo e constitui a substância redutora mais abundante no meio intracelular e a manutenção dos níveis adequados dessa enzima dependem da atividade da glutathiona redutase (GR), consequentemente formando substrato para a GPX. Assim a atuação de forma eficiente da GPX exige um sistema enzimático sequencial que envolve a glutathiona redutase e as enzimas que mantêm níveis de NADPH, necessário para manter a glutathiona na forma reduzida, nos compartimentos citoplasmático e mitocondrial (Remacle *et al.*, 1992, Ribeiro *et al.* 2005). No presente estudo a atividade da GR de brânquias de *M. charruana* expostos por 48 horas à menor concentração de fluoxetina ($0,037 \text{ ng.g}^{-1}$) teve correlação positiva com o grupo controle segundo a análise estatística, indicando uma maior atividade dessa enzima. Esse aumento de atividade pode levar à um aumento da formação de GPX e de GST, o que foi observado no presente estudo para a atividade dessas duas enzimas em brânquias do *M. charruana*. Com isso pode-se inferir que a fluoxetina foi capaz de ativar o metabolismo antioxidante de fase 2, de células de brânquias de *Mytella charruana* expostos à concentração de $0,037 \text{ ng.g}^{-1}$.

Os resultados indicam que não houve variação estatisticamente significativa para brânquias de *M. charruana* expostos as maiores concentrações de fluoxetina ($0,37$ e $3,7 \text{ ng.g}^{-1}$). Tais resultados podem indicar uma redução da capacidade de atuação das enzimas GR, GPX e GST, o que poderia levar ao aumento de efeitos oxidativos de membranas e em moléculas de DNA (Milan *et al.*, 2013).

De fato, os resultados do presente estudo demonstraram aumento da LPO em brânquias de *Mytella charruana* para as três concentrações de fluoxetina ($0,037 \text{ ng.g}^{-1}$, $0,37 \text{ ng.g}^{-1}$ e $3,7 \text{ ng.g}^{-1}$) a que foram expostos, caracterizando a presença de possíveis falhas nos mecanismos antioxidantes desses organismos quando expostos à concentrações ambientalmente relevantes de fluoxetina. Diferentes trabalhos indicam

resultados semelhantes, Pusceddu *et al.*, (2018) reportaram aumento da LPO em mexilhões *Mytella charruana* após exposição por 24 horas à sedimentos contaminados com diferentes fármacos. Gonzalez – Rey *et al.*, (2013) demonstraram em seu trabalho que a exposição de mexilhões à fluoxetina pelo período de duas semanas induziu à uma alteração da atividade das enzimas antioxidantes principalmente em brânquias e ainda caracterizaram a fluoxetina como possível disruptor endócrino da regulação hormonal de gônadas de *M. galloprovincialis*. Segundo Hazelton *et al.*, (2014), mexilhões da espécie *Lampsilis fasciola* expostos à 2,5 e 22,3 g.L⁻¹ de fluoxetina exibiram comportamento de exibição de manto significativamente maior do que os controles e os mexilhões tratados com fluoxetina a 22,3 g.L⁻¹ foram estatisticamente mais propensos a ter menor tempo de movimento, maior movimento total e iniciaram a escavação mais cedo.

A atividade da GPX em glândulas digestivas se mostrou mais responsiva em relação à atividade da GR e da GST, sendo observado um aumento significativo da GPX em organismos *M. charruana* expostos ao sedimento marcado com fluoxetina na concentração de 3,7 ng.g⁻¹. Por possuir um papel antioxidante, catalisando a conversão do peróxido de hidrogênio resultante do metabolismo celular em água e oxigênio e comparando esse resultado a redução da LPO em glândulas digestivas de *M. charruana* expostos ao sedimento marcado com a mesma concentração de fluoxetina é possível que essa via seja a mais eficiente na redução de estresse oxidativo para esse órgão dessa espécie de mexilhão.

Diferentemente de outras classes de poluentes, os fármacos são projetados para interagir com alvos celulares específicos (por exemplo, receptores, enzimas) em humanos, podendo dessa forma ser farmacologicamente ativo em células que possuam receptores funcionais de organismos não - alvos. A conservação evolutiva de alvos moleculares em diferentes espécies poderia aumentar potencialmente o risco de efeitos ecotoxicológicos, uma vez que efeitos classificados como secundários e irrelevantes para a atividade terapêutica em humanos podem desencadear respostas em diferentes populações de organismos expostos aos fármacos pela transferência indesejada de sinais entre os canais de comunicação celular (Huggett *et al.*, 2003; Gunnarsson *et al.*, 2008; Franzellitti *et al.*, 2014).

Estudos recentes demonstram que resultados adversos podem ser observados em organismos aquáticos expostos à concentrações ambientalmente relevantes de fármacos, Brooks *et al.* (2012) prevêem que pelo menos 10% dos fármacos podem apresentar riscos para a vida aquática abaixo de 29 ng.L⁻¹ relacionando efeitos encontrados ao mecanismo de ação de fármacos específicos.

Atualmente existem diferentes tipos de medicamentos com ação antidepressiva, dentre eles a fluoxetina se destaca como o medicamento mais prescrito mundialmente (Fong *et al.*, 2014; Franzellitti *et al.*, 2014). Este medicamento possui mecanismo de ação pela sua ligação e inibição à proteínas de transporte pré-sinápticas da recaptação da serotonina, estas proteínas normalmente reciclam neurotransmissores de volta ao terminal pré-sináptico e a inibição desses transportadores permite que a serotonina permaneça na fenda sináptica por mais tempo.

A regulação dos mecanismos fisiológicos sobre o comportamento, recepção e transmissão sináptica na junção neuromuscular e neuromodulação em moluscos é descrita por pesquisadores há anos (Weiger, 1997; Birmingham & Tauck, 2003; Dayan & Huys, 2009; Wu & Cooper, 2012). Lewis *et al.*, (2011) descreveram que a serotonina é responsável pelo controle de contrações musculares e regulação da natação no nudibrânquio *Melibe leonine*, também sendo relacionada ao controle da atividade ciliar pedal em moluscos aquáticos como *Tritonea diomedea* (Audesirk *et al.*, 1979) e *Lymnaea stagnalis* (Syed & Winlow, 1989).

Na maioria dos bivalves a locomoção é limitada, porém é descrito na literatura que a serotonina ativa estruturas semelhantes às que são ativadas em gastrópodes, participando assim da regulação da atividade ciliar branquial em mexilhões e ostras (Aiello, 1970; Saimi *et al.*, 1983) e aumentando tanto a atividade ciliar quanto o diâmetro das brânquias em mexilhões da espécie *Dreissena polymorpha* (Gardiner *et al.*, 1991). Há algum tempo, já foram identificados receptores de serotonina em membranas de células de óvulos (Krantic *et al.*, 1991; Guerrier *et al.*, 1996) assim como em ovários de bivalves por técnicas de imunocitoquímica e HPLC (Ram *et al.*, 1992). Mecanismos importantes do desenvolvimento de gametas como a maturação de ovócitos e a quebra da vesícula germinativa podem ser induzidas em várias espécies diferentes de bivalves

pela serotonina e seus receptores ligantes (Osanai e Kuraishi, 1988; Hirai *et al.*, 1988; Kadam & Koide, 1989; Fong *et al.*, 1994; Fong *et al.*, 2014).

Por terem valor comercial agregado e pela importância na aquicultura, a indução de desova de bivalves também tem sido amplamente estudada e a serotonina, bem como seus ligantes atuam como fatores importantes na liberação de ovócitos em bivalves marinhos (Matsutani & Nomura, 1982; Gibbons & Castagna, 1984) e de água doce (Ram *et al.*, 1993). Recentemente Meechonkit *et al.*, (2012) mostraram que a exposição do mexilhão de água doce *Hyriopsis bialatus* a diferentes concentrações de serotonina induziu a liberação da larva gloquídeo viável que se desenvolveu normalmente.

Em seu estudo, Ram *et al.*, 1999 observaram abertura dos sífões do mexilhão-zebra e contração muscular quando expostos a altas concentrações de serotonina (1 mM), mas em concentrações baixas (1 M) os músculos relaxaram. Ao interferir com a regulação serotoninérgica a fluoxetina tem portanto, o potencial para prejudicar funções fisiológicas relevantes em invertebrados, incluindo regulação da ingestão de alimentos, metabolismo e sucesso reprodutivo (Tierney, 2001; Brooks *et al.*, 2003a; Foran *et al.*, 2004; Fabbri & Capuzzo, 2010).

Apesar de agir primariamente sobre a regulação da serotonina na fenda sináptica, este fármaco pode agir em inúmeros canais iônicos (Lenkey *et al.*, 2006; Rajamani *et al.*, 2006; Traboulsie *et al.*, 2006) e também possui a capacidade de afetar a atividade da colinesterase na junção neuro muscular de animais. Em seu estudo, Muller *et al.*, (2002) observaram que em concentração micromolares, diferentes classes de antidepressivos, incluindo a fluoxetina, inibiram a colinesterase sérica humana, enquanto Bertrand *et al.*, 2008 observaram que a fluoxetina foi responsável pelo bloqueio de receptores de acetilcolina o que inibiu a atividade da acetilcolinesterase em ratos nocaute.

A colinesterase é uma enzima intimamente ligada à transmissão do impulso nervoso, pois catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Quando a atividade desta enzima é inibida ocorre um bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos, conseqüentemente um erro na transmissão dos estímulos percebidos pelo animal em

relação às variações ambientais. Tais mudanças podem modificar os mecanismos de respostas e funções vitais do organismo (Adams, 1990; Beyers & Sikoski, 1994).

No presente estudo, a atividade da enzima colinesterase foi avaliada e pode ser observado que a atividade dessa enzima se mostrou reduzida em brânquias e em glândulas digestivas de *Mytella charruana* expostos por 48h à sedimentos marcados com diferentes concentrações de fluoxetina ($0,037 - 3,7 \text{ ng.g}^{-1}$). Tais resultados podem estar relacionados com a interação da fluoxetina sobre sinapses neuro-musculares desses mexilhões, demonstrando uma interação desse fármaco por um mecanismo de ação diferente do esperado para a molécula. Em seu estudo, Pusceddu *et al* 2018 observou uma redução da atividade da colinesterase em mexilhões *Mytella charruana* pela exposição durante 24 horas a sedimento marcado com ibuprofeno ($0,02 \text{ ng.g}^{-1}$).

A inibição da atividade da colinesterase pode estar associada ao fato da fluoxetina possuir elevada capacidade de ligação à proteínas (Oakes *et al.*, 2010) o que poderia induzir uma menor eficiência da colinesterase ou ainda estar indiretamente associada ao aumento do estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) uma vez que o aumento do tempo de contração muscular estimulado pela baixa atividade da colinesterase pode aumentar a demanda energética devido à ação colinérgica. Em seu estudo Franzellitti *et al.*, (2013) observaram que a fluoxetina afetou a via de sinalização da proteína quinase A dependente de AMP cíclico (PKA/AMPC), sendo esta via fundamental para o metabolismo energético atuando assim sobre o desenvolvimento de gônadas, batimento cardíaco e movimentos ciliares em mexilhões. Essa constatação pode estar intimamente ligada ao aumento de outros parâmetros como a peroxidação lipídica, que neste estudo apresentou aumento significativo em brânquias de *M. charruana* expostos as concentrações de $0,037 \text{ ng.g}^{-1}$, $0,37 \text{ ng.g}^{-1}$ e $3,7 \text{ ng.g}^{-1}$ de fluoxetina. Tais observações vão de encontro ao que tem sido reportado na literatura a qual indica a indução de alterações significativas em lisossomos do mexilhão marinho *Mytilus galloprovincialis*, onde esse tipo de resultado é relacionado diretamente à consequente diminuição da capacidade de crescimento e viabilidade nestes mexilhões (Moore *et al.*, 2006; Viarengo *et al.*, 2007; Franzellitti *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos pela análise de danos em DNA também indicaram aumento significativo de danos em DNA de células de glândulas digestivas de *M. charruana* expostos por 48 horas às concentrações de $0,037 \text{ ng.g}^{-1}$ e $0,37 \text{ ng.g}^{-1}$. Cabe ressaltar que apesar de não ter havido diferença estatisticamente relevante, em relação ao grupo controle, brânquias de *M. charruana* também apresentaram aumento de danos em DNA para organismos expostos ao sedimento marcado com fluoxetina na concentração de $0,037 \text{ ng.g}^{-1}$ em relação ao grupo controle. Provavelmente o mecanismo de reparo de danos em DNA em células de brânquias pode ser mais eficiente já que este órgão parece possuir maior probabilidade de sofrer efeitos oxidativos uma vez que é o órgão com maior potencial de entrar em contato direto com xenobióticos no ambiente aquático. Por outro lado, mesmo o aumento da atividade do sistema de reparo de quebras em DNA pode indicar um potencial estresse oxidativo, pois a inibição de danos na molécula de DNA podem indicar um aumento do risco de futuros danos (Shugart *et al* 1992; Maranhão *et al* 2014).

6.2. Avaliação de risco ambiental

A avaliação do risco ambiental para fluoxetina realizada no presente estudo ocorreu de acordo com protocolo da EMEA (2006), partindo diretamente para a Fase II - TIER B, uma vez que esta substância possui capacidade de acumular em sedimentos.

O risco ambiental de sedimentos contaminados com fluoxetina para invertebrados marinhos foi determinado baseando-se em quocientes de risco (QR), calculados a partir da maior concentração ambiental mensurada (MEC) para a fluoxetina encontrada na região de descarte de efluente do ESS na baía de Santos, e das concentrações onde não são previstos efeitos (PNECs).

Os valores de QR para a fluoxetina estão apresentados na Tabela 10. Para o cálculo das PNECs, foi utilizada a relação entre as menores concentrações de efeito não observado (CENO) obtidas nos ensaios de toxicidade crônica e citotoxicidade dividindo o valor por um fator de avaliação 10. De acordo com os resultados obtidos, a classificação proposta pela EMEA (2006) e as concentrações de fluoxetina encontradas

nos sedimentos da Baía de Santos pode-se afirmar que a fluoxetina apresenta alto risco para os invertebrados marinhos bentônicos *Perna perna*, mesmo considerando somente os ensaios a nível de indivíduo (embriolarval).

TABELA 10. Concentrações onde não são previstos efeitos (PNECs) obtidas a partir dos ensaios com ISA (Interface sedimento-água), ELU (Elutriato) e SI (Sedimento integral), e os quocientes de risco (QR) para a fluoxetina (MEC = 10,4 ng.g⁻¹), detectada no entorno do ESS.

<i>Perna perna</i>				<i>Echinometra lucunter</i>				<i>Mytella charruana</i>	
ISA		ELU		ISA		ELU		SI	
PNEC	QR	PNEC	QR	PNEC	QR	PNEC	QR	PNEC	QR
370	0,028	3,7	2,81	37	0,281	37	0,281	0,0037	2810

A análise química realizada nas amostras de sedimentos coletadas no entorno do ESS demonstrou a ocorrência de fluoxetina (10,4 ng.g⁻¹), fato que por si só já gera preocupação, uma vez que diferentes populações podem entrar em contato com tal substância, seja pela absorção direta por difusão pela superfície corpórea no caso de espécies mais simples ou pela alimentação e/ou respiração.

No ambiente ainda é possível a ocorrência de efeitos sinérgicos com outros fármacos, o que potencializa ainda mais o risco da fluoxetina em sedimentos marinhos. Pereira *et al*, (2016) realizaram o primeiro estudo para detecção da presença de fármacos na região da baía de Santos. Em amostras de água coletadas próximo ao lançamento de esgoto pelo emissário submarino municipal, diferentes classes de fármacos foram detectadas, no qual o ibuprofeno apresentou as concentrações mais elevadas, variando de 326,1 ng.L⁻¹ até 2094,4 ng.L⁻¹.

Os FPCP, diferentemente dos poluentes convencionais, são compostos biologicamente ativos, desenvolvidos para interagir com vias fisiológicas específicas em organismos alvo. Desta forma, fazem parte de uma classe de contaminantes

emergentes capazes de causar efeitos em funções específicas de animais (ex: desenvolvimento, crescimento, reprodução), mesmo que em baixas concentrações, especialmente pelo fato destes compostos serem introduzidos de forma contínua no ambiente aquático (Fabbri & Franzellitti, 2015).

A partir dos resultados obtidos, junto com o estabelecimento de quocientes de risco tanto a nível individual (desenvolvimento embrionário e reprodução) como sub-indivíduo (biomarcadores) demonstrou que a fluoxetina representa risco para invertebrados bentônicos.

De fato existem poucos estudos sobre risco ambiental de sedimentos marinhos contaminados com fármacos, os quais utilizam PNECs estimados a partir de dados de toxicidade na água, considerando o método do equilíbrio de partição sedimento-água (Hernando *et al.*, 2006; Nie *et al.*, 2015). Porém, o uso de dados estimados, tanto de PNECs quanto de concentrações ambientais (Predicted Environmental Concentration - PEC), pode subestimar ou superestimar o risco ambiental para esta classe de substâncias. Oakes *et al.*, (2010) em seu estudo demonstraram valor de QR de com base no PEC para águas superficiais de rios do Reino Unido (QR = 4,92) e da Alemanha (QR = 1,0), tomando como base resultados de PNEC de 0,012 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fluoxetina para a espécie de alga clorofícea *Desmodesmus subspicatus*. Porém, utilizando os dados de QR (2810) e de PNEC (0,037 ng.g^{-1}) para o mexilhão *Mytella charruana* exposto ao sedimento integral marcado com fluoxetina, é possível observar um quociente de risco muito mais elevado.

Ainda em relação ao estudo de Oakes *et al.*, 2010, os autores apresentaram diferentes QRs (PEC / PNEC) para sedimentos contendo fluoxetina, utilizando resultados de diferentes pesquisadores (Brooks *et al.*, 2003b; Nentwig, 2007; Péry *et al.*, 2008) obtidos a partir de diferentes *endpoints* para diferentes espécies de organismos bentônicos, os resultados dos QRs variaram de 0,0045 a > 0,42. Embora esse intervalo esteja abaixo do valor de 1 proposto pela EMEA (2006) e, portanto, não devesse gerar maior preocupação, a incerteza inerente aos ensaios e os valores de PNEC de <28 ng.kg^{-1} para fluoxetina, permitiu aos autores a não exclusão com segurança do potencial risco tóxico dessa substância em sedimentos. Somado à isso, os resultados encontrados de QR (QR = 2,81) para a espécie *Perna perna* exposto ao

sedimento marcado com fluoxetina pelo método de Elutriato, indica um potencial risco ambiental para esta substância quando presente em sedimentos marinhos.

Como os ISRSs e os SSNRIs são os antidepressivos mais prescritos, eles são os mais comumente detectados em amostras de efluentes domésticos e a jusante das estações de tratamento de esgoto (Fong *et al.*, 2014). Somado à isso, a elevada capacidade de adsorção a sedimentos (Kwon & Armbrust, 2008) e aumento da preocupação crescente de doenças psiquiátricas como a depressão (Alonso *et al.*, 2004), um aumento do consumo de fluoxetina e outros medicamentos antidepressivos da mesma classe é esperado em um futuro próximo. De fato, vários medicamentos inibidores da recaptação da serotonina foram detectados em diferentes matrizes ambientais (González Alonso *et al.*, 2010; Metcalfe *et al.*, 2010).

Por conseguinte, se torna ainda mais necessária a investigação dos efeitos causados na biota aquática exposta a longo prazo a esses contaminantes, bem como as interações toxicológicas prováveis de misturas complexas de fármacos devem ser melhor investigadas.

7. CONCLUSÕES

- A concentração de fluoxetina detectada nos sedimentos da área de influência do emissário submarino de Santos foi de $10,4 \text{ ng.g}^{-1}$. Cabe ressaltar que estes são os primeiros resultados obtidos para a presença deste fármaco em sedimentos marinhos no litoral brasileiro.
- A fluoxetina causou toxicidade aos embriões do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* e ao mexilhão *Perna perna* em concentrações acima das concentrações ambientais encontradas para este fármaco na região de influência do emissário submarino de Santos/SP. Porém, os resultados obtidos sugerem que as concentrações que geraram efeito sobre o desenvolvimento embrionário para estas espécies, podem ser consideradas ambientalmente relevantes, pois estão próximas de concentrações já detectadas em outras matrizes ambientais de regiões costeiras.
- Mesmo em baixas concentrações, a fluoxetina pode ser considerada potencialmente perigosa, pois é capaz de alterar os mecanismos de manutenção da homeostase de mexilhões *Mytella charruana*, uma vez que foi evidenciada alteração no sistema de defesa antioxidante, havendo aumento da atividade de GPX.
- O tempo de 48 horas de exposição à fluoxetina foi capaz de gerar efeitos citogenotóxicos (diminuição da estabilidade da membrana lisossomal, peroxidação lipídica e danos em DNA) e efeitos neurotóxicos, com significativa redução da atividade de ChE em mexilhões *Mytella charruana* em concentrações ambientalmente relevantes.
- A avaliação de risco ambiental caracterizou o fármaco fluoxetina como substância de potencial risco, pois o QR se mostrou acima de 1 para a espécie de mexilhão *Perna perna* segundo os resultados obtidos no presente estudo houve dos ensaios biológicos quando relacionados às concentrações ambientais presentes em sedimentos marinhos da área de influência do emissário submarino de Santos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D.M.S. Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil. Tese de Doutorado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 2002. 290 p.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 2012. NBR 15350: ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Rio de Janeiro, 19 p.

ADAMS, S. M. 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effect of stress in fish. Amer. Fish. Soc. Symp., 8: 1-8p.

AGUIRRE-MARTÍNEZ GV, BURATTI S, FABBRI E. 2013. Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. J Environ Sci. 25:1408–1418p.

AIELLO, E. 1970. Nervous and chemical stimulation of gill cilia in bivalve mollusks. Physiological Zoology, 43:60–70p.

ALONSO, S.G.; CATALA´, M.; MAROTO, R.R.; GIL, J.L.R.; MIGUEL, A´.G.; VALCA´ RCEL, Y. 2010. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the rivers of Madrid metropolitan area (Spain). Environ. Int., 36: 195–201p.

ANDERSON, B.S.; HUNT, J.W.; HESTER, M.M.; PHILLIPS, B.M. 1996. Assessment of sediment toxicity at the sediment-water interface. In: G.K. Ostrander, Techniques in aquatic toxicology (pp. 609-624). Boca Raton, FL: CRC Press.

ARPIN-PONT, L.; BUENO, M.J.; GOMEZ, E.; FENET, H. 2016. Occurrence of PPCPs in the marine environment: a review. Environ Sci Pollut Res., 23(6):4978-4991p.

AUDESIRK, G.; MCCAMAN, R.E.; WILLOWS, A.O.D. 1979. The role of serotonin in the control of pedal ciliary activity by identified neurons in *Tritonia diomedea*. *Comparative Biochemistry Physiology C*, 62:87–91p.

BARREIRO, E. J. & FRAGA, C.A.M. 2015. Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre, Artmed, 3ªed.

BENOTTI, M.J.; TRENHOLM, R.A.; VANDERFORD, B.J; HOLADY, J.C; STANFORD, B.D; SNYDER, S.A. 2009. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environmental Science & Technology*, 43: 597–603p.

BERTRAND, C.; BONAFOS, B.; TREMBLAYA, M.; FERRY, A.; CHATONNET, A. 2008. Effect of fluoxetine on neuromuscular function in acetylcholinesterase (AChE) knockout mice. *Chemico-Biological Interactions* 175:113–114p.

BEYERS, D.W.; SIKOSKI, P.J. 1994. Acetylcholinesterase inhibition in federally endangered Colorado squawfish exposed to cararyl and malathion. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:935–939p.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. 2003. Fármacos no Meio Ambiente. *Química Nova*, 26: 523-5p.

BIRMINGHAM, J.T.; TAUCK, D.L. 2003. Neuromodulation in invertebrate sensory systems: from biophysics to behaviour. *Journal Experimental Biology*, 206: 3541–3546p.

BOOTH, L.H.; O' HALLORAN, K. 2001. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorous insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 2494–2502p.

BOTTONI, P., CAROLI, S. & CARACCIOLO, A.B. 2010. Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92:549 – 565p.

BRAGA, O.; SMYTHE, G.A.; SCHÄFER, A.I.; FEITZ, A.J. 2005. Steroid estrogens in ocean sediments. *Chemosphere*, 61:827–833p.

BROOKS, B.W.; FORAN, C.M.; RICHARDS, S.M.; WESTON, J.; TURNER, P.K.; STANLEY, J.K.; SOLOMON, K.R.; SLATTERY, M.; LA POINT, T.W. 2003a. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol Lett*, 142:169–183p.

BROOKS, B.W.; FORAN, C.M.; RICHARDS, S.M.; WESTON, J.; TURNER, P.K.; STANLEY, J.K.; SOLOMON, K.R.; SLATTERY, M. LA POINT, T.W. 2003b. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol Lett.*, 142:169–183p.

BROOKS, B.W.; BERNINGER, J.P.; KRISTOFKO, L.A.; RAMIREZ, A.J.; STANLEY, J.K.; VALENTI, T.W. 2012. Pharmaceuticals in the environment: lessons learned for reducing uncertainties in environmental risk assessment. *Toxicology and Human Environments*, 112:231–258P.

BRINGOLF, R. B.; HELTSLEY, R.M.; NEWTON, T.J.; EADS, C.B.; FRALEY, S.J.; SHEA, D.; COPE, W.G. 2010. Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environmental Toxicology and chemistry*. 29(6): 1311-1318p.

CABIANCA, M.A.A. & SOUZA, L. H. 2017. A Cultura de Veraneio e a produção do espaço da Região Metropolitana da Baixada Santista(São Paulo, Brasil). *Turismo & Sociedade* (ISSN: 1983-5442), v10(1):1-22p.

CANESI, L.; CIACCI, C.; LORUSSO, L.C.; BETTI, M.; GALLO, G.; POIANA, G.; MARCOMINI, A.; 2007. Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte

function and digestive gland enzyme activities: possible modes of action on non target organisms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145(C):464-472p.

CESAR, A.; SILVA, S.L.R; SANTOS, A.R. 1997. Testes de toxicidade aquática no controle da poluição. In: Universidade Santa Cecília - Laboratório de Ecotoxicologia - Santos, São Paulo, Brasil.

CESAR, A.; MARÍN, A.; MARÍN-GUIRAO, L.; VITA, R. 2004. Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portmán Bay. *Sci. Mar.*, 68(1):205-213p.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Sedimentos: Determinação da distribuição granulométrica. São Paulo: CETESB, 1995. Norma Técnica L6 160.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Qualidade das águas litorâneas no estado de São Paulo. Balneabilidade das praias 2004/CETESB. 2005. São Paulo, SP. 331p.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.. Áreas contaminadas. 2011. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas>. Acessado em 01/04/2014 às 14:30.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade das praias litorâneas no estado de São Paulo 2013. São Paulo : CETESB, 2014.

CONAMA. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005a. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras

providências. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 53, 18 março de 2005. Seção 1, p. 58-63.

COMINETTI, C.; BORTOLI, M. C.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. 2011. Considerations about oxidative stress, selenium and nutrigenetics. *Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, 36(3):131-153p.

CORTEZ, F.S. 2011. Avaliação ecotoxicológica do fármaco triclosan para invertebrados marinhos. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas da Universidade de São Paulo. 203p.

CORTEZ, F.S.; PEREIRA, C.D.S.; SANTOS, A.R.; CESAR, A.; CHOUERI, R.B.; MARTINI, G.A.; BOHRER-MOREL, M.B. 2012. Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Environ Pollut.*, 168:145-150p.

CORTEZ, F.S. Estudo ecotoxicológico de contaminantes de preocupação emergente na baía de Santos, SP. Tese de doutorado. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” Campus do Litoral Paulista (CLP).

CUNNINGHAM VL, CONSTABLE DC, HANNAH RE. 2004. Environmental risk assessment of paroxetine. *Environ Sci Technol* 38:3351–3359p.

DAILIANIS, S.; DOMOUHTSIDOU, G.P.; RAFTOPOULOU, E.; KALOYIANNI, M.; DIMITRIADIS, V.K. 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 56:443-470p.

DAYAN, P.; HUYS, Q.J.M. 2009. Serotonin in affective control. *Annual Review Neuroscience*, 32: 95–126p.

DULAWA, S.C.; HOLICK, K.A.; GUNDERSEN, B.; HEN, R. 2004. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*, v29(7):1321-30p.

ELI LILLY DO BRASIL LTDA. 2011. Prozac - Cloridrato de fluoxetina. Bula aprovada pela ANVISA em 18/01/2011.

EMA - European Medicines Evaluation Agency. 2006. European agency for the evaluation of medicinal products. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. Ref EMA/CRMP/SWP/4447/00. London, UK.

FABBRI, E., CAPUZZO, A., 2010. Cyclic AMP signaling in bivalve molluscs: an overview. *Journal of Experimental Zoology Part A* 313: 179–200p.

FABBRI, E. & FRANZELLITTI, S. 2015. Human pharmaceuticals in the marine environment: focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4):799–812p.

FERREIRA, J.F.; MAGALHÃES, A.R.M. 2004. Cultivo de Mexilhões. *In: POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. Aquicultura - Experiências Brasileiras*. Florianópolis: Multitarefa. 221-250p.

FICK, J.; SODERSTROM, H.; LINDBERG, R.; PHAN, C.; TYSKLIND, M.; LARSSON, D. 2009. Contamination of surface, ground and drinking water from pharmaceutical production. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28(12):2522-2527p.

FOCAZIO, M. J.; KOLPIN, D. W.; BARNES, K. K.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; THURMAN, M. E. 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. *Sci. Total Environ.* 402: 201–216p.

FONG, P.P.; KYOZUKA, K.; ABDELGHANI, H.; HARDEGE, J.D.; RAM, J.L. 1994. *In vivo* and *in vitro* induction of germinal vesicle breakdown in a freshwater bivalve, the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). Journal Experimental Zoology, 269:467–474p.

FONG, P.P.; FORD, A.T. 2014. The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. Aquatic Toxicology, 151:4-13p.

FONSECA, A. L. 1991. A Biologia da Espécie *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia dubia silvestre* (Cladocera, Crustacea) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o Comportamento destes em Testes de Toxicidade Aquática com Efluentes Industriais. USP, 210p. São Carlos.

FORAN, C.M.; WESTON, J.; SLATTERY, M.; BROOKS, B.W.; HUGGETT, D.B. 2004. Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. Arch Environ Contam Toxicol, 46:511–517p.

FRANCIS, P.C.; BIRGE, W.J.; BLACK, J.A. 1984. Effects of cadmium-enriched sediment on fish and amphibian embryo–larval stages. Ecotoxicol. Environ. Saf., 8:378–387p.

FRANZELLITTI, S.; BURATTI, S.; VALBONESI, P.; FABBRI, E. 2013. The mode of action (MOA) approach reveals interactive effects of environmental pharmaceuticals on *Mytilus galloprovincialis*. Aquat Toxicol. 140:249–256p.

FRANZELLITTI, S.; BURATTI, S.; CAPOLUPO, M.; DUC, B.; HADDAD, S.P.; CHAMBLISS, C.K.; BROOKS, B.W.; FABBRI, E. 2014. An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. Aquatic Toxicology, 151:14–26P.

FRANZELLITTI, S.; BURATTI, S.; DU, B.; HADDAD, S. P.; CHAMBLISS, C. K.; BROOKS, B. W.; FABBRI, E. 2015. A multibiomarker approach to explore interactive effects of propranolol and fluoxetine in marine mussels. *Environmental Pollution*, 205:60–69p.

FREITAS, M.I.C.; BORTOLETTO, K.C.; ROSSETTI, L.A.F.G.; FREITAS, A.C.; OLIVEIRA, R.B.N. 2017. Análise da vulnerabilidade socioambiental e do uso do solo urbano da área insular de Santos – SP. *revista brasileira de cartografia*, nº 69/4, edição desastres naturais e impactos ambientais: 769-790p.

FULONE, I. & LOPES, L.C. Potentially inappropriate prescriptions for elderly people taking antidepressants: comparative tools. *BMC Geriatrics*, v.17, p.278, 2017.

GAČIĆ, Z., KOLAREVIĆ, S., SUNJOG, K., KRAČUN-KOLAREVIĆ, M., PAUNOVIĆ, M., KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, J., & VUKOVIĆ-GAČIĆ, B. 2014. The impact of in vivo and in vitro exposure to base analogue 5-FU on the level of DNA damage in haemocytes of freshwater mussels *Unio pictorum* and *Unio tumidus*. *Environmental Pollution*, 191: 145-150p.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; ANDRÉ, C. 2006. Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v64:329-336p.

GARDINER, D.B.; SILVERMAN, H.; DIETZ, T.H. 1991. Musculature associated with the water canals in freshwater mussels and response to monoamines in vitro. *Bio-logical Bulletin*, 180 (3):453–465p.

GASPAR, J.C. 2015. Avaliação ecotoxicológica e do risco ambiental do fármaco ibuprofeno em invertebrados marinhos: uma abordagem com endpoints reprodutivos e de estresse celular. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Paulo. 81p.

GIBBONS, M.C.; CASTAGNA, M. 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalvespecies. *Aquaculture*, 40:189–191p.

GILROY, È.A.M.; BALAKRISHNAN, V.K.; SOLOMON, K.R.; SVERKO, E.; SIBLEY, P.K. 2012. Behaviour of pharmaceuticals in spiked lake sediments – Effects and interactions with benthic invertebrates. *Chemosphere*. 86(6): 578–584p.

GÓMEZ-MENDIKUTE, A., ELIZONDO, M., VENIER, P., & CAJARAVILLE, M. P. 2005. Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro. *Cell and Tissue Research*, 321(1):131–140p.

GOMEZ, M.J.; MARTINEZ BUENO, M.J.; LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A.R.; AGUERA, A. 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66: 993–1002p.

GONZÁLEZ ALONSO, S.; CATALÁ, M.; MAROTO, R.R.; GIL, J.L.R.; DE MIGUEL, Á.G.; VALCÁRCEL, Y. 2010. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environment International*, 36(2): 195–201p.

GONZALEZ-REY, M.; BEBIANNO, M.J. 2013. Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affect mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environmental Pollution*, 174: 200–209p.

GONZALEZ-REY, M.; MATTOS, J. J.; PIAZZA, C. E.; BAINY, A. C. D.; BEBIANNO, M. J. 2014. Effects of active pharmaceutical ingredients mixtures in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 153, 12–26.

GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. 2009. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters using liquid chromatography quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Analytical Chemistry*, 81: 898 - 912p.

GROSVICK, B.E.; JONSSON, H.; ORTEGA,M.J.R.; ROEPSTORFF,P.; GOKSOYR,A. CYP1A-immunipostive proteins in bivalves identified as cytoskeletal and major vault proteins.Aquat.Toxicol.v.79, p.334–340, 2006

GUERRIER, P.; DUROCHER, Y.; GOBET, I.; LECLERC, C.; MOREAU, M. 1996. Reception andtransduction of the serotonin signal responsible for oocyte meiosis reinitiationin bivalves. Invertebrate Reproduction Development, 30:39–45p.

GULER, T.; FORD, A.T. 2008 Anti-depressants make amphipods see the light. Aquat Toxicol. 99(3):397-404p.

GUNNARSSON, L.; JAUHIAINEN, A.; KRISTIANSSON, E.; NERMAN, O.; LARSSON, D.G.J. 2008. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for envi-ronmental risk assessments. Environ. Sci. Technol., 42: 5807–5813p.

GURY, C. & COUSIN F. 1999. Pharmacokinetics of SSRI antidepressants: half-life and clinical applicability. Encephale, v.25(5):470-6p.

Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid Peroxidation : Its Mechanism, Measurement and Significance. The American Journal of Clinical Nutrition, 57: 715p–725p.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. 4 ed. Oxford: Oxford University Press. 704p

HAZELTON, P.D.; COPE, W.G.; MOSHER, S.; PANDOLFO, T.J.; BELDEN, J.B.; BARNHART, M.C.; BRINGOLF, R.B. 2013. Fluoxetine alters adult freshwater mussel behaviour and larval metamorphosis. Science Total Environment. 445: 94–100p.

HAZELTON, P.D.; DUC, .B; HADDADD, S.P.; FRITTS, A.K.; CHAMBLISS, C.K.; BROOKS, B.W.; BRINGOLF, R.B. 2014. Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. *Aquatic Toxicology*, 151:27–35P.

HEALY, D. 1997. *The antidepressant era*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

HERNANDO, M.D.; MEZCUA, M.; FERNANDEZ-ALBA, A.R.; BARCELO, D. 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69:334–342p.

HIEMKE, C. & HÄRTTER S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. 2000. *Pharmacology & Therapeutics*, v.85(1):11-28p.

HIRAI, S., KISHIMOTO, T., KADAM, A.L., KANATANI, H., KOIDE, S.S., 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *Journal Experimental Zoology*, 245: 318–321p.

HIROTA, J. & SZYPER, J.P. 1975. Separation of total particulate carbon into inorganic and organic components. *Limnol Oceanogr.*, 20:896–900p.

HUGGETT, D.B.; COOK, J.C.; ERICSON, J.F.; WILLIAMS, R.T. 2003. A theoretical model for utilizing mammalian pharmacology and safety data to prioritize potential impacts of human pharmaceuticals to fish. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 9:1789–1799p.

IBGE. 2010. Censo demográfico - Características da população e dos domicílios: resultados do universo. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível <http://www.brasileirosnomundo.itamaraty.gov.br/a-comunidade/estimativas-populacionais-das-comunidades/estimativas-do-ibge/censo-demografico-ibge-2010.pdf> . Acesso em: out. 2018.

IBGE. 2015. Cidades@. Histórico do município de Santos SP. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/painel/historico.php?lang=&codmun=354850>>. Acesso em:

julho de 2018.

INSTITUTO PÓLIS. 2014. Agendas de desenvolvimento sustentável: contribuições para a Baixada Santista e Litoral Norte de São Paulo. Coord.: Nelson Saule Jr. e outros. São Paulo: Instituto Pólis.

JAKOB, A.A.E. 2003. Análise Sócio-Demográfica da Constituição do Espaço Urbano da Região Metropolitana da Baixada Santista no período 1960-2000. Tese de Doutorado apresentada ao Programa De Doutorado em Demografia do Instituto de Filosofia e Ciências Humanas da Universidade Estadual de Campinas.

JOHNSON, D. J.; SANDERSON, H.; BRAIN, R.A.; WILSON, C.J.; BESTARI, K.J.T.; SOLOMON, K.R. 2005. Exposure assessment and microcosm fate of selected selective serotonin reuptake inhibitors. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v42(3):313-323p.

KADAM, A.L.; KOIDE, S.S. 1989. Serotonin analogs and *Spisula* oocyte maturation. *Invertebrate Reproduction Development*, 17: 33–37p.

KALLENBORN, R.; FICK, J.; LINDBERG, R.; MOE, M.; NIELSEN, K. M.; TYSKLIND, M.; VASSKOG, T. 2008. Pharmaceutical Residues in Northern European Environments: Consequences and Perspectives in: *Pharmaceuticals in the Environment Part II*. Ed. Springerlink. 61 – 74p.

KIM, S.D., CHO, J., KIM, I.S., VANDERFORD, B.J., SNYDER, S.A., 2007. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research*, 41: 1013–1021p.

KINNEY, C. A.; FURLONG, E. T.; WERNER, S. L.; CAHILL, J. D. 2006. Presence and distribution of wastewater-derived pharmaceuticals in soils irrigated with reclaimed water. *Environ. Toxicol. Chem.* 2006, 25, 317–326.

KLAPPENBACH, M.A. 1965. Lista preliminar de los Mytilidae brasileños con claves para su determinación y notas sobre su distribución. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 37: 327-352.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol.*, 36: 1202–1211p.

KOSJEK, T. & HEATH, E. 2010. Tools for evaluating selective serotonin re-uptake inhibitor residues as environmental contaminants. *Trends Anal Chem*, v29:832–47p.

KRANTIC, S.; DUBE, F.; QUIRON, R.; GUERRIER, P. 1991. Pharmacology of the serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes. *Developmental Biology*, 146:491–498p.

KUMMERER, K. 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90: 2354–2366p.

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

Kwon, J.W. & Armbrust, K. L. 2008. Aqueous Solubility, n-Octanol–Water Partition Coefficient, and Sorption of Five Selective Serotonin Reuptake Inhibitors to Sediments and Soils. *Bull Environ Contam Toxicol.* 81:128–135p.

LAJEUNESSE, A.; GAGNON, C.; SAUVE, S. 2008. Determination of basic antidepressants and their n-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 80: 5325–5333p.

LENKEY, N.; KAROLY, R.; KISS, J.P.; SZASZ, B.K.; VIZI, E.S.; MIKE, A. 2006. The mechanism of activity-dependent sodium channel inhibition by the antidepressants fluoxetine and desipramine, *Mol. Pharmacol.*, 70:2052–2063p.

LEWIS, S.L.; LYONS, D.E.; MEEKINS, T.L.; NEWCOMB, J.M. 2011. Serotonin influences locomotion in the nudibranch mollusc *Melibe leonine*. *Biological Bulletin*, 220(3):155–160p.

LIANG, X., CHEN, B., NIE, X., SHI, Z., HUANG, X., AND LI, X. 2013. The distribution and partitioning of common antibiotics in water and sediment of the Pearl River Estuary, South China. *Chemosphere*. 92(11): 1410–1416p.

LOWE, D.M.; FOSSATO, V.U.; DEPLEDGE, M.H. Contaminant –induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from venice lagoon: an in vitro study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 129:189-196. 1995.

LUCZAK, C.; JANQUIN, M.A.; KUPKA, A. 1997. Simple standard procedures for the routine determination of organic matter in marine sediment. *Hydrobiologia*, 345:87-94p.

LUNETTA, J.E. Fisiologia da reprodução de mexilhões *Mytilus perna* (Molusca Lamellibranchia). *Bol. Zoo. Bio. Mar.*, 26:33-111. 1969.

OSANAI, K.; KURAISHI, R. 1988. Response of oocytes to meiosis-inducing agents in pelecypods. *Bulletin Marine Biological Station Asamushi*, 18: 45–56p.

MACLEOD, S.L.; SUDHIR, P.; WONG, C.S. 2007. Stereoisomer analysis of wastewater-derived β -blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1170(1–2): 23-33p.

MANDAJI, D.S. Emissário submarino de santos: contribuição nos sedimentos de fundo para al, mg, k, ca, fe, ti, na, si, ba, cu, zn, cr, mn, co, ni e s. universidade de são paulo instituto de geociências. dissertação de mestrado. 2008.

MARANHO, L.A.; BAENA-NOGUERAS, R.M.; LARA-MARTÍN, P.A.; DELVALLS, T.A.; MARTÍN-DÍAZ, M.L. 2014. Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species. *Environmental Research*, 134:353–365p.

MARANHO, L.A.; GARRIDO-PÉREZ, M.C.; DELVALLS, T.A.; MARTÍN-DÍAZ, M.L. 2015a. Suitability of Standardized Acute Toxicity Tests for Marine Sediment Assessment: Pharmaceutical Contamination. *Water Air Soil Pollut*, 226:65. DOI 10.1007/s11270-014-2273-6.

MARQUES, L. A. 1998 Criação comercial de mexilhões – São Paulo: Editora Nobel, 1998. 111 p.

MARTINEZ-BUENO, M.J., AGÜERA, A., GÓMEZ, M.J., HERNANDO, M.D., GARCIA-REYES, J.F., FERNANDEZ-ALBA, A.R., 2007. Application of liquid chromatography/quadrupolelinear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Anal. Chem.*, 79: 9372–9384p.

MATSUTANI, T.; NOMURA, T. 1982. Induction of spawning by serotonin in the scallop *Patinoplectin yessoensis* (Jay). *Marine Biology Letters*, (3):353–358p.

MEECHONKIT, P.; ASUVAPONGPATANA, S.; JUMROMN, W.; KOVITVADHI, U.; WEER-ACHATYANUKUL, W. 2012. Sexual differences in serotonin distribution and induction of synchronous larval release by serotonin in the freshwater mussel *Hyriopsis bialatus*. *Journal Molluscan Studies*, 76(3):267–274p.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, G.T.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. 2009. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, São Paulo, 32(1): 188-197p.

MENNIGEN, J.A.; MARTYNIUK, C.J.; CRUMP, K.; XIONG, H.; ZHAO, E.; POPESKU, J.; ANISMAN, H.; COSSINS, A.R.; XIA, X.; TRUDEAU, V.L. 2008. Effects of fluoxetine on the reproductive axis of female goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol Genomics*, v35(3):273-82p.

MENNIGEN, J.A.; STROUD, P.; ZAMORA, J.M.; MOON, T.W.; TRUDEAU, V.L. 2011. Pharmaceuticals as Neuroendocrine Disruptors: Lessons Learned from Fish on Prozac. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 14(5-7): 387-412p.

METCALFE, C. D.; MIAO, X.-S.; KOENIG, B. G.; STRUGER, J. 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2881–2889p.

METCALFE, C. D.; CHU, S.; JUDT, C.; LI, H.; OAKES, K. D.; SERVOS, M. D.; ANDREWS, D. M. 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (1): 79–89p.

METCALFE, C., 2014. Contaminants of emerging concern in effluents from wastewater treatment plants in the Lake Simcoe watershed. Trent University, Peterborough, ON, Canada, pp. 1-8.

MILAN, M.; PAULETTO, M.; PATARNELLO, T.; BARGELLONI, L.; MARIN, M.G.; MATOZZO, V. 2013. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. *Aquat. Toxicol.*, 126:17-29p.

MOORE, M.N.; LOWE, D.M.; ALLEN, J.I.; MCVEIGH, A.; SOMERFIELD, P.J. 2007. Predicting health of the environment - lysosomal biomarker responses in mussels. In: Proceedings of the Workshop on the Med Pol Biological Effects Programme. United Nations Environment Programme/Mediterranean Action Plan (UNEP/MAP). Technical Reports Series Athens 166, 245p.

MORA, D. A. & ALPÍZAR, B. M. 1998. Crecimiento de *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) en balsas flotantes. *Revista de Biología Tropical*, 46: 21-26.

MORENO-GONZÁLEZ, R.; RODRIGUEZ-MOZAZ, R.; GROS, M.; BARCELÓ, D.; LEÓN, V.M. 2015. Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (SE Spain). *Environmental Research*. 138: 326–344p.

MULROY, A. 2001. When the cure is the problem. *Water Environment Technology*, 13(2):32-36p.

MURRAY, R.K.; GRANNER D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. 1996. *Harper's Biochemistry*. 24ed. Stanford: Appleton & Lange. 868p.

NEGREIROS, Rovená. 1992. A Região Metropolitana da Baixada Santista: Dinâmica Sócio Econômica e as Perspectivas da Gestão Urbana. Relatório D.2 do Projeto - Urbanização e Metropolização no Estado de São Paulo: Desafios da Política Urbana. NESUR-IE/UNICAMP. Convênio SEP/UNICAMP. mimeo, 111p.

NENTWIG, G. 2007. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: the antidepressant drug fluoxetine. *Archives Environmental Contamination Toxicology*, 52:163–170p.

NEUWOEHNER, J.; FENNER, K.; ESCHER, B.I. 2009. Physiological modes of action of fluoxetine and its human metabolites in algae. *Environ Sci Technol*, 43:6830–6837p.

NIE, M.; Yan, C.; Dong, W.; Liu, M.; Zhou, J.; Yang, Y. 2015. Occurrence, distribution and risk assessment of estrogens in surface water, suspended particulate matter, and sediments of the Yangtze Estuary. *Chemosphere*, 127:109–116p.

NISHIDA, A .K e LEONEL, R.M.V. 1995 Occurrence, population dynamics and habitat characterization of *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Mollusca, Bivalvia) in the Paraíba do Norte river estuary. *Bol. Inst. Ocean, São Paulo*, 43 (1):41 – 49.

NISHIDA, A., NORDI, N., NÓBREGA-ALVES, R. 2006. Mollusc gathering in northeast Brazil: an ethnological approach. *Human Ecology*, 34: 133-144.

NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. 2006. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere*, 62: 581–594p.

OAKES, K. D.; COORS, A.; ESCHER, B.I.; FENNER, K.; GARRIC, J.; GUST, M.; SERVOS, M. R. 2010. Environmental risk assessment for the serotonin re-uptake inhibitor fluoxetine: Case study using the European risk assessment framework. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6(S1):524–539p.

OLIVEIRA, J.A. 2007. "Terceira idade" e cidade: o envelhecimento populacional no espaço intra-urbano de Santos. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo.

ORTIZ-ZARRAGOITIA, M.; CAJARAVILLE, M.P. 2010. Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Ecotoxicol Environ Saf.*, 73(5):693-701p.

PAROLINI, M.; BINELLI, A. Oxidative and genetic responses induced by Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC) to *Dreissena polymorpha*. *Science of the Total Environment*. v. 468–469, p.68–76, 2014.

PEREIRA, C.D.S. 2008. Biomarcadores de exposição, efeito e bioacumulação de xenobióticos em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus,1758) transplantados ao longo do litoral de São Paulo. Tese Doutorado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 180p.

PEREIRA, C.D.S.; MARANHO, L.A.; CORTEZ, F.S.; PUSCEDDU, F.H.; SANTOS, A.R.; RIBEIRO, D.A.; CESAR, A.; GUIMARÃES, L.L. 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Science of the Total Environment*, 548–549:148–154p.

PEREIRA, O. M.; LOPES, R.G. da 1995 Fixação de sementes de *Mytella falcata* (sururu) em coletores artificiais no Canal de Bertioga, Estuário de Santos, Estado de São Paulo, Brasil. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 22 (1): 165 - 173.

PEREIRA, O.M., HILBERATH, R.C., ANSARAH, P.R.A.C., GALVÃO, M.S.N. 2003. Estimativa da produção de *Mytella falcata* e de *M. guyanensis* em bancos naturais do Estuário de Ilha Comprida, SP, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 29: 139-149.

PEREIRA, O.M., GALVÃO, M.S.N., PIMENTEL, C.M., HENRIQUES, M.B., MACHADO, I.C. 2007. Distribuição dos bancos naturais e estimativa de estoque do gênero *Mytella* no estuário de Cananéia, SP, Brasil. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 11: 21-29.

PÉRY, A.R.R.; GUST, M.; VOLLAT, B. 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere*, 73:300–304p.

PETROVIĆ, M.; ŠKRBIĆ, B.; ŽIVANČEV, J.; FERRANDO-CLIMENT, L.; BARCELOA, D. 2014. Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole –linear ion

trap in different types of water in Serbia. *Science of the Total Environment*, v.468-469 468-469(p).

PIMENTEL, M.F.; DAMASCENO, E.P.; JIMENEZ, P.C.; ARAÚJO, P.F.R.; BEZERRA, M.F.; MORAIS, P.C.V.; CAVALCANTE, R.M.; LOUREIRO, S.; LOTUFO, L.V.C. 2016.

PINTADO-HERRERA, M.G.; GONZÁLEZ-MAZO, E.; LARA-MARTÍN, P.A. 2014. Determining the distribution of triclosan and methyl triclosan in estuarine settings. *Chemosphere*, 95:478–485p.

PRASSE, C.; STALTER, D.; SCHULTE-OEHLMANN U.; OEHLMANN J.; TERNES T.A. 2015. Spoilt for choice: a critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment technologies. *Water Research*, 87:237–270p.

PUSCEDDU, F.H. Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados de água doce com ênfase em ensaios com sedimento marcado (“spiked sediment”). 2009. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PUSCEDDU, F.H. Avaliação do risco ambiental de sedimentos contaminados com triclosan, ibuprofeno e 17 α -etinilestradiol empregando invertebrados marinhos bentônicos. 2016. Tese de Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PUSCEDDU, F.H., CHOUERI, R.B., PEREIRA, C.D.S., CORTEZ, F.S., SANTOS, D.R.A., MORENO, B.B., SANTOS, A.R., ROGERO, J.R., CESAR, A. 2018. Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints. *Environ Pollut*, vol 232, pp 274 - 283.

PRÓSPERI, V. A.; ARAÚJO, M. M. S. 2002. Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* Lamarck 1816 e *Echinometra lucunter*, Linnaeus

1758 (Echinodermata: Echinoidea). In: NASCIMENTO, I. A; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (Ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda, 99-110p.

RAJAMANI, S.; ECKHARDT, L.L.; VALDIVIA, C.R.; KLEMENS, C.A.; GILLMAN, B.M.; ANDERSON, C.L.; HOLZEM, K.M.; DELISLE, B.P.; ANSON, B.D.; MAKIELSKI, J.C.; JANUARY, C.T. 2006. Drug-induced longQTsyndrome: hERGK⁺ channel block and disruption of protein trafficking by fluoxetine and norfluoxetine, Br. J. Pharmacol., 149:481–489p.

RAM, J.L.; FONG, P.; CROLL, R.P.; NICHOLS, S.J.; WALL, D. 1992. The zebra mussel (*Dreissenapolyomorpha*), a new pest in North America: reproductive mechanisms as possible targets of control strategies. Invertebrate Reproduction Development, 22:77–86p.

RAM, J.L.; CRAWFORD, G.W.; WALKER, J.U.; MOJARES, J.J.; PATEL, N.; FONG, P.P.; KYOZUKA, K. 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. Journal Experimental Zoology, 265:587–598p.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. 1985. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications. New York: Hemisphere Publishing Corporation.

REMACLE, J.; LAMBERT, D.; RAES, M.; PIGEOLET, E.; MICHIELS, C.; TOUSSAINT, O. 1992. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data. Biochemical Journal, 286(1): 41-46p.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELUZIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. 2005. A FORMACAO E OS EFEITOS DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGENIO NO MEIO BIOLOGICO. BIOSCIENCE JOURNAL, 21(3):133-149p.

RICHARDSON, K.; JORGENSEN, B. B. Eutrophication: definition, history and effects. In: Jorgensen, B.B.; Richardson, K. (Ed.). Eutrophication in coastal marine ecosystems. Washington: American Geophysical Union, 1996. p. 1-19.

RUHOY, I.S.; DAUGHTON, C.G. 2008. Beyond the medicine cabinet: an analysis of where and why medications accumulate. *Environ. Int.* 34(8): 1157–1169p.

RIOS, E. 1994. Seashells of Brazil. Editora da Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, 368 p.

ROBERTS, P.H.; THOMAS, K.V. 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science Total Environment*, 356: 143–153p.

RUSSELL-HUNTER, W.D. Overview: planetary distribution of and ecological constraints upon the Mollusca. In: HUSSELL-HUNTER, W.D. ed *The Mollusca*, v.6, Ecology. Acad. Press, London, p. 1 - 27, 1983.

SAIMI, Y.; MURAKAMI, A.; TAKAHASHI, K. 1983. Electrophysiological correlates of nervous control of ciliary arrest response in the gill epithelial cells of *Mytilus*. *Comparative Biochemistry Physiology*, 74(A): 499–506p.

SALGADO, R.; MARQUES, R.; NORONHAA, J.P.; MEXIA, J.T.; CARVALHO, G.; OEHMEN, A.; REIS, M.A.M. 2011. Assessing the diurnal variability of pharmaceutical and personal care products in a full-scale activated sludge plant. *Environmental Pollution*, 159(10): 2359-2367p.

SANCHEZ-ARGUELLO, P. FERNANDEZ, C.; TARAZONA, J.V. 2009. Assessing the effects of fluoxetine on *Physa acuta* (Gastropoda, Pulmonata), and *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera) using a two-species water–sediment test. *Sci Total Environ*, 407:1937–1946p.

SANTOS, T.G., MARTINEZ, C.B.R., 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in the Neotropical fish species. *Chemosphere* 89, 1118–1125

SATO, T.; QADIR, M.; YAMAMOTO, S.; ENDO, T.; ZAHOOR, A. 2013. Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use. *Agricultural Water Management*, 130:1–13p.

SCHULTZ, M. M.; FURLONG, E. T. 2008. Trace analysis of antidepressant pharmaceuticals and their select degradates in environmental aquatic matrices by LC/ESI/MS/MS. *Anal. Chem.* 80: 1756– 1762p.

SCHULTZ, M.M.; FURLONG, E.T.; KOLPIN, D.W.; WERNER, S.L.; SCHOENFUSS, H.L.; BARBER, L.B.; BLAZER, V.S.; NORRIS, D.O.; VAJDA, A.M. 2010. Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci. Technol.*, (44): 1918–1925p.

SIES, H. & MOSS, K.M. 1978. A role of mitochondrial glutathione peroxidase in modulating mitochondrial oxidations in liver. *Eur J Biochem*, v.84, 377-83.

SILVA, L. J.G.; LINO, C. M.; MEISEL, L. M.; PENA, A. 2012. Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: An ecopharmacovigilance approach. *Science of the Total Environment*, v.437, 185–195p.

SIMM, M. 2009. Avaliação da qualidade da água em amostras provenientes da Baía da Babitonga – SC, através de ensaios de embriotoxicidade e de exposição prolongada ao ar, utilizando mexilhão da espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na fase larval e adulta. Dissertação de Mestrado. Universidade de Joinville – UNIVILLE. 107p.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; RICHARD, T.D.G.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effects. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle Jr. Jr., P.M., BERGMAN, H.L. (Eds.),

Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 235–335p.

SYED, N.I.; WINLOW, W. 1989. Morphology and electrophysiology of neurons innervating the ciliated locomotor epithelium in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comparative Biochemistry Physiology (A)*, 93(3):633–644p.

TERNES, T.A.; ANDERSEN, H.; GILBERG, D.; BONERZ, M. 2002. Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS. *Anal. Chem.*, 74:3498-3504p.

TIERNEY, A.J., 2001. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*. 128: 791–804p.

Tolls, J. 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environ Sci Technol*, 35:3397–3406p.

TRABOULSIE, A.; CHEMIN, J.; KUPFER, E.; NARGEOT, J.; LORY, P. 2006. T-type calcium channels are inhibited by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Mol. Pharmacol.*, 69:1963–1968p.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. 1995. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. First edition. [EPA/600/R-95-136].

USEPA – United States Environmental Protection Agency. 2001. Technical Manual. Methods for collection, storage and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses. Chapter 5: Sediment Manipulations.

USEPA - United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2007. Final report: the environmental occurrence, fate, and ecotoxicity of selective serotonin reuptake inhibitors

(SSRIs) in aquatic environments. Disponível em: http://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstract/1755/report/F . Acessado em: 23/07/2018.

VAN DER OOST,R.; BEYER,J.; VERMEULEN, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment:are view.Environ.Toxicol.Pharmacol., 13(2): 57–149p.

VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. A. 2006. Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/mass spectrometry. Environ. Sci. Technol. 40: 7312–7320p.

VASSKOG T, BERGER U, SAMUELSEN P-J, KALLENBORN R, JENSEN E. 2006. Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway. J Chromatogr A. 1115:187–195p.

VASSKOG, T.; ANDERSEN, T.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; KALLENBORN, R.; JENSEN, E. 2008. Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. Journal of Chromatography A, 1185: 194 - 205p.

VULLIET, E.; OLIVÉ, C.C. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption.Environmental Pollution.v.159, n.10, p.2929-2934, 2011.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-

induced stress syndrome in sentinel organisms. Review. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 146:281–300p.

VICTOR, R.; KOTTER, R.; O'BRIEN, G.; MITROPOULOS, M.; PANAYI, G. 2008. WHO Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater (1–4). International Journal of Environmental Studies, 65:157-176p.

WEIGER, W.A. 1997. Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. Biological Reviews Cambridge Philosophical Society, 72:61–95p.

WENTWORTH, C.H. 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. The Journal of Geology, 30(5):377-392p.

WINDER, V.L.; PENNINGTON, P.L.; HURD, M.W.; WIRTH, E.F. 2012 Fluoxetine effects on sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) locomotor activity. J Environ Sci Health B. 47(1):51-8P.

WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organisms. Aquat. Toxicol., 19: 137–161p.

WU, W.H.; COOPER, R.L. 2012. Serotonin and synaptic transmission at invertebrate neuromuscular junctions. Experimental Neurobiology, 21(3):101–112p.

XU, J.; WU, L.; CHANG, A.C. 2009. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. Chemosphere, 77: 1299- 1305p.

YAMAMOTO, H.; HAYASHI, A.; NAKAMURA, Y.; SEKIZAWA, J. 2005. Fate and partitioning of selected pharmaceuticals in aquatic environment. Environ Sci., 12:347–358p.

ZARONI, L.P., ABESSA, D.M.S., LOTUFO, G.R., SOUSA, E.C.P.M., PINTO, Y.A., 2005. Toxicity testing with embryos of marine mussels: protocol standardization for *Perna perna* (Linnaeus, 1758). Bulletin of Environmental Contamination Toxicology 74, 793-800.

ZHAO, J-L.; YING, G-G; LIU, Y-S; CHEN, F; YANG, J-F; WANG, L. 2010. Occurrence and risks of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: From source to the receiving environment. J Hazard Mater., 179:215–222p.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.**