AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Avaliação citotóxica de Amoxicilina e Clavulanato de Potássio em mexilhões *Perna perna*

Amanda de Souza

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero

São Paulo
2016

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

Avaliação citotóxica de Amoxicilina e Clavunalato de Potássio em mexilhões *Perna perna*

Amanda de Souza

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2016

Dedico este trabalho a minha mãe Renata e a minha avó Claudete, por jamais medirem esforços para me auxiliarem e serem as minhas maiores incentivadoras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora pelas bênçãos em minha vida.

A minha mãe e minha vó, a quem dedico essa dissertação, por todo o esforço e apoio que me dão sempre. Sem vocês o fardo seria muito mais árduo. Como sempre falo, espero poder fazer aos meus filhos pelo menos uma parte de tudo o que vocês fazem por mim.

Aos meus tios Célia e Ernesto por depositarem sua confiança em mim desde sempre e por todo o apoio.

Aos familiares (tios e primos) que sempre torceram e rezaram por mim ao longo de minha vida.

Aos amigos sorocabanos, os quais a amizade permaneceu firme e forte mesmo com o tempo e a distância. Sempre me compreenderam e me encorajaram para seguir meus sonhos e objetivos.

Aos amigos da faculdade, que mesmo com o distanciamento natural sempre fazem questão de me apoiar e incentivar.

Aos amigos e colegas de longa e curta data que de alguma maneira participaram dessa etapa.

Ao pessoal dos laboratórios da Unisanta, Unifesp, Unesp e Ipen (estagiários, alunos, professores, biólogos, faxineiros, etc) por todo o apoio durante os experimentos realizados, coletas e vida fora do laboratório. Como toda família, temos nossos momentos bons e ruins, mas a melhor lição aprendida é que sempre nos reunimos quando precisamos nos apoiar.

Ao Pedro Sérgio que me forneceu os mexilhões e aos motoristas do Ipen que pacientemente me auxiliavam como podiam durante as coletas.

Ao orientador Dr. José Roberto Rogero e Msc. Sizue Ota Rogero pelo acolhimento desde o início, pela ajuda e compreensão. Muito obrigada por tudo e serei eternamente grata pelas lições acadêmicas e cotidianas aprendidas com vocês ao longo desse caminho.

Ao professor Dr. Aldo Ramos, a quem carinhosamente chamo de tio, por seus ensinamentos acadêmicos e cotidianos. Obrigada por ser um exemplo a ser seguido e ser uma pessoa maravilhosa. Sou muito feliz e grata de ter seu convívio.

Ao professor Dr. Camilo Dias Seabra Pereira, que desde a graduação pacientemente me auxiliou nas dúvidas e momentos em que achava que nada daria certo. A tranquilidade com que você conduz as situações é essencial pra nos transmitir segurança e confiança.

Aos professores Dr. Augusto César, Dr. Rodrigo Choueri, Msc. Fernando Cortez e Msc. Fabio Hermes, por todos os ensinamentos desde a graduação e época de estágio, bem como na ajuda ao longo do período de mestrado.

A todos que diretamente ou não contribuíram para a realização desse projeto.

Ao CNPq pela bolsa de estudos ofertada que possibilitou a concretização de etapas importantes desse projeto.

"Há apenas uma forma de evitar as críticas: não diga nada, não seja nada, não faça nada."
(Aristóteles)

AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE AMOXICILINA E CLAVULANATO DE POTÁSSIO EM MEXILHÕES *Perna perna*.

Amanda de Souza

RESUMO

Compostos farmacêuticos são identificados em matrizes ambientais em ordens de grandeza de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$. Dentre os fármacos, os antibióticos têm recebido atenção especial devido aos problemas que podem causar à biota aquática. O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade de Amoxicilina e Clavulanato de Potássio isolados e em associação para mexilhões *Perna perna* utilizando o ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro, que avalia a estabilidade da membrana lisossômica de hemócitos dos organismos teste. A Amoxicilina causou citotoxicidade aos mexilhões nas concentrações de: CEO: 1 ng.L^{-1} , $\text{CI}_{25-24\text{h}}$: $0,44 \text{ ng.L}^{-1}$, $\text{CI}_{25-48\text{h}}$: $1,19 \text{ ng.L}^{-1}$ e $\text{CI}_{25-72\text{h}}$: $0,85 \text{ ng.L}^{-1}$, o Clavulanato de Potássio foi citotóxico nas concentrações de: 10 ng.L^{-1} em 24h e 50 ng.L^{-1} e 100 ng.L^{-1} em 48h e 72h. Os valores de concentração inibitória foram de $\text{CI}_{25-24\text{h}}$: $3,11 \text{ ng.L}^{-1}$, $\text{CI}_{25-48\text{h}}$: $3,45 \text{ ng.L}^{-1}$ e $\text{CI}_{25-72\text{h}}$: $3,43 \text{ ng.L}^{-1}$. No ensaio realizado com a associação dos fármacos todas as concentrações foram citotóxicas aos mexilhões em 48h e em 72h apenas 40 ng.L^{-1} de Amoxicilina + 10 ng.L^{-1} de Clavulanato de Potássio e 200 ng.L^{-1} de Amoxicilina + 50 ng.L^{-1} de Clavulanato de Potássio. As concentrações inibitórias foram: $\text{CI}_{25-48\text{h}}$: $1,67 \text{ ng.L}^{-1}$ e $\text{CI}_{25-72\text{h}}$: $1,36 \text{ ng.L}^{-1}$ a partir dos dados de Amoxicilina e $\text{CI}_{25-48\text{h}}$: $0,42 \text{ ng.L}^{-1}$ e $\text{CI}_{25-72\text{h}}$: $0,34 \text{ ng.L}^{-1}$ a partir dos dados de Clavulanato de Potássio.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Mexilhões *Perna perna*; Vermelho Neutro; Amoxicilina; Clavulanato de potássio.

CYTOTOXICAL EVALUTION OF AMOXICILLIN AND POTASSIUM CLAVULANATE TO *Perna perna* MUSSEL.

Amanda de Souza

ABSTRACT

Pharmaceutical compounds are identified in environmental matrices in orders of magnitude from ng.L^{-1} to $\mu\text{g.L}^{-1}$. Among the drugs, antibiotics have received special attention due to the problems that can cause to aquatic biota. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of Amoxicillin and Potassium Clavulanate in isolated and associated forms to marine mussels *Perna perna* through the neutral red retention time assay which assesses the stability of hemocytes lisosomal membrane of test organisms. Amoxicillin caused cytotoxicity to the mussels in concentrations of: OEC: 1 ng.L^{-1} , $\text{IC}_{25-24\text{h}}$: 0.44 ng.L^{-1} , $\text{IC}_{25-48\text{h}}$: 1.19 ng.L^{-1} and $\text{IC}_{25-72\text{h}}$: 0.85 ng.L^{-1} , Potassium Clavulanate was cytotoxic at concentrations of 10 ng.L^{-1} in 24h; 50 ng.L^{-1} and 100 ng.L^{-1} at 48h and 72h. The inhibitory concentration values were $\text{IC}_{25-24\text{h}}$: 3.11 ng.L^{-1} , $\text{IC}_{25-48\text{h}}$: 3.45 ng.L^{-1} and $\text{IC}_{25-72\text{h}}$: 3.43 ng.L^{-1} . The test conducted with the combination of drugs all concentrations were cytotoxic to mussels in 48h and 72h only 40 ng.L^{-1} Amoxicillin + 10 ng.L^{-1} and Potassium Clavulanate 200 ng.L^{-1} Amoxicillin + 50 ng.L^{-1} Potassium Clavulanate. The inhibitory concentrations were $\text{IC}_{25-48\text{h}}$: 1.67 ng.L^{-1} and $\text{IC}_{25-72\text{h}}$: 1.36 ng.L^{-1} from the data of Amoxicillin and $\text{IC}_{25-48\text{h}}$: 0.42 ng.L^{-1} and $\text{IC}_{25-72\text{h}}$: 0.34 ng.L^{-1} from the Potassium Clavulanate data.

Keywords: Cytotoxicity; *Perna perna* mussels; Neutral Red; Amoxicillin; Potassium Clavulanate.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Ecotoxicologia aquática.....	4
3.2. Mexilhões.....	10
3.3. Poluição por fármacos	11
3.4. Amoxicilina.....	20
3.5. Clavulanato de potássio	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1. Organismo teste.....	23
4.2. Obtenção e manutenção dos organismos	24
4.3. Coleta de água.....	25
4.4. Substâncias teste.....	26
4.4.1. Amoxicilina	27
4.4.2. Clavulanato de potássio	28
4.5. Preparo das soluções teste.....	29
4.6. Concentrações teste	29
4.7. Ensaio de citotoxicidade	29
4.7.1. Preparo de lâminas	31
4.7.2. Preparo de solução fisiológica para diluição da hemolinfa	32
4.7.3. Preparo da solução de Vermelho Neutro (VN).....	32
4.7.4. Extração e manuseio de hemolinfa	32
4.7.5. Observação e critério de avaliação de células.	34
4.8. Avaliação estatística	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Ensaio preliminares.....	37
5.1.1. Primeiro ensaio com Amoxicilina.....	37

5.1.2. Segundo ensaio com Amoxicilina.....	40
5.1.3. Terceiro ensaio com Amoxicilina	41
5.2. Ensaio com Clavulanato de potássio	42
5.3. Ensaio com associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio	43
5.4. Ensaio definitivos	45
5.4.1. Ensaio de citotoxicidade de Amoxicilina	45
5.4.2. Ensaio de citotoxicidade com Clavulanato de potássio.....	48
5.4.3. Ensaio de citotoxicidade com a associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio.	51
5.5. Adaptação do cálculo de risco ambiental de fármacos de acordo com o protocolo desenvolvido por EMEA (2006)	55
5.5.1. Avaliação de risco de Clavulanato de potássio.....	55
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Concentrações de compostos antropogênicos, fármacos e drogas ilícitas encontrados em matrizes ambientais aquáticas no Brasil.....	15
TABELA 2 - Propriedades físico-químicas de Amoxicilina.....	28
TABELA 3 - Propriedades físico-químicas de Clavulanato de potássio.	28
TABELA 4 - Concentrações teste dos fármacos Amoxicilina e Clavulanato de potássio..	29
TABELA 5 - Parâmetros e condições do ensaio de citotoxicidade	30
TABELA 6 - Critério de avaliação dos hemócitos de mexilhões	34
TABELA 7 - Dados de média do tempo de retenção, desvio padrão e coeficiente de variação de concentrações de exposição dos mexilhões à Amoxicilina.....	37
TABELA 8 - Dados de média do tempo de retenção, desvio padrão e coeficiente de variação de concentrações de exposição dos mexilhões à Amoxicilina.....	40
TABELA 9 - Dados de média do tempo de retenção, desvio padrão e coeficiente de variação de concentrações de exposição dos mexilhões à Amoxicilina.....	41
TABELA 10 - Dados de média do tempo de retenção, desvio padrão e coeficiente de variação de concentrações de exposição dos mexilhões ao Clavulanato de potássio.	43
TABELA 11 - Dados de média do tempo de retenção, desvio padrão e coeficiente de variação de concentrações de exposição dos mexilhões a associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio.....	44
TABELA 12 - Dados de CEO, CENO e CI ₂₅ nos períodos de exposição dos organismos à Amoxicilina.....	45
TABELA 13 - Dados de CEO, CENO e CI ₂₅ nos períodos de exposição dos organismos ao Clavulanato de potássio.....	48
TABELA 14 - Dados de CEO, CENO e CI ₂₅ nos períodos de exposição dos organismos à Amoxicilina e Clavulanato de potássio, com resultados a partir dos efeitos de Amoxicilina.	51
TABELA 15 - Dados de CEO, CENO e CI ₂₅ nos períodos de exposição à Amoxicilina e Clavulanato de potássio, com resultados a partir dos efeitos de Clavulanato de potássio. .	51

TABELA 16 - Parâmetros e valores utilizados para cálculo de quociente de risco ambiental de Clavulanato de potássio.	55
TABELA 17 - Parâmetros e valores utilizados para cálculo de quociente de risco ambiental de Amoxicilina e Clavulanato de potássio em associação, a partir dos resultados de Amoxicilina.....	56
TABELA 18 - Parâmetros e valores utilizados para cálculo de quociente de risco ambiental de Amoxicilina e Clavulanato de potássio em associação, a partir dos resultados de Clavulanato de potássio.	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Relação de níveis de organização biológica e respostas a poluentes (Nascimento <i>et al.</i> , 2002 apud. Cortez, 2011).....	7
FIGURA 2 - Mexilhão <i>Perna perna</i> com valvas fechadas e com as valvas abertas, respectivamente.....	10
FIGURA 3 - Etapas do processo de tratamento de água (SABESP, 2016).....	12
FIGURA 4 - Etapas do tratamento de esgoto por lodos ativados na fase líquida (SABESP, 2015).....	13
FIGURA 5 - Etapas do tratamento de esgoto por lodos ativados na fase sólida (SABESP, 2015).....	14
FIGURA 6 - Mecanismos de filtração de alimentos de <i>Perna perna</i>	24
FIGURA 7 - Tanque de água marinha para manutenção dos mexilhões.	25
FIGURA 8 - Imagem aérea das praias de São Sebastião (CETESB, 2013).....	26
FIGURA 9 - Praia de Toque Toque Grande, São Sebastião – SP.	26
FIGURA 10 - Estrutura química de Amoxicilina.	27
FIGURA 11 - Estrutura química do Clavulanato de potássio.	28
FIGURA 12 - Frascos teste utilizados para expor os organismos ao fármaco.	31
FIGURA 13 - Fluxograma das etapas realizadas no ensaio	31
FIGURA 14 - Tubos de microcentrífuga para acondicionamento de solução fisiológica e hemolinfa.	33
FIGURA 15 - Células saudáveis (+) e células stressadas (-), respectivamente.....	34
FIGURA 16 - Fluxograma com as etapas para cálculo de CEO, CENO e CI ₂₅ . (USEPA, 2002).....	36
FIGURA 17 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Amoxicilina para o mexilhão <i>Perna perna</i> após 24h de ensaio.	38

FIGURA 18 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Amoxicilina para o mexilhão <i>Perna perna</i> após 48h de ensaio.	39
FIGURA 19 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Amoxicilina para o mexilhão <i>Perna perna</i> após 72h de ensaio.	39
FIGURA 20 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Amoxicilina para o mexilhão <i>Perna perna</i> em 24h, 48h e 72h de ensaio.	41
FIGURA 21 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Amoxicilina para o mexilhão <i>Perna perna</i> após 24h e 48h de ensaio.	42
FIGURA 22 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Clavulanato de potássio para o mexilhão <i>Perna perna</i> após 24h de ensaio.	43
FIGURA 23 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações da associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio para o mexilhão <i>Perna perna</i> após 24h e 48h de ensaio.	44
FIGURA 24 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Amoxicilina no período de exposição de 24h.	46
FIGURA 25 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Amoxicilina no período de exposição de 48h.	46
FIGURA 26 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Amoxicilina no período de exposição de 72h.	47
FIGURA 27 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Clavulanato de potássio no período de exposição de 24h.	49
FIGURA 28 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Clavulanato de potássio no período de exposição de 48h.	49
FIGURA 29 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Clavulanato de potássio no período de exposição de 72h.	50
FIGURA 30 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração da associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio no período de exposição de 48h.	52
FIGURA 31 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração da associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio no período de exposição de 72h.	52

LISTA DE SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Amox: Amoxicilina

Clav: Clavulanato de potássio

CEO: Concentração de efeito observado

CENO: Concentração de efeito não observado

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CI₂₅: Concentração inibitória a 25% dos organismos

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

Conc: Concentração

C.V.: Coeficiente de variação

D.V.: Desvio padrão

EMA: European Medicines Agency (Agência Europeia de medicamentos)

KPC: *Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*

MEC: Measured effect concentration (Concentração de efeito mensurado)

PCBs: Polychlorinated biphenyl (Bifenilos Policlorados)

PEC: Predicted Environmental Concentration

pH: Potencial hidrogeniônico

PNEC: Predicted No Effect Concentration

QR: Quociente de risco

RDC: Resolução da diretoria colegiada

SABESP: Companhia de Saneamento básico do estado de São Paulo

TR: Tempo de retenção

TRCVN: Tempo de retenção do corante vermelho neutro

1. INTRODUÇÃO

A água é um bem essencial para todos os seres vivos, mas a crescente expansão populacional e o incentivo ao consumo aumentam as taxas de utilização desse recurso para manter a demanda exigida pela sociedade. Os problemas como escassez de água bem como a poluição são constantemente noticiados, mas as reais providências para minimizar os impactos são poucas ou ineficazes. A grande diversidade de compostos identificados e quantificados no ambiente denota essa situação.

Compostos farmacêuticos são utilizados para cumprir um propósito terapêutico no combate ou prevenção de doenças e patógenos nocivos. São empregados na saúde humana, veterinária, aquicultura e agricultura, sendo eliminados por meio de excretas de seres humanos e animais e lixiviação do solo em agricultura (Kümmerer 2009; Regitano & Leal, 2010). Associado também ao descarte incorreto de medicamentos pela população, os compostos não são retirados efetivamente na aplicação de tratamentos nas estações de tratamento de água e esgoto (ETEs), permanecendo nos efluentes que são despejados no mar (Cooper *et al.*, 2008).

Os fármacos permanecem bioativos no meio ambiente mesmo presentes em baixas concentrações (ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$) e a constante entrada de material proveniente de efluentes confere uma característica de persistência à eles (Bila & Dezotti, 2003).

Dentre a grande diversidade existente nessa classe de contaminantes os antibióticos e seus inibidores têm recebido atenção especial uma vez que baixas concentrações podem causar resistência bacteriana (Zou *et al.*, 2011) e alterações em algas que podem ocasionar consequências à cadeia trófica (Lützhof *et al.*, 1999; Andreozzi *et al.*, 2005)

A Amoxicilina e Ácido clavulânico na forma de Clavulanato de potássio são amplamente utilizados ao redor do mundo por serem uma das mais eficazes e bem sucedidas associação medicamentosa conhecida. A Amoxicilina age na interrupção da síntese de peptídeoglicano que compõe a parede celular bacteriana e o Ácido Clavulânico interrompe a ação enzimática de betalactamase produzida por bactérias resistentes aos antibióticos betalactâmicos, permitindo a eficácia no tratamento (Oliveira *et al.*, 2009; Le Minh *et al.*, 2010; Ozcengiz & Demain, 2013).

Para determinar os reais efeitos sobre a biota, os estudos ecotoxicológicos são empregados como forma de avaliação dos efeitos nas taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário, danos subcelulares, entre outros (Zagatto & Bertoletti, 2008). O uso de biomarcadores nesses estudos permite a acurácia dos dados obtidos já que são avaliados níveis de organização biológicas mais sensíveis e permitem a determinação dos primeiros sinais de efeito sem que haja o comprometimento dos organismos e ecossistemas servindo como alertas (Pereira *et al.*, 2013). Nesse contexto, o ensaio de citotoxicidade que avalia a estabilidade da membrana lisossômica pelo tempo de retenção do corante vermelho neutro é importante por sua facilidade de aplicação em ensaios biológicos, por não ser destrutiva sendo relativamente de baixo custo econômico comparado à outras técnicas de análises (Pereira *et al.*, 2011; Lowe *et al.*, 1995).

Os organismos não alvos, denominação dada àqueles que sofrem interferência dos fármacos de maneira não intencional, estão constantemente recebendo o aporte da carga orgânica. Diversos danos são ocasionados como disfunção no sistema endócrino, mudança nos hábitos, etapas no desenvolvimento, bioacumulação: acúmulo de xenobiótico, etc (Mazur, 2015). Nesse cenário temos o mexilhão *Perna perna*, amplamente utilizado em estudos por seu hábito sésil, filtração de grandes quantidades de água, bioacumulação de compostos em tecidos e órgãos. Os mexilhões têm grande importância na cadeia alimentar além de importância econômica visto que é comercializado como alimento e as valvas são utilizadas em adornos, trazendo subsistência às comunidades ribeirinhas (Pereira, 2008).

Com a ausência de políticas que regularizem as quantidades seguras de descarte dos fármacos, torna-se eminente a necessidade de estudos que contemplem a caracterização ecotoxicológica dos compostos, em especial os antibióticos para que os dados provenientes da literatura auxiliem em futuras tomadas de decisões e os impactos à biota possam ser minimizados.

Diante desse contexto, esse estudo propõe mensurar os efeitos tóxicos de Amoxicilina e Clavulanato de potássio para assegurar a qualidade de vida dos seres vivos e do ambiente aquático como um todo pela avaliação da citotoxicidade de Amoxicilina e Clavulanato de potássio individualmente e associados em mexilhões *Perna perna*.

2. OBJETIVO

O presente estudo avaliou a citotoxicidade dos fármacos Amoxicilina e Clavulanato de potássio isolados e em associação, utilizando o ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro para a avaliação da estabilidade da membrana lisossomal em hemócitos de mexilhões *Perna perna*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Ecotoxicologia aquática

Com o advento da tecnologia após a Revolução Industrial foi notória a busca e captação de matéria prima que pudesse suprir a constante e crescente demanda mercantil da época. No entanto, com a extração de recursos, aumentou-se a degradação e poluição que não eram vistos como problema para a população, visto que os danos ainda não eram perceptíveis. Além da revolução, as guerras promoveram a criação de tecnologias e compostos químicos para garantir a superioridade de determinado país perante os outros.

Gradativamente os efeitos adversos causados pela poluição e compostos começaram a aparecer, dentre os quais, podemos citar: o caso das mariposas *Biston betularia* em Manchester (Inglaterra). Mariposas de coloração branca passaram a ser mais predadas por aves após a morte dos líquens que recobriam os troncos de árvores devido à fuligem das fábricas, enquanto que as mariposas escuras começaram a crescer exponencialmente, ocasionando uma inversão da situação (Grant & Wiseman, 2002). A utilização de pesticidas, que gerou problemas para o meio ambiente e saúde humana, por serem potencialmente tóxicos contendo substâncias químicas, como o caso das dioxinas presentes no “agente laranja”. Esse pesticida era pulverizado em grandes áreas do Vietnã para desfolhar árvores e permitir que os americanos os visualizassem com mais facilidade (DOW, 2015). Problemas de carcinogênese e mutações ainda são associados ao despejo desse composto, uma vez que possuem alta persistência no meio ambiente (WHO, 2015). As dioxinas também foram relatadas pela bióloga Rachel Carson em seu livro Primavera Silenciosa, livro esse que despertou na população o alerta para os potenciais riscos dos compostos sintéticos.

No ano de 1972, em Estocolmo ocorreu a primeira iniciativa mundial para minimizar os impactos causados pela poluição. Nesta convenção de Estocolmo foi determinada que as substâncias classificadas como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) deveriam ser controladas desde o processo de produção até a disposição final dos mesmos. Os POPs definidos nessa convenção foram: Aldrin, Clordano, DDT, Dieldrin, Endrin, Heptacloro, Hexaclorobenzeno (HCB), Mirex (agrotóxicos), Toxafeno, Bifenilas Policloradas (PCBs) (produtos industriais), Dioxina e Furanos (formados sem intenção na presença de cloro durante a combustão de matéria orgânica) (Brasil, 2015a). Na quarta conferência, realizada no ano de 2009, nove novos POPs foram inclusos à lista:

Clordecone, Hexabromobifenil, Alfa hexaclorociclohexano, Beta hexaclorociclo hexano, Lidano, Éter tetrabromodifenílico e Éter pentabromodifenílico, Éter hexabromodifenílico e Éter heptabromodifenílico, Ácido perfluorooctano (PFOs) e seus sais, e fluoreto de Perfluorooctano sulfonila e Pentaclorobenzeno. (Brasil, 2015b).

Alguns anos antes, na mesma cidade, ocorreu a reunião do Committee of the Internacional Council of Scientific Unions (ICSU), em que o toxicologista francês René Truhaut sugeriu pela primeira vez o termo “Ecotoxicologia”. A ecotoxicologia surgiu pela junção das ciências de toxicologia clássica e ecologia, para complementar uma à outra. Para consolidar essa nova ciência, foi organizado um novo comitê denominado “Comitê Científico do ICSU sobre Problemas Ambientais” (SCOPE), que definiu em 1976 a ecotoxicologia como ciência que estuda os efeitos das interações de substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos e o meio em que vivem. (Zagatto & Bertoletti, 2008)

Ao longo dos anos recebeu outras definições complementares à inicial, porém com o mesmo princípio. No Brasil, os primeiros trabalhos e iniciativas aconteceram no início da década de 70 através de Rocha e colaboradores (1975) no estudo sobre efluente industrial no rio Atibaia e da CETESB na participação de programas para padronização de testes de toxicidade. Contudo, as primeiras normas de testes ecotoxicológicos começaram a ser publicadas a partir de 1987 pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). (Zagatto & Bertoletti, 2008)

Atualmente, muitas empresas, laboratórios e universidades utilizam os ensaios ecotoxicológicos para compreender os efeitos adversos que vêm ocorrendo no ambiente e dessa forma poder contribuir com informações relevantes para medidas mitigatórias. As legislações federais CONAMA 357/2005 e sua complementação CONAMA 430/2011 já contemplam o uso de ensaios ecotoxicológicos. Anualmente é realizado congresso de Ecotoxicologia para a divulgação científica de resultados dos estudos ecotoxicológicos, de modo a garantir a inovação dos dados e metodologia pertinente (SETAC, 2015).

Os testes em geral contemplam ensaios de efeito agudo no qual é possível observar efeitos deletérios e mortalidade em um curto período de tempo e efeito crônico em que os efeitos da substância são observados em parte do ciclo de vida de um organismo ou seus descendentes por um tempo maior. Nos ensaios ecotoxicológicos, os organismos bioindicadores padronizados são utilizados para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. Devem ser escolhidos organismos sensíveis biológica e economicamente

representativos para a matriz a ser avaliada. No entanto as pesquisas têm selecionado animais que configuram a realidade dos estudos e trazem novas possibilidades de organismos teste que possam ser contemplados futuramente nas normas técnicas. (Zagatto & Bertoletti, 2008; Nascimento *et al.*, 2002).

Para avaliação dos resultados devem ser utilizadas análises estatísticas com expressão de dados coerente com o analisado tal como: concentração letal (CL), concentração efetiva (CE) ou concentração inibitória (CI) a 50% dos organismos acompanhado do tempo de exposição do organismo à amostra. Esses resultados são valores de concentrações hipotéticas calculadas a partir dos dados nominais (utilizadas no teste) fornecido ao programa estatístico. Os resultados podem ser expressos também em concentração de efeito observado (CEO) que é a menor concentração teste capaz de causar efeito adverso e concentração de efeito não observado (CENO) concentração onde não é observado efeito ao organismo, sempre comparadas com o controle. (Mastroti, 2002).

A Ecotoxicologia pode ser empregada desde os níveis mais básicos de organização biológica, como a expressão de uma molécula até os níveis mais complexos, como ecossistemas. Quanto maior o nível de organização biológica avaliada (indivíduo, comunidade ou ecossistema), maior será o tempo necessário para verificar a resposta ao contaminante uma vez que as variáveis (idade, época reprodutiva e hábitos de vida) podem dificultar a relação entre efeito e objeto de estudo. Entretanto, as respostas em níveis mais simples (moléculas, enzimas, células e tecidos) podem ser ferramentas preventivas desde que estejam corretamente associados aos efeitos causados para os níveis superiores, já que quando ocorre uma perturbação nas condições fisiológicas ideais, o efeito pode ser diretamente correlacionado ao contaminante (Mazur, 2015). A FIG. 1 mostra a relação de níveis de organização biológica e respostas a poluentes.

FIGURA 1 - Relação de níveis de organização biológica e respostas a poluentes (Nascimento *et al.*, 2002 apud. Cortez, 2011).

Para auxiliar nos primeiros alertas dos efeitos de um xenobiótico e contribuir na prevenção de danos aos seres vivos e ao ambiente, utiliza-se os biomarcadores que se definem como: alterações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou variações comportamentais que podem ser medidas em amostras de tecidos ou fluídos corpóreos (Nascimento *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2013).

São classificados em: biomarcadores de exposição, efeito, suscetibilidade e fisiológicos de acordo com a especificidade, mecanismo de ação-resposta e aplicação. Os biomarcadores de exposição dão resultados de estimativa de dose interna ou biodisponibilidade de um xenobiótico específico em que se associa a atuação e o efeito diretamente no organismo, como a indução de metalotioneínas após exposição a metais. Em biomarcadores de efeito não há especificidade do agente estressor, no entanto avalia-se desencadeamento de ações como mecanismo de defesa no organismo (alterações

moleculares-bioquímicos como enzimas que respondem aos processos de peroxidação lipídica e estresse oxidativo) para prevenção de danos que pode ser reversível se não houver exposição contínua ao estressor. Biomarcadores de suscetibilidade indicam processos com interferentes que causam variação nas respostas entre o período de exposição ao surgimento do efeito. As condições naturais de um grupo de organismos (sexo, jejum, tamanho, período de desenvolvimento) podem influenciar nos resultados de efeito à exposição de contaminantes, uma vez que, diferentes grupos da mesma espécie podem estar mais saudáveis ou mais fragilizados no momento da exposição. No entanto, através de avaliação de conjunto de análises fisiológicas pode-se analisar a habilidade de adaptação ou fragilidade ao composto. Os biomarcadores fisiológicos (e processos bioquímicos-celulares envolvidos) respondem às alterações energéticas, endócrinas e estádios de crescimento e maturação do organismo. Nas análises pode-se observar diminuição de defesas antioxidantes celulares, diminuição de processos enzimáticos, inibição de processos regeneradores, desestabilização de membranas lisossômicas e síntese de proteínas de estresse (Nascimento *et al*, 2008).

Algumas precauções são necessárias na escolha para a utilização do biomarcador, tais quais: facilidade de medição e análise, como responde à dose ou tempo de exposição, sua sensibilidade e relevância biológica (Pereira *et al.*, 2013). O uso de biomarcadores vem se tornando amplo devido suas aplicações, nas análises genotóxicas como danos em DNA (quebras de fita), ocorrência de micronúcleo, danos celulares pela estabilidade da membrana lisossômica e dosagem de atividades enzimáticas responsáveis pelos mecanismos de defesa e controle fisiológicos. (Pereira *et al.*, 2011).

Com as evidências de danos primariamente a níveis bioquímicos, moleculares e celulares, têm se aplicado o ensaio de estabilidade da membrana lisossômica para prever os danos de um xenobiótico no nível celular (Lowe & Pipe, 1994).

Os estudos com vermelho neutro para avaliar a estabilidade da membrana lisossomal iniciaram-se no Reino Unido no início da década de 90 através de Lowe e colaboradores. As pesquisas foram realizadas inicialmente com células digestivas de moluscos expostos ao fluoranteno por sete dias, nos quais utilizaram o corante vermelho neutro para avaliar o tempo de integridade da membrana lisossomal de organismos expostos e não expostos ao contaminante. Posteriormente avaliaram a resposta em células sanguíneas e digestivas do bivalve *Mytilus edulis* para observarem se havia diferenciação

nos resultados, concluindo que é possível avaliar a depleção da integridade da membrana lisossômica em qualquer tipo de célula.

O lisossomo é a organela responsável pelo encapsulamento de agentes estranhos à célula mantendo-os em seu interior. Duve *et al.* (1974) citam como ocorrem esses mecanismos:

- a) Endocitose: é a principal rota. O composto será encapsulado formando vacúolos dentro da célula que se fundem ao lisossomo;
- b) Permeação: difusão do composto na membrana celular e captação pelo lisossomo;

A toxicidade da substância altera a permeabilidade da membrana lisossomal e por consequência todo o conteúdo absorvido é extravasado ao citosol das células (Lowe *et al.*, 1995). A alteração da permeabilidade ocorre por uma ineficiência da bomba de próton dependente de ATPase ocasionando uma diminuição do pH interno do lisossomo que é naturalmente ácido deixando-o semelhante ao pH externo. Sem a diferenciação do gradiente de pH entre os dois meios o material retido flui para o meio externo lesando a célula (Lowe *et al.*, 1995).

A viabilidade de aplicação da metodologia e obtenção de respostas faz com o que o ensaio seja utilizado atualmente para diferentes invertebrados. Em mexilhões *Perna perna* estudou-se os efeitos após a exposição aos fármacos Amoxicilina, Diclofenaco, Ibuprofeno, Omeprazol e Paracetamol (Bento, 2015; Fontes, 2015; Gaspar, 2015; Mathias, 2011; Mazur, 2015); aos produtos de cuidados pessoais Triclosan e DEET (Cortez *et al.*, 2012; Martini, 2011) e os efeitos de hipóxia e reoxigenação de organismos expostos à água do mar sem interferentes e ao biodiesel (Nogueira, 2013); em ostras a metodologia foi aplicada para verificar a qualidade ambiental de áreas estuarinas e costeiras do quais os organismos avaliados eram provenientes de regiões impactadas e uma região controle (Almeida, 2013) e em caranguejos uçá de áreas de manguezais estudou-se a integridade da membrana lisossômica após exposição a metais (Duarte, 2014). Sendo assim, escolheu-se o ensaio do tempo de retenção corante vermelho neutro para aplicação nas avaliações de efeitos dos fármacos no presente estudo.

3.2. Mexilhões

Os mexilhões são pertencentes ao Filo Mollusca e Classe Bivalvia. Apresentam hábito de vida planctônica na fase larval e sésil na vida adulta. A alimentação ocorre por meio de filtração de partículas, o que torna a brânquia bem adaptada ao hábito alimentar dessa classe. Os organismos são dióicos (indivíduo macho e fêmea) com reprodução por meio da liberação de gametas na coluna d'água, desenvolvimento em estádios de fases larvais e posterior fixação em substratos consolidados como os costões rochosos. (Hickmann *et al.*, 2004).

As características sedentárias desse grupo de organismos, posição na cadeia alimentar, importância econômica e alimentar para subsídio de comunidades ribeirinhas, a acumulação de xenobióticos em seus tecidos e facilidade de obtenção e manutenção para estudos permite o uso dos mexilhões como bons bioindicadores de qualidade ambiental. (Souza *et al.*, 2011)

Dentre as diversas espécies da Classe Bivalvia apresenta-se a espécie *Perna perna* (FIG. 2) da família Mytilidae que é amplamente distribuída na região costeira brasileira, formando densos bancos naturais em áreas com alta incidência de ondas (Zaroni, 2002).

FIGURA 2 - Mexilhão *Perna perna* com valvas fechadas e com as valvas abertas, respectivamente.

Há estudos de monitoramento ambiental para diversos tipos de contaminantes utilizando o *Perna perna* como bioindicador.

Zaroni (2002) elaborou protocolo para ensaios de efeito agudo e crônico com larvas de *Perna perna*, podendo ser expostos em qualquer tipo de contaminante a fim de avaliar os danos aos embriões. Souza *et al.* (2011) estudaram a qualidade de diferentes locais na Baía do Espírito Santo: os organismos foram retirados das áreas de estudos e o tempo de retenção do corante vermelho neutro foi empregado para observar os impactos ambientais da região. Yoshimine & Carreira (2012) analisaram tecidos dos bivalves por meio de cromatografia gasosa para determinação de contaminação em mariculturas (fazendas de cultivo) por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Nogueira (2013) estudou os efeitos da hipóxia e reoxigenação na fisiologia do organismo e os danos causados após a exposição ao biodiesel.

O mexilhão *Perna perna* mostra-se importante e efetivo na obtenção de respostas ambientais em nosso país, e suas características de organismo bioindicador permite avanços científicos por meio de pesquisas nos auxiliando futuramente em tomadas de decisões para o ambiente marinho.

3.3. Poluição por fármacos

Dentre os diversos problemas envolvendo o meio ambiente, a poluição aquática vem recebendo maior atenção, uma vez que a água é indispensável para manutenção dos seres vivos.

No último ano alguns estados brasileiros entraram em crise hídrica devido à escassez de chuvas associada à má administração do recurso. Dentre os mais afetados, o estado de São Paulo e em especial a capital sofreram com a falta de água nos reservatórios de abastecimento água à população.

A cidade de São Paulo é uma das maiores metrópoles brasileiras e abriga 11.253.503 de pessoas (IBGE, 2010). Com o crescimento populacional elevado e questões socioeconômicas, diversas famílias construíram casas às margens das represas de abastecimento. Essas moradias possuem baixa infraestrutura de saneamento, não havendo redes de esgoto legais e que passam por tratamento, sendo assim despejados diretamente nas águas represadas (Otomo, 2015). Além das redes ilícitas, há alta produção de redes de esgotos domésticas, industriais, hospitalares, agrícolas, etc. Para diminuição da carga

orgânica, a SABESP realiza tratamento de água e esgoto. O tratamento de água consiste em etapas de desinfecção com cloro, adequação dos parâmetros para consumo com adição de produtos químicos e distribuição para a população, e o tratamento de esgoto é realizado pelo método de lodos ativados que consiste de uma fase líquida e outra sólida (SABESP, 2015; 2016). A FIG. 3 apresenta as etapas dos processos de tratamento de água e as FIG. 4 e 5 apresentam as etapas dos processos de tratamento de esgoto por lodos ativados na fase líquida e fase sólida, respectivamente.

FIGURA 3 - Etapas do processo de tratamento de água (SABESP, 2016)

Para o tratamento, as águas são captadas da represa (1) e bombeadas para a estação de tratamento (2). O processo é iniciado com a adição primária de cloro para retirada de matéria orgânica e metais, adição de sais (Cal ou Soda) para ajuste de pH que auxiliará nas etapas seguintes e adição de coagulantes como Sulfato de alumínio ou cloreto férrico. Após a inserção desses compostos, é realizado forte agitação a fim de desestabilizar as partículas de sujeira para que possam se agregar (3). Na etapa 4 inicia-se o

processo de floculação em que Sulfato de alumínio é colocado na água e após a aglutinação de sujeira, forma-se flocos que são removidos com mais facilidade, então esses flocos passam por um decantador e se depositam no fundo (5). Para finalização da etapa de clarificação (consistente das etapas 3, 4 e 5), a água passa por camadas filtrantes para retirar os flocos menores que não foram retidos na decantação. A seguir, é adicionado novamente Cloro para desinfecção e retirada de microorganismos e inserido Flúor para prevenção de cáries (7). As águas são armazenadas em reservatórios (8) e então encaminhadas para distribuição ao público por meio de adutoras (9) que chegam as redes de distribuição e à população (10 e 11).

FIGURA 4 - Etapas do tratamento de esgoto por lodos ativados na fase líquida (SABESP, 2015).

Na fase líquida, o efluente chega à estação de tratamento através das canalizações de redes coletoras do município (1). Na rede de esgotos, como início do tratamento, todos os resíduos não domésticos são retirados como tampas, papéis, etc (2 e

3). Após essa etapa, inicia-se o processo de remoção de areia (4) e decantação de partículas mais pesadas no decantador primário (5). Para diminuir a carga poluidora, o esgoto é levado aos tanques de aeração. Nesses tanques há grande fornecimento de oxigênio propiciando o aumento dos microrganismos presentes no efluente. Os microrganismos se alimentam do material orgânico e formam o lodo (6). Para finalizar esse processo, o efluente passa pelo decantador secundário. Os resíduos sólidos ficam no fundo e a parte líquida é lançada em rios (7 e 8).

FIGURA 5 - Etapas do tratamento de esgoto por lodos ativados na fase sólida (SABESP, 2015).

Na fase sólida o efluente chega à estação de tratamento de esgoto e ocorre a separação de líquidos e sólidos parciais (1 e 2). Nas etapas seguintes há a entrada do lodo secundário (3) e a concentração do lodo por meio de retirada de parte da água (4). O lodo chega aos flotadores para que a água seja separada do sólido (5) e após a separação são levados aos digestores para degradação da matéria orgânica por meio dos microrganismos (6). Após a degradação aeróbia, o lodo passa por filtros prensa para ser desidratado e ficar

com apenas 40% de sólidos (7). O lodo resultante desses processos é levado por meio de esteira em locais para armazenamento até a disposição em aterros sanitários (8).

Contudo, o tratamento de esgoto aplicado é ineficaz na remoção de diversos compostos, dentre eles, os produtos de cuidados pessoais e fármacos (Pereira *et al.*, 2016). A TAB. 1 apresenta concentrações de compostos antropogênicos, fármacos e drogas ilícitas encontradas em matrizes ambientais aquáticas no Brasil.

TABELA 1 - Concentrações de compostos antropogênicos, fármacos e drogas ilícitas encontrados em matrizes ambientais aquáticas no Brasil.

Composto	Matriz ambiental	Local	Quantidade	Referência
Atenolol	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	8,5 - 177 ng.L ⁻¹	[4]
	Represa de abastecimento (Billings)	São Paulo	0,9 - 16,4 ng.L ⁻¹	[2]
Ácido Clofíbrico	Água residual	Rio de Janeiro	0,02 - 0,03 µg.L ⁻¹	[6]
Amoxicilina	Água superficial (período seco)	Atibaia - SP	4 - 17 ng.L ⁻¹	[3]
	Água superficial (período chuvoso)	Atibaia - SP	5,4 - 1.284 ng.L ⁻¹	[3]
Benzoilecgonina	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	7,9 - 139 ng.L ⁻¹	[4]
Bezafibrato	Água residual	Rio de Janeiro	LOD 0,025 µg.L ⁻¹	[6]
	Água potável	Campinas - SP	0,16 ± 0,03 µg.L ⁻¹	[5]
Bisfenol A	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	1.061 ng.L ⁻¹	[4]
	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	27 - 27.836 ng.L ⁻¹	[7]
Cafeína	Represa de abastecimento (Billings)	São Paulo - SP	0,35 - 28,3 ng.L ⁻¹	[2]
	Água potável	Campinas - SP	0,22 ± 0,06 µg.L ⁻¹	[5]
Carbamapexina	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	12 - 358 ng.L ⁻¹	[3]
Cefalexina	Água superficial (período seco)	Atibaia - SP	26 ng.L ⁻¹ - 2,42 µg.L ⁻¹	[3]
	Água superficial (período chuvoso)	Atibaia - SP	4,6 - 133 ng.L ⁻¹	[3]
Ciprofloxacina	Água superficial (período seco)	Atibaia - SP	0,6 - 119 ng.L ⁻¹	[4]
Clortadiona	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	9,4 - 35 ng.L ⁻¹	[4]

Composto	Matriz ambiental	Local	Quantidade	Referência
Cocaína	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	2,8 - 2.650 ng.L ⁻¹	[7]
Colestanol	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	114 ng.L ⁻¹	[5]
Colesterol	Água potável	Campinas - SP	0,27 ± 0,07 µg.L ⁻¹	[7]
	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	12.818 ng.L ⁻¹	[4]
	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	8 -35 ng.L ⁻¹	[2]
Diclofenaco	Represa de abastecimento (Billings)	São Paulo	20 - 60 ng.L ⁻¹	[6]
	Água residual	Rio de Janeiro	0,02 - 0,06 µg.L ⁻¹	[1]
Dibutilftalato	Efluente tratado - ETE	Três Lagoas - MS	0,273 µg.mL ⁻¹	[7]
	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	12.921 ng.L ⁻¹	[4]
Enalapril	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	20 ng.L ⁻¹	[5]
Estigmasterol	Água potável	Campinas - SP	0,34 ± 0,13 µg.L ⁻¹	[7]
Estradiol	Sedimento na represa do Guarapiranga	São Paulo	3 ng.g ⁻¹	[6]
Ibuprofeno	Água residual	Rio de Janeiro	LOD 0,01 µg.L ⁻¹	[1]
	Efluente tratado - ETE	Três Lagoas - MS	0,273 µg.mL ⁻¹	[4]
Losartana	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	6,7 - 114 ng.L ⁻¹	[6]
Naproxeno	Água residual	Rio de Janeiro	0,02 - 0,05 µg.L ⁻¹	[1]
	Efluente tratado - ETE	Três Lagoas - MS	0,07 µg.L ⁻¹	[7]
Nonifenol	Sedimento na represa do Guarapiranga	São Paulo	872 ng.g ⁻¹	[3]
Norflaxacina	Água superficial (período seco)	Atibaia - SP	0,5 - 51 ng.L ⁻¹	[3]
	Água superficial (período chuvoso)	Atibaia - SP	1,5 ng.L ⁻¹	[4]
Paracetamol	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	9,6 - 254 ng.L ⁻¹	[2]
	Represa de abastecimento (Billings)	São Paulo	0,3 - 10,3 ng.L ⁻¹	[1]
Piroxicam	Efluente tratado - ETE	Três Lagoas - MS	0,331 µg.L ⁻¹	[3]

Composto	Matriz ambiental	Local	Quantidade	Referência
Sulfametoxazol	Água superficial (período seco)	Atibaia - SP	1,1 - 106 ng.L ⁻¹	[3]
Tetraciclina	Água superficial (período chuvoso)	Atibaia - SP	11 ng.L ⁻¹	[3]
Trimetoprima	Água superficial (período seco)	Atibaia - SP	3,5 - 484 ng.L ⁻¹	[3]
	Água superficial (período chuvoso)	Atibaia - SP	2,3 - 5,3 ng.L ⁻¹	[3]
Valsartana	Represa de abastecimento (Guarapiranga)	São Paulo	9,7 - 47 ng.L ⁻¹	[4]

* [1] Américo *et al.* (2002); [2] Almeida & Weber (2007); [3] Locatelli *et al.* (2011); [4] Shihomatsu (2015); [5] Sodré & Locatelli (2009); Stumpf *et al.* (1999); Otomo (2015).

A Resolução CONAMA 358/2005 que “dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências” fornece algumas diretrizes sobre a maneira correta de descarte desses resíduos, mas, determina que os órgãos ambientais competentes devem determinar a quantidade (em valores) que podem ser seguramente descartados sem prejuízos à população e ao meio ambiente e devem fazer a averiguação sobre o padrão adotado. O CONAMA 430/2011 que estabelece valores em efluentes para alguns compostos ainda não contempla os fármacos.

O aporte de matéria orgânica constante nas represas geram problemas como: eutrofização que corresponde ao crescimento algáceo excessivo pela alta disponibilidade de nutrientes, que pode ser remediado com adição de cloro. Com os baixos volumes de água, a retirada da fração correspondente ao volume morto, níveis abaixo da captação normal pode causar ressuspensão de compostos decantados no sedimento.

Esses problemas com o ambiente aquático não ficam restritos apenas a capital ou interior, mas também em regiões litorâneas.

O litoral paulista possui 880 km de extensão, 16 municípios com uma área de 7.759 km² incluindo o município de Cubatão. Abriga os portos de São Sebastião (Terminal Marítimo Almirante Barroso - TEBAR) e Santos que é o maior porto da América Latina, o qual passa por processos de dragagem de sedimento para aumentar a profundidade do canal para tráfego dos navios ocasionando ressuspensão do sedimento. Estudos de fauna, flora e análises químicas do material dragado são realizados constantemente para assegurar

que os parâmetros estejam de acordo com os estabelecidos pela legislação CONAMA 357, além disso, esses resultados são acompanhados pelos órgãos ambientais competentes. (CETESB, 2014).

O município de Cubatão já foi considerado uma das cidades mais poluídas do mundo devido à intensa atividade do polo industrial instalado na cidade. Danos à saúde como carcinogênese, anencefalia fetal e problemas respiratórios foram relatados ao longo dos anos.

Muitos estudos foram realizados em água e sedimento para verificar quantidade de metais, PBCs e danos remanescentes aos organismos do sistema estuarino e marinho (CETESB, 2014).

Assim como a capital de São Paulo, algumas regiões do litoral, principalmente Santos, São Vicente, Guarujá e Cubatão têm problemas de subdesenvolvimento humano, com populações abrigadas em palafitas e com baixo saneamento básico. O descarte de objetos como móveis, brinquedos, vestuário, lixo, etc. provoca acúmulo dos mesmos em áreas de manguezais ou chegam ao mar pela ação das ondas. Este fato aliado à falta de tratamento de esgoto tornam precárias as condições nessas localidades.

Importante ressaltar que em período de férias e finais de semana há significativo aumento do número de visitantes que podem ultrapassar o dobro do número de moradores e as condições de balneabilidade das praias estão relacionadas ao saneamento local (CETESB, 2014).

Na região litorânea a SABESP utiliza também o tratamento de esgoto por lodos ativados e o efluente gerado é lançado ao ambiente por meio de emissários submarinos. Atualmente são sete em funcionamento e está localizado em Santos o que possui maior vazão ($7\text{m}^3/\text{s}$). Em recente estudo, foram constatados nesse local a presença dos fármacos Ibuprofeno ($326,1 - 2094,4 \text{ ng.L}^{-1}$), Diclofenaco ($19,4 \text{ ng.L}^{-1}$), Valsartana (92 ng.L^{-1}), Losartan ($11,8 - 32 \text{ ng.L}^{-1}$), Atenolol (Não quantificado) e Paracetamol ($17,4 - 34,6 \text{ ng.L}^{-1}$), e da droga ilícita Cocaína ($12,6 - 537 \text{ ng.L}^{-1}$) e seu subproduto Benzoilecgonina ($4,6 - 20,8 \text{ ng.L}^{-1}$) (Pereira *et al.*, 2016).

Os compostos farmacêuticos são produzidos com a finalidade de cumprir o propósito terapêutico específico para o qual os princípios ativos foram sintetizados. Existem diversas classes de princípios ativos utilizados em diferentes setores: medicina

humana e veterinária, agrícola, aquicultura, etc (Kümmerer, 2008) e são liberados constantemente para o ambiente por meio de efluentes hospitalares e de estações de tratamento de esgoto, esgoto clandestinos, águas de chuvas, resíduos industriais, lixiviações de solos contaminados, descarte incorreto, etc. Após o consumo cerca de 50% a 90% desses fármacos são excretados na forma inalterada. (Mulroy, 2001)

Os fármacos são bioativos e mesmo após a excreção podem continuar em sua forma original ou formar subprodutos pela degradação e podendo ser mais tóxicos. Por estes fatos os fármacos têm recebido atenção da comunidade científica, tendo sido encontrados em diversas matrizes como águas superficiais e residuais, efluentes de estações de tratamento e hospitalar, águas marinhas, sedimento etc (Mazur, 2015).

O Ministério da Saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza a Relação de Medicamentos Nacionais Essenciais (RENAME) para garantir a qualidade de vida da população através do controle e gestão do que é produzido e ofertado ao público, para controle e prevenção de doenças e taxas de natalidade.

Com a disponibilidade e facilidade de adesão de um fármaco muitas pessoas não sabem a maneira correta de descartá-lo após o vencimento da validade ou quando não são mais necessários, acreditando que não há problemas de jogar em lixo comum ou via descarga em vasos sanitários, porém a informação de descarte seguro não é amplamente divulgada e são poucos os lugares que se responsabilizam pelo recebimento desses compostos excedentes.

No ambiente aquático a presença de compostos farmacêuticos mesmo em baixas concentrações (ng.L^{-1} a mg.L^{-1}) atingem organismos não alvos e podem causar reações adversas como: feminilização de peixes machos e diminuição de fertilidade por interferência de hormônios, mudança de hábitos comportamentais e resistência bacteriana pela ação de antibióticos (Escher *et al.*, 2010). Bactérias responsáveis por processos químicos e biológicos naturais como desnitrificação, degradação também são afetadas. (Ozcengiz & Demain, 2012)

É importante salientar que os compostos não são encontrados de forma isolada no meio ambiente e pouco se sabe das possíveis interações que ocorrem entre eles e os efeitos benéficos ou adversos provenientes dessas misturas, o que reforça a necessidade de estudos que contemplem as análises de substâncias isoladas e em mistura (Godoy *et al.*, 2015).

3.4. Amoxicilina

A Penicilina, antibiótico natural da classe dos betalactâmicos foi descoberta por Alexander Flamming e trouxe grande avanço no combate de doenças por patógenos, sendo muito utilizada até os dias atuais. (Ozcengiz *et al.*, 2012).

A Amoxicilina é um dos antibióticos semissintéticos provenientes do ácido 6-aminopenicilânico que é obtido pelo tratamento da penicilina com a penicilina acilase, pela retirada da cadeia lateral de penicilina G ou V. É consumido em grandes quantidades ao redor do mundo devido ao seu amplo espectro de ação para combate de bactérias, tornando-o altamente eficaz. No entanto, quando utilizado frequentemente, principalmente por automedicação (sem o diagnóstico correto e prescrição médica) pode levar à resistência bacteriana como ocorrida no Brasil no surto de KPC (carbanemepase). Como medida de prevenção, a ANVISA determinou no ano de 2010 na resolução RDC 44/2010 que a venda de antibióticos só pode ser efetuada com receituário e deve ser retido no local da compra. Em 2015 determinada Indústria Farmacêutica teve a venda de determinados antibióticos suspensa pela ANVISA devido a utilização de materiais não autorizados para sua produção (ANVISA, 2015).

Em meio aquoso a Amoxicilina é degradada por hidrólise pela abertura do anel betalactâmico. (Baricatti *et al.*, 2008). O antibiótico é mais estável em condições ácidas e quando sofre degradação forma os subprodutos: ácido penicilóico e fenol hidroxipirazina. A partir do ácido penicilóico ocorre a formação de ácido penilóico e 2',5'-dicetopiperazina que se forma preferencialmente em pH = 8. (Gozlan *et al.*, 2013)

Alguns autores reportaram a presença de Amoxicilina em matrizes ambientais aquáticas. Christian *et al* (2003) observaram concentrações $< 10 \text{ ng.L}^{-1}$ de Amoxicilina em águas superficiais no Noroeste da Alemanha. Andreozzi *et al.* (2004) verificaram diversas concentrações até $> 120 \text{ ng.L}^{-1}$ em várias estações de tratamento de esgoto na Itália, sendo: em Cagliari: $7,40 \text{ ng.L}^{-1}$, Palermo: $120,35 \text{ ng.L}^{-1}$, Roma: $15,20 \text{ ng.L}^{-1}$, Napoli: $1,80 \text{ ng.L}^{-1}$, Torino $4,74 \text{ ng.L}^{-1}$ e dois pontos em Varese: Olona e Lago: $4,68 \text{ ng.L}^{-1}$. Na Austrália, Watkinson *et al.* (2007) obtiveram a média de 190 ng.L^{-1} em afluentes de estações de tratamento de águas residuais e na Coreia, Lee *et al.* (2008) encontraram $12,64 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Amoxicilina no mesmo tipo de matriz. Locatelli *et al.* (2011) analisaram águas superficiais do rio Atibaia e verificaram que no período seco havia concentrações variáveis de $4\text{-}17 \text{ ng.L}^{-1}$ e no período chuvoso $1,284\text{-}5,4 \text{ ng.L}^{-1}$.

Dados da literatura apresentam ensaios realizados com Amoxicilina para avaliação de danos em organismos, como:

- Inibição no crescimento algáceo de *Microcystis aeruginosa* (CE₅₀: 0,037 mg.L⁻¹), *Selenastrum capricornutum* (CENO > 250 mg.L⁻¹), *Rhodomonas salina* (CE₅₀: 3,108 mg.L⁻¹) e *Synechococcus leopoliensis* (CE₅₀: 2,22 µg.L⁻¹; CEO: 1,56 µg.L⁻¹ e CENO: 0,78 µg.L⁻¹) (Lutzholtz *et al.*, 1999; Andreozzi *et al.*, 2004);
- Comprometimento nas etapas da fotossíntese em *Synechocystis* sp. expostos a 50mg.L⁻¹ e deterioração completa de todo o processo com o aumento da dose do antibiótico (Pan *et al.*, 2008);
- Efeitos em embriões, fases larvais e adultos do peixe *Danio rerio*, como: eclosão prematura dos embriões (CE_{5048h}: 132,4 mg.L⁻¹), edemas e deformidades na cauda nas concentrações de 221 mg.L⁻¹, 380 mg.L⁻¹, 654 mg.L⁻¹ e 1,125 mg.L⁻¹, inibição da enzima Catalase em tecidos da cabeça e brânquias, bem como o aumento de Glutathione S-transferase em tecidos de músculos e brânquias de organismos adultos expostos a 1 mg.L⁻¹ (Oliveira *et al.*, 2013).
- Efeitos no desenvolvimento embriolaval de mexilhões *Perna perna* (CEO: 1.000 mg.L⁻¹ e CI₅₀: 835 mg.L⁻¹) (Bento, 2015).

3.5. Clavulanato de potássio

O Clavulanato de potássio é o sal proveniente da purificação do Ácido clavulânico e por ser a forma estável do composto é utilizado tanto em pesquisas científicas como na indústria farmacêutica. O medicamento obtido pela interação da Amoxicilina + Ácido Clavulânico é farmacológica e economicamente bem sucedida (Liu *et al.*, 2005).

O ácido clavulânico foi descoberto ao acaso em num processo de isolamento da bactéria *Streptomyces clavuligerus* na década de 70 por Brown e sua equipe (Saudagar *et al.*, 2008). A estrutura química do composto é similar à da penicilina, com o anel betalactâmico condensado a um anel oxazolidina. Este anel não é ligado estruturalmente a um anel contendo enxofre. Isoladamente o Clavulanato de potássio tem fraca ação antibiótica, mas associado à Amoxicilina inibe a enzima betalactamase que é produzida por bactérias resistentes e permite que o fármaco cumpra a ação de interromper a síntese de peptídeoglicanos, composição da parede celular, através da ligação irreversível que ocorre entre o grupo hidroxila da serina da betalactamase e o inibidor (ácido). A partir do

intermediário estável produzido a enzima é inativada e a infecção é combatida. (Oliveira *et al.*, 2009; Nurmohamadi & Pourghassem, 2014).

Apesar da grande empregabilidade do ácido clavulânico nos tratamentos de doenças infecciosas, ainda há muitas informações incompletas ou desconhecidas sobre este fármaco e muitos estudos médicos e odontológicos buscam verificar os efeitos de toxicidade nos seres humanos. Pela escassez de dados, motivaram-se pesquisas desse fármaco no âmbito químico e ambiental.

Diversos autores têm estudado o composto para compreender seu comportamento perante as diferenças de pH e temperatura e entre eles Haginaka *et al.* (1985) são os mais citados. Esses autores observaram a estabilidade do ácido clavulânico em 35°C, força iônica de $\mu = 0,5$ e pH= 6,39 sendo a degradação dependente de pH. Em solução aquosa levemente alcalina e na temperatura de estabilidade (35°C) são formados os subprodutos: 2,5-bis-(2-hidroxietil)pirazina, 3-(2-carboxietil)-2,5-bis-(2-hidroxietil)pirazina e 3-etil-2,5-bis-(2-hidroxietil)pirazina. Em 60°C forma-se o subproduto 3-metil-2,5-bis-(2-hidroxietil)pirazina juntamente com os mencionados anteriormente e em 100°C ocorre todos com exceção de 3-(2-carboxietil)-2,5-bis-(2-hidroxietil)pirazina.

Finn *et al.* (1984) observaram condições semelhantes às de Haginaka *et al.*: o ácido sofre hidrólise em meio ácido formando amino cetona que é estável nessa condição, entretanto em solução aquosa neutra ou básica havia formação de pirazina.

Bersanetti *et al.* (2005) avaliaram que o ácido clavulânico mostrou ser mais estável em 20°C em pH 6,0 e força iônica de $\mu = 0,5$, com a degradação ocorrendo mais rapidamente em soluções alcalinas.

A fim de determinar os efeitos da radiação gama, rotineiramente utilizada para esterilização, Valvo *et al.*, 1999, notaram logo após a irradiação a presença de um produto não identificado pelos autores, assim como um aumento de 15% nas impurezas já existentes.

Em um trabalho realizado na França para prever os riscos dos fármacos mais consumidos, Besse & Garric (2007) calcularam através de estimativas de consumo local que o Ácido clavulânico estaria presente em águas superficiais na concentração de 520 ng.L⁻¹. Os autores não puderam determinar os riscos à biota por ausência de dados ecotoxicológicos, o que reforça a importância de estudos ecotoxicológicos com fármacos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio de citotoxicidade seguiu as etapas de análise descritas no protocolo de Lowe *et al.* (1995) que é constituído na avaliação do tempo de retenção do corante vermelho neutro, que consiste na exposição de organismos à um composto em determinado período e avaliação da integridade e estabilidade da membrana lisossômica das células utilizadas.

A partir dos resultados obtidos no ensaio do TRCVN foram calculados os valores de risco ambiental de Amoxicilina e Clavulanato de potássio de acordo com o protocolo EMEA (2006).

O guia de avaliação de risco ambiental de fármacos foi desenvolvido pela Agência Europeia de medicamentos (EMEA da sigla em inglês) e é dividido em TIER (camadas) para o levantamento de dados e análise dos compostos em diferentes etapas, a fim de assegurar e precaver os efeitos danosos que causam ao ambiente e aos seres vivos.

Inicialmente é obtido dados de consumo e quantificação ambiental do fármaco estudado para calcular a Concentração Ambiental Mensurada (da sigla em inglês MEC), então na fase seguinte que divide-se em duas etapas, é realizado ensaios de efeito agudo e ensaios de efeito crônico. A partir dos resultados dessas análises, aplica-se um fator de segurança (valores múltiplos de 10) e então calcula-se a Concentração Ambiental não prevista (PNEC em inglês). A partir dos valores de MEC e PNEC, calcula-se o Quociente de risco (QR). Valores abaixo de 1 determinam baixo risco do composto e acima de 1 alto risco do fármaco ao meio ambiente (EMEA, 2006).

4.1. Organismo teste

São necessários alguns cuidados na escolha do organismo teste utilizados em ensaios de toxicidade, como: avaliar a posição na cadeia trófica, a representatividade no meio ambiente que está se estudando, sensibilidade à agentes químicos, conhecimento sobre hábitos vitais, alimentares e fisiologia, porte pequeno e ciclo de vida não muito longo, disponibilidade anual que possibilite cultivo ou manutenção do organismo no laboratório e estabilidade genética para que seja possível a obtenção de lotes uniformes de

organismos (Domingues & Bertoletti, 2008). A partir dessas recomendações, o mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) foi utilizado no presente estudo.

O mexilhão marinho *Perna perna* (Bivalvia, Mytilidae; FIG. 6) é uma espécie que se distribui na Costa Brasileira, entretanto, ocorre também na Venezuela, Uruguai, Argentina e África do Sul. São encontrados na zona entre marés e infralitoral, fixos a rochas, formando densos bancos naturais. Sua alimentação constitui-se de partículas que são filtradas, contudo, compostos químicos também podem ser filtrados e acumular em seus tecidos.

FIGURA 6 - Mecanismos de filtração de alimentos de *Perna perna*.

4.2. Obtenção e manutenção dos organismos

Os organismos foram provenientes de um cultivo de corda da praia de Toque Toque Grande na cidade de São Sebastião, litoral do estado de São Paulo. Após coletados, foram retirados os organismos incrustantes de suas valvas. Após a limpeza foram colocados em caixas térmicas e transportados ao laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília em Santos-SP, que é acreditado no sistema de qualidade da ISO 17025. No laboratório, foram colocados em tanque de 3.500 L de água do mar (FIG. 7) com salinidade 35 ± 2 ppm e aeração constante para manter os animais, permanecendo por um dia antes da realização dos experimentos.

FIGURA 7 - Tanque de água marinha para manutenção dos mexilhões.

4.3. Coleta de água

A água utilizada para a preparação de diluições das soluções estoque dos compostos e na exposição dos organismos no ensaio de citotoxicidade foi proveniente do mesmo local que os organismos teste: a praia de Toque Toque Grande (FIG. 8 e 9). O local foi classificado como “ótimo” pela avaliação anual da qualidade de balneabilidade realizada pela CETESB. (CETESB, 2013).

No local de coleta, a água foi acondicionada em galões de 50 L que foram transportados ao laboratório e mantidos sob a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para a realização do ensaio, foi verificada a salinidade da água com o refratômetro da marca Unity, modelo 512 – ATC, e ajustada para $35 \pm 2\text{ppm}$ quando necessário. Para remoção de partículas, a água foi filtrada em malha de zooplâncton com abertura de $120\text{ }\mu$.

FIGURA 8 - Imagem aérea das praias de São Sebastião (CETESB, 2013).

FIGURA 9 - Praia de Toque Toque Grande, São Sebastião – SP.

4.4. Substâncias teste

As substâncias teste utilizadas nos ensaios foram adquiridas da empresa Sigma Aldrich Brasil®.

Para a definição das concentrações-testes dos fármacos utilizados nos ensaios definitivos, foram realizados ensaios preliminares com Amoxicilina, Clavulanato de

Potássio e a associação Amoxicilina + Clavulanato de potássio. Para esses ensaios 12 organismos (por concentração) foram utilizados e expostos a diferentes concentrações dos fármacos. O ensaio ocorreu em um período total de 72h com avaliação da estabilidade da membrana lisossomal a cada 24h. Os resultados do tempo de retenção passaram por tratamento estatístico no programa TOXSTAT 3.5 e para as representações gráficas foi utilizado o programa OriginPro8.

Para os ensaios definitivos, as análises foram realizadas em triplicatas com 21 organismos por concentração, em um período total de 72h com avaliações da estabilidade da membrana lisossomal de cada organismo exposto ocorrendo a cada 24h. Os resultados do tempo de retenção foram submetidos ao programa estatístico ICP para cálculo das concentrações pontuais de CI_{25} . Para obtenção dos valores de CEO e CENO foi calculado valor da média do tempo de retenção de cada replicata e posteriormente uma média geral para a triplicata. Esses valores foram analisados pelo programa estatístico TOXSTAT 3.5

4.4.1. Amoxicilina

A Amoxicilina (2S, 5R, 6R) – 6 – [[[(2R) – 2 – amino – 2 – (4 - hidrófenil) acetil] amino] – 3, 3 – dimetil – 7 – oxo – 4 – tia – 1 – azabiciclo [3.2.0] heptano – 2 – ácido carboxílico é um antibiótico semissintético pertencente à classe β -lactâmicos, solúvel em água e de amplo espectro que combate bactérias Gram positivas e Gram negativas, atuando na inibição da síntese da parede celular bacteriana. A estrutura química está representada da FIG. 10 e as propriedades físico químicas estão apresentadas na TAB. 2.

FIGURA 10 - Estrutura química de Amoxicilina.

TABELA 2 - Propriedades físico-químicos de Amoxicilina

Koc	0,87
LogKow	0,87
Meia vida	1 hora (60 min)
Peso molecular	365,4 g.mol ⁻¹
pKa	2,40
Pressão de vapor (mmHg)	4,69 E-14
Solubilidade	4 mg.L ⁻¹ em água

4.4.2. Clavulanato de potássio

O Clavulanato de potássio (Potassium (2R, 3Z, 5R) – 3 – (2 – hydroxyethylidene) – 7 – oxo – 4 – oxa – 1- azabicyclo [3.2.0] heptane – 2 – carboxylate) é um fraco antibiótico pertencente à classe dos β – lactâmicos, solúvel em água. Atua na inibição da enzima β -lactamase que confere resistência das bactérias às penicilinas. Provém de *Streptomyces clavuligerus* pertencente a um pequeno grupo de Actinomycetes. A estrutura química está representada na FIG. 11 e as propriedades físico químicas estão apresentadas na TAB. 3.

FIGURA 11 - Estrutura química do Clavulanato de potássio.

TABELA 3 - Propriedades físico-químicas de Clavulanato de potássio.

Koc	-1,5
Meia vida	1 hora (60 minutos)
Peso molecular	199,16 g.mol ⁻¹
Ponto de fusão	117,5-118°C
Solubilidade	300 mg.mL ⁻¹ em água

4.5. Preparo das soluções teste

Para cada composto foi preparado uma solução estoque de 1 mg.L^{-1} , para isso, foi pesada em balança analítica a massa de 0,001g do fármaco e dilui-se em 1 L de água do mar filtrada, acondicionado em balão volumétrico. A partir dessas soluções estoques foram preparadas 3 L de cada diluição em água do mar filtrada.

4.6. Concentrações teste

A fim de avaliar a toxicidade dos fármacos, estipularam-se três diferentes concentrações nominais com Amoxicilina, Clavulanato de potássio e com a mistura de Amoxicilina e Clavulanato de potássio, apresentadas na TAB. 4.

TABELA 4 - Concentrações teste dos fármacos Amoxicilina e Clavulanato de potássio.

Composto	Concentração teste
Amoxicilina	1 ng.L^{-1} , 5 ng.L^{-1} e 10 ng.L^{-1}
Clavulanato de potássio	10 ng.L^{-1} , 50 ng.L^{-1} e 100 ng.L^{-1}
Amoxicilina	4 ng.L^{-1} de Amox + 1 ng.L^{-1} de Clav (I)
+	40 ng.L^{-1} de Amox + 10 ng.L^{-1} de Clav (II)
Clavulanato de potássio	200 ng.L^{-1} de Amox + 150 ng.L^{-1} de Clav (III)

4.7. Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios foram preparados em triplicata. Para cada ensaio com os diferentes compostos, foram utilizados 9 organismos dispostos em 3 frascos de vidro contendo 3 L de água sob aeração. Os mexilhões foram expostos nas concentrações descritas acima e com um controle de água marinha por um período total de 72h, com coleta de hemolinfa,

avaliação da membrana lisossômica dos hemócitos e trocas de soluções a cada 24h (FIG. 12). A TAB. 5 apresenta os parâmetros do ensaio de citotoxicidade e a FIG. 13 apresenta o fluxograma com as etapas de realização do ensaio.

TABELA 5 - Parâmetros e condições do ensaio de citotoxicidade

Parâmetros	Condições
Sistema de teste	Semi estático
Duração	72h
Substância teste	Amoxicilina e Clavulanato de Potássio
Temperatura	$22 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Salinidade	35 ± 2 ppm
Oxigênio dissolvido	$> 5 \text{ mg.L}^{-1}$
Fotoperíodo	12h luz/escuro
Frascos teste	Frascos de vidro de 3L
Nº de concentrações - teste	3 + Controle de água marinha
Nº de organismos/frasco	3 organismos em 3 réplicas
Troca de soluções	A cada 24h
Alimentação	Não
Critério de avaliação do efeito	Integridade da membrana lisossômica
Expressão dos resultados	CEO, CENO e CI_{25} .

FIGURA 12 - Frascos teste utilizados para expor os organismos ao fármaco.

FIGURA 13 - Fluxograma das etapas realizadas no ensaio

4.7.1. Preparo de lâminas

As lâminas foram pré-lavadas em água destilada e após secarem foram tratadas com uma solução de poly-L-lisina para adesão dos hemócitos nas mesmas. Esta solução foi

preparada na proporção de 100µL de poly-L-lisina e 1000 µL de água destilada e desta mistura, uma alíquota de 10µL foi pipetada sobre cada lâmina e espalhada por toda a superfície com auxílio de pincel. Após secarem, foram identificadas com o número do organismo e a concentração teste.

4.7.2. Preparo de solução fisiológica para diluição da hemolinfa

Para diluir a hemolinfa dos mexilhões, foi preparada uma solução salina composta de: 4,77g de HEPES; 25,48g de Cloreto de sódio; 13,06g de sulfato de magnésio; 0,75g de Cloreto de potássio; 1,47g de Cloreto de cálcio diluído em 1 L de água destilada em balão volumétrico. O pH foi verificado no aparelho Micronal, modelo B-474 e então ajustado para 7,36 com adição de Hidróxido de sódio (NaCl) ou Ácido Clorídrico (HCl).

A solução foi estocada e mantida sob refrigeração e, antes de ser utilizada, foi deixada em temperatura ambiente. A cada 24h foi conferido o pH e reajustado se necessário.

4.7.3. Preparo da solução de Vermelho Neutro (VN)

Solução estoque de VN: 28,8 mg do corante VN em pó foi dissolvido em 1 mL do solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) (concentração de 28,8 mg VN/mL DMSO) em um frasco âmbar com suave agitação, e após homogeneização a solução foi estocada sob refrigeração. Essa solução permanece estável por um período de 2 a 3 semanas quando mantida em condições adequadas pela fotossensibilidade.

Solução de trabalho de VN: A solução de trabalho foi preparada 5 minutos antes de utilizada no ensaio. A solução estoque foi retirada do refrigerador e mantida fora até atingir a temperatura ambiente. Em outro frasco âmbar foi pipetado 5 mL de solução fisiológica e 10 µL de solução estoque e homogeneizada suavemente. A cada concentração analisada foi preparada uma nova solução.

4.7.4. Extração e manuseio de hemolinfa

Seringas hipodérmicas de 1 mL com agulha padrão 21 foram preenchidas com 0,5 mL de solução fisiológica para retirar a hemolinfa. Os organismos foram dispostos em bandejas e cada organismo teve sua valva cuidadosamente separada com auxílio de uma faca inserida na superfície ventral, lado oposto do local onde fica o músculo adutor posterior. Após a abertura da valva, o excesso de água interna foi drenado.

Na abertura entre valvas, a agulha foi inserida cuidadosamente até o contato com o músculo ser observado por meio de certa resistência. A superfície do músculo foi furada e 0,5 mL de hemolinfa foi coletada. É possível verificar a extração do conteúdo pela diferença de coloração: a hemolinfa é de aspecto leitoso quando comparada à solução fisiológica, que é transparente. O conteúdo total da seringa foi transferido para tubo de microcentrífuga siliconado de 2 mL (FIG. 14). Após a retirada de hemolinfa de todos os organismos, eles foram recolocados nos frascos-teste.

FIGURA 14 - Tubos de microcentrífuga para acondicionamento de solução fisiológica e hemolinfa.

O conteúdo de cada tubo de microcentrífuga foi homogeneizado e 40 μ L da solução foram pipetadas sobre as lâminas acondicionadas em câmara escura e umedecida. As lâminas ficaram incubadas por um período de 15 minutos e após esse período, foi retirado o excesso e 40 μ L da solução de trabalho de vermelho neutro foi adicionada. As lâminas voltaram a ser incubadas por mais 15 minutos e transcorrido esse tempo, o excesso foi retirado, lamínulas foram colocadas e iniciou-se a observação em microscópio óptico.

4.7.5. Observação e critério de avaliação de células.

As lâminas foram observadas a cada 15 minutos no tempo total de 120 minutos em microscópio óptico da marca Meiji, aumento de 400x e baixa luz para evitar interferência no corante. As células foram avaliadas quanto ao tamanho, coloração, formato, etc. Os critérios de observação estão apresentados na TAB. 6.

A cada lâmina, foram atribuídos sinais de “+” quando as células estavam saudáveis, “±” quando apresentavam sinais de estresse e “-” quando 50% de células ou mais estavam estressadas e apresentavam extravasamento do conteúdo lisossomal (FIG. 15). Os dados foram anotados em tabela para ter a precisão do tempo de retenção do VN (em minutos).

FIGURA 15 - Células saudáveis (+) e células stressadas (-), respectivamente.

TABELA 6 - Critério de avaliação dos hemócitos de mexilhões

Critério	Células saudáveis	Células estressadas
Forma das células	Irregular	Arredondadas
Tamanho das células	Largas	Menores
Número de lisossomos	Muitos	Poucos
Tamanho dos lisossomos	Pequenos	Alargados/ aumentados
Cor dos lisossomos	Vermelho pálido/rosado	Vermelhos ou rosa escuro, alaranjados, marrons
Pseudópodes	Não visíveis	Visíveis
Corante vazado das células	Não visíveis	Visíveis

4.8. Avaliação estatística

Após a realização dos ensaios de citotoxicidade com os fármacos Amoxicilina, Clavulanato de potássio e a mistura de ambos, aplicou-se avaliação estatística para os dados obtidos nas análises de lâminas para verificação do tempo de retenção dos fármacos aos quais os organismos foram expostos.

Os valores médios de cada concentração-teste foram comparados ao valor médio do controle para verificação de diferenças estatísticas significativas. Foram aplicados os testes estatísticos contidos no programa TOXSTAT 3.5:

- Chi-quadrado que analisou a normalidade dos dados através do agrupamento dos valores. A normalidade tem por objetivo avaliar se os valores oscilam simetricamente comparados à média;
- Bartlett que é aplicado para grupos com diferentes ou mesmo número de réplicas para testar a homocedasticidade dos grupos. Quando os dados são homogêneos ocorre o mesmo grau de dispersão em torno do valor central;
- ANOVA (Análise de variância) para verificar efetivamente a diferença entre as concentrações-teste e o controle, o que rejeita a hipótese nula de que todos os grupos possuem a mesma média;
- DUNNETT que requer número de réplicas iguais e fornece o valor de α , indicador da probabilidade de identificação estatística entre as concentrações teste e controle, fornecendo os valores de CEO (Concentração de efeito observado) e CENO (Concentração de efeito não observado).

A Concentração de efeito observado (CEO) é a menor concentração teste capaz de causar efeito adverso, e a Concentração de efeito não observado (CENO) é a maior concentração-teste que não causa efeito adverso (Buratini & Bertolotti, 2008).

Os danos gerados pelos fármacos também foram apresentados por meio da Concentração Inibitória (CI): concentração do fármaco que inibe em 25% a estabilidade da membrana lisossômica de hemócitos de mexilhões medida pelo tempo de retenção do corante vermelho neutro. Para obtenção da CI25 foram calculadas e avaliadas as porcentagens de efeito pelo método de interpolação linear no programa estatístico ICP. A

Interpolação linear é um dos testes de estimativas pontuais que assumem um modelo matemático para o cálculo da relação concentração/resposta e dessa forma estimar porcentagens efetivas de redução das concentrações teste comparadas ao controle.

Essa metodologia faz uma análise de regressão dos dados e estabelece equação concentração/resposta dos valores não testados, o que torna o método analítico mais preciso. Com a variabilidade nas concentrações, é calculado os limites de confiança superior e inferior (Buratini & Bertoletti, 2008).

Os gráficos foram construídos com o programa estatístico OriginPro8. A FIG. 16 apresenta o fluxograma da USEPA utilizado para determinar os métodos estatísticos adequados

FIGURA 16 - Fluxograma com as etapas para cálculo de CEO, CENO e CI₂₅. (USEPA, 2002)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as análises do tempo de retenção do corante vermelho neutro com o objetivo de avaliar a estabilidade da membrana lisossômica foi possível observar que os valores no controle estão dentro do parâmetro adequado como critério de aceitabilidade para organismos saudáveis ($t \geq 60$ minutos) (OSPAR,2013), indicando a confiabilidade nas respostas obtidas na exposição aos fármacos Amoxicilina e Clavulanato de potássio bem como a boa qualidade do local escolhido para obtenção dos organismos-teste.

A água utilizada nos ensaios foi água do mar natural coletada na mesma região dos cultivos de mexilhões. Dentre os parâmetros físico-químicos, a salinidade foi ajustada para 35 ppm para manter os limites aceitáveis para os bivalves.

5.1. Ensaios preliminares

Abaixo estão apresentados os resultados obtidos para os fármacos Amoxicilina, Clavulanato de potássio e a associação de ambos nas análises preliminares. Os resultados foram expressos somente em CEO e CENO para conhecimento das concentrações citotóxicas aos organismos para melhor elucidação nos ensaios definitivos.

5.1.1. Primeiro ensaio com Amoxicilina

Para o primeiro ensaio com Amoxicilina foram testadas as concentrações de 12 ng.L⁻¹, 14 ng.L⁻¹, 16 ng.L⁻¹ e 18 ng.L⁻¹ nos períodos de 24h, 48h e 72h. A TAB. 7 apresenta os dados de média do tempo de retenção $\pm$ desvio padrão e coeficiente de variação nos períodos de ensaio. A concentração que foi estatisticamente diferente do controle foi assinalada com asterisco vermelho ($p < 0,05$), e as FIG. 17, 18 e 19, apresentam os valores em gráfico para cada dia de ensaio.

TABELA 7 - Dados de média do tempo de retenção, desvio padrão e coeficiente de variação de concentrações de exposição dos mexilhões à Amoxicilina.

Tempo de exposição	Concentração	Média $\pm$ D.P.	C.V. (%)
24h	Controle	50 $\pm$ 15	30
	12 ng.L ⁻¹	56 $\pm$ 9	17
	14 ng.L ⁻¹	48 $\pm$ 11	23

Tempo de exposição	Concentração	Média ± D.P.	C.V. (%)
48h	16 ng.L ⁻¹	49 ± 14	28
	18ng.L ⁻¹	45 ± 6	14
	Controle	47 ± 16	34
	12 ng.L ⁻¹	63 ± 14	22
	14 ng.L ⁻¹	83 ± 28	34
	16 ng.L ⁻¹	41 ± 12	29
	18ng.L ⁻¹	43 ± 20	47
72h	Controle	46 ± 11	23
	12 ng.L ⁻¹	51 ± 16	32
	14 ng.L ⁻¹	38 ± 8	21
	16 ng.L ⁻¹ *	21 ± 20	95
	18ng.L ⁻¹	40 ± 22	54

Em 24h e 48h, as concentrações teste não foram citotóxicas aos organismos, no entanto, em 72h a concentração de 16 ng.L⁻¹ causou citotoxicidade.

FIGURA 17 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Amoxicilina para o mexilhão *Perna perna* após 24h de ensaio.

FIGURA 18 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Amoxicilina para o mexilhão *Perna perna* após 48h de ensaio.

FIGURA 19 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Amoxicilina para o mexilhão *Perna perna* após 72h de ensaio.

5.1.2. Segundo ensaio com Amoxicilina

Para o segundo ensaio com Amoxicilina foram testadas as concentrações de: 10 ng.L⁻¹, 20 ng.L⁻¹ e 30 ng.L⁻¹ nos períodos de 24h, 48h e 72h. A TAB. 8 apresenta os dados de média de tempo de retenção $\pm$ desvio padrão e coeficiente de variação nos períodos de ensaio. As concentrações que foram estatisticamente diferentes do controle foram assinaladas com asterisco vermelho ($p < 0,05$), e a FIG. 20 apresenta os valores em gráfico para os dias de exposição dos organismos à Amoxicilina

TABELA 8 - Dados de média do tempo de retenção, desvio padrão e coeficiente de variação de concentrações de exposição dos mexilhões à Amoxicilina.

Tempo de exposição	Concentração	Média $\pm$ D.P.	C.V. (%)
24h	Controle	50 $\pm$ 15	30
	10 ng.L ⁻¹	56 $\pm$ 9	17
	20 ng.L ⁻¹ *	48 $\pm$ 11	23
	30 ng.L ⁻¹ *	49 $\pm$ 14	28
48h	Controle	55 $\pm$ 20	35
	10 ng.L ⁻¹ *	40 $\pm$ 23	56
	20 ng.L ⁻¹ *	39 $\pm$ 15	38
	30 ng.L ⁻¹ *	15 $\pm$ 18	118
72h	Controle	65 $\pm$ 23	63
	10 ng.L ⁻¹ *	30 $\pm$ 16	52
	20 ng.L ⁻¹ *	25 $\pm$ 21	82
	30 ng.L ⁻¹ *	25 $\pm$ 14	57

Em 24h as concentrações de 20 ng.L⁻¹ e 30 ng.L⁻¹ foram citotóxicas aos mexilhões. Em 48h e 72h todas as concentrações testadas causaram citotoxicidade aos organismos.

FIGURA 20 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Amoxicilina para o mexilhão *Perna perna* em 24h, 48h e 72h de ensaio.

5.1.3. Terceiro ensaio com Amoxicilina

Para o terceiro ensaio com Amoxicilina as concentrações testadas foram: 1 ng.L⁻¹, 10 ng.L⁻¹ e 20 ng.L⁻¹ nos períodos de 24h e 48h. A TAB. 9 apresenta os dados de média do tempo de retenção $\pm$ desvio padrão e coeficiente de variação nos períodos de ensaio. A concentração que foi estatisticamente diferente do controle foi assinalada com asterisco vermelho ($p < 0,05$), e a FIG. 21 apresenta os valores em gráfico para os dias de exposição dos organismos à Amoxicilina.

TABELA 9 - Dados de média do tempo de retenção, desvio padrão e coeficiente de variação de concentrações de exposição dos mexilhões à Amoxicilina.

Tempo de exposição	Concentração	Média $\pm$ D.P.	C.V. (%)
24h	Controle	64 $\pm$ 29	46
	1 ng.L ⁻¹	42 $\pm$ 22	52
	10 ng.L ⁻¹ *	25 $\pm$ 17	69
	20 ng.L ⁻¹	49 $\pm$ 14	28
	Controle	51 $\pm$ 25	50

Tempo de exposição	Concentração	Média ± D.P.	C.V. (%)
48h	1 ng.L ⁻¹	51 ± 23	44
	10 ng.L ⁻¹	24 ± 18	73
	20 ng.L ⁻¹	41 ± 43	105

Em 24h a concentração de 10 ng.L⁻¹ causou citotoxicidade aos organismos, contudo em 48h nenhuma das concentrações testadas foram citotóxicas aos mexilhões.

FIGURA 21 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Amoxicilina para o mexilhão *Perna perna* após 24h e 48h de ensaio.

5.2. Ensaio com Clavulanato de potássio

Para o primeiro ensaio com Clavulanato de Potássio as concentrações testadas foram: 10 ng.L⁻¹, 100 ng.L⁻¹ e 1000 ng.L⁻¹ no período de 24h. A TAB. 10 apresenta os dados de média ± desvio padrão e coeficiente de variação nos períodos de ensaio. As concentrações que foram estatisticamente diferentes do controle foram assinaladas com asterisco vermelho ($p < 0,05$), e a FIG. 22 apresenta os valores em gráfico para os dias de exposição dos organismos ao Clavulanato de potássio.

TABELA 10 - Dados de média do tempo de retenção, desvio padrão e coeficiente de variação de concentrações de exposição dos mexilhões ao Clavulanato de potássio.

Concentração	Média $\pm$ D.P.	C.V. (%)
Controle	76 $\pm$ 29	38
10 ng.L ⁻¹	60 $\pm$ 16	26
100 ng.L ⁻¹ *	35 $\pm$ 28	80
1000 ng.L ⁻¹ *	5 $\pm$ 7	148

No período de exposição, as concentrações de 100 ng.L⁻¹ e 1000 ng.L⁻¹ foram citotóxicas aos organismos.

FIGURA 22 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações de Clavulanato de potássio para o mexilhão *Perna perna* após 24h de ensaio.

5.3. Ensaio com associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio

Para o primeiro ensaio da associação de Amoxicilina e Clavulanato de Potássio as concentrações testadas foram: 1 ng.L⁻¹, 10 ng.L⁻¹ e 100 ng.L⁻¹ em uma proporção de 1:1 no período de 24h e 48h. A TAB. 11 apresenta os dados de média $\pm$ desvio padrão e coeficiente de variação nos períodos de ensaio. As concentrações que foram estatisticamente diferentes do controle foram assinaladas com asterisco vermelho ($p <$

0,05), e a FIG. 23 apresenta os valores em gráfico para os dias de exposição dos organismos a associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio.

TABELA 11 - Dados de média do tempo de retenção, desvio padrão e coeficiente de variação de concentrações de exposição dos mexilhões a associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio.

Tempo de exposição	Concentração	Média $\pm$ D.P.	C.V. (%)
24h	Controle	84 ± 34	40
	1 ng.L ⁻¹ *	41 ± 23	56
	10 ng.L ⁻¹ *	41 ± 36	86
	100 ng.L ⁻¹ *	30 ± 13	43
48h	Controle	49 ± 31	64
	1 ng.L ⁻¹	53 ± 32	60
	10 ng.L ⁻¹	38 ± 24	63
	100 ng.L ⁻¹	30 ± 26	85

Em 24h todas as concentrações foram citotóxicas aos organismos, entretanto em 48h não houve citotoxicidade aos mexilhões a partir dessas concentrações.

FIGURA 23 - Representação gráfica do tempo de retenção do corante vermelho neutro em função das concentrações da associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio para o mexilhão *Perna perna* após 24h e 48h de ensaio.

5.4. Ensaios definitivos

Nos ensaios definitivos os resultados foram expressos em CEO, CENO e CI_{25} . A partir dos resultados obtidos pode-se observar que ocorreu a redução de 25% do tempo de retenção em relação ao controle do experimento após a exposição aos fármacos, razão pela qual os dados não foram calculados quanto a CI_{50} .

5.4.1. Ensaio de citotoxicidade de Amoxicilina

As concentrações de Amoxicilina foram: 1 ng.L^{-1} , 5 ng.L^{-1} e 10 ng.L^{-1} . Os resultados de tempo de retenção em relação à concentração de Amoxicilina foram colocados em gráfico e apresentados nas FIG. 24, 25 e 26. Os valores de CEO, CENO e CI_{25} para os períodos de exposição dos organismos à Amoxicilina foram colocados em tabela e estão apresentados na TAB. 12.

TABELA 12 - Dados de CEO, CENO e CI_{25} nos períodos de exposição dos organismos à Amoxicilina.

Tempo	CEO	CENO	CI_{25} Média (ng.L^{-1}) $\pm$ D.P.	Intervalo de confiança	C.V. (%)
24h	1 ng.L^{-1}	$< 1 \text{ ng.L}^{-1}$	$0,44 \pm 0,04$	0,370 - 0,522	10
48h	1 ng.L^{-1}	$< 1 \text{ ng.L}^{-1}$	$1,19 \pm 0,91$	0,536 - 4,125	77
72h	1 ng.L^{-1}	$< 1 \text{ ng.L}^{-1}$	$0,85 \pm 0,09$	-	10

FIGURA 24 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Amoxicilina no período de exposição de 24h.

FIGURA 25 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Amoxicilina no período de exposição de 48h.

FIGURA 26 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Amoxicilina no período de exposição de 72h.

A citotoxicidade de Amoxicilina não apresentou variação ao longo dos dias de exposição sendo possível observar que todas as concentrações causaram efeito adverso à membrana lisossômica. A cada período de exposição (24h, 48h e 72h) as médias de retenção diminuíram em relação ao dia anterior, com exceção da concentração de 1 ng.L⁻¹ em 72h, contudo as células não estavam saudáveis ($t < 60$ minutos). A ausência de concentrações de efeito não observado de Amoxicilina nas condições experimentais utilizadas demonstra a alta toxicidade do composto.

Na literatura a Amoxicilina é descrita como não tóxico aos organismos, uma vez que os resultados das análises apresentaram efeitos em altas concentrações (mg.L⁻¹), valores que não são passíveis de ocorrência no meio ambiente (Bento, 2015).

Diversos autores realizam ensaios com Amoxicilina através da exposição de organismos teste, dentre os quais foram realizados ensaios com algas para verificar a inibição no crescimento e comprometimento em etapas do processo fotossintético; estudos com o peixe *Danio rerio* para observação do comprometimento das fases embrionária, larvais e ação enzimáticas em tecidos de organismos adultos e avaliação no desenvolvimento embriolarval de mexilhões *Perna perna*. Dentre essas avaliações

realizadas, apenas as algas *Mycrocystis aeruginosa* (CE_{50} : 0,037 mg.L⁻¹) e *Synechococcus leopoliensis* (CE_{50} : 2,22 µg.L⁻¹, CEO: 1,56 µg.L⁻¹ e CENO: 0,78 µg.L⁻¹) foram efetivamente afetadas pelo composto, já que os resultados obtidos estão na faixa de concentrações ambientais, como na Coreia (12,64 µg.L⁻¹).

No presente estudo foi avaliado pelo ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro que a Amoxicilina causou citotoxicidade aos hemócitos de mexilhões. Os resultados obtidos em concentrações na ordem de ng.L⁻¹ (CEO: 1 ng.L⁻¹, CI_{25-24h} : 0,44 ng.L⁻¹, CI_{25-48h} : 1,19 ng.L⁻¹ e CI_{25-72h} : 0,85 ng.L⁻¹) estão na mesma ordem de grandeza de concentrações ambientais descritas na literatura e, são valores menores em comparação aos resultados de efeitos adversos que promovem inibição no crescimento algáceo. Dessa forma, denota-se o risco desse composto à biota.

5.4.2. Ensaio de citotoxicidade com Clavulanato de potássio

As concentrações de Clavulanato de potássio foram: 10 ng.L⁻¹, 50 ng.L⁻¹ e 100 ng.L⁻¹. Os resultados de tempo de retenção em relação à concentração de Clavulanato de potássio foram colocados em gráfico e apresentados na FIG. 27, 28, e 29. Os valores de CEO, CENO e CI_{25} para os períodos de exposição dos organismos ao Clavulanato de potássio foram apresentados na TAB. 13.

TABELA 13 - Dados de CEO, CENO e CI_{25} nos períodos de exposição dos organismos ao Clavulanato de potássio.

Tempo	CEO	CENO	CI_{25} Média (ng.L ⁻¹) ± D.P.	Intervalo de confiança	C.V. (%)
24h	10 ng.L ⁻¹	50 ng.L ⁻¹ e 100 ng.L ⁻¹	3,11 ± 0,29	2,763 - 3,654	9
48h	10 ng.L ⁻¹	50 ng.L ⁻¹ e 100 ng.L ⁻¹	3,45 ± 0,35	2,920 - 4,156	10
72h	50 ng.L ⁻¹ e 100 ng.L ⁻¹	10 ng.L ⁻¹	3,43 ± 0,24	3,139 - 4,113	7

Concentrações de Clavulanato de potássio (ng.L⁻¹) em 24h de exposição.

FIGURA 27 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Clavulanato de potássio no período de exposição de 24h.

Concentrações de Clavulanato de potássio (ng.L⁻¹) em 48h de exposição.

FIGURA 28 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Clavulanato de potássio no período de exposição de 48h.

FIGURA 29 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração de Clavulanato de potássio no período de exposição de 72h.

O Clavulanato de potássio causou citotoxicidade aos hemócitos de mexilhões na concentração de 10 ng.L⁻¹ nos dois primeiros períodos de análise das células (24h e 48h). As concentrações de 50 ng.L⁻¹ e 100 ng.L⁻¹ não foram citotóxicas aos organismos durante esse período e tiveram médias próximas ou superiores ao controle, indicando que os organismos permaneciam saudáveis quando expostos à essas concentrações. Esses resultados possivelmente estão relacionados à degradação do composto, em que o dano foi mais severo inicialmente e dessa forma somente os organismos expostos à menor concentração foram afetados.

No entanto, em 72h as concentrações de 50 ng.L⁻¹ e 100 ng.L⁻¹ tiveram redução significativa no tempo de retenção do corante em comparação às análises dos períodos de 24h e 48h, causando citotoxicidade aos hemócitos de mexilhões, enquanto que a menor concentração (10 ng.L⁻¹) não foi citotóxica aos organismos.

Os dados ambientais para Clavulanato de potássio são escassos uma vez que a maioria dos estudos está concentrada na área médica. O resultado obtido no presente trabalho apresenta concentração mais tóxica em comparação ao único trabalho que apresentou o resultado de previsão ambiental (520 ng.L⁻¹ em água superficial na França).

Esses dados demonstram que é necessária atenção a esse composto e aos possíveis danos aos organismos (Besse & Garric, 2007).

5.4.3. Ensaio de citotoxicidade com a associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio.

As concentrações de Amoxicilina + Clavulanato de potássio foram: 4 ng.L⁻¹ de Amoxicilina + 1 ng.L⁻¹ de Clavulanato (I), 40 ng.L⁻¹ de Amoxicilina + 10 ng.L⁻¹ de Clavulanato (II) e 200 ng.L⁻¹ de Amoxicilina + 50 ng.L⁻¹ de Clavulanato (III). Os resultados de tempo de retenção em relação à concentração da associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio foram colocados em gráfico e apresentados na FIG. 30 e 31. Os valores de CEO, CENO e CI₂₅ para os períodos de exposição dos organismos à Amoxicilina e Clavulanato de potássio foram colocados em tabela e estão apresentados nas TAB. 14 e 15.

TABELA 14 - Dados de CEO, CENO e CI₂₅ nos períodos de exposição dos organismos à Amoxicilina e Clavulanato de potássio, com resultados a partir dos efeitos de Amoxicilina.

Tempo	CEO	CENO	CI ₂₅ Média (ng.L ⁻¹) ± D.P.	Intervalo de confiança	C.V. (%)
48h	I	< I	1,67 ± 0,15	1,46 – 2,04	9
72h	II e III	I	1,36 ± 0,09	1,22 – 1,56	7

TABELA 15 - Dados de CEO, CENO e CI₂₅ nos períodos de exposição à Amoxicilina e Clavulanato de potássio, com resultados a partir dos efeitos de Clavulanato de potássio.

Tempo	CEO	CENO	CI ₂₅ Média (ng.L ⁻¹) ± D.P.	Intervalo de confiança	C.V. (%)
48h	I	< I	0,42 ± 0,05	0,35 – 0,52	12
72h	II e III	I	0,34 ± 0,02	0,30 – 0,39	6

FIGURA 30 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração da associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio no período de exposição de 48h.

FIGURA 31 - Resultado do tempo de retenção em relação à concentração da associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio no período de exposição de 72h.

Todas as concentrações foram citotóxicas aos organismos em 48h. Em 72h a concentração mais baixa da associação dos fármacos (4 ng.L^{-1} de Amoxicilina + 1 ng.L^{-1} de Clavulanato de potássio) teve média do tempo de retenção de 46 minutos, valor próximo ao tempo de retenção dos organismos exposto somente à água marinha, que foi de 56 minutos, não ocorrendo citotoxicidade nessa concentração. Contudo, as concentrações de 40 ng.L^{-1} de Amoxicilina + 10 ng.L^{-1} de Clavulanato e 200 ng.L^{-1} de Amoxicilina + 50 ng.L^{-1} de Clavulanato causaram citotoxicidade aos hemócitos de mexilhões.

Na associação de fármacos foi possível observar padrão de dose e tempo dependência entre as concentrações e o controle experimental, o que significa que quanto maior a dosagem de exposição dos fármacos aos mexilhões, menor era o tempo de retenção na estabilidade da membrana lisossomal dos organismos.

De acordo com os conceitos da farmacodinâmica, as penicilinas, classe que inclui a Amoxicilina e o Clavulanato de potássio, são tempo-dependentes. Essa relação determina que se o antibiótico permanecer na corrente sanguínea (concentração sérica) em concentrações superiores à necessária para a concentração mínima de inibição da bactéria, em um espaço de tempo de ao menos 50% acima do fundamental, a atuação será aprimorada no combate ao patógeno (ANVISA, 2016), no entanto, em organismos não-alvos, como os mexilhões, essas condições podem ser desfavoráveis e causar efeito adverso, como pontuado nos resultados acima a partir dos ensaios de TRCVN.

Comparando os dados de CI_{25} dos fármacos nas análises individuais, foi observado que nos períodos de 48h e 72h a Amoxicilina foi mais citotóxica que o Clavulanato de potássio, entretanto, em associação ocorre uma pequena variação nos valores de CI_{25} e avaliou-se que foi necessária uma quantidade maior de fármaco para causar citotoxicidade. O Clavulanato de potássio apresentou citotoxicidade maior em associação com a Amoxicilina quando comparado aos dados de análise individuais, com grande decréscimo nos valores de CI_{25} .

Foi possível observar nas análises isoladas e em associação dos fármacos que eles foram mais citotóxicos no período de 72h quando comparados com o período de 48h.

A faixa de pH da água do mar utilizada nos ensaios foi mantida nas condições naturais $\text{pH} \geq 8,00$. A Amoxicilina e Ácido Clavulânico são altamente solúveis em água, possuem meia vida curta e são suscetíveis à hidrólise dependente de pH com maior estabilidade em condições ácidas. A partir das condições naturais da água do mar aos quais

os fármacos foram expostos, segundo a literatura, pode ocorrer degradação com a formação dos subprodutos para Amoxicilina: ácido penicilóico decorrente da abertura do anel betalactâmico e fenol hidroxipirazina. A partir do ácido penicilóico ocorre a formação de ácido penilóico e 2',5'-dicetopiperazina. Esse último subproduto é formado preferencialmente em condições de pH= 8 (Gozlan *et al.*, 2013). Para Clavulanato de potássio ocorre a formação de Pirazina (Finn *et al.*, 1984; Haginaka *et al.*, 1985; Bersanetti *et al.*, 2005). A citotoxicidade causada aos mexilhões pode ser proveniente desses subprodutos uma vez que os hemócitos são avaliados depois de transcorridas 24h de exposição. A ação desses subprodutos é desconhecida, dificultando informações adicionais sobre o potencial tóxico.

Além da formação de subprodutos, a constante de dissociação (pKa) de compostos pode estar relacionada aos resultados de citotoxicidade. O conhecimento dessa propriedade físico-química auxilia no entendimento do comportamento químico dos fármacos. Compostos ionizados tendem a serem mais solúveis em água enquanto que na forma neutra são mais lipofílicos e possuem maior permeabilidade de membranas (Babić *et al.*, 2007).

A Amoxicilina comporta-se como zwitterion na dissociação em soluções aquosas, ou seja, na presença de meio ácido comporta-se como base e em meio básico atua como ácido. Essa configuração de zwitterion ocorre pela presença de moléculas de grupos carboxílicos e de aminoácidos (Babić *et al.*, 2007). Uma vez que a diluição desse fármaco ocorreu em água do mar que possui características de pH alcalino, a Amoxicilina pode ter se comportado como um fraco ácido durante o período de exposição antes de se degradar.

Os lisossomos sofrem alterações na presença de ácidos fracos, como inchaço e vacuolização, responsáveis por aumento nos processos de autofagia e desestabilização celular (Lowe *et al.*, 1995).

Para combater infecções por bactérias, a Amoxicilina interrompe a síntese da parede celular bacteriana e a partir da desestruturação, as bactérias sofrem desregulação osmótica, absorvendo quantidades acima do limite tolerado para as células, que então, sofrem pressão pelo excesso absorvido e morte (Kaur *et al.*, 2011).

5.5. Adaptação do cálculo de risco ambiental de fármacos de acordo com o protocolo desenvolvido por EMEA (2006)

É necessário avaliar o risco dos fármacos de modo que se possa assegurar a saúde pública e ambiental. De acordo com esse protocolo valores de quociente de risco <1 apresentam risco baixo, 0-1 apresentam risco médio e >1 configura alto risco.

As etapas para cálculo de QR ocorreram de forma subsequente:

- Valor de CENO resultante do ensaio de TRCVN;
- Valor de previsão de concentração não ambiental (PNEC em inglês) correspondente à concentração segura, obtida a partir da divisão do valor de CENO por 10, que é o valor de aplicação de fator de segurança;
- O valor mais alto de previsão de concentração ambiental (PEC em inglês) ou concentração ambiental mensurada (MEC em inglês) resultante de dados da literatura;
- Divisão dos valores de PEC por PNEC (PEC/PNEC) para determinação de QR.

5.5.1. Avaliação de risco de Clavulanato de potássio

Para Clavulanato de potássio foi utilizado a CENO mais alta obtida durante as 72h de exposição no ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro e PEC de 520 ng.L^{-1} calculada por Besse & Garric (2007) para águas superficiais na França. A TAB. 16 apresenta os parâmetros e valores utilizados para cálculo de quociente de risco ambiental de Clavulanato de potássio.

TABELA 16 - Parâmetros e valores utilizados para cálculo de quociente de risco ambiental de Clavulanato de potássio.

Ensaio	CENO	PNEC	PEC	QR (PEC/PNEC)	Risco
TRCVN	100	10	520	52	Alto

5.5.2. Avaliação de risco da associação de Amoxicilina e Clavulanato de potássio.

O cálculo de risco foi realizado de forma separada para Amoxicilina e Clavulanato de potássio a partir dos valores de CENO obtido durante o período 72h de ensaio TRCVN.

Para Amoxicilina o valor de CENO foi 4 ng.L^{-1} e o MEC 12.640 ng.L^{-1} . O MEC ($12,64 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) foi obtido no estudo de Lee *et al.* (2008) para afluentes de águas residuais na Coreia. A fim de padronizar as ordens de grandeza, foi realizada a conversão de unidades.

Para Clavulanato de potássio o valor de CENO foi 1 ng.L^{-1} e utilizou-se o PEC de 520 ng.L^{-1} como anteriormente.

TABELA 17 - Parâmetros e valores utilizados para cálculo de quociente de risco ambiental de Amoxicilina e Clavulanato de potássio em associação, a partir dos resultados de Amoxicilina.

Ensaio	CENO	PNEC	MEC	QR (MEC/PNEC)	Risco
TRCVN	4	0,4	12.640	31.600	Alto

TABELA 18 - Parâmetros e valores utilizados para cálculo de quociente de risco ambiental de Amoxicilina e Clavulanato de potássio em associação, a partir dos resultados de Clavulanato de potássio.

Ensaio	CENO	PNEC	PEC	QR (PEC/PNEC)	Risco
TRCVN	1	0,1	520	5.200	Alto

O cálculo de quociente de risco indicou que a Amoxicilina associada ao Clavulanato de potássio possui alto risco de interferência nociva no ambiente marinho. Devido à ausência de CENO nas condições experimentais testadas, foi impossibilitado o cálculo de risco do composto isolado.

Bento (2015) descreve a Amoxicilina como composto de baixo risco ambiental a partir de seus resultados em ensaios para avaliação de efeito embriolarval em mexilhões *Perna perna*. No referido estudo, o autor obteve CEO: 1.000 mg.L^{-1} e CI_{50} : 835 mg.L^{-1} .

Besse & Garric (2007) fizeram levantamento dos fármacos mais consumidos e os classificaram quanto à prioridade de verificação de risco ambiental para

acompanhamento e controle. A Amoxicilina foi categorizada como “composto de maior risco” por sua grande quantidade de consumo, aplicabilidade em tratamentos antibacterianos, identificação em matrizes aquáticas e efeitos adversos em organismos.

O Clavulanato de potássio foi categorizado como “potencialmente tóxico, mas com limitação de dados”. A ausência de dados ecotoxicológicos não permitiu que esses autores classificassem o risco ambiental desse composto, no entanto, alertam a necessidade de dados adicionais sobre esse fármaco, uma vez que é consumido em grandes quantidades por sua associação com a Amoxicilina (Besse & Garric, 2007). Entretanto, a partir dos resultados de TRCVN pode-se observar que de forma isolado ou associado à Amoxicilina, o Clavulanato de potássio é de alto risco ambiental e pode causar efeitos nocivos à organismos e ao ambiente aquático.

O protocolo de avaliação de risco ambiental EMEA (2006) aplicado acima preconiza que devem ser realizados ensaios que avaliem os possíveis efeitos agudos dos fármacos, e apenas mediante a apresentação de risco deve-se proceder para a etapa seguinte e realizar ensaios de efeitos crônicos. No entanto, a diversidade nos mecanismos de ação de cada composto e a metodologia aplicada para avaliação dos efeitos podem fornecer dados com variação nas respostas. Desde a criação do protocolo EMEA houve avanço nas análises e padronização de métodos mais sensíveis que podem fornecer respostas diferentes e assegurar a prevenção dos efeitos sem consequências para toda a biota, como a aplicação de ensaios com biomarcadores.

No Brasil os estudos para detecção e compreensão da presença de fármacos no ambiente é assunto relativamente novo e há muitas informações que são incompletas na área científica e acadêmica (Umbuzeiro *et al.*, 2011). Habitualmente adaptamos protocolos e guias de agências internacionais, contudo é necessário que criemos documentos que retratem a realidade de nosso país como: clima, condições físico-químicas, organismos-teste, etc. Estudos acadêmicos buscam sanar essas deficiências. Umbuzeiro *et al.* (2011) com base em documento internacional, elaboraram um protocolo de derivação do critério de qualidade de água para proteção da vida aquática, mas resultados de efeito como bioacumulação, alterações de sistema endócrino e genotoxicidade não são contemplados nesse documento, deixando-o restrito àquilo que já é avaliado, como: sobrevivência, inibição da emissão de luz em organismos fotossintetizantes, crescimento, desenvolvimento embriolarval, efeitos sobre a fertilização e reprodução. No que se refere às leis há um tempo grande no período para as atualizações legislativas e enquanto não são

determinados valores específicos de concentrações ambientalmente seguras de descarte de compostos não se pode fazer controle efetivo.

De acordo com os resultados obtidos, a Amoxicilina possivelmente está associada aos processos de desestabilização celular, uma vez que é o mecanismo de ação necessário para combater patógenos nocivos, no entanto, pôde-se observar no presente estudo que os mexilhões, organismos não alvos, são afetados pelo fármaco.

A Amoxicilina também é relatada na literatura por causar efeitos adversos em algas. Esse importante grupo está na base da cadeia alimentar servindo como alimento a diversos organismos, dentre os quais se encontram os bivalves. Supressões no crescimento algáceo podem acarretar em menor oferta alimentar aos demais organismos ocasionando um desequilíbrio ecológico (Lutzholtz *et al.*, 1999).

Os efeitos nocivos causados pelo Clavulanato de potássio possivelmente estão associados ao mesmo comportamento e mecanismo de ação da Amoxicilina.

O processo de ruptura da membrana lisossômica está relacionado à morte celular e outros processos fisiológicos importantes para a manutenção dos organismos. Tais processos incluem regeneração de tecidos e viabilidade de gametas. De acordo com Ringwood *et al.* (2004) em estudo com ostras, embriões oriundos de organismos adultos com grande percentual de desestabilização da membrana celular, tinham seu desenvolvimento afetado. Em mexilhões as atividades lisossômicas estão relacionadas às reações imunológicas (Nascimento *et al.*, 2008) e a estabilidade da membrana lisossômica serve como indicativo de status de saúde dos organismos (OSPAR, 2013).

Devido à importância ecológica que os resultados de desestabilização da membrana lisossômica fornecem, a possibilidade de prognóstico ambiental e a aplicabilidade que permite utilizar esse biomarcador em diferentes organismos de regiões climáticas diferentes, países europeus já aplicam essa ferramenta em monitoramento ambiental. A convenção para a proteção do ambiente marinho do Atlântico nordeste (OSPAR em inglês) faz menção desse biomarcador em relatório, apresentando as vantagens de utilização e o Programa de meio ambiente das Nações Unidas (UNEP em inglês) contempla o uso no monitoramento de impacto no programa de poluição do Mediterrâneo (MEDPOL) (OSPAR, 2013).

No presente estudo, apenas uma interação medicamentosa foi avaliada, no entanto, no ambiente aquático há uma vasta diversidade de compostos e seus subprodutos disponíveis. Diante desse contexto, observa-se a necessidade de monitoramento ambiental que determine a toxicidade dos fármacos aos organismos e ao ambiente, bem como o uso adequado de ensaios que possam auxiliar na antecipação de efeitos adversos, e assim compreender melhor a ocorrência de danos aos organismos e fornecer dados para futuras tomadas de decisões políticas.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo atingiu os objetivos propostos. Foi observado nas avaliações dos compostos isolados e em associação que os fármacos Amoxicilina e Clavulanato de potássio são citotóxicos aos mexilhões *Perna perna* em baixas concentrações (ng.L^{-1}).

A Amoxicilina é mais tóxica que Clavulanato de potássio individualmente, contudo, quando há a associação dos fármacos, o Clavulanato de potássio se apresenta mais tóxico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, G. A.; WEBER, R. R. Fármacos na represa Billings. *Revista Saúde e Ambiente*, v. 6, n.2, p. 7-13, 2005.

ALMEIDA, J.E.; MEDEIROS, I. D.; CESAR, A.; Pereira, C. D. S. Estabilidade da membrana lisossômica de hemócitos como biomarcador de qualidade ambiental em zonas estuarinas e costeiras. In: XXI Congresso de Iniciação Científica PIBIC - Universidade Federal de São Paulo, 2013, São Paulo. ANAIS PIBIC 2013 - UNIFESP, 2013. v. 1. p. 35.

AMÉRICO, J. H. P.; ISIQUE, W. D.; MINILLO, A.; CARVALHO, S. L. Fármacos em uma estação de tratamento de esgoto na região Centro-Oeste do Brasil e os riscos aos Recursos Hídricos. *RBRH-Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 17, n.3, p. 61-67, 2012.

ANDREOZZI, R., CAPRIO, V., CINIGLIA, C., DE CHAMPDOREA, M., LO GIUDICE, R., MAROTTA, R & ZUCCATO, E. Antibiotics in the Environment: Occurrence in Italian STPs, Fate, and Preliminary Assessment on Algal Toxicity of Amoxicillin. *Environ. Sci. Technol.*, v. 38, p. 6832-6838, 2004.

ANDREOZZI, R., CANTERINO, M., MAROTTA, R. & PAXEUS, N. Antibiotic removal from wastewaters: The ozonation of Amoxicillin. *Journal of Hazardous Materials.*, v. 122, p. 243–250, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Tratamento das infecções comunitárias e relacionadas à assistência à saúde diante da resistência microbiana.** Disponível em: <
http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo3/otimizacao2.htm>. Acesso em: Abril, 2016.

BABIĆ, S.; HORVAT, A. J. M.; PAVLOVIĆ, D. M.; MALAN, M. K. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends in analytical chemistry*. v. 26 n. 11, 2007.

BARICCATTI R. A.; SOUZA M. L.; LINDINO C. A.; ROSA, M. F. Degradação hidrolítica e fotoquímica de Amoxicilina na presença de betaciclodextrina. *Eclet. Quím.*, v. 33 n. 04, 2008.

BENTO, N. R. *Avaliação ecotoxicológica dos fármacos fluoxetina e amoxicilina empregando o mexilhão marinho Perna perna. (Linnaeus, 1758).* 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Santa Cecília, Santos – SP.

BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O. Kinetics studies on clavulanic acid degradation. *Biochem. Eng. J.* v. 23, p. 31-36, 2005.

BESSE, J-P.; GARRIC, J. Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicology Letters.*, v. 176, p. 104-123, 2008.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova.*, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BRASIL a. Ministério do Meio Ambiente. **Convenção de Estocolmo**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/convencao-de-estocolmo>>. Acesso em: Jul, 2015.

BRASIL. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 44 de 26 de outubro de 2010*. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências.

BRASIL b. Ministério do Meio Ambiente. *Os nove novos POPs*, p. 1-15, 2010.

BRASIL. *CONAMA, Resolução Federal N.º 357*. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, Diário Oficial da União, de 17 de março de 2005. 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.

BRASIL. *CONAMA, Resolução Federal N.º 430*. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, Diário Oficial da União, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, A. P.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e aplicações*. 2ª edição. Ed. Rima, 2008.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB: *Relatório de balneabilidade. Qualidade das praias litorâneas do estado de São Paulo*. 2013.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB: *Relatório de balneabilidade. Qualidade das praias litorâneas do estado de São Paulo*. 2014.

CHRISTIAN, T.; SCHNEIDER, R. J.; FÄRBER, H. A.; SKUTLAREK, D.; MEYER, M. T.; GOLDBACH, H. E. 2003. Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters. *Acta hydrochim. hydrobiol.*, v. 31 (1), p. 36–44, 2003.

COOPER, E. R.; SIEWICKI, T. C. & PHILLIPS, K. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Science of the total environment*, v. 398, p. 26-33, 2008.

CORTEZ, F. S. *Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados marinhos*. 2011. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

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

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, A. P.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e aplicações*. 2ª edição. Ed. Rima, 2008.

DOW QUÍMICA. **O agente laranja**. Disponível em: <<http://www.dow.com/en-us/about-dow/issues-and-challenges/agent-orange>> Acesso em: Set, 2015.

DUARTE, L. F. A. **Impacto geno e citotóxico em populações do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Brachyura, Ucridae), em manguezais do estado de São Paulo, Brasil**. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro – SP.

DUVE, C.; BARSY, T.; POOLE, B.; TROUET, A.; TULKENS, P.; VAN HOOFF, F. Lysosomotropic agents. *Biochemical pharmacology*, v. 23, p. 2495-2537, 1974.

EMA - European Medicines Agency Pre-Authorisation Evaluation of Medicines for Human Use. EMA/CHMP/SWP/4447/00. 2006. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003978.pdf>

ESCHER, I. B.; BAUMGARTNER, R.; KOLLER, M.; TREYER, K.; LIENERT, J.; McARDELL, C. S. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Research*, v. 45, p. 75-92, 2011.

FONTES, M.; ABESSA, D. M.; MAZUR, W.; NOBRE, C. R.; SOUZA, A.; MORENO, B. B.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, F. H. & SEABRA, C. 2015. Effects of Diclofenac to the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758): a preliminary environmental risk assessment in Santos bay (Brazil). 2014. Setac Latin American 11th Biennial meeting, Buenos Aires, p. 85.

GASPAR, J. C. 2015. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Ibuprofeno: uma abordagem com múltiplos endpoints em parâmetros reprodutivos**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, Santos-SP.

GODOY A. A; KUMMROW F.; PAMPLIN P. A. Z. Ecotoxicological evaluation of propranolol hydrochloride and losartan potassium to *Lemna minor* L. (1753) individually and in binary mixtures. *Ecotoxicology*, v. 24, p. 1112-1123, 2015.

GOZLAN, I; ROTSTEIN, A. & AVISAR, D. Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: Identification and determination in the aquatic environment. *Chemosphere*, v. 91, p. 985-992, 2013.

GRANT, B. S.; WISEMAN, L. L. Recent history of melanism in American peppered moths. *The Journal of heredity*, v. 93(2), 2002.

HAGINAKA, J.; YASUDA, H.; UNO, T. & NAKAGAWA, T. Degradation of clavulanic acid in aqueous alkaline solution: isolation and structural investigations of degradation products. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 33, p. 218. 1985.

HICKMAN, C. P. Jr.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. *Princípios integrados de Zoologia*. 10ª. Ed. Rio de Janeiro, 2009.

KAUR, S. P.; RAO, R.; NANDA, S. Amoxicillin: A broad spectrum antibiotic. *Internacional journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. v. 3, p. 30-37, 2011.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, v. 75, p. 417-434, 2009.

LEE, Y-J.; LEE, S-E.; LEE, D-S & KIM, Y-H. Risk assessment of human antibiotics in Korean aquatic environment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 26, p. 216–221, 2008.

LE MINH, N.; KHAN, S. J.; DREWES, J. E.; STUETZ, R. M. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research*, v. 44, p. 4295- 4323. Jun, 2010.

LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Arch Environ Contam Toxicol*, v. 60, p. 385-393, 2011.

LOWE, D. M. & PIPE, R. K. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussels digestive cells: an in vitro study. *Aquatic toxicology*, v. 30, p. 357-365, 1994.

LOWE, D. M.; SOVERCHIAI, C. & MOORE, M. N. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology*, v. 33, p. 105-112, 1995.

LÜTZHOLFT, H. H. C.; HALLING-SØRENSEN, B & JØRGENSEN, S. E. Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 36, p. 1–6, 1999.

MARTINI, G. A. **Avaliação da citotoxicidade do Dietiltolamida (DEET) em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) irradiados e não irradiados com radiação gama de ⁶⁰Co.** 2013. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

MASTROTI, R. R. Testes de toxicidade com gametas de ouriço-do-mar (fertilização). In: NASCIMENTO A. I.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. *Métodos em ecotoxicologia marinha – Aplicações no Brasil*. Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. p. 91-97, 2002.

MATHIAS, A. J. C.; SOUZA, L. S.; CORTEZ, F. S.; PEREIRA, C. D. S. 2012. Avaliação dos efeitos tóxicos do fármaco Omeprazol sobre mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758). In XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Porto de Galinhas – PE.

MAZUR, W. A. **Avaliação de risco ambiental do fármaco Paracetamol na Baía de Santos, SP.** 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Santa Cecília, Santos – SP.

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

NASCIMENTO A. I.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. *Métodos em ecotoxicologia marinha – Aplicações no Brasil*. Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. p. 91-97, 2002.

NASCIMENTO A. I.; PEREIRA, S. A. & LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como Instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO, A. P.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e aplicações*. 2ª edição. Ed. Rima, 2008.

NOGUEIRA, L. **Influência da hipóxia em respostas bioquímicas de mexilhões *Perna perna* expostos ao biodiesel B5**. 2013. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto – SP.

NURMOHAMADI, M.; POURGHASSEM, H. Clavulanic acid production estimation based on color and structural features of *Streptomyces clavuligerus* bacteria using self-organizing map and genetic algorithm. *Computer methods and programs in medicine*. v. 114, p. 337-348, 2014.

OLIVEIRA, J. H. H. L.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O. BARBOZA, M. Ácido clavulânico e cefamicina C: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009.

OLIVEIRA, R.; McDONOUGH, S.; LADEWIG, J. C. L.; SOARES, M. V. M. A.; NOGUEIRA, A. J. A. & DOMINGUES, I. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 36, p. 903-912, 2013.

OSPAR COMMISSION: *Background document and technical annexes for biological effects monitoring, Update 2013*. 2013.

OTOMO, J. I. **Contribuição antrópica na qualidade das águas da represa do Guarapiranga. Um estudo sobre interferentes endócrinos**. 2015. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

OZCENGİZ, G & DEMAİN, A. L. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnology Advances*, v. 31, p. 287–311, 2013.

PAN, X.; DENG, C.; ZHANG, D.; WANG, J.; MU, G. & CHEN, Y. Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis* sp. characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. *Aquatic Toxicology*, v. 89, p. 207–213, 2008.

PEREIRA, C. D. S.; MARTÍN-DÍAZ, M. L.; ZANETTE, J.; CÉSAR, A.; CHOUERI, R. B.; ABESSA, D. M. S.; CATHARINO, M. G. M.; VASCONCELLOS, M. B. A.; BAINY, A. C. D.; SOUSA, E. C. P. M.; DEL VALLS, T. A. Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 1257-1264, 2011.

PEREIRA, C. D. S.; ABESSA, D. M. S.; CHOUERI, R. B.; ALMAGRO-PASTOR, V.; CÉSAR, A.; MARANHO, L. A.; MARTÍN-DÍAZ, M. L.; TORRES, R. J.; GUSSO-CHOUERI, P. K.; ALMEIDA, J. E.; CORTEZ, F. S.; MOZETO, A. A.; SILBIGER, H. L. N.; SOUSA, E. C. P. M.; DEL VALLS, T. A.; BAINY, A. C. D. Ecological relevance of sentinels' biomarker responses: A multi-level approach. *Marine Environmental Research*, v. 96, p. 118-126, 2014.

PEREIRA, C. D. S.; MARANHO, L. A.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, F. H.; SANTOS, A. R., RIBEIRO, D. A., CÉSAR, A.; GUIMARÃES, L. L. Occurrence of pharmaceuticals

and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Science of the total environment*. V. 548-549, p. 148-154, 2016.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P; Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *R. Bras. Ci. Solo.*, v. 34, p. 601-616, 2010.

RINGWOOD, A. H.; HOGUET, J.; KEPPLER, C.; GIELAZYN, M. Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters – *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*. v. 58, p. 151-155, 2004.

SABESP. **Tratamento de esgotos.** Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=49>> Acesso em: Set. 2015

SABESP. **Tratamento de água.** Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=47>> Acesso em: Abril 2016

SAUDAGAR, S. P.; SURVASE, A. S.; SINGHAL, R, S. Clavulanic acid: a review. *Biotechnology advances*, v. 26, p. 335-351, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECOTOXICOLOGIA (SETAC). Disponível em: <http://ecotoxbrasil.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=16&Itemid=73>. Acesso em: Set, 2015.

SHIHOMATSU, H. M. **Desenvolvimento e validação de metodologia SPE-LC-MS/MS para a determinação de fármacos e droga de abuso nas águas da represa Guarapiranga. São Paulo/SP, Brasil.** 2015. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water, air, soil pollution*. v. 206, p. 57-67, 2010.

SOUZA, I. C.; Jr. SANTANA, P. J.; ALMADA, B. V. P; ZARONI, L. P.; MATSUMOTO, S. T. Avaliação da resposta celular do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na Baía do Espírito Santo por meio do tempo de retenção do vermelho neutro (TRVN). *Natureza on line*, v. 9, p. 54-58, 2011.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R-D.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the Total Environment*, v. 225, p. 135-141, 1999.

UMBUZEIRO, G.; SIMONE, S.; de DEUS, A. C. C. R.; ALTAFIN L.; VEIGA, L. C.; ALVES L. S. N.; CASTRO M. L. M. P.; LAMPARELLI M. C.; VON DER OHE, P. C.; ARAUJO, R. P. A.; VARGAS, V. M. F. **Protocol for water quality criteria derivation for the protection of aquatic life in Brazil.** p. 60, 2011.

US EPA – **United States Environmental Protection Agency.** Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth edition. EPA-821-R-02-012., p. 266, 2002

VALVO, L.; MANNA, L.; ALIMENTI, R.; ALIMONTI, S.; BERTOCCHI, P.; CIRANNI E. Amoxicillin sodium–potassium clavulanate: evaluation of gamma radiation induced

effects by liquid chromatography on both the individual drugs and their combination. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, v. 21, p. 9-14, 1999.

WATKINSON, A. J.; MURBYC, E. J. & COSTANZO, S. D. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water research.*, v. 41, p. 4164-4176, 2007.

World Health Organization (WHO). **Dioxins and their effect on human health.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs225/en/>> Acesso em: Set, 2015.

YOSHIMINE, R. V.; CARREIRA, R. S. PAHs in cultured mussels *Perna perna* from a Southeastern Brazilian Bay. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 23, n. 8, p. 1429-1436, 2012.

ZAGATTO, A. P.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e aplicações.** 2ª edição. Ed. Rima, 2008.

ZARONI, L. P. Testes de toxicidade com embriões do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758). In: NASCIMENTO A. I.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. *Métodos em ecotoxicologia marinha – Aplicações no Brasil.* Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. p. 91-97, 2002.

ZOU, S.; XU, W.; ZHANG, R.; TANG, J.; CHEN, Y.; ZHANG, G. Occurrence and distribution of antibiotics in coastal water of Bohai Bay, China: impacts of river discharging and aquaculture activities. *Environmental pollution.*, v. 159, p. 2913-2920, 2011.