

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE
DEECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS
MESTRADO EM ECOLOGIA

WESLEY DE ALMEIDA MAZUR

AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL DO FÁRMACO PARACETAMOL NA
BAÍA DE SANTOS, SP

SANTOS/SP

2015

WESLEY DE ALMEIDA MAZUR

**AVALIAÇÃO DO RISCO AMBIENTAL DO FÁRMACO PARACETAMOL NA
BAÍA DE SANTOS, SP**

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob a orientação do Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira.

SANTOS /SP

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

Mazur, Wesley de Almeida.
Avaliação do risco ambiental do fármaco paracetamol na baía de Santos, SP / Wesley de Almeida Mazur-- 2015.
94 p.

Orientador: Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2015.

1. Ecotoxicologia. 2. Paracetamol. 3. Análise de Risco. 4. Fármacos. 5. Baía de Santos. I. Prof. Dr. Pereira, Camilo Dias Seabra, orient. Avaliação do risco ambiental do fármaco paracetamol na baía de Santos, SP.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

*Dedico este trabalho a toda minha
família pelo incansável apoio e a todas as
mãos, mentes e corações envolvidos.*

AGRADECIMENTO

Primeiramente a DEUS, por iluminar meu caminho e colocar em minha vida pessoas tão especiais.

À minha mãe Maria pelo apoio, carinho, amor, e por tudo que fez e faz por mim, sendo uma das responsáveis pelo meu progresso e inspiração para os próximos passos. Obrigado por todos os ensinamentos e incentivos.

Ao meu pai Enio, por tantos momentos memoráveis e ensinamentos pra vida toda e que um dia terei o prazer de passá-los adiante,

Aos meus irmãos (Deni, Stanley e Kevin) por todos os momentos, todos os sorrisos e todo o amor. Hoje, cada um seguindo seu caminho separado, mas com os corações sempre unidos.

Por todo amor e apoio familiar, sempre presente e recíproco, peça chave para o bem estar e a felicidade plena.

À minha namorada Elaine por entender e aturar meus momentos de estresse e reclamações, por todo companheirismo, confiança e apoio imprescindíveis. Ao João Murilo e toda sua família que me recebem de braços abertos.

Ao meu tio Oswaldo “Pardal” (*in memoriam*) que não chegou a ver o início dessa jornada, mas que deixou um sorriso inesquecível e saudade em muitos corações. Aos meus primos Gabriel e Lucas e a minha tia Ana pela força pra seguir em frente.

Pelos cuidados e carinhos que não faltaram de minhas avós Odolvira e Maria (*in memoriam*).

A toda minha família, tios, tias, primos e primas.

Aos meus amigos de Itararé (Donalvan, Romulo, Rodrigo, Apolo, Eron, Marco, João, Leandro, Glauko, Alan, Duh, Jair, Erich, Jean, Gabriel, Diogo, Carlinhos, Marcos, Higor, Israel, T. Ospedal, os demais Thiagos e tantos outros que não citei aqui, mas que também foram sempre presentes em minha vida) pelas risadas, churrascos, trilhas, músicas, sinuca, videogame, futebol... Por sempre estarem ao meu lado em qualquer que seja a situação.

À CAPES pela concessão da Bolsa que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do mestrado pelos ensinamentos compartilhados e tempo dedicado.

À equipe ECOTOX, em nome do Aldo, Augusto, Camilo, Rodrigo, Fernando e Fábio por manterem o ambiente como uma família, sempre incentivando, ensinando e respeitando a todos por igual, pelas oportunidades oferecidas, por terem me acolhido no laboratório desde a graduação e pela amizade e reconhecimento que não se restringem somente a universidade.

Ao equipe da UNESP –SV (Luciane, Paloma, Lucas, Lucas Buruaem, Denis, Bruno) por toda paciência que tiveram comigo ao me ensinarem e sempre dispostos a ajudar.

Aos colegas de mestrado (Rubia, Fernanda, Janaina, Thainá, Bruna, Paloma, Yula, Giovanna, Camila, Nelson, Maurici, Rogério, Vinícius) obrigado pela companhia, conversas e idéias, sucesso a todos.

Aos professores Walber e Luciana, por acreditarem em mim e pelas oportunidades para dar continuidade aos trabalhos.

Aos amigos de Santos desde a graduação (Arthur, Larissa, Vanessa, Becarelli, Índio, Felix, Thiago, Maicon, Eduardo, Carol e Pedro)

Ao Corinthians pela oscilação de emoções, sempre invejado e insuperável... Todo Poderoso Timão.

Aos funcionários da universidade Vera e Jorge, pelas conversas descontraídas e boas risadas.

Às secretárias Sandra e Imaculada, sempre atenciosas e dedicadas.

A toda família Bueno (familiares e amigos) que desde o momento que cheguei em Santos me acolheram como um filho.

Aos amigos de laboratório (Caio, Amanda, Mayana, Aline, Beatriz, Flavia, Juliana, Bea) por toda ajuda oferecida em dias de testes, pelas conversas sempre produtivas e pela amizade construída.

Agradeço ao Camilo, meu orientador, por todas conversas, orientações, e conselhos que levarei pra toda vida. Por me mostrar esse mundo acadêmico e me ajudar nos primeiros passos. Minha eterna gratidão, respeito e admiração.

Agradeço a todos os desafios e imprevistos que surgiram, pois com eles pude crescer e aprender.

Obrigado a todos que me apoiam e acreditam em mim.

“Seja quem você for, seja qualquer posição que você tenha na vida, do nível altíssimo ao mais baixo do social, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

RESUMO

A interferência antrópica em áreas costeiras como o despejo de efluentes sem o devido tratamento é uma das principais fontes de poluição dos ambientes marinhos. Os fármacos e produtos de higiene e cuidados pessoais são constituintes desses efluentes e não há uma legislação específica para esta classe de poluentes que regularize o seu descarte. O Paracetamol é um anti-inflamatório não esteroidal com propriedades antialérgicas e antipiréticas. Por ser um composto bioativo, a interação com organismos não alvo pode ocorrer. A fim de realizar uma análise do risco oferecido por esse fármaco ao meio marinho, este estudo utilizou uma metodologia escalonada denominada “TIER”, consistindo na quantificação do Paracetamol ao entorno do Emissário Submarino de Santos e na avaliação dos efeitos adversos da exposição ao composto utilizando o molusco bivalve *Perna perna* como modelo. As amostras de água superficial analisadas identificaram a presença do Paracetamol entre 0,02 e 0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$. O ensaio agudo realizado não possibilitou a estimativa de uma CE_{50} nas concentrações testadas, porém no ensaio crônico 20,58 mg.L^{-1} foi capaz de inibir em 50% o desenvolvimento embrionário dos embriões expostos por 48h. A estabilidade da membrana lisossômica foi afetada a partir de exposições de 48 h a 300 ng.L^{-1} . Efeito genotóxico (*DNA strand break*) também foi evidenciado em brânquias de organismos expostos por 48h a concentrações de 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A análise de risco demonstrou-se como baixo quando utilizado os resultados dos ensaios de desenvolvimento embrionário ($\text{QR} = 0,0006$), porém, quando utilizado o ensaio de estabilidade de membrana lisossômica, o risco foi caracterizado como alto ($\text{QR} = 100$) para a baía de Santos. Um tratamento eficiente deve ser empregado para a remoção do Paracetamol e outros fármacos presentes nos efluentes, bem como uma legislação específica estabelecendo padrões seguros para emissão deste composto nos sistemas aquáticos.

Palavras chave: Ecotoxicologia. Paracetamol. Análise de Risco. Fármacos. Baía de Santos.

ABSTRACT

The anthropogenic interference in coastal zones, such as untreated domestic effluent, is one of the main sources of pollution in marine environments. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) are constituents of these effluents and there is no specific legislation for this class of pollutants that regularize their disposal. Paracetamol is a nonsteroidal anti-inflammatory with antipyretic and hypo-allergenic properties. Being a bioactive compound, the interaction with non-target organisms can occur. In order to perform an environmental risk assessment of this compound to the marine environment, this study employed a tiered methodology entitled "Tier", which consisting in the quantification of Paracetamol in the superficial water surrounding submarine sewage outfall of Santos bay and assessment of adverse effects to the bivalve mollusk *Perna perna*. The surface water samples analyzed identified the presence of paracetamol between 0.02 and 0.03 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The acute assay did not estimate an EC_{50} in tested concentrations, but in the chronic assay an $\text{IC}_{50} = 20.58 \text{ mg.L}^{-1}$ was able to inhibit the embryolarval development of 50% of embryos exposed for 48 hours. The stability of lysosomal membrane was affected in mussels exposed to 300 ng.L^{-1} for 48 hours. Genotoxic effect (DNA strand break) was found in the gills of adult mussels exposed to 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ by 48 h. The risk quotient (RQ) was shown as "low" when the results of embryolarval development assays were considered ($\text{RQ} = 0.0006$), however, when the lysosomal membrane stability assay was employed, the risk was characterized as high ($\text{RQ} = 100$) for the Bay of Santos. An effective treatment must be employed for removal of Paracetamol and other PPCPS present in domestic effluents, as well as specific legislation establishing environmental standards of this compound in aquatic systems.

Keywords: Ecotoxicology. Paracetamol. Risk Assessment. Pharmaceuticals. Santos Bay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Nível de organização biológica, tempo de resposta e relevância ecológica dos ensaios ecotoxicológicos.	20
Figura 2. Estrutura química do Paracetamol	25
Figura 3. Caracterização de Risco “TIER”	30
Figura 4. Mexilhão marinho <i>Perna perna</i> (Linnaeus, 1758)	32
Figura 5. Praia Toque Toque Grande – São Sebastião / SP	33
Figura 6. Pontos de amostragem.	34
Figura 7. Disposição de placas de Petri em bandeja.	38
Figura 8. Métodos de indução integrados: Fluxo Contínuo + Indução Termal.	38
Figura 9. Distinção visual dos gametas.	39
Figura 10. Óvulos observados em aumento de 100x.	41
Figura 11. Análise de larva véliger (Aumento de 400x).	45
Figura 12. Aquário de exposição.	45
Figura 13. Localização do músculo adutor posterior (em destaque)	49
Figura 14. Hemócitos expostos ao vermelho neutro (Aumento de 400x)	50
Figura 15. Ensaio agudo – Taxa de fertilização	58
Figura 16. Ensaio crônico - Taxa de desenvolvimento embriolarval normal. ...	60
Figura 17. Tempo médio de retenção do corante Vermelho Neutro.	61
Figura 18. Danos ocasionados ao DNA após 48 horas de exposição.	62
Figura 19. Danos ocasionados ao DNA após 96 horas de exposição.	63
Figura 20. Lipoperoxidação após 48 horas de exposição.	64
Figura 21. Lipoperoxidação após 96 horas de exposição.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Presença e concentração de micropoluentes em matrizes ambientais ao redor do mundo.	23
Tabela 2. Características físicas e químicas do Paracetamol.	26
Tabela 3. Ranking de Risco	31
Tabela 4. Preparo das concentrações-teste ensaio agudo.	40
Tabela 5. Parâmetros necessários para Ensaio de Fertilização.....	40
Tabela 6. Preparo das concentrações-teste ensaio crônico.....	42
Tabela 7. Preparo das concentrações-teste ensaio TRCVN.....	43
Tabela 8. Parâmetros necessários para o Ensaio Embriolarval.	44
Tabela 9. Parâmetros necessários para o Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN).....	46
Tabela 10 - Critérios para diferenciação de células saudáveis e células estressadas.	51
Tabela 11 – Dados das análises físico-químicas inicial/final	57
Tabela 12 – Concentrações de Paracetamol na Baía de Santos	57
Tabela 13. Ensaio de Sensibilidade do <i>Perna perna</i> com substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio.	59
Tabela 14. Concentrações de efeito e CENO (mg.L ⁻¹) obtidas nos ensaios crônicos.....	59
Tabela 15. Tempo médio de retenção do corante vermelho neutro (min).	61
Tabela 16. Determinação do Quociente de Risco.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE's = Anti-inflamatório Não Esteroidais

CE50 = Concentração efetiva (50% dos organismos expostos)

CEO = Concentração de Efeito Observado

CENO = Concentração de Efeito Não Observado

CI50 = Concentração de inibição (50% dos organismos expostos)

ERO = Espécies Reativas de Oxigênio

ETA = Estação de Tratamento de Água

ETE = Estação de Tratamento de Esgoto

FPHCP's = Fármacos e Produtos de Higiene e Cuidados Pessoais

MEC = Concentração Ambiental Mensurada (Measured Environmental Concentration)

OD = Oxigênio Dissolvido

PNEC = Concentração Previsivelmente Sem Efeito (Predicted No Effect Concentration)

QR = Quociente de Risco

TRCVN = Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Ecotoxicologia: histórico, aplicações e ensaios	17
1.2 Fármacos no ambiente: ocorrência e implicações	22
1.3 Paracetamol	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Avaliação de Risco Ambiental (TIER)	29
3.2 Organismo-teste (<i>Perna perna</i> - Mollusca, Bivalvia)	31
3.3 Água de manutenção e diluição	33
3.4 Processamento TIER 0	33
3.4.1 Coleta e acondicionamento das amostras de água	33
3.4.2 Análise Quantitativa	34
3.4.3 Preparo de Padrão – 8 bromo cafeína (8-BC)	34
3.4.4 Preparo das amostras	35
3.4.5 Ativação da Coluna e lavagem do cartucho	35
3.4.6 Eluição e Armazenamento	36
3.4.7 Análise quantitativa por LC/MS/MS	36
3.5.1 Limpeza dos organismos e obtenção de gametas	37
3.6 Processamento TIER 1	39
3.6.1 Preparo de concentrações-teste	39
3.6.2 Ensaio de toxicidade aguda (Fertilização) com mexilhão marinho <i>Perna perna</i> (Mollusca, Bivalvia)	40
3.7 Processamento TIER 2 – Efeitos subletais	41
3.7.1 Preparo de concentrações-teste	41
3.7.1.1 Ensaio crônico	42
3.7.1.2 Ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro	42
3.8 Efeito crônico e subletal	43
3.8.1 Ensaio para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) com <i>Perna perna</i> (Mollusca, Bivalvia)	43

3.8.2 Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN)	45
3.8.2.2 Preparo das Lâminas.....	46
3.8.2.3 Preparo da Solução Fisiológica	47
3.8.2.4 Preparo do Vermelho Neutro.....	47
3.8.2.5 Extração e Manuseio da Hemolinfa.....	48
3.8.2.6 Incubação e Leitura do Ensaio	49
3.8.2.7 Tempos de exposição.....	51
3.8.3 Extração e análise dos tecidos biológicos	51
3.8.3.1 Danos em DNA.....	52
3.8.3.2 Preparo de soluções.....	53
3.8.3.3 Preparo e leitura de amostras	54
3.8.3.2 Lipoperoxidação	54
3.8.3.3 Preparo de soluções.....	55
3.8.3.4 Preparo e leitura de amostras	55
3.9 Análises Estatísticas	55
4 RESULTADOS	57
4.1 Análises físico-químicas.....	57
4.2 TIER 0 – Quantificação do Paracetamol	57
4.3 TIER 1 – Ensaios de Ecotoxicidade Aguda.....	57
4.4 TIER 2 – Ensaios de Efeitos Subletais.....	59
4.4.1 Sensibilidade dos organismos	59
4.4.2 Ensaio Crônico – Desenvolvimento Embriolarval	59
4.4.3 Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN)	60
4.4.3 Danos em DNA.....	62
4.4.4 Lipoperoxidação.....	63
4.5 Avaliação de Risco de acordo com EMEA (2006).....	65
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXO	94

1 INTRODUÇÃO

A água é um bem indispensável a qualquer forma de vida na Terra, atuando tanto na manutenção quanto na constituição dos organismos.

Ao longo dos anos todo o desenvolvimento da humanidade se deu ao entorno de corpos d'água que permitiram a instalação de uma sociedade que fez do recurso hídrico uma força motora de trabalho em moinhos, na irrigação agrícola, no transporte de cargas, na geração de eletricidade, lazer, na dessedentação de animais, e principalmente no abastecimento público e industrial (BACCI e PATACA, 2006).

O modelo de consumo atual, o desenvolvimento tecnológico e principalmente a expansão urbana desenfreada tendeu-se a dar sem tomar os devidos cuidados com o meio ambiente que tem sido impactado pelas diversas atividades antrópicas. As consequências geradas não limitam-se ao ambiente em si, mas afetam também todos que dependem dele, incluindo os humanos.

Nos últimos anos a ocupação urbana em ambientes costeiros tem-se intensificado. De acordo com o Censo Demográfico 2010, o Brasil possui uma população de 190.755.799 habitantes, sendo que 26,58% ocupam municípios da zona costeira. Partes significativas dessa população estão ocupadas em atividades, direta ou indiretamente, ligadas ao turismo, produção de petróleo e gás natural, pesca e demais atividades portuárias (IBGE, 2011).

Nesse contexto, é inevitável um aumento na quantidade de resíduos gerados e consequentemente descartados. O despejo de efluentes tanto industriais quanto domésticos sem o devido tratamento tende a ser uma das principais fontes de poluição do ambiente marinho (ABESSA et al., 2005).

Segundo a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) as cidades do litoral paulista utilizam-se de emissários submarinos para a disposição final de seus efluentes. Ao todo são 7 emissários em atividade, sendo o de Santos o que possui a maior vazão ($7\text{m}^3/\text{s}$). O efluente passa por uma estação de pré condicionamento, destinada a remoção de sólidos grosseiros, areia e redução de matéria orgânica e organismos patogênicos antes de seu lançamento em alto mar (CETESB, 2004). Estes procedimentos

tornam-se inadequados frente aos diversos compostos presentes que a partir deste momento são despejados diretamente no ambiente marinho.

Em um estudo realizado foram quantificados os compostos constituintes do emissário submarino da cidade de Santos, onde foram encontrados compostos aromáticos como o benzeno, xileno, tolueno, etilbenzeno, uma série de metais, dentre eles, o cádmio, cobre, cromo hexavalente, níquel, mercúrio, além de amônia (NH_3) e amônio (NH_4) e óleos e graxas em valores superiores aos permitidos (RACHID, 2002 apud ABESSA et al., 2005). Foi analisado também o sedimento ao entorno do emissário submarino de Santos, onde se confirmou a presença dos metais Cádmio, Cobalto, Cobre, Níquel, Chumbo, Vanádio, Zinco, Hidrocarboneto Policíclico Aromático (HPAs) e Bifenilas Policloradas (PCBs) (CESAR et al., 2006)

O emissário torna-se também uma fonte para a introdução de compostos pertencentes à classe dos Fármacos e Produtos de Higiene e Cuidados Pessoais (FPHCP's). A ocorrência dessas substâncias no ambiente aquático está intimamente relacionada ao estilo de vida da sociedade moderna, aos padrões de consumo e ao envelhecimento da população. Estes fatores exigem, em níveis mais elevados, o uso dos FPHCP's (ELLIS, 2006).

Atualmente, estudos ecotoxicológicos têm sido realizados em diferentes partes do mundo para se identificar fármacos potencialmente perigosos para o meio ambiente, porém, os dados disponíveis na literatura são insuficientes frente a variedade de compostos existentes. A ocorrência desses fármacos residuais em águas superficiais e subterrâneas, bem como em sedimentos, demonstra a necessidade de estudos que determinem os efeitos tóxicos dessas substâncias no ambiente (BILA e DEZOTTI, 2003).

No ano de 2006 foi publicada uma diretiva elaborada pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA – European Medicines Agency) na sua atribuição de supervisão dos medicamentos e proteção da saúde pública e animal. Esta diretiva trata de recomendações e procedimentos para uma avaliação de risco ambiental fornecida pelos medicamentos (EMA, 2006).

Esta diretiva trata de etapas em camadas (TIER) nas quais as análises tornam-se cada vez mais refinadas, numa primeira etapa (TIER 0) estimam-se

possíveis concentrações ambientais baseadas em informações físico-químicas do composto ou através de mensurações diretas nas matrizes de interesse. Em seguida (TIER I) são tomadas análises ecotoxicológicas agudas para conhecer danos irreversíveis e imediatos dessa exposição da biota ao contaminante e numa terceira etapa (TIER II) são avaliados os efeitos crônicos para conhecer mais detalhadamente possíveis alterações fisiológicas que possam vir a prejudicar o equilíbrio ecossistêmico.

Em âmbito nacional, o Paracetamol é um analgésico prescrito por profissionais da área da saúde e também de venda livre sem a necessidade de receita médica, o que o torna um composto popular muito utilizado. O mesmo encontra-se inserido na Relação de Medicamentos Essenciais - RENAME. Este documento serve de instrumento básico para a elaboração das listas estaduais e municipais segundo sua situação epidemiológica, para a orientação da prescrição médica, para o direcionamento da produção farmacêutica e para o desenvolvimento científico e tecnológico (BRASIL, 2010).

Diante deste contexto, para a realização de uma avaliação de risco ambiental do Paracetamol considerando uma metodologia escalonada denominada “Tier” (EMEA, 2006), foram identificados e quantificados a presença do composto no entorno do lançamento do emissário submarino de Santos, e posteriormente empregados ensaios de toxicidade aguda e crônica, bem como de citotoxicidade através do tempo de retenção do corante vermelho neutro, genotoxicidade a partir das quebras simples de DNA (strand break) e possíveis danos ocasionados pelo estresse oxidativo como a peroxidação lipídica, avaliando assim os efeitos subletais sobre o mexilhão marinho *Perna perna*, possibilitando uma análise dos primeiros sinais de efeitos biológicos (“early warning”) adversos em níveis de organização biológica menores, considerando o possível mecanismo de ação desta substância.

1.1 Ecotoxicologia: histórico, aplicações e ensaios

O termo Ecotoxicologia ou Toxicologia Ambiental foi proposto durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* realizada em 1969 em Estocolmo. Foi considerada como um dos ramos da Toxicologia e definida como o estudo dos efeitos tóxicos causados por

substâncias naturais ou sintéticas sobre o ecossistema e as comunidades animais e vegetais num contexto integrado (TRUHAUT, 1977).

Ao longo dos tempos novas definições foram designadas, mas sua idéia principal permanece a mesma, a de identificar os efeitos adversos que perturbações ambientais e xenobióticos causam ou possam vir a causar sobre os integrantes do ecossistema em foco. Considerando o equilíbrio existente na natureza, uma perturbação em qualquer um dos níveis tróficos pode vir a gerar uma desestabilização e comprometer toda a saúde ambiental e seus dependentes diretos e indiretos.

Diversos foram os episódios que ocorreram e levaram ao desenvolvimento dessa ciência. Alguns ganharam destaque como o momento pós segunda guerra mundial, com o uso acentuado do inseticida organoclorado DDT e suas diversas complicações ambientais. O DDT foi encontrado em aves, peixes e invertebrados marinhos evidenciando a sua persistência e transporte pelo ambiente e pela cadeia alimentar (BEYER e GISH, 1980; VERVEEN et al., 1967). Este evento levou ao que foi considerado como a primeira manifestação ecológica contra o uso indiscriminado do DDT, na forma do livro “Primavera Silenciosa” de Rachel Carson (1962).

A poluição aquática só recebeu devida atenção a partir do momento onde se atingiu um limite no qual foi possível visualizar os efeitos adversos sobre a biota e todo o ecossistema (FREIRE, 2008). Um evento notável foi a contaminação que ocorreu em 1956 na região de Minamata no Japão. Uma indústria que utilizava mercúrio como catalisador na fabricação de acetaldeído despejava seu efluente na baía de Minamata, onde a acumulação do mercúrio se deu pelos organismos aquáticos e posteriormente por ingestão humana causando mortes e síndromes neurológicas que ficaram conhecidas como “Doença de Minamata” (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Portanto, emprega-se a ecotoxicologia, que é uma ciência multidisciplinar e nos permite tanto avaliar efeitos ocorridos devido alguma alteração ambiental ou até mesmo prever impactos de produtos químicos antes mesmo de entrarem em contato com o ambiente. Para uma interpretação adequada é necessário a compreensão de fundamentos de ecologia, biologia,

química, bioquímica, fisiologia, oceanografia, limnologia, estatística, dentre outros (RAND, 1995).

No Brasil até meados de 1980 apenas análises químicas eram tomadas como padrões de qualidade ambiental, viu-se que somente isso não era suficiente, era necessário uma resposta biológica, resposta essa fornecida agora pela ecotoxicologia. Com isso, veio o desenvolvimento em pesquisas voltadas a escolha dos organismos a serem usados nos ensaios que fossem mais adequados devido sua sensibilidade a exposição frente a um contaminante. Assim os critérios de qualidade de águas para proteção de vida aquática passaram a dar grande ênfase para os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda e principalmente crônica (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Os ensaios agudos são caracterizados pelo tempo de resposta curto e efeitos severos. Acontecem num período de exposição de geralmente 0 a 96 horas e consideram uma fase do ciclo de vida do organismo. Usa-se de critérios como mortalidade, imobilidade ou parâmetros ligados a reprodução como a fecundação. Os ensaios crônicos já são aqueles que abrangem uma parte significativa do ciclo de vida do organismo e avaliam os efeitos de uma exposição em longo prazo utilizando como critérios de análise parâmetros subletais como o desenvolvimento embrionário, comportamento ou a taxa de reprodução (NASCIMENTO et al., 2002).

Emprega-se o uso da estatística sobre esses resultados obtidos, podendo assim estimar a concentração que causa efeito adverso em uma dada porcentagem dos organismos expostos. Esses valores são expressos de acordo com o critério utilizado, sendo CL (concentração letal), CE (concentração efetiva) ou CI (concentração inibitória) e o tempo de exposição do ensaio. Assim a CL_{50-24h} é a concentração que foi letal a 50% dos organismos num período de exposição de 24 horas. Outro meio de expressar os resultados é através de CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado). A CENO expressa a maior concentração que foi testada e não se demonstrou prejudicial, já a CEO é a menor concentração onde o efeito já pode ser identificado (NASCIMENTO et al., 2002).

As análises ecotoxicológicas podem ser realizadas nos mais diversos níveis de organização biológica, desde a expressão de uma molécula, passando por células e processos fisiológicos até chegar em indivíduos, comunidades e ecossistemas (WALKER et al., 1997).

Quanto maior o nível de organização biológica, maior a relevância do ponto de vista ecológico. Porém, maior será também a incerteza ao associar os efeitos observados com um contaminante específico visto que os interferentes tanto naturais quanto antropogênicos serão ampliados e maior será o tempo necessário para se obter a resposta (FIG 1).

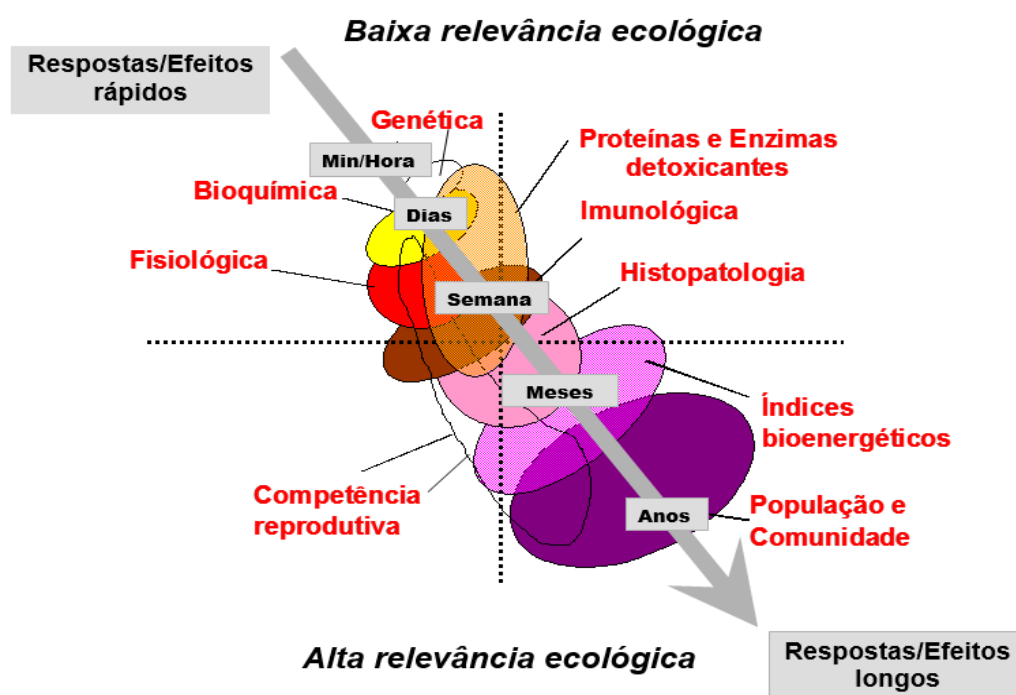


Figura 1. Nível de organização biológica, tempo de resposta e relevância ecológica dos ensaios ecotoxicológicos.

Fonte: Adams et al., 1990.

Existe uma dificuldade em relacionar os efeitos observados em menor nível hierárquico biológico com alterações no ecossistema como um todo, contudo, toda resposta biológica se manifesta inicialmente em nível molecular. Sendo assim, havendo parâmetros bioquímicos significativamente correlacionados a efeitos em níveis superiores, este pode se tornar uma ferramenta preventiva, evitando que seja necessária a obtenção de respostas mais severas (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Em 1987 surge o termo Biomarcadores, até então com ênfase para efeitos em humanos, posteriormente sendo adaptado e utilizado para organismos aquáticos. Biomarcadores podem ser definidos como alterações moleculares bioquímicas, celulares, ou fisiológicas nas células, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou efeito de um xenobiótico (LAM e GRAY, 2003).

De acordo com o seu propósito, pode ser classificado como biomarcador de exposição no qual se pode constatar a sua biodisponibilidade no ambiente, como a indução da metalotioneína, característica de exposição a metais. Existe também o biomarcador de efeito, este não permite identificar qual composto está atuando sobre o organismo, mas sim demonstra o estresse gerado pela exposição, estresse esse que pode ser reversível se a fonte do efeito cessar, caso contrário esse estresse pode se desenvolver em efeitos irreversíveis. Há ainda o biomarcador de suscetibilidade, o qual permite elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos organismos (AMORIM, 2003).

Muitos são os biomarcadores utilizados e ainda há trabalhos para desenvolver novos métodos ou confirmar a eficiência dessa classe tão diversa de ensaios. Seu uso tem sido muito aplicado para identificar o potencial tóxico de substâncias químicas isoladas e para o monitoramento ambiental com organismos nativos ou transplantados. Algumas das análises realizadas utilizam-se de ensaios genotóxicos como danos em DNA (*strand breaks*) e incidência de micronúcleos, citotóxicos avaliando a estabilidade da membrana lisossômica e a dosagem da atividade de enzimas responsáveis pelo mecanismo de detoxificação tanto de fase I (biotransformação) quanto de fase II (conjugação) e relacionadas a defesas antioxidantes (CORTEZ et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; SILVA et al., 2014; SOUZA et al., 2013).

A utilização dos biomarcadores em estudos ambientais tem sido tomada como forma de demonstrar que os organismos são expostos a poluentes e que a exposição está associada com a deterioração da saúde, levando a consequências como redução do crescimento e da atividade reprodutiva, as quais têm um elevado significado ecológico (FONTAÍNHAS-FERNANDES, 2005).

1.2 Fármacos no ambiente: ocorrência e implicações

Ao longo dos anos um avanço da química analítica permitiu a quantificação de compostos antes não detectados, estes foram denominados como compostos químicos emergentes ou micropoluentes (TERNES, 2010).

Englobado nessa classe de micropoluentes destacam-se os FPHCP's, característicos de ação antrópica, desenvolvidos para os mais diversos propósitos como medicina veterinária, práticas agrícolas, saúde humana e cosméticos.

A maioria dos fármacos são compostos bioativos, ou seja, exercem seu efeito terapêutico após interações específicas com uma biomacromolécula ou receptor. Além disso, possuem características lipofílicas e frequentemente apresentam baixa biodegradabilidade. Estas propriedades intrínsecas apresentam um grande potencial para bioacumulação e persistência no ambiente (VIEGAS JR et al., 2006; CHRISTENSEN, 1998). Assim sendo, o fármaco é sintetizado com um propósito biológico e a interação com organismos não alvos pode ocorrer no ambiente mesmo que expostos a baixas concentrações.

Dados clínicos indicam que dependente das doses ministradas, alguns FPHCP's podem apresentar determinadas proporções de excreção de seus princípios ativos inalterados, sendo essa excreção considerada como baixa ($\leq 5\%$), moderadamente baixa (6-39%), relativamente alta (40-69%) ou alta ($\geq 70\%$) (JJEMBA, 2006). Assim estes compostos são transportados por efluentes até os corpos hídricos receptores e diversos trabalhos relatam a ocorrência de FPHCP's nos mais diferentes compartimentos ambientais ao redor do mundo (TAB 1).

Uma característica relevante dessa classe de contaminantes é a sua cinética que tende a ser específica para cada fármaco, podendo gerar subprodutos da sua degradação que sejam ainda mais tóxicos ao ambiente do que o composto original, como o caso do Triclosan que no ambiente sofre uma metilação biológica gerando o Metil-Triclosan, um composto que além de apresentar maior toxicidade também tem maior persistência no ambiente e maior lipofilicidade (LINDSTRÖM et al., 2002).

Tabela 1. Presença e concentração de micropoluentes em matrizes ambientais ao redor do mundo.

Classe	Composto	Matriz	Local	Concentração	Referência
Anti Inflamatório Não Esteroidal (AINE)	Ibuprofeno	Efluente (ETE)	Espanha	0.24 - 28 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[1]
			Espanha	0.15 - 25.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[2]
			Reino unido	<20-27256 ng.L^{-1}	[3]
		Lodo (ETE)	Espanha	741.1 ng.g^{-1}	[4]
			Alemanha	120 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$	[5]
		Água superficial – Rio	Itália	7-201 ng.L^{-1}	[6]
			Korea do Sul	132-414 ng.L^{-1}	[7]
	Diclofenaco	Estuário	Mar do Norte	0.6 ng.L^{-1}	[8]
		Afluente (ETA)	França	1.3- 8 ng.L^{-1}	[9]
		Efluente (ETE)	Suíça	310-930 ng.L^{-1}	[10]
			Espanha	0.14-2.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[1]
			Reino unido	<20-2349 ng.L^{-1}	[3]
		Lodo (ETE)	Espanha	2.0 ng.g^{-1}	[11]
			Alemanha	7020 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$	[5]
		Água superficial – Rio	Itália	5-55 ng.L^{-1}	[6]
			Brasil	0.02-0.06 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[12]
		Estuário	Mar do Norte	6.2 ng.L^{-1}	[8]
		Afluente (ETA)	França	0.2-35 ng.L^{-1}	[9]
	Naproxeno	Água superficial - Rio	Brasil	0.02-0.05 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[12]
			Itália	1-22 ng.L^{-1}	[6]
			EUA	22-107 ng.L^{-1}	[13]
		Efluente (ETE)	Espanha	0.003-22.6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[2]
		Lodo (ETE)	Espanha	0.9 ng.g^{-1}	[11]
	Ácido salicílico	Afluente (ETA)	Ontario Canadá	63 ng.L^{-1}	[13]
		Água superficial – Rio	Itália	7-205 ng.L^{-1}	[6]
			Espanha	0.008-32.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[2]
		Afluente (ETA)	França	1-29 ng.L^{-1}	[9]
		Efluente (ETE)	Reino unido	<50-1440 ng.L^{-1}	[3]
	Ácido mefenâmico	Água superficial	Korea do Sul	89-326 ng.L^{-1}	[7]
			Espanha	2.4 – 7.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[1]
	Dipirona	Efluente (ETE)	Espanha	2.4 – 7.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[1]
	Paracetamol	Efluente (ETE)	EUA	1.1 – 1.2 ng.L^{-1}	[13]
			Espanha	7.1 – 11.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[4]
			Espanha	29 – 246 ng.L^{-1}	[1]
		Afluente (ETA)	França	0.5 – 71 ng.L^{-1}	[9]
		Rede de distribuição (ETA)	EUA	0.1 ng.L^{-1}	[13]
			Canadá	0.2 ng.L^{-1}	[13]
Antibióticos	Sulfametoxazol	Efluente Hospitalar	EUA	400-2100 ng.L^{-1}	[14]
		Águas superficiais	EUA	300 ng.L^{-1}	[14]
		Afluente (ETA)	França	0.3-5.1 ng.L^{-1}	[9]
		Rede de distribuição (ETA)	EUA	0.32 ng.L^{-1}	[15]
			China	8.3 ng.L^{-1}	[16]
		Efluente (ETE)	EUA	0.37 $\mu\text{g.L}^{-1}$	[17]
	Trimetoprim	Efluente Hospitalar	EUA	2900-5000 ng.L^{-1}	[14]
		Afluente (ETA)	França	0.2-2 ng.L^{-1}	[9]
		Água marinha	China	16.6 ng.L^{-1}	[16]

		Efluente (ETE)	EUA	0.55µg.L ⁻¹	[17]
	Ciprofloxacino	Efluente (ETE)	EUA	0.14µg.L ⁻¹	[17]
	Tetraciclina	Efluente (ETE)	EUA	0.85µg.L ⁻¹	[17]
	Azitromicina	Lodo (ETE)	Espanha	299.6ng.g ⁻¹	[4]
β –bloqueadores	Propanolol	Afluente ETA	França	0.8-2ng.L ⁻¹	[9]
		Água superficial	Korea do Sul	22.5-40.1ng.L ⁻¹	[7]
		Efluente	Reino unido	<10-115 ng.L ⁻¹	[3]
	Atenolol	Lodo ETE	Espanha	0.7ng.g ⁻¹	[11]
		Rede de distribuição	EUA	0.84ng.L ⁻¹	[15]
	Timolol	ETA			
		Lodo ETE	Espanha	0.9ng.g ⁻¹	[11]
Bactericida	Triclosan	Efluente (ETE)	EUA	10-21ng.L ⁻¹	[13]
			Espanha	0.08-0.40µg.L ⁻¹	[1]
Regulador lipídico	Ácido Clofíbrico	Afluente (ETA)	Canadá	103ng.L ⁻¹	[13]
		Água superficial	Brasil	0.02-0.03µg.L ⁻¹	[12]
		Oceano	Mar do Norte	1.3ng.L ⁻¹	[8]
Hormônio	17α	Efluente ETE	Alemanha	0.015µg.L ⁻¹	[18]
	Etinilestradiol		Canadá	0.042µg.L ⁻¹	[18]
Antimicótico	Fluconazol	Água superficial	Korea do Sul	16-111ng.L ⁻¹	[7]
Antiepilético	Carbamazepina	Rede de distribuição	EUA	10ng.L ⁻¹	[15]
		ETA			
Antidepressivo	Fluoxetina	Rede de distribuição	EUA	0.64ng.L ⁻¹	[15]
		ETA			
Ansiolítico	Diazepam	Lodo ETE	Alemanha	580ug.Kg ⁻¹	[5]
Substâncias	Morfina	Afluente (ETE)	Croácia	160-476ng.L ⁻¹	[19]
Psicoativas	Codeína	Afluente (ETE)	Croácia	159-364ng.L ⁻¹	[19]
	Cocaína	Afluente (ETE)	Croácia	30-114ng.L ⁻¹	[19]

[1] Gómez et al., 2007; [2] Camacho-Muñoz et al., 2010; [3] Ashton et al., 2004; [4] Radjenovic et al., 2009; [5] Ternes et al., 2004; [6] Marchese et al., 2003; [7] Kim et al., 2009; [8] Weigel et al., 2002; [9] Vulliet et al., 2011; [10] Buser et al., 1998; [11] Jelic et al., 2011; [12] Stumpf et al., 1999; [13] Boyd et al., 2003; [14] Brown et al., 2006; [15] Benotti et al., 2009; [16] Zhang et al., 2013; [17] Karthikeyan et al., 2006; [18] Ternes et al., 1999; [19] Terzic et al., 2010.

Dos diversos efeitos adversos ocasionados, alguns são característicos de determinadas classes, como a exposição prolongada a estrogênios que pode acarretar na feminilização de peixes machos além de estar relacionada com a incidência de câncer de testículos e infertilidade masculina (JOBLING et al., 1998; SHARPE e SKAKKEBAEK, 1993). Já os bactericidas podem gerar o aumento na resistência bacteriana tanto de microorganismos relacionados a saúde humana quanto a área agrícola (BAQUERO et al., 2008; SANTOS et al., 2010). Drogas ilícitas como cocaína, ecstasy e maconha têm sido quantificadas em ETE's, porém com a finalidade de estimar o consumo da droga realizado pela população e os efeitos da exposição na biota são desconhecidos (ZUCCATO et al., 2005; TERZIC et al., 2010).

Por serem lipofílicos, os FPHCP's ao interagir com organismos vivos podem aderir aos tecidos e assim gerar bioacumulação, por conseguinte ao entrar na cadeia alimentar pode gerar quadros de biomagnificação, ameaçando não só a saúde do ambiente, mas também a saúde humana (ZENKER et al., 2014).

A ubiquidade e os efeitos gerados da interação com o meio ambiente, principalmente com o ambiente marinho, mostra a necessidade de se conhecer o potencial tóxico dessas substâncias para uma adequada avaliação de risco.

1.3 Paracetamol

O Paracetamol ou acetaminofeno (N-(4-hidroxifenil) etanamida) (FIG. 2) é um fármaco muito utilizado no Brasil, pertencente a classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's), com propriedades analgésicas e antipiréticas, mas sem atividade anti-inflamatória clinicamente significativa. As principais características físicas e químicas do Paracetamol estão apresentadas na Tabela (2).

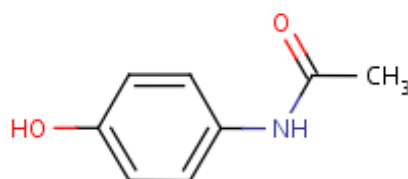


Figura 2. Estrutura química do Paracetamol

O mecanismo de ação atualmente descrito para os AINE's como o Paracetamol consiste na inibição não seletiva na atividade da enzima ciclooxigenase e sua isoforma (COX – 1 e 2), impedindo assim a síntese das prostaglandinas, mediadores celulares pró-inflamatórios, responsáveis pelas várias manifestações da inflamação, como o aparecimento da dor (KULMACZ et al., 1991). Estudos relatam a possibilidade de ação sobre a isoforma COX – 3, predominante no sistema nervoso central de algumas espécies (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; BOTTING, 2000).

Comumente comercializada na forma de cápsulas, drágeas ou comprimidos, na forma de gotas, xarope, efervescentes e pastilhas, sozinho ou em associações, este é um medicamento prescrito por médicos e também de venda livre (SEBBEN et al., 2010).

Tabela 2. Características físicas e químicas do Paracetamol.

Fórmula Molecular	C ₈ -H ₉ -N-O ₂
Peso molecular	151,16 g/mol
Cor	Pó cristalino branco
Ponto de fusão	169-170,5 ° C
Solubilidade em água	Pouco solúvel na água fria, mais solúvel em água quente
Kow	0,46
pKa	9,38
Meia vida	20 dias

Somente 1 a 4 % do Paracetamol ingerido é excretado de forma inalterada através da urina (CUMMINGS et al., 1967). Formas conjugadas são geradas da interação com enzimas biológicas e a formação de metabólitos tóxicos também pode ocorrer, porém em menor quantidade (BERTOLINI et al., 2006).

A ingestão em doses elevadas pode causar lesões hepáticas e renais irreversíveis, através do seu metabólito alquilado, o *N*-acetil-p-benzoquinona. Essa situação ocorre quando a dose supera 4g/dia e o quadro pode ser acentuado com o alcoolismo (JUNIOR, 2011; LOPES e MATHEUS, 2012).

A Secretaria Municipal de Saúde do Estado de São Paulo por meio de pregão eletrônico adquiriu uma quantia de Paracetamol estimando o consumo médio para o ano de 2015. Foram solicitados 48.144.000 comprimidos do medicamento que serão distribuídos para 4 unidades de saúde (ANEXO A).

Este é um medicamento muito popular e se encontra inserido na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), instrumento que norteia oferta, prescrição médica e direcionamento de produção farmacêutica, o que faz com que seu consumo amplie ainda mais. Sua venda livre torna difícil uma estimativa confiável de seu consumo (BRASIL, 2010).

Alguns trabalhos já relatam a ocorrência de apoptose celular em bivalves de água doce e redução na densidade de fitoplâncton marinho relacionadas a exposição de compostos pertencentes a classe dos AINE's (PAROLINI et al., 2009; DELORENZO e FLEMING, 2008).

Devido a suas características e farmacocinética, o Paracetamol pode ser transportado pela rede de esgoto e despejado diretamente no meio ambiente podendo gerar efeitos adversos no local. Assim este trabalho visa

identificar e quantificar o Paracetamol diretamente no ambiente marinho, ao entorno do emissário submarino de Santos e em seguida realizar a avaliação de risco ambiental do composto para a área de estudo.

2OBJETIVOS

O trabalho desenvolveu-se através dos objetivos a seguir.

2.1 Objetivo geral

Avaliação de risco ambiental do fármaco Paracetamol no ambiente marinho (Baía de Santos – SP) utilizando como organismo-teste o molusco bivalve *Perna perna*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar e quantificar o Paracetamol em amostras de água superficial e de fundo da baía de Santos na área adjacente aos difusores do emissário submarino de Santos;
- ✓ Avaliar a toxicidade aguda do Paracetamol a partir de alterações na taxa de fertilização de gametas do mexilhão marinho *P. perna*;
- ✓ Avaliar a toxicidade crônica do Paracetamol a partir do desenvolvimento embrionário do mexilhão marinho *P. perna*;
- ✓ Avaliar efeitos subletais do Paracetamol através da estabilidade da membrana lisossômica;
- ✓ Avaliar os efeitos genotóxicos a partir dos danos em DNA;
- ✓ Avaliar estresse oxidativo por meio da peroxidação lipídica;
- ✓ Determinar o risco ambiental do Paracetamol por meio da relação entre as concentrações ambientais do composto e as concentrações de efeito encontradas nos ensaios laboratoriais, a partir da utilização de uma metodologia escalonada de avaliação de risco;
- ✓ Gerar subsídios para a identificação de concentrações seguras do Paracetamol no ambiente marinho para fins de política de gestão e regulação pela legislação pertinente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Avaliação de Risco Ambiental (TIER)

A avaliação de risco consiste na análise de efeitos ecológicos adversos que estão ocorrendo ou que possam ocorrer resultante da exposição a um estressor ambiental, que pode ser tanto de entidade biológica, física ou química.

O procedimento adotado para a avaliação de risco ambiental foi a metodologia escalonada TIER (FIG. 3). A forma de análise segue conforme descreve o nome do método (tier = camada). As fases se dão em camadas sobrepostas, onde os resultados obtidos em cada etapa são essenciais para uma avaliação de risco mais adequada.

Para o presente trabalho foram propostos 3 níveis denominados TIER-0, TIER-I e TIER-II e posteriormente foi obtido o Quociente de Risco (QR) seguindo as diretrizes propostas para compostos farmacêuticos pela Comissão Européia (EMA, 2006).

TIER 0: Consiste na identificação e quantificação das concentrações ambientais do composto de interesse. Esta etapa engloba a coleta, acondicionamento, processamento e análise química das amostras gerando assim a Concentração Ambiental Mensurada (*MEC - Measured Environmental Concentration*) no local de estudo.

TIER I: Nesta etapa se desenvolveu ensaios ecotoxicológicos com a finalidade de obter respostas de efeito agudo em curto período de exposição. Obteve-se com isso a Concentração Efetiva a 50% (CE_{50}) dos organismos expostos, que no presente trabalho se deu pela análise da taxa de fecundação em 50 % das células reprodutivas expostas.

TIER II: Utilizou-se análise de efeitos subletais e crônicos levando em consideração um maior período de exposição contínua ao contaminante. Atuando em diferentes níveis de organização biológica, os efeitos foram mensurados através de biomarcadores e ensaios que contemplam estágios iniciais de vida (desenvolvimento embrionário). Esses ensaios permitiram a determinação da Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e da Concentração de Efeito Observado (CEO).

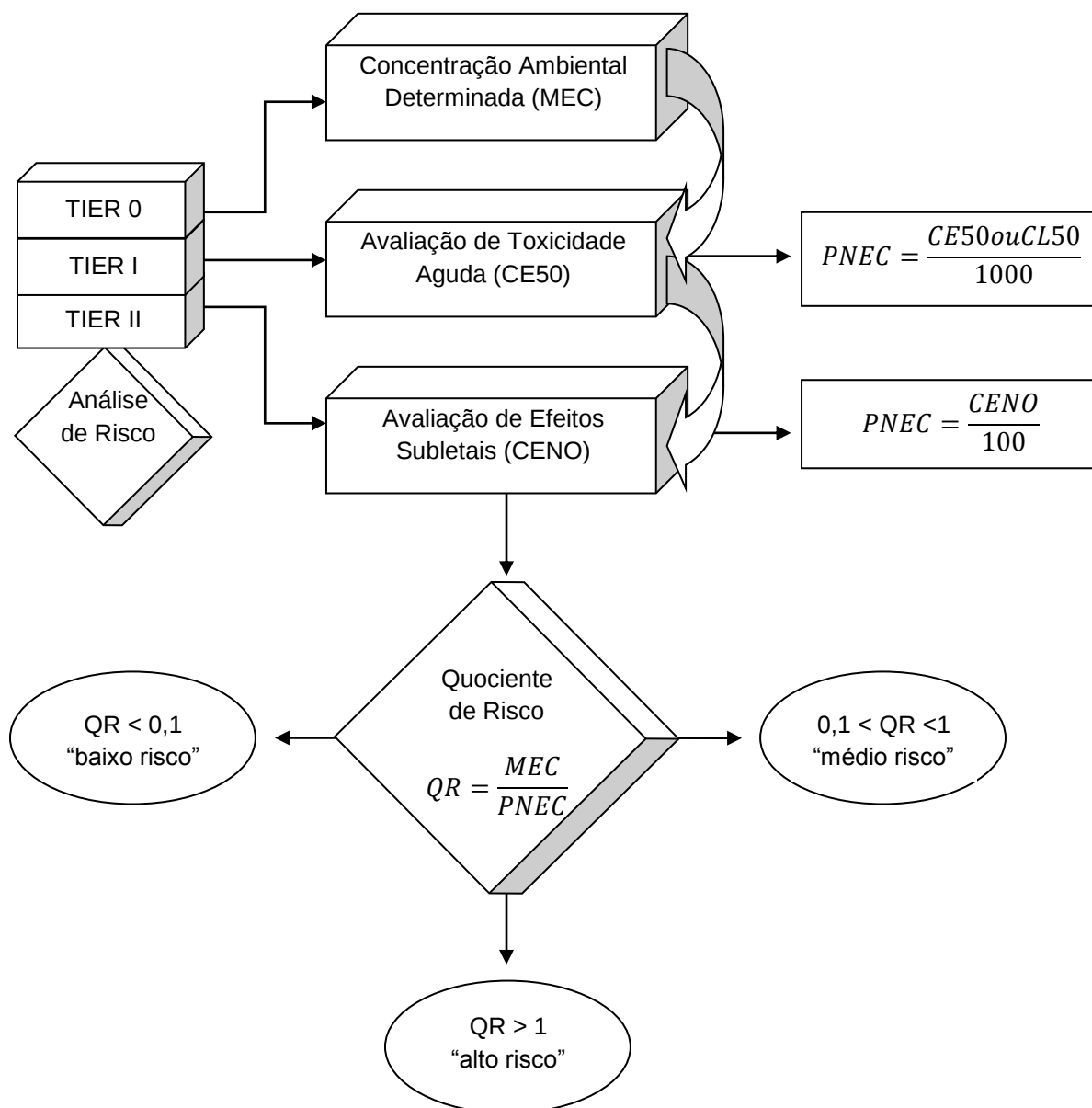


Figura 3. Caracterização de Risco “TIER”

Fonte: Adaptação de EMEA (2006)

Com a análise dos dados obtidos na metodologia TIER calculou-se o Quociente de Risco (QR) relacionando os efeitos obtidos nos ensaios com a concentração ambiental mensurada. Para se determinar o QR, os valores de CE_{50} e CENO foram divididos por fatores de segurança (múltiplos de 10) derivando assim em uma Concentração Previsivelmente Sem Efeito (*PNEC - Predicted no Effect Concentration*). Os fatores de segurança são aplicados devido a incertezas quanto a extrapolação dos resultados para o ambiente natural e na variação da sensibilidade intra e inter-espécies.

A PNEC derivada do Tier-I foi obtida de acordo com a equação (1):

Eq. 1:

$$PNEC_{wat} = \frac{CE50ouCL50}{1000}$$

A PNEC derivada do Tier-II foi obtida de acordo com a equação (2):

Eq. 2:

$$PNEC = \frac{CENO}{100}$$

A PNEC para o Tier-I tem fator de segurança mais elevado devido ao efeito ocasionado ser irreversível e tratando-se da proposta de prevenção de efeitos o fator de segurança 1000 foi aplicado ao cálculo.

A estimativa do Quociente de Risco seguiu-se de acordo com a equação (3):

Eq. 3:

$$QR = \frac{MEC}{PNEC}$$

Os níveis de risco foram estabelecidos de acordo com a Tabela (3).

Tabela 3. Ranking de Risco

Quociente de risco (QR)	Ranking
$0.01 \geq e < 0.1$	Baixo Risco
$0.1 \geq e < 1$	Médio Risco
≥ 1	Alto Risco

FONTE: EC, (1996); EMEA (2006); HERNANDO et al., (2006); SÁNCHEZ-BAYO et al.,(2002)

3.2 Organismo-teste (*Perna perna*- Mollusca, Bivalvia)

Devido a capacidade de bioconcentrar os poluentes, mexilhões e outros bivalves vêm sendo empregados como organismos sentinelas, e seu comportamento sésil os tornam apropriados para estudos de monitoramento da qualidade ambiental, uma vez que esses disponibilizarão respostas provindas da exposição local e não de outras áreas, bem como em estudos

laboratoriais que possibilitam uma previsão dos possíveis efeitos biológicos adversos em diferentes níveis de organização biológica (IMW, 1995).

O mexilhão *Perna perna* é naturalmente encontrado em costões rochosos e áreas de incidência direta de ondas, ocupando a faixa do entre-marés ao infralitoral (FIG. 4). São organismos sésseis filtradores e sua alimentação consiste de fitoplâncton e matéria orgânica particulada em suspensão.



Figura 4. Mexilhão marinho *Perna perna* (Linnaeus, 1758)

Os exemplares do molusco bivalve (mexilhão) *Perna perna* empregados nos ensaios ecotoxicológicos neste estudo foram adquiridos de cultivos na praia da Toque Toque Grande – São Sebastião/SP (FIG. 5). Os organismos foram transportados em caixa térmica até o laboratório de Ecotoxicologia “Prof. Caetano Belliboni” na Universidade Santa Cecília, onde foram mantidos para aclimação em tanques com água do mar do local de origem, sob aeração constante e temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização dos ensaios, não ultrapassando 48 horas.

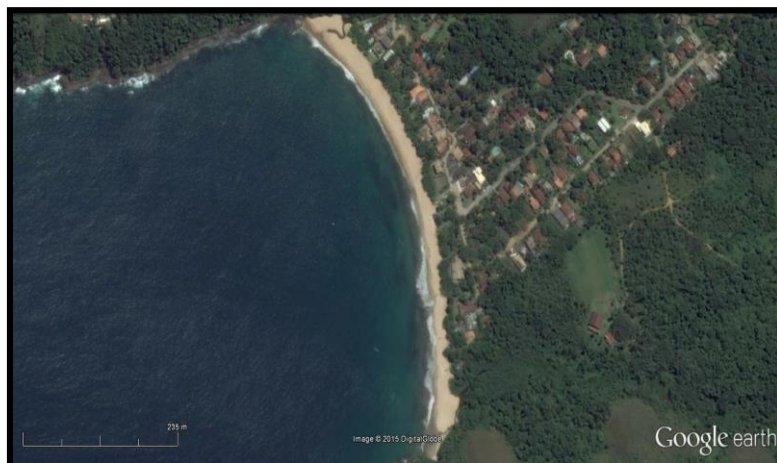


Figura 5. Praia Toque Toque Grande – São Sebastião / SP

3.3 Água de manutenção e diluição.

Para realizar a troca de água no tanque de manutenção de organismos e nos aquários de ensaios, bem como na diluição do composto e procedimentos de lavagem nos ensaios agudos e crônicos, coletou-se a água no mesmo local onde os cultivos de mexilhões permaneciam (Praia de Toque Toque Grande – São Sebastião/SP).

A água do mar utilizada nos ensaios agudos e crônicos foi filtrada em membrana Milipore 0,22 μm de porosidade e mantida sob aeração até o momento de uso.

3.4 Processamento TIER 0

3.4.1 Coleta e acondicionamento das amostras de água

As amostras de água superficial (1-5 S) e de fundo (1-5 F) foram coletados em 5 pontos considerando a dispersão da pluma do efluente no entorno do emissário submarino de Santos – SP (FIG 6).

Para armazenar as amostras foi utilizados frascos de vidro âmbar, esterilizados com ácido nítrico (HNO_3), metanol e água destilada.

Foram coletados 3 litros de água superficial e fundo (8 m) com o auxílio de uma garrafa Van Dorn.

Posteriormente as amostras foram acondicionadas nos frascos de vidro âmbar, previamente limpos e em seguida transportadas ao laboratório em caixa

térmica com gelo ($<10^{\circ}\text{C}$) e acondicionadas em temperatura de -20°C até o processamento.

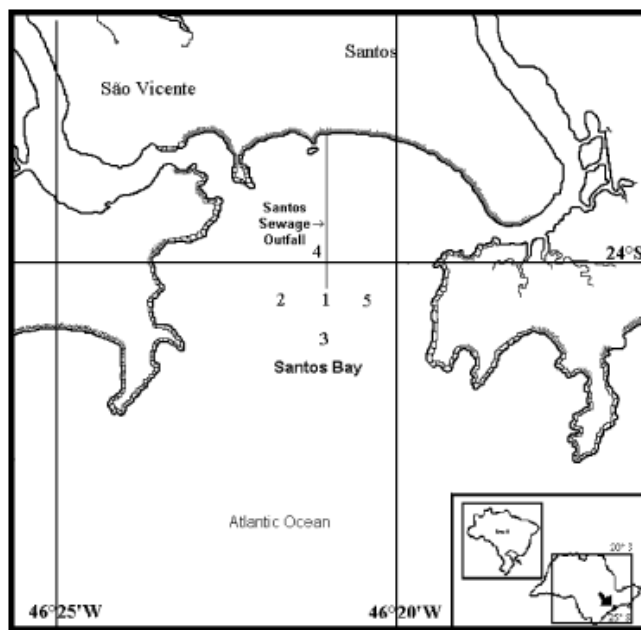


Figura 6. Pontos de amostragem.

3.4.2 Análise Quantitativa.

Os analitos presentes na amostra foram extraídos e concentrados pelo método de extração em fase sólida (EFS). A metodologia utilizada seguiu o proposto por Wille et al., (2010), adequado para quantificação de FPHCP's em ambientes estuarinos e marinhos.

3.4.3 Preparo de Padrão – 8 bromo cafeína (8-BC)

Esse padrão foi feito para estimar possíveis perdas de compostos durante o processo, por isso a substância a ser utilizada como padrão deve ser inexistente na amostra bruta, assim escolheu-se a 8 bromo cafeína ($\text{C}_8\text{H}_9\text{BrN}_4\text{O}_2$), que consiste numa molécula sintética de cafeína com a incorporação do bromo.

Inicialmente preparou-se a solução estoque do Padrão 8-BC com a concentração de 1 mg.mL^{-1} . Para isso, pesou-se 10mg de 8-BC e dilui-se em 10 mL de Metanol.

Em seguida foi feita a solução de trabalho que foi adicionada as amostras. Foram retirados 10 µL da solução estoque de 8-BC e transferido a outro recipiente onde se acrescentou 9990 µL de água Metanol, diluindo em 1000x a solução estoque, obtendo uma concentração de 1 µg.mL⁻¹ na solução de trabalho

As soluções foram envolvidas com papel alumínio e mantidas no freezer até o momento de uso.

3.4.4 Preparo das amostras

A amostra bruta foi descongelada a temperatura ambiente e o volume utilizado foi de 1 litro, o qual teve o pH ajustado para $7 \pm 0,5$ usando soluções de HCL (1M) e NaOH (1M).

Em seguida, as amostras foram filtradas com o auxílio de um sistema de filtração (Bomba de sucção + Kitasato + copo graduado + funil com base de vidro + rolha de silicone + garra de aço inox + membrana). A membrana utilizada foi de fibra de vidro – GF/C 47 mm de diâmetro e retenção de partículas de 1,2 µm.

Após filtrar toda a amostra adicionou-se 2 mL de metanol no copo graduado para que também fosse filtrado, passando pela membrana e arrastando componentes de interesses que possivelmente ficaram retidos na membrana.

A amostra filtrada foi transferida para um béquer de volume proporcional e acrescentou-se o padrão de 8-BC (solução de trabalho) em um volume o qual a concentração final de 8-BC foi de 50 µg.L⁻¹.

3.4.5 Ativação da Coluna e lavagem do cartucho

Foram utilizados cartuchos HR-X Chromabond (3 mL, 200 mg, Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Antes de passar a amostra pelo cartucho foi necessário ativá-lo adicionando 5 mL de metanol e logo após a passagem desse pela coluna adicionou-se 5 mL de água Milli-Q. Evitou-se que a resina do interior do cartucho secasse, assim logo após a passagem dos solventes de ativação a

amostra filtrada foi sendo adicionada no cartucho com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.

Ao término da passagem de toda a amostra pelo cartucho fez-se a lavagem do mesmo passando por ele 10mL de água Milli-Q, garantindo que toda a água passasse pelo cartucho e não ficasse retida.

3.4.6 Eluição e Armazenamento.

A eluição (arraste dos compostos de interesse que ficaram retidos na resina do cartucho utilizando um solvente) é a fase de interesse para a quantificação do fármaco, devido a isso nesse momento foi introduzido tubos de ensaio com tampas esmerilhadas para a coleta do volume de solventes de eluição.

O primeiro solvente a passar pelo cartucho foi a Acetona (5 mL), em seguida adicionou-se o Metanol (10mL). Garantiu-se que todo o volume dos solventes passou pelo cartucho e não ficou retido, assim o frasco de coleta continha ao final da eluição 15 mL de amostra.

Tanto o frasco de coleta quanto os cartuchos utilizados foram identificados, envoltos em papel alumínio e mantidos no freezer. O transporte ao laboratório responsável pela análise foi feita em caixa térmica.

3.4.7 Análise quantitativa por LC/MS/MS

Essas análises foram realizadas pelo Centro de Espectrometria de Massa Aplicada – CEMSA do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, em São Paulo.

Uma alíquota (10 μ L) de cada amostra foi analisada por HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, CA, EUA), acoplado ao espectrômetro de massa 3200 QTRAP (AB Sciex, Ontário, CA) híbrido do tipo triplo quadrupolo / LIT (iontrap linear). As condições utilizadas para a separação em HPLC foram: coluna de 1,8 μ m Agilent Eclipse XDB - C18 4,6X50 mm; temperatura = 25 ° C; volume de injeção de 10 μ L; taxa de fluxo de eluente = 0,7 mL.min⁻¹. Fase móvel para análise no modo positivo, A = água + 0,1 % de ácido fórmico e B = acetonitrilo, fase móvel para análise de modo negativo, A = água + 5 mM de acetato de amônio e B = acetonitrilo.

Um gradiente linear de 0,7 mL.min⁻¹ foi usado, iniciando com uma mistura de 95 % de solvente A e 5 % de solvente B. Essa porcentagem diminuiu linearmente de 95 a 5 % em 5 minutos, e esta condição foi mantida durante 1 minuto. Em seguida, o solvente A foi aumentado linearmente de 5 a 95 % em 2 minutos.

A detecção e quantificação dos analitos foi realizada utilizando ESI com ionização (modos positivo e negativo) e modo de MRM (monitoramento de reação múltipla), com a seleção de um íon precursor e dois produtos de íon para quantificar e qualificar cada composto. Os dados foram processados usando o programa Analyst® 1.5.2 (AB Sciex, Ontario, CA).

3.5 Ensaios Ecotoxicológicos

3.5.1 Limpeza dos organismos e obtenção de gametas

A preparação dos organismos-teste para os ensaios iniciou-se com sua limpeza, feita através da raspagem dos organismos incrustantes, seguido da lavagem dos mexilhões com água doce. Os organismos permaneceram fora da água, para que não ocorresse a liberação dos gametas antes da separação dos indivíduos.

Para a liberação dos gametas foi utilizado a técnica de indução termal junto com fluxo contínuo, procedimentos considerados adequados no trabalho realizado por Zaroni et al., (2005). Cerca de 50 mexilhões foram colocados individualmente dentro de placas de Petri e o conjunto de placas dentro de uma bandeja plástica rasa, cheia de água do mar (FIG.7).

As bandejas com os mexilhões foram mantidos em geladeira por aproximadamente 30 minutos em temperatura de 4°C. Após este procedimento, as bandejas foram retiradas da geladeira e permaneceram vinte minutos sem água antes de serem novamente imersos em água do mar em temperatura ambiente (24±2° C) sob fluxo contínuo.



Figura 7. Disposição de placas de Petri em bandeja.

O fluxo contínuo foi montado com o auxílio de grades e bandejas sobrepostas de maneira com que a água escoe para a bandeja inferior até chegar ao tanque com ebulidor que mantém a temperatura adequada e com a bomba que manda novamente essa água para a bandeja mais alta, simulando assim uma cascata de fluxo contínuo (FIG 8).



Figura 8. Métodos de indução integrados: Fluxo Contínuo + Indução Termal.

O fluxo foi mantido até ocorrer à liberação dos gametas que pode ser detectada visualmente (FIG 9). O líquido espermático possui coloração branca e foi coletado com o mínimo de água possível com uma pipeta de Pasteur e mantido em um béquer envolto por gelo. Os óvulos possuem cor laranja,

também coletado com uma pipeta e transferido para um béquer com água do mar filtrada.

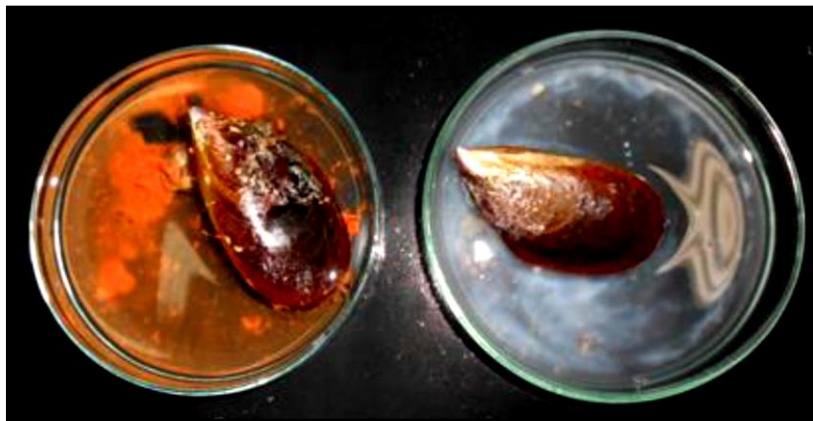


Figura 9. Distinção visual dos gametas.

Fêmea à esquerda (ovócitos laranja) e macho à direita (esperma branco)

Em seguida, os óvulos foram lavados com auxílio de uma peneira com 75 μm de malha e recolocados em um béquer de capacidade maior com água do mar filtrada. Esse processo de lavagem dos óvulos se repetiu 3 vezes.

Foram obtidos lotes de 3 organismos diferentes (tanto machos quanto fêmeas) que foram misturados e posteriormente utilizado nos ensaios ecotoxicológicos agudos e crônicos da maneira como segue os procedimentos para cada qual.

3.6 Processamento TIER 1

3.6.1 Preparo de concentrações-teste

A concentração da solução estoque de Paracetamol foi de 1000 mg.L^{-1} . Pesou-se 100mg de Paracetamol e a diluição inicial foi feita utilizando 100 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO 0,01%) sendo depois avolumado para 100 mL.

A partir da solução estoque foram geradas as concentrações-teste a serem avaliadas e foram de 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 mg.L^{-1} . O DMSO (0,01%) utilizado na diluição também foi analisado com o intuito de verificar a influencia do mesmo sobre o ensaio. O controle de água do mar foi preparado com a água filtrada utilizada na diluição e as concentrações-teste conforme Tabela 4.

Tabela 4. Preparo das concentrações-teste ensaio agudo.

Volumes (mL)	Concentrações-testes (mg.L ⁻¹)							
	Controle	DMSO	1000	500	250	125	62,5	31,25
Sol. Estoque	---	---	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125
Água do mar	10	10*	---	5	7,5	8,75	9,375	9,6875
Volume total	10	10	10	10	10	10	10	10

* 9,99mL de água do mar + 0,01mL de DMSO

3.6.2 Ensaio de toxicidade aguda (Fertilização) com mexilhão marinho

Perna perna (Mollusca, Bivalvia)

O método usado foi uma adaptação do protocolo da USEPA (1991) feita por Zaroni et al., (2005) para a espécie do mexilhão marinho *Perna perna*.

O método consiste na exposição de espermatozóides de *Perna perna*, por um período de 1 hora, a diferentes concentrações do Paracetamol e posteriormente a adição dos óvulos para avaliar se a capacidade de fecundação dos espermatozóides foi prejudicada nesse período de tempo de exposição. Os parâmetros para realização desse ensaio encontram-se na Tabela (5).

Tabela 5. Parâmetros necessários para Ensaio de Fertilização.

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±1° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	1h:40min
Frasco-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15mL
Volume das soluções-teste	10mL
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	200 óvulos por mililitro
Efeito observado	Inibição da fertilização
Validade do ensaio	70 – 90 % de óvulos fecundados no controle

Após o processo de obtenção de gametas, preparou-se 25 mL de uma solução espermática, utilizando 0,5 mL de esperma + 24,5 mL de água do mar filtrada.

Dessa solução espermática foram retirados 100 μL e inseridos em cada tubo de ensaio, permanecendo durante 1 hora em câmara de germinação à $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Durante o período de exposição, foi feita a estimativa da densidade de óvulos utilizando uma câmara de Sedgwick-Rafter, assim os volumes utilizados continham cerca de 2000 óvulos. Transcorrido a exposição de 1 hora, o volume contendo aproximadamente 2000 óvulos foi adicionado aos frascos-teste. Quarenta minutos após a adição dos óvulos, o ensaio foi encerrado com a adição de 0,5 mL de formol (10%) tamponado com bórax em todas as réplicas.

A contagem foi feita analisando os 100 primeiros óvulos de cada réplica em câmara de Sedgwick-Rafter, obtendo assim a porcentagem de óvulos fecundados e não fecundados. Foram considerados como fecundados/fertilizados os óvulos que apresentaram membrana de fertilização, presença de corpúsculo polar ou aparecimento de divisões celulares (FIG. 10).

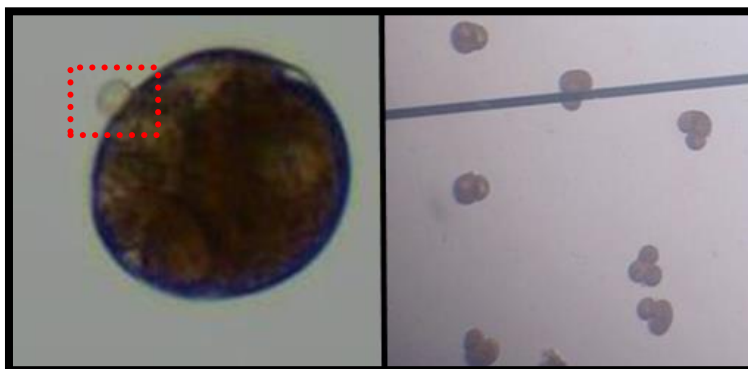


Figura 10. Óvulos observados em aumento de 100x.

A - (imagem ampliada) Corpúsculo Polar presente (em destaque). B - Divisões celulares.

3.7 Processamento TIER 2 – Efeitos subletais

A fase do TIER 2 consiste na avaliação dos efeitos a níveis subletais, sendo empregado nesse trabalho através do ensaio de desenvolvimento embrionário e de estabilidade da membrana lisossômica.

3.7.1 Preparo de concentrações-teste

As concentrações foram preparadas no momento de uso, evitando assim a degradação natural do composto. A água do mar utilizada para as diluições foi filtrada a $0,22\mu\text{m}$ e teve a salinidade ajustada para o ensaio.

3.7.1.1 Ensaio crônico

A concentração da solução estoque de Paracetamol foi de 100 mg.L⁻¹. Pesou-se 10 mg de Paracetamol e a diluição inicial foi feita utilizando 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) sendo depois avolumado para 100 mL.

A partir da solução estoque, as concentrações-teste a serem avaliadas foram de 100; 75; 50; 25; 10 e 5 mg.L⁻¹. O DMSO (0,01%) utilizado na diluição também foi analisado com o intuito de verificar a influencia do mesmo sobre o ensaio. O controle de água do mar foi preparado com a água filtrada utilizada na diluição (TAB. 6).

Tabela 6. Preparo das concentrações-teste ensaio crônico.

Volumes (mL)	Concentrações-testes (mg.L ⁻¹)							
	Controle	DMSO	100	75	50	25	10	5
Sol. Estoque	---	---	10	7,5	5	2,5	1	0,5
Água do mar	10	10*	---	2,5	5	7,5	9	9,5
Volume total	10	10	10	10	10	10	10	10

* 9,99mL de água do mar + 0,01mL de DMSO

3.7.1.2 Ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro

Solução Estoque 1: Pesou-se 1 mg do composto, diluiu em 100 µL de DMSO e avolumou para 100 mL. Concentração da solução estoque 1 foi de 10mg.L⁻¹.

Solução Estoque 2: Retirou-se um alíquota de 1 mL da solução estoque 1, transferiu a outro balão volumétrico e avolumou novamente para 100 mL. Concentração da solução estoque 2 foi de 0.1 mg.L⁻¹.

Os recipientes-testes para esse ensaio foram aquários de 20 L e as concentrações-teste eram de 3000; 300 e 30 ng.L⁻¹. O controle utilizado foi o aquário com DMSO (0,01%).

Os volumes correspondentes as concentrações foram adicionados aos aquários e avolumados, tendo o volume final de 10 Litros (TAB. 7). Foram realizados leituras em diferentes períodos de tempo (T-0; T-48 e T-96 horas). A leitura em T-0 foi feita para avaliar a condição dos organismos após o período de aclimação antes de serem expostos nos aquários.

Tabela 7. Preparo das concentrações-teste ensaio TRCVN.

Volumes (mL)	Concentrações-testes (ng.L ⁻¹)			
	Controle	3000	300	30
Sol. Estoque 1	---	3	0,3	---
Sol. Estoque 2	---	---	---	3
Volume total	10x10 ³	10x10 ³	10x10 ³	10x10 ³

3.8 Efeito crônico e subletal.

3.8.1 Ensaio para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) com *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia)

Este método de ensaio foi realizado de acordo com o protocolo da ASTM (1992) com pequenas adaptações de ZARONI et al., (2005). O procedimento de ensaio consistirá na exposição de ovos recém-fertilizados a diferentes concentrações do Paracetamol por um período de 48 horas, tempo o qual ocorre o desenvolvimento embriolarval do organismo até o estágio de larva véliger, então avalia-se retardos e/ou anomalias nesse desenvolvimento. As condições necessárias para esse ensaio encontram-se na Tabela 8.

Após o processo de obtenção de gametas e lavagem dos óvulos, preparou-se 25 mL de uma solução espermática, utilizando 0,5mL de esperma + 24,5 mL de água do mar filtrada. No recipiente com os óvulos promoveu-se a fecundação através da adição gradual de 1-2 mL da solução espermática preparada e sendo mantido sob freqüente porém leve agitação. Com auxílio de uma câmara de Sedgwick-Rafter, foi estimada a densidade de óvulos fecundados e, cerca de 500 embriões foram colocados em cada frasco-teste, iniciando-se então o período de incubação em câmara de germinação com fotoperíodo (48 horas).

Ao término do período de incubação foi feita a fixação com 0,5 mL de formol (10%) tamponado com bórax para contagem, onde os 100 primeiros embriões encontrados foram avaliados.

Tabela 8. Parâmetros necessários para o Ensaio Embrionaral.

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±1° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Fotoperíodo	12 a 16 horas de luz
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	48 h
Frasco-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15mL
Volume das soluções-teste	10mL
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	50 óvulos fecundados por mililitro
Idade do organismo-teste	Ovos recém fecundados
Efeito observado	Atraso ou anormalidade no desenvolvimento embrionaral
Validade do ensaio	Mínimo de 70% de larvas normais nos controles
Alimentação	Sem

Durante a contagem foi determinada a porcentagem de embriões normais (valvas simétricas fechadas e massa visceral presente na porção interna da concha) e/ou anormais (embriões que não se desenvolveram até larva “D”, que tenham atingido este estágio mas com extravasamento de massa visceral e/ou com a concha aberta) nas diferentes concentrações testadas, em relação ao controle(FIG11).

Para garantir um desenvolvimento adequado e confiabilidade do ensaio, foram também realizados ensaios de sensibilidade dos organismos com a substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio.

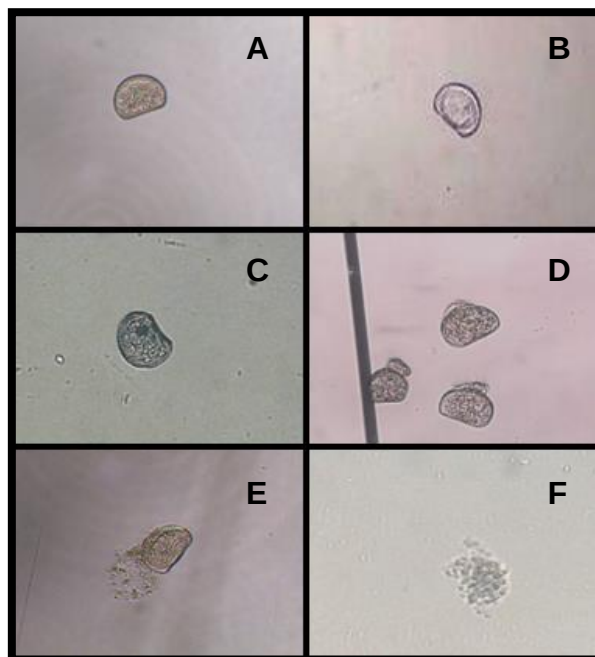


Figura 11. Análise de larva véliger (Aumento de 400x).

Larva normal: (A) Formato em “D” com conteúdo visceral. Larvas anômalas: (B) Larva vazia; (C) Deformidade na concha; (D) Retardo no desenvolvimento; (E) Extravasamento de conteúdo; (F) Aglomerado de células disforme.

3.8.2 Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN)

O procedimento utilizado para análise do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro em lisossomos de hemócitos foi realizado de acordo com o método descrito por LOWE et al. (1995). Neste ensaio os mexilhões permaneceram expostos em aquários com diferentes concentrações do Paracetamol por 96 horas (FIG. 12).



Figura 12. Aquário de exposição.

A avaliação consiste na análise dos hemócitos desses organismos o que possibilita detectar alterações na permeabilidade da membrana lisossômica, ocorrida em função da exposição ao contaminante. As condições para realização do ensaio encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros necessários para o Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN).

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±1° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Fotoperíodo	12 horas de luz
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Semi – Estático
Duração do ensaio	96 h
Troca de água	24 h
Frasco-teste	Aquários com capacidade para 20 L
Volume das soluções-teste	10 L
Número de réplicas por diluição	2
Número de organismos por réplicas	1 mexilhão por Litro
Efeito observado	Alterações morfológicas de membrana em hemócitos
Alimentação	Sem

A estabilidade da membrana é considerada um indicador de “bem estar” celular, e torna-se um importante biomarcador inespecífico de estresse celular devido a possibilidade de extrapolação dos seus efeitos. A instabilidade gerada na membrana lisossômica pode consequentemente aumentar a ocorrência de processos autofágicos, levando ao rompimento da organela seguido da degeneração celular. A extrapolação dos danos celulares à níveis de organização biológica maiores faz desse biomarcador uma adequada ferramenta para monitoramentos ambientais (MABOETA et al., 2002; CASTRO et al., 2004).

3.8.2.2 Preparo das Lâminas

As lâminas foram preparadas 1 dia antes das análises. Elas foram lavadas e enxaguadas com água deionizada e pré-tratadas com a solução de

Poly-L-lisina que facilita a adesão dos hemócitos no vidro, e postas para secar em temperatura ambiente e em local abrigado de poeira.

A solução de Poly-L-lisina foi preparada com água destilada na proporção de 1:10. Com o auxílio de uma micropipeta foram adicionados 10 µL da solução sobre cada lâmina. Em seguida, o volume foi espalhado sobre toda superfície da lâmina com o uso de uma lamínula e postas para secar em local fechado e abrigado de poeira.

3.8.2.3 Preparo da Solução Fisiológica

Esta solução salina é utilizada para diluir a hemolinfa de modo que os hemócitos retirados não sofram estresse ao serem retirados do organismo. Esta solução foi preparada um dia antes do experimento, diluída em água destilada, continha 20 mM de HEPES, 450 mM de cloreto de sódio, 50 mM de sulfato de magnésio, 10 mM de cloreto de potássio e 9 mM de cloreto de cálcio.

A solução foi preparada em um frasco de vidro volumétrico. Após diluição total dos reagentes o pH foi ajustado para 7,36 com o uso de HCl ou NaOH. Garantiu-se também que no momento do uso o pH da solução encontrava-se nesse mesmo valor.

A solução fisiológica foi armazenada em refrigerador, mas quando usada no ensaio estava em temperatura ambiente, pois um choque térmico pelo uso de uma solução muito fria (ou muito quente) pode também estressar os hemócitos que estavam saudáveis.

3.8.2.4 Preparo do Vermelho Neutro

A solução estoque de vermelho neutro foi preparada durante o período (15 minutos de incubação) em que as células estavam se aderindo nas lâminas preparadas com Poly-L-lisina.

Esta solução foi preparada com a diluição do corante em DMSO. Pesou-se 28,8 mg do corante vermelho neutro e colocado em um frasco de vidro âmbar. Em seguida foi adicionado 1 mL de DMSO com auxílio de uma micropipeta. Foi necessária uma leve agitação para que o corante dissolvesse. Esta solução estoque foi preparada dentro de um recipiente à prova de luz e

transferida ao refrigerador, pois o corante é fotossensível e pode degradar formando cristais que podem influenciar nos resultados da leitura.

A solução de trabalho foi preparada com a solução estoque em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para isso, a solução estoque foi agitada por 1 a 2 minutos para total homogeneização, eliminando assim possíveis cristais que possam ter se formado. Em seguida preparou-se a solução de trabalho que foi feita em frasco âmbar, onde, com uma micropipeta adicionou-se 5 mL da solução fisiológica e em seguida foram pipetados 10 μ L da solução estoque.

3.8.2.5 Extração e Manuseio da Hemolinfa

Para extração da hemolinfa, os mexilhões foram retirados dos aquários e tiveram suas valvas levemente separadas para que a água dentro das conchas fosse drenada, garantindo assim que o líquido coletado fosse hemolinfa e não água do mar. Uma lâmina de bisturi foi cuidadosamente inserida na região ventral deslocando assim a valva para o procedimento de drenagem. O bisturi foi mantido em uma posição em que as valvas permanecessem abertas para que a extração pudesse ser feita.

Utilizou-se seringa hipodérmica de 2 mL com uma agulha padrão 21 contendo 0,5 mL de solução fisiológica, sendo coletado 0,5 mL de hemolinfa do músculo adutor posterior.

A hemolinfa foi retirada do músculo adutor posterior, que foi identificado ao encontrar certa resistência oferecida pelo toque da agulha com o músculo. Isso foi feito introduzindo a agulha na lateral oposta ao umbo e realizando movimentos suaves (FIG. 13). Cuidadosamente a agulha foi inserida no músculo, extraíndo a hemolinfa, de aparência levemente leitosa, identificada de forma visual ao colocar a seringa contra a luz.

O padrão da agulha é importante, pois uma agulha mais fina poderá causar destruição nos hemócitos e aumentar a probabilidade de formação de coágulos.

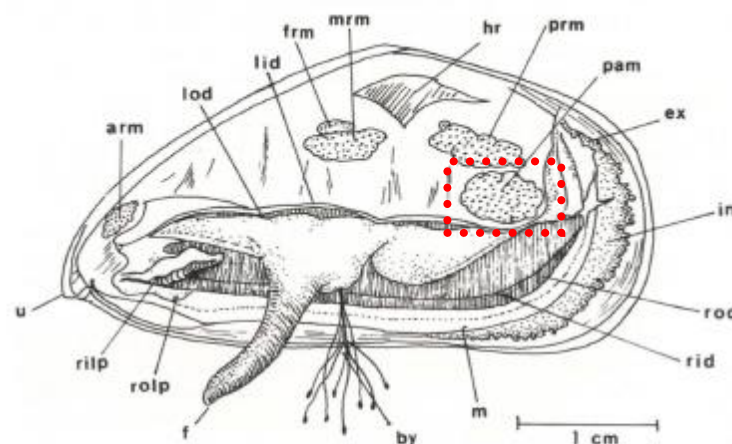


Figura 13. Localização do músculo adutor posterior (em destaque)

Fonte: Narchi e Galvão-Bueno (1997)

Após obter uma amostra de hemolinfa, a agulha foi removida da seringa e o conteúdo transferido para microtubos com volume de 2 mL. O conteúdo dos tubos foi misturado suavemente, invertendo-se os tubos e logo em seguida 40 μ L desta solução de células (hemolinfa + solução fisiológica) foi pipetado sobre a superfície de uma lâmina previamente tratada com poly-L-lisina.

As lâminas foram colocadas em uma câmara úmida à prova de luz e deixadas incubar por 15 minutos, tempo suficiente para as células aderirem às lâminas. Nesse intervalo de tempo, foi preparada a solução de trabalho de vermelho neutro.

Após a incubação inicial, retirou-se o excesso de fluido inclinando a lâmina sobre papel absorvente. Este procedimento é necessário para que os hemócitos aderidos na lâmina sejam totalmente expostos ao vermelho neutro no próximo estágio, e também para eliminar o efeito de flutuar que eventualmente ocorre com a lamínula quando há excesso de líquido.

3.8.2.6 Incubação e Leitura do Ensaio

Dentro da câmara úmida abrigada de luz, com auxílio de uma micropipeta, 40 μ L de solução de trabalho de vermelho neutro foi colocada sobre a camada de hemócitos formada em cada lâmina. Aguardaram-se mais 15 minutos para que o corante pudesse penetrar nas células, após esse tempo

a lâmina foi coberta com uma lamínula e iniciaram-se as leituras considerando células saudáveis e estressadas (FIG 14).

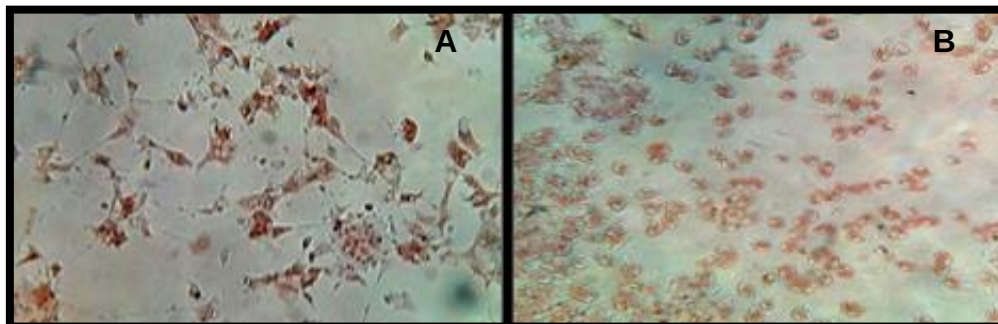


Figura 14. Hemócitos expostos ao vermelho neutro (Aumento de 400x)

(A) Células saudáveis; (B) Células estressadas.

As lâminas foram examinadas em microscopia de luz com aumento de 400X. De forma sistemática, onde o tempo de observação de cada lâmina não excedeu 1 minuto, pois devido a sua fotodegradação recomenda-se que as lâminas recebam a mesma exposição à luz durante as análises.

As leituras foram realizadas a cada 15 minutos até todas as células se apresentarem estressadas ou até atingir o tempo de 120 minutos.

As células foram examinadas conforme a Tabela (10). A cada contagem as condições foram anotadas em planilhas conforme a situação da lâmina em função do tempo de retenção do corante.

Na planilha de registro da análise das lâminas, as que apresentavam mais que 90% das células observadas sem sinais de stress, usou-se o sinal + (positivo), quando a ausência de stress se deu entre 90 - 50% das células observadas, usou-se o sinal $\pm$ (intermediário). O “end-point” foi determinado quando 50% ou mais das células exibiram anomalias estruturais ou vazamento do corante para o citosol, recebendo assim o sinal – (negativo) (KING, 2000).

O estado de integridade da membrana lisossômica pode ser refletido pelo tempo necessário para que ocorra o extravasamento do corante Vermelho Neutro para o citosol, o tempo de retenção médio para cada concentração foi calculado em função do tempo em minutos de cada organismo analisado.

Tabela 10 - Critérios para diferenciação de células saudáveis e células estressadas.

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

Fonte: (KING, 2000).

3.8.2.7 Tempos de exposição

Ao chegarem no laboratório os organismos foram limpos, sendo removidos os organismos incrustantes e posteriormente os mexilhões permaneceram em tanque de aclimação por 48 horas, afim de reduzir o estresse sofrido pelo transporte e pela limpeza.

Ao iniciar a exposição dos organismos no aquário foram retirados 10 organismos do tanque de aclimação para a leitura de T0 = 0 hora, a fim de identificar se os mesmos estão recuperados do estresse inicial.

Após a exposição, a água dos aquários com as concentrações teste foram renovadas a cada 24 horas.

No período de 48 horas de exposição realizou-se a leitura T48, retirando hemolinfa de 10 organismos de cada concentração. Esse processo repetiu-se após o período de 96 horas de exposição (T96) com o mesmo número de organismos.

3.8.3 Extração e análise dos tecidos biológicos

Concomitantemente ao processo de extração de hemolinfa realizou-se a dissecação dos organismos com o auxílio de um bisturi para a retirada dos tecidos a serem analisados (brânquias e glândulas digestivas). Foram obtidos tecidos em T0, T48 e T96, os mesmos após a extração foram identificados e armazenados em ultrafreezer (-80°C).

Os tecidos foram descongelados sobre o gelo e homogeneizados com solução tampão. A solução tampão de homogeneização foi preparada um dia antes do uso utilizando TRIS (50 mM), EDTA (1mM), DTT (1mM), Sacarose (50 mM), KCl (150 mM) diluído em 250 mL de água Milli-Q e no dia de uso o pH foi

ajustado para 7,6 com HCl. Preparou-se também outra solução de PMSF (100 mM) diluído em 1 mL de etanol.

A solução tampão de trabalho usada para homogeneização foi preparada da junção destas duas soluções sendo adicionados 100 μ L da solução PMSF em 30 mL do tampão de homogeneização, mantida sobre o gelo e envolta por papel alumínio.

A massa de cada alíquota de tecido foi pesado para que fosse adicionado um volume de solução tampão 4 vezes maior e em seguida a amostra foi homogeneizada (*TissueTearor*) e as alíquotas separadas em tubos de microcentrífuga para as análises de Lipoperoxidação (40 μ L), danos em DNA (25 μ L) e a mensuração de proteínas foram congeladas em ultrafreezer (-80°C.)

Foi utilizada a metodologia de Bradford (1976) para a quantificação de proteínas. As amostras foram descongeladas e mantidas sobre o gelo, foi necessário fazer a diluição da amostra utilizando 20 μ L de amostra em 180 μ L de água Milli-Q e homogeneizado com o auxílio de um agitador vortex.

Em placa transparente foi confeccionada uma curva padrão com albumina do soro bovino (BSA) e inserido 20 μ L das amostras diluídas, ambos foram feitos em duplicatas, bem como o branco que foi feito com a solução tampão de homogeneização. Em seguida com auxílio de uma pipeta multicanal adicionou-se 180 μ L do reagente Bradford e a placa foi incubada por 20 minutos envolta por papel alumínio.

Após a incubação a leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorbância de 595 nm.

3.8.3.1 Danos em DNA

A capacidade carcinogênica e mutagênica de substâncias químicas se manifesta a partir de danos infligidos sobre o DNA. Uma abordagem preventiva a estes efeitos mais severos se dá pela detecção de quebras simples no DNA, quebras que podem ser originadas pela exposição a contaminantes. Apesar do todo sistema de reparos genéticos, uma exposição contínua a poluentes pode levar ao colapso celular, uma vez que o DNA é molécula responsável por todas

as informações genéticas que interferem no funcionamento das células (Shugart et al., 1992; BERRA e MENCK, 2006).

Danos em DNA foram avaliados pelo ensaio de precipitação alcalina proposto por Olive (1988), utilizando fluorescência para quantificar vestígios de DNA livres (GAGNÉ e BLAISE, 1993).

3.8.3.2 Preparo de soluções

Solução de Sódio Dodecil Sulfato (SDS) 2%

A solução SDS (2%) foi preparada com EDTA (10mM), Trizma base (10mM), NaOH (40mM) e Sódio Dodecil Sulfato (SDS) na proporção de 2% diluídos em 250 mL de água Milli-Q).

Solução KCl

Essa solução foi preparada com 0,2236g (0,012M) de KCL diluído em 250 mL de água Milli-Q.

Solução Hoechst

Solução preparada no momento do uso através da mistura de 10 µL da solução estoque de Hoechst e 9,990 mL de Tampão. O preparo dessas soluções encontram-se a seguir.

A solução estoque Hoechst foi preparada com 100 µL de Hoechst 33342 = Trihidrocloreto Trihidratado (10mg.mL⁻¹) diluídos em 900 µL de metanol.

A solução Tampão foi preparada com NaCl (0,4M), colato de sódio (4mM), trizma-acetato (1M) dissolvidos em água Milli-Q, o pH foi ajustado para 8,5 com ácido acético.

Buffer de Homogeneização

Essa solução foi preparada com Trizma base-HCl (10mM) e EDTA (1mM) diluídos em de água Milli-Q, o ph foi ajustado para 8 com HCl.

Solução padrão de esperma de Salmão

Está solução foi obtida pesando 0,010g de esperma de Salmão que estava acondicionado em geladeira (4°C) e diluindo em 10mL da solução Buffer de homogeneização. A solução de esperma de Salmão foi utilizada para confeccionar a curva padrão.

3.8.3.3 Preparo e leitura de amostras

As alíquotas separadas para a análise continham 25µL de amostra e estavam armazenadas no ultrafreezer (-80°C). Ao serem retiradas do ultrafreezer foram adicionados 200 µl da solução SDS 2% as amostras e agitadas 2 vezes por inversão, em seguida foi adicionado 200 µl da solução KCl e agitadas 2 vezes por inversão. Após esse processo as amostras permaneceram em banho a 60°C por 10 minutos, em seguida agitadas 2 vezes por inversão e incubadas por 30 minutos a 4°C.

As amostras após a incubação foram submetidas a centrifugação (8000g a 5 minutos, 4°C, 6800 rpm) e foram pipetados do sobrenadante o volume de 50 µl de amostras para a leitura. Os 50 µl de amostras foram inseridos em duplicata em uma placa preta e em seguida foi adicionado 150 µl do reativo Hoechst.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro com agitação durante 5 minutos a 700rpm, a fluorescência foi mensurada através da excitação em 360nm e emissão 460nm.

3.8.3.2 Lipoperoxidação

A geração de espécies reativas de oxigênio podem ocorrer tanto como consequência direta do metabolismo do oxigênio, quanto da exposição a xenobióticos. O sistema de defesa antioxidante presente nos organismos tende a minimizar os efeitos dessas reações, porém no caso da exposição a xenobióticos esse sistema pode ser suplantado gerando uma cascata de reações que ocasionam diversos danos. Todos compartimentos celulares estão sujeitos a interação com espécies reativas de oxigênio e a membrana celular é altamente impactada devido a peroxidação lipídica que pode influenciar na permeabilidade da membrana e causar alterações estruturais comprometendo seu funcionamento (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação foi analisada através do método FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method), onde os peróxidos de hidrogênio oxidam o Fe⁺² formando o complexo Fe⁺³ + laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado podendo assim ser analisado quanto a absorbância de luz a 550-570nm (JIANG et al., 1991; JIANG et al., 1992).

3.8.3.3 Preparo de soluções

Solução laranja de xilenol (100 μ M)

Dissolveu-se 0,0038g de laranja de xilenol em 1mL de metanol.

Solução Hidroxitolueno butilado (BHT- 4mM)

Dissolveu-se 0,0441g de Hidroxitolueno butilado em 1mL de metanol.

Solução sulfato ferroso amoniacal (250 μ M)

Dissolveu-se 0,0049 g de sulfato ferroso amoniacal ($\text{FeSO}_4 \cdot \text{NH}_4$) em 0,5 mL de água Milli-Q.

Meio de reação

Essa solução foi feita no momento do uso com soluções previamente preparadas. Adicionou-se 47,375mL de metanol, 1mL da solução de laranja de xilenol, 125 μ L H_2SO_4 , 1 mL da solução e BHT e 0,5 mL da solução de Sulfato ferroso amoniacal.

3.8.3.4 Preparo e leitura de amostras

As amostras foram preparadas adicionando 800 μ L da solução de meio de reação aos 200 μ L da amostra ainda congelada e em seguida permaneceu 20 minutos em temperatura ambiente, sendo agitados por inversão a cada 3 minutos e depois centrifugados a 9000g por 10 minutos.

Foram pipetados 200 μ L do sobrenadante em duplicata nas microplacas e a leitura da absorbância foi feita a 550-570 nm.

3.9 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas, sendo assim avaliados quanto à normalidade, homogeneidade de variância por meio do método Chi-quadrado e teste de Bartlett, respectivamente. Posteriormente, para identificar diferenças entre as médias das concentrações testadas com relação ao controle e identificar CENO e CEO, foram empregados o Test-t de Student ou Dunnett. Para todas as análises, diferenças significativas foram determinadas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do programa TOXSTAT 3.5.

Para estipular a CE_{50} para os ensaios agudos foi utilizado o Trimmed Sperman Karber. Nos ensaios crônicos foi utilizado o ICP para calcular CI_{50} .

4 RESULTADOS

4.1 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas englobaram a mensuração do pH, oxigênio dissolvido e salinidade, condicionantes básicas para o desenvolvimento dos métodos utilizados e foram aferidos tanto no início quanto no fim dos ensaios. Esses parâmetros mantiveram-se dentro do considerado como adequado para os procedimentos, com leve variação do pH e do oxigênio dissolvido (O.D) devido a interação com os organismos inseridos no ensaio (TAB. 11).

Tabela 11 – Dados das análises físico-químicas inicial/final

	pH		O.D (mg.L ⁻¹)		Salinidade	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Água de diluição	8,16	8,11	5,9	5,4	35	35
Sol. Estoque (Agudo)	7,94	7,91	7,4	6,0	35	35
Sol. Estoque (Crônico)	8,14	8,03	6,8	5,9	35	35
Ensaio de Sensibilidade	7,90	8,00	7,2	6,8	35	35

4.2 TIER 0 – Quantificação do Paracetamol

As amostras processadas tanto de água superficial (1-5 S) quanto de fundo (1-5 F) continham o fármaco Paracetamol em concentrações que variaram de 0,02 a 0,03 µg.L⁻¹ (TAB. 12) Estando presente em todos os pontos, porém abaixo do limite de quantificação nos pontos 2F e 3F.

Tabela 12 – Concentrações de Paracetamol na Baía de Santos

	PONTOS DE COLETA									
	1S	2S	3S	4S	5S	1F	2F	3F	4F	5F
Paracetamol (µg.L⁻¹)	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	<LQ*	<LQ*	0,02	0,03

* limite de quantificação (LQ)

4.3 TIER 1 – Ensaios de Ecotoxicidade Aguda

O primeiro ensaio mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) a partir da concentração de 125 mg.L⁻¹, no segundo ensaio todas as concentrações foram diferentes e no terceiro apenas a maior concentração (1000 mg.L⁻¹) mostrou-se diferente em relação ao controle (FIG. 15). Essa variação pode ter se dado em função da variação

natural nos indivíduos da espécie coletados em datas diferentes e dentro disso ainda acrescenta-se os diferentes lotes de gametas utilizados. Apesar dessa variação, em nenhum ensaio foi possível estimar a CE_{50} .

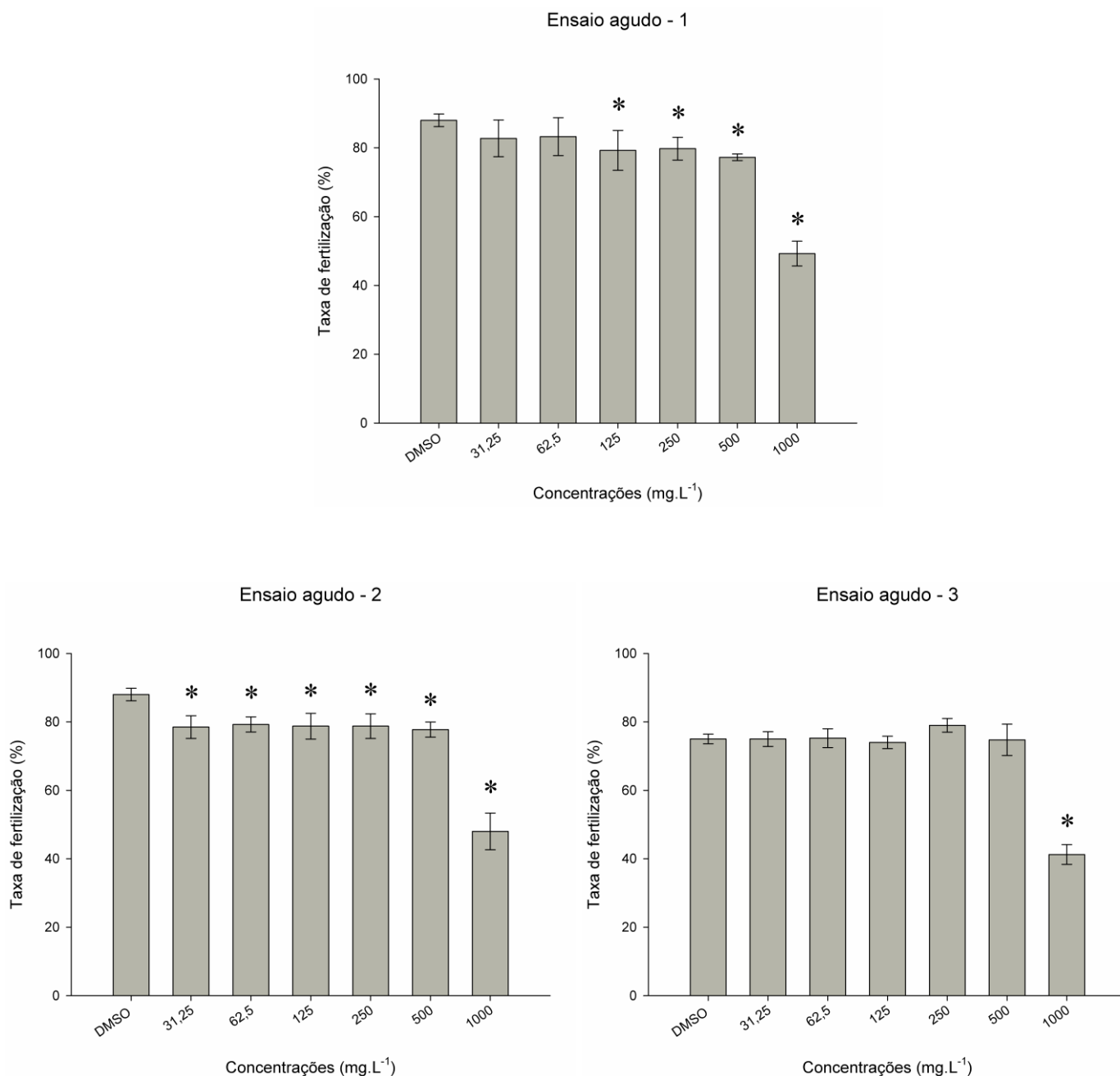


Figura 15. Ensaio agudo – Taxa de fertilização

Asteriscos indicam diferenças significativas com relação ao controle DMSO ($p < 0,05$)

4.4 TIER 2 – Ensaios de Efeitos Subletais

4.4.1 Sensibilidade dos organismos

Os valores de CI_{50} obtidos nos ensaios de sensibilidade mostram que os organismos estavam aptos ao estudo, viabilizando o prosseguimento dos ensaios e conferindo maior precisão e confiabilidade dos resultados (TAB. 13)

Tabela 13. Ensaio de Sensibilidade do *Perna perna* com substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio.

Dodecil Sulfato de Sódio	CI_{50}
Ensaio I	1,25 mg.L ⁻¹ (1,19-1,31 mg.L ⁻¹)
Ensaio II	1,01 mg.L ⁻¹ (0,97-1,03 mg.L ⁻¹)
Ensaio III	1,09 mg.L ⁻¹ (1,07-1,11 mg.L ⁻¹)

4.4.2 Ensaio Crônico – Desenvolvimento Embriolarval

Os resultados das leituras do ensaio crônico quanto ao desenvolvimento embriolarval das larvas do mexilhão *Perna perna* encontram-se expressadas graficamente (FIG. 16).

No ensaio preliminar foi observado efeito em 10 e 1000 mg.L⁻¹. A partir destes resultados estipularam-se as concentrações a serem usadas nos ensaios definitivos.

Houve queda no desenvolvimento normal dos embriões, sendo que quanto maior a concentração do composto mais severo eram os danos sobre os embriões.

Os valores de CENO e CEO foram iguais para os ensaios definitivos sendo respectivamente de 5 e 10 mg.L⁻¹. A CI_{50} apresentou uma variação entre os ensaios e o valor médio foi de 20,58 mg.L⁻¹ (TAB. 14).

Tabela 14. Concentrações de efeito e CENO (mg.L⁻¹) obtidas nos ensaios crônicos.

Ensaio	CENO	CEO	CI_{50}	Desvio Padrão
Preliminar	1	10	49,74	±1,71
1	5	10	10,84	±3,71
2	5	10	34,56	±0,75
3	5	10	16,33	±0,28
Média	5	10	20,58	±1,58

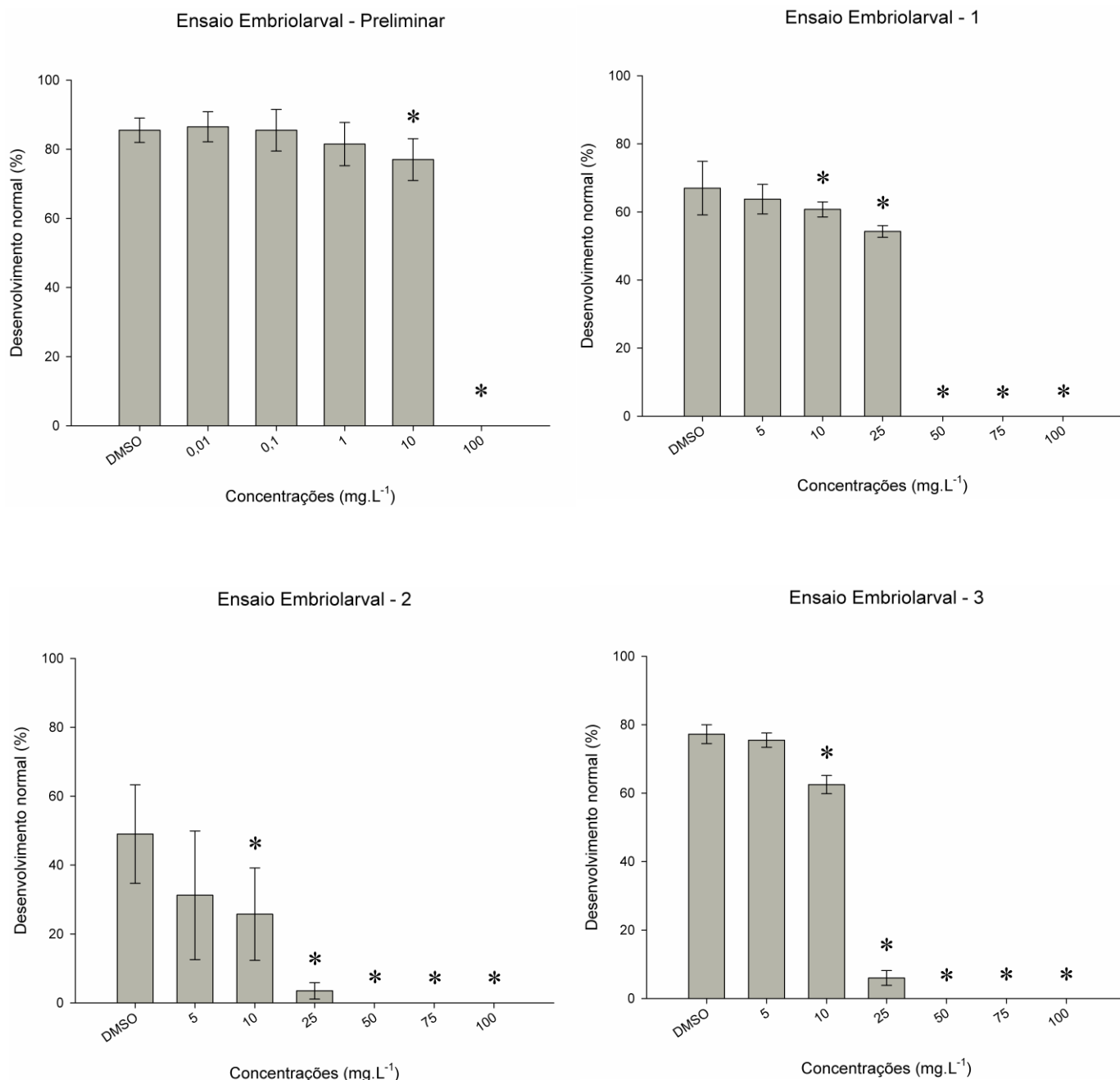


Figura 16. Ensaio crônico - Taxa de desenvolvimento embriolarval normal.

(A) Ensaio preliminar; (B) Ensaio 1; (C) Ensaio 2; (D) Ensaio 3.

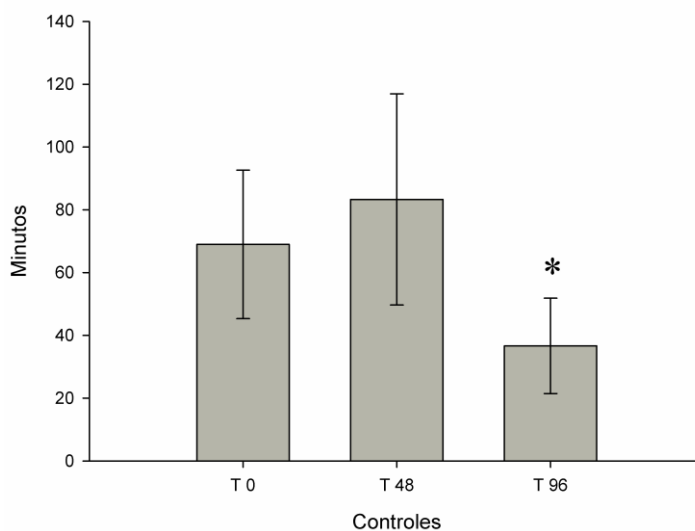
Asteriscos indicam diferenças significativas com relação ao controle DMSO ($p < 0,05$)

4.4.3 Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (TRCVN)

Os resultados das leituras de TRCVN apresentam-se de forma gráfica (FIG 17) e o tempo médio de retenção de cada leitura encontra-se na Tabela 15.

Foi observado diferença significativa em relação ao controle somente em 300 e 3000 ng.L⁻¹ na leitura de 48 horas e pela queda no tempo de retenção no controle de 96 horas não foi possível evidenciar alguma diferença.

Tempo de retenção do corante Vermelho Neutro



Tempo de retenção do corante Vermelho Neutro - 48 horas

Tempo de retenção do corante Vermelho Neutro - 96 horas

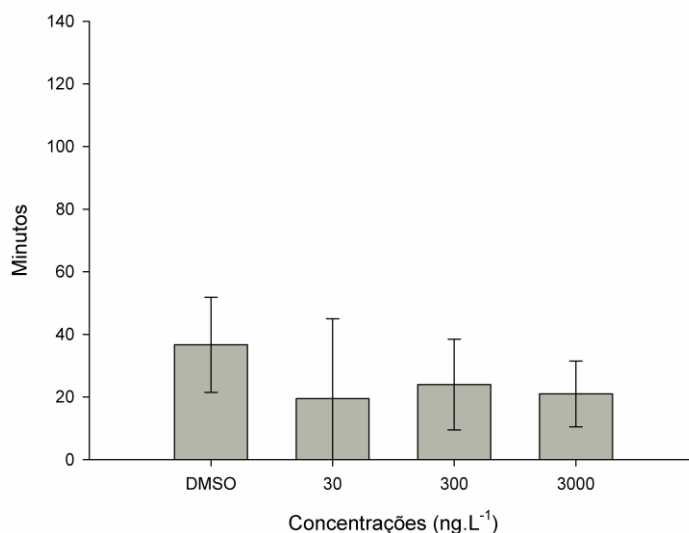
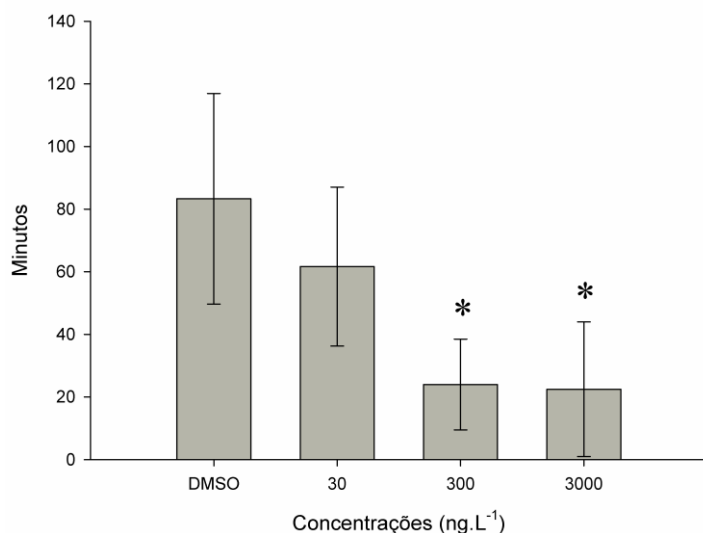


Figura 17. Tempo médio de retenção do corante Vermelho Neutro
Asteriscos indicam diferenças significativas com relação ao controle DMSO (p<0,05)

Tabela 15. Tempo médio de retenção do corante vermelho neutro (min).

Tempo médio de retenção	T-0	T-48				T-96			
		Controle	30	300	3000	Controle	30	300	3000
	69	83,3	61,6	24	22,5	36,6	19,5	24	21

Tempo = minutos;
Concentrações teste = ng.L⁻¹.

4.4.3 Danos em DNA

Constatou-se a capacidade do Paracetamol em gerar efeito genotóxico em brânquias de organismos expostos por 48h a $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Por ser o primeiro tecido a entrar em contato com o contaminante e o processo de filtração da água faz deste tecido o primeiro a demonstrar efeito.

Após 96 horas não foi observado efeito, provavelmente devido a uma resposta frente a exposição inicial.

As glândulas dos mexilhões expostos não apresentaram diferença em relação a dos controles em nenhum dos períodos de exposição.

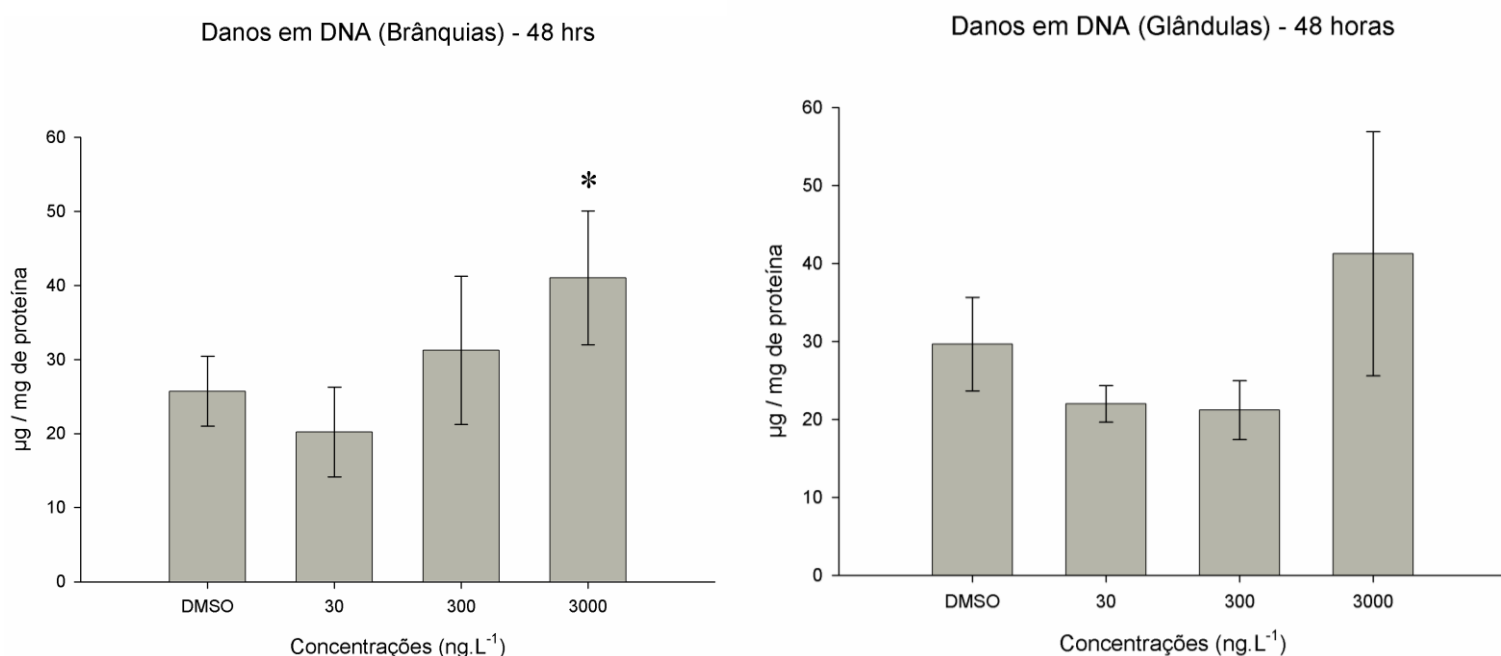


Figura 18. Danos ocasionados ao DNA após 48 horas de exposição.

Asteriscos indicam diferenças significativas com relação ao controle de DMSO ($p < 0,05$)

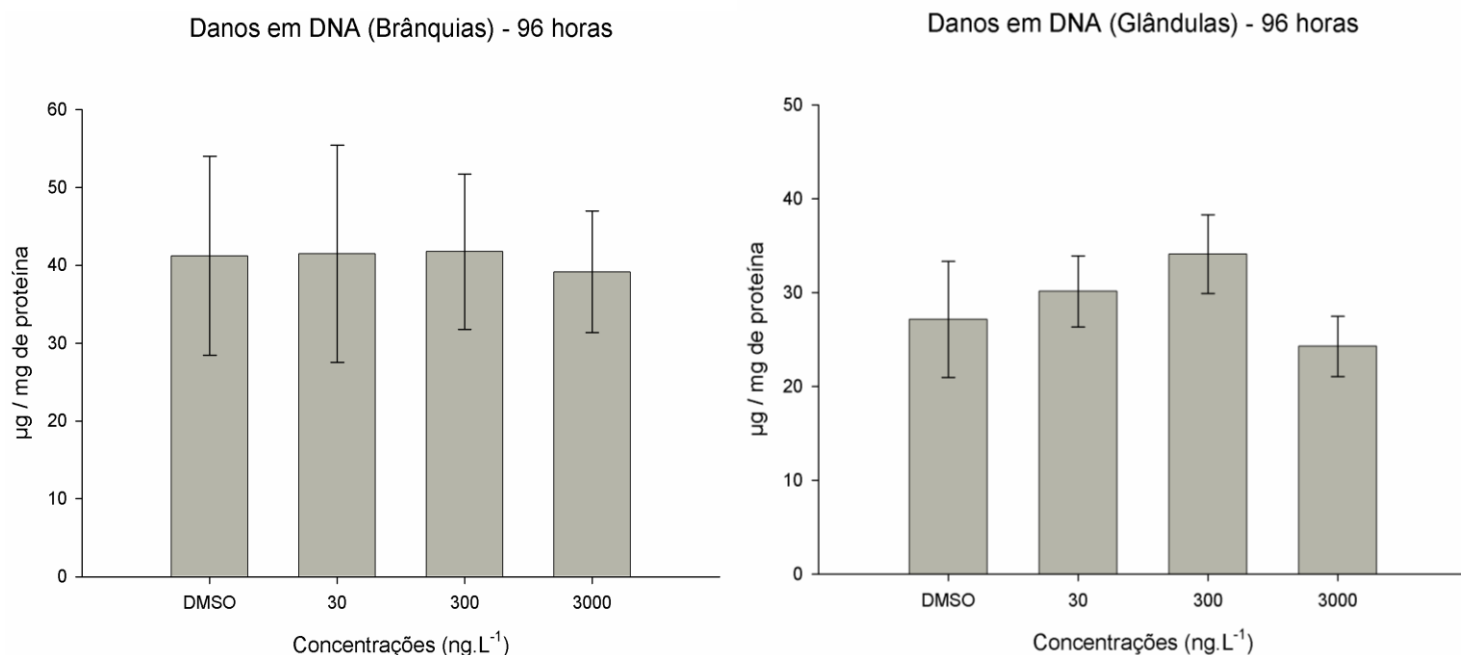


Figura 19. Danos ocasionados ao DNA após 96 horas de exposição.

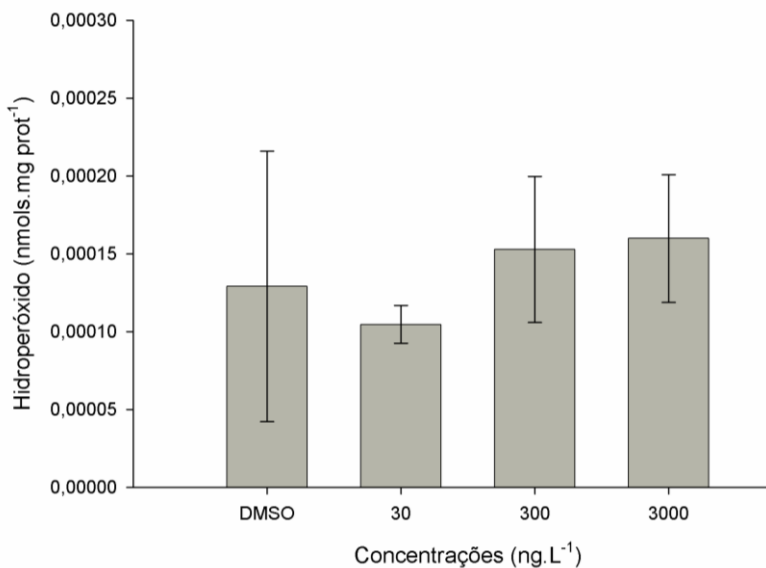
Asteriscos indicam diferenças significativas com relação ao controle DMSO ($p < 0,05$)

4.4.4 Lipoperoxidação

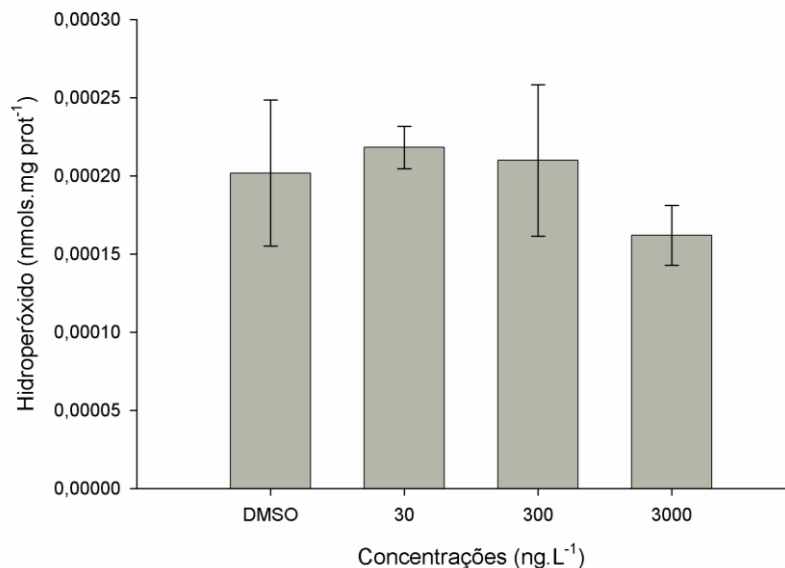
A peroxidação lipídica não foi constatada em nenhuma das condições reproduzidas neste estudo.

Houve uma queda do efeito nas concentrações de 300 e 3000ng.L⁻¹ após 96 horas de exposição nas brânquias. Apesar de não demonstrar efeitos adversos nas concentrações testadas essa também pode ser uma resposta de recuperação frente a exposição inicial.

Lipoperoxidação (Brânquias) - 48 horas

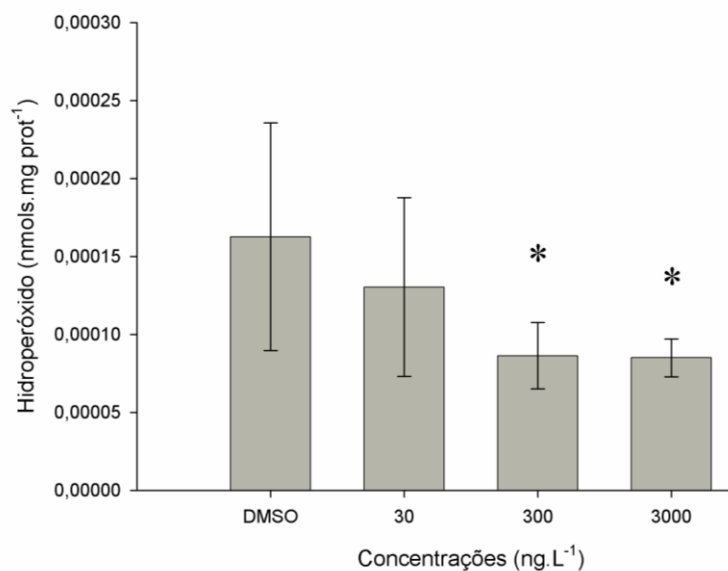


Lipoperoxidação (Glândulas) - 48 horas

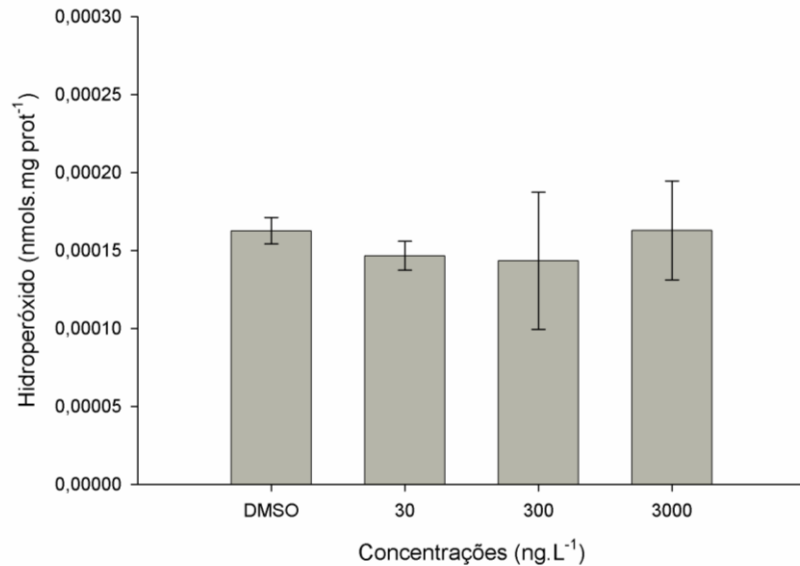
**Figura 20. Lipoperoxidação após 48 horas de exposição.**

Asteriscos indicam diferenças significativas com relação ao controle DMSO ($p < 0,05$)

Lipoperoxidação (Brânquias) - 96 horas



Lipoperoxidação (Glândulas) - 96 horas

**Figura 21. Lipoperoxidação após 96 horas de exposição.**

Asteriscos indicam diferenças significativas com relação ao controle DMSO ($p < 0,05$)

4.5 Avaliação de Risco de acordo com EMEA (2006)

Devido a ausência da CE_{50} em TIER – I (ensaio agudo) e CENO em TRCVN – 96hrs, calculou-se o QR utilizando os resultados obtidos somente em TIER –II com os ensaios embriolarvais, TRCVN – 48hrs, danos em DNA e LPO (TAB. 15).

Para o ensaio embriolarval o QR foi abaixo de 0,1 não apresentando risco significativo, porém quando calculado QR com base na citotoxicidade esse valor foi 100x maior que o necessário para qualificá-lo como alto risco.

Tabela 16. Determinação do Quociente de Risco.

Ensaio	CENO (mg.L ⁻¹)	PNEC (mg.L ⁻¹)	MEC (mg.L ⁻¹)	Q.R (MEC/PNEC)	Risco
Embriolarval	5	0,05	0,00003	0,0006	Baixo
TRCVN – 48hrs	0,00003	0,0000003	0,00003	100	Alto
TRCNV (CE ₅₀)	0,000107	0,000000107	0,00003	280,37	Alto

4.6 Avaliação de Risco de acordo com a Diretiva Européia 93/67/EEC

Esta abordagem é realizada com base nos valores de CI_{50} , sem levar em consideração as concentrações ambientais e propõem uma classificação de toxicidade para o composto.

O Paracetamol foi classificado em diferentes categorias de acordo com o ensaio realizado, sendo que os ensaios mais sensíveis ranquearam o composto como extremamente tóxico (TAB 16).

CI_{50} ou CE_{50} (mg.L ⁻¹)	Extremamente tóxico	Muito tóxico	Tóxico	Perigoso	Não tóxico
	<0,1	0,1≥ e <1	1≥ e <10	10≥ e <100	≥100
Ensaio agudo					
Embriotoxicidade					
Citotoxicidade					

5 DISCUSSÃO

As análises físico-químicas permaneceram dentro do permitido para o bom desenvolvimento dos ensaios, bem como os controles tanto de água do mar quanto do solvente DMSO não apresentaram toxicidade, assim sendo, os demais efeitos observados nas concentrações-teste podem ser atribuídos ao composto em análise.

A comercialização livre do Paracetamol dificulta a estimativa do uso e consequentemente da excreção. Soma-se a essa questão o descarte inadequado de medicamentos, muitas vezes diretamente nas redes de esgoto (GASPARINI et al., 2011; UEDA et al., 2009).

Tem se desenvolvidos trabalhos com a finalidade de remoção dos FPHCP's nas ETE's, porém para o Paracetamol o processo de lodo ativado, convencional em alguns locais, já apresenta uma eficiência acima de 90% no tratamento (KASPRZYK-HORDERN et al., 2009).

Dependendo da dose ministrada e de características da pessoa (peso, idade, sexo) a meia vida biológica do Paracetamol tende a variar, porém não muito, em média de 2:30 horas (PRESCOT, 1980).

O Paracetamol assim como os demais FPHCP's é uma molécula bioativa, ou seja, para exercer efeito depende da interação com moléculas biológicas presentes nos organismos podendo interagir com organismos não-alvos. Após o uso, em contato com o meio ambiente, tanto os metabólitos originados quanto a porcentagem excretada de forma inalterada ainda pode agir sobre a biota.

Após ministrado no organismo, no caso da saúde humana, o Paracetamol passa por diversas interações com enzimas, originando produtos secundários para que possam ser excretados, porém 5 a 15% do composto interage com CYP450 gerando o metabólito tóxico N-acetyl-p-benzoquinona em quadros de superdosagem ou depreciação dos níveis de glutathione (BERTOLINI et al., 2006).

Esse é um composto altamente solúvel em água ($K_{ow} = 0,46$), não sendo esperado que venha a adsorver em sólidos suspensos ou em sedimentos, por outro lado, isso facilita a sua dispersão pela água. É

classificado como facilmente biodegradável com meia vida de aproximadamente 20 dias e por isso não é considerado persistente de acordo com o REACH (BOUISSOU-SCHURTZ et al., 2014; MOERMOND et al., 2012)

Mesmo não sendo considerado persistente, um estudo realizado por Benottie e Brownawell (2009) demonstrou que a comunidade microbiana de estuários e regiões costeiras tende a degradar compostos farmacêuticos de forma mais lenta do que em águas continentais, incluindo nesses FPHCP's o Paracetamol.

Apesar da lenta degradação em regiões costeiras, a baixa taxa de excreção do composto inalterado (4%), o pré-tratamento e a dispersão sofrida pelo emissário em mar aberto não foram suficientes o bastante para que o composto estivesse ausente nas águas da Baía de Santos.

No presente estudo, em todas as amostras coletadas ao entorno do lançamento do emissário submarino foi identificada a presença de Paracetamol, sendo encontradas concentrações entre 0,02 e 0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Os pontos 2F e 3F apesar de apresentarem o composto em sua constituição continham os limites abaixo da quantificação permitida pelo método escolhido. Isso pode ter se dado pela própria dispersão da pluma do efluente na coluna d'água no momento da coleta.

O KoW do Paracetamol indica uma afinidade não tão forte com substrato apolar como sedimento e matéria orgânica, assim sendo, sua afinidade com a água tende a ser maior do que outros FPHCP's e devido a isso possui uma dispersão maior na água, o que pode explicar a ausência em alguns pontos da coleta.

Valores superiores ao deste estudo foram identificados num monitoramento em diversos locais como no mar Báltico - Alemanha (48 ng.L^{-1}) e em Veneza - Itália (99 ng.L^{-1}), valores inferiores quantificados na Baía de São Francisco - EUA (11 ng.L^{-1}) e no Mar Mediterrâneo - Israel (12 ng.L^{-1}), apesar da ampla distribuição notada neste monitoramento, consta-se que a presença do Paracetamol não ultrapassa ng.L^{-1} (NÖDLER et al., 2009).

Já no trabalho feito por Gómez et al., (2007) quantificou o máximo de 246 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Paracetamol no afluente de uma ETE no sul da Espanha, sendo

este a maior concentração encontrada para o composto, sendo que antes de ser lançada no ambiente foi submetido ao tratamento local que mostrou eficiência de remoção de 99%.

Apesar da presença dos FPHCP's no ambiente os efeitos agudos provenientes desta exposição não são frequentes (BLASCO e DELVALLS, 2008).

Claessens et al., (2013) constatou que valores de 265,8 mg.L⁻¹ de Paracetamol podem inibir o crescimento da diatomácea marinha *Phaeodactylum tricornutum*.

Ao avaliar 5 diferentes invertebrados marinhos e de água doce Calleja et al., (1994) para a espécie mais sensível a LC₅₀ foi de 9,2 mg.L⁻¹ (*Streptocephalus proboscideus*).

Utilizando camarões de água doce, Sung et al., (2014) obteve uma LC₅₀ de 6,07mg.L⁻¹ e quando em mistura com o analgésico Ibuprofeno apresentou número de mortes mais elevada, indicando a capacidade de interação entre FPHCP's.

Estes estudos demonstram que a concentração necessária para causar efeitos agudos é muito elevada e suplanta em muitas vezes as concentrações comumente encontradas no ambiente.

Para este trabalho foi determinado o máximo de 1000 mg.L⁻¹ visto a inexistência de dados de concentrações ambientais que fossem acima disso, estando esses entre as ordens de ng a µg.L⁻¹.

Apesar das concentrações testadas terem demonstrado diferenças estatísticas quando comparadas ao controle, não foi possível obter uma EC₅₀ nem mesmo na maior concentração.

Já numa visão mais próxima às condições reais do ambiente onde a entrada desses compostos por mais que seja baixa se mantém de certa forma contínua, os ensaios ecotoxicológicos de efeito crônico e subletal tornam-se uma ferramenta mais adequada para a avaliação de risco do composto.

Os resultados obtidos com o ensaio de desenvolvimento embrionário indicou CE₅₀ 20,58 mg.L⁻¹(10,84 – 34,56). Os efeitos observados até a

concentração de 10 mg.L⁻¹ em sua maior parte foram conchas vazias e deformidades morfológicas nessa mesma estrutura. Na concentração de 25 mg.L⁻¹ já foi possível observar também retardos e extrusão do conteúdo visceral. A partir da concentração de 50 mg.L⁻¹ a estrutura biológica encontrava-se muito danificada, sendo observado apenas aglomerados de células disformes. A deteriorização do embrião em função da concentração foi relatada em ouriços do mar (*Paracentrotus lividus*) por Carballeira et al. (2010)

A CENO obtida com isso foi de 5 mg.L⁻¹ e esse valor foi usado para estimar o coeficiente de risco.

A CEO resultante dessa análise foi de 10 mg.L⁻¹, o fato dos embriões encontrarem-se em pleno estado de desenvolvimento, sendo células indiferenciadas com altas taxas de divisão os torna mais susceptíveis à ação do fármaco, com a manifestação dos efeitos em anormalidades morfológicas que se mostraram mais severas conforme a concentração de Paracetamol aumentava.

Quanto maior a disponibilidade do contaminante na amostra maior foi a interação e influência dele sob os organismos. Durante o processo de divisão celular sofrida pelo embrião o Paracetamol pode ter alterado os processos de expressão gênica e consequentemente de divisão celular. Esse tipo de ação torna-se facilitada devido ao estágio de vida analisado, tomado como frágil por não ter um sistema de excreção e defesa desenvolvido como nos organismos adultos.

A CENO é semelhante a obtida por Kim et al., (2012) que analisou a sobrevivência e crescimento populacional de dois microcrustáceos de água doce, *Daphnia magna* (21 dias) e *Moina macrocopa* (7 dias) apresentando respectivamente CENO 5.72 mg.L⁻¹ e 8.58 mg.L⁻¹. Neste mesmo estudo, evidenciou-se que uma concentração de 95 mg.L⁻¹ de Paracetamol pode diminuir a sobrevivência de juvenis do peixe *Oryzias latipes*.

O presente estudo apresenta também os efeitos do Paracetamol sobre a estabilidade da membrana lisossômica de mexilhões expostos a concentrações ambientalmente relevantes.

Os mexilhões analisados em T0, antes da exposição dos demais tiveram tempo médio de retenção de 69 minutos, considerado saudável, demonstrando que os organismos se recuperaram do estresse inicial do transporte e limpeza.

As leituras ocorridas após 48 horas de exposição (T48) mostraram uma melhora no controle (83 minutos) que pode ser reflexo ainda da melhora na condição fisiológica do organismo em função do estresse inicial, a concentração de 30 ng.L⁻¹ não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Os efeitos foram significativos nas maiores concentrações (300 e 3000 ng.L⁻¹)

O Paracetamol possui constante de dissociação que o caracteriza como ácido fraco (pKa= 9,38) (DASTMALCHI et al., 1995). O pKa é um parâmetro que influencia na absorção do fármaco, ele representa o valor de pH do meio no qual o composto encontra-se em equilíbrio em relação as formas ionizadas e não ionizadas/moleculares. Ou seja, quando o pH do meio é igual ao pKa do fármaco, esse se encontra 50% na forma ionizada e 50% na forma não ionizada.

Para ácidos fracos como o Paracetamol, quanto menor o pH da solução em que ele se encontra, maior a porcentagem da forma molecular, e em pH elevado predomina a ionização e dissociação do composto (XAGORARAKI et al., 2008).

Formas não ionizadas são mais lipossolúveis e se difundem pela membrana celular com facilidade, já as formas ionizadas encontram resistência na membrana devido a grupamentos carregados presentes em sua superfície.

Apesar de o Paracetamol ser pouco lipofílico (KoW = 0,46) o pKa favorece o seu transporte pelas membranas, podendo assim chegar ao interior das células e sendo captado pelo lisossomo que contém pH ácido mantendo a forma não ionizada do composto que passa a interagir com o lisossomo, afetando a estabilidade de sua membrana, comprometendo as bombas de H⁺ que regulam o pH do interior da organela e reduzindo a capacidade de retenção do corante.

Nas leituras de T96 apesar da diminuição no tempo de retenção, não foi possível estabelecer diferenças estatísticas entre as concentrações e o

controle. Comparou-se o tempo de retenção entre T0 e os controles de T48 e T96, onde se constatou uma queda significativa no controle T96, esse efeito pode ter sido gerado pela manutenção do organismo em aquário, provavelmente devido à baixa circulação de água, uma vez que esses organismos permanecem em locais dinâmicos com embates de ondas e flutuação da maré. Esse efeito sobre o controle T96 explica a incapacidade de encontrar diferenças significativas desse período de exposição.

Alguns estudos foram realizados com o molusco bivalve de água doce *Dreissena polymorpha*, utilizando de análise da estabilidade da membrana lisossômica através do TRCVN e outros ensaios de cito-genotoxicidade. Parolini et al., (2009) destaca os níveis elevados de danos em DNA causados pela exposição ao Paracetamol em concentrações a partir de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ e este tipo de dano está diretamente ligado a desestabilização da membrana lisossômica que ocorreu a partir dessa mesma concentração e também levou a quadros de apoptose celular.

A capacidade de desestabilizar a membrana lisossômica e seus riscos correlacionados pode ser explicada pelo valor de pKa que favorece o transporte e manutenção das formas não ionizadas do Paracetamol.

Com exposição de 96 horas foi possível constatar queda no tempo de retenção do corante vermelho neutro em concentrações de 151,2 e 756 ng.L^{-1} , quando a concentração foi de $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ esse efeito foi gerado a partir de 48 horas e após 96 horas foi possível observar apoptoses (PAROLINI et al., 2010).

Comparando os dados obtidos nesse estudo com o que foi constatado por Parolini et al., (2010), a concentração de 30 ng.L^{-1} que não mostrou-se prejudicial em T48 possivelmente poderia ter se mostrado diferente estatisticamente em relação ao controle em T96 em função do período prolongado de exposição, não fosse a interferência da redução de tempo de retenção observada no controle.

Nota-se assim que a exposição contínua mesmo que em valores de ng.L^{-1} são capazes de causar efeitos deletérios nos organismos, e que a estabilidade da membrana lisossômica por mais que seja um biomarcador de

estresse celular geral precede efeitos em outros níveis de organização biológica como dano em DNA e morte celular.

Alguns trabalhos demonstram que organismos que apresentavam a membrana lisossômica desestabilizada tiveram redução na condição fisiológica e atrofia de tecidos reprodutivos, afetando negativamente a viabilidade dos gametas (PEREIRA et al., 2007; RINGWOOD et al., 2004).

Pereira et al., (2014) demonstrou que os organismos adultos que estavam com a integridade da membrana lisossômica comprometida também apresentaram menor viabilidade de gametas. Uma das funções dos lisossomos é a de digestão intracelular, seja de patógenos ou até mesmo de macromoléculas disponibilizando carboidratos e aminoácidos. Isso pode elucidar os efeitos gerados sobre os embriões no ensaio crônico, pois num estágio inicial a dependência de energia é exclusiva do vitelo e essa disposição de nutrientes é prejudicada, uma vez que a organela atuante nesse processo encontra-se desestruturada (FAN et al., 2010).

Assim, o ensaio TRCVN mostra-se uma ferramenta eficiente, além de ser um método conservativo permitindo o monitoramento da condição ambiental a partir de informações que precedem efeitos significativos em nível de indivíduo e população.

Os radicais livres são agentes reativos patogênicos e a maioria origina-se a partir da metabolização do oxigênio molecular (O_2), sendo também chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO). A interação de ERO com outras moléculas como o DNA pode ocasionar quebras na fita, bem como pode desencadear a lipoperoxidação em membranas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Danos em fitas de DNA são comuns e podem ocorrer pela incidência de luz UV, ação de radicais livres e exposição a contaminantes, porém em condições normais esses danos podem ser reparados (SHUGART, 2000).

Os danos em DNA foram verificados apenas em 48 horas de exposição na concentração de 3000 ng.L^{-1} , sendo que as menores concentrações e o período de exposição de 96 horas não apresentaram o dano.

Isso pode ter se dado pela fácil excreção do composto, uma vez que em contato com o organismo, o Paracetamol é oxidado pela ação da CYP 450 do sistema de oxidase de função mista, gerando assim o N-acetil-p-benzoquinona que é altamente reativo e passa a interagir com proteínas e ácidos nucleicos sendo assim o responsável pelo efeito observado em 48 horas. Em seguida a enzima glutathione se associa ao composto formando um conjugado para que o mesmo seja excretado permitindo que o organismo se recupere desse estresse inicial, contando ainda com a contribuição do sistema de reparos do DNA, não apresentando efeito a 96 horas de exposição (PAROLINI et al., 2010; BERRA e MENCK).

Na membrana celular pode ocorrer o processo chamado lipoperoxidação, originado da interação de ERO com os ácidos graxos que constituem a membrana liberando radicais lipídicos que dão continuidade a esse processo como uma reação em cadeia desestruturando e comprometendo funções das células podendo levar a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 2010).

No presente estudo foi utilizado uma metodologia que leva em consideração os subprodutos da produção de radicais livres e não foi possível identificar efeitos adversos relacionados a lipoperoxidação em 96 horas de exposição. Entretanto, ao utilizar métodos de quantificação direta da produção de radicais livres Wofford e Thomas (1988) constataram a capacidade do Paracetamol de induzir peroxidação lipídica em peixes marinhos. Ramos et al., (2010), utilizando truta de água doce, observaram efeitos em exposições acima de $12,5\mu\text{g.L}^{-1}$ em período de exposição de 28 dias. Solé et al., (2010) utilizou mexilhões marinhos e conseguiu relacionar os danos hepáticos observados com altos índices de peroxidação lipídica causados pela exposição ao Paracetamol em concentrações mais elevadas ($200\mu\text{g.L}^{-1}$) e período de 10 dias.

Alguns estudos mostram que AINE's dentre eles o Paracetamol, contribui para o aumento na atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase e catalase, que são defesas contra o estresse oxidativo o que nos indica que o organismo responde a exposição a esse contaminante e devido a isso pode

não ter apresentado efeitos no início do ensaio. As concentrações testadas e no período de exposição utilizado neste estudo que por levar em consideração concentrações ambientalmente relevantes tem sido inferior ao reportado na literatura (GONZALES-REY e BEBIANNO, 2012; GONZALEZ-REY e BEBIANNO, 2014; PAROLINI et al., 2010; RAMOS et al., 2010).

O Quociente de risco foi calculado utilizando os dados de quantificação obtidos neste estudo na Baía de Santos (MEC) e com os ensaios ecotoxicológicos realizados com organismo nativo da região (PNEC).

Para o ensaio agudo não foi possível estabelecer o QR, pois para este ensaio o parâmetro utilizado é a CE_{50} e as concentrações testadas não permitiram identificar esse parâmetro, assim, neste estudo o risco levando em consideração os efeitos agudos com a espécie *Perna perna* são inexistentes.

Bouissou-Schurtz et al.,(2014) utilizando ensaio agudo com microcrustáceos de água doce determinou o risco como alto ($QR = 1.6$), porém usou como dado ambiental a concentração calculada baseada no uso diário máximo resultado numa concentração esperada (PEC) de $20 \mu g.L^{-1}$. Quando se utilizou a concentração ambiental real obtida na França, o risco foi caracterizado como baixo ($QR = 0,04$).

A análise de risco feita utilizando o PEC deve ser cuidadosa, pois a estimativa é feita envolvendo diversos fatores em relação ao fármaco como dose ingerida, excreção, prescrição e degradação, no caso do Paracetamol é difícil estipular o parâmetro de uso devido a venda livre, sendo mais seguro trabalhar com as concentrações ambientais mensuradas (MEC).

Hernando et al., (2006) analisou 5 diferentes AINE's baseado em MEC de ETE's e PNEC obtida de ensaios agudos com diferentes classes de organismos de água doce (algas, bactérias e invertebrados) e todos os AINE's apresentaram QR superior a 1 caracterizando-os como alto risco. Análises de risco baseados somente em dados da literatura pode levar a análises falhas e deve se tomar cuidado ao selecionar os dados, pois não é conveniente analisar o risco de um composto num local com espécies que não são nativas da região.

A análise do QR com base nos dados crônicos obtidos neste estudo demonstrou um risco considerado baixo (0.006).

Verlicchi et al., (2012) estipularam o risco de um efluente hospitalar para diversos FPHCP's e o Paracetamol foi dado como risco alto, quando analisado o afluente e o efluente em ETE's o risco foi respectivamente determinado como médio e baixo, a concentração de efeito utilizada para estimar o risco foi obtida na literatura.

A análise de risco feita a partir da CENO e da CE_{50} obtida no TRCVN caracterizou o QR como alto ($QR-CENO = 100$ e $QR-CE_{50} = 280,37$), sendo que para ser categorizado esse risco é necessário que o QR seja maior do que 1. Isso indica um risco eminente no que diz respeito a alteração fisiológica do organismo que permanecendo constante pode levar a danos mais severos e irreversíveis.

Com isso é importante levar em consideração a possibilidade do uso de novas metodologias que são mais adequadas que possam nos dar um panorama mais realista das condições ambientais a que os diversos organismos estão expostos e assim realizar uma análise de risco mais coerente e não se restringir somente a métodos já padronizados (AGUIRRE-MARTINÉZ et al., 2015).

De acordo com Avaliação de Risco proposta pela Diretiva Europeia 93/67/EEC a classificação do Paracetamol oscilou em função do ensaio utilizado sendo considerado não tóxico ou perigoso utilizando os métodos padrões e com o TRCVN sua classificação foi tomada como extremamente tóxico.

Como precursor de diversos efeitos em diferentes níveis de organização biológica relacionados em alguns trabalhos, a análise do risco embasada na estabilidade da membrana lisossômica fornece uma análise de risco mais sensível e permite interferência de ordem legislativa visando a preservação e a integridade do ecossistema e não somente a remediação de um problema, uma vez que medidas podem ser tomadas para evitar que futuros danos à comunidade biológica venham se manifestar.

Faz-se necessário o emprego de um tratamento de efluentes eficiente que possa remover o Paracetamol, uma vez que este está presente na Baía de Santos e continuamente disponibilizado no meio marinho podendo interagir de forma prejudicial com a biota. Junto com o Paracetamol outros constituintes da classe dos FPHCP's também são despejados podendo exercer seus efeitos adversos e interagir de forma sinérgica quanto a sua toxicidade.

Além da instalação de tratamento adequado faz-se também necessário a normatização de padrões aceitáveis para emissão destes compostos em meio aquático.

6 CONCLUSÕES

O fármaco Paracetamol foi identificado em todas as amostras coletadas no entorno do Emissário Submarino de Santos e provavelmente devido a movimentação da pluma do efluente e de sua dinâmica na coluna d'água alguns pontos se mostraram abaixo do limite de quantificação.

O Paracetamol não foi capaz de interferir no processo de fertilização do mexilhão nas concentrações testadas neste trabalho e a concentração limite (1000 mg.L^{-1}) não foi ultrapassado pois não existem quadros onde a concentração ambiental do composto possa chegar a tais níveis.

O composto demonstrou embriotoxicidade a partir de 10 mg.L^{-1} (CENO) e o valor de $\text{CI}_{50} - 20,58 \text{ mg.L}^{-1}$ utilizado para calcular o QR forneceu um índice de 0,0006, sendo classificado como “baixo risco”.

A aplicação de metodologias mais adequadas, além das já padronizadas é recomendada, pois a utilização de métodos orientados pelo modo de ação dos xenobióticos em níveis menores de organização biológica podem auxiliar num melhor entendimento dos efeitos adversos e do risco ambiental.

Nesse contexto, os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade elucidaram efeitos em concentrações ambientalmente relevantes (300 e 3000 ng.L^{-1} , respectivamente). Quando a CE_{50} do ensaio citotóxico foi considerada para cálculo do quociente de risco, o resultado foi “alto risco”.

O composto apresenta capacidade genotóxica ao induzir quebras no DNA, e para mensurar os efeitos de peroxidação lipídica seria indicado o uso de metodologias de mensuração direta como o TBAR.

Dentre os biomarcadores, o ensaio do tempo de retenção do corante vermelho neutro mostra-se uma ferramenta eficiente e adequada, visto o tempo de obtenção de resultados, a sensibilidade do ensaio em detectar efeitos em ng.L^{-1} e a sua relação direta com outros efeitos em níveis de organização superior podendo prejudicar o desenvolvimento do organismo e tecidos reprodutivos, afetando assim níveis populacionais.

O tempo de retenção do corante vermelho neutro indica uma condição de saúde celular e pode ser tomado como antecedente a efeitos diversos, porém a detecção de perturbações a nível celular pode ser reversível e as consequências posteriores evitadas.

Para a matriz ambiental analisada o mexilhão se mostrou um organismo modelo adequado, pois o seu comportamento filtrador faz com que ele interaja diretamente com o composto dissolvido na água e o seu habito sésil traz informações das condições que atuam sobre o local do estudo e não de regiões diversas, o que pode ocorrer ao usar organismos móveis.

A reprodução das condições de exposição em períodos de tempo maiores que os abordados neste estudo são aconselháveis, uma vez que em exposição contínua os mecanismos de recuperação fisiológica podem ser suplantados, entrando em colapso e tornando-se ineficientes frente a ação do composto que pode ocasionar efeitos adversos.

Nossos resultados reforçam a necessidade de tratamento eficiente como o lodo ativado para a remoção de FPHCP's em efluentes líquidos, bem como o estabelecimento de padrões seguros para emissão destes compostos em ambientes marinhos.

REFERÊNCIAS

ABESSA, D. M. S.; CARR, R. S.; RACHID, B. R. F.; SOUZA, E. C. P. M.; HORTELANI, M. A.; SARKIS, J. A. **Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments.** Marine Pollution Bulletin.V. 50 pág.875–885. 2005.

ADAMS, S. M.; SHUGART, L. R.; SOUTHWORTH, G.R.; HINTON, D. E. **Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress.** pág. 333-353. In: J.F. McCarthy and L.R. Shugart (eds.), Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, 1990.

AGUIRRE-MARTINEZ, G. V.; OWUOR, M. A.; GARRIDO-PÉRA, C.; SALAMANCA, M. J.; DEL VALLS, T. A.; MARTÍN-DÍAZ, M. L. **Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs.**Chemosphere. V. 120 pág. 75-85. 2015.

ALBIERI, S.; FREITAS, M. P. S. de. **Censo demográfico de 2010: plano amostral para a coleta de dados.** Revisão 2012. Rio de Janeiro: IBGE, Diretoria de Pesquisas. 2012.

AMORIM, L. C. A. **Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais.**Rev. Bras. Epidemiol. V. 6nº.2 pág.158–170. 2003.

ASHTON, D.; HILTON, M.; THOMAS, K. V. **Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom.**Science of the Total Environment.V. 333 pág. 167–184. 2004.

ASTM – AMERICAN SOCIETY OF TESTING AND MATERIALS. E 724-89 **Standard guide for conducting static toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve mollusks.** In: Annual Book of ASTM Standards: water and environmental technology. Philadelphia. V. 11 pág.377–394. 1992.

BACCI, D. L. C.; PATACA, E. M. **Educação para a água.** Estudos avançados.V. 22, nº.63 pág. 211-226.doi.org/10.1590/S0103-40142008000200014

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. **Antibiotics and antibiotic resistance in water environments.** Current opinion in Biotechnology.V. 19 pág.260–265. 2008.

BENOTTI, M. J.; TRENHOLM, R. A.; VANDERFORD, B. J.; HOLADY, J. C.; STANFORD, B. D.; SNYDER, S. A. **Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water.** Environ. Sci. Technol. V. 43 pág.597–603. 2009. doi: 10.1021/es801845a

BENOTTI, M. J.; BROWNAWELL, B. J. **Microbial degradation of Pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater.** Environmental Pollution.V.157 pág. 994–1002. 2009.

BERRA, C, M.; MENCK, C. F. M. **Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular.** Quim. Nova. V. 29 nº.6 pág 1340-1344. 2006.

BERTOLINI, A.; FERRARI, A.; OTTANI, A.; GUERZONI, S.; TACCHI, R.; LEONE, S. **Paracetamol: New vistas of an old drug.**CNS drug reviews.V. 12 nº 3-4. 2006.

BEYER, N.; GISH, C.D. **Persistence in earthworms na potential hazards to birds of soil applied DDT, Dieldrin and Heptachlor.**Journal of Applied Ecology.V. 17 nº.2 pág.295-307.1980.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Fármacos no meio ambiente.** Química Nova.V. 26 nº.4 pág.523-530.2003.

BLASCO, J.; DELVALLS, A. **Impact of Emergent Contaminants in the Environment: Environmental Risk Assessment.** HdbEnv Chem. V. 5 nº.1pág.169–188. 2008.

BOTTING, R. M. **Mechanism of action of acetaminophen: Is there a cyclooxygenase 3?** Clinical Infectious Diseases. V. 31 pág. 202-210. 2000.

BOUISSOU-SCHURTZ, C.; HOUETO, P.; GUERBET, M.; BACHELOT, M.; CASELLAS, C.; MAUCLARIE, A. C.; PANETIER, P.; DELVAL, C.; MASSET, D. **Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey.** Regulatory Toxicology and Pharmacology. V.69 nº.3 pág.296–303. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.04.006>

BOYD, G. R.; REEMTSMA, H.; GRIMM, D. A.; MITRA, S. **Pharmaceuticals and personal care products (PPCP's) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada.** The Science of the Total Environment.V.331 pág.135–149. 2003.doi:10.1016/S0048-9697(03)00138-4

BRADFORD, M. B. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Ana. Biochem. V. 72 pág 248-254. 1976.

BRASIL. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais.** RENAME. ed.7, Ministério da Saúde, 2010.

BROWN, K. D.; KULIS, J.; THOMSON, B.; CHAPMAN, T. H.; MAWHINNEY, D. B. **Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico.** Science of the Total Environment.V. 366pág. 772–783.2006. [doi:10.1016/j.scitotenv.2005.10.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.10.007)

BUSER, H. R.; POIGER, T.; MÜLLER, M. D. **Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: Rapid photodegradation in a lake.** Environmental Science & Technology.V. 32nº.22pág. 3449–3456. 1998.

CALLEJA, M. C.; PERSONONE, G.; GELADI, P. **Comparative acute toxicity of the first 50 multicentre evaluation of in vitro cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates.** Arch Environ ContamToxicol. V. 26 pág.69–78. 1994.

CAMACHO-MUÑOZ, M. D.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO E. **Presence of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain) main watersheds.** Journal of Hazardous Materials.V. 177pág. 1159–1162. 2010.

CARBALLEIRA, C.; RAMOS-GÓMEZ, J.; MARTIN-DIAZ, L. DELVALLS, T. **Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: Application to marine psiculture effluents.** Marine Environmental Research. V. 77 pág. 12-22. 2012

CARSON, R. **Silent Spring.**Houghton Mifflin Company: New York, 1962.

CASTRO, M.; SANTOS, M.M.; MONTEIRO, N.M.; VIEIRA, N.**Measuring lysosomal stability as an effective tool for marine coastal environmental monitoring.** Marine Environmental Research.V.58pág.741–745. 2004.

CEC (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES). Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, environmental risk assessment. **Luxembourg: Office for official publication of the European Communities**, 1996.

CESAR, A.; PEREIRA, C. D. S.; SANTOS, A. R.; ABESSA, D.M. S.; FERNÁNDEZ, N.; CHOUERI, R.; DELVALLS, A. **Ecotoxicology assessment of sediments from Santos and São Vicente Estuarine System – Brazil.** Brazilian Jour. Ocean.V.54 nº.1pág.55-63. 2006.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. **COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression.**Proc Natl AcadSci U S A. V.99 pág.13926-13931.2002.

CHRISTENSEN, F. M. **Pharmaceuticals in the Environment – A Human Risk?**Regulatory Toxicology and Pharmacology. 28: 212 – 221, 1998.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB.
**Relatório de Qualidade das Águas Litorâneas no Estado de São Paulo –
 Balneabilidade das Praias:**<<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/praias/21-emissarios-submarinos>> Acesso em 12 de janeiro de 2004.

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. 168pág. 145-150. 2012.

CUMMINGS, A. J.; KING, M. L.; MARTIN, B. K. **A kinetic study of drug elimination: The excretion of paracetamol and its metabolites in man.** Br. J. Pharmac. Chemother. V. 29 pág.150–157. 1967.

DASTMALCHI, S.; RASHIDI, M. R.; RASSI, M. **Simultaneous determination of the pKa and octanol/water partition coefficient (Pm) of acetaminophen.** J. Sch. Pharm. Med. Sci. Tehran. Univ. V.4 pág.7–14. 1995.

DELORENZO, M. E.; FLEMING, J. **Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*.** Arch. Environ. Contam. Toxicol. V. 54 pág. 203-210. 2008.doi:10.1007/s00244-007-9032-2.

ELLIS, J. B. **Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters.** Environmental Pollution. V. 144pág.184-189. 2006.

FAN, X.; KLEIN, M.; FLANAGAN-STEET, H. R.; STEET, R. **Selective yolk deposition and mannose phosphorylation of lysosomal glycosidases in zebrafish.** J. Biol. Chem. V. 285 pág.32946–32953. 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Rev. Ass. Med. Brasil. V. 43, nº1 pág 61-68. 1997.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. **The use of biomarkers in aquatic toxicology studies.** Revista Portuguesa de Zootecnia. V. 13, nº.1 pág. 67–86. 2005.

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. F.; ARIAS, A. R. L. **Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos.** Oecol.Bras.V. 12nº.3pág.347–354. 2008.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C. **Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and papermill effluents.** Wat Res 27:1669-1682. 1993.

GASPARINI, J. C.; GASPARINI, A. R.; FRIGIERI, M. C. **Estudo do descarte de medicamentos e consciência ambiental no município de Catanduva-SP.** Ciência & Tecnologia: FATEC – JB. V. 2nº.1 pág.38–51.2011.

GÓMEZ, M. J.; MARTÍNEZ-BUENO, M. J.; LACORTE, S.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; AGÜERA, A. **Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast.** Chemosphere.V. 66 pág. 993–1002. 2007.

GONZALEZ-REY, M.; BEBIANNO, M. J. **Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*?** Environmental toxicology and pharmacology. V. 33 pág. 361-371. 2012.

GONZALEZ-REY, M.; BEBIANNO, M. J. **Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*.** Aquatic toxicology. V. 148 pág. 221-230. 2014.

HERNANDO, M. D.; MEZCUA, M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; BARCELÓ, D. **Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in the wastewater effluents, surface waters and sediments.** Talanta. V. 69pág. 334–342.2006.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil.** Diretoria de Geociências. - Rio de Janeiro. 176p. 2011.

IMW – INTERNATIONAL MUSSEL WATCH COMMITTEE. **International Mussel Watch Project: Initial Implementation Phase, final report.** Farrington, J. W., Tripp, B. W. (eds). Woods Hole Oceanographic Institution, Coastal Research Center, Woods Hole, MA. 1995.

JJEMBA, P. K. **Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment.** Ecotoxicology and Environmental Safety.V. 63 pág.113–130.2006. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.11.011.

JELIC, A.; GROS, M.; GINEBRED, A.; CESPEDES-SÁNCHEZ, R.; VENTURA, F.; PETROVIC, M.; BARCELO, D. **Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment.** Water Research.V.45pág.1165–1176. 2011. doi:[10.1016/j.watres.2010.11.010](https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.010)

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. **Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein.** Analytical Biochemistry. V. 202 pág. 384-389. 1992.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. **Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method.** Lipids. V. 26 pág. 853-856. 1991.

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P. **Widespread sexual disruption in wild fish.** Environ. Sci. Technol. V. 32 pág. 2498–2506. 1998.

JUNIOR E.V.M. **Situações que favorecem ou reduzem a hepatotoxicidade pelo acetaminofen (uso de álcool, faixa etária e uso de outras medicações).**Rev. Suplem.Hepatotoxicidade.V. 30nº.1 pág.6-47. 2011.

KARTHIKEYAN, K. G.; MEYER, M. T. **Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA.**Science of the Total Environment.V. 361 pág.196–207. 2006. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.06.030

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of **receiving Waters**. *Water Research*. V.43 pág.363–380. 2009.

KIM, J. W.; JANG, H. S.; KIM, J. G.; ISHIBASHI, H.; HIRANO, M.; NASU, K.; ICHIKAWA, N.; TAKAO, Y.; SHINOHARA, R.; ARIZONO, K. **Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPS) in surface water from Mankyung River, South Korea**. *Journal of Health Science*. V. 55nº.2 pág.249–258. 2009.

KIM, P.; PARK, Y.; JI, K.; SEO, J.; LEE, S.; CHOI, K.; KHO, Y.; PARK, J.; CHOI, K. **Effect of chronic exposure to acetaminophen and licomycin on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, and potential mechanisms of endocrine disruption**. *Chemosphere*. V. 89 pág. 10–18. 2012.

KING, R. **Rapid assesment of marine pollution – Biological techniques**. Plymouth Environmental Research Center, University of Plymouth, UK, 37p, 2000.

KULMACZ, R. J.; PALMER, G.; TSAI, A. L. **Prostaglandin H synthase: Perturbation of the Tyrosyl radical as a probe of anticyclooxygenase agents**. *Molecular Pharmacology*. V. 40 pág.833–837. 1991.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. **The use of biomarkers in environmental monitoring programmes**. *Marine Pollution Bulletin*. V.46 nº.2 pág.182-186. 2003.

LINDSTRÖM, A.; BUERGE, I. J.; POIGER, T; BERGQVIST, P. A.; MÜLLER, M. D.; BUSER, H. R. **Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater**. *Environ. Sci. Technol*. V. 36 pág.2322–2329. 2002.

LOPES, J.; MATHEUS, M. E. **Risco de hepatotoxicidade do Paracetamol**. *Rev. Bras. Farm*. V.93nº.4 pág.411–414. 2012.

LOWE, D. M.; FOSSATO, V. U.; DEPLEDGE, M. H. **Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study.** Marine Ecology Progress Series.V.129 pág.189-196. 1995.

MABOETA, M.S.; REINECKE, S.A.; REINECKE, A.J. The **Relation Between Lysosomal Biomarker and Population Responses in a Field Population of *Microchaetus* sp. (Oligochaeta) Exposed to the Fungicide Copper Oxychloride.** Ecotoxicology and Environmental Safety. V. 52 pág.280–287. 2002.

MARCHESE, S.; PERRET, D.; GENTILI, A.; CURINI, R.; PASTORI, F. **Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in surface water and wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Chromatographia.V. 58 pág.263–269. 2003. doi: 10.1365/s10337-003-0052-4.

MOERMOND, C. T. A.; JANSSEN, M. P. M.; KNECHT, J. A.; MONTFORTS, M. H. M. M.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; ZWEERS, P. G. P. C.; SIJM, D. T. H. M. **PBT assessment using the revised annex XIII of REACH: A comparison with other regulatory frameworks.** Integrated Environmental Assessment and Management. V. 8nº.2 pág.359–371. 2012.

NARCHI, W.; GALVÃO-BUENO, M. S. **Anatomia funcional do *Perna perna* (LINNÉ) (BIVALVIA, MYTILIDAE).** Revta Brás. Zool. V. 14nº.1 pág.135–168. 1997.

NASCIMENTO, I. A.; SOUZA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha: Aplicações no Brasil.** Artes Gráficas e Ind. Ltda. São Paulo. 262p. 2002.

NÖDLER, K.; VOUTSA, D.; LICHA, T. **Polar organic micropollutants in the coastal environment of different marine systems.** Marine Pollution Bulletin.V. 85pág. 50–59. 2014.

OLIVE, P.L., **DNA precipitation Assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells.** Environ. Mol. Mutagen. V. 11 pág. 487-495. 1998.

PAROLINI, M.; BINELLI, A.; COGNI, D.; RIVA, C.; PROVINI, A. **An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)**. *Toxicology in Vitro*. V. 23 pág.935–942. 2009.

PAROLINI, M.; BINELLI, A.; COGNI, D.; PROVINI, A. **Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)**. *Chemosphere*. V. 79 pág.489–498. 2010.

PEREIRA, C. D. S.; ABESSA, D. M. S.; BAINY, A. C. D.; ZARONI, L. P.; GASPARRO, M. R.; BICEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; FURLEY, T. H.; SOUSA, E. C. P. M. **Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo**. Brazil. *Environ. Toxicol.Chem.* V.26 pág.462–469. 2007.

PEREIRA, C. D. S.; ABESSA, D. M. S.; CHOUERI, R. B.; ALMAGRO-PASTOR, V.; CESAR, A.; MARANHO, L. A.; MARTÍN-DÍAZ, M. L.; TORRES, R. J.; GUSSO-CHOUERI, P. K.; ALMEIDA, J. E.; CORTEZ, F. S.; MOZETO, A. A.; SILBINGER, H. L. N.; SOUZA, 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. 96pág. 118-126. 2014.

PRESCOT, L. F. **Kinetics and metabolism of Paracetamol and Phenacetin**. *Br. J. Clin. Pharmacol.* V. 10 pág.291–298. 1980.

RACHID, B. R. F. **Avaliação ecotoxicológica dos efluentes domésticos lançados pelos sistemas de disposição oceânica da Baixada Santista**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. São Paulo, 286p, 2002.

RADJENOVIC, J.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. **Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment**. *Water Research*. V. 43 pág.831–841. 2009.

RAMOS, A. S.; CORREIA, A. T.; ANTUNES, S. C.; GONÇAÇVES, F. **Effect of acetaminophen exposure in *Oncorhynchus mykiss* gills and liver: Detoxification mechanisms, oxidative defence system and peroxidative damage.** Environmental toxicology and pharmacology. V. 37 pág. 1221-1228. 2014

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: Effescts, environmental fate and risk assessment.** Ed 2. Taylor & Francis, Washington, DC.1125p. 1995.

RINGWOOD, A. H.; HOGUET, J.; KEPPLER, C.; GIELAZYN, M. **Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters *Crassostrea virginica*.** Mar. Environ. Res. V. 58 pág.151–155. 2004.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; BASKARAN, S.; KENNEDY, I. R. **Ecological relative risk (EcoRR): another approach for risk assessment of pesticides in agriculture.** Agriculture, Ecosystems and Environment.V.91 pág.37–57.2002.

SANTOS, L. H. M. L. M.; ARAÚJO, A. N.; FACHINI, A.; PENA, A.; MATOS, C. D.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. **Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment.** Journal of Hazardous Materials. V. 175 pág. 45–95. 2010.

SEBBEN, V. C.; LUGOCH, R. W.; SCHLINKER, C. S.; ARBO, M. D.; VIANNA, R. L. **Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica de paracetamol.** J. Bras. Patol. Med. Lab. V. 46 nº.2 pág.143–148. 2010.

SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. **Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?**The Lancet. V.341 pág.1392–1395. 1993.

SHUGART, L. R. **Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay.**Aquatic Toxicology. V. 13 pág 43-52. 1988.

SHUGART, L. R. **DNA damage as a biomarker of exposure.** Ecotoxicology. V. 9 pág 329-340. 2000

SILVA, V. H. P.; MOURA, C. F. G.; RIBEIRO, F. A. P.; CESAR, A.; PEREIRA, C. D. S.; SILVA, M. J. D.; VILEGAS, W.; RIBEIRO, D. A. **Genotoxicity and cytotoxicity induced by municipal effluent in multiple organs of Wistar rats.** Environ Sci Pollut Res. V. 21pág.13069–13080. 2014. doi 10.1007/s11356-014-3261-5.

SOLÉ, M.; SHAW, J. P.; FRICKERS, P. E.; READMAN, J. W.; HUTCHINSON, T. H. **Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and a acetaminophen.** Anal Bioanal Chem. V. 396 pág.649-656. 2010.doi 10.1007/s00216-009-3182-1

SOUZA, I. C.; DUARTE, I. D.; PIMENTEL, N. Q.; ROCHA, L. D.; MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; AZEVEDO, V. C.; PEREIRA, C. D. S.; MONFERRÁN, M. V.; MILANEZ, C. R. D.; MATSUMOTO, S. T.; WUNDERLIN, D. A.; FERNANDES, M. N. **Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries.** Environmental Pollution.V.180 pág.136-144. 2013.

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 pág.135–141. 1999.

SUNG, H. H.; CHIU, Y. W.; WANG, S. Y.; CHEN, C. M.; HUANG, D. J. **Acute toxicity of mixture of acetaminophen and ibuprofen to Green Neon Shrimp, *Neocaridina denticulate*.** Environmental Toxicology and Pharmacology.2014. doi.org/10.1016/j.etap.2014.04.014.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. **Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil.** The Science of the Total Environment.V. 225 pág.81–90. 1999.

TERNES, T. A.; HERRMANN, N.; BONERZ, M.; KNACKER, T.; SIEGRIST, H.; JOSS, A. **A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge.** Water Research. V.38 pág.4075–4084. 2004.

TERNES, T. A. **Editorial to special issue in Water Research Emerging contaminants in water.** Water Research. V.44. 2010.

TERZIC, S.; SENTA, I.; AHEL, M. **Illicit drugs in wastewater of the city of Zagreb (Croatia) – Estimating of drug abuse in a transition country.** Environmental Pollution. V.158 pág.2686–2693. 2010.

TRUHAUT, R. **Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives.** Ecotoxicology and Environmental Safety. V. 1 pág.151–173.1977.

UEDA, J.; TAVERNARO, R.; MAROSTEGA, V.; PAVAN, W. **Impacto ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema.** Revista Ciências do Ambiente On-Line. V. 5 nº.1, 2009.

US EPA - United States Environmental Protection Agency. EPA/600/4-91/003 – **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms.** Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency. 1991.

VERLICCHI, P.; AUKIDY, M. A.; GALLETTI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. **Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment.** Science of the Total Environment. V. 430 pág.109–118. 2012.

VERVEEN, A. A.; DERKSEN, H. E.; SCHICK, K. L. **DDT residues in pacific sea birds: A persistent insecticide in marine food chains.** Nature. V. 216. 1967.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** Química Nova. V. 29 nº.2 pág.326–337. 2006.

VULLIET, E.; CREN-OLIVÉ, C.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. **Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters.** Environ Chem Lett. V. 9. 103–114. 2011. doi 10.1007/s10311-009-0253-7.

WEIGEL, S.; KUHLMANN, J.; HÜHNERFUSS, H. **Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea.** The Science of the Total Environment. V. 295. 131–141. 2002.

WILLE, K.; NOPPE, H.; VERHEYDEN, K.; BUSSCHE, J. V.; WULF, E.; CAETER, P. V.; JANSSEN, C. R.; BRABANDER, H. F.; VANHAECKE, L. **Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater.** Anal Bioanal Chem. V. 397. 1797–1808. 2010. doi 10.1007/s00216-010-3702-z

WOFFORD, H. W.; THOMAS, P. **Effect of xenobiotics on Peroxidation of hepatic microsomal lipids from Striped Mullet (*Mugil cephalus*) and Atlantic Croaker (*Micropogonias undulatus*).** Marine Environmental Research. V. 24. 285–289. 1988.

XAGORARAKI, I.; HULLMAN, R.; SONG, W.; LI, H.; VOICE, T. **Effect of pH on degradation of acetaminophen and production of 1,4-benzoquinone in water chlorination.** Journal of water supply: Research and Technology – AQUA. V. 57. 381–390. 2008.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações.** Ed 2. RiMa. São Carlos, SP. 468 p. 2008.

ZARONI, L. P.; ABESSA, D. M. S.; LOTUFO, G. R.; SOUSA, E. C. P. M.; PINTO, Y. A. **Toxicity Testing with Embryos of Marine Mussels: Protocol Standardization for *Perna perna* (Linnaeus, 1758).** Bull. Environ. Contam. Toxicol. V. 74. 793–800. 2005.

ZENKER, A.; CICERO, M. R.; PRESTINACI, F.; BOTTONI, P.; CARERE, M. **Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a**

focus to the aquatic environment.Journal of Environmental Management.V.133 pág.378–387. 2014.

ZHANG, R.; TANG, J.; LI, J.; ZHENG, Q.; LIU, D.; CHEN, Y.; ZOU, Y.; CHEN, X.; LUO, C.; ZHANG, G. **Antibiotics in the offshore waters of the Bohai Sea and the Yellow Sea in China: Occurrence, distribution and ecological risks.** Environmental Pollution. V. 174 pág. 71–77. 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.11.008>

ZUCCATO, E.; CHIABRANDO, C.; CASTIGLIONI, S.; CALAMARI, D.; BAGNATI, R.; SCHIAREA, S.; FANELLI, R. **Cocaine in surface Waters: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse.**Environmental Health: A global Access science source.2005. doi:10.1186/1476-069X-4-14.

ANEXO

ANEXO A – Compra de Paracetamol no município de São Paulo.



PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO
SECRETARIA MUNICIPAL DA SAÚDE
DIVISÃO TÉCNICA DE SUPRIMENTOS
SETOR DE ATAS DE REGISTRO DE PREÇOS
 Rua General Jardim, 36 – 3º andar – Vila Buarque – CEP 01223-010
EXTRATO

ATA DE REGISTRO DE PREÇO Nº 435/2014-SMS.G
 PROCESSO ADMINISTRATIVO Nº 2014-0.219.059-6
 PREGÃO ELETRÔNICO Nº 292/2014
 ORGÃO GESTOR: SECRETARIA MUNICIPAL DA SAÚDE
 DETENTORA: PRATI, DONADUZZI & CIA LTDA.
 CNPJ: 73.856.593/0001-66
 OBJETO: MEDICAMENTOS DIVERSOS XV
 VIGÊNCIA: 18/11/2014 A 18/11/2015

Item 01 – PARACETAMOL 500 MG COMPRIMIDO - CP
 R\$ 0,0349/cp
 Marca: Paracetamol - Genérico
 Fabricante: Prati, Donaduzzi & Cia. Ltda.
 Embalagem/Apresentação: Caixa com 500 comprimidos
 Reg. no M.S: 1256800500028
 Procedência: Nacional
 Código Supri: 11.064.001.001.0001-1

Item 02 – DIPIRONA SODICA 500 MG COMPRIMIDO - CP
 R\$ 0,06/cp
 Marca: Dipirona - Genérico
 Fabricante: Prati, Donaduzzi & Cia. Ltda.
 Embalagem/Apresentação: Caixa com 500 comprimidos
 Reg. no M.S: 1256800410029
 Procedência: Nacional
 Código Supri: 11.064.001.001.0009-7

Consumo Médio Estimado:

Unidades	MENSAL	MENSAL	ANUAL	ANUAL
	Item 01	Item 01	Item 02	Item 02
AHM	4.000	13.000	48.000	156.000
HMEC	7.000	50.000	84.000	600.000
HSPM	1.000	5.000	12.000	60.000
COVISA	0	300	0	3.600
CDMEC	4.000.000	5.000.000	48.000.000	60.000.000
Total Geral	4.012.000 comprimidos	5.068.300 comprimidos	48.144.000 comprimidos	60.819.600 comprimidos

DEMAIS ESPECIFICAÇÕES CONFORME PUBLICAÇÃO NO DOC/SP DE
 20/11/14 - PÁG. 197