

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

**NELSON ROBERTO BENTO**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS FÁRMACOS**  
**FLUOXETINA E AMOXICILINA EMPREGANDO O MEXILHÃO**  
**MARINHO**  
*Perna perna* (LINNAEUS 1758)

**SANTOS – SP**  
**2015**

**NELSON ROBERTO BENTO**

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS FÁRMACOS  
FLUOXETINA E AMOXICILINA EMPREGANDO O MEXILHÃO  
MARINHO  
*Perna perna* (LINNAEUS 1758)**

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, sob a orientação do Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira e Co-orientação do Prof. Dr. Augusto Cesar.

**SANTOS – SP  
2015**

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

---

Assinatura

Santos, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Bento, Nelson Roberto.

Avaliação ecotoxicológica dos fármacos Fluoxetina e Amoxicilina empregando o mexilhão marinho *Perna perna* (LINNAEUS 1758)/ Nelson Roberto Bento -- 2015.

n. 23.

Orientador: Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira.

Co-orientador: Prof. Dr. Augusto Cesar.

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

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer o Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira, meu orientador, pela sua dedicação e confiança depositada em mim, e principalmente pelo compartilhamento do seu conhecimento.

Agradeço ao Prof. Dr. Augusto Cesar pela valiosa contribuição dada durante a execução do meu trabalho, bem como pelos esclarecimentos necessários para a sua realização.

Aos meus colegas de classe, principalmente, ao Caio, Wesley, Mayana, que, com muita paciência tiraram as minhas dúvidas, em relação aos meus ensaios e gráficos.

Aos estagiários do laboratório de ecotoxicologia que estavam sempre dispostos a ajudar quando os meus ensaios eram realizados.

Às secretárias da Pós-graduação, Sandra e Imaculada, por serem muito prestativas e atenciosas

Aos orientadores não oficiais: Fernando Cortez, Fábio Pusceddu, pelo apoio e esclarecimento de dúvidas, durante nossa convivência.

A minha irmã, que nos momentos mais difíceis da minha vida manteve a calma e com sabedoria me ajudou a concluir esse trabalho.

E a minha mãe, Lourdes da Conceição Bento, que Deus colocou ao seu lado para ver o resultado da sua brilhante criação, e o meu sucesso na apresentação e finalização do meu trabalho.

À UNISANTA que me deu a oportunidade de enriquecimento intelectual e científico.

## **DEDICATÓRIA**

À minha irmã, pela paciência que teve comigo durante a realização do meu trabalho.

Ao meu pai, pelo apoio sempre presente nos momentos mais difíceis.

E, principalmente, à minha mãe que partiu sem ver o fruto de tudo que me ensinou como ser humano e profissional que ajudou a criar.

## RESUMO

A presença de compostos farmacêuticos tem sido detectada em grande número de ecossistemas aquáticos e, neste sentido, é de interesse sua avaliação através de estudos ecotoxicológicos. Fármacos e produtos de higiene e cuidados pessoais (FPHCP) representam um grupo diversificado de substâncias químicas usadas na saúde humana e veterinária, em cosméticos e práticas agrícolas. Os antibióticos como Amoxicilina (AMX) são utilizados para tratar uma ampla variedade de infecções bacterianas e são essenciais no tratamento médico, tais como tratamento intensivo, transplante de órgãos, quimioterapia, cuidado de bebês prematuros, e procedimentos cirúrgicos que não podem ser realizados satisfatoriamente sem o uso de antibióticos eficazes. O grupo de antidepressivos são os medicamentos mais analisados no contexto de sistemas aquáticos. A Fluoxetina (FLX) é a droga neuroativa mais prescrita, e a sua contaminação é propagada em rios, águas superficiais e efluentes de estações de tratamento de esgoto. Diante deste contexto, o objetivo do presente estudo é avaliar efeitos agudo e crônico do antibiótico AMX e do antidepressivo FLX por meio de ensaios de toxicidade com mexilhões *Perna perna*. A AMX e FLX foram capazes de interferir em processos reprodutivos do molusco bivalve *Perna perna*, a partir de inibição na fertilização (FLX) bem como no desenvolvimento embriolarval (AMX e FLX). Os resultados obtidos apresentaram efeitos da AMX a partir de  $1,0 \text{ gL}^{-1}$  e da FLX a partir da concentração  $0,125 \text{ mgL}^{-1}$ . Os riscos desses compostos foram avaliados como baixo para AMX e médio para a FLX. Seguindo a Diretiva Europeia 93/67/EEC que classifica as substâncias de acordo com as concentrações de efeito, a Amoxicilina foi classificada como não tóxica, enquanto a Fluoxetina foi classificada como muito tóxica.

Palavras-chave: Amoxicilina, Fluoxetina, Toxicidade, moluscos marinhos, risco ambiental.

## ABSTRACT

The presence of pharmaceutical compounds has been detected in several aquatic ecosystems, and its assessment is of ecotoxicological interest. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) represent a diversified group of chemicals used in human and veterinarian health, cosmetics and agricultural practices. The antibiotics such as Amoxicillin (AMX) are used to treat a great amount of bacterial infections and are essential on medical treatment, such as intensive care, organ transplant, chemotherapy, care for premature babies, and surgical procedures that cannot be satisfactory done without the use of effective antibiotics. The antidepressants group is the most analysed group of drugs in the aquatic system context. The fluoxetine (FLX) is the most prescribed neuroactive drug, and its contamination is widespread in rivers, superficial water and effluents of sewage treatment. In this context, the objective of this study is evaluating AMX and FLX acute and chronic effects by toxicity essays using *Perna perna* mussels. AMX and FLX were able to interfere in the reproductive process of *P. perna* mussels' such as fertilization (FLX and embryonic development (AMX and FLX). Our results showed effects in larvae exposure to  $1,0 \text{ gL}^{-1}$  of AMX and to  $0,125 \text{ mgL}^{-1}$  of FLX. The environmental risks of these compounds were assessed as low to AMX and moderate for FLX. Following the European Directive 93/67 / EEC which classifies the substances according to the effect concentrations, Amoxicillin was classified as non-toxic whereas fluoxetine was classified as very toxic.

Keywords: Amoxicillin, Fluoxetine, toxicity, marine mussels, environmental risk.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Origens e rotas dos FPHCP (modificado de EPA, 2010). (Disponível em <a href="http://www.epa.gov/ppcp/pdf/drawing.pdf">http://www.epa.gov/ppcp/pdf/drawing.pdf</a> ).....	11
Figura 2 - Estrutura da proposta para a avaliação do risco ambiental (Adaptado de EMEA 2006 e HERNANDO <i>et al.</i> (2006)).....	19
Figura 3 - Estrutura química da Amoxicilina.....	20
Figura 4 - Estrutura química da Fluoxetina.....	21
Figura 5 - <i>Perna perna</i> .....	23
Figura 6 - Óvulos fertilizados de <i>P. perna</i> nas primeiras clivagens.....	25
Figura 7 - Coletas de espermatozoides (A) e óvulos (B) de <i>P. perna</i> .....	27
Figura 8 - Larvas normais de <i>P. perna</i> .....	27
Figura 9 - Toxicidade aguda da Amoxicilina na fertilização de <i>P. perna</i> .....	30
Figura 10 - Toxicidade aguda da Amoxicilina na fertilização de <i>P. perna</i> .....	31
Figura 11 - Toxicidade aguda da Amoxicilina na fertilização de <i>P. perna</i> .....	31
Figura 12 - Toxicidade aguda da Fluoxetina na fertilização de <i>P. perna</i> . *diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).....	32
Figura 13 - Toxicidade aguda da Fluoxetina na fertilização de <i>P. perna</i> . *diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).....	33
Figura 14 - Toxicidade aguda da Fluoxetina na fertilização de <i>P. perna</i> . *diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).....	33
Figura 15 - Toxicidade crônica de Amoxicilina no desenvolvimento embriolarval de <i>P. perna</i> . *diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).....	35
Figura 16 - Toxicidade crônica de Amoxicilina no desenvolvimento embriolarval de <i>P. perna</i> . *diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).....	35
Figura 17 - Toxicidade crônica de Amoxicilina no desenvolvimento embriolarval de <i>P. perna</i> . *diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).....	36
Figura 18 - Toxicidade crônica de Fluoxetina no desenvolvimento embriolarval de <i>P. perna</i> . *diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).....	37
Figura 19 - Toxicidade crônica de Fluoxetina no desenvolvimento embriolarval de <i>P. perna</i> . *diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).....	38
Figura 20 - Toxicidade crônica de Fluoxetina no desenvolvimento embriolarval de <i>P. perna</i> . *diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físicas e químicas da Amoxicilina .....	20
Tabela 2 - Característica físicas e químicas da Fluoxetina. ....	22
Tabela 3 - Condições e critérios de aceitabilidade dos ensaios de toxicidade com P. perna (Embriolarval).....	28
Tabela 4 - Toxicidade aguda do composto Fluoxetina .....	34
Tabela 5 - Toxicidade crônica do composto Amoxicilina .....	36
Tabela 6 - Toxicidade crônica do composto Fluoxetina .....	39
Tabela 7 - Concentrações ambientais em diferentes matrizes.....	40
Tabela 8 - Quociente de Risco .....	40
Tabela 9 - Toxicidade dos compostos baseado na classificação da Diretiva Europeia 93/67/EEC .....	41

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	OBJETIVOS.....	16
3.	MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1	Descrição da metodologia escalonada (“Tier”) para a avaliação de risco ambiental em ambientes marinhos.....	17
3.2	Fármacos de interesse.....	19
3.2.1	Amoxicilina .....	20
3.2.2	Cloridrato de Fluoxetina .....	21
3.3	Organismo-teste.....	23
3.4	Ensaio ecotoxicológicos .....	24
3.4.1	Sensibilidade dos organismos.....	24
3.4.2	Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito agudo (Fertilização) com o moluscos bivalve <i>Perna perna</i> (Mollusca, Bivalvia) – TIER 1.....	24
3.4.3	Ensaio para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) com <i>Perna perna</i> (Mollusca, Bivalvia) .....	25
3.5	Análise dos resultados .....	29
4.	RESULTADOS .....	30
4.1	Toxicidade Aguda – Inibição da fertilização .....	30
4.1.1	Amoxicilina .....	30
4.1.2	Fluoxetina.....	32
4.2	TOXICIDADE CRÔNICA – DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL.....	34
4.2.1	Amoxicilina .....	34
4.2.2	Fluoxetina.....	37
4.2.3	Ensaio de sensibilidade.....	39
4.3	Análise de Risco.....	39
4.3.1	Concentrações ambientais .....	39
4.3.2	Avaliação do Risco de acordo com EMEA (2006).....	40
4.3.3	Avaliação do Risco de acordo a Diretiva Europeia 93/67/EEC ....	40
5.	DISCUSSÃO.....	42
6.	CONCLUSÃO .....	45
7.	REFERÊNCIAS .....	46

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento populacional e desenvolvimento das indústrias ocorreram de forma acelerada sem um devido planejamento quanto aos seus efeitos no ambiente. Os resíduos gerados do consumo e produção são descartados em efluentes líquidos que muitas vezes não recebem o tratamento adequado. Efluentes domésticos são tidos como a principal fonte de contaminação dos ambientes costeiros, pois acabam introduzindo diferentes classes de poluentes comprometendo a qualidade das águas (ABESSA *et al.*, 2005).

Das diferentes classes de contaminantes presentes em efluentes domésticos, uma que tem despertado interesse quanto ao seu potencial tóxico são os fármacos e produtos de higiene e cuidados pessoais (BILA and DEZOTTI, 2006; JONES *et al.*, 2007; OMS, 2012). Produtos farmacêuticos são uma coleção grande e diversificada de produtos químicos bioativos, que são utilizados na medicina humana e veterinária (KIM *et al.*, 2007). Devido ao uso humano, grandes quantidades de produtos farmacêuticos são descarregadas em ambientes aquáticos (BLAIR *et al.*, 2013; LIU e WONG, 2013).

Fármacos e produtos de higiene e cuidados pessoais (FPHCP) compreendem um grupo variado de produtos químicos. Quando administradas, uma parte significativa desses fármacos são excretadas e levadas as Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) ou despejadas no ambiente aquático sem o devido tratamento desses produtos.

Os produtos farmacêuticos são sintetizados a fim de proporcionar uma qualidade de vida melhor, mas com o crescimento populacional e o tratamento inadequado dos esgotos, esses fármacos, mesmo em baixas concentrações acabam provocando efeitos em organismos não alvos. De acordo com Mulroy (2001), 50% a 90% de uma dosagem de um fármaco é excretado de forma inalterada e persistem no meio ambiente, assim eles podem agir sobre organismos não alvos e podendo desestabilizar todo o ecossistema. A figura 1 ilustra as possíveis fontes de FPHCPs para os ambientes aquáticos.



Figura 1 - Origens e rotas dos FPHCP (modificado de EPA, 2010). (Disponível em <http://www.epa.gov/ppcp/pdf/drawing.pdf>).

Das diversas classes de fármacos, os antibióticos são os mais estudados em função de promoverem resistência em bactérias (SANTOS *et al.*, 2010). Os antibióticos fazem parte de um grande grupo de produtos farmacêuticos, que são amplamente utilizados para tratamento de infecções bacterianas em seres humanos e animais. O consumo global de mercado de antibióticos foi recentemente estimado entre 100.000 e 200.000 toneladas / ano (WISE, 2002).

Os antibióticos são usados como promotores de crescimento na produção de gado, na produção avícola e são intensivamente usados como aditivos de alimento de peixe na aquicultura e criação de porcos. Sendo assim, podem contaminar o solo, águas de subsolo e superficiais. Devido ao uso na cultura de peixes, alguns antibióticos já foram identificados em sedimentos marinhos (INGERSLEV *et al.*, 2001; RABOLLE *et al.*, 2000).

Os antibióticos têm diferentes efeitos sobre o meio ambiente, e um deles é a contribuição no desenvolvimento de bactérias resistentes, assunto que tem sido largamente discutido.

Mc Keon *et al.* (2000) constataram a resistência bacteriana da espécie *Escherichia coli*, isolada de águas de subsolo de uma região rural, frente a 16 antibióticos. Estudos sobre os efeitos causados ao meio ambiente com o uso de antibióticos na aquicultura foram desenvolvidos por vários pesquisadores (WU *et al.*, 1995; CHIEN *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 1996).

Um desses efeitos descreve o desenvolvimento de uma população de bactérias resistentes em sedimentos marinhos. O estudo de WU *et al.* (1995) mostrou que o maior impacto é no sedimento marinho, e em menor extensão na qualidade da água.

Entre os diferentes tipos de sistemas de produção animal, a aquicultura tem especialmente levantado preocupações ambientais em virtude do uso intensivo e diversificado de antibióticos e seus impactos sobre os ecossistemas aquáticos rio abaixo (RICO *et al.*, 2012). Amoxicilina (AMX) e a oxitetraciclina (OTC) são utilizados em todo o mundo em aquicultura. Uma pesquisa realizada para obter informação de base sobre a situação de uso de produtos químicos em tilápia aquicultura na Nordeste da Tailândia (Moon River, Ubon Ratchathani), no âmbito de um projeto internacional Asia-Link (2010) indicou que os antibióticos são 56,8% de todos os produtos químicos utilizados na aquicultura na região. AMX é considerado o mais importante antimicrobiano aplicado na aquicultura (LANGIN *et al.*, 2009) e é usado para tratar infecções bacterianas e doenças sistêmicas como estreptococose, furunculose e pasteurelose.

AMX é administrada tipicamente por via oral, incorporada no alimento granulado (em doses de 40-80 mg.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>) ou aplicado diretamente na água de tanques, tanques de terra ou gaiolas. Qualquer que seja a via de administração, estes compostos podem atingir o ambiente através dos alimentos não consumidos ou através das fezes de organismos tratados (HALLING-SORENSEN *et al.*, 1998; LALUMERA *et al.*, 2004) e potencialmente que afetam organismos aquáticos não-alvo (TREVES-BROWN, 2000).

Concentrações de 18 ng.L<sup>-1</sup> de amoxicilina foram reportadas por ZUCATTO *et al.* (2010) em amostras de entrada de plantas de tratamento de esgoto na Itália. No entanto, esses autores não detectaram AMX em efluente tratado por UV ou no lodo ativado. Esse mesmo estudo analisou amostras de água do rio Arno, e reportou concentrações de AMX variando entre 3.77 a 9.91 ng.L<sup>-1</sup>.

Inibidores da recaptção da serotonina (SSRIs), uma classe de antidepressivo, são os medicamentos mais estudados no contexto de sistemas aquáticos (FENT *et al.*, 2006). Fluoxetina (FLX) é a droga SSRI mais prescrita, e a contaminação por FLX é generalizada em rios (águas superficiais) e estações de tratamento de esgoto (GONZALEZ-REY e BEBIANNO, 2013). Concentrações de FLX relatados nas águas de superfície no Canadá (METCALFE *et al.*, 2003), Croácia (GROS *et al.*, 2006), e o EUA (BRINGOLF *et al.*, 2010) variam de 46, 66 a 111 ng L<sup>-1</sup>. Recentemente, FLX foi detectada em 25% das amostras de água coletadas em vários locais nos EUA, apresentando uma concentração média de 65 ng.L<sup>-1</sup> (FERRER e THURMAN, 2012). Uma vez que as concentrações de FLX medidas no ambiente são baixas em relação às concentrações que produzem efeitos adversos, parece improvável que esse composto represente um risco a seres humanos (CARLSSON *et al.*, 2006).

O termo Ecotoxicologia ou Toxicologia Ambiental foi sugerido pela primeira vez em 1969, durante uma reunião do *Committe of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut (TRUHAUT, 1977 apud RAND 1995). De acordo com esse autor, a Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais e vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com

o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (CAIRNS e NIEDELEHNER, 1995). Mais recentemente, NEWMAN *et al.* (2002) definiram a Ecotoxicologia como a ciência dos contaminantes e seu efeitos sobre os constituintes da biosfera, incluindo o homem.

Nesse sentido, para se conhecer os efeitos biológicos e realizar avaliações de risco ambiental, estudos ecotoxicológicos para avaliação de efeitos agudo e crônico de fármacos tem sido realizado com as diferentes classes de fármacos e com distintos organismos-teste (GAGNÉ *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; QUINN *et al.*, 2008).

Um levantamento dos ensaios de toxicidade realizados com diferentes classes de fármacos, baseado em estudos publicados no período de 1996 a 2009, foi realizado por SANTOS *et al.* (2010). Os dados de toxicidade aguda, no período citado, foram empregados e são úteis para estimar os efeitos, por exemplo, quando uma descarga acidental de drogas ocorre, uma vez que as concentrações ambientais geralmente relatadas para estes compostos são baixas. Já os dados de toxicidade crônica são escassos, bem como estudos de toxicidade de fármacos em organismos marinhos.

Devido ao grande número de agentes químicos lançados no Mercado e conseqüentemente no ambiente e a existência de limitações financeiras e de tempo, existe uma necessidade de se priorizar compostos que serão submetidos à avaliação de risco e ao monitoramento, especialmente relacionados aos contaminantes emergentes (UMBUZEIRO, 2011).

A atual ênfase dada à Avaliação de Risco, uma metodologia introduzida nos últimos 15 anos, tem sido atribuída ao interesse mundial em se definir uma metodologia ampla, na qual se possa incluir os vários aspectos relacionados à toxicidade das substâncias, unindo causas e efeitos de uma maneira quantitativa. Os esforços para identificar fatores de risco já vêm de longo tempo, dos quais a menor tolerância pública à exposição a substâncias potencialmente prejudiciais e o aumento das enfermidades congênitas têm motivado o estudo dos possíveis fatores ambientais associados à etiologia destas alterações (VEGA, 1985).

Neste contexto, este estudo propõe a realização de uma avaliação dos efeitos agudos e crônicos dos fármacos Amoxicilina e Fluoxetina sobre a reprodução do molusco *Perna perna*, bem como a avaliação do risco ambiental dessas substâncias empregando uma metodologia escalonada denominada “Tier”.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo principal desta proposta consiste na avaliação da toxicidade dos compostos farmacêuticos Fluoxetina e Amoxicilina sobre o molusco bivalve *Perna perna*, bem como a avaliação do risco ambiental desses compostos em ecossistemas aquáticos.

A realização do objetivo geral descrito implica na realização dos seguintes objetivos específicos:

- ✓ Avaliar a toxicidade aguda dos compostos farmacêuticos a partir de alterações na taxa de fertilização de gametas do mexilhão marinho *P. perna*;
- ✓ Avaliar a toxicidade crônica dos compostos farmacêuticos a partir de efeitos no desenvolvimento embriolarval do mexilhão marinho *P. perna*;
- ✓ Determinar o risco ambiental dos diferentes fármacos estudados por meio da relação entre as concentrações ambientais dos compostos e as concentrações de efeito encontradas nos ensaios ecotoxicológicos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Descrição da metodologia escalonada (“Tier”) para a avaliação de risco ambiental em ambientes marinhos.

Neste estudo foram trabalhados os 3 (três) níveis da Tier com adaptações do protocolo Europeu EMEA/CHMP/SWP/4447/00 (EMEA,2006) relacionadas à identificação e quantificação dos compostos em amostras de água superficial marinha. Posteriormente, foram determinadas as concentrações de efeitos agudo e crônicos sobre o mexilhão marinho *Perna perna*, a partir da utilização de ensaios ecotoxicológicos que contemplam diferentes fases de vida e distintos níveis de organização biológica. Abaixo estão descritos as diferentes etapas de avaliação:

Tier I: Concentrações ambientais – O presente estudo utilizou, como concentração ambiental, resultados de estudos pretéritos que determinaram as concentrações de fluoxetina e amoxicilina em água superficial, efluentes domésticos, industriais e hospitalares.

Tier IIA: Avaliação de efeito agudo - Nesta etapa foram desenvolvidos ensaios ecotoxicológicos com a exposição do organismo-teste a diferentes concentrações dos fármacos estudados com a finalidade de conhecer o efeito agudo (alteração na taxa de fertilização) após um curto período de exposição (1hora). Nessa etapa foi determinada a Concentração Efetiva a 50% (CE50) dos organismos expostos, ou nesse caso específico, 50 % das células reprodutivas expostas.

Tier IIB: Avaliação de efeito crônico – Nesta etapa foram desenvolvidos ensaios ecotoxicológicos com a exposição do organismo-teste a diferentes concentrações dos fármacos estudados com a finalidade de se conhecer efeitos sobre o estágio inicial de vida do bivalve, a partir da avaliação do desenvolvimento embriolarval. Nessa etapa foram determinadas a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e a Concentração de Efeito Observado (CEO).

A abordagem utilizada está baseada em uma estimativa da incidência de efeitos adversos que ocorrem na exposição via água, com o resultado das concentrações ambientais medidas (MEC - em inglês) dos fármacos. Os efeitos

ambientais foram caracterizados através do cálculo da PNEC (em inglês - Predicted No Effect Concentration) com base em valores médios de CE50 ou CENO obtidos a partir de um conjunto de dados de ensaios de toxicidade. Fatores de avaliação padrão (1000 para avaliação de efeito agudo e 100 para avaliação de efeito crônico) foram aplicados para explicar a extrapolação a partir da variabilidade intra e inter-espécies na sensibilidade. A PNEC em compartimentos de água (PNEC<sub>wat</sub>) para TIER I (teste agudo) será determinada seguindo a equação (1):

$$PNEC_{wat} = \frac{CE50ouCL50}{1000} \quad (1)$$

Já a PNEC para TIER II (teste crônico) será determinado pela equação (2):

$$PNEC = \frac{CENO}{100} \quad (2)$$

Como critério para a interpretação do coeficiente de risco (RQ) foi utilizada a relação MEC/PNEC, a partir da qual se estabeleceu diferentes níveis de risco ("baixo risco" de 0,01 até 0,1; "médio risco" acima de 0,1 a 1; e "alto risco" acima de 1), conforme proposto pela Comunidade Europeia (EMEA, 2006), SÁNCHEZ-BAYO *et al.* (2002) e HERNANDO *et al.* (2006).

Com os dados gerados foi estabelecida a relação entre as concentrações ambientais dos compostos e as concentrações de efeito encontradas, com o objetivo de determinar o risco ambiental no ambiente marinho (Figura 2).

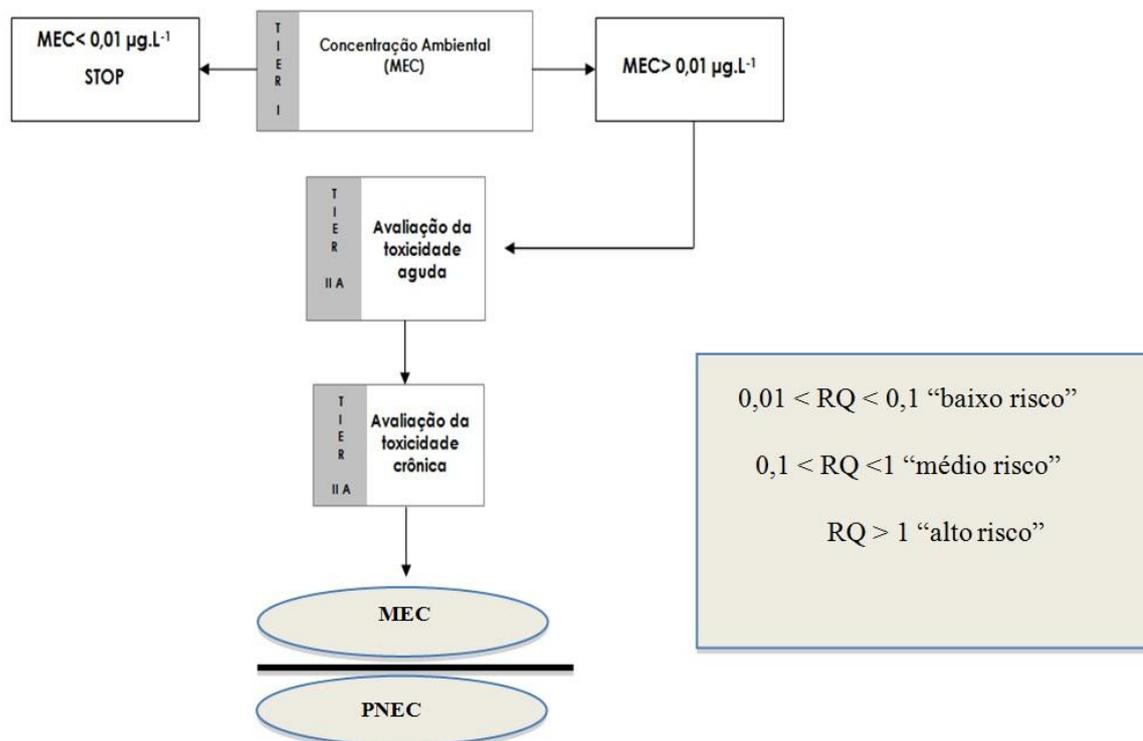


Figura 2 - Estrutura da proposta para a avaliação do risco ambiental (Adaptado de EMEA 2006 e HERNANDO *et al.* (2006)).

### 3.2 Fármacos de interesse

A proposta de avaliação de risco ambiental dos fármacos levou em consideração que, dentre as classes terapêuticas que estes compostos se enquadram (antidepressivo e antibiótico), estes são os mais utilizados em âmbito nacional e estão inseridos 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).

### 3.2.1 Amoxicilina

A amoxicilina ((2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2(4-hidroxifenil)acetil]amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-thia-1-zabicyclo[3.2.0]heptano-2-ácido carboxílico) (Fig. 3 ), é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico de espectro moderado utilizado no tratamento de infecções bacterianas causadas por microorganismos susceptíveis.

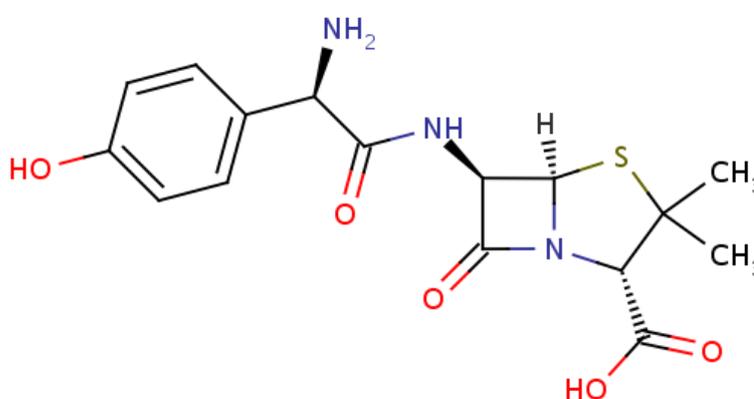


Figura 3 - Estrutura química da Amoxicilina

As principais características físicas e químicas da Amoxicilina estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características físicas e químicas da Amoxicilina

<b>Fórmula Molecular</b>	<b>C<sub>16</sub>-H<sub>19</sub>-N<sub>3</sub>-O<sub>5</sub>-S</b>
<b>Peso molecular</b>	365.41 g/mol
<b>Cor</b>	Pó cristalino branco
<b>Ponto de fusão</b>	194 ° C
<b>Solubilidade em água</b>	1 g solúvel em 370 mL de água
<b>pKa</b>	9,48

Estudos indicam que AMOX é hidrolisada no ambiente, pela abertura do anel  $\beta$ -lactâmico, estrutura instável e sensível a variações do pH, do calor e da ação das enzimas  $\beta$ -lactamases. Experimentos laboratoriais têm mostrado a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico levando a formação de ácido penicilâmico intermediário, em soluções fracamente ácidas ou neutras; com posterior transformação ao ácido penicilóico, produto de degradação dos compostos  $\beta$ -lactâmicos em meio alcalino. Esse ácido penicilóico pode reagir formando ácido penicilínico sob condições ácidas (HIRSCH *et al.*, 1999; SACHER *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2008).

### 3.2.2 Cloridrato de Fluoxetina

O Cloridrato de Fluoxetina (N-metil-3-(4-trifluorometil-fenoxi-3-fenilpropilamina cloridreto) (FIG.4), um inibidor seletivo da recaptação da serotonina, é uma substância reconhecidamente eficaz para o tratamento dos sintomas da depressão humana (O'SHEA, 1991).

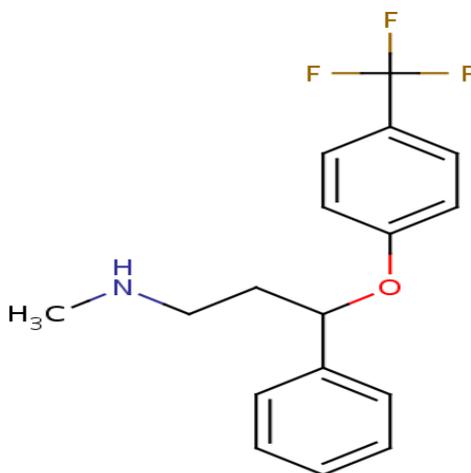


Figura 4 - Estrutura química da Fluoxetina

As principais características físicas e químicas da Fluoxetina estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Característica físicas e químicas da Fluoxetina.

<b>Fórmula Molecular</b>	<b>C<sub>17</sub>-H<sub>18</sub>-F<sub>3</sub>-N-O</b>
<b>Peso molecular</b>	345,79 g/mol
<b>Cor</b>	Cristais brancos a quase brancos
<b>Estabilidade</b>	Estável em condições normais
<b>Ponto de fusão</b>	158,4 - 158,9° C
<b>Solubilidade em água</b>	50 mg.mL <sup>-1</sup> a 25° C
<b>pKa</b>	4,6

Segundo KWON e ARMBRUST (2005) a FLX não degrada sensivelmente por fotólise direta, com meia-vida variando 102-385 dias em soluções tampão. Ainda no mesmo estudo a FLX foi hidroliticamente estável e fotoliticamente em todos os testes feitos em soluções aquosas, incluindo águas naturais, com semi-vida superior a 100 dias.

### 3.3 Organismo-teste

*Perna perna* (Molusco, Bivalve)



Figura 5 - *Perna perna*

Desde meados da década de 70, moluscos bivalves filtradores vêm sendo utilizados para monitorar a contaminação química em áreas marinhas costeiras. Devido a seus hábitos sedentários e sua habilidade de bioconcentrar os poluentes, mexilhões e outros bivalves vêm sendo empregados como organismos sentinelas apropriados para estudos de monitoramento da qualidade ambiental de áreas costeiras (IMW, 1995), bem como em estudos laboratoriais que possibilitam uma previsão dos possíveis efeitos biológicos adversos em diferentes níveis de organização biológica.

O mexilhão *Perna perna* (Fig. 5) é encontrado em bancos naturais entre a região do entre-marés ao infralitoral, onde habita em áreas de incidência direta de ondas e de alto hidrodinamismo. São organismos filtradores e sua alimentação consiste de fitoplâncton e matéria orgânica particulada em suspensão.

Os exemplares do molusco bivalve (mexilhão) *Perna perna* empregados nos ensaios ecotoxicológicos previstos neste estudo foram adquiridos de cultivos na praia de Toque-toque, São Sebastião - SP. Os organismos foram transportados em caixa térmica até o laboratório e mantidos em aquário com água do mar filtrada, sob aeração constante e temperatura de 25°C até o momento da realização dos ensaios.

### **3.4 Ensaios ecotoxicológicos**

#### **3.4.1 Sensibilidade dos organismos**

Em paralelo aos experimentos, foram realizados ensaios de sensibilidade (n=3) com os mexilhões *Perna perna* para se verificar a viabilidade dos embriões utilizados nos ensaios, empregando como substância de referência o surfactante Dodecil sulfato de sódio (DSS), de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.3. ZARONI *et al.* (2005)

#### **3.4.2 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito agudo (Fertilização) com o moluscos bivalve *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia) – TIER 1**

Este ensaio foi realizado de acordo com protocolo da USEPA (1991), desenvolvido para avaliação da toxicidade crônica e aguda em efluentes e corpos receptores marinhos e estuarinos com diferentes organismos. No presente estudo este método foi adaptado para a espécie de mexilhão *Perna perna* de acordo com o estudo realizado por ZARONI *et al.* (2005).

O método consistiu na exposição de espermatozoides de *Perna perna*, por um período de 1 hora, a diferentes concentrações dos fármacos em câmara de germinação e fotoperíodo de  $25 \pm 1$  °C. As concentrações testadas de AMX foram: 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 mg.L<sup>-1</sup>. As concentrações testadas de FLX foram: 5,0; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25 mg.L<sup>-1</sup>. Após o período de exposição, uma solução contendo aproximadamente 2000 óvulos foi adicionada aos frascos-teste.

Quarenta minutos após a adição dos óvulos, o ensaio foi encerrado com a adição de 0,5 ml de formol tamponado com bórax em todas as réplicas. Após o

período de exposição, o ensaio foi concluído com a contagem dos 100 primeiros ovos de cada réplica. A fertilização do óvulo foi analisada pela observação da ocorrência da membrana de fertilização ou das primeiras divisões celulares. O ensaio foi validado quando apresentou taxa de fertilização maior ou igual a 70 % no controle (Fig. 6).

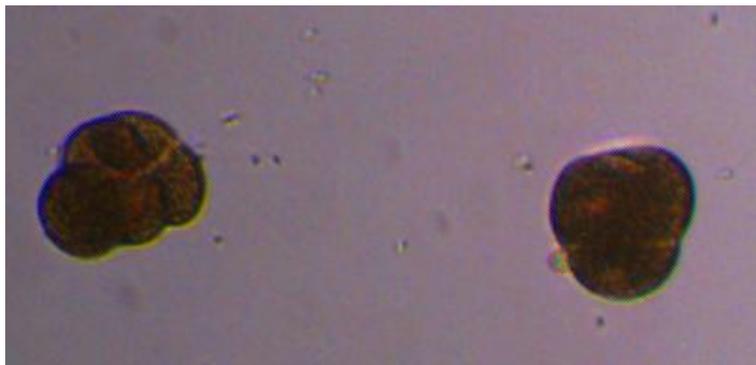


Figura 6 - Óvulos fertilizados de *P. perna* nas primeiras clivagens

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

Efeitos de xenobióticos podem ainda se manifestar através de alterações fisiológicas como diminuição na capacidade de reprodução. Estudos pretéritos têm utilizado ensaios de desenvolvimento embrionário para avaliar os efeitos da contaminação em níveis conectivos (DAME,1996; WEDDERBURN *et al.*, 2000). A viabilidade dos gametas, bem como a capacidade de desenvolvimento larval podem refletir as condições de organismos expostos a contaminantes e sua capacidade de reproduzir-se, com reduções no percentual de fecundação e de larvas bem desenvolvidas sendo observadas em organismos expostos a contaminantes (ZARONI *et al.* 2005; ABESSA *et al.*, 2005; PEREIRA, 2008).

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 consistiu na exposição de ovos recém-fertilizados a diferentes concentrações dos fármacos por um período de 48 horas, em temperatura de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e salinidade de 35. As concentrações testadas de AMX foram: 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 e

31,25 mg.L<sup>-1</sup>. As concentrações testadas de FLX foram: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,06 mg.L<sup>-1</sup>. Após o período de exposição foi determinada a porcentagem de embriões normais (valvas simétricas fechadas e massa visceral presente na porção interna da concha) e/ou anormais (organismos que não se desenvolveram até larva “D”, que tenham atingido este estágio porém com extravasamento de massa visceral e/ou com a concha aberta) nas diferentes concentrações testadas, em relação ao controle.

A preparação dos organismos-teste para o início dos ensaios consistiu em sua limpeza, através de raspagem dos organismos incrustantes. Após a limpeza, os mexilhões foram lavados e mantidos fora da água, para que não ocorra a liberação dos gametas antes da separação dos indivíduos. A água do mar utilizada na diluição dos fármacos, bem como no controle e na fecundação dos ovos foi filtrada em membrana Milipore 0,22 µm de porosidade. Após a filtração a água foi mantida sob aeração por aproximadamente 4 horas antes da montagem dos ensaios.

A liberação dos gametas foi induzida por um estímulo físico (indução termal), técnica considerada adequada no trabalho realizado por ZARONI *et al.* (2005). Para tanto, cerca de 50 mexilhões foram colocados individualmente dentro de placas de Petri e o conjunto de placas dentro de uma bandeja plástica rasa com água do mar. Este conjunto foi mantido em baixa temperatura (10 °C) por aproximadamente 60 minutos. Após este procedimento, os animais foram imersos em água do mar em temperatura elevada (26±2° C) sob fluxo contínuo. Este fluxo de água contínuo foi proporcionado pelo próprio sistema de filtração do tanque simulando uma cascata. Após duas ou três horas do início do fluxo de água ocorreu a liberação dos gametas, que foi detectada visualmente. Entre 6 e 12 organismos liberaram gametas que foram empregados nos ensaios.

Os óvulos liberados foram coletados do fundo da placa de Petri com auxílio de uma pipeta e transferidos para béqueres contendo água do mar filtrada (0,22 µm). Em seguida, os óvulos foram lavados com auxílio de uma malha de 75 µm e recolocados em um béquer de capacidade maior com água do mar filtrada. O líquido espermático foi coletado com o mínimo de água possível e mantido separado em um béquer, imerso em um recipiente com gelo (Fig.7).



Figura 7 - Coletas de espermatozoides (A) e óvulos (B) de *P. perna*

A fecundação foi realizada pela adição gradual de 2 mL da suspensão espermática total. Os óvulos fecundados foram identificados após o início da divisão celular.

Com auxílio de uma câmara de Sedgwick-Rafter, foi estimada a densidade dos ovos e, cerca de 500 embriões foram colocados em cada frasco-teste, iniciando-se então o período de exposição aos fármacos (48 horas).

O ensaio foi encerrado após 48 h e validado quando constatado que mais de 70% dos embriões atingiram o estágio de larva-D no controle. A fixação foi feita com 0,5 mL de formol tamponado com bórax para posterior contagem, onde os 100 primeiros organismos encontrados foram avaliados.

Foram considerados normais somente os organismos que se desenvolverem até o estágio de larva-D (Fig.8), com valvas simétricas fechadas e massa visceral presente na porção interna da concha.

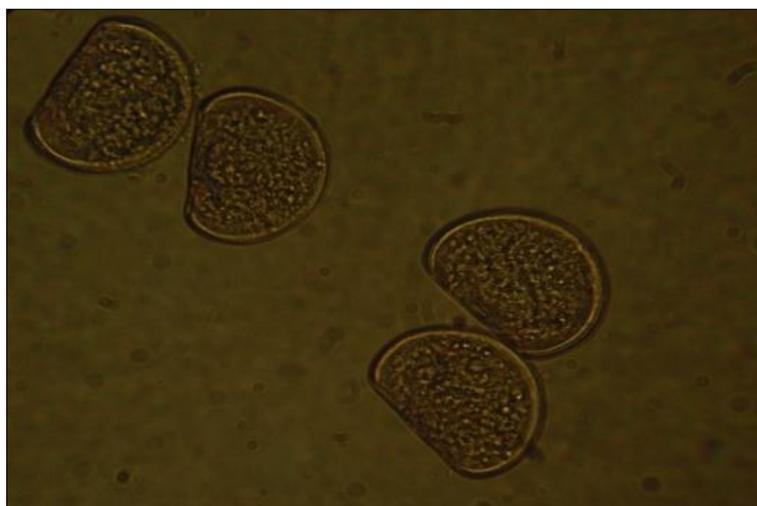


Figura 8 - Larvas normais de *P. perna*

A Tabela 3 apresenta um resumo da metodologia do ensaio.

Tabela 3 - Condições e critérios de aceitabilidade dos ensaios de toxicidade com P. perna (Embriolarval).

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições</b>
<b>Temperatura</b>	25±1° C
<b>Salinidade</b>	30 a 36 unidades
<b>Fotoperíodo</b>	12 a 16 horas de luz
<b>Água de diluição</b>	Água marinha natural ou reconstituída filtrada em 0,22 µm
<b>Sistema do ensaio</b>	Estático
<b>Duração do ensaio</b>	48 h
<b>Recipiente-teste</b>	Tubo de ensaio com capacidade para 15 ml
<b>Volume das soluções-teste</b>	10 ml
<b>Número de réplicas por diluição</b>	4
<b>Número de organismos por réplicas</b>	50 organismos (ovos) por mililitro
<b>Idade do organismo-teste</b>	Óvulos recém-fecundados
<b>Efeito observado</b>	Atraso ou anormalidade no desenvolvimento embriolarval
<b>Validade do ensaio</b>	Mínimo de 70% de larvas normais nos controles
<b>Alimentação</b>	---

### 3.5 Análise dos resultados

Nos ensaios para avaliação de efeito agudo foi estabelecida a concentração que causa inibição da fertilização a 50% dos ovócitos avaliados (CE50) através do método de Trimmed Spearman-Kärber.

Nos ensaios para avaliação de efeito crônico foram estabelecidas as maiores concentrações onde não foram detectados efeitos biológicos (CENO – Concentração de Efeito Não Observado) e as menores concentrações que causaram efeito (CEO) em cada ensaio. Também foram estimados valores de CI<sub>50<sub>48h</sub></sub> através do método de interpolação linear (ICp – USEPA). Para o estabelecimento da CENO, os dados foram analisados quanto à normalidade através do método do Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) e também analisados quanto à homocedasticidade através do teste de *Bartlett*. Após passarem nestes pré-requisitos para aplicação da análise de variância (ANOVA) foi empregado o teste de *Dunnnett*, a fim de identificar as concentrações que apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle.

As análises estatísticas dos ensaios para avaliação de efeito crônico foram realizadas através do programa TOXSTAT 3.5 e consideraram um  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Toxicidade Aguda – Inibição da fertilização

#### 4.1.1 Amoxicilina

As análises físico-químicas iniciais e finais (pH, Oxigênio Dissolvido e salinidade) demonstraram valores dentro do range adequado para a espécie, de acordo procedimento proposto por Zaroni et al. (2005). O pH variou de 6,9 a 7,11; enquanto o OD variou de 6,9 a 5,6 mg.L<sup>-1</sup> e a salinidade de 35 a 36. As figuras de 9 a 11 apresentam o resultado da avaliação de toxicidade aguda. As concentrações testadas até 2000 mg.L<sup>-1</sup> não apresentaram efeito sob a fertilização dos gametas de *P. perna*.

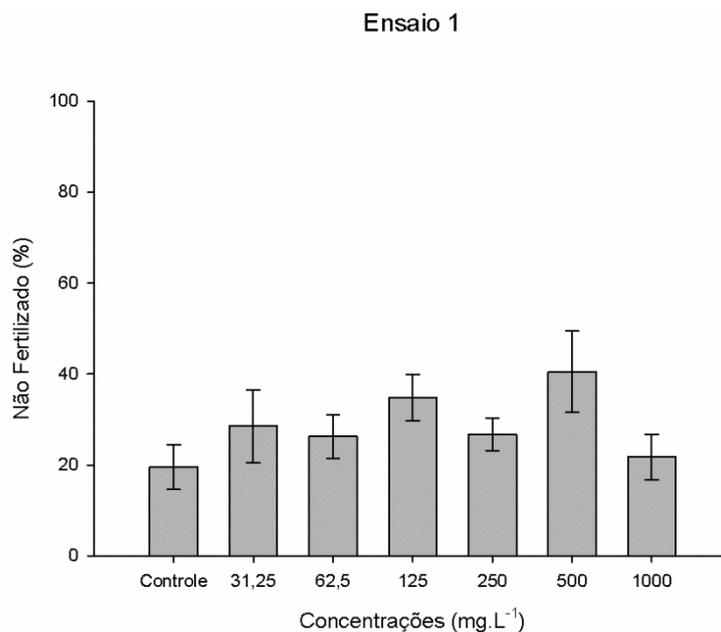


Figura 9 - Toxicidade aguda da Amoxicilina na fertilização de *P. perna*

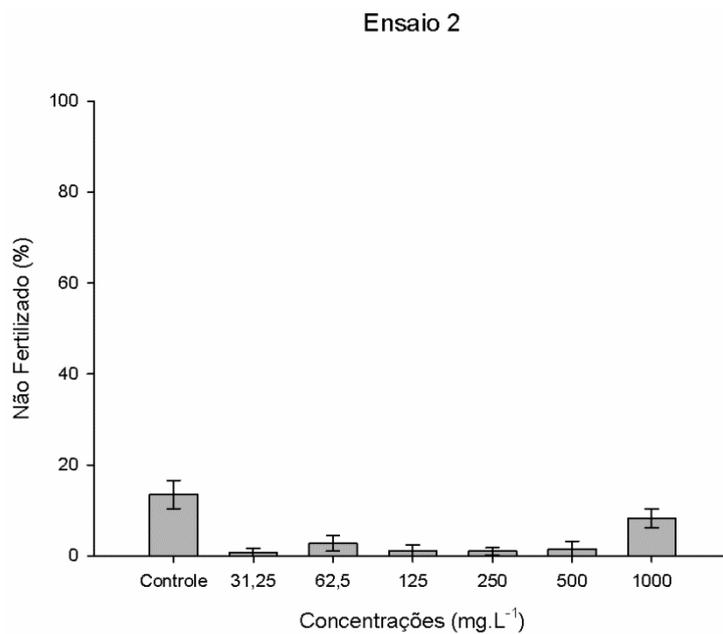


Figura 10 Fig. 10 – Toxicidade aguda da Amoxicilina na fertilização de *P. perna*.

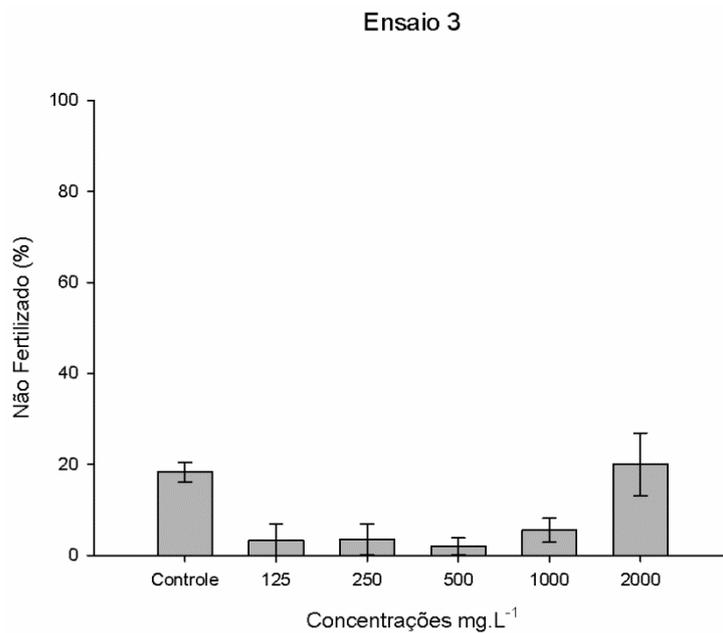


Figura 11 - Toxicidade aguda da Amoxicilina na fertilização de *P. perna*.

#### 4.1.2 Fluoxetina

As análises físico-químicas iniciais e finais (pH, Oxigênio Dissolvido e salinidade) demonstraram valores dentro do range adequado para a espécie, de acordo procedimento proposto por Zaroni *et al.* (2005). O pH variou de 8,08 a 8,31; enquanto o OD variou de 6,9 a 5,7 mg.L<sup>-1</sup> e a salinidade de 34 a 35. As Figuras 12 a 14 apresentam os resultados dos ensaios para avaliação de toxicidade aguda. Concentrações a partir de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram efeito sob a fertilização dos gametas de *P. perna*.

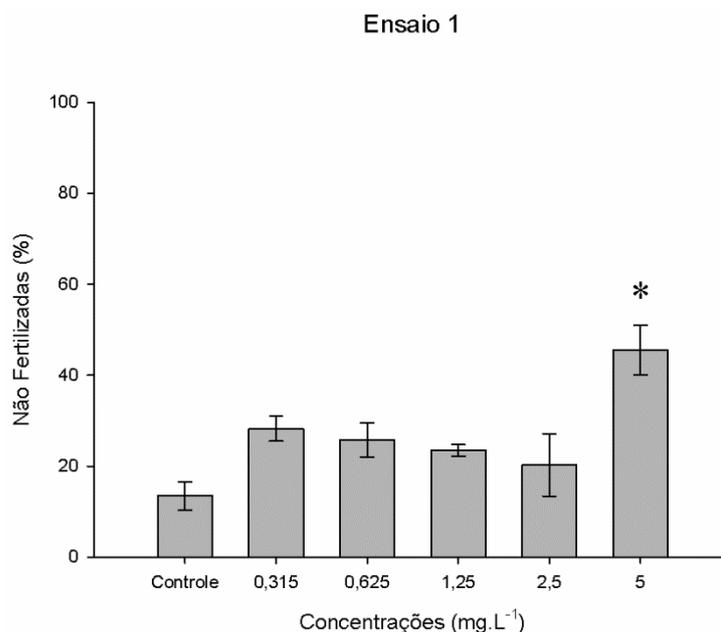


Figura 12 - Toxicidade aguda da Fluoxetina na fertilização de *P. perna*. \*diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )

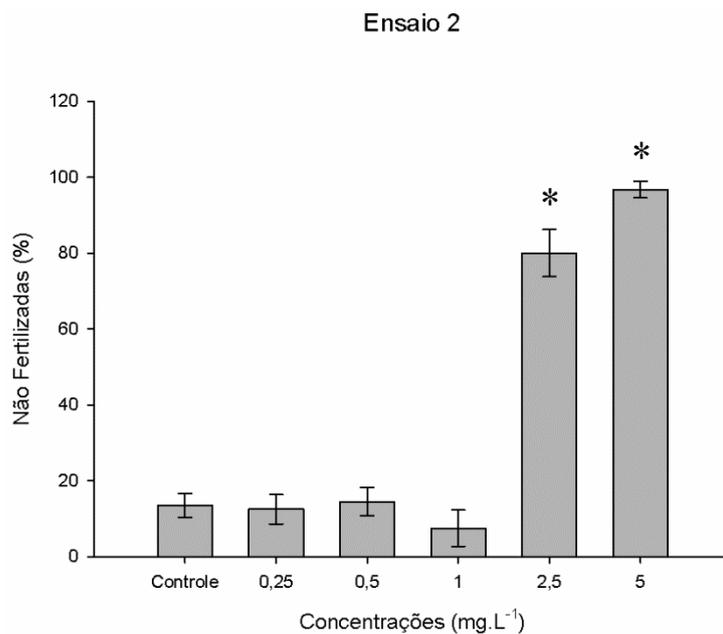


Figura 13 - Toxicidade aguda da Fluoxetina na fertilização de *P. perna*. \*diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )

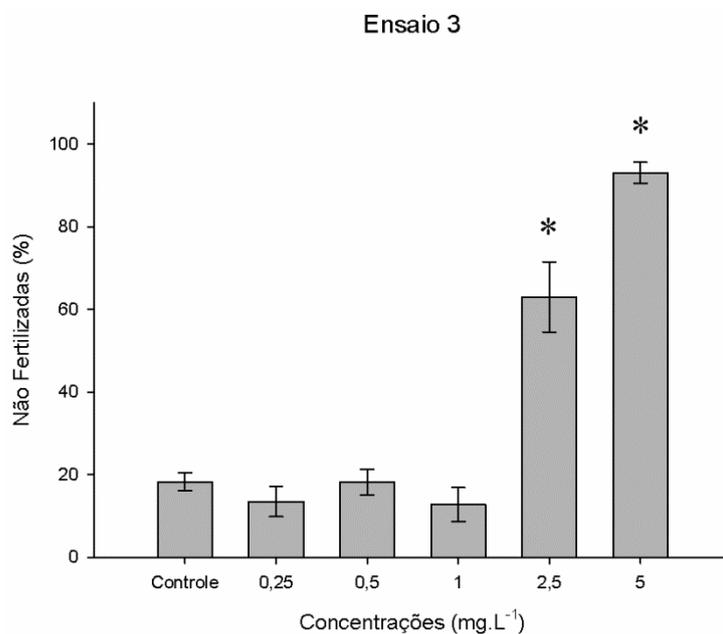


Figura 14 - Toxicidade aguda da Fluoxetina na fertilização de *P. perna*. \* diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )

A Tabela 4 apresenta os resultados dos três ensaios de toxicidade aguda do composto Fluoxetina.

Tabela 4 - Toxicidade aguda do composto Fluoxetina

<b>Fluoxetina Agudo</b>			
<b>Ensaio</b>	<b>CI50</b>	<b>LC Inf.</b>	<b>LC Sup.</b>
<b>1</b>	> 5.0	-	-
<b>2</b>	1.99	1.91	2.07
<b>3</b>	2.32	2.20	2.44

## 4.2 TOXICIDADE CRÔNICA – DESENVOLVIMENTO EMBRIOLARVAL

### 4.2.1 Amoxicilina

As análises físico-químicas iniciais e finais (pH, Oxigênio Dissolvido e salinidade) demonstraram valores dentro do range adequado para a espécie, de acordo procedimento proposto por Zaroni *et al.* (2005). O pH variou de 6,9 a 7,11; enquanto o OD variou de 6,9 a 5,6 mg.L<sup>-1</sup> e a salinidade de 35 a 36. As Figuras de 15 a 17 apresentam os resultados dos ensaios para avaliação de toxicidade crônica. Concentrações a partir de 1000 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram efeito sob o desenvolvimento embriolarval de *P. perna*.

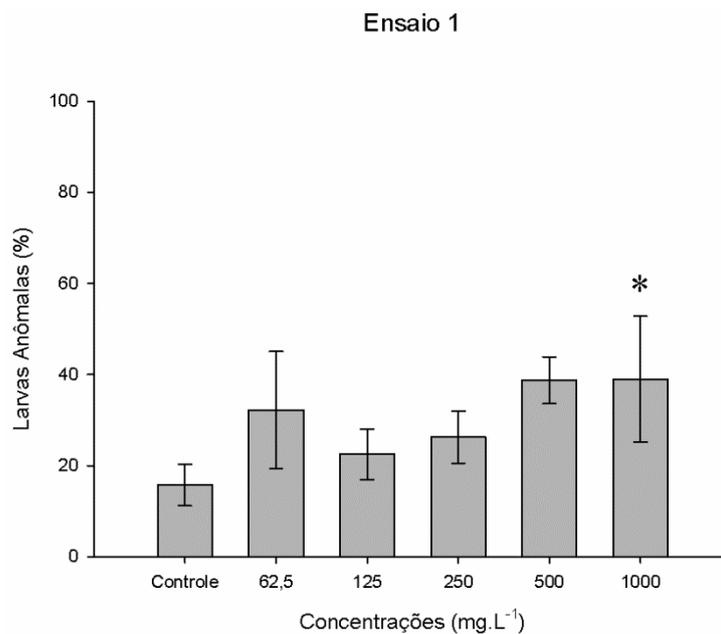


Figura 15 - Toxicidade crônica de Amoxicilina no desenvolvimento embrionário de *P. perna*. \*diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )

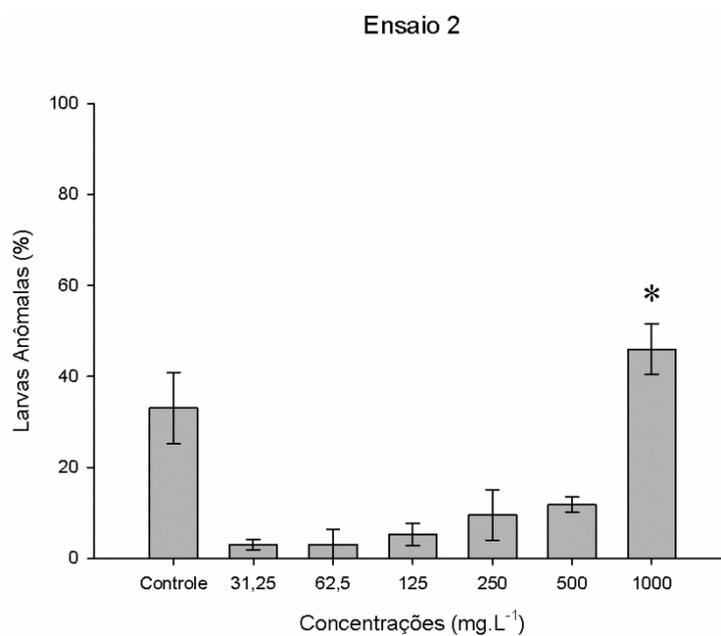


Figura 16 - Toxicidade crônica de Amoxicilina no desenvolvimento embrionário de *P. perna*. \*diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )

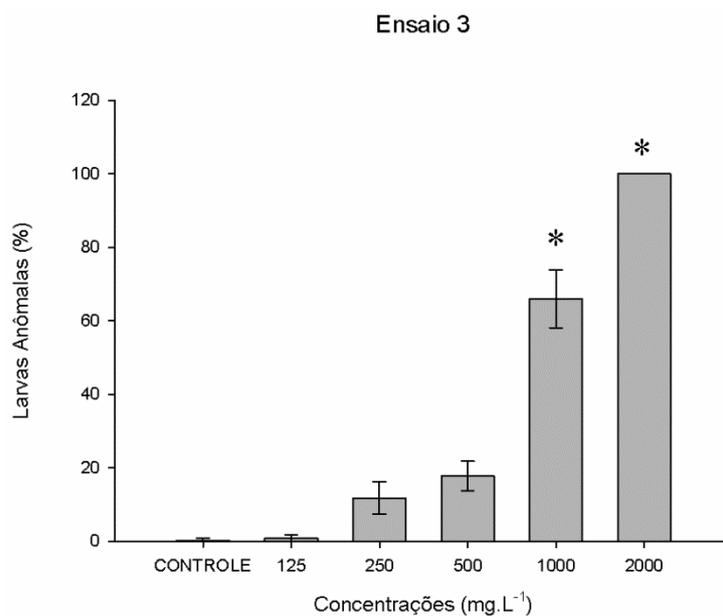


Figura 17 - Toxicidade crônica de Amoxicilina no desenvolvimento embrionário de *P. perna*. \*diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )

A Tabela 5 apresenta os resultados dos três ensaios de toxicidade aguda do composto Amoxicilina.

Tabela 5 - Toxicidade crônica do composto Amoxicilina

Amoxicilina Crônico					
Ensaio	CENO	CEO	CI50	LC Inf.	LC Sup.
1	250	500	-	-	-
2	500	1000	-	-	-
3	500	1000	835	799	885

#### 4.2.2 Fluoxetina

As análises físico-químicas iniciais e finais (pH, Oxigênio Dissolvido e salinidade) demonstraram valores dentro do range adequado para a espécie, de acordo procedimento proposto por Zaroni et al. (2005). O pH variou de 8,08 a 8,31; enquanto o OD variou de 6,9 a 5,7 mg.L<sup>-1</sup> e a salinidade de 34 a 35. As Figuras 18 a 20 apresentam os resultados dos ensaios para avaliação de toxicidade crônica. Concentrações a partir de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram efeito sob a fertilização dos gametas de *P. perna*.

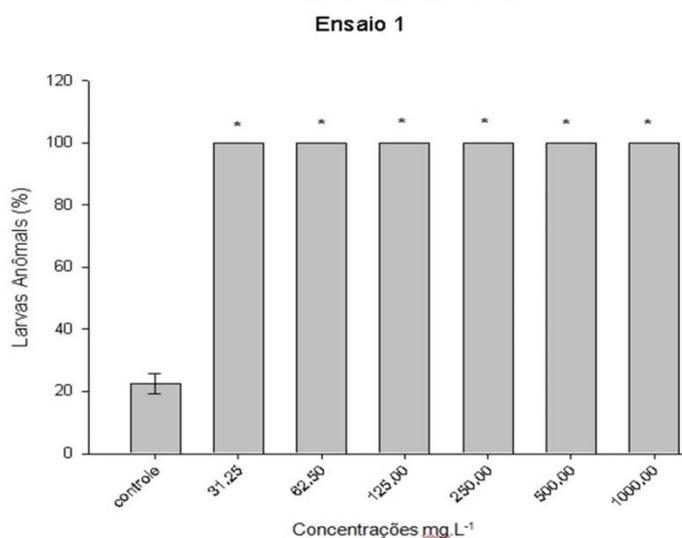


Figura 18 - Toxicidade crônica de Fluoxetina no desenvolvimento embriolarval de *P.perna*. \*diferença significativa em relação ao controle (p< 0,05)

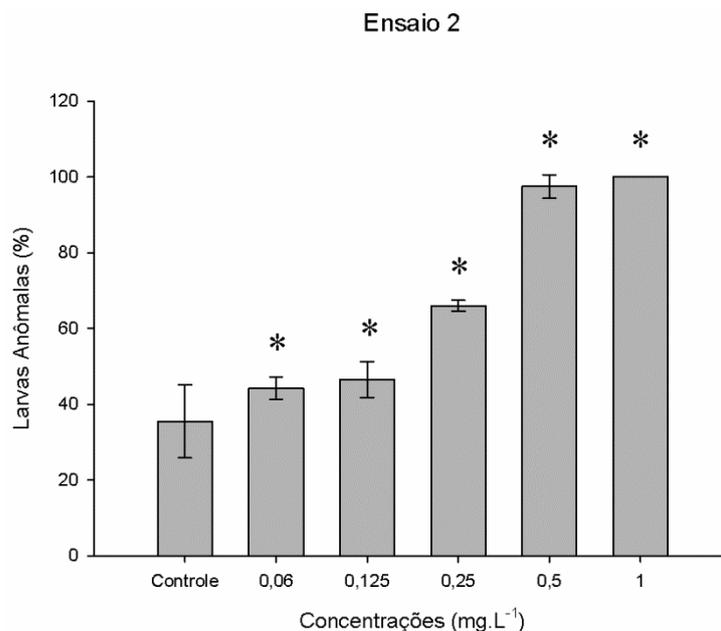


Figura 19 - Toxicidade crônica de Fluoxetina no desenvolvimento embrionário de *P. perna*. \*diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )

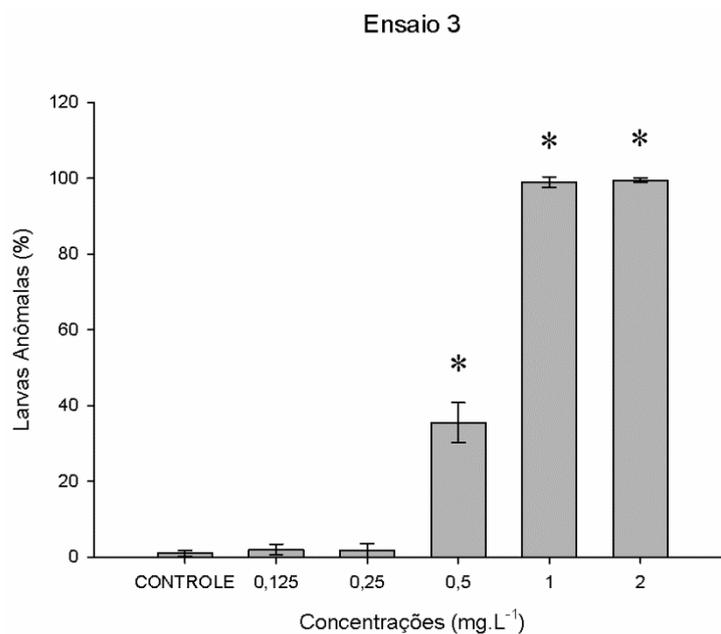


Figura 20 - Toxicidade crônica de Fluoxetina no desenvolvimento embrionário de *P. perna*. \*diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )

A Tabela 6 apresenta os resultados dos três ensaios de toxicidade crônica do composto Fluoxetina.

Tabela 6 - Toxicidade crônica do composto Fluoxetina

<b>Fluoxetina Crônico</b>					
<b>Ensaio</b>	<b>CENO</b>	<b>CEO</b>	<b>CI50</b>	<b>LC Inf.</b>	<b>LC Sup.</b>
<b>1</b>	<31.25	31.25	-	-	-
<b>2</b>	0.06	0.125	0.254	0.233	0.277
<b>3</b>	0.25	0.50	0.618	0.587	0.639

#### **4.2.3 Ensaios de sensibilidade**

Os resultados da CI50 (48h) dos três ensaios de sensibilidade com DSS foram de: 1,25 mg.L-1 (1,19 – 1,31 mg. L-1); 1,01 mg. L-1 (0,97 – 1,03 mg. L-1) e 1,09 mg. L-1 (1,07 – 1,11 mg. L-1). Os resultados obtidos nos ensaios de sensibilidade ao DSS encontram-se dentro do intervalo de concentrações reportadas na literatura (Zaroni, 2005; Simm, 2009; Cortez, 2011).

### **4.3 Análise de Risco**

#### **4.3.1 Concentrações ambientais**

A Tabela 7 apresenta as concentrações ambientais de Fluoxetina em amostras de água superficial, efluentes municipais e sedimento. Não foram obtidas concentrações ambientais do antibiótico Amoxicilina.

Tabela 7 - Concentrações ambientais em diferentes matrizes

<b>Fármaco</b>	<b>MEC</b>	<b>Matriz</b>	<b>Referência</b>
<b>Fluoxetina</b>	0,012 µg/L	água superficial	Koplin et al (2002)
	0,540 µg/L	efluente	Weston et al.(2001)
	0,03- 300ng/L	águas superficiais	Franzellitti (2014)
	0.32 µg/L	efluentes municipais	Weston et al.(2001)
	0.003µg/L	ambiente estuarino	Pait et al.,( 2006)
	600 (±280) µg/L	águas residuais	Benotti and Brownawell (2007)
	1,8ng/g	sedimento	Furlong et al.(2003)
<b>Amoxicilina</b>	---	---	---

#### 4.3.2 Avaliação do Risco de acordo com EMEA (2006)

De acordo com o procedimento descrito no item 3.1, a Tabela 8 apresenta os resultados dos quocientes de risco conforme proposto por EMEA 2006.

Tabela 8 - Quociente de Risco

<b>Fármaco</b>	<b>MEC (mg/L)</b>	<b>PNEC (mg/L)</b>	<b>QR (MEC/PNEC)</b>	<b>Risco</b>
<b>Amoxicilina</b>	---	2,5	---	---
<b>Fluoxetina</b>	0,0003 Franzellitti (2014)	0,0006	0,5	Médio

#### 4.3.3 Avaliação do Risco de acordo a Diretiva Europeia 93/67/EEC

Baseado nos resultados de CI50 dos ensaios crônicos de curta duração, e seguindo a Diretiva Europeia 93/67/EEC que classifica as substâncias de acordo com as concentrações de efeito, a amoxicilina foi classificada como não tóxica, enquanto a fluoxetina foi classificada como muito tóxica. A Tabela 9 apresenta os resultados.

Tabela 9 - Toxicidade dos compostos baseado na classificação da Diretiva Europeia 93/67/EEC

Fármaco	Extremamente tóxico	Muito tóxico	Tóxico	Perigoso	Não tóxico
CI50 (mg.L <sup>-1</sup> )	<0,1	0,1-1	1-10	10-100	>100
Amoxicilina					
Fluoxetina					

## 5. DISCUSSÃO

Fármacos são compostos projetados para serem biologicamente ativos, tornando crescente a preocupação dos seus efeitos sobre organismos não alvos em ecossistemas aquáticos (Boxall et al, 2012;. Brausch et al, 2012). Santos *et al* (2010) considera que os antibióticos pertencem a uma classe terapêutica onde a saúde humana e a perturbação ambiental estão intimamente relacionados.

A principal preocupação com compostos antimicrobianos está associada com o desenvolvimento de resistência de bactérias que podem posteriormente, comprometer a saúde pública por meio da eficácia dos tratamentos. McKeon *et al.* (2000) Miranda *et al.* 1998, investigaram a incidência de resistência microbiana em uma espécie de *Aeromonas* isolada de ambientes aquáticos, constatando que a resistência ocorreu com diferentes antibióticos.

Segundo Jones *et al.* (2002), testes de toxicidade crônica realizados com algas têm mostrado alta sensibilidade a esses antibacterianos.

Efeitos significativos de amoxicilina foram observados em dois organismos de água doce: microalgas *Synechococcus lepoliensis* (EC<sub>50</sub>= 0,002 mg.L<sup>-1</sup>) e as cianobactérias *Microcystis aeruginosa* (EC<sub>50</sub> = 0,0037 mg.L<sup>-1</sup>) (ANDREOZZI *et al.* 2006; HOLTEN-LÜTZHØFT *et al.* 1999).

No presente estudo não foram observados efeitos agudos da amoxicilina sobre a fertilização dos gametas de *P. perna* nas mais altas concentrações testadas (2,0 mg.L<sup>-1</sup>). Resultados semelhantes foram observados em embriões de ouriço-do-mar expostos a AMX (CARBALERA, *et al.* 2012) . De acordo com Lanzky *et al* (1997) peixes expostos a baixo níveis de antimicrobianos aparentemente também não sofreram efeitos adversos.

Quanto aos compostos neuroativos antidepressivos, existem vários exemplos de efeitos sobre organismos aquáticos em concentrações ambientalmente relevantes. O antidepressivo Fluoxetina (Prozac) foi inicialmente relatado como capaz de provocar respostas comportamentais em peixes (Painter *et al*, 2009;

Schultz et al., 2011), bem como alterações nos padrões de reprodução (BROOKS *et al.*, 2003).

Estudos com moluscos expostos a FLX inicialmente relataram indução da desova em bivalves (HONKOOOP *et al.*, 1999) e da metamorfose larval em gastrópode (COUPER e LEISE, 1996). A menor concentração de fluoxetina necessária para induzir a desova e outras espécies de bivalves foi de 30,9  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (FONG E MOLNAR, 2008), e BRINGOLF *et al.* (2010) constataram que apenas as duas maiores concentrações que eles testaram, ou seja, 300 e 3000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , teve efeitos na desova em diversas espécies de mexilhões de água doce.

No presente estudo, a Fluoxetina apresentou toxicidade aguda a partir de 1,99  $\text{mg.L}^{-1}$  (CI50 48h) e toxicidade crônica a partir da concentração 0,125  $\text{mg.L}^{-1}$  (CEO 48h). HAZELTON *et al.*, (2014) observaram em testes realizados com exposição prolongada à fluoxetina alterações no comportamento de mexilhões de água doce. Animais tratados com 22,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$  fluoxetina se movimentaram por distâncias maiores que os animais controle, e embora não estatisticamente significativa, mexilhões expostos a 2,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  moveram-se 50% mais do que os animais do controle durante 72 h exposições.

Maranho *et al.* (2015a) observaram mortalidade de anfípodos expostos a sedimento marcado com 10  $\text{ng.g}^{-1}$ , bem como efeitos subletais representados pela alteração de atividades enzimáticas de defesa (EROD, DBF, GST, AChE, GPx) ou efeitos celulares (danos em DNA e LPO) a partir da exposição a sedimento marcado com 0,01  $\text{ng.g}^{-1}$ . Maranho *et al.*, (2014a) observaram mortalidade de poliquetas (*H. diversicolor*) expostos a sedimento marcado com 1  $\text{ng.g}^{-1}$ , bem como danos em DNA a partir de 0,01  $\text{ng.g}^{-1}$ . Maranho *et al.*, (2015 b) também observaram inibição de luminescência em *Vibrio fischeri* exposta a sedimento marcado com FLX a partir de 36  $\text{ng.g}^{-1}$  (CI50), bem como embriotoxicidade em *P. lividus* expostos a elutriato a partir de 0,01  $\text{ng.g}^{-1}$ . Foran *et al.*, (2004), observaram anormalidades no desenvolvimento de embriões de medaka japonês (*Oryzias latipes*) expostos por 4 semanas a fluoxetina.

O trabalho realizado por CUNHA E MACHADO (2001) relata um inchaço significativo e saliência do pé em mexilhões tratados com fluoxetina. Isto tem sido atribuída a um aumento potencial na captura de água nas brânquias e perda do

controle do esqueleto hidrostático, que possivelmente reduz a mobilidade dos mexilhões afetados. HAZELTON *et al.* (2013) relataram que, após um período de 28 dias de exposição a  $29,3 \mu\text{g.L}^{-1}$  de fluoxetina, mexilhões adultos da ordem Unionoidea apresentaram comportamento alterado quanto a protrusão do pé.

FONG *et al.*, (2015) observaram que a fluoxetina diminuiu a velocidade de rastejamento e a capacidade de alcançar a interface ar-água em *Urosalpinx cinerea* e *Lithopoma americanum* expostos a concentrações a partir de  $345 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

O estudo realizado por Santos (2012), encontrou efeito em *Daphnia similis* após 48h de exposição a  $1,33 \text{mg.L}^{-1}$ , enquanto *Hyalella azteca* apresentou mortalidade na concentração  $0,61 \text{mg.L}^{-1}$  após 96h de exposição.

No trabalho de PÉRY *et. al.*, (2008), os efeitos mais elevados foram encontrados no desenvolvimento dos neonatas de dafinídeos, resultando em efeitos significativos sobre a sua reprodução. A fluoxetina parece interagir com os processos de crescimento e reprodução em invertebrados. Dependendo da espécie, os efeitos de fluoxetina podem ser encontrados em baixas concentrações de exposição, em torno  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Nesse estudo, os autores observaram que a segunda geração de dafinídeos foram mais sensíveis do que a primeira, evidenciando a necessidade de investigação dos efeitos em pelo menos duas gerações de invertebrados. Os autores assumem que a quantidade total de energia investida por neonata não é dependente da concentração, de modo que as neonatas devem ter o mesmo comprimento e capacidade para resistir a exposição a substâncias tóxicas. Isto sugere um ação direta da fluoxetina sobre o desenvolvimento de recém-nascidos, que não pode ser a consequência do esgotamento de energia na fêmea adulta.

Os estudos citados acima demonstram a capacidade da Fluoxetina causar efeitos fisiológicos adversos em baixas concentrações e sugerem a necessidade de estudos em menores níveis de organização biológica, bem como estudos populacionais para uma melhor avaliação ecotoxicológica desse composto neuroativo.

## 6. CONCLUSÃO

O antibiótico Amoxicilina não apresentou efeito agudo nas concentrações testadas no presente estudo. Entretanto, efeito crônico sobre o desenvolvimento embriolarval de *P. perna* foi observado a partir de 1000 mg.L<sup>-1</sup>. Essas concentrações não são ambientalmente relevantes, porém esse composto é largamente utilizado em áreas de maricultura e pode levar ao surgimento de organismos alvos resistentes (bactérias) ou à toxicidade para microalgas.

A Fluoxetina mostrou efeitos nos processos reprodutivos de *Perna perna* uma vez que efeito agudo (inibição da fertilização) foi observado a partir 2,5 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto efeito crônico foi observado a partir de 0,125 mg. L<sup>-1</sup>.

A partir da avaliação de risco baseada na legislação europeia AMX não foi considerada tóxica, enquanto fluoxetina foi avaliada como muito tóxica. A partir dos registros de concentrações ambientais de AMX pode-se considerar o risco como baixo, enquanto fluoxetina apresentou risco médio.

Nossos resultados demonstram os riscos ambientais provocados pelo descarte inadequado de fluoxetina no ecossistema aquático, onde políticas futuras devem ser desenvolvidas a respeito do tratamento dos efluentes e gerenciamento dos resíduos.

Estudos mais detalhados devem ser realizados levando-se em conta um maior tempo de exposição, menores níveis de organização biológica bem como estudos populacionais que denotem alterações significativas em função da exposição a concentrações ambientalmente relevantes.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABESSA, D. M. S. **Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, SP, Brasil.** Tese (Doutorado). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- ANDREOZZI, R. *et al.* **Antibiotics in the Environment: Occurrence in Italian STPs, Fate, and Preliminary Assessment on Algal Toxicity of Amoxicillin.** *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 6832-6838, 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, section 11, p. 377-394, 1992.
- BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. **Conclusions and future research needs.** In: BARCELÓ, D. (editor). *Analyses, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle.* First edition. Elsevier. p. 515-526, 2007.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Fármacos no meio ambiente.** *Química Nova*, 26 (4): p. 523-530, 2003.
- BLAIR, B.D., CRAGO, J.P., HEDMAN, C.J., KLAPER, R.D. **Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern.** *Chemosphere* 93, 2116–2123. 2013
- BRASIL. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais.** RENAME. 7ED. Ministério da Saúde, 2010.
- BRAUSCH, J.M., *et al.* **Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review of recent toxicological studies and considerations for toxicity testing.** In: Whitacre, D.M (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 218, pp. 1–99. 2012
- BOXALL, A.B.A., *et al.* **Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions?** *Environmental Health Perspectives* 120 (9), 1221–1229. 2012
- BRINGOLF, R.B., *et al.* **Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels.** *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1311– 1318. 2010
- BROOKS, B.W., *et al.* **Aquatic ecotoxicology of fluoxetine.** *Toxicol. Lett.* 142, 169–183. 2003
- CARBALLEIRA C., *et al.* **Assessing the Toxicity of Chemical Compounds Associated With Land-Based Marine Fish Farms: The Sea Urchin Embryo Bioassay With *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*.** *Arch Environ Contam Toxicol* 63:249–261. 2012.

- CARINS, J. Jr.; NIEDERLEHNER, B. R. **Ecological Toxicity Testing**. Lewis Publisher, Boca Raton, USA. P 228, 1995.
- CARLSSON, C., *et al.* **Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients**. *Sci. Total Environ.* 364, 67–87. 2006.
- CHIEN, Y. H.; LAI, H. T.; LIU, S. M.; **Sci. Total Environ.** 239, 81. 1999.
- CORTEZ, FS. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco triclosan para invertebrados marinhos**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas da Universidade de São Paulo. 203p. 2011.
- CUNHA, E.M., MACHADO, J. **Parturition in *Anodonta cygnea* induced by selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)**. *Canadian Journal of Zoology* 79 (1),95–100. 2001.
- DAUGHTON, C. G. **Pharmaceuticals in environment: sources and management**. In: Barceló, D.(editor). *Analyses, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle*. First edition. Elsevier.p. 1-49, 2007.
- EC. Technical Guidance Documents in Support of the Commission Directive 93/667/EEC on risk assessment for new notified substances and the Commission regulation (EC) 1488/94 on Risk substances, European Chemical Bureau, Ispra, Italy, 19th April 1996, part 1, 2 and 3. 1996.
- EMA - European Medicines Agency Pre-Authorisation Evaluation of Medicines for Human Use. **EMA/CHMP/SWP/4447/00. 2006**. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC500003978.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003978.pdf)
- FENT, K., WESTON, A.A., CAMINADA, D. **Ecotoxicology of human pharmaceuticals**. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. 2006
- FERRER, I., THURMAN, E.M. **Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry**. *J. Chromatogr. A* 1259, 148–157. 2012.
- FONG, P., HUMINSKI, P., D'URSO, L. **Induction and potentiation of parturition in fingernail clams by selective serotonin re-uptake inhibitors**. *J. Exp. Zool.* 280, 260\_ 264. 1998.
- FONG, P.P., *et al.* **The antidepressants venlafaxine (“Effexor”) and fluoxetine (“Prozac”) produce different effects on locomotion in two species of marine snail, the oyster drill (*Urosalpinx cinerea*) and the starsnail (*Lithopoma americanum*)**. *Mar Environ Res*, 103: 89-94, 2015 .
- FONG, P.P., MOLNAR, N. **Norfluoxetine induces spawning and parturition in estuarine and freshwater bivalves**. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81, 535–538. 2008.

- FORAN, C. M., *et al.* **Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure.** Arch Environ Con Tox, 46 (4), 511–517.2004.
- GAGNÉ, F.; *et al.* **Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 143. p. 179-186, 2006.
- GONZALEZ-Rey, M., BEBIANNO, M.J. **Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*?** Environ. Toxicol. Pharmacol. 33, 361–371. 2012.
- GROS, M., PETROVIC´, M., BARCELÓ, D. **Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters.** Talanta 70, 678–690. 2006.
- HALLING-SØRENSEN B., **Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming,** Chemosphere. 731–739. 2000
- HAZELTON, P.D., *et al.* **Fluoxetine alters adult freshwater mussel behavior and larval metamorphosis.** Sci. Total Environ. 445, 94–100. 2013.
- HAZELTON, PD., *et al.* **Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels.** Aquatic Toxicology 151; 27–35. 2014
- HERNANDO, M.D., *et al.* **Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments.**Talanta. 69, (2) 334–342. 2006.
- HIRSCH, R., *et al.*, **Occurrence of antibiotics in the aquatic environment,** The Science of the Total Environment 225; 109 – 118.1999.
- HOLTEN LÜTZHØFT H.C., B. HALLING-SØRENSEN, S.E. JØRGENSEN, **Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish farming,** Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36 ; 1–6. 1999.
- HONKOOP, P.J.C., LUTTIKHUIZEN, P.C., PIERSMA, T. **Experimentally extending the spawning season of a marine bivalve using temperature change and fluoxetine as synergistic triggers.** Mar. Ecol. Prog. Ser. 180, 297\_ 300. 1999.
- 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.
- INGERSLEV, F.; *et al.* ;**Chemosphere**, 44, 865. 2001.

- JOEL WEINBERGER II, REBECCA KLAPER. **Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow)** 77-83. 2014.
- JONES , K. C.; VOOGT, P. **Persistent organic pollutants (POPs): state of the science**. Environmental Pollution. V 100. p. 209-221, 1999.
- KIM, Y.; *et al.* **Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimeyidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea**. Environment International. 33. P 370-375, 2007.
- KWON, J.W., and ARMBRUST, K. L. **LABORATORY PERSISTENCE AND FATE OF FLUOXETINE IN AQUATIC ENVIRONMENTS**. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 25, No. 10, pp. 2561–2568, 2006
- LÄNGIN, A., *et al.* **Deactivation and transformation products in biodegradability testing of  $\beta$ -lactams amoxicillin and piperacillin**. Chemosphere 75, 347–354. 2009
- LANZKY P.F., B. HALLING-SØRENSEN, **The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms**, Chemosphere 35 ; 2553–2561. 1997.
- LI, D.; *et al.*; **Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river**. Water Research, v. 42, p. 307–317, 2008.
- LIU, J.L., WONG, M.H. **Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China**. Environ. Int. 59C, 208–224. 2013.
- MARANHO, L.,A; *et al.* **Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species** Environmental Research, v. 134, p. 353-365, 2014a.
- MARANHO, L.A. **Evaluación del riesgo ambiental de sedimentos marinos afectados por la contaminación de productos farmacéuticos: estudios en laboratorio e in situ**. Tese de Doutorado. Universidade de Cádiz. 2014b.
- MARANHO, L.A. ; DELVALLS, T.A. ; MARTÍN-DÍAZ, M.L. . **Assessing potential risks of wastewater discharges to benthic biota: An integrated approach to biomarker responses in clams (*Ruditapes philippinarum*) exposed under controlled conditions**. Marine Pollution Bulletin., v. 92, p. 11-24, 2015a.
- MARANHO, A. L.,. *et al.*, **Suitability of standardized acute toxicity tests for marine sediment assessment: pharmaceutical contamination**. Water, Air and Soil Pollution v. 226, p. 1-14, 2015b.
- MCKEON, D. M.; CALABRESE, J. P.; BISSONNETTE, G. K.; **Water Res.**, 29,1902. 1995.

- METCALFE, C.D., *et al.* **Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes.** Can. Environ. Toxicol. Chem. 22, 2881–2889. 2003.
- MIRANDA, C. D.; CASTILLO, G.; **Sci. Total Environ**, 224, 167. 1998.
- MULROY, A. **When the cure is problem.** Water Environmente Technology. 13(2): p. 32-36, 2001.
- NEWMAN, M. C.; UNGER, M. A. **Fundamentals of Ecotoxicology.** Second Edition. Lewis Publisher, 2002.
- O'SHEA, B. **Antidepressants: user and attitudes among consultant psychiatrists.** Br J Psycho - social Med. v 8. 1991.
- PAINTER, M.M., *et al.* **Antidepressants at environmentally relevant concentrations affect predator avoidance behavior of larval fathead minnows (*Pimephales promelas*).** Environ. Toxicol. Chem./ SETAC 28, 2677–2684. 2009.
- PEREIRA, C. D. S. **Biomarcadores de exposição, efeito e bioacumulação de xenobióticos em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) transplantados ao longo do litoral de São Paulo.** Tese (Doutorado). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- PÉRY A.R.R., *et al.* **Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates,** Chemosphere 73 ; 300–304. 2008.
- QUINN, B.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. **An investigation into acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarians, *Hydra attenuata*.** Science the Total Environment. 389. p. 306-314, 2008.
- RABOLLE, M.; SPLIID, N. H.; **Chemosphere**, 40, 715. 2000
- RAND, G. M.; WELLS, P.G.; McCARTY, L. S. **Introduction to Aquatic Ecotoxicology. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment.** Ecological Services Inc. North Palm Beach, Florida, 1995.
- SACHER, F., *et al.*, **Pharmaceuticals in groundwaters Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany,** Journal of Chromatography A, 938 ; 199–210 . 2001.
- SANTOS, D. R. A.; **Avaliação ecotoxicológica do fármaco cloridrato de fluoxetina e do surfactante dodecil sulfato de sódio quando submetidos a tratamento por radiação ionizante.** Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações, 2012.

- SANTOS, LÚCIA H.M.L.M, *et al.* **Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment**, Journal of Hazardous Materials 175 45–95, 2010.
- SCHULTZ, M.M., *et al.* **Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows**. *Aquat. Toxicol.* 104, 38–47. 2011.
- SIMM, M. **Avaliação da qualidade da água em amostras provenientes da Baía da Babitonga – SC, através de ensaios de embriotoxicidade e de exposição prolongada ao ar, utilizando mexilhão da espécie *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na fase larval e adulta**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Joinville – UNIVILLE. 107p. 2009.
- SMITH, P.; SAMUELSEN, O. B.; *Aquaculture*, 144, 17. 1996.
- TERNES, T. A.; *et al.* **Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – Investigations in Germany, Canada and Brazil**. *The Science of the Total Environment*. 225. p. 81-90, 1999.
- TREVES-BROWN, K.M. **Applied Fish Pharmacology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 2000.
- TRUHAUT, R. **Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1 : p. 151-173, 1977.
- UMBUZEIRO, G., A. **Protocolo para Derivação de Critérios de Qualidade da Água para Proteção da Vida Aquática no Brasil**, UNICAMPI , 2011.
- 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. p. 579, 1991.
- VEGA, G. S. **Evaluación Epidemiológica de Riesgos Causados por Agentes Químicos Ambientales**. *Toxicología V: genotoxicidad no al sistema reprodutor*, v. 11, Organización Mundial de la Salud, 1985.
- WEDDERBURN, J., *et al.* **The field application of cellular and physiological biomarkers in the mussel *Mytilus edulis* in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathology**. *Mar. Poll. Bull.*, 40(3):257-267. 2000.
- WU, R. S. S.; *Mar. Pollut. Bull.* 31, 159. 1995
- ZAGATTO, P. A. *Ecotoxicologia*. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP. Rima, p. 1-13, 2006.
- ZARONI, L. P.; *et al.* **Toxicity Testing with Embryos of Marine Mussels: Protocol Standardization for *Perna perna* (Linnaeus, 1758)**. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74: p. 793-800, 2005.

ZUCCATO, E., CASTIGLIONI, S., FANELLI, R.,. **Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment.** J. Hazard.Mater. 122, 205–209, 2005.

ZUCCATO, E.; *et al.* **Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic.** Environment. Journal of Hazardous Materials 179 1042–1048, 2010.