

Estudo ecotoxicológico de contaminantes de preocupação emergente
na baía de Santos, SP.

Fernando Sanzi Cortez

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências/Campus do Litoral Paulista (IB-CLP)

Estudo ecotoxicológico de contaminantes de preocupação emergente
na baía de Santos, SP.

Aluno: Fernando Sanzi Cortez

Orientador: Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus do Litoral Paulista, UNESP, para
obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biodiversidade de Ambientes
Costeiros.

**São Vicente - SP
2018**

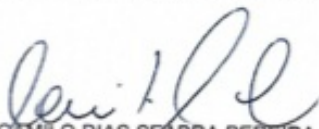
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estudo ecotoxicológico de contaminantes de preocupação emergente na baía de Santos, SP

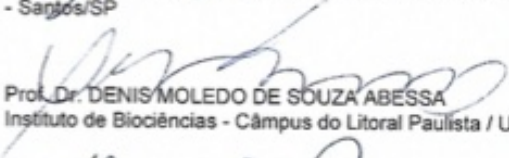
AUTOR: FERNANDO SANZI CORTEZ

ORIENTADOR: CAMILO DIAS SEABRA PEREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIODIVERSIDADE DE AMBIENTES COSTEIROS, área: Biodiversidade pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. CAMILO DIAS SEABRA PEREIRA
Departamento de Ciências do Mar / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - Campus Baixada Santista - Santos/SP



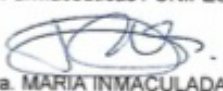
Prof. Dr. DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA
Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista / UNESP



Profa. Dra. LUCIANA LOPES GUIMARÃES
Farmácia 7 Universidade Santa Cecília



Prof. Dr. FÁBIO KUMMROW
Ciências Farmacêuticas / UNIFESP



Profa. Dra. MARIA INMACULADA RIBA LOPEZ
Química e Física - Facultad de Ciencias Del Mar y Ambientales / Universidade de Cádiz - ES

São Vicente, 14 de setembro de 2018

574.5222 Cortez, Fernando Sanzi
C 818 Estudo ecotoxicológico de contaminantes de preocupação
emergente na baía de Santos, SP. / Fernando Sanzi Cortez. -
São Vicente, 2018.
163 p.; il, figs., gráfs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências.
Orientador: Camilo Dias Seabra Pereira

1. Ecotoxicologia. 2. Poluição marinha. 3. Fármacos.
4. Água - contaminação. 5. Risco ambiental. I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da UNESP
Instituto de Biociências - Campus do Litoral Paulista

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha amada esposa, companheira de todos os momentos, mulher e mãe maravilhosa que me faz viver o amor que transborda a alma. Te amo muito...etc, infinito;

Ao meu amigo em fé, irmão e orientador Camilo. Sou extremamente abençoado de tê-lo junto comigo na empreitada da vida;

Aos meus amigos e irmãos Augusto, Aldo e Fábio os quais compartilho a benção de estar profissionalmente também em FAMÍLIA;

À todos os meus familiares pelo amor compartilhado e apoio fundamental;

À todos os professores, pesquisadores que na atual conjuntura de nosso país, de ínfimo investimento em pesquisas, conseguem com esforço hercúleo fazer ciência, gerar conhecimento e bons frutos para o avanço de uma sociedade mais justa e sustentável.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela renovação diária da gratidão e da fé. Meu coração transborda em gratidão e esse estudo é a expressão pessoal desse sentimento a Deus;

Ao meu orientador, Dr. Camilo Dias Seabra Pereira por todo apoio, total disponibilidade, incentivo e confiança na execução desse estudo;

À Universidade Santa Cecília - Unisanta, na pessoa do Dr. Antonio de Salles Penteado, pelo amplo apoio durante o curso;

Aos meus amigos Dr. Aldo Ramos Santos, Dr. Augusto Cesar e Dr. Fabio Hermes Pusceddu, vocês são incríveis e inspiradores ! Sou grato por fazer parte dessa família ! Obrigado por tudo !

Ao Dr. Denis Moledo de Souza Abessa por todo apoio, especialmente durante a realização das análises dos biomarcadores no NEPEA;

À Dra. Luciana Lopes Guimarães por toda dedicação, incentivo e explicações sobre as análises químicas; obrigado !

Aos amigos Lorena da Silva Souza e João Emanuel Almeida por terem vestido a camisa e me ajudarem demais nas análises laboratoriais ! Vocês foram demais ! Muito obrigado !

À Dra. Luciane Alves Maranhão pelo suporte durante as análises dos biomarcadores;

Aos colegas Caio Nobre, Beatriz Barbosa, Jonas Rosa, Mayana Fontes, alunos e alunas do NEPEA e do Lab. Ecotoxicologia da Unisanta, obrigado pelo grande apoio !

À minha esposa Renata, minha enteada Ninoca e toda família que também torcem e desejam o melhor para mim;

À todos os meus familiares, especialmente minha mãe que mesmo distante, tenho a certeza de seus pensamentos, desejos e orações a meu favor;

Esse é um trabalho realizado por muitas mãos, sou muito grato a todos que de alguma maneira contribuíram para sua execução.

MUITO OBRIGADO !

Formidável Rei dos Reis, cordeiro santo, justo e puro

Perfeito salvador, só Jesus cristo vive sempre !

(Rodolfo Abrantes)

DEUS É SEMPRE BOM !

Sumário

Lista de abreviações.....	XIV
Lista de tabelas.....	XVI
Lista de figuras.....	XVIII
Resumo.....	1
Capítulo 1 - Introdução.....	3
Capítulo 2 – Ecotoxicological effects of losartan on the brown mussel <i>Perna perna</i> and its occurrence in seawater from Santos Bay (Brazil).....	13
1 Introduction.....	14
2 Methods.....	16
2.1 Chemical.....	16
2.2 Study area and water sampling.....	16
2.3. Sample preparation and LC–MS/MS analysis.....	17
2.4 Mussel acclimation and maintenance conditions.....	19
2.5 Toxicity assays.....	19
2.5.1 Fertilization assay.....	19
2.5.2 Embryo-larval development assay.....	20
2.6 Biomarkers assay.....	20
2.6.1 Mussel exposure.....	20
2.6.2 Tissue extraction and storage.....	21
2.6.3 Neutral Red Retention Time assay (NRRT).....	21
2.6.4 Tissue preparation.....	21
2.6.5 Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD).....	22
2.6.6 Dibenzylfluorescein dealkylase (DBF).....	22
2.6.7 Glutathione S-transferase activity (GST).....	22
2.6.8 Glutathione peroxidase activity (GPx).....	23
2.6.9 DNA Damage.....	23
2.6.10 Lipid peroxidation.....	23
2.6.11 Cholinesterase (ChE).....	23
2.7 Statistical analysis.....	23
3 Results.....	24
3.1 Environmental concentrations.....	24

3.2 Fertilization rate and embryo-larval development assays.....	24
3.3 Biomarkers responses.....	25
4 Discussion.....	28
5 Conclusion.....	32
References.....	34
Capítulo 3 – O antidepressivo fluoxetina causa efeitos adversos em bivalve marinho tropical.....	40
1 Introdução.....	41
2 Material e Métodos.....	41
2.1 Fármaco de interesse.....	42
2.2 Área de estudo e amostragem.....	42
2.3 Preparação das amostras.....	43
2.4 Análise química (LC-MS/MS).....	44
2.5 Coleta e manutenção do organismo modelo - molusco bivalve <i>Perna perna</i>	45
2.6 Biomarcadores.....	46
2.6.1 Exposição dos organismos.....	46
2.6.2 Extração e armazenamento de tecidos.....	46
2.6.3 Preparação de tecidos brânquia e glândula digestiva.....	46
2.6.4 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD).....	47
2.6.5 Dibenzilfluoresceína (DBF).....	47
2.6.6 Glutathione-S-Transferase (GST).....	47
2.6.7 Glutathione peroxidase (GPx).....	48
2.6.8 Lipoperoxidação (LPO).....	48
2.6.9 Danos em DNA.....	48
2.6.10 Colinesterase (ChE).....	48
2.6.11 Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (VN).....	49
2.7 Análise dos dados.....	49
3 Resultados.....	49
3.1 Concentrações Ambientais.....	49
3.2 Biomarcadores.....	50
4 Discussão.....	53
5 Conclusão.....	58

Referências.....	59
Capítulo 4 – Metformina: Contaminação da baía de Santos e efeitos citogenotóxicos em concentrações ambientalmente relevantes.....	65
1 Introdução.....	66
2 Material e Métodos.....	67
2.1 Fármaco de interesse.....	67
2.2 Área de estudo e amostragem.....	68
2.3 Preparação das amostras.....	69
2.4 Análise química (LC-MS/MS).....	69
2.5 Coleta e manutenção do organismo modelo - molusco bivalve <i>Perna perna</i>	71
2.6 Biomarcadores.....	71
2.6.1 Exposição dos organismos.....	71
2.6.2 Extração e armazenamento de tecidos.....	71
2.6.3 Preparação de tecidos brânquia e glândula digestiva.....	72
2.6.4 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD).....	72
2.6.5 Dibenzilfluoresceína (DBF).....	72
2.6.6 Glutathione-S-Transferase (GST).....	73
2.6.7 Glutathione peroxidase (GPx).....	73
2.6.8 Lipoperoxidação (LPO).....	73
2.6.9 Danos em DNA.....	73
2.6.10 Colinesterase (ChE).....	74
2.6.11 Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (VN).....	74
2.7 Análise dos dados.....	74
3 Resultados.....	75
3.1 Concentrações Ambientais.....	75
3.2 Biomarcadores.....	75
4 Discussão.....	78
5 Conclusão.....	81
Referências.....	82
Capítulo 5 – Estudo ecotoxicológico com o hormônio sintético 17 α -etinilestradiol utilizando como organismo modelo o bivalve <i>Perna perna</i>.....	88

1 Introdução.....	89
2 Material e Métodos.....	90
2.1 Fármaco de interesse.....	90
2.2 Coleta e manutenção do organismo modelo - molusco bivalve <i>Perna perna</i>	91
2.3 Biomarcadores.....	91
2.3.1 Exposição dos organismos.....	91
2.3.2 Extração e armazenamento de tecidos.....	92
2.3.3 Preparação de tecidos brânquia e glândula digestiva.....	92
2.3.4 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD).....	92
2.3.5 Dibenzilfluoresceína (DBF).....	93
2.3.6 Glutathione-S-Transferase (GST).....	93
2.3.7 Glutathione peroxidase (GPx).....	93
2.3.8 Lipoperoxidação (LPO).....	93
2.3.9 Danos em DNA.....	94
2.3.10 Colinesterase (ChE).....	94
2.3.11 Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (VN).....	94
2.4 Análise dos dados.....	95
3 Resultados.....	95
3.1 Biomarcadores.....	95
4 Discussão.....	97
5 Conclusão.....	100
Referências.....	101
Capítulo 6 – Amoxicilina: Ocorrência na baía de Santos e efeitos sub-letais em mexilhões de cultivo.....	106
1 Introdução.....	107
2 Material e Métodos.....	109
2.1 Fármaco de interesse.....	109
2.2 Área de estudo e amostragem.....	109
2.3 Preparação das amostras.....	110
2.4 Análise química (LC-MS/MS).....	111
2.5 Coleta e manutenção do organismo modelo - molusco bivalve <i>Perna perna</i>	112

2.6 Biomarcadores.....	112
2.6.1 Exposição dos organismos.....	112
2.6.2 Extração e armazenamento de tecidos.....	113
2.6.3 Preparação de tecidos brânquia e glândula digestiva.....	113
2.6.4 Etoxirosorufina-O-deetilase (EROD).....	113
2.6.5 Dibenzilfluoresceína (DBF).....	114
2.6.6 Glutathione-S-Transferase (GST).....	114
2.6.7 Glutathione peroxidase (GPx).....	114
2.6.8 Lipoperoxidação (LPO).....	114
2.6.9 Danos em DNA.....	115
2.6.10 Colinesterase (ChE).....	115
2.6.11 Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (VN).....	115
2.7 Análise dos dados.....	116
3 Resultados.....	116
3.1 Concentrações Ambientais.....	116
3.2 Biomarcadores.....	116
4 Discussão.....	119
5 Conclusão.....	123
Referências.....	124
Capítulo 7 – Avaliação do risco ambiental do antimicrobiano triclosan em zonas costeiras.....	131
1 Introdução.....	132
2 Material e Métodos.....	133
2.1 Substância de interesse.....	133
2.2 Área de estudo e amostragem.....	134
2.3 Preparação das amostras.....	135
2.4 Análise química (LC-MS/MS).....	135
2.6 Ensaio de toxicidade.....	136
2.6.1 Coleta e cultivo dos organismos modelo - copépodo <i>Nitokra sp</i> e ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i>	136
2.6.2 Preparo das soluções-teste	137
2.6.3 Controle positivo com o solvente Dimetilsufóxido (DMSO).....	137

2.6.4 Ensaio para avaliação de efeito agudo (mortalidade) com <i>Nitokra sp</i> (Crustácea, Harpacticoida).....	137
2.6.5 Ensaio para avaliação de efeito agudo (fertilização) com <i>Lytechinus variegatus</i> (Echinodermata, Echinoidea).....	138
2.6.6 Ensaio para avaliação de efeito agudo (fertilização) com <i>Perna perna</i> (Molusco, Bivalve).....	138
2.6.7 Ensaio para avaliação de efeito crônico (sucesso reprodutivo) com <i>Nitokra sp</i> (Crustácea, Harpacticoida).....	138
2.6.8 Ensaio para avaliação de efeito crônico (embriolarval) de curta duração com <i>Lytechinus variegatus</i> (Echinodermata, Echinoidea).....	139
2.6.9 Ensaio para avaliação de efeito crônico (embriolarval) com o bivalve <i>Perna</i> <i>perna</i> (Molusco, Bivalve).....	139
2.7 Avaliação do risco ambiental em zona costeira.....	139
2.8 Análise dos dados.....	139
3 Resultados.....	140
3.1 Concentrações Ambientais.....	140
3.2 Ensaio de toxicidade.....	141
3.2.1 Controle do solvente DMSO.....	141
3.2.2 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito agudo com o copépodo <i>Nitokra</i> <i>sp</i> e com o ouriço-do-mar <i>L. variegatus</i>	141
3.2.3 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico com o copépodo <i>Nitokra sp</i> , com o ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i> e com o bivalve <i>Perna</i> <i>perna</i>	142
3.2.4 Avaliação do risco ambiental do TCS em zonas costeiras.....	142
4 Discussão.....	144
4.1 Ocorrência de TCS em água marinha.....	144
4.2 Efeitos biológicos adversos do TCS em organismos não-alvo.....	145
4.3 Avaliação do risco ambiental do TCS em zonas costeiras.....	147
5 Conclusões.....	149
Referências.....	151
Capítulo 8 – Conclusões	159
Apêndice.....	163

Lista de abreviações

AMOX - amoxicilina

ARA - do inglês, angiotensin receptor antagonist

ASTM - American Society for Testing and Materials

B - do inglês, bottom (fundo)

CE - do inglês, collision energy

ChE - colinesterase

CXP - do inglês, collision exit potential

CE - do inglês, collision energy

CXP - do inglês, collision exit potential

CEO (LOEC) - concentração de efeito observado

CENO (NOEC) - concentração de efeito não observado

CE50 - concentração efetiva

CL50 - concentração letal

DNA - ácido desoxirribonucleico (dano em DNA)

DBF - dibenzilfluoresceína

DP - do inglês, declustering potential

ETE - estação de tratamento de esgoto

EE2 - 17 α -etinilestradiol

EROD - etoxiresorufin O-deetilase

FDA - Food and Drug Administration

FLX - fluoxetina

GPx - glutational peroxidase

GST - glutational S-transferase

LMS - lysosomal membrane stability

LOD - em inglês, limit of detection

LOQ - limits of quantification

LPO - lipoperoxidação

LOS - losartan

MET - metformina

MIM - do inglês, multiple ion monitoring

MRM - do inglês, multiple reaction monitoring

NRRT - do inglês, neutral red retention time

NHANES - do inglês, The National Health and Nutrition Examination Surveys

NAPH - nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

Q1 - em inglês, first quadrupole

Q3 - do inglês, last quadrupole

RT - do inglês, retention time

S - do inglês, surface (superfície)

STP - do inglês, sewage treatment plant

VN - estabilidade da membrana lisossomal

WWTP - do inglês, wastewaters treatment plant

Lista de Tabelas

Capítulo 2	13
Table 1. Parameters of Multiple Reactions Monitoring for the positive ion mode, limit of detection, limit of quantification and retention time.....	18
Table 2. Environmental concentration of LOS in surface and bottom water samples (1-6 sampling stations) from Santos Bay.....	24
Table 3. Nominal and measured concentrations of LOS in fertilization and embryolarval assay (T0).....	25
Table 4. Nominal and measured concentrations of LOS (T0) in the experiments with biomarkers.....	25
Table 5. Toxicity assay with LOS and aquatic organisms of different trophic levels..	30
Capítulo 3	39
Tabela 1. Parâmetros MRM para o modo de íon positivo, limite de detecção, limite de quantificação e tempo de retenção.....	44
Tabela 2. Concentração ambiental de FLX em amostras de água superficial e de fundo (1-6 estações de amostragem) da Baía de Santos.....	49
Tabela 3. Concentrações nominais e medidas de FLX (T0) nos experimentos com biomarcadores.....	49
Capítulo 4	64
Tabela 1. Parâmetros MRM para o modo de íon positivo, limites de detecção, limites de quantificação e tempo de retenção.....	69
Tabela 2. Concentração ambiental de MET em amostras de água superficial e de fundo (1-6 estações de amostragem) da Baía de Santos.....	74
Tabela 3. Concentrações nominais e medidas de MET (T0) nos experimentos com biomarcadores.....	74
Capítulo 6	106
Tabela 1. Parâmetros MRM para o modo íon positivo, limite de detecção, limite de quantificação e tempo de retenção.....	111
Capítulo 7	131
Tabela 1. Parâmetros MRM para o modo íon negativo, limite de detecção, limite de quantificação e tempo de retenção.....	136

Tabela 2. Concentração ambiental do TCS em amostras de água superficial e de fundo (1-6 estações de amostragem) da Baía de Santos.....	141
Tabela 3. Resultados dos ensaios para avaliação de efeito agudo (mg/L).....	141
Tabela 4. Resultados dos ensaios para avaliação de efeito crônico (mg/L).....	142
Tabela 5. Risco ambiental do TCS em zonas costeiras.....	143

Lista de figuras

Capítulo 2	13
Figure 1. Sampling stations in Santos Bay (São Paulo, Brazil).....	16
Figure 2. Neutral Red Retention Time Assay (mean $\pm$ SE).....	26
Figure 3. Biomarker responses in gill tissues (mean $\pm$ SE).....	27
Figure 4. Biomarker responses in digestive gland (mean $\pm$ SE).....	28
Capítulo 3	39
Figura 1. Estrutura química do fármaco Fluoxetina.....	41
Figura 2. Baía de Santos e pontos de amostragem.....	42
Figura 3. Resultados obtidos pelos biomarcadores em brânquias de organismos expostos a fluoxetina.....	50
Figura 4. Resultados obtidos pelos biomarcadores em glândulas digestivas de organismos expostos a fluoxetina.....	51
Figura 5. Resultado do ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro.....	52
Capítulo 4	64
Figura 1. Estrutura química do fármaco Metformina.....	67
Figura 2. Pontos de amostragem na Baía de Santos.....	67
Figura 3. Resultados obtidos pelos biomarcadores em brânquias de organismos expostos a metformina.....	75
Figura 4. Resultados obtidos pelos biomarcadores em glândulas digestivas de organismos expostos a metformina.....	76
Figura 5. Resultado do ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro.....	77
Capítulo 5	87
Figura 1. Estrutura química do fármaco 17 α -etinilestradiol.....	90
Figura 2. Resultados obtidos pelos biomarcadores em brânquias de organismos expostos ao EE2.....	95
Figura 3. Resultados obtidos pelos biomarcadores em glândulas digestivas de organismos expostos a EE2.....	96
Figura 4. Resultado do ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro.....	97
Capítulo 6	106
Figura 1. Estrutura química do fármaco Amoxicilina.....	109

Figura 2. Baía de Santos e pontos de amostragem.....	110
Figura 3. Resultados obtidos pelos biomarcadores em brânquias de organismos expostos a amoxicilina.....	117
Figura 4. Resultados obtidos pelos biomarcadores em glândulas digestivas de organismos expostos a amoxicilina.....	118
Figura 5. Resultado do ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro.....	119
Capítulo 7	131
Figura 1. Estrutura química do antimicrobiano Triclosan.....	134
Figura 2. Baía de Santos e pontos de amostragem.....	134

RESUMO

O amplo uso de fármacos na medicina humana e veterinária tem resultado em problemas ambientais, uma vez que a ocorrência dessas substâncias em ecossistemas aquáticos têm sido demonstrada em regiões que recebem efluentes domésticos e industriais. Embora a ocorrência dessas substâncias no ambiente marinho e estuarino tenha sido amplamente observada, há poucos estudos que abordem a avaliação dos efeitos nocivos em organismos não-alvos, principalmente de áreas tropicais. Dada a importância de conhecer as concentrações ambientais de fármacos em zonas costeiras e estimar os efeitos biológicos adversos em organismos marinhos, o presente estudo visou identificar e quantificar por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS/MS) os fármacos losartan, fluoxetina, metformina, 17α -etinilestradiol, amoxicilina e o antimicrobiano triclosan em amostras de água coletadas na Baía de Santos (SP); avaliar as respostas metabólicas (fases I (etoxiresorufina-O-desetilase/ EROD; dibenzilfluoresceína/ DBF) e II (glutathione-S-transferase/ GST)) do processo de biotransformação; a atividade antioxidante (glutathione peroxidase/ GPx) e estimar os efeitos subletais (lipoperoxidação (LPO), dano em DNA, colinesterase (ChE) e estabilidade da membrana lisossomal (EML)) associados à exposição a essas substâncias (48 e 96 horas), nos tecidos brânquia, glândula digestiva e hemolinfa do molusco bivalve *Perna perna*. Com o antimicrobiano triclosan foi realizada uma avaliação de risco ambiental empregando dados de toxicidade com invertebrados marinhos. Todos os fármacos estudados foram detectados em amostras de água do mar da baía de Santos, com exceção do 17α -etinilestradiol e da amoxicilina. A investigação dos processos metabólicos envolvidos na biotransformação desses fármacos demonstraram, em geral, alterações na atividade de CYP 450 *like proteins*, GST e em alguns casos da atividade da GPx nas brânquias. Dentre os biomarcadores de efeito (LPO, DNA, ChE e EML), ocorreram variações de acordo com os fármacos estudados, porém a estabilidade da membrana lisossomal foi o método mais responsivo. A avaliação de risco ambiental realizada com o triclosan apontou risco variando de baixo a alto em função dos parâmetros empregados. Os resultados obtidos no presente estudo apontam para o risco relacionado à introdução de fármacos em zonas costeiras via efluente doméstico, e poderão contribuir com futuras regulamentações sobre o tema.

Palavras chave: Fármacos, antimicrobiano, biomarcadores, *Perna perna*, poluição marinha.

ABSTRACT

The widespread use of drugs in human and veterinary medicine has resulted in environmental problems, as the occurrence of these substances in aquatic ecosystems has been demonstrated in regions receiving domestic and industrial effluents. Although the occurrence of these substances in the marine and estuarine environment has been widely observed, there are few studies that approach the evaluation of harmful effects in non-target organisms, mainly in tropical areas. Given the importance of knowing the environmental concentrations of pharmaceuticals in coastal zones and the adverse biological effects on organisms of these regions, the present study aimed to identify and quantify by mass spectrometry (LC/MS/MS) the pharmaceuticals losartan, fluoxetine, metformin, 17 α -ethynylestradiol, amoxicillin and the antimicrobial triclosan in marine water samples collected in Santos Bay, evaluate the metabolic responses (phases I (ethoxyresorufin-O-deethylase/EROD, dibenzylfluorescein/DBF) and II (glutathione S-transferase/GST), antioxidant activity (glutathione peroxidase/GPx) and estimate sub-lethal effects (lipoperoxidation (LPO), DNA damage, cholinesterase (ChE) and lysosomal membrane stability (VN)) associated with the exposure to these substances (48 and 96 hours), in the gill tissues (BR), digestive gland (GD) and hemolymph of the marine bivalve *Perna perna*. With the antimicrobial triclosan, an environmental risk assessment was performed using marine invertebrate toxicity data. All pharmaceuticals compounds were detected in seawater samples, except for the hormone and the antibiotic. The investigation of the metabolic processes involved in the biotransformation of these drugs showed, in general, changes in the activity of CYP 450 like proteins, GST and in some cases of GPx activity in the gills. Among the biomarkers of effect, there were variations according to the drugs studied, but the stability of the lysosomal membrane was the most responsive method. The environmental risk assessment performed with triclosan indicated a risk ranging from low to high depending on the endpoints. The results obtained in the present study point to the risk related to the introduction of drugs in coastal zones through domestic effluent, and may contribute to future regulations on the subject.

Key words: Pharmaceuticals, antimicrobial, biomarkers, *Perna perna*, marine pollution.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O aumento na expectativa de vida da população possui relação direta com os avanços na área da medicina. No entanto, novos problemas de saúde ocorrem sob a forma de doenças em idosos, uma vez que doenças crônicas são mais comuns nessa faixa etária em relação às gerações mais jovens (Debaveye et al., 2016; Rensbrug et al., 2017). Nesse sentido, vale ressaltar outros aspectos centrais relacionados ao aumento da expectativa de vida, tais como os avanços na produção de fármacos com o desenvolvimento de novas moléculas, os quais tem contribuído com a redução da mortalidade, com o controle de doenças e com a melhoria da qualidade de vida da população.

De acordo com Busfield et al. (2010), nas últimas décadas houve um aumento expressivo no uso de medicamentos associado a fatores como o crescimento populacional global, às doenças crônicas, à acessibilidade no preço de aquisição de genéricos (Thomas & Depledge, 2015), além da distribuição gratuita na rede pública por meio de programas governamentais. Em 2020, o uso de medicamentos atingirá 4,5 trilhões de doses com mais de 50 % da população mundial consumindo mais de uma dose por pessoa por dia, isso significa um aumento de 24% no consumo, em relação ao ano de 2015 (IMS, 2015). O aumento na oferta de medicamentos representa um grande benefício para sociedade moderna. Por outro lado, é motivo de preocupação, uma vez que esse grupo de substâncias bioativas têm sido detectadas em ecossistemas naturais e reconhecidas como contaminantes de preocupação emergente (Oosterhuis et al., 2013; Bayen et al., 2013; Barreiros et al., 2016; Briones et al., 2016; Kafaei et al., 2018).

Os fármacos consumidos podem ser totalmente ou parcialmente metabolizados pelo organismo humano, são excretados e atingem as estações de tratamento de esgotos (ETE), sendo essa a principal via de entrada dessas substâncias para o ambiente aquático (Fatta-Kassinos et al., 2011). Nas ETE, os fármacos podem ser parcialmente degradados dependendo dos processos empregados (físico/químico/biológico) para tratamento das águas residuais e das características físico-químicas das moléculas (Evgenidou et al., 2015). Torna-se importante ressaltar que globalmente é possível que mais de 80% das águas residuais sejam lançados no ambiente aquático sem tratamento adequado e estimam-se que 245.000 km² do ambiente marinho sejam afetados pelo descarte de efluentes domésticos sem tratamento (UNESCO, 2017), fato que pode contribuir com concentrações significativas de fármacos para ecossistemas aquáticos.

Em uma dosagem terapêutica de 50% a 90% da substâncias podem ser excretadas inalteradas e, diferentemente de um evento pontual de poluição, são introduzidas

continuamente no ambiente aquático o que caracteriza a pseudo-persistência dessas substâncias (Mulroy, 2001; Mezzelani et al., 2018; Miller et al., 2018). Embora os fármacos sejam detectados no ambiente aquático em concentrações traço (ng/L), efeitos biológicos adversos em organismos não-alvo têm sido demonstrado para as diferentes classes de medicamentos existentes na literatura científica (Oliveira et al., 2013; Crago et al., 2016; Silva et al., 2016; Chen et al., 2017; Di Poi et al., 2018).

A preocupação com os problemas ambientais relacionados aos fármacos levou a União Européia, por meio da Diretiva 2013/39/UE, elaborar uma lista de vigilância que contempla os fármacos diclofenaco, 17α -etinilestradiol e o hormônio endógeno 17β -etinilestradiol, a qual determina o monitoramento das concentrações ambientais, bem como estimativas de efeitos biológicos adversos para gerenciamento adequado dos riscos ambientais (CE, 2013). Essa política vem ao encontro do conceito de ecofarmacovigilância (Daughton & Ruhoy, 2008), que propõe avaliação da destinação de sobra de medicamentos, monitoramento, avaliação de efeitos e ações para reduzir a introdução de fármacos no ambiente aquático com vistas a minimizar os impactos negativos sobre a saúde humana e ambiental.

Alguns aspectos relacionados aos efeitos biológicos adversos de fármacos em organismos não-alvo devem ser destacados. Classes de fármacos, como por exemplo a dos antimicrobianos, despertam atenção pelo fato de causarem resistência bacteriana e essa característica é uma das questões alvo nos estudos com contaminantes emergentes (Boxall et al., 2012). Esse problema tem desdobramentos relacionados também à saúde humana, uma vez que a carga global de doenças resistentes é projetada para se tornar uma das principais causas de mortalidade global (Taylor et al., 2014). Hormônios em geral e outros fármacos, como por exemplo o antidiabético metformina (MET), possuem a capacidade de agir como interferentes endócrinos causando efeitos nocivos em aspectos reprodutivos de espécies e feminização em peixes (Luzio et al., 2016; Niemuth & Klaper et al., 2015). Outro aspecto relevante sobre os efeitos tóxicos ocasionados por fármacos em concentrações traço, está relacionado com a possibilidade dessas substâncias bioativas encontrarem em um organismo não-alvo os receptores específicos para o mecanismo de ação. Esse é o caso do antidepressivo fluoxetina (FLX) que, uma vez no ambiente aquático, pode agir em espécies (moluscos, crustáceos, peixes) que possuem o receptor serotonina evolutivamente conservado. Com isso, efeitos adversos podem ocorrer alterando a fisiologia, o comportamento e o “status” geral de

saúde dos organismos em função à exposição a esse poluente psicoativo, inibidor da recaptação de serotonina (Fong & Ford, 2014).

Nesse contexto de consumo contínuo de medicamentos e a comprovada ocorrência no ambiente aquático, estudos ecotoxicológicos vêm sendo empregados como uma maneira abrangente de avaliar a toxicidade aguda e crônica em organismos não-alvo, e colaborar em avaliações de perigo e risco ambiental. No período de 1996 a 2009 cerca de 70% dos estudos de toxicidade avaliaram efeito agudo por meio de ensaios de toxicidade tradicionais (Santos et al., 2010). O emprego desses métodos possibilita a estimativa de concentrações de efeito na ordem de mg/L, ou seja, concentrações com mais de uma ordem de grandeza superiores às encontradas no ambiente aquático, contudo, não são ambientalmente realísticas. No entanto, de acordo com Mezzelani et al. (2018), a avaliação de efeitos sub-letais relacionados à exposição crônica é mais adequada para caracterizar o potencial tóxico dessas moléculas, detectadas constantemente em concentrações baixas. Assim, uma vez que os fármacos são projetados para cumprir uma função celular, inúmeros autores apontaram efeitos biológicos adversos em concentrações ambientalmente relevantes, demonstrando que essa abordagem é mais precisa para estimar os efeitos de substâncias bioativas, em relação aos ensaios agudos tradicionais (Cortez et al., 2012; Franzellitti et al., 2015; Pusceddu et al., 2018).

A utilização de biomarcadores de exposição e efeito possibilitam a obtenção de respostas moleculares, bioquímicas e celulares que se traduzem nos primeiros sinais de alterações significativas em um sistema biológico e, promovem a antecipação dos efeitos em níveis mais elevados de organização biológica (Cajaraville et al., 2000). Em alguns casos, esses métodos possibilitam estimar os efeitos de fármacos orientados pelo mecanismo de ação da substância de interesse (Franzellitti et al., 2014) e, com isso, estimar os efeitos biológicos precoces em concentrações mais baixas e ambientalmente realísticas.

Em um estudo sobre a ocorrência de fármacos e produtos de higiene e cuidados pessoais no ambiente, Boxall et al. (2012) apontaram a necessidade urgente de priorizar os estudos em mais de 4.000 fármacos de acordo com critérios tais como, moléculas mais prescritas em determinadas regiões, potencial tóxico, modo de ação e características da região geográfica. Além disso, há necessidade de ampliar a compreensão científica e o conhecimento sobre produtos farmacêuticos no ambiente aquático, uma vez que evidências científicas e informações sobre a ocorrência, destino e efeitos de poluentes emergentes são escassas, especialmente em países em desenvolvimento e no ambiente marinho, este muito menos investigado em relação a ambientes dulcícolas (UNESCO, 2017; Mezzelani et al., 2018).

Em âmbito nacional, o número de estudos que analisam a ocorrência de contaminantes de preocupação emergente ainda é limitado, com uma lista restrita de substâncias investigadas principalmente em efluentes e corpos d'água dulcícolas de áreas urbanizadas da região sudeste do país (Starling et al., 2018). Deve-se ressaltar nesse contexto a importância da Baixada Santista no cenário nacional, especialmente a região metropolitana densamente povoada dos municípios de Santos e São Vicente (população aproximada de 795.000 habitantes), que abriga um complexo industrial petroquímico; o maior porto da América Latina e turismo sazonal. Em Santos, 98 % do esgoto doméstico é coletado e direcionado para uma estação de pré-condicionamento e, sem receber tratamento primário, as águas residuais são lançadas na baía de Santos por meio de um emissário submarino distante 4,5 km da praia (CETESB, 2018).

Diante do exposto, algumas questões ainda devem ser respondidas no que diz respeito à ocorrência e aos efeitos biológicos adversos causados por contaminantes emergentes nessa zona costeira tropical, tais como: (i) Há ocorrência de fármacos e antimicrobianos na baía de Santos? (ii) Quais substâncias e em que concentrações? (iii) Observam-se efeitos biológicos adversos à biota em concentrações ambientalmente relevantes?

O presente estudo assume a hipótese de que há ocorrência desses contaminantes emergentes na baía de Santos em concentrações capazes de causar efeitos biológicos adversos, denotando risco ao ecossistema costeiro. Com o propósito de testar essa hipótese e, considerando os resultados de um *screening* realizado por Pereira et al. (2016), foram delineados os seguintes objetivos: (i) Identificar e quantificar os fármacos amoxicilina (AMOX), 17 α -etinilestradiol (EE2), losartan (LOS), metformina (MET), fluoxetina (FLX), bem como o antimicrobiano triclosan (TCS), em amostras de água do mar coletadas no entorno do emissário submarino de Santos e em um ponto mais distante do lançamento (referência); (ii) Caracterizar as respostas metabólicas (biotransformação fase I (EROD e DBF) e conjugação fase II (GST), sistema antioxidante (GPX) utilizando como organismo modelo o molusco bivalve *Perna perna* exposto aos diferentes fármacos; (iii) Avaliar os efeitos sub-letais (peroxidação lipídica (LPO), danos em DNA, atividade da colinesterase (ChE) e estabilidade da membrana lisossomal (EML) dos fármacos de interesse nos tecidos brânquia, glândula digestiva e hemolinfa do bivalve; (iv) Avaliar o risco ambiental do antimicrobiano TCS em zonas costeiras, considerando diferentes cenários de concentrações ambientais e dados de toxicidade com invertebrados marinhos.

A tese foi organizada em 8 capítulos, iniciando com uma introdução no Capítulo 1 que apresenta o problema central do estudo, as abordagens e métodos utilizados, bem como a organização da tese ao redor da hipótese proposta.

No capítulo 2 se avaliam os efeitos ecotoxicológicos e a ocorrência em água do mar do antihipertensivo losartan (artigo publicado na “Science of the Total Environment” - Anexo 1); o capítulo 3 aborda o antidepressivo fluoxetina quanto à contaminação da Baía de Santos e efeitos adversos; o capítulo 4 aborda a ocorrência em água do mar do antidiabético metformina e sua toxicidade para o bivalve marinho *Perna perna*; o capítulo 5 aborda os efeitos ecotoxicológicos do hormônio sintético 17α -etinilestradiol; enquanto o capítulo 6 aborda os efeitos ecotoxicológicos e a ocorrência em água do mar do antibiótico amoxicilina.

O capítulo 7 conduz uma avaliação de risco ambiental do antimicrobiano triclosan empregando dados de toxicidade com invertebrados marinhos (ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, copépodo *Nitokra sp* e bivalve *Perna perna*) obtidos em estudos pretéritos (Cortez, 2011; Cortez et al., 2012) e no presente estudo. Além disso, foram consideradas as concentrações ambientais de TCS em zonas costeiras de outras regiões, bem como as detectadas na baía de Santos.

Por fim o capítulo 8 apresenta as conclusões do estudo, bem como recomendações para melhor gestão do problema e futuros desafios nos estudos sobre o tema.

Referências

- Barreiros, L., Queiroz, J.F., Magalhães, L.M., Silva, A.M.T., Segundo, M.A. 2016. Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices - A review. *Microchem J*, vol 126, pp 243 - 262.
- Bayen, S., Zhang, H., Desai, M.M., Ooi, S.K., Kelly, B.C. 2013. Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore's marine environment: Influence of hydrodynamics and physical-chemical properties. *Environ Pollut*, vol 182, pp 1 - 8.
- Boxall, A.B., Rudd, M.A., Brooks, B.W., Caldwell, D.J., et al., 2012. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environ. Health Perspect*, vol 120, pp 1221-1229.
- Busfield, J. 2010. 'A pill for every ill': Explaining the expansion in medicine use. *Soc Sci Med*, vol 70, pp 934 - 941.
- Briones, R.M., Sarmah, A.K., Padhye, L.P. 2016. A global perspective on the use, occurrence, fate and effects of anti- diabetic drug metformin in natural and engineered ecosystems. *Environ Pollut*, pp 1-14. doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.040.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ*, v 247, pp 295-311.
- CE - European Commission. 2013. Directive 2013/39/UE of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013, amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official J. Eur. Union*, 24.8.2013 L 226/1.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, 2018. Relatório de qualidade das praias no estado de São Paulo. Série Relatórios (pp 198).
- Cortez, F.S., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Cesar, A. 2012. Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Environ Pollut*, vol 168, pp 145–150.

- Chen, Y., Li, M., Yuan, L., Xie, Y., Li, B., Xu, W., Meng, F., Wang, R. 2017. Growth, blood health, antioxidant status and immune response in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to α -ethinylestradiol (EE2). *Fish Shellfish Immunol*, vol 69, pp 1-5.
- Crago, J., Bui, C., Grewal, S., Schlenk, D. 2016. Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin. *Gen Comp Endocrinol*, vol 232, pp 185-190.
- Daughton, C.G., Ruhoy, I.S. 2008. The after life of drugs and the role of pharmacovigilance. *Drug Saf*, vol 31, pp 1069-1082.
- Debaveye, S., De Soete, W., Meester, S., Vandijck, D., Heirman, B., Kavanagh, S., Dewulf, Jo. 2016. Human health benefits and burdens of a pharmaceutical treatment: Discussion of a conceptual integrated approach. *Environ Res*, vol 144, pp 19-31.
- Di Poi, C., Costil, K., Bouchart, V., Halm-Lemeille, M-P. 2018. Toxicity assessment of five emerging pollutants, alone and in binary or ternary mixtures, towards three aquatic organisms. *Environ Sci Pollut Res*, vol 25, pp 6122–6134.
- Evgenidou, E.N., Konstantinou, I.K., Lambropoulou, D.A. 2015. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. *Sci Total Environ*, vol 505, pp 934 - 941.
- Fatta-Kassinos, D., Meric, S., Nikolaou, A. 2011. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal Bioanal Chem*, vol 399, pp 251–275.
- Fong, P.P., Ford, A.T. 2014. The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. *Aquat Toxicol*, vol 151, pp 4-13.
- Franzellitti, S., Burattia, S., Capolupoa, M., Du, B., Haddad, S.P., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., Fabbri, E. 2014. An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquat Toxicol*, v 151, pp 14-26.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Du, B., Haddad, S.P., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., Fabbri, E. 2015. A multibiomarker approach to explore interactive effects of propranolol and fluoxetine in marine mussels. *Environ Pollut*, vol 205, pp 60-69.

IMS - Institute for healthcare informatics. 2015. Global Medicines Use in 2020. Outlook and Implications. pp 43.

Kafaei, R., Papari, F., Seyedabadi, M., Sahebi, S., Tahmasebi, R., Ahmadi, M., Sorial, G.A., Asgari, G., Ramavandi, B. 2018. Occurrence, distribution, and potential sources of antibiotics pollution in the water-sediment of the northern coastline of the Persian Gulf, Iran. *Sci Total Environ*, vol 627, pp 703 - 712.

Kalache, A., Veras, R.P., Ramos, L.R. 1987. O envelhecimento da população mundial. Um desafio novo. *Rev Saúde públ*, vol 21, pp200-10.

Luzio, A., Santos, D., Fontáinhas-Fernandes, A.A., Monteiro, S.M., Coimbra, A.M. 2016. Effects of 17 α -ethinylestradiol at different water temperatures on zebrafish sex differentiation and gonad development. *Aquat Toxicol*, vol 174, pp 22-35.

Mezzelani, M., Gorbi, S., Regoli, F. 2018. Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms, *Marine Environmental Research*, doi: 10.1016/j.marenvres.2018.05.001.

Miller, T.H., Bury, N.R., Owen, S.F., MacRae, J.I., Barron, L.P. 2018. A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. *Environ Pollut*, vol 239, pp 129 - 146.

Mulroy, A. 2001. When the cure is the problem. *Water Environment Technology*, vol 13, pp 32-36.

Niemuth, N.J., Klaper, R.D. 2015. Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere*, vol 135, pp 38-45.

Oliveira, R., McDonough, S., Jessica C.L. Ladewig, J.C.L., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., Domingues, I. 2013. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Pharmacol*, vol 36, pp 903 - 912.

Oosterhuis, M., Sacher, F., Laak, T.L.T. 2013. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. *Sci Total Environ*, vol 442, pp 380-388.

Pusceddu, F.H., Choueri, R.B., Pereira, C.D.S., Cortez, F.S., Santos, D.R.A., Moreno, B.B., Santos, A.R., Rogero, J.R., Cesar, A. 2018. Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints. *Environ Pollut*, vol 232, pp 274 - 283.

Rensburg, A.J., Kotze, I., Lubbe, M.S., Cockeran, M. 2017. An elderly, urban population: Their experiences and expectations of pharmaceutical services in community pharmacies. *Health SA Gesondheid*, vol 22, pp 241-251.

Santos, L. H. M. L. M.; Araújo, A. N.; Fachini, A.; Pena, A.; Matos-Delerue, C.; Montenegro, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater*, vol 175, pp 45–95.

Silva, L.J.G., Martins, M.C., Pereira, A.M.P.T., Meisel, L.M., Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., Lino, C.M., Pena, A. 2016. Uptake, accumulation and metabolization of the antidepressant fluoxetine by *Mytilus galloprovincialis*. *Environ Pollut*, v 213, pp 432-437.

Starling, M.C.V.M., Amorim, C.C., Leão, M.M.D. 2018. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *J Hazard Mater*. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.043.

Taylor, J., Hafner, M., Yerushalmi, E., Smith, R., Bellasio, J., Vardavas, R., Bienkowska-Gibbs, T., Rubin, J. 2014. Estimating the economic costs of antimicrobial resistance - Model and Results. pp 87.

Thomas, F., Depledge, M. 2015. Medicine ‘misuse’: Implications for health and environmental sustainability. *Soc Sci Med*, vol 143, pp 81 - 87.

UNESCO - The United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. 2017. Emerging Pollutants in Water Series. Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region - A status report. International Initiative on Water Quality. pp 49.

UNESCO - The United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. 2017. The United Nations World Water Development Report. World Water Assessment Programme - Wastewater - The Untapped Resource. pp 12.

CAPÍTULO 2 - Ecotoxicological effects of losartan on the brown mussel *Perna perna* and its occurrence in seawater from Santos Bay (Brazil).

1 Introduction

The current number of elderly people in the world is estimated to be approximately 901 million (equivalent to 12.3% of the world population) but this number is continuously increasing. The scenario for 2050 is that the population of the elderly surpasses two billion, representing about 22% of the global population (Francisco, 2017). The increasing age of the population, stress, sedentary lifestyle, diet habits are directly associated with high blood pressure (Brazilian Archives of Cardiology, 2016), which makes the use of antihypertensive drugs more frequent. Nowadays it is estimated that over a billion adults worldwide are hypertensive and this figure is projected to reach 1.56 billion by 2025 (Jarari et al., 2016).

In this sense, the angiotensin II receptor antagonist class (ARA) has been widely prescribed (Bayer et al. 2014; Knopf & Grams, 2013). In number of prescriptions in United States of America (USA), antihypertensive drugs were classified as “Top 1” from 2011 to 2015 (IMS, 2016). Gu et al. (2012) performed a compilation of data from The National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES - USA) and verified that between 2001 and 2010 there was a 100% increase in the use of ARA. In this period the pharmaceuticals valsartan and losartan (LOS) were classified as the seventh and ninth most used antihypertensive drugs. LOS has also had a significant increase in the consumption in Brazil (23.34%) since 2010, emerging as the main hypertensive drug freely distributed throughout the public health network (Silva et al. 2017).

Taking into account the wide use of this therapeutic class, it is important to point out the wastewater as a main source of aquatic contamination due to the absence or inefficacy of wastewater treatment plants (WWTPs) (Larsson et al., 2007; Bayer et al., 2014). Gurke et al. (2015) determined for LOS a removal rate within a range of 50% to 80% in a sewage treatment plant (STP) including coarse and fine screens, a grit chamber with integrated fat trap, primary clarifiers, biological nitrogen removal and chemical precipitation of phosphorus. The occurrence of Losartan (LOS), an antihypertensive of the ARA class, has been detected in effluents of WWTPs, water supply and environmental matrices (Huerta-Fontela et al., 2011; Godoy et al., 2015a). In samples of a municipal effluent in India, which receives wastewater from bulk drug manufactures, LOS was detected in concentrations ranging from 2,400-2,500 µg/L (Larsson et al. 2007). A study carried in Portugal by Santos et al. (2013) revealed the occurrence of LOS in concentration ranging from 59 – 910 ng/L in hospital effluents while the maximum concentration detected in samples of a STP was 364 ng/L. Gros

et al. (2017) detected concentration of LOS varying from 705-980 ng/L in effluents of a medium scale WWTP in Sweden. In the same study, in a large scale WWTP, concentrations of LOS of 450 ng/L and 270 ng/L in influent and effluent samples were detected, respectively. Gurke et al. (2015) found a maximum concentration of 333 ng/L in municipal effluent samples in Germany. LOS was also detected in supply water (Spain) with a maximum concentration of 620 ng/L (Huerta-Fontela et al. 2011). In a Brazilian coastal region (São Paulo), Pereira et al. (2016) found LOS in concentrations ranging from 11.8 ng/L to 32 ng/L.

With regard to ecotoxicological studies of antihypertensives, Godoy et al., (2015a) pointed out a lack of data related to this therapeutic class, with 60% of the studies conducted until 2014 employing only acute standardized toxicity tests to assess biological effects. The same authors concluded that there was a need of more studies on the potential risk of antihypertensives in marine/estuarine ecosystems.

Filter feeding organisms with sessile habits and wide distribution have been used as sentinel organisms in ecotoxicological studies and marine biomonitoring (Gerges, 1994). In Brazil, the brown mussel *Perna perna* has been widely used both as seafood and as sentinel organisms in monitoring of anthropogenic pollution trends in coastal waters (Cortez, et al. 2012; Trevisan et al., 2014; Pereira et al. 2014; Ortega et al., 2018).

Based on previous studies, LOS monitoring in aquatic environments should be considered, taking into account factors such as (i) its occurrence in wastewater and environmental matrices; (ii) it is one of the antihypertensive drugs mostly used in different regions; (iii) increasing density of the elderly population leading to higher environmental concentrations in near future scenarios.

In this scenario of high consumption and previous detection of LOS in São Paulo coastal zone (Pereira et al. 2016), our study measured environmental concentrations of LOS in Santos Bay and employed ecotoxicological assays to elucidate metabolism and biological responses in different life stages of the brown mussel *Perna perna*.

2 Methods

2.1 Chemical

Standard of LOS 2-Butyl-4-chloro-1- $\{[2'-(1H\text{-tetrazol-5-yl})(1,1'\text{-biphenyl})-4\text{-yl]methyl}\}$ -1*H*-imidazole-5-methanol monopotassium salt, CAS number 124750-99-8, purity $\geq 98\%$) as well as all other chemicals employed in this study were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2 Study area and water sampling

The estuarine region of Santos and São Vicente is located in São Paulo coastal zone, southeastern Brazil. It has an industrial complex; the largest port in Latin America and it is a touristic and densely populated area. Wastewater is collected, preconditioned and discharged via submarine outfalls 4.5 km from the beach in Santos Bay (Figure 1).

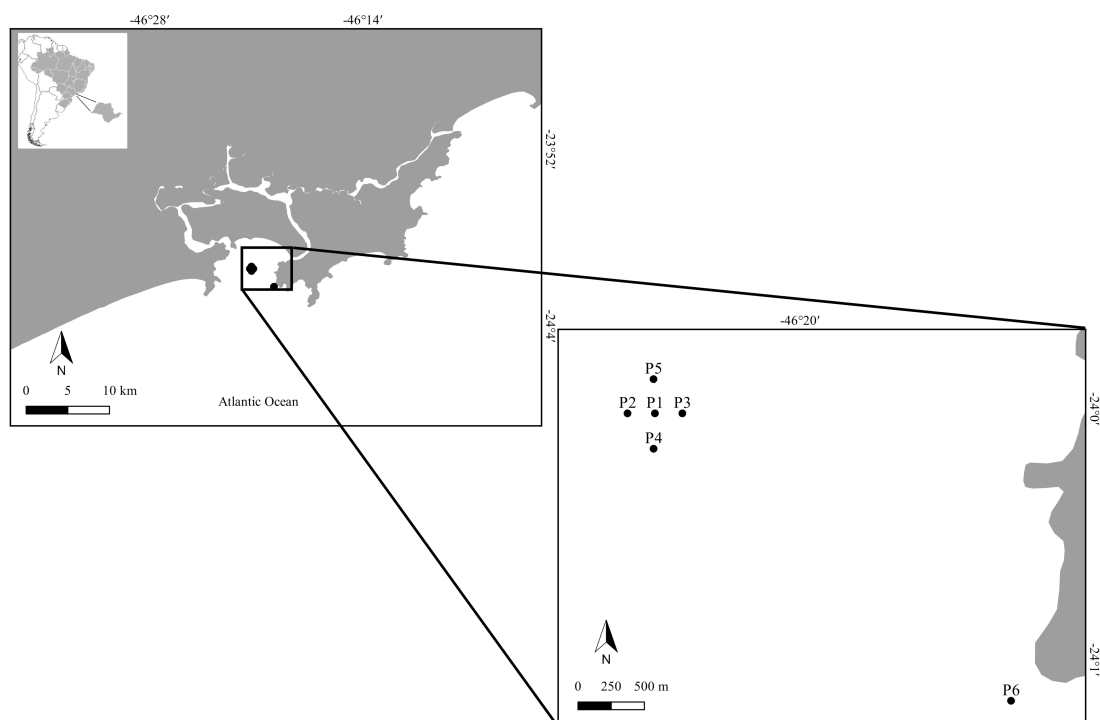


Figure 1. Sampling stations in Santos Bay (São Paulo, Brazil).

Water samples from the water column (surface — S and bottom — B) were collected each sampling station in March 2017, in the vicinities of the submarine sewage outfall in Santos Bay, considering the possibilities of effluent plume dispersion. The sampling stations were defined according to the study carried out by Pereira et al. (2016), except station 6. At each sampling station, three liters of S (-1m) and B water (-8m) were collected by using a Van Dorn bottle. The samples were placed into amber glass bottles previously cleaned with HNO₃, methanol and distilled water and then transported to the laboratory in an insulated box with ice (<6 °C) and placed in a freezer at -20 °C until processing time.

2.3. Sample preparation and LC–MS/MS analysis

Seawater samples (field) and water samples from bioassays (test solutions) were prepared according to Pereira et al. (2016). Briefly, the pH of each sample was adjusted to 7.0 ± 0.5 prior to extraction, using an HCl solution (1 M) and then samples were filtered through Whatman filter paper (GF/C diameter 47 mm, particle retention 1.2 µm, Merck, Darmstadt, Germany). The filters were washed with 2 mL of methanol and the methanol extract collected was added to the filtered sample. The samples were then submitted to solid phase extraction using Chromabond HR-X cartridges (3 mL, 200 mg, Macherey-Nagel, Düren, Germany). The SPE cartridges were pre-conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of Milli-Q water and the filtered samples (mixed with methanol extract) were loaded into the cartridges. After the samples were loaded, the cartridges were rinsed with 5 mL of Milli-Q water (2x) and then dried under vacuum for 30 minutes. The elution step was performed with 5 mL of acetone and twice with 5 mL of methanol. After elution, the samples were dried under nitrogen flow, resuspended in 1mL with a solution of water/acetonitrile (95:5, v/v) and filtered in a 0.45 µm filter (Millipore) before MS analysis.

LC–MS/MS analysis

For analyses of field seawater samples, 10 µL of each sample were analyzed by an HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, CA, USA) combined with a 3200 QTRAP hybrid triple quadrupole/LIT (linear ion trap) mass spectrometer ABSciex, Ontario (Canada). Seawater samples were analyzed by an Agilent Eclipse XDB-C18 4.6 × 50 mm, 1.8 µm column at 25 °C, and the mobile phase was in 0.1% formic acid (Sigma-Aldrich LC–MS

Grade) in water (solvent A) and acetonitrile (J.T. Baker LC–MS Grade) (solvent B). The mobile phase used in the analysis was 0.1% formic acid (Sigma-Aldrich LC–MS Grade) in water (solvent A) and acetonitrile (J.T. Baker LC–MS Grade) (solvent B). A linear gradient of 0.7 ml·min⁻¹ was used, starting with a mixture of 95% solvent A and 5% solvent B. The solvent A percentage was decreased linearly from 95% to 5% over the course of 5 min and this condition was maintained for 1 min. The mixture was then returned to the initial conditions over the course of 2 min, as described in Pereira et al., (2016). LOS was detected and quantified using ESI ionization (positive mode) in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode (Table 1), according Pereira et al., (2016). The ion source parameters were (i) curtain gas - 20 a.u; (ii) collision gas - 8 a.u; (iii) ion spray voltage - 5500; (iv) source gas temperature - 650 °C; (v) ion source gas 1 - 45 a.u; (vi) ion source gas 2 - 65 a.u. A matrix-matched calibration curve was employed, as described by Wille et al. (2010).

Table 1. Parameters of Multiple Reactions Monitoring for the positive ion mode, limit of detection, limit of quantification and retention time.

Compounds	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	RT (min.)
Losartan	423.2	207.2	21	31	6	0.01	0.04	4.84
		405.2	21	17	4			

Q1 (first quadrupole); Q3 (last quadrupole); DP (Declustering potential); CE (Collision Energy); CXP (Collision Exit Potential); LOD (Limits of detection); LOQ (Limits of quantification); RT (Retention Time); MIM (Multiple ion monitoring). In Q3, in the upper cell is the quantifier ion and in the lower cell is the qualifier ion.

For determining the LOS concentration in the test solutions from bioassays, 1L of the spiked water was collected at the beginning of the experiment, then the same procedures adopted for the field seawater samples were applied, and mass spectrometry analyses were performed using a Varian 310 Triple-Quadrupole mass spectrometry (Varian Inc., Walnut Creek, CA) with an ESI source (ESI-MS), by direct infusion. Data acquisition was controlled with Varian MS Workstation version 6.9 (Varian Inc.). Sample analysis was carried out in positive ESI mode with a needle voltage of 20kV. The capillary temperature was 200 °C, the drying gas pressure was 20 psi and the nebulizing gas pressure was 40 psi. LOS was detected and quantified using Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode, with the selection of a precursor ion (423.2 m/z) and two ion products to quantify and qualify LOS (207.2 and 405.2

m/z, respectively). A matrix-matched calibration curve was employed, as described by Wille et al. (2010).

2.4 Mussel acclimation and maintenance conditions

Adult mussels (average size 6.2 ± 1.3 cm) were purchased from a mussel farming located in Cocanha Beach (Caraguatatuba, SP, Brazil), due to its good environmental quality, where no water or sediment contamination have been reported by the State Environmental Agency (CETESB, 2016). The organisms were acclimatized for one week (300 L tank), receiving food supply (microalgae), and kept in tanks under constant temperature ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), aeration and filtration system.

2.5 Toxicity assays

2.5.1 Fertilization assay

Fertilization assay was performed following USEPA protocol (1991) adapted to *Perna perna* according to Zaroni et al. (2005). The gametes (eggs and sperm) were obtained by thermal stimulation (from 10°C to 30°C) of 20 individuals during 30 minutes. As soon as the organisms started releasing the gametes, they were removed from the tray to prevent fertilization. The gametes from 3 males and 3 females were collected separately and transferred to glass beakers.

A stock solution of 1000 mg/L was prepared in filtered seawater (0.22 μm membrane) and from this solution all the LOS tested concentrations were prepared. The sperm was exposed to concentrations of 31.25; 62.5; 125; 250 and 500 mg/L for 60 min, in quadruplicate. After this period, a suspension containing approximately 2000 ovules was added to the test recipients. Forty minutes after adding the eggs, the assay was finished by adding 0.5 mL of formaldehyde in each replicate. The first 100 eggs from each replicate were analyzed and fertilization was identified by observation of the occurrence of the membrane of fertilization or first cellular divisions. The results were expressed by the concentration that inhibited the fertilization rate in 50% of exposed organisms (IC50; 1 h).

2.5.2 Embryo-larval development assay

In order to assess the embryolarval development rate in mussels zygotes exposed to LOS, experiments were performed according to the protocol recommended by ASTM (1992) for mussels, with minor adaptations proposed by Zaroni et al. (2005) concerning salinity, which was elevated to 35 ± 1 ppm. Twenty adult individuals were induced to spawn by thermal stimulation. The gametes from 3 males and 3 females were collected separately and transferred to glass beakers. The fertilization was obtained by adding 2 mL of sperm solution to the 200 mL of ovules solution. The rate of fertilized eggs was estimated with the support of Sedgwick-Rafter chamber, and about 500 embryos were transferred to glass tubes containing different nominal concentrations of LOS (5; 10; 25; 50; 75 and 100 mg/L), for a period of 48 h at a temperature of 25° C and salinity of 35 ppm.

After the exposure period, the assay was finished by adding 0.5 mL of formaldehyde, and the first 100 larvae were analyzed for each replicate. Larvae developed to D-phase were considered normal and a mean percentage of normal development was obtained for each tested concentration. Thereafter were calculated: (i) the concentration of LOS that caused inhibition of the development of the embryos to 50% of the exposed organisms (IC₅₀; 48 h); (ii) the highest concentration tested of LOS that did not cause adverse biological effects on exposed organisms - “NOEC” (No Observable Effect Concentration); and (iii) the lowest LOS concentration tested that caused significant adverse biological effects on exposed organisms - “LOEC” (Lowest Observable Effect Concentration).

2.6 Biomarkers assay

2.6.1 Mussel exposure

The mussels were acclimatized for one week to clean seawater under controlled conditions. After this period, the organisms (n=21) were exposed in aquaria with different concentrations of LOS (30; 300 and 3000 ng/L) and water control, in triplicate, for 96 hours. These concentrations were set according to studies that detected LOS in effluents and surface waters.

In each replicate of all treatments, 7 organisms were exposed in each aquarium containing 10L of the test solution. Since LOS has been considered a stable molecule with low hydrolysis and biodegradation process (FDA 2002), controls and test solutions were

renewed each 48 hour. The physico-chemical parameters were controlled during the experiment without significant changes (salinity 35 ppm, dissolved oxygen $8 \pm 0,5$ mg/L, pH 8.3-8.5). The natural seawater used in the assay was filtered through a membrane of 200 μ m in order to filter higher particulates and maintain a food supply (phytoplankton) because during the experiment no other type of food was provided.

2.6.2 Tissue extraction and storage

The hemolymph, gill and digestive gland tissues were extracted for analysis at T0, T48h and T96h. Organisms were removed from each replicate of the different treatments, totaling 10 mussels for T48h and 10 mussels for T96h. Immediately after removal of the hemolymph, the slides were prepared for analysis of the lysosomal membrane stability (LMS). After this procedure, gills and digestive glands were dissected, separated into microtubes and stocked in ultrafreezer (-80°C) until the biomarker analyses were carried out.

2.6.3 Neutral Red Retention Time assay (NRRT)

NRRT assay was performed following the method described by Lowe et al. (1994) to assess the lysosomal membrane stability (LMS). The mussels were removed from the aquariums and with the aid of a syringe containing physiological saline solution (pH 7.3) 40 μ L of hemolymph from each organism was withdrawn and placed on glass slides, which were transferred to a dark and humid chamber for 15 minutes to promote cell attachment. Then, the excess liquid was removed and 40 μ L of the neutral red dye (NR) were added into all the slides. After another 15 minutes of incubation the slides were analyzed periodically (every 15 min). The endpoint was the time when at least 50% of the examined cells by optical microscopy (400 $\times$) exhibited dye loss from the lysosomes to the cytosol or structural abnormalities.

2.6.4 Tissue preparation

Gills and digestive glands from each organism were defrosted on ice and homogenized with 4 times the volume of 100 mM NaCl buffer, 25 mM HEPES-NaOH, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, pH 7.5, in a homogenizer (Tissue Tearor). After homogenization, the extract was

centrifuged at 4 °C at 15,000 g for 20 minutes, thus obtaining the supernatant fraction (15,000 g) where the activities of CYP450 like (Ethoxyresorufin O-deethylase - EROD and Dibenzylfluorescein dealkylase - DBF), Glutathione-S-transferase (GST), Glutathione peroxidase (GPX), Cholinesterase (ChE) were analyzed, as well as the concentration of proteins in the cytoplasmic cell fraction, according to the method of Bradford (1976). An aliquot of homogenized tissue was separated for lipoperoxidation (LPO) and DNA damage analyzes, and the protein concentration in this aliquot was also evaluated by the method of Bradford (1976).

2.6.5 Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD)

The EROD activity was evaluated by the adapted test of Gagné and Blaise (1993). The transformation of 7-Hydroxyresorufin in resorufin (EROD activity) was determined fluorometrically using 520 nm (excitation) and 590 nm (emission) filters. The determination of 7-hydroxyresorufin in the samples was performed using a standard calibration curve of 7-hydroxyresorufin. The results were expressed as pmol/min/mg protein.

2.6.6 Dibenzylfluorescein dealkylase (DBF)

The determination of DBF activity was performed according the method described by Gagné et al. (2007) using as substrate 10 µM dibenzylfluorescein and incubated with a solution of 1 mM NADPH in a test solution (50 mM NaCl containing 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4). The fluorescence of the sample was measured with a 485 nm excitation and 516 nm emission filter. Results were expressed in pmol/min/mg protein.

2.6.7 Glutathione S-transferase activity (GST)

The method used to determine GST activity was adapted from Mc Farland et al. (1999). The activity was analyzed using 42 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 1 mM GSH as substrate and measured at 340 nm every 30 seconds for 3 minutes. Results were expressed as OD/min/mg proteins.

2.6.8 Glutathione peroxidase activity (GPx)

The methodology used to determine GPx activity was developed according to the method proposed by Mc Farland et al. (1999). GPx activity was measured at 340 nm every 2 minutes for 10 minutes, using 1 mM cumene hydroperoxide as the substrate. The decrease in absorbance of NADPH measured at 340 nm during the oxidation of NADPH to NADP⁺ was indicative of GPx activity. Results were expressed as nmol/ min / mg protein.

2.6.9 DNA Damage

DNA damage was evaluated by the Olive (1988) alkaline precipitation assay, using fluorescence to quantify traces of DNA (Gagné & Blaise, 1993). Fluorescence was measured using 360 nm filter (excitation) and 450 nm (emission) and a salmon sperm genomic DNA standard (Sigma) was employed for calibration. The results were expressed in µg/mg protein.

2.6.10 Lipid peroxidation

Analysis of lipid peroxidation was performed by the thiobarbituric acid method (Wills, 1987). This determination was employed by fluorescence using 516 nm (excitation) and 600 nm (emission). The tetramethoxypropane standards were prepared in homogenization solution. The results were expressed in µM TBARs / mg proteins.

2.6.11 Cholinesterase (ChE)

The analysis of the ChE activities of the gills and digestive glands were performed according to the method described by Ellman et al. (1961) using a concentration of 0.3 mM acetylcholine iodide in the enzyme assay. The variation of absorbance per minute at 412 nm at 25°C was recorded in a spectrophotometer. The results were expressed in µmol DNTB / min. / mg protein.

2.7 Statistical analysis

For the fertilization assay, an EC₅₀ was calculated by Trimmed Spearman-Kärber. The linear interpolation method was used to calculate the IC₅₀ (48 h) for the embryo-larval

development assay. T-Test was employed to assess differences between T0 and water controls. Since no difference was detected, water controls were used as references for 48h and 96h. *One-way* ANOVA followed by the Dunnett's test were used to identify the concentrations significantly different of water controls. Statistical differences were considered significant when $p \leq 0.05$. The software Prism v.7 was employed for ANOVA and *pos hoc* analysis.

3 Results

3.1 Environmental concentrations

Table 2 shows the environmental concentrations of LOS. This pharmaceutical compound was detected in all sampling stations including the reference area.

Table 2. Environmental concentration of LOS in surface and bottom water samples (1-6 sampling stations) from Santos Bay.

LOS concentration (ng/L)						
	1	2	3	4	5	6
Surface	8.70	3.89	2.10	0.295	3.62	0.60
Bottom	2.46	1.59	1.50	1.18	1.07	1.79

3.2 Fertilization rate and embryo-larval development assays

The measured concentrations of LOS at the beginning of the exposure experiment for the fertilization and embryo-larval assays (T0) are shown in Table 3.

Table 3. Nominal and measured concentrations of LOS in fertilization and embryo-larval assays (T0).

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)
0	<LOD
5.0	4.72
25.0	23.43
75.0	71.13
125.0	118.36
250.0	232.92
500.0	469.36

* LOD - Limits of detection

The IC50 1h for the rate of fertilization of *P. perna* was calculated as 219.2 mg/L, with a confidence interval ranging from 208.3 to 231.8 mg/L. The normal embryo-larval development of 50% exposed zygotes was inhibited in the concentration of 84.6 mg/L (IC50 48h) with a confidence interval ranging from 62.8 to 87.5 mg/L, while NOEC and LOEC were 50 mg/L and 75 mg/L, respectively.

3.3 Biomarkers responses

The nominal and the measured concentrations of LOS at time T=0 are reported in Table 4. The nominal concentrations were similar to those determined at T=0.

Table 4. Nominal and measured concentrations of LOS (T0) in the experiments with biomarkers.

Nominal concentration (ng/L)	Measured concentration (ng/L)
30	27.3
300	276.9
3000	2811.2

The lysosomal membrane stability (LMS) showed a concentration-time response, with a significant decrease in the NR retention time after exposure to 3000 ng/L in 48h, and down to 300 ng/L after 96h (Figure 2).

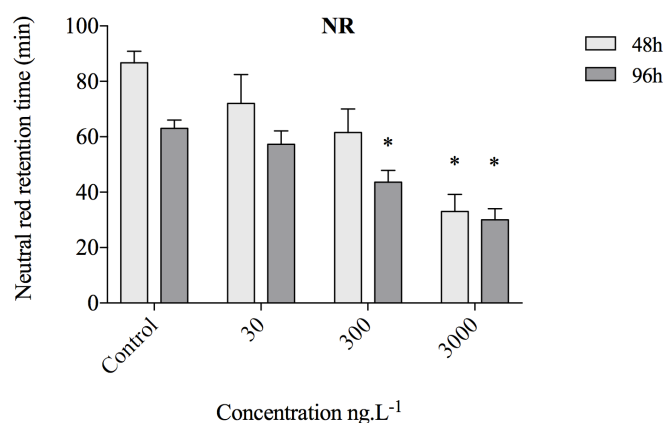


Figure 2. Neutral Red Retention Time Assay (mean $\pm$ SE). An asterisk indicates a significant difference from the control (ANOVA - Dunnett's, $p < 0.05$).

The activities of EROD, DBF, GST, GPX and ChE as well as the DNA damage and LPO in the gill tissue are shown in Figure 3.

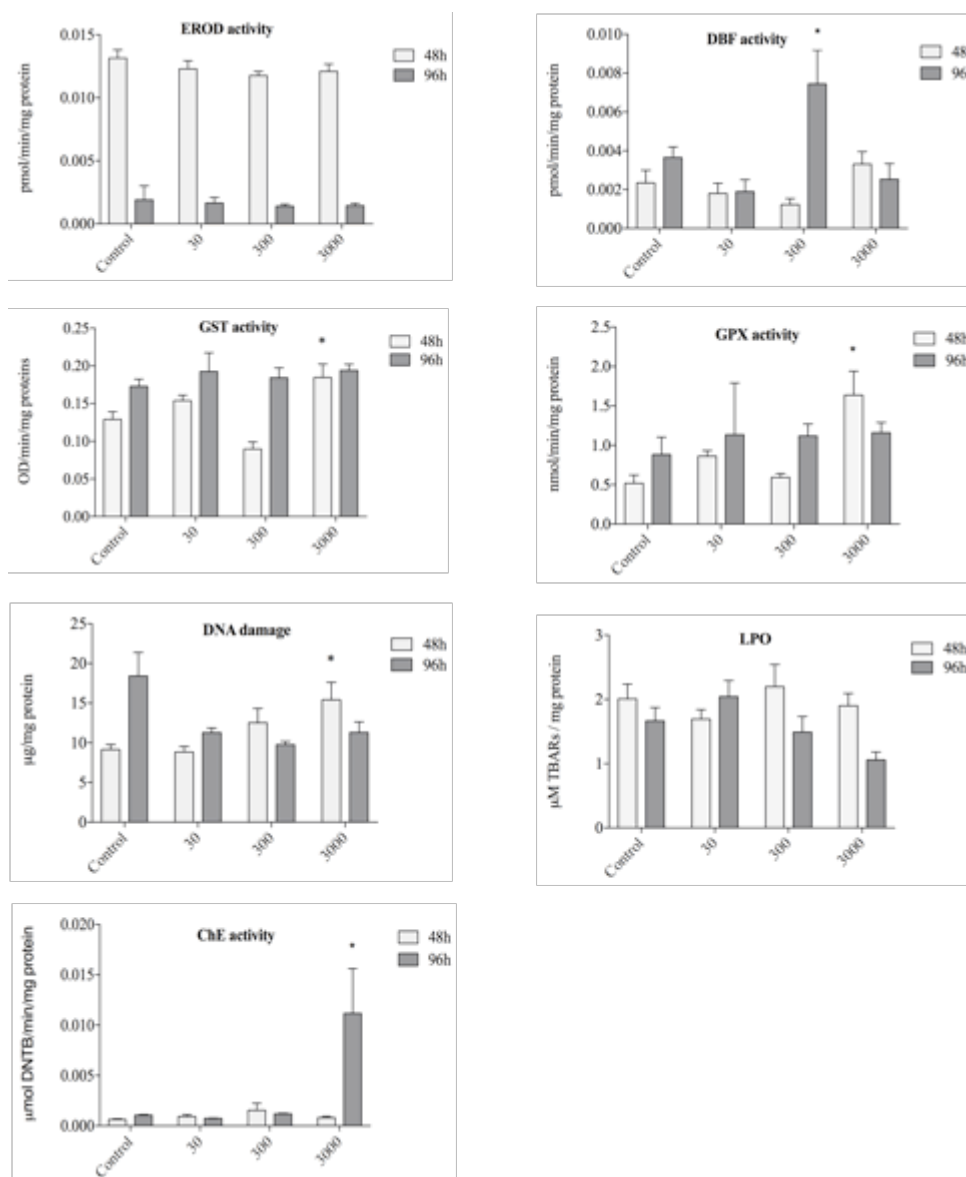


Figure 3. Biomarker responses in gill tissues (mean $\pm$ SE). An asterisk indicates a significant difference from the control (ANOVA - Dunnett's, $p < 0.05$).

When gills are considered, the activity of EROD and LPO did not show significant difference in relation to the control in any of the analyzed times. With regard to the activity of the DBF, only the concentration of 300 ng/L showed significant difference, with induction of the activity after 96h. Significant increase of GST, GPx activities, as well as DNA primary damages were found after 48h exposure to 3000 ng/L. With regard to the ChE, an induction of the activity of this enzyme in the concentration of 3000 ng/L at 96h of exposure was observed.

The activities of EROD, DBF, GST, GPX and ChE as well as the DNA damage and LPO in the digestive glands are shown in Figure 4. Significant differences were only detected to EROD (inhibition of activity) in mussels exposed to 300 ng/L and 3000 ng/L after 96 h.

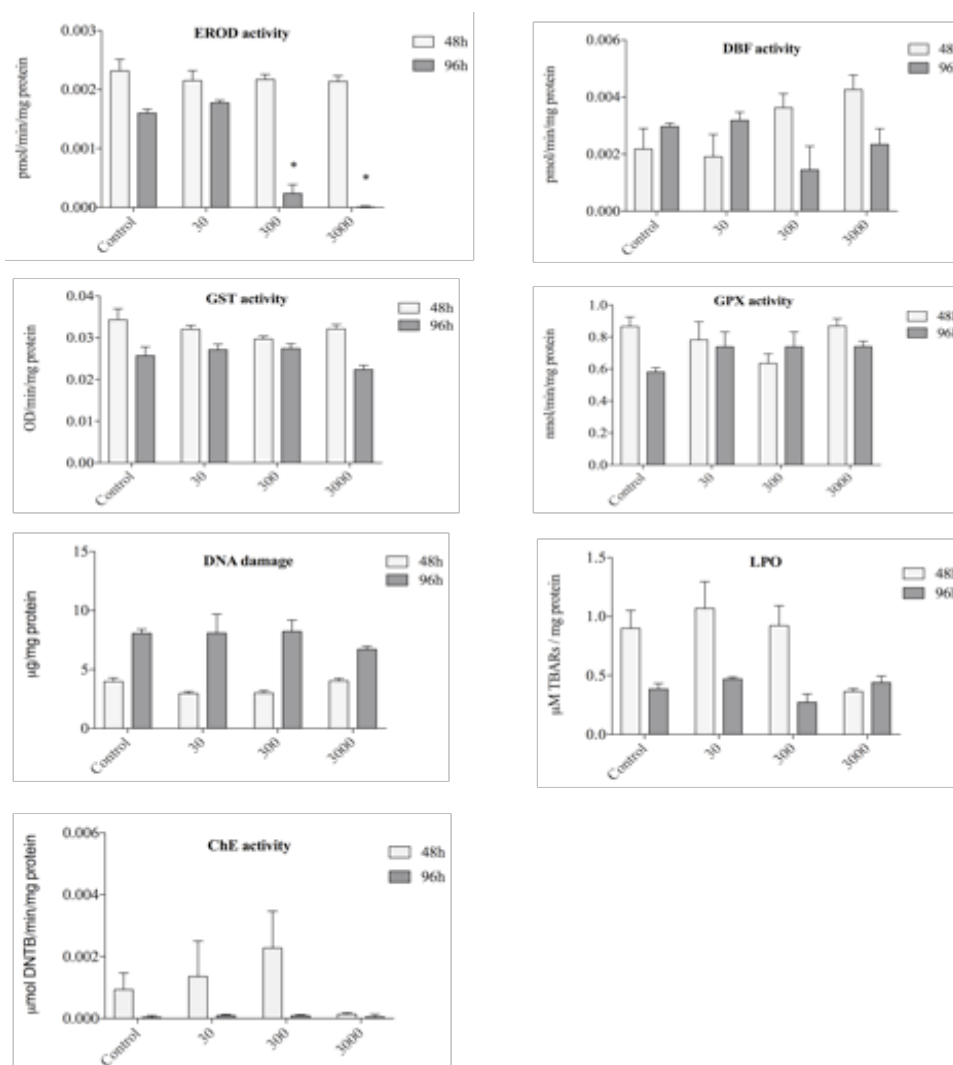


Figure 4. Biomarker responses in digestive gland (mean $\pm$ SE). An asterisk indicates a significant difference from the control (ANOVA - Dunnett's, $p < 0.05$).

4 Discussion

The pharmaceuticals represent a major group of emerging pollutants, which have been found in freshwater and marine environments (UNESCO 2017), representing a global challenge to water quality in terms of environmental status and human supply. Their

occurrence in the aquatic compartment leads to the need of knowledge about possible harmful effects of this class of substances on the biota.

LOS was quantified in different rivers of the Iberian Peninsula in a concentration ranging from 0.17 ng/L to 220.63 ng/L (Osorio et al. 2016). In the marine environment, Moreno-González et al. (2015) detected concentrations of 104 ng/L and 6.47 ng/g in samples of water and sediment from the Spanish coast, respectively. In a tropical coastal zone (Santos Bay, Brazil) LOS concentrations varied from 11.8 ng/L to 32 ng/L in marine water (Pereira et al., 2016). In the present study, the concentrations of LOS detected in surface and bottom samples ranged from 0.29 ng/L to 8.70 ng/L.

These concentrations were lower than those reported in the study performed by Pereira et al. (2016); however, these authors detected LOS only in 30% of samples collected three years before, whereas the present study has found LOS in 100% of samples, including the farthest station of the effluent discharged (station #6). Gros et al. (2012) also detected LOS in marine surface water (Spain) in a similar range found in the present study. The frequent occurrence of this antihypertensive in Santos bay could be related to aging population, which according Bersusa et al. (2013), 79.3% of the hypertensive people in Santos are over 40 years old, and according to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE, 2010), the cities of Santos and São Vicente make up 82.3% of the population at this age group.

With regard to adverse biological effects, we have employed standardized ecotoxicology assays and a suite of biomarkers responses of a marine invertebrate. *P. perna* mussel is considered a key species in Brazilian rocky shores and broadly cultivated for human consumption. The results obtained in the fertilization and embryo-larval assays fit into the same order of magnitude (mg/L) in relation to the previous studies (Table 5).

Table 5. Toxicity assays with LOS and aquatic organisms of different trophic levels.

Losartan					
Species	Endpoint	LC50/EC50 mg/L	NOEC mg/L	LOEC mg/L	References
<i>Daphnia sp.</i>		331	80	nd	
<i>Pimephales promelas</i>	Lethal effects	> 1000	100	nd	FDA (2002)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		> 929	> 929	nd	
<i>S. capricornutum</i>	Cell growth	nd	143	nd	
	Growth rate	no data	0.78	1.56	
<i>Lemna minor</i>	Frond number	63.7	nd	nd	Godoy et al. (2015b)
	Total frond area	64.6	nd	nd	
	Fresh weight	76.9	nd	nd	
<i>Lytechinus variegatus</i>	Embryo-larval development	nd	50	70	Yamamoto et al. (2014)

* nd - no data

The bivalve *Perna perna* presented values of NOEC (50 mg/L) and LOEC (75 mg/L) similar to those found in a study employing the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Yamamoto et al., 2014). Considering all the previous studies, it is possible to note that the aquatic macrophyte *Lemna minor* shows a relatively higher sensitivity to LOS. Another antihypertensive pharmaceutical of the “sartans” group (Valsartan) has been found in the aquatic environment (Klosterhaus et al. 2013; Bayer et al. 2014). Bayer et al. (2014) found EC50 (72h) of > 115 mg/L and NOEC of 85 mg/L to microalgae *Desmodesmus subspicatus* exposed to Valsartan. In the same study effect concentrations for the fish *Oncorhynchus mykiss* and for *Daphnia magna* of > 100 mg/L and > 580 mg/L, respectively, were reported. Using the sea urchin *Lytechinus variegatus*, Yamamoto et al. (2014) conducted a study with Valsartan and observed NOEC of 12.5 mg/L and LOEC of 25 mg/L. This author related the higher Log K_{ow} of Valsartan (3.65) to its higher toxicity when compared to LOS (Log K_{ow}

1.19), considering that such property determines a higher capacity to bioaccumulate and reach target organs.

The data obtained through the chemical analysis to determine the real concentrations of LOS in the biomarkers assays were similar to the nominal concentrations. Thus, the nominal concentrations were employed to calculate NOEC and LOEC.

Biomarker responses shed light on the metabolism and sub-lethal effects of the antihypertensive LOS in a non-target marine organism. The activity of DBF was induced in the gills after 96h of exposure at 300 ng/L, whereas GST was induced in gills of mussels exposed to 3000 ng/L after 48 h. The metabolism of this pharmaceutical in vertebrates occurs through the Cytochrome P450 (CYP 450) system specifically through the CYP2C9 and CYP3A4 families (Ripley & Hirsch, 2010), which is in agreement with our results obtained in a marine bivalve. Phases I and II of the detoxification system produce reactive oxygen species (ROS) and metabolites, which are able to promote oxidative stress and cellular damages. This fact can induce the activity of antioxidant enzymes to protect against oxidant damages (Maranho et al. 2014).

The activity of GPx was also induced at 3000 ng/L (48h), which shows a correlation with ROS generated by phase I detoxification system. The data on sub-lethal effects, especially DNA damage and ChE activity, suggest a possible overlapping of the antioxidant system, since these effects were estimated in the same concentrations (3000 ng/L). The enzymatic activity of the ChE is considered a biomarker of neurotoxicity effects and, in bivalve mollusks the alterations in the activity of this enzyme can be related to the control of the closing of the valves, alterations in the muscle movements, in the ciliary beating, among others (Viarengo et al. 2007). Previous studies with pharmaceuticals reported the induction of the activity of ChE in bivalve mollusks (Mesquita et al. 2011; Gonzalez-Rey & Bebianno, 2014) a fact that coincides with the data obtained for LOS in the present study. Zhang et al. (2002) reported that the induction of ChE is associated with cellular apoptosis in several human cells and other mammals, possibly because ChE is released after the rupture of the cellular membrane. It is possible that the induction of the activity of ChE is related to the membranothropic effects and the resulting cellular apoptosis caused by the LOS. The reduced stability of the lysosomal membranes confirms this hypothesis, since dependent concentration-time responses were found after exposures up to 300 ng/L.

Furthermore, toxicological studies reported the ability of the LOS to inhibit H⁺ ATPase activity in rodent kidney cells (Valles & Manucha, 2000) and the capacity of this pharmaceutical to interact with the bilayer cell membrane altering the fluidity of membrane (Zoumpoulakis et al. 2003). These characteristics may also be related to effects detected on the lysosomal membrane stability. This biomarker showed the most sensitive response, which coincides with previous studies on the cytotoxicity of pharmaceuticals compounds (Cortez et al. 2012; Pusceddu et al. 2018). Aguirre-Martínez et al. (2013) evaluating the toxicity of ibuprofen, carbamazepine and novobiocin on the crab *Carcinus maenas*, concluded that stability of lysosomal membrane is a good indicator of general stress in organisms exposed to pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations.

With regard to the sensitivity of the different mussel's life stages used in the present study, the endpoints fertilization rate and embryolarval development, although considered phases highly sensitive to environmental pollutants (Beiras et al. 2003), were not responsive to detect adverse biological effects in environmentally relevant concentrations of LOS ranging from ng/L to µg/L. On the other hand, the data obtained with the use of biomarkers in adult mussels showed some significant biological effects (DNA damage and reduced lysosomal membrane stability) after short-term exposures at concentration closer to those found in WWTPs effluents and marine surface water (Larsson et al. 2007; Moreno-González et al. 2015; Pereira et al. 2016; Gros et al. 2017).

Perna perna mussels showed to be a suitable marine model, which could be employed in future environmental assessments. The gill was the most responsive tissue, showing detoxification (DBF and GST activities) and antioxidante defenses (GPx), but this was not able to prevent mitochondrial DNA damage.

5 Conclusion

The pharmaceutical LOS was quantified in 100% of surface and bottom water samples from Santos Bay ranging from 0.295 to 8.70 ng/L. Adverse effects of the antihypertensive Losartan on reproductive parameters of the brown mussel *Perna perna* were detected in higher concentrations (mg/L) after short-term exposure. In spite of the high ecological relevance of these endpoints, they are not expected in realistic scenarios of aquatic ecosystems. However, detoxification and antioxidant systems were induced after exposure to concentrations ranging from ng/L to µg/L, as such as cyto-genotoxic effects in gills and

hemolymph. These results highlighted the concern of introducing this class of contaminant into marine environments, and pointed out the need to include antihypertensive compounds as targets to wastewater treatments plants, such as including them in environmental monitoring programs.

References

- Aguirre-Martínez, G.V., Del Valls, T.A., Martín-Díaz, M.L. 2013. Early responses measured in the brachyuran crab *Carcinus maenas* exposed to carbamazepine and novobiocin: Application of a 2-tier approach. *Ecotoxicol Environ Saf* 97:47–58.
- Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2016. Vol. 107, Nº 3, Supl. 3.
- ASTM - American Society of Testing and Materials. 1992 - 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, vol. 11, pp. 377-394.
- Bayer, A., Asner, R., Schüssler, W., Kopf, W., Weiß, K., Sengl, M., Letzel, M. 2014. Behavior of sartans (antihypertensive drugs) in wastewater treatment plants, their occurrence and risk for the aquatic environment. *Environ Sci Pollut Res* 21:10830–10839.
- Beiras, R., Fernandez, N., Bellas, J., Besada, V., Gonzalez-Quijano, A., Nunes, T. 2003. Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. *Chemosphere* 52:1209–1224.
- Bersusa, A.A.S., Pascalicchio, A.E., Pessoto, U.C., Escuder, M.M.L. 2010. Access of hypertension and/or diabetes patients to healthcare services in Baixada Santista. *Rev Bras Epidemiol* 13(3): 1-9.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB - Relatório de qualidade das praias no estado de São Paulo. 2016. Série Relatórios. 184p.
- Cortez, F.S., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Cesar, A., Choueri, R.B., Martini, G.A., Bohrer-Morel, M.B. 2012. Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Environ Pollut* 168:145-150.

Silva, R.M., Chaves, G.C., Chaves, L.A., Campos, M.R., Luiza, V.L., Bertoldi, A.D., Ross-Degnan, D., Emmerick, I.C.M. 2017. Farmácia Popular Program: pharmaceutical market analysis of antihypertensive acting on the renin-angiotensin system medicines. *Ciências & Saúde Coletiva*. 22: 2501-2512.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, Jr.V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88–95.

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

FDA. U.S. Food and Drug Administration. 2002. Center for drug evaluation and research. Environmental assessment/FONSI. Approval package for application number 20-386/S-019 and 029. Review of Environment Assessment NDA 20-386 Cozaar Tablets (LOSARTAN POTASSIUM).

Francisco, A.A.S. ‘Gerontogrowth’ and population ageing in Africa and the Global Age Watch Index. 2017. *The Journal of the Economics of Ageing (JEoA)* 9, 78-89.

Gagné, F., Blaise, C. 1993. Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Water Res* 27:1669-1682.

Gagné, F., André, C., Cejka, P., Gagnon, C., Blaise, C. 2007. Toxicological effects of primary-treated urban wastewaters, before and after ozone treatment, on freshwater mussels (*Elliptio complanata*). *Comp Biochem Phys Part C: Toxicol Pharmacol* 145: 542–552.

Godoy, A.A., Kummrow, F., Pamplin, P.A.Z. 2015a. Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment - A review. *Chemosphere* 138:281–291.

Godoy, A.A., Kummrow, F., Pamplin, P.A.Z. 2015b. Ecotoxicological evaluation of propranolol hydrochloride and losartan potassium to *Lemna minor* L. (1753) individually and in binary mixtures. *Ecotoxicol* 24:1112–1123.

- Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J. 2014. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol* 148:221–230.
- Gros, M., Sara Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D. 2012. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1248: 104–121.
- Gros, M., Blumb, K.M., Jernstedt, H., Renman, G., Rodríguez-Mozaz, S., Haglund, P., Andersson, P.L., Wiberg, K., Ahrens, L. 2017. Screening and prioritization of micropollutants in wastewaters from on-site sewage treatment facilities. *J Hazard Mater* 328:37–45.
- Gurke, R., Rößler, M., Marx, C., Diamond, S., Schubert, S., Oertel, R., Fauler, J. 2015. Occurrence and removal of frequently prescribed pharmaceuticals and corresponding metabolites in wastewater of a sewage treatment plant. *Sci Total Environ* 532: 762–770.
- Huerta-Fontela, M., Maria Teresa Galceran, M.T., Ventura, F. 2011. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research* 45:1432-1442.
- IMS - Institute for Healthcare Informatics. 2016. Medicines Use and Spending in the U.S. A Review of 2015 and Outlook to 2020. p 50.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. 2010. Sinopse do Censo Demográfico 2010 (São Paulo, Brasil). Accessed 13 November 2017. Available from: <http://censo2010.ibge.gov.br>
- Jarari, N., Rao, N., Peela, J.R., Ellafi, K.A., Shakila, S., Said, A.R., Nelapalli, N.K., Min, Y., Tun, K.D., Jamallulail, S.I., Rawal, A.K., Ramanujam, R., Yedla, R.N., Kandregula, D.K., Argil, A., Peela, L.T. 2016. A review on prescribing patterns of antihypertensive drugs. *Clinical Hypertension* 22:7.
- Klosterhaus, S.L., Grace, R., Hamilton, M.C., Yee, D. 2013. Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. *Environ Int* 54:92–99.

- Knopf, H., Grams, D. 2013. Pharmaceutical of adults in Germany. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). 56:868–877.
- Larsson, D.G.J., de Pedro, C., Paxeus, N. 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J Hazard Mater* 148:751–755.
- Lowe, D.M., Pipe, R.K. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat Toxicol* 30:357–365.
- Maranho, L.A., Baena-Nogueras, R.M., Lara-Martín, P.A., DelValls, T.A., Martín-Díaz, M.L. 2014. Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species. *Environ Res* 134:353–365.
- Mc Farland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., Mccant, D.D. 1999. Biomarkers of Oxidative Stress and Genotoxicity in Livers of Field-Collected Brown Bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Arch Environ Contam Toxicol* 241:236–241.
- Mesquita, S.R., Guilhermino, L., Guimarães, L. 2011. Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Chemosphere* 85:967–976.
- Moreno-González, R., Rodriguez-Mozaz, S., Gros, M., Barceló, D., León, V.M. 2015. Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (SE Spain). *Environ Res* 138:326–344.
- Olive, P.L. 1988. DNA precipitation assay: A rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen* 11:487–495.
- Ortega, A.S.B., Maranho, L.A., Nobre, C.R., Moreno, B.B., Rafael Solé Guimarães, R.S., Lebre, D.T., Abessa, D.M.S., Ribeiro, D.A., Pereira, C.D.S. 2018. Detoxification, oxidative stress, and cytogenotoxicity of crack cocaine in the brown mussel *Perna perna*. *Environ Sci Pollut Res*. doi.org/10.1007/s11356-018-1600-7.
- Osorio, V., Larrañaga, A., Aceña, J., Pérez, S., Barceló, D. 2016. Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian Rivers. *Sci Total Environ* 540:267–277.
- 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., Silbiger, H.L.N., Sousa, E.C.P.M., Del Valls, T.A., Bainy, A.C.D. 2014. Ecological relevance of sentinels' biomarker responses: A multi-level approach. *Marine Poll Bull* 96, 118-126.
- Pereira, C.D.S., Maranhão, L.A., Cortez, F.S., Pusceddu, F.H., Santos, A.R., Ribeiro, D.A., Cesar, A., Guimarães, L.L. 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Sci Total Environ* 548:549, 148–154.
- Pusceddu, F.H., Choueri, R.B., Pereira, C.D.S., Cortez, F.S., Santos, D.R.A., Moreno, B.B., Santos, A.R., Rogero, J.R., Cesar, A. 2018. Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints. *Environ Pollut* 232:274-283.
- Ripley, E., Hirsch, A. 2010. Fifteen years of losartan: what have we learned about losartan that can benefit chronic kidney disease patients? *Int J Nephrol Renovasc Dis* 3: 93–98.
- Santos, L.H.M.L.M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, C.A., Barceló, D., Montenegro, M.C.B.S.M. 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci Total Environ* 461:462, 302–316.
- Trevisan, R., Flesch, S., Mattos, J.J., Milani, M.R., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L. 2014. Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*. *Comp Biochem Physiol. Part C* 159, 22-30.
- UNESCO and HELCOM. 2017. Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region – A status report. UNESCO Emerging Pollutants in Water Series – N^o. 1, UNESCO Publishing, Paris.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency. 1991. EPA/600/4-91/003- Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, pp. 579.
- Valles, P.G., Manucha, W.A. 2000. H⁺-ATPase activity on unilateral ureteral obstruction: Interaction of endogenous nitric oxide and angiotensin II. *Kidney Int* 58:1641–1651.

- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp Biochem Physiol - Part C*, 146:281–300.
- Wille, K., Noppe, H., Verheyden, K., Vanden Bussche, J., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., De Brabander, H.F., Vanhaecke, L. 2010. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. *Anal Bioanal Chem* 397:1797–1808.
- Wills, E.D. 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell K, Mullock B. (eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, USA, pp. 127-150.
- Yamamoto, N.S., Pereira, C.D.S., Cortez, F.S., Pusceddu, F.H., Santos, A.R., Toma, W., Guimarães, L.L. 2014. Avaliação dos efeitos biológicos adversos dos fármacos anti-hipertensivos Losartan e Valsartan em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA). *Unisantia BioScience* 3:27–32.
- Zoumpoulakis, P., Daliani, I., Zervou, M., Kyrikou, I., Siapi, E., Lamprinidis, G., Mikros, E., Mavromoustakos, T. 2003. Losartan's molecular basis of interaction with membranes and AT1 receptor. *Chem Phys Lipids* 125:13–25.
- Zaroni, L.P., Abessa, D.M.S., Lotufo, G.R., Sousa, E.C.P.M., Pinto, Y.A. 2005. Toxicity testing with embryos of marine mussels: protocol standardization for *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Bull Environ Contam Toxicol* 74:793-800.
- Zhang, X.J., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J.P., He, H.Y., Jin, Q.H., Guo, L.H., Alemany, M., Zhang, L.Y., Shi, Y.F. 2002. *Cell Death Differ* 9:790-800.

CAPÍTULO 3 - O antidepressivo fluoxetina causa efeitos adversos em bivalve marinho tropical

1 Introdução

O antidepressivo Fluoxetina (FLX) é um fármaco psicotrópico que atua como inibidor seletivo de recaptação de serotonina (Wong et al., 1995; Pham et al., 2018). Essa classe de medicamentos está entre as mais prescritas e, a fluoxetina, o ingrediente ativo mais utilizado (Stewart et al., 2014). Em humanos, esse fármaco é indicado para o controle da ansiedade, para transtornos obsessivo-compulsivos e outros distúrbios psiquiátricos (Hiemke & Hartter, 2000).

Como consequência do amplo uso, há uma crescente preocupação com a ocorrência da FLX em matrizes ambientais, bem como com os efeitos nocivos à biota. Em um estudo realizado nos EUA, o antidepressivo fluoxetina foi classificado como “Top 20” entre os fármacos mais detectados em ambientes dulcícolas (Hughes et al., 2013). Embora estudos tenham reportado a ocorrência desse fármaco em efluentes e ambientes aquáticos (Vasskog et al., 2008; Benotti & Brownawell, 2007; Birch et al., 2015), há na literatura uma escassez de dados sobre a ocorrência de fluoxetina no ambiente marinho (Estévez-Calvar et al., 2016).

Considerando os estudos realizados sobre a ocorrência de FLX em zonas costeiras de diferentes regiões, a faixa de concentrações detectadas em águas marinhas variou de 0,6 ng/L a 90 ng/L (Pait et al., 2006; Nodler et al., 2014; Birch et al., 2015; Biel-Maeso et al., 2018). Com relação aos efeitos nocivos da fluoxetina, diversos estudos tem apontado alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais em organismos aquáticos (Stanley et al., 2007; Di Poi et al., 2014; Chen et al., 2015; Peters & Granek, 2016; Silva et al., 2016; Magni et al., 2017). Nesse sentido, torna-se importante ressaltar que a serotonina, alvo da ação da FLX (bloqueio da recaptação da serotonina), cumpre importante função neuromoduladora em bivalves e outros invertebrados aquáticos, regulando a atividade ciliar em brânquias, a maturação dos oócitos, a muda, o comportamento e a indução de desova (Gibbons & Castagna, 1984; Fong & Ford, 2014). Uma vez que a FLX aumenta a disponibilidade de serotonina, alterando e perturbando diversas funções biológicas, a mesma tem sido reconhecida como um desregulador endócrino (Bossus et al., 2014).

Dentre os invertebrados aquáticos, moluscos bivalves tem sido empregados como organismos modelos em estudos ecotoxicológicos, também com o objetivo de elucidar os efeitos biológicos adversos associados à exposição ao fármaco FLX (Honkoop et al., 1999; Gonzalez-Rey et al., 2013; Franzellitti et al., 2014, 2015; Chen et al., 2015; Peters & Granek, 2016; Silva et al., 2016; Magni et al., 2017; Silva et al., 2017). No entanto, pesquisas com

organismos nativos de áreas marinhas tropicais são inexistentes na literatura. Dada a importância de conhecer as concentrações ambientais de FLX em zonas costeiras tropicais e estimar os efeitos biológicos adversos desse fármaco em organismos dessas regiões, o presente estudo visou avaliar a ocorrência do fármaco FLX em amostras de água marinha coletadas na Baía de Santos-SP; avaliar as respostas metabólicas e estimar os efeitos subletais associados à exposição ao fármaco, com o emprego de diferentes biomarcadores, nos tecidos brânquia (BR), glândula digestiva (GD) e hemolinfa do molusco bivalve *Perna perna*.

2 Material e Métodos

2.1 Fármaco de interesse

O fármaco Fluoxetina-N-Metil- γ -[4-trifluorometil) fenoxi] benzenopropanaminahidroclorida (CAS Number 56296-78-7; peso molecular 345.79; pureza $\geq 98\%$) bem como todos os outros reagentes utilizados nesse estudo foram adquiridos na Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). A Figura 1 apresenta a estrutura química da Fluoxetina.

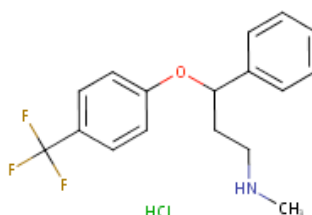


Figura 1. Estrutura química do fármaco Fluoxetina

2.2 Área de estudo e amostragem

A região estuarina de Santos e São Vicente está localizada na zona costeira do Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. Abriga um complexo industrial petroquímico; o maior porto da América Latina e é uma área turística e densamente povoada, onde o esgoto doméstico é coletado, pré-condicionado e lançado na Baía de Santos por meio de um emissário submarino distante 4,5 km da praia (Figura 2).



Figura 2. Baía de Santos e pontos de amostragem

A coleta das amostras de água foi realizada em 6 estações (superfície - S e fundo - F) no entorno do emissário submarino de esgoto na Baía de Santos, considerando as possibilidades de dispersão da pluma de efluente. Em cada estação de amostragem foram coletados três litros de água superficial (S-1m) e água de fundo (F-8m) utilizando uma garrafa de Van Dorn. As amostras foram colocadas em frascos de vidro âmbar previamente limpos com HNO_3 , metanol e água destilada e foram transportados para o laboratório em caixa térmica com gelo ($<6^\circ\text{C}$), posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o processamento.

2.3 Preparação das amostras

As amostras de água do mar (campo) e as amostras de água do bioensaio (soluções-teste) foram preparadas de acordo com Pereira et al. (2016). Inicialmente, o pH de cada amostra foi ajustado para $7,0 \pm 0,5$ antes da extração, utilizando uma solução de HCl (1M) e, posteriormente, as amostras foram filtradas através de papel filtro Whatman (diâmetro GF / C 47 mm, retenção de partículas $1,2 \mu\text{m}$, Merck, Darmstadt, Alemanha). Os filtros foram lavados com 2 mL de metanol e o extrato metanólico recolhido foi adicionado à amostra filtrada. As amostras foram então submetidas a extração em fase sólida (SPE) usando

cartuchos Chromabond HR-X (3 mL, 200 mg, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Os cartuchos de SPE foram pré-condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água Milli-Q e as amostras filtradas (misturadas com extrato de metanol) foram carregadas nos cartuchos. Após as amostras terem sido carregadas, os cartuchos foram lavados com 5 mL de água Milli-Q (2 vezes) e depois secos sob vácuo durante 30 minutos. A etapa de eluição foi realizada com 5 mL de acetona e duas vezes com 5 mL de metanol. Após a eluição, as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio, ressuspensas em 1 mL com solução de água/acetonitrila (95: 5, v / v) e filtradas em filtro de 0,45 µm (Millipore) antes da análise por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

2.4 Análise química (LC-MS/MS)

Para determinação da FLX nas amostras ambientais, 10 µL do eluato de cada amostra foram analisadas por um HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, CA, EUA) combinado com um espectrômetro de massas triplo quadrupolo híbrido íon trap/LC-QqLIT ABSciex, Ontario (Canadá). Os extratos das amostras de água do mar foram analisadas por uma coluna Agilent Eclipse XDB-C18 4,6 × 50 mm, 1,8 µm a 25°C, e a fase móvel em 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich LC-MS Grade) em água (solvente A) e acetonitrila (JT Baker LC-MS Grade) (solvente B). Um gradiente linear de 0,7 mL/min.⁻¹ foi usado, começando com uma mistura de 95% de solvente A e 5% de solvente B. A concentração do solvente “A” diminuiu linearmente de 95% para 5% ao longo de 5 min e esta condição foi mantida por 1 minuto. A mistura foi então devolvida às condições iniciais ao longo de 2 minutos e a FLX foi detectada e quantificada usando fonte de ionização por “electrospray” (ESI - modo positivo) no modo Monitoramento de Reação Múltipla (MRM), com a seleção de um íon precursor e dois produtos de íons para quantificar e qualificar o composto (Tabela 1) (Pereira et al. 2016). Os parâmetros da fonte de íons adotados foram (i) gás de interface - 20 a.u.; (ii) gás de colisão - 8 a.u.; (iii) voltagem da ESI - 5500; (iv) temperatura do gás de origem - 650°C; (v) gás do nebulizador - 45 a.u.; (vi) gás de aquecimento - 65 a.u. Posteriormente foi empregada uma curva de calibração matriz, como descrito por Wille et al. (2010).

Tabela 1. Parâmetros MRM para o modo de íon positivo, limite de detecção, limite de quantificação e tempo de retenção.

Fármaco	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	RT (min.)
Fluoxetina	310,2	148,1	16	13	4	0.01	0.04	4,84
		163,1	16	20	4			

Q1 (primeiro quadrupolo); Q3 (último quadrupolo); DP (potencial de desagregação); CE (energia de colisão); CXP (Potencial de Saída de Colisão); LOD (Limites de detecção); LOQ (limites de quantificação); RT (tempo de retenção). No Q3, na célula superior, encontra-se o íon quantificador e na célula inferior o íon qualificador.

Para determinação da concentração de FLX nos ensaios, 1L da água marcada com o fármaco foi coletada no início do experimento e preparadas como as amostras ambientais. A análise de espectrometria de massa foi realizada por meio de um espectrômetro de massa Varian 310 triplo quadrupolo (Varian Inc., Walnut Creek, CA) com uma fonte ESI (ESI-MS), por infusão direta. A aquisição de dados foi controlada com o Varian MS Workstation versão 6.9 (Varian Inc.). A análise da amostra foi realizada em modo ESI positivo com uma voltagem de agulha de 20kV. A temperatura capilar foi de 200 ° C, a pressão do gás de secagem de 20 psi e a pressão do gás de nebulização de 40 psi. A FLX foi detectada e quantificada usando o modo de Monitoramento de Reação Múltipla (MRM), com a seleção de um íon precursor (310,2 m/z) e dois íons produtos para quantificar e qualificar a FLX (148,1 e 163,1 m/z, respectivamente). Uma curva analítica com matriz foi empregada, como descrito por Wille et al. (2010).

2.5 Coleta e manutenção do organismo modelo - molusco bivalve *Perna perna*

Mexilhões adultos foram adquiridos de um cultivo localizado na Praia da Cocanha (Caraguatatuba, SP, Brasil), devido a boa qualidade ambiental da área (CETESB, 2016). Os organismos foram transportados ao laboratório em caixa térmica, mantidos em um tanque de 300 L de água do mar com fornecimento de alimentos (microalga), sob temperatura constante (24 ± 2°C) e sistema de aeração e filtração para aclimação durante 7 dias.

2.6 Ensaio e análises de biomarcadores

2.6.1 Exposição dos organismos

Após o período de aclimação, os organismos (n=21) foram dispostos em aquários com diferentes concentrações de FLX (3 ng/L; 30 ng/L e 300 ng/L) e controle de água, em triplicata, por 96 horas. Essas concentrações foram determinadas de acordo com estudos pretéritos que detectaram FLX em efluentes e águas superficiais (Nodler et al., 2014; Birch et al., 2015).

Para cada réplica de todos os tratamentos, 7 organismos foram expostos em 10 L de soluções-teste e controles. Após 48h de exposição todas as réplicas das soluções-teste e os controles foram renovados. A água do mar natural usada no ensaio foi filtrada através de uma membrana de 200 µm para remoção de partículas e, dessa forma manter um suprimento de alimento (fitoplâncton), uma vez que durante o experimento nenhuma outra fonte de alimento foi adicionada.

2.6.2 Extração e armazenamento de tecidos

Os tecidos hemolinfa, brânquia e glândula digestiva foram extraídos para análise dos biomarcadores em três tempos de exposição; T0, T48h e T96h. Nesse sentido, os organismos foram removidos aleatoriamente de cada réplica dos diferentes tratamentos, totalizando 10 mexilhões para T48h e 11 mexilhões para T96h. Imediatamente após a remoção da hemolinfa, as lâminas foram preparadas para análise da estabilidade da membrana lisossomal (EML). Após este procedimento as brânquias e as glândulas digestivas foram dissecadas, separadas em microtubos devidamente identificados e estocadas em ultrafreezer (-80°C) até a análise dos biomarcadores.

2.6.3 Preparação de tecidos brânquia e glândula digestiva

As brânquias e glândulas digestivas de cada organismo foram descongeladas em gelo, pesadas e homogeneizadas com 4 vezes o volume do tampão constituído por NaCl 100 mM, HEPES-NaOH 25 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, pH 7,5, com uso de um homogeneizador (Tissue Tearor). Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado a 4°C a 15.000g por 20 minutos, obtendo-se a fração sobrenadante, onde as atividades de CYP450

like (Etoxioresorufina-O-deetilase - EROD e Dibenzilfluoresceína - DBF), Glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPX), colinesterase (ChE), bem como a concentração de proteínas na fração de células citoplasmáticas, foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976). Separou-se uma alíquota de tecido homogeneizado para análises de Lipoperoxidação (LPO) e de danos em DNA. A concentração de proteína dessa alíquota também foi avaliada pelo método de Bradford (1976).

2.6.4 Etoxioresorufina-O-deetilase (EROD)

A atividade do EROD foi avaliada pelo método adaptado de Gagné e Blaise (1993). A transformação de 7-hidroxioresorufina em resorufina (atividade EROD) foi determinada fluorometricamente usando filtros de 520 nm (excitação) e 590 nm (emissão). A determinação da 7-hidroxioresorufina nas amostras foi realizada utilizando uma curva de calibração padrão de 7-hidroxioresorufina. Os resultados foram expressos como pmol/min./mg de proteína.

2.6.5 Dibenzilfluoresceína (DBF)

A determinação da atividade da DBF foi realizada de acordo com o método descrito por Gagné et al. (2007). Para isso, foi utilizado como substrato, 10 μ M de dibenzilfluoresceína incubada com uma solução de 1 mM de NADPH em uma solução de teste (50 mM de NaCl contendo 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,4). A fluorescência da amostra foi medida com um filtro de excitação de 485 nm e 516 nm. Os resultados foram expressos em pmol/min./mg de proteína.

2.6.6 Glutathione-S-Transferase (GST)

O método utilizado para determinar a atividade da GST foi adaptado de Mc Farland et al. (1999). A atividade foi analisada usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 42 mM (CDNB), GSH 1 mM como substrato e medido a 340 nm a cada 30 segundos durante 3 minutos. Os resultados foram expressos como OD/min./mg de proteínas.

2.6.7 Glutathione peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da GPx foi realizada de acordo com o método proposto por Mc Farland et al. (1999). A atividade da GPx foi medida a 340 nm a cada 2 minutos durante 10 minutos, utilizando hidróperóxido de cumeno 1 mM como substrato. A diminuição na absorbância de NADPH medida a 340 nm durante a oxidação de NADPH a NADP⁺ foi indicativa da atividade de GPx. Os resultados foram expressos como nmol/min./mg de proteína.

2.6.8 Lipoperoxidação (LPO)

A análise de peroxidação lipídica foi realizada pelo método do ácido tiobarbitúrico (Wills, 1987). Esta determinação foi empregada por fluorescência utilizando 516 nm (excitação) e 600 nm (emissão). Os padrões de tetrametoxipropano foram preparados em solução de homogeneização. Os resultados foram expressos em μ M TBARs/mg proteínas.

2.6.9 Danos em DNA

O dano ao DNA foi avaliado pelo ensaio de precipitação alcalina (Olive, 1988), utilizando fluorescência para quantificar traços de DNA (Gagné & Blaise, 1993). Mediu-se a fluorescência utilizando um filtro de 360 nm (excitação) e 450 nm (emissão) e utilizou-se um padrão de DNA genômico de espermatozoário de salmão (Sigma) para a calibração. Os resultados foram expressos em μ g/mg de proteína.

2.6.10 Colinesterase (ChE)

A análise das atividades de ChE das brânquias e glândulas digestivas foram realizadas de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961) utilizando uma concentração de 0,3 mM de iodeto de acetilcolina no ensaio enzimático. A variação da absorbância por minuto em 412 nm a 25°C foi registrada em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em μ mol DNTB/min./mg de proteína.

2.6.11 Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (VN)

O ensaio de VN foi realizado de acordo com o método descrito por Lowe et al. (1994) para avaliar a estabilidade da membrana lisossomal (LMS).

Os mexilhões foram removidos dos aquários e com o auxílio de uma seringa contendo soro fisiológico (pH 7,3) foram retirados 40 µL de hemolinfa de cada organismo e colocados em lâminas de vidro, que foram transferidas para câmara escura e úmida por 15 minutos para promover a aderência das células na lâmina. Em seguida, o excesso de líquido foi removido e 40 µL do corante vermelho neutro (NR) foram adicionados em todas as lâminas. Após mais 15 minutos de incubação, as lâminas foram analisadas periodicamente (a cada 15 minutos). O ponto final foi o tempo em que pelo menos 50% das células examinadas por microscopia óptica (400x) exibiram perda de corante dos lisossomos para o citosol ou anormalidades estruturais.

2.7 Análise dos dados

O teste T de Student foi empregado para avaliar diferenças entre o T0 e os controles de água. Como não foi detectada diferença, controles de água foram utilizados como referências para os tempos de exposição de 48h e 96h. Posteriormente foi empregado análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett para identificar as concentrações significativamente diferentes dos controles de água. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. O software Prism v.7 foi empregado para ANOVA e análise pos-hoc.

3 Resultados

3.1 Concentrações Ambientais de FLX

O fármaco FLX foi detectado em água superficial e de fundo nos pontos 1, 2 e 3. No entanto, apenas em água de fundo do ponto 4 a FLX esteve acima do limite de quantificação (Tabela 2). Os limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) para esse fármaco foram de 0,25 ng/L e 0,07 ng/L, respectivamente.

Tabela 2. Concentração ambiental de FLX em amostras de água superficial e de fundo (1-6 estações de amostragem) da Baía de Santos.

	Concentração de FLX (ng/L)					
	1	2	3	4	5	6
Superfície (S)	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
Fundo (F)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,58	<LOD	<LOD

LOQ - Limite de quantificação; LOD - Limite de detecção

3.2 Biomarcadores

As concentrações nominais e reais de FLX no tempo T = 0 estão indicadas na Tabela 3. As concentrações nominais foram semelhantes às determinadas em T = 0.

Tabela 3. Concentrações nominais e medidas de FLX (T0) nos experimentos com biomarcadores.

Concentração nominal (ng/L)	Concentração real (ng/L)
0	<LOD
3	2,9
30	29,9
300	304,5

As atividades de EROD, DBF, GST, GPX, bem como LPO, dano em DNA, e ChE no tecido das brânquias e glândulas digestivas estão demonstrados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

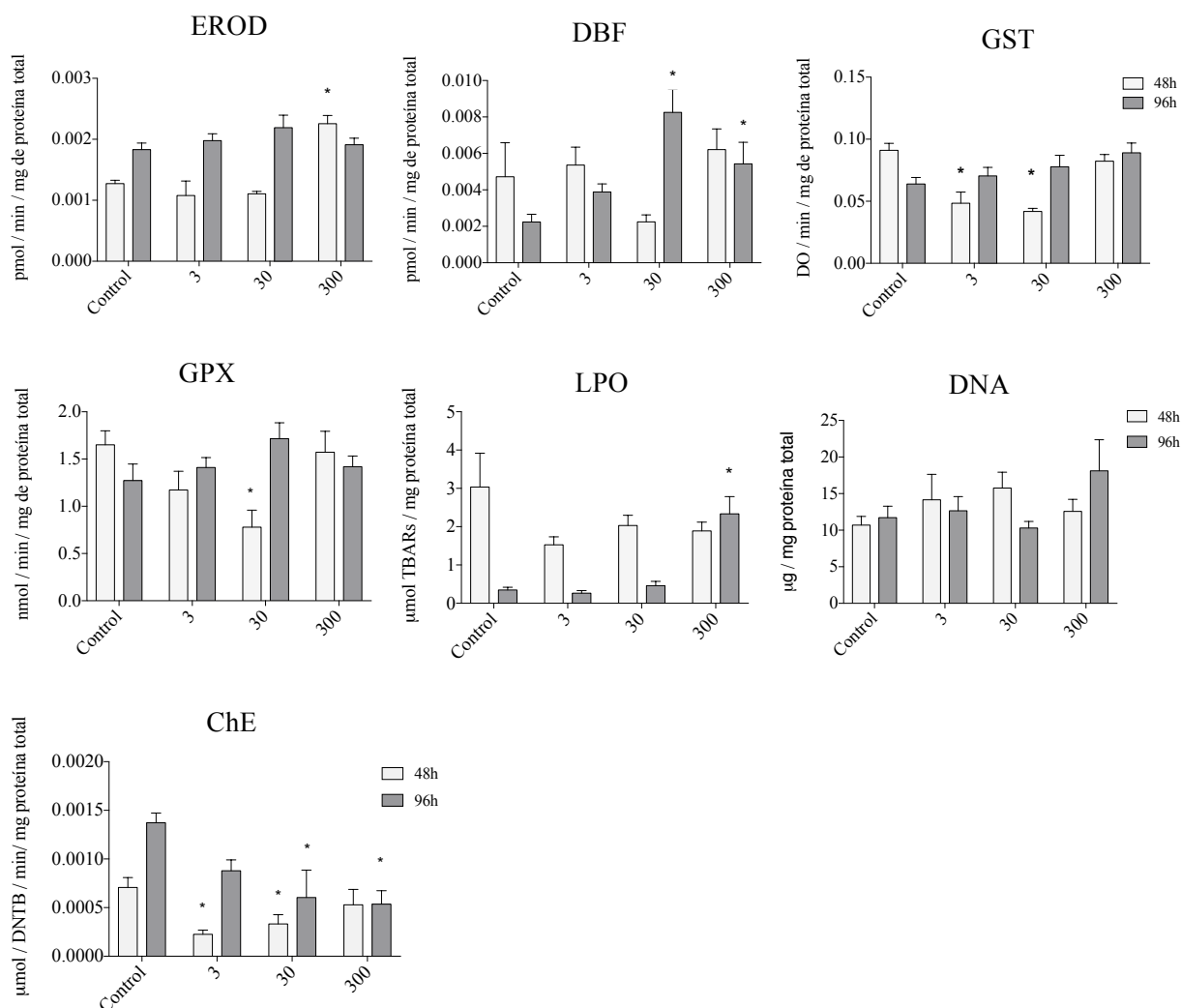


Figura 3. Resultados obtidos pelos biomarcadores em brânquias de organismos expostos a fluoxetina. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos com os biomarcadores em brânquias demonstraram que, com relação à biotransformação, a atividade enzimática EROD foi significativamente induzida com 48h de exposição na maior concentração testada (300 ng/L). Ainda com relação à fase I da biotransformação, foi observado diferença significativa na indução da atividade de DBF com 96h de exposição, nas concentrações de 30 ng/L e 300 ng/L. Efeitos oxidativos, estimados também pela peroxidação lipídica foram detectados com 96h de exposição na maior concentração testada. Além disso, a inibição colinesterase ocorreu nas concentrações de 3 ng/L e 30 ng/L (48h) e 30 ng/L e 300 ng/L (96h).

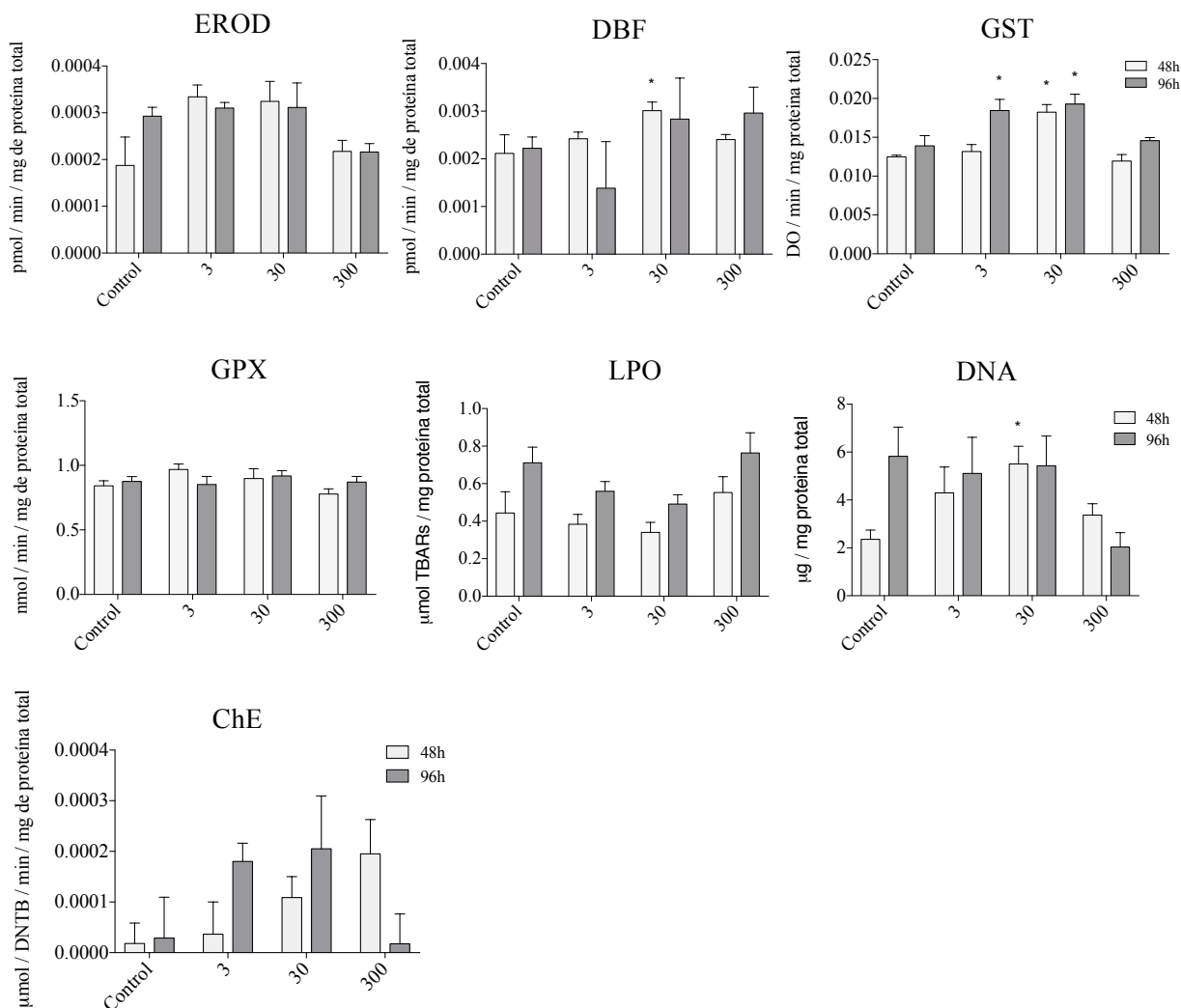


Figura 4. Resultados obtidos pelos biomarcadores em glândulas digestivas de organismos expostos a fluoxetina. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle ($p<0,05$).

Alterações significativas na atividade da DBF foram observadas na concentração de 30 ng/L com 48h de exposição. A indução da atividade da GST foi observada na concentração de 30 ng/L com 48h de exposição, enquanto que com 96h de exposição foram observados aumento significativo da atividade nas concentrações de 3 ng/L e 30 ng/L. Danos em DNA foram detectados na concentração de 30 ng/L com 48h de exposição.

Os efeitos da FLX sobre a estabilidade da membrana lisossomal estão demonstrados na Figura 5.

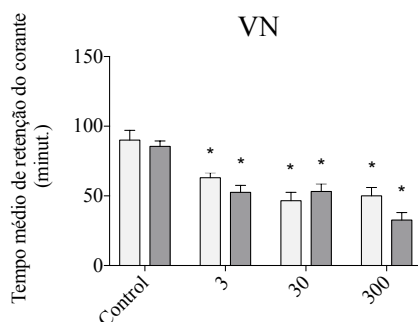


Figura 5. Resultado do ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Efeitos significativos na estabilidade da membrana lisossômica ocorreram a partir da concentração mais baixa de FLX (3 ng/L) em ambos os tempos analisados.

4 Discussão

O fármaco fluoxetina vem despertando preocupações quanto aos impactos nos ecossistemas aquáticos, especialmente pelo fato dessa molécula possuir uma estrutura química que resulta em estabilidade, lipofilicidade e no consequente acúmulo em matrizes ambientais (Calisto & Esteves, 2009; Kwon & Armbrust, 2006). De acordo com Szabó et al. (2018) esse fármaco possui resistência contra a hidrólise, fotólise e biodegradação.

No presente estudo, os dados obtidos na análise química para determinação das concentrações reais no bioensaio foram próximos às concentrações nominais de FLX. Com relação às concentrações ambientais, em áreas costeiras Nodler et al. (2014) detectaram fluoxetina com uma concentração máxima de 90 ng/L (concentração média de 66 ng/L) em amostras coletadas entre as praias Muir e Monterey, EUA (Pacific Ocean). Em um estuário de Sydney - Austrália, Birch et al. (2015) detectaram fluoxetina em amostras de água em um range de concentração que variou de 0.9 ng/L - 36 ng/L. No presente estudo, FLX foi detectada nos pontos 1 (S/F), 2 (S/F), 3 (S/F), 4 (S), entretanto abaixo do limite de quantificação. Somente no ponto 4 (F) foi possível quantificar a concentração de 0,58 ng/L.

Essa concentração se enquadra no range já encontrada em zonas costeiras e coincide com a concentração de 0,6 ng/L observada em um estudo realizado na Baía de Cádiz - Espanha (Biel-Maeso et al., 2018).

Diante do quadro de ocorrência de FLX em matrizes ambientais, torna-se importante ressaltar uma questão que leva a uma maior preocupação sobre os impactos negativos desse fármaco nos ecossistemas. A serotonina, alvo da ação da FLX, é considerada um neurotransmissor/neurohormônio conservativo, ou seja, ocorre em vertebrados e invertebrados e ainda não tem sua função bem conhecida em diversas espécies (Kreke & Dietrich, 2008 - Silva et al., 2016 - uptake). Uma vez que organismos não-alvo possuem o receptor evolutivamente conservado, efeitos adversos podem ocorrer alterando a fisiologia, o comportamento e o “status” geral de saúde dos organismos, em função à exposição a esse poluente psicoativo, inibidor da recaptação de serotonina (Fong & Ford, 2014).

Os resultados obtidos das análises dos biomarcadores demonstraram alterações significativas no metabolismo de detoxicação, bem como efeitos oxidativos e membranotrópicos. Na fase I do processo de biotransformação a atividade da EROD foi significativamente ativada em brânquias (300 ng/L - 48h) enquanto que a atividade da DBF foi induzida em brânquias (30 ng/L e 300 ng/L - 96h) e glândulas digestivas (30 ng/L - 48h). Maranhão et al. (2014) observaram uma indução significativa na atividade da EROD em poliquetos expostos à FLX via sedimentos marcados, a partir da concentração de 0,01 ng/g.

Em relação a atividade da enzima GST (fase II do metabolismo), os tecidos analisados apresentaram padrões distintos com a inibição da atividade em brânquias e um aumento significativo transitório da atividade no tecido das glândulas digestivas, uma vez que não houve diferença significativa na concentração mais alta (300 ng/L) em ambos os tempos analisados. Esse mesmo padrão de resposta da GST foi obtido no estudo realizado por Gonzalez-Rey & Bebianno (2013) com a exposição do molusco bivalve *Mytilus galloprovincialis* à concentração de 75 ng/L de FLX por quinze dias. Nesse caso, a atividade da GST em brânquias foi diferente do controle apenas no tempo intermediário de exposição (7 dias) enquanto que em glândula digestiva (definida pelos autores como mais responsiva) a atividade da enzima (indução) apresentou diferença significativa do controle com três e quinze dias de exposição. Franzelliti et al. (2015) observaram também um aumento significativo da GST em glândula digestiva de moluscos da espécie *Mytilus galloprovincialis* expostos por 7 dias a 0,3 ng/L de FLX.

O processo de biotransformação que envolve a família CYP 450 pode produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) que, conseqüentemente, podem gerar danos oxidativos em lipídios de membranas biológicas, em enzimas, proteínas e no DNA (Valavanidis et al., 2006). Embora no presente estudo a enzima antioxidante GPx não tenha sido responsiva em nenhum dos tecidos analisados, foram observados lipoperoxidação em brânquias (300 ng/L - 96h) e danos em DNA em glândula digestiva (30 ng/L - 48h). Gonzalez-Rey & Bebianno (2013) observaram peroxidação lipídica em *M. galloprovincialis* nos tecidos brânquia e glândula digestiva. Nesse estudo, as brânquias mostraram-se mais responsiva na primeira semana do experimento (efeitos significativos com 3 e 7 dias de exposição) e, em glândula digestiva, os efeitos foram progressivos demonstrando um aumento significativo conforme o tempo de exposição (maior diferença detectada com 15 dias). No estudo conduzido por Maranhão et al. (2014) FLX causou lipoperoxidação em poliquetos expostos a sedimentos marcados (100 ng/g). Elgebaly et al. (2018) demonstraram, em um estudo conduzido com roedores, que a fluoxetina e seu metabólito norfluoxetina possuem a capacidade de causar hepatotoxicidade proveniente do aumento do estresse oxidativo e da diminuição dos níveis antioxidantes. Por outro lado, não foi observado um aumento significativo nos níveis de lipoperoxidação em tecidos do molusco bivalve dulcícola *Dreissena polymorpha* expostos por 15 dias à concentração de 500 ng/L de FLX. Esse fato foi associado pelos autores à eficiência do sistema antioxidante (Magni et al., 2017). Essa mesma tendência foi observada por Mesquita et al. (2011) em caranguejos da espécie *Carcinus maenas* expostos por 7 dias a diferentes concentrações de FLX (0,5 µg/L - 750 µg/L).

No presente estudo, danos em DNA ocorreram pontualmente apenas na concentração de 30 ng/L em glândula digestiva. Franzellitti et al. (2015) não observaram aumento significativo nos danos em DNA de bivalves *M. galloprovincialis* expostos à concentração de 0,3 ng/L de FLX por um período de 7 dias. Ausência de danos no DNA em poliquetos expostos a diferentes concentrações de FLX por 14 dias também foram observadas por Maranhão et al. (2014). No estudo realizado por Magni et al. (2017), o fármaco FLX também não demonstrou potencial de causar efeitos genotóxicos (ensaio cometa e micronúcleo) no molusco bivalve *D. polymorpha*.

Há na literatura, uma disparidade dos dados relacionados aos danos em DNA causados pela FLX. Por exemplo, no estudo realizado por Djordjevic et al. (2011), um grupo de roedores expostos cronicamente a um situação de estresse (considerado nesses estudos uma situação modelo de depressão), quando tratados com FLX por um período de 21 dias

demonstraram uma maior taxa de fragmentação do DNA, além da indução significativa da GPx, associado a uma resposta compensatória ao aumento da peroxidação lipídica (eliminação pela GPx de peróxidos lipídicos). Han & Lee (2009) observaram em um estudo farmacológico, que células neuronais (PC12) expostas a 15 μ M de FLX por 20 minutos apresentaram danos mitocondriais, estresse oxidativo e aumento significativo de fragmentação em DNA.

Com relação à neurotoxicidade, a enzima ChE tem sido utilizada como um importante biomarcador em estudos ecotoxicológicos (Cajaraville et al., 2000). Nesse sentido, o fármaco FLX demonstrou ser neurotóxico para o bivalve *Perna perna* e, o tecido das brânquias, foi mais responsivo para atividade da ChE. Com 48h de exposição, ocorreu inibição significativa dessa enzima, exceto na concentração mais alta (300 ng/L). Com 96h de exposição as concentrações mais altas de (30 ng/L e 300 ng/L) inibiram significativamente a atividade da ChE. Os dados obtidos coincidem com o estudo realizado por Franzellitti et al. (2014) no qual a inibição da ChE ocorreu em mexilhões *M. galloprovincialis* expostos a FLX, em concentrações a partir de 0,03 ng/L. Munari et al. (2014) também observaram a inibição da ChE no molusco bivalve *Venerupis philippinarum* expostos por 7 dias à concentrações de FLX (1 μ g/L e 5 μ g/L). No entanto, nas concentrações mais altas (25 μ g/L, 125 μ g/L e 625 μ g/L) a atividade da ChE aumentou atingindo os valores obtidos no controle. No estudo realizado por Gonzalez-Rey & Bebianno (2013), bivalves da espécie *M. galloprovincialis* foram expostos por 15 dias à 75 ng/L de FLX. Os resultados da atividade da ChE também variaram, uma vez que no terceiro dia de exposição ocorreu um aumento significativo da atividade em relação ao controle, enquanto que no final do experimento (15 dias) foi observado uma inibição significativa da enzima. Com base nos dados da literatura apresentados e, de acordo com Munari et al. (2014), nota-se que a atividade da ChE pode variar acentuadamente em resposta à exposição à FLX dependendo da concentração, do tempo de exposição e das espécies e tecidos analisados. No entanto, considerando os dados obtidos no presente estudo com relação à ChE (redução significativa da atividade em brânquias), é possível que esses efeitos possam contribuir aditivamente para os efeitos de outros inibidores de ChE, como os inseticidas organofosforados e, com isso, gerar efeitos negativos cumulativos (Franzellitti et al., 2014).

Com relação aos efeitos membranotrópicos foi observado alterações significativas na estabilidade da membrana dos lisossomos a partir da menor concentração analisada, em ambos os tempos de exposição. O dados obtidos coincidem com o estudo realizado por

Franzellitti et al. (2014) no qual bivalves *M. galloprovincialis* foram expostos a uma faixa de 0,03-300 ng/L de FLX por 7 dias. Os efeitos na estabilidade da membrana lisossomal correram a partir da menor concentração analisada (0,03 ng/L). Em outro estudo com a mesma espécie de bivalve realizado por Franzellitti et al. (2015) com os fármacos FLX e propranolol, efeitos na estabilidade da membrana do lisossomos ocorreram na concentração de 0,3 ng/L (7 dias de exposição). Os dados relacionados à estabilidade da membrana lisossomal com o molusco bivalve *Perna perna* apresentaram o mesmo padrão de resposta e, efeitos na mesma faixa de concentrações quando comparado aos estudos que empregaram o bivalve *M. galloprovincialis* (Franzellitti et al., 2014; 2015). Esse fato denota a sensibilidade da membrana lisossomal quando bivalves marinhos são expostos à FLX, independente da espécie utilizada. De acordo com Daniel & Wojcikowski (1997), a FLX, por ser uma base fraca, em seu estado não ionizado possui a capacidade de permear as membranas e se acumular no interior ácido dos lisossomos, onde são protonadas e tornam-se incapazes de se difundir novamente para o citosol, levando ao acúmulo desse fármaco no interior dos lisossomos. Esse fenômeno, denominado lisossomotropismo (FLX é considerada um fármaco lisossomotrópico) pode levar a um aumento do volume dos lisossomos, à perda da funcionalidade da organela e é considerado um fator de citotoxicidade (Daniel, 2003; Seo et al., 2014).

Nesse contexto, assim como no estudo realizado por Franzellitti et al. (2014), é possível inferir que a ausência de respostas antioxidantes consistentes em ambos os tecidos analisados pode ser uma consequência de um sequestro lisossômico preferencial de FLX, que por sua vez impediria outros efeitos celulares do fármaco, incluindo a peroxidação lipídica, cujos níveis foram significativos somente em brânquias e na maior concentração analisada.

Em um estudo de revisão com inibidores da recaptação de serotonina, Silva et al. (2015) demonstraram que esses antidepressivos têm efeitos em diferentes níveis tróficos de organismos não-alvo, como algas, plantas, invertebrados e vertebrados, e possui a capacidade de bioacumulação em peixes e moluscos. Nesse contexto, se faz necessário a realização de estudos orientados pelo mecanismo de ação da FLX empregando alvos moleculares específicos, como transportadores e receptores de serotonina, bem como interações com outros neurotransmissores.

5 Conclusão

Os dados obtidos no presente estudo adicionaram informações sobre as concentrações de FLX que alteram significativamente o metabolismo de fase I e II e, que causam efeitos sub-letais em um organismo não-alvo marinho tropical. As concentrações de efeito observadas, embora acima das concentrações ambientais detectadas na Baía de Santos, são ambientalmente relevantes, uma vez que se enquadram em uma faixa de concentrações já detectadas em águas superficiais de zonas costeiras de outras regiões. Nesse sentido, os resultados sugerem que o fármaco FLX pode causar alterações em processos celulares e fisiológicos, e no estado geral de saúde em bivalves *P. perna* deixando-os mais susceptíveis a outros estressores ambientais. Esses resultados apontam para o risco relacionado à introdução desse fármaco no ambiente marinho, bem como a necessidade de incluir essa substância em programas de monitoramento ambiental para uma melhor compreensão dos riscos associados.

Referências

- Benotti, M.J., Brownawell, B.J. 2007. Distributions of pharmaceuticals in an urban estuary during both dry- and wet-weather conditions. *Environ Sci Technol*, v 41, pp 5795-5802.
- Biel-Maeso, M., Baena-Nogueras, R.M., Corada-Fernández, C., Lara-Martín, P.A. 2018. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Sci Total Environ*, v 612, pp 649-659.
- Birch, G.F., Drage, D.S., Thompson, K., Eaglesham, G., Mueller, J.F. 2015. Emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, a food additive and pesticides) in waters of Sydney estuary, Australia. *Marine Poll Bull*, v 97, pp 56-66.
- Bossus, M.C., Gulera, Y.Z., Short, S.J., Morrison, E.R., Ford, A.T. 2014. Behavioural and transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. *Aquat Toxicol*, v 151, pp 46-56.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v 72, pp 248-254.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ*, v 247, pp 295-311.
- Calisto, V., Esteves, V.I. 2009. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere*, v 77, pp 1257-1274.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, 2016. Relatório de qualidade das praias no estado de São Paulo. Série Relatórios (pp 184).
- Chen, H., Zha, J., Yuan, L., Wang, Z. Effects of fluoxetine on behavior, antioxidant enzyme systems, and multixenobiotic resistance in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Chemosphere*, v 119, pp 856-862.

Daniel, W.A., Wojcikowski, J. 1997. Contribution of Lysosomal Trapping to the Total Tissue Uptake of Psychotropic Drugs. *Pharmacol Toxicol*, v 80, pp 62-68.

Daniel, W.A. 2003. Mechanisms of cellular distribution of psychotropic drugs. Significance for drug action and interactions. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, vol 27, pp 65-73.

Di Poi, C., Bidela, F., Dickela, L., Bellanger, C. 2014. Cryptic and biochemical responses of young cuttlefish *Sepia officinalis* exposed to environmentally relevant concentrations of fluoxetine. *Aquat Toxicol*, v 151, pp 36-45.

Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., Elaković, I., Matić, G., Radojic, M.B. 2011. Fluoxetine affects antioxidant system and promotes apoptotic signaling in Wistar rat liver. *Eur J Pharmacol*, v 659, pp 61-66.

Elgebaly, H.A., Mosa, N.M., Allach, M., El-Massry, K.F., El-Ghorab, A.H., Hroob, A.M.A., Mahmoud, A.M. 2018. Olive oil and leaf extract prevent fluoxetine-induced hepatotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Biomed Pharmacother*, v 98, pp 446-453.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, v 7, pp 88-95.

Estévez-Calvar, N., Canesi, L., Montagna, M., Faimali, M., Piazza, V., Garaventa, F. 2016. Adverse effects of the SSRI antidepressant sertraline on early life stages of marine invertebrates. *Mar Environ Res*, pp 1-10. doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.021.

Fong, P.P., Ford, A.T. 2014. The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. *Aquat Toxicol*, v 151, pp 4-13.

Franzellitti, S., Burattia, S., Capolupoa, M., Du, B., Haddad, S.P., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., Fabbri, E. 2014. An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquat Toxicol*, v 151, pp 14-26.

Franzellitti, S., Buratti, S., Du, B., Haddad, S.P., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., Fabbri, E. 2015. A multibiomarker approach to explore interactive effects of propranolol and fluoxetine in marine mussels. *Environ Pollut*, v 205, pp 60-69.

Gagné, F., Blaise, C. 1993. Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Water Res*, v 27, pp 1669–1682.

Gagné, F., André, C., Cejka, P., Gagnon, C., Blaise, C., 2007. Toxicological effects of primary- treated urban wastewaters, before and after ozone treatment, on freshwater mussels (*Elliptio complanata*). *Comp Biochem Physiol, Part C: Toxicol Pharmacol*, v 145, pp 542–552.

Gibbons, M.C., Castagna, M. 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture*, v 40, pp 189-191.

Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J. 2013. Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environ Pollut*, v 173, pp 200-209.

Han, Y.S., Lee, C.S. 2009. Antidepressants reveal differential effect against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in differentiated PC12 cells. *Eur J Pharmacol*, v 604, pp 36-44.

Hiemke, C., Härtter, S. 2000. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Therapeut*, v 85, pp 11-28.

Honkoop, P.J.C., Luttikhuizen, P.C., Piersma, T. 1999. Experimentally extending the spawning season of a marine bivalve using temperature change and fluoxetine as synergistic triggers. *Mar Ecol Prog Ser*, v 180, pp 297-300.

Hughes, S.R., Kay, P., Brown, L.E. 2013. Global Synthesis and Critical Evaluation of Pharmaceutical Data Sets Collected from River Systems. *Environ Sci Technol*, v 47, pp 661-677.

Kreke, N., Dietrich, D.R. 2008. Physiological endpoints for potential SSRI interactions in fish. *Crit Rev Toxicol*, v 38, pp 215-247.

- Kwon, J-W., Armbrust, K.L. 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ Toxicol Chem*, v 77, N° 10, pp 2251-2568.
- Lowe, D.M., Pipe, R.K. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat Toxicol*, v 30, pp 357–365.
- Magni, S., Parolini, M., Torre, C.D., de Oliveira, L.F., Catani, M., Guzzinati, R., Cavazzini, A., Binelli, A. 2017. Multi-biomarker investigation to assess toxicity induced by two antidepressants on *Dreissena polymorpha*. *Sci Total Environ*, v 578, pp 452-459.
- Maranho, L.A., Baena-Nogueras, R.M., Lara-Martín, P.A., DelValls, T.A., Martín-Díaz, M.L. 2014. Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species. *Environ Res*, v 134, pp 353-365.
- Mesquita, S.R., Guilhermino, L., Guimarães, L. 2011. Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Chemosphere*, v 85, pp 967-976.
- Munari, M., Marin, M.G., Matozzo, V. 2014. Effects of the antidepressant fluoxetine on the immune parameters and acetylcholinesterase activity of the clam *Venerupis philippinarum*. *Mar Environ Res*, v 94, pp 32-37.
- Mc Farland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., Mccant, D.D. 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bull-head, *Ameiurus nebulosus*. *Arch Environ Contam Toxicol*, v 241, pp 236–241.
- Nödler, K., Voutsas, D., Licha, T. 2014. Polar organic micropollutants in the coastal environment of different marine systems. *Marine Poll Bull*, v 85, pp 50-59.
- Olive, P.L. 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen*, v 11, pp 487–495.
- Pait, A.S., Warner, S.I., Hartwell, J.O., Nelson, P.A., Pacheco, and A.L. Mason. 2006. Human Use Pharmaceuticals in the Estuarine Environment: A Survey of the Chesapeake Bay, Biscayne Bay and Gulf of the Farallones. NOS NCCOS 7. Silver Spring, MD. NOAA/NOS/NCCOS/Center for Coastal Monitoring and Assessment. 21pp.

Peters, J.R., Granek, E.F. 2016. Long-term exposure to fluoxetine reduces growth and reproductive potential in the dominant rocky intertidal mussel, *Mytilus californianus*. *Sci Total Environ*, pp 621-628. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.118.

Pham, Vy.T., Nguyen, T.Q., Dao, U.P.N., Nguyen, T.T. 2018. On the interaction between fluoxetine and lipid membranes: Effect of the lipid composition. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 191, pp 50–61.

Seo, I., Jha, B.K., Lim, J-G., Suh, S-II., Suh, M-H., Baek, W-K. 2014. Identification of lysosomotropic compounds based on the distribution and size of lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun*, v 450, pp 189-194.

Silva, L.J.G., Pereira, A.M.P.T., Meisel, L.M., Lino, C.M., Pena, A. 2015. Reviewing the serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: Uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. *Environ Pollut*, v 197, pp 127-143.

Silva, L.J.G., Martins, M.C., Pereira, A.M.P.T., Meisel, L.M., Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., Lino, C.M., Pena, A. 2016. Uptake, accumulation and metabolization of the antidepressant fluoxetine by *Mytilus galloprovincialis*. *Environ Pollut*, v 213, pp 432-437.

Silva, L.J.G., Pereira, A.M.P.T., Rodrigues, H., Meisel, L.M., Lino, C.M., Pena, A. 2017. SSRIs antidepressants in marine mussels from Atlantic coastal areas and human risk assessment. *Sci Total Environ*, pp 118-125. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.076.

Stanley, J.K., Ramirez, A.J., Chambliss, C.K., Brooks, B.W. 2007. Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere*, v 69, pp 9-16.

Stewart, A.M., Grossman, L., Nguyen, M., Maximino, C., Rosemberg, D.B., Echevarria, D.J; Kalueff, A.V. 2014. Aquatic toxicology of fluoxetine: Understanding the knowns and the unknowns. *Aquat Toxicol*, vol 156, pp 269–273.

Szabó, L., Mile, V., Kiss, D.J., Kovacs, K., Foldes, T., Nemeth, T., Toth, T., Homlok, R., Balogh, G.T., Takacs, E., Wojnarovits, L. 2018. Applicability evaluation of advanced processes for elimination of neurophysiological activity of antidepressant fluoxetine. *Chemosphere*, v 193, pp 489-497.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf*, v 64, pp 178-189.

Vasskog, T., Anderssen, T., Pedersen-Bjergaard, S., Kallenborn, R., Jensen, E. 2008. Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. [J Chromatogr A](#), vol 1185, pp 194-205.

Wille, K., Noppe, H., Verheyden, K., Vanden Bussche, J., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., De Brabander, H.F., Vanhaecke, L., 2010. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. *Anal Bioanal Chem* 397, 1797–1808.

Wills, E.D. 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell, K., Mullock, B. (Eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, USA, pp 127–150.

Wong, D.T., Bymaster, F.P., Engleman, E.A. 1995. PROZAC (Fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sciences*, vol

*CAPÍTULO 4 - Metformina: Contaminação da baía de Santos e
efeitos citogenotóxicos em concentrações ambientalmente
relevantes*

1 Introdução

O antidiabético metformina (MET) está entre os produtos farmacêuticos mais prescritos e, em humanos, é usada para regular os níveis de glicose agindo por meio de mecanismos dependentes e independentes de AMPK (adenosina monofosfato quinase - regulação do metabolismo celular); por inibição da respiração mitocondrial, pela inibição da enzima glicerofosfato desidrogenase mitocondrial e por um mecanismo envolvendo os lisossomos (Hawley et al., 2010; Rena et al., 2017). Nos Estados Unidos (EUA) o total de prescrições dispensadas em 2015 alcançou 4.368 milhões e, a MET foi classificada entre os 7 principais fármacos prescritos no período de 2011 a 2015. Essa demanda foi maior em algumas áreas de terapia, como no tratamento da diabetes, que registraram aumentos de cerca de 10% (IMS, 2016). No Brasil a MET está entre os fármacos mais prescritos no controle da diabetes e está inserida na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, com distribuição gratuita no sistema de saúde (RENAME, 2017). Com o aumento alarmante do número de pessoas com diabetes, esta doença tem sido considerada uma epidemia global e, além disso, é previsto que o número total de diabéticos atinja 366 milhões em 2030. (Wild et al., 2004; Briones et al., 2016).

Uma vez administrada, a MET não é metabolizada e é excretada via urina de forma inalterada (Wild et al., 2004). Nesse contexto, a MET e seu subproduto da biodegradação, Guanylyurea (GNA), têm sido detectados em efluentes de estação de tratamento de esgoto (STP), bem como em compartimentos ambientais (van Nujis et al., 2010; Trautwein et al., 2014; Kosma et al., 2015; Briones et al., 2016; Ali et al., 2017). Torna-se importante ressaltar que devido ao amplo uso da MET, essa substância tem sido considerada um dos principais componentes dos efluentes de ETE (Briones et al., 2016). No estudo realizado por Scheurer et al. (2012) na Alemanha, a MET foi detectada em uma faixa de 1.200 ng/L a 10.000 ng/L. Huber et al. (2016) detectaram MET em amostras de efluentes das Ilhas Faroe, da Islândia e Groelândia em uma faixa de concentrações que variou de 234 ng/L a 7950 ng/L. Nos EUA, em amostras de efluente, Meador et al. (2016) observaram concentrações de MET que variaram de 29.300 ng/L a 82.700 ng/L. No Canadá, em um estudo de ocorrência dos fármacos mais prescritos (Top 11) em efluentes, Ghoshdastidar et al. (2015) detectaram MET na concentração de 10.600 ng/L. Os mesmos autores ressaltam a polaridade da MET e como consequência a alta mobilidade desse fármaco no ambiente aquático. Em águas superficiais dulcícolas (rios e lagos), o fármaco MET foi detectado em concentrações que variaram de 610 ng/L - 4100 ng/L (Scheurer et al., 2012; Blair et al., 2013; Kong et al., 2015).

Em zonas costeiras são poucos os estudos que tenham identificado e quantificado MET em águas superficiais e as concentrações encontradas variaram entre 33 ng/L - 3000 ng/L e entre 105 ng/L - 832 ng/L em água do mar e estuarina, respectivamente (Trautwein et al., 2014; Meador et al., 2016; Ali et al., 2017).

Com relação aos estudos ecotoxicológicos, os dados na literatura são limitados (KWR, 2014). No estudo realizado por Cleuvers (2003) foram empregados ensaios de toxicidade (avaliação de efeitos agudo e crônico) padronizados para avaliação da toxicidade da MET com concentrações de efeito na ordem de mg/L em organismos aquáticos dulcícolas. Estudos mais recentes, apontam a MET como uma substância capaz de agir como desregulador endócrino em peixes a concentrações ambientalmente relevantes que variaram de 1 ng/L - 40.000 ng/L (Niemuth & Klaper, 2015; Niemuth et al., 2015; Crago et al., 2016, 2018). Em estudos sobre a bioacumulação da MET, Solla et al. (2016) estimaram um fator de bioacumulação (BAF) de 0,66 no molusco bivalve *Lasmigona costata*. Meador et al. (2016) observaram uma concentração de 28 ng/g de MET em tecidos da espécie de peixe *Leptocottus armatus*.

Embora MET tenha sido detectada em água superficial marinha e estuarina, até o momento não há na literatura estudos sobre a ocorrência de MET em zonas costeiras tropicais. Além disso, não há dados sobre os efeitos biológicos subletais da MET em invertebrados marinhos. Nesse contexto, objetivamos identificar e quantificar o fármaco MET em amostras de água do mar coletadas na Baía de Santos-SP, bem como empregar uma bateria de biomarcadores de exposição e efeitos com bivalve marinho *Perna perna*.

2 Material e Métodos

2.1 Fármaco de interesse

O fármaco Metformina - 1,1 Dimetil Cloridrato de Biguanida (CAS Number 1115-70-4; peso molecular 165.63; pureza $\geq 97\%$) bem como todos os outros reagentes utilizados nesse estudo foram adquiridos na Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). A Figura 1 apresenta a estrutura química da Metformina.

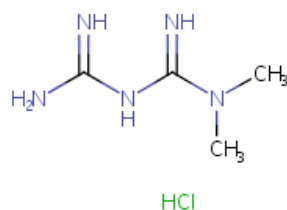


Figura 1. Estrutura química do fármaco Metformina

2.2 Área de estudo e amostragem

A coleta das amostras de água foi realizada em 6 pontos (superfície - S e fundo - F) no entorno do emissário submarino de esgoto na Baía de Santos (Figura 2), considerando as possibilidades de dispersão da pluma de efluente. Em cada estação de amostragem foram coletados três litros de água S (1m) e água F (8m) utilizando uma garrafa de Van Dorn. As amostras foram colocadas em frascos de vidro âmbar previamente limpos com HNO_3 , metanol e água destilada e foram transportados para o laboratório em caixa térmica com gelo ($<6^\circ\text{C}$), posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o processamento.



Figura 2. Pontos de amostragem na Baía de Santos.

2.3 Preparação das amostras

As amostras de água do mar (campo) e as amostras de água do bioensaio (soluções-teste) foram preparadas de acordo com Pereira et al. (2016). Inicialmente, o pH de cada amostra foi ajustado para $7,0 \pm 0,5$ antes da extração, utilizando uma solução de HCl (1M) e, posteriormente, as amostras foram filtradas através de papel filtro Whatman (diâmetro GF/C 47 mm, retenção de partículas 1,2 μm , Merck, Darmstadt, Alemanha). Os filtros foram lavados com 2 mL de metanol e o extrato de metanol recolhido foi adicionado à amostra filtrada. As amostras foram então submetidas a extração em fase sólida usando cartuchos Chromabond HR-X (3 mL, 200 mg, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Os cartuchos de SPE foram pré-condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água Milli-Q e as amostras filtradas (misturadas com extrato de metanol) foram carregadas nos cartuchos. Após as amostras terem sido carregadas, os cartuchos foram lavados com 5 mL de água Milli-Q (2 vezes) e depois secos sob vácuo durante 30 minutos. A etapa de eluição foi realizada com 5 mL de acetona e duas vezes com 5 mL de metanol. Após a eluição, as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio, ressuspensas em 1 mL com solução de água/acetonitrila (95: 5, v / v) e filtradas em filtro de 0,45 μm (Millipore) antes da análise por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

2.4 Análise química (LC-MS/MS)

Para determinação da MET nas amostras ambientais, 10 μL do eluato de cada amostra foram analisadas por um HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, CA, EUA) combinado com um espectrômetro de massas triplo quadrupolo híbrido íon trap/LC-QqLIT ABSciex, Ontario (Canadá). As amostras de água do mar foram analisadas por uma coluna Agilent Eclipse XDB-C18 $4,6 \times 50$ mm, 1,8 μm a 25°C, e a fase móvel em 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich LC-MS Grade) em água (solvente A) e acetonitrila (JT Baker LC-MS Grade) (solvente B). Um gradiente linear de 0,7 mL $\cdot$ min⁻¹ foi usado, começando com uma mistura de 95% de solvente A e 5% de solvente B. A concentração do solvente “A” diminuiu linearmente de 95% para 5% ao longo de 5 min e esta condição foi mantida por 1 minuto. A mistura foi então devolvida às condições iniciais ao longo de 2 minutos e a MET foi detectada e quantificada usando fonte de ionização por “electrospray” (ESI - modo positivo) no modo Monitoramento de Reação Múltipla (MRM), com a seleção de um íon precursor e dois produtos de íons para quantificar e qualificar o composto (Tabela 1) (Pereira et al. 2016).

Os parâmetros da fonte de íons adotados foram (i) gás de interface - 20 a.u; (ii) gás de colisão - 8 a.u; (iii) voltagem da ESI - 5500; (iv) temperatura do gás de origem - 650°C; (v) gás do nebulizador - 40 a.u; (vi) gás de aquecimento - 65 a.u. Posteriormente foi empregada uma curva de calibração matriz, como descrito por Wille et al. (2010).

Tabela 1. Parâmetros MRM para o modo de íon positivo, limite de detecção, limite de quantificação e tempo de retenção.

Fármaco	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	RT (min.)
Metformina	130,1	71,1	26	27	2	0.21	0.69	0,67
		60,0	26	17	2			

Q1 (primeiro quadrupolo); Q3 (último quadrupolo); DP (potencial de desagregação); CE (energia de colisão); CXP (Potencial de Saída de Colisão); LOD (Limites de detecção); LOQ (limites de quantificação); RT (tempo de retenção). No Q3, na célula superior, encontra-se o íon quantificador e na célula inferior o íon qualificador.

Para determinação da concentração de MET nos ensaios, 1L da água marcada com o fármaco foi coletada no início do experimento e preparadas como as amostras ambientais. A análise de espectrometria de massa foi realizada por meio de um espectrômetro de massa Varian 310 triplo quadrupolo (Varian Inc., Walnut Creek, CA) com uma fonte ESI (ESI-MS), por infusão direta. A aquisição de dados foi controlada com o Varian MS Workstation versão 6.9 (Varian Inc.). A análise da amostra foi realizada em modo ESI positivo com uma voltagem de agulha de 20kV. A temperatura capilar foi de 200°C, a pressão do gás de secagem de 20 psi e a pressão do gás de nebulização de 40 psi. A MET foi detectada e quantificada usando o modo de Monitoramento de Reação Múltipla (MRM), com a seleção de um íon precursor (130,1 m/z) e dois íons produtos para quantificar e qualificar a MET (71,1 e 60,0 m/z, respectivamente). Uma curva de calibração foi empregada, como descrito por Wille et al. (2010).

2.5 Coleta e manutenção do organismo modelo - molusco bivalve *Perna perna*

Mexilhões adultos foram adquiridos de um cultivo localizado na Praia da Cocanha (Caraguatatuba, SP, Brasil), devido a boa qualidade ambiental da área (CETESB, 2016). Os organismos foram transportados ao laboratório em caixa térmica, mantidos em um tanque de 300 L de água do mar com fornecimento de alimentos (microalga), sob temperatura constante ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e sistema de aeração e filtração.

2.6 Biomarcadores

2.6.1 Exposição dos organismos

Os mexilhões foram aclimatados durante uma semana em água do mar sob condições controladas. Após esse período, os organismos ($n=21$) foram expostos a aquários com diferentes concentrações de MET (30 ng/L; 300 ng/L e 3000 ng/L) e controle de água, em triplicata, por 96 horas. Essas concentrações foram determinadas de acordo com estudos préteritos que detectaram MET em efluentes e águas superficiais.

Para cada réplica de todos os tratamentos, 7 organismos foram expostos em 10 L de soluções-teste e controles. Após 48h de exposição todas as réplicas das soluções-teste e os controles foram renovados. A água do mar natural usada no ensaio foi filtrada através de uma membrana de 200 μm para remoção de partículas maiores e, dessa forma manter um suprimento de alimento (fitoplâncton), uma vez que durante o experimento nenhuma outra fonte de alimento foi adicionada.

2.6.2 Extração e armazenamento de tecidos

Os tecidos hemolinfa, brânquia e glândula digestiva foram extraídos para análise dos biomarcadores em três tempos de exposição; T0, T48h e T96h. Nesse sentido, os organismos foram removidos de cada réplica dos diferentes tratamentos, totalizando 10 mexilhões para T48h e 11 mexilhões para T96h. Imediatamente após a remoção da hemolinfa, as lâminas foram preparadas para análise da estabilidade da membrana lisossomal (LMS). Após este procedimento as brânquias e as glândulas digestivas foram dissecadas, separadas em microtubos devidamente identificados e estocadas em ultrafreezer (-80°C) até a análise dos biomarcadores.

2.6.3 Preparação de tecidos brânquia e glândula digestiva

As brânquias e glândulas digestivas de cada organismo foram descongeladas em gelo, pesadas e homogeneizadas com 4 vezes o volume do tampão constituído por NaCl 100 mM, HEPES-NaOH 25 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, pH 7,5, com uso de um homogeneizador (Tissue Tearor). Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado a 4°C a 15.000g por 20 minutos, obtendo-se a fração sobrenadante, onde as atividades de CYP450 like (Etoxiresorufina-O-deetilase - EROD e Dibenzilfluoresceína - DBF), Glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPX), colinesterase (ChE), bem como a concentração de proteínas na fração de células citoplasmáticas, foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976). Separou-se uma alíquota de tecido homogeneizado para análises de Lipoperoxidação (LPO) e de danos em DNA. A concentração de proteína dessa alíquota também foi avaliada pelo método de Bradford (1976).

2.6.4 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

A atividade do EROD foi avaliada pelo método adaptado de Gagné e Blaise (1993). A transformação de 7-hidroxiresorufina em resorufina (atividade EROD) foi determinada fluorometricamente usando filtros de 520 nm (excitação) e 590 nm (emissão). A determinação da 7-hidroxiresorufina nas amostras foi realizada utilizando uma curva de calibração padrão de 7-hidroxiresorufina. Os resultados foram expressos como pmol/min./mg de proteína.

2.6.5 Dibenzilfluoresceína (DBF)

A determinação da atividade da DBF foi realizada de acordo com o método descrito por Gagné et al. (2007). Para isso, foi utilizado como substrato, 10 µM de dibenzilfluoresceína incubada com uma solução de 1 mM de NADPH em uma solução de teste (50 mM de NaCl contendo 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,4). A fluorescência da amostra foi medida com um filtro de excitação de 485 nm e 516 nm. Os resultados foram expressos em pmol/min./mg de proteína.

2.6.6 Glutathione-S-Transferase (GST)

O método utilizado para determinar a atividade da GST foi adaptado de Mc Farland et al. (1999). A atividade foi analisada usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 42 mM (CDNB), GSH 1 mM como substrato e medido a 340 nm a cada 30 segundos durante 3 minutos. Os resultados foram expressos como OD/min./mg de proteínas.

2.6.7 Glutathione peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da GPx foi realizada de acordo com o método proposto por Mc Farland et al. (1999). A atividade da GPx foi medida a 340 nm a cada 2 minutos durante 10 minutos, utilizando hidróperóxido de cumeno 1 mM como substrato. A diminuição na absorbância de NADPH medida a 340 nm durante a oxidação de NADPH a NADP⁺ foi indicativa da atividade de GPx. Os resultados foram expressos como nmol/min./mg de proteína.

2.6.8 Lipoperoxidação (LPO)

A análise de peroxidação lipídica foi realizada pelo método do ácido tiobarbitúrico (Wills, 1987). Esta determinação foi empregada por fluorescência utilizando 516 nm (excitação) e 600 nm (emissão). Os padrões de tetrametoxipropano foram preparados em solução de homogeneização. Os resultados foram expressos em μ M TBARs/mg proteínas.

2.6.9 Danos em DNA

O dano ao DNA foi avaliado pelo ensaio de precipitação alcalina (Olive, 1988), utilizando fluorescência para quantificar traços de DNA (Gagné & Blaise, 1993). Mediu-se a fluorescência utilizando um filtro de 360 nm (excitação) e 450 nm (emissão) e utilizou-se um padrão de DNA genômico de espermatozoides de salmão (Sigma) para a calibração. Os resultados foram expressos em μ g/mg de proteína.

2.6.10 Colinesterase (ChE)

A análise das atividades de ChE das brânquias e glândulas digestivas foram realizadas de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961) utilizando uma concentração de 0,3 mM de iodeto de acetilcolina no ensaio enzimático. A variação da absorbância por minuto em 412 nm a 25°C foi registrada em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol DNTB}/\text{min.}/\text{mg}$ de proteína.

2.6.11 Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (VN)

O ensaio de VN foi realizado de acordo com o método descrito por Lowe et al. (1994) para avaliar a estabilidade da membrana lisossomal (LMS).

Os mexilhões foram removidos dos aquários e com o auxílio de uma seringa contendo soro fisiológico (pH 7,3) foram retirados 40 μL de hemolinfa de cada organismo e colocados em lâminas de vidro, que foram transferidas para câmara escura e úmida por 15 minutos para promover a aderência das células na lâmina. Em seguida, o excesso de líquido foi removido e 40 μL do corante vermelho neutro (NR) foram adicionados em todas as lâminas. Após mais 15 minutos de incubação, as lâminas foram analisadas periodicamente (a cada 15 minutos). O ponto final foi o tempo em que pelo menos 50% das células examinadas por microscopia óptica (400x) exibiram perda de corante dos lisossomos para o citosol ou anormalidades estruturais.

2.7 Análise dos dados

O teste T de Student foi empregado para avaliar diferenças entre o T0 e os controles de água. Como não foi detectada diferença, controles de água foram utilizados como referências para os tempos de exposição de 48h e 96h. Posteriormente foi empregado análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett para identificar as concentrações significativamente diferentes dos controles de água. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. O software Prism v.7 foi empregado para ANOVA e análise pos-hoc.

3 Resultados

3.1 Concentrações Ambientais

A Tabela 2 apresenta as concentrações ambientais de MET. O fármaco MET foi quantificado em água superficial nos pontos 2, 5 e 6 e, em água de fundo apenas no ponto 3.

Tabela 2. Concentração ambiental de MET em amostras de águas superficiais e de fundo (1-6 estações de amostragem) da Baía de Santos.

Concentração de MET (ng/L)						
	1	2	3	4	5	6
Superfície (S)	<LOD	2,77	<LOD	<LOD	2,29	2,48
Fundo (F)	<LOD	<LOD	1,82	<LOD	<LOD	<LOD

3.2 Biomarcadores

As concentrações nominais e reais de MET no tempo $T = 0$ estão indicadas na Tabela 3. As concentrações nominais foram semelhantes às determinadas em $T = 0$.

Tabela 3. Concentrações nominais e medidas de MET (T_0) nos experimentos com biomarcadores.

Concentração nominal (ng/L)	Concentração real (ng/L)
0	<LOD
30	27,68
300	288,80
3000	2833,57

<LOD - abaixo do limite de detecção; T_0 - início do experimento

As atividades de EROD, DBF, GST, GPX e ChE bem como LPO e danos em DNA no tecido das brânquias, estão demonstrados na Figura 3.

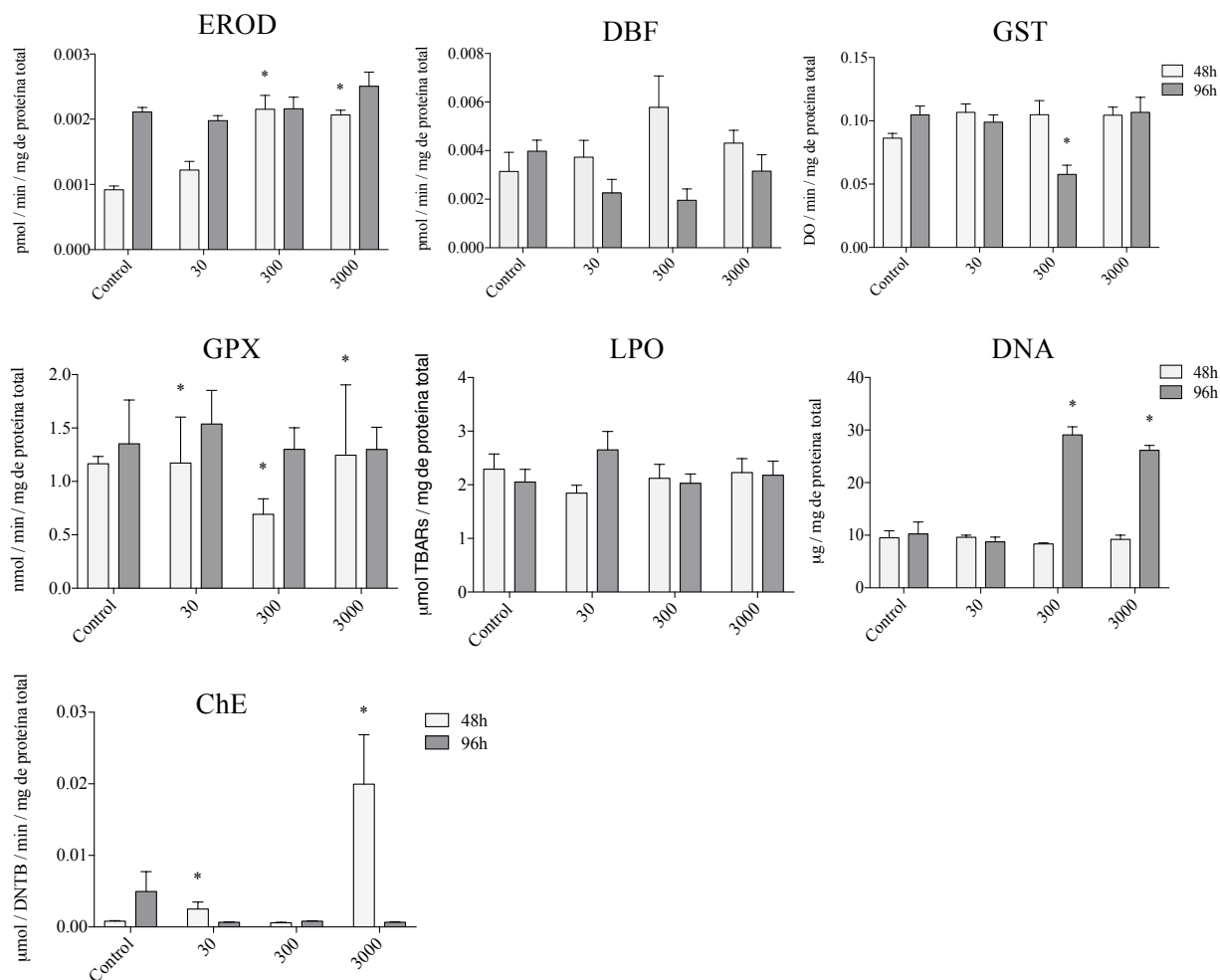


Figura 3. Resultados obtidos pelos biomarcadores em brânquias de organismos expostos a metformina. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle (p<0,05).

Os resultados obtidos com os biomarcadores em brânquias demonstraram que, com relação à biotransformação, a atividade enzimática EROD foi significativamente ativada com 48h de exposição nas concentrações de 300 ng/L e 3000 ng/L. Com relação à fase II, foi observado diferença significativa na inibição da atividade da GST com 96h de exposição, na concentração de 300 ng/L. Danos em DNA foram observados nas concentrações de 300 ng/L e 3000 ng/L com 96h de exposição. A atividade da ChE foi induzida significativamente nas concentrações de 30 ng/L e 3000 ng/L.

As atividades de EROD, DBF, GST, GPX e ChE, bem como LPO e danos em DNA no tecido das glândulas digestivas, estão demonstrados na Figura 4.

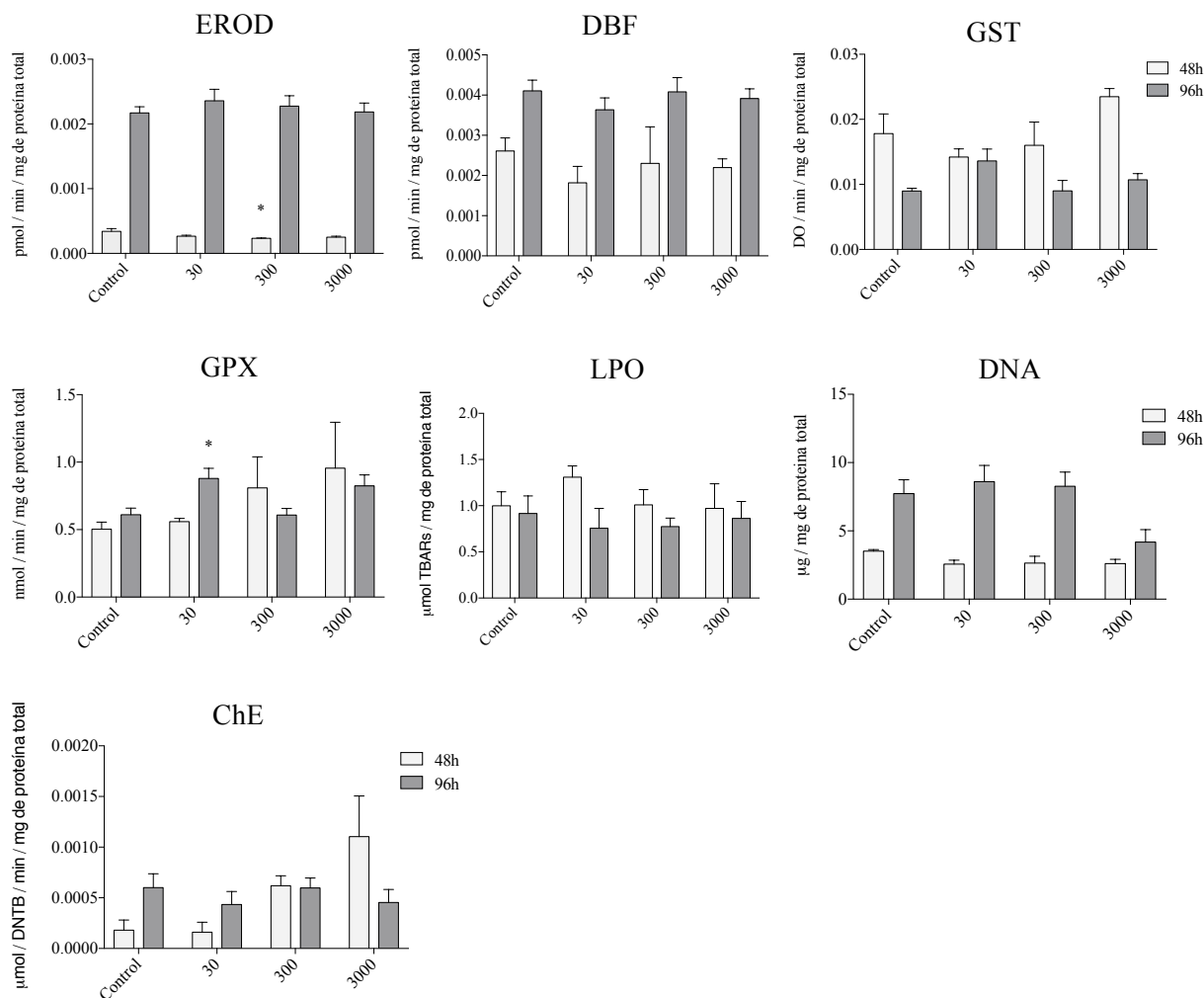


Figura 4. Resultados obtidos pelos biomarcadores em glândulas digestivas de organismos expostos a metformina. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle (p<0,05).

Os resultados obtidos com as análises dos biomarcadores em glândulas digestivas demonstraram inibição da atividade de EROD na concentração de 300 ng/L com 48h de exposição. Apenas na atividade da GPX foi possível observar uma indução significativa na concentração de 30 ng/L com 96h de exposição.

Os efeitos da FLX sobre a estabilidade da membrana lisossomal estão demonstrados na Figura 5.

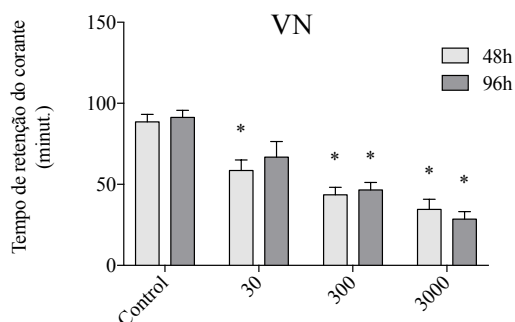


Figura 5. Resultado do ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Efeitos significativos na estabilidade da membrana lisossômica ocorreram a partir de 48h de exposição em todas as concentrações analisadas. Com 96h de exposição efeitos significativos foram observados nas concentrações de 300 ng/L e 3000 ng/L.

4 Discussão

O antidiabético MET é introduzido no ambiente aquático principalmente por meio de lançamentos de efluentes de ETE (Oosterhuis et al., 2013; Trautwein et al., 2014; Huber et al., 2016) e de efluentes hospitalares (Santos et al., 2013). De acordo com Trautwein & Kummerer (2011) a MET não é facilmente biodegradada em determinadas condições ambientais (aeróbias). No presente estudo, os dados obtidos na análise química para determinação das concentrações reais no ensaio foram próximos às concentrações nominais de MET.

Com relação às concentrações ambientais, em áreas costeiras Trautwein et al. (2014) detectaram pela primeira vez MET em todas as amostras de água coletadas no Mar do Norte ($n=14$), obtendo uma média de concentração de 13 ng/L. Em uma área estuarina de região temperada (EUA), Meador et al. (2016) detectaram MET em amostras de água em um range de concentração que variou de 105 ng/L - 832 ng/L. Em uma zona costeira na Arábia Saudita (Mar Vermelho), MET foi detectada em amostras de água marinha em um range de

concentração que variou de 7 ng/L - >3000 ng/L (Ali et al., 2017). Nesse mesmo estudo, os autores concluíram que MET foi um dos fármacos mais abundantes nas amostras analisadas, com uma frequência de detecção de 85%. Nas amostras de água do mar da Baía de Santos, o fármaco MET foi quantificado em 4 das 12 amostras analisadas em um range de concentração que variou de 1,82 ng/L - 2,77 ng/L.

Em relação aos estudos realizados em zonas costeiras, as concentrações de MET obtidas na Baía de Santos foram menores e, o range encontrado variou menos. Esse fato pode estar relacionado ao procedimento de cloração empregado após o pré-condicionamento das águas residuais coletadas na região de Santos e São Vicente. Scheurer et al. (2012) demonstraram em um estudo sobre a ocorrência e destino de MET e de seu subproduto GNA em água de abastecimento que, dentre os diferentes processos empregados para o tratamento da água, a cloração foi o mais efetivo quanto à degradação da MET. Nesse processo, o fármaco MET degradou em 90% no período de 24h na concentração de 0,2 mg/L de cloro, enquanto que uma degradação de 99% ocorreu em 8h com 1 mg/L de cloro.

Com relação aos dados obtidos a partir da análise dos biomarcadores, foi possível observar a indução da atividade de CYP-*like* (EROD) a partir da concentração de 300 ng/L de MET com 48h de exposição em brânquias. Em um estudo toxicológico, Chatuphonprasert et al. (2012) observaram a indução significativa da expressão do RNAm de CYP1A1 em camundongos normais e diabéticos tratados por 2 semanas com 100 mg/Kg/dia de MET. O metabolismo de xenobióticos podem formar, por meio de uma variedade de reações, espécies reativas de oxigênio (ROS) e consequentemente causar estresse oxidativo e danos celulares. Esse fato pode induzir a atividade de enzimas antioxidantes na proteção contra os danos oxidativos (Maranho et al., 2014; Donaghy et al., 2015). Nesse sentido, a atividade da GPx foi induzida significativamente em brânquias (30 ng/L e 3000 ng/L com 48h de exposição) e glândula digestiva (30 ng/L com 96h de exposição). Em eritrócitos de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 tratados com MET, Memisogullar et al. (2008) observaram um aumento significativo da atividade da GPx quando comparado a um grupo de pacientes o qual não foi ministrada o fármaco. No estudo de Akila et al. (2018) foi observado que a MET restabeleceu os níveis de defesa antioxidante em roedores diabéticos.

O potencial antioxidante da MET (Dai et al., 2014; Obi et al., 2016) pode estar relacionado à ausência de lipoperoxidação observada em ambos os tecidos analisados no presente estudo. Por outro lado, MET causou danos em DNA em brânquias de organismos expostos à 300 ng/L e 3000 ng/L com 96h de exposição. Onaran et al. (2006) observaram que

a MET, apesar de possuir propriedades antioxidantes, não foi capaz de proteger linfócitos humanos cultivados e expostos à agentes oxidantes, contra danos em DNA. Genotoxicidade (ensaio cometa) também foi observada em células de ovário de hamsters, incubadas por 24h em uma concentração de 114,4 µg/mL de MET (Amador et al., 2012). O aumento significativo da atividade de ChE (30 ng/L e 3000 ng/L com 48h) que ocorreu em brânquias pode estar relacionado aos efeitos membranotrópicos observado na estabilidade da membrana do lisossomo. Zhang et al. (2002) reportaram que a indução de ChE está associada à apoptose celular em várias células humanas e de outros mamíferos, possivelmente porque a ChE é liberada após a ruptura da membrana celular.

Os efeitos na estabilidade da membrana lisossomal apresentaram uma tendência concentração-tempo dependente. A inibição no tempo de retenção do corante vermelho neutro ocorreu significativamente em todas as concentrações analisadas com 48h de exposição e a partir de 300 ng/L com 96h de exposição. No estudo realizado por Caminada et al. (2006), duas linhagens de células (PLHC-1 e RTG-2) da espécie de peixe *Oncorhynchus mykiss* expostas à MET, não apresentaram citotoxicidade mensurável ($CE_{50} > 2,5$ mM).

Há na literatura uma escassez de dados sobre os efeitos adversos causados pela MET em organismos marinhos (vertebrados e invertebrados), que tenham considerado respostas metabólicas e os efeitos subletais. No estudo de Cleuvers (2003), a MET causou efeitos em concentrações de 64 mg/L, >320 mg/L e 110 mg/L nos organismos aquáticos dulcícolas *Daphnia magna* (imobilização), *Desmodesmus subspicatus* e *Lemna minor* (inibição do crescimento), respectivamente. A maioria dos estudos ecotoxicológicos encontrados foram realizados empregando peixes de ambiente dulcícola como organismo modelo e, com uma abordagem molecular. Niemuth et al. (2015) observaram a indução de vitelogenina em peixe (*Pimephales promelas*) expostos por 4 semanas à 40 µg/L de MET. Feminização em peixes (*Pimephales promelas*) machos expostos à 40 µg/L de MET por 320 dias, também foi observada por Niemuth & Klaper (2015). Nos demais estudos com peixes de água doce (fathead minnow e zebrafish), os autores detectaram em concentrações ambientalmente relevantes de MET, efeitos significativos na redução do tamanho e fertilidade dos organismos, indução de CYP19A2 (envolvido na diferenciação sexual), expressão de genes ligados a funções reprodutivas e estrogenicidade (Crago et al., 2016; Crago & Klaper, 2018; Niemuth & Klaper, (2018).

Em um estudo populacional com duas espécies de rotíferos, García-García et al. (2017) observaram que concentrações de MET já detectadas em efluentes inibiram o

crescimento populacional em ambas as espécies. Alterações comportamentais (diminuição da agressividade) foram observadas em peixes da espécie *Betta splendens* expostos à concentrações ambientais de MET por 5 meses (MacLaren et al, 2018).

De acordo com Briones et al. (2016), o amplo uso da MET, a ocorrência significativa em águas superficiais e o potencial desse fármaco agir como interferente endócrino em organismos não-alvo levam à necessidade de uma atenção urgente relacionadas aos aspectos ecotoxicológicos. Nesse contexto, torna-se importante ressaltar que metade da carga farmacêutica total em estações de tratamento de esgoto (ETEs) deve corresponder à MET e, estudos sobre ocorrência e toxicidade no ambiente marinho têm sido em grande parte ignorados (Trautwein et al., 2014).

5 Conclusão

O fármaco MET alterou significativamente o metabolismo de biotransformação, bem como promoveu efeitos citogenotóxicos. A espécie utilizada como modelo biológico demonstrou ser adequada para estudos com essa classe de medicamento e apresentou maior responsividade no tecido das brânquias. Esse é o primeiro estudo sobre os efeitos subletais da MET em um invertebrado marinho e os resultados poderão subsidiar avaliações de risco ambiental e programas de monitoramento.

Referências

- Ali, A.M., Rønning, H.T., Alarif, W., Kallenborn, R., Al-Lihaibi, S.S. 2017. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in effluent- dominated Saudi Arabian coastal waters of the Red Sea. *Chemosphere*, vol 175, pp 505-513.
- Akila, G., Djamil, K., Nawal, D., Saadia, B. 2018. Comparative study of antihypertensive and antioxidant effects of clove and metformin on renal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *PharmaNutrition*, vol 6, pp 37-44.
- Amador, R.R., Longo, J.P.F., Lacava, Z.G., Dórea, J.G., Santos, M.F.M.A. 2012. Metformin (dimethyl-biguanide) induced DNA damage in mammalian cells. *Genet Mol Biol*, vol 35, pp 153-158.
- Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Klaper, R.D. 2013. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere*, vol 93, pp 2116-2123.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v 72, pp 248–254.
- Briones, R.M., Sarmah, A.K., Padhye, L.P. 2016. A global perspective on the use, occurrence, fate and effects of anti- diabetic drug metformin in natural and engineered ecosystems. *Environ Pollut*, pp 1-14. doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.040.
- Caminada, D., Escher, C., Fent, K. 2006. Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: Comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquat Toxicol*, vol 79, pp 114-123.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, 2016. Relatório de qualidade das praias no estado de São Paulo. Série Relatórios (pp 184).
- Cleuvers, M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett*, vol 142, pp 185-194.

Crago, J., Bui, C., Grewal, S., Schlenk, D. 2016. Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin. *Gen Comp Endocrinol*, vol 232, pp 185-190.

Crago, J., Klaper, R. 2018. Place-based screening of mixtures of dominant emerging contaminants measured in Lake Michigan using zebrafish embryo gene expression assay. *Chemosphere*, vol 193, pp 1226-1234.

Chatuphonprasert, W., Nemoto, N., Sakuma, T., Jarukamjorn, K. 2012. Modulations of cytochrome P450 expression in diabetic mice by berberine. *Chem Biol Interact*, vol 196, pp 23-29.

Dai, J., Liu, M., Ai, Q., Lin, L., Wu, K., Deng, X., Jing, Y., Jia, M., Wan, J., Li Zhang. 2014. Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. *Chem Biol Interact*, vol 216, pp 34-42.

Donaghy, L., Hong, H.K., Jauzein, C., Choi, K.S. 2015. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol*, vol 42, pp 91-97.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, v 7, pp 88–95.

García-García, G., Reys-Carrillo, G.I., Sarma, S.S.S., Nandini, S. 2017. Population level responses of rotifers (*Brachionus calyciflorus* and *Platyonus patulus*) to the anti-diabetic drug, metformin. *J Environ Biol*, vol 38, pp 1213-1219.

Gagné, F., Blaise, C. 1993. Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Water Res*, v 27, pp 1669–1682.

Gagné, F., André, C., Cejka, P., Gagnon, C., Blaise, C., 2007. Toxicological effects of primary- treated urban wastewaters, before and after ozone treatment, on freshwater mussels (*Elliptio complanata*). *Comp Biochem Physiol, Part C: Toxicol Pharmacol*, v 145, pp 542–552.

Ghoshdastidar, A.J., Fox, S., Tong, A.Z. 2015. The presence of the top prescribed pharmaceuticals in treated sewage effluents and receiving waters in Southwest Nova Scotia, Canada. *Environ Sci Pollut Res*, vol 22, pp 689-700.

Hawley, S.A., Ross, F.A., Chevtzoff, C., Green, K.A., Evans, A., Fogarty, S., Towler, M.C., Brown, L.J., Ogunbayo, O.A., Evans, A.M., Hardie, D.G. 2010. Use of cells expressing γ subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab*, v 11, pp 554-565.

Huber, S., Remberger, M., Kaj, L., Schlabach, M., Jörundsdóttir, H.O., Vester, J., Arnórsson, M., Mortensen, I., Schwartzon, R., Dam, M. 2016. A first screening and risk assessment of pharmaceuticals and additives in personal care products in waste water, sludge, recipient water and sediment from Faroe Islands, Iceland and Greenland. *Sci Total Environ*, vol 562, pp 13-25.

IMS - Medicines Use and Spending in the U.S. Report by the IMS Institute for Healthcare Informatics. 2016. Medicines Use and Spending in the U.S. A Review of 2015 and Outlook to 2020, pp 50.

KWR - Watercycle Research Institute - Holanda. 2014. The occurrence, fate and ecological and human health risks of metformin and guanyurea in the water cycle - A literature review, pp 24.

Kong, L., Kadokami, K., Wang, S., Duong, H.T., Chau, H.T.C. 2015. Monitoring of 1300 organic micro-pollutants in surface waters from Tianjin, North China. *Chemosphere*, vol 122, pp 125-130.

Kosma, C.I., Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A. 2015. Comprehensive study of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanyurea in Greek wastewaters. *Water Res*, vol 70, pp 436-448.

Lowe, D.M., Pipe, R.K. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat Toxicol*, v 30, pp 357-365.

- Maranho, L.A., Baena-Nogueras, R.M., Lara-Martín, P.A., DelValls, T.A., Martín-Díaz, M.L. 2014. Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species. *Environ Res*, vol 134, pp 353-365.
- MacLaren, R.D., Wisniewski, K., MacLaren, C. 2018. Environmental concentrations of metformin exposure affect aggressive behavior in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. doi.org/10.1371/journal.pone.0197259, pp 1-13.
- Meador, J.P., Yeh, A., Young, G., Gallagher, E.P. 2016. Contaminants of emerging concern in a large temperate estuary. *Environ Pollut*, vol 213, pp 254-267.
- Memisogullar, R., Turkeli, M., Bakan, E., Akçay, F. 2008. Effect of metformin or gliclazide on lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with diabetes mellitus. *Turk J Med Sci*, vol 38, pp 545-548.
- Mc Farland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., Mccant, D.D. 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bull-head, *Ameiurus nebulosus*. *Arch Environ Contam Toxicol*, v 241, pp 236–241.
- Niemuth, N.J., Klaper, R.D. 2015. Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere*, vol 135, pp 38-45.
- Niemuth, N.J., Jordan, R., Crago, J., Blanksma, C., Johnson, R., Klaper, R.D. 2015. Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environ Toxicol Chem*, vol 34, pp 291-296.
- Obi, B.C., Okoye, T.C., Okpashi, V.E., Igwe, C.N., Alumanah, E.O. 2016. Comparative study of the antioxidant effects of metformin, glibenclamide, and repaglinide in alloxan-induced diabetic rats. *J Diabetes Res*, vol 2016, Article ID 1635361, pp 5.
- Olive, P.L. 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen*, v 11, pp 487–495.
- Onaran, I., Guven, G.S., Ozdas, S.B., Kanigur, G., Vehid, S. 2006. Metformin does not prevent DNA damage in lymphocytes despite its antioxidant properties against cumene hydroperoxide-induced oxidative stress. *Mutat Res*, vol 611, pp 1-8.

Oosterhuis, M., Sacher, F., Laak, T.L.T. 2013. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. *Sci Total Environ*, vol 442, pp 380-388.

Rena, G., D. Hardie, G., Pearson, E.R. 2017. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, vol 60, pp 1577–1585.

RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - 2017. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, pp 210.

Santos, L.H.M.L.M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Damià Barceló, D., M. Montenegro, M.C.B.S.M. 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci Total Environ*, pp 302-316. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077.

Solla, S.R., Gilroy, E.A.M., Klinck, J.S., King, L.E., McInnis, R., Struger, J., Backus, S.M., Gillis, P.L. 2016. Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care products in the unionid mussel *Lasmigona costata* in a river receiving wastewater effluent. *Chemosphere*, vol 146, pp 486-496.

Scheurer, M., Michel, A., Brauch, H.J., Ruck, W., Sacher, F. 2012. Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylsurea in the environment and during drinking water treatment. *Water Res*, vol 46, pp 4790-4802.

Trautwein, C., Kümmerer, K. 2011. Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylsurea. *Chemosphere*, vol 85, pp 765-773.

Trautwein, C., Berset, J-D., Wolschke, H., Kümmerer, K. 2014. Occurrence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanylsurea in several compartments of the aquatic cycle. *Environ Int*, vol 70, pp 203-212.

van Nuijs, A.L.N., Tarcomnicu, I., Simons, W., Bervoets, L., Blust, R., Jorens, P.G., Neels, H., Covaci, A. 2010. Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater. *Anal Bioanal Chem*, v 398, pp 2211-2222.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. 2004. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 20130. *Diabetes Care*, v 27, pp 1047-1053.

Wills, E.D. 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell, K., Mullock, B. (Eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, USA, pp 127–150.

Wille, K., Noppe, H., Verheyden, K., Vanden Bussche, J., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., De Brabander, H.F., Vanhaecke, L., 2010. Validation and application of an LC-MS/ MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. *Anal Bioanal Chem* 397, 1797–1808.

Zhang, X.J., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J.P., He, H.Y., Jin, Q.H., Guo, L.H., Alemany, M., Zhang, L.Y., Shi, Y.F., 2002. *Cell Death Differ*, vol 9, pp 790–800.

CAPÍTULO 5 - Estudo ecotoxicológico com o hormônio sintético

17 α -etinilestradiol utilizando como organismo modelo o bivalve

Perna perna

1 Introdução

Os hormônios esteróides enquadram-se em um grupo de substâncias biologicamente ativas que podem interferir no funcionamento normal do sistema endócrino, o qual é responsável pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e comportamento dos organismos (Ying et al., 2002; Nasuhoglu et al., 2012). Substâncias com essa capacidade são denominadas disruptores endócrinos (DE) e agem mimetizando os efeitos dos hormônios endógenos, interrompendo a síntese e o metabolismo de hormônios endógenos, bem como levando a um desequilíbrio dos sistemas endócrinos em múltiplos níveis nos organismos expostos.

O fármaco 17 α -etinilestradiol (EE2) é um hormônio sintético bioativo, derivado do hormônio natural estradiol (E2), e é um dos contraceptivos mais utilizados em todo o mundo em terapia contraceptiva e de reposição hormonal, bem como para atividades pecuárias e de aquicultura (Aris et al., 2014; Darbre et al., 2015; Cunha et al., 2016). Esse fármaco foi inserido pela Comissão Européia, por meio da Diretiva 2013 / 39 / UE, em uma lista de vigilância de substâncias químicas que contempla a necessidade de monitorização das concentrações ambientais, bem como dos efeitos biológicos adversos para embasar medidas relacionadas aos riscos ambientais (CE, 2013).

De acordo com Ying et al. (2002) os efluentes das estações de tratamento de esgoto (ETEs), efluentes hospitalares e de atividades pecuárias são as principais vias de entrada dessas substâncias para o ambiente aquático. No estudo realizado por Fernandez et al. (2007) o EE2 foi o hormônio sintético com maior frequência de detecção em amostras de efluentes (Canadá), com concentrações que variaram de <5 ng/L a 178 ng/L. A partir de um banco de dados, considerando 117 publicações do período de 1997 - 2007, Miège et al. (2009) observaram que os hormônios foram a classe de substâncias mais investigadas (30%) e as concentrações de EE2 em efluentes de ETE que passaram pelo tratamento com lodo ativado variaram de 0,2 ng/L - 5 ng/L, com 59% de frequência de ocorrência. Yang et al. (2011) detectaram EE2 em uma concentração média de 140 ng/L em amostras de efluente tratado convencionalmente. Nesse mesmo estudo foi observada uma remoção maior que 90% na concentração de EE2 após o efluente passar por tratamentos avançados (filtração por membranas, adsorção em carvão ativado granular e ozonização). Huang et al. (2013) em um estudo com amostras de efluentes de diferentes ETE, observaram uma variação média na concentração de EE2 de 2,8 ng/L a 26,1 ng/L. Nesse mesmo estudo, EE2 foi detectado em

água superficial do Lago Dianchi (China) em concentrações que variaram de 0,2 ng/L - 61 ng/L. Concentrações de EE2 entre 0,07 ng/L e 0,60 ng/L foram detectadas em águas subterrâneas e superficiais (Li et al., 2013). No Brasil, Moreira et al. (2011) detectaram EE2 no rio das Velhas (Minas Gerais) em um range de concentração que variou de 5,6 ng/L - 63,8 ng/L.

Em ambientes costeiros os estudos sobre a ocorrência de EE2 são escassos, entretanto o fármaco já foi detectado em diferentes matrizes, tais como água superficial e sedimentos, bem como acumulado em tecidos de organismos aquáticos. Em águas superficiais estuarinas e marinhas as concentrações de EE2 variaram de 0,025 ng/L - 101,9 ng/L. EE2 foi detectado em sedimento marinho em um range de concentração que variou de <2 ng/g - 41 ng/g. Em tecido de *Mytilus galloprovincialis* a concentração variou de <3 ng/g - 38 ng/g (Pojana et al., 2007; Ribeiro et al., 2009; Rocha et al., 2012; Fergusson et al., 2013; Santos et al., 2018).

Estudos ecotoxicológicos tem gerado evidências sobre os efeitos nocivos do EE2 em organismos aquáticos. Alterações comportamentais, inibição do crescimento, efeitos reprodutivos, inibição do desenvolvimento gonadal, genotoxicidade, embriotoxicidade, alterações no metabolismo, entre outros efeitos biológicos adversos tem sido observado em espécies aquáticas expostas ao EE2 (Wessel et al., 2007; Yan et al., 2012; Leonard et al., 2014; Borysko et al., 2014; Leonard et al., 2014; Luzio et al., 2016; Valcarce et al., 2017; Chen et al., 2017). Embora evidências sobre os efeitos da exposição a esse fármaco sejam encontradas na literatura, há uma escassez de dados sobre os efeitos subletais em invertebrados marinhos, especialmente de zonas tropicais. Nesse contexto, objetivamos avaliar a atividade de enzimas de biotransformação, antioxidantes e efeitos associados à exposição ao EE2, nos tecidos brânquia (BR), glândula digestiva (GD) e hemolinfa do molusco bivalve *Perna perna*.

2 Material e Métodos

2.1 Fármaco de interesse

O fármaco 17 α -etinilestradiol - 17 α -Ethinyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol (CAS Number 57-63-6; peso molecular 296,40; pureza $\geq$ 98%) bem como todos os outros reagentes utilizados nesse estudo foram adquiridos na Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). A Figura 1 apresenta a estrutura química do 17 α -etinilestradiol.

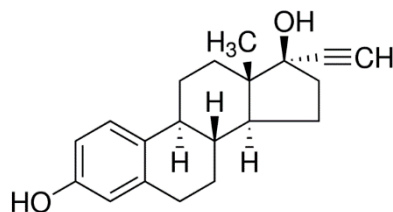


Figura 1. Estrutura química do fármaco 17 α -etinilestradiol

2.2 Coleta e manutenção do organismo modelo - molusco bivalve *Perna perna*

Mexilhões adultos foram adquiridos de um cultivo localizado na Praia da Cocanha (Caraguatatuba, SP, Brasil), devido a boa qualidade ambiental da área (CETESB, 2016). Os organismos foram transportados ao laboratório em caixa térmica, mantidos em um tanque de 300 L de água do mar com fornecimento de alimentos (microalga), sob temperatura constante ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e sistema de aeração e filtração.

2.3 Biomarcadores

2.3.1 Exposição dos organismos

Os mexilhões foram aclimatados durante uma semana em água do mar sob condições controladas. Após esse período, os organismos ($n=21$) foram expostos a aquários com diferentes concentrações de EE2 (30 ng/L; 150 ng/L e 300 ng/L) e controle de água, em triplicata, por 96 horas. Essas concentrações foram determinadas de acordo com estudos pretéritos que detectaram EE2 em efluentes e águas superficiais.

Para cada réplica de todos os tratamentos, 7 organismos foram expostos em 10 L de soluções-teste e controles. Após 48h de exposição todas as réplicas das soluções-teste e os controles foram renovados. A água do mar natural usada no ensaio foi filtrada através de uma membrana de 200 μm para remoção de partículas maiores e, dessa forma manter um suprimento de alimento (fitoplâncton), uma vez que durante o experimento nenhuma outra fonte de alimento foi adicionada.

2.3.2 Extração e armazenamento de tecidos

Os tecidos hemolinfa, brânquia e glândula digestiva foram extraídos para análise dos biomarcadores em três tempos de exposição; T0, T48h e T96h. Nesse sentido, os organismos foram removidos de cada réplica dos diferentes tratamentos, totalizando 10 mexilhões para T48h e 11 mexilhões para T96h. Imediatamente após a remoção da hemolinfa, as lâminas foram preparadas para análise da estabilidade da membrana lisossomal (EML). Após este procedimento as brânquias e as glândulas digestivas foram dissecadas, separadas em microtubos devidamente identificados e estocadas em ultrafreezer (-80°C) até a análise dos biomarcadores.

2.3.3 Preparação de tecidos brânquia e glândula digestiva

As brânquias e glândulas digestivas de cada organismo foram descongeladas em gelo, pesadas e homogeneizadas com 4 vezes o volume do tampão constituído por NaCl 100 mM, HEPES-NaOH 25 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, pH 7,5, com uso de um homogeneizador (Tissue Tearor). Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado a 4°C a 15.000g por 20 minutos, obtendo-se a fração sobrenadante, onde as atividades de CYP450 like (Etoxiresorufina-O-deetilase - EROD e Dibenxilfluoresceína - DBF), Glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPX), colinesterase (ChE), bem como a concentração de proteínas na fração de células citoplasmáticas, foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976). Separou-se uma alíquota de tecido homogeneizado para análises de Lipoperoxidação (LPO) e de danos em DNA. A concentração de proteína dessa alíquota também foi avaliada pelo método de Bradford (1976).

2.3.4 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

A atividade do EROD foi avaliada pelo método adaptado de Gagné e Blaise (1993). A transformação de 7-hidroxiresorufina em resorufina (atividade EROD) foi determinada fluorometricamente usando filtros de 520 nm (excitação) e 590 nm (emissão). A determinação da 7-hidroxiresorufina nas amostras foi realizada utilizando uma curva de calibração padrão de 7-hidroxiresorufina. Os resultados foram expressos como pmol/min./mg de proteína.

2.3.5 Dibenzilfluoresceína (DBF)

A determinação da atividade da DBF foi realizada de acordo com o método descrito por Gagné et al. (2007). Para isso, foi utilizado como substrato, 10 μ M de dibenzilfluoresceína incubada com uma solução de 1 mM de NADPH em uma solução de teste (50 mM de NaCl contendo 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,4). A fluorescência da amostra foi medida com um filtro de excitação de 485 nm e 516 nm. Os resultados foram expressos em pmol/min./mg de proteína.

2.3.6 Glutathione-S-Transferase (GST)

O método utilizado para determinar a atividade da GST foi adaptado de Mc Farland et al. (1999). A atividade foi analisada usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 42 mM (CDNB), GSH 1 mM como substrato e medido a 340 nm a cada 30 segundos durante 3 minutos. Os resultados foram expressos como OD/min./mg de proteínas.

2.3.7 Glutathione peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da GPx foi realizada de acordo com o método proposto por Mc Farland et al. (1999). A atividade da GPx foi medida a 340 nm a cada 2 minutos durante 10 minutos, utilizando hidroperóxido de cumeno 1 mM como substrato. A diminuição na absorbância de NADPH medida a 340 nm durante a oxidação de NADPH a NADP⁺ foi indicativa da atividade de GPx. Os resultados foram expressos como nmol/min./mg de proteína.

2.3.8 Lipoperoxidação (LPO)

A análise de peroxidação lipídica foi realizada pelo método do ácido tiobarbitúrico (Wills, 1987). Esta determinação foi empregada por fluorescência utilizando 516 nm (excitação) e 600 nm (emissão). Os padrões de tetrametoxipropano foram preparados em solução de homogeneização. Os resultados foram expressos em μ M TBARs/mg proteínas.

2.3.9 Danos em DNA

O dano ao DNA foi avaliado pelo ensaio de precipitação alcalina (Olive, 1988), utilizando fluorescência para quantificar traços de DNA (Gagné & Blaise, 1993). Mediu-se a fluorescência utilizando um filtro de 360 nm (excitação) e 450 nm (emissão) e utilizou-se um padrão de DNA genômico de espermatozoides de salmão (Sigma) para a calibração. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína.

2.3.10 Colinesterase (ChE)

A análise das atividades de ChE das brânquias e glândulas digestivas foram realizadas de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961) utilizando uma concentração de 0,3 mM de iodeto de acetilcolina no ensaio enzimático. A variação da absorbância por minuto em 412 nm a 25°C foi registrada em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol DNTB}/\text{min.}/\text{mg}$ de proteína.

2.3.11 Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (VN)

O ensaio de VN foi realizado de acordo com o método descrito por Lowe et al. (1994) para avaliar a estabilidade da membrana lisossomal (LMS).

Os mexilhões foram removidos dos aquários e com o auxílio de uma seringa contendo soro fisiológico (pH 7,3) foram retirados 40 μL de hemolinfa de cada organismo e colocados em lâminas de vidro, que foram transferidas para câmara escura e úmida por 15 minutos para promover a aderência das células na lâmina. Em seguida, o excesso de líquido foi removido e 40 μL do corante vermelho neutro (NR) foram adicionados em todas as lâminas. Após mais 15 minutos de incubação, as lâminas foram analisadas periodicamente (a cada 15 minutos). O ponto final foi o tempo em que pelo menos 50% das células examinadas por microscopia óptica (400x) exibiram perda de corante dos lisossomos para o citosol ou anormalidades estruturais.

2.4 Análise dos dados

O teste T de *Student* foi empregado para avaliar diferenças entre o T0 e os controles de água. Como não foi detectada diferença, controles de água foram utilizados como referências para os tempos de exposição de 48h e 96h. Posteriormente foi empregado análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett para identificar as concentrações significativamente diferentes dos controles de água. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. O software Prism v.7 foi empregado para ANOVA e análise pos-hoc.

3 Resultados

3.1 Biomarcadores

As atividades de EROD, DBF, GST, GPX e ChE, bem como LPO e danos em DNA no tecido das brânquias estão demonstrados na Figura 2.

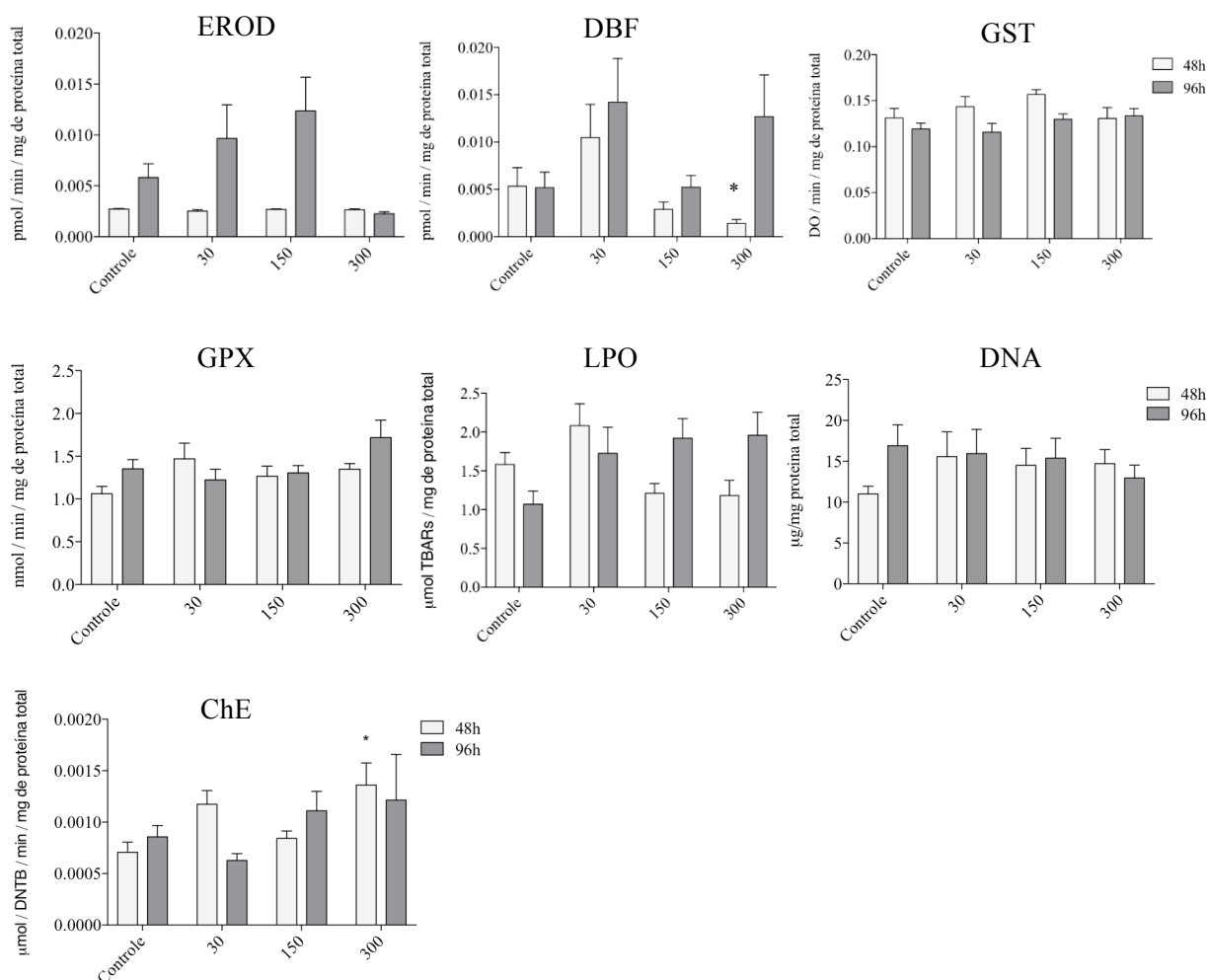


Figura 2. Resultados obtidos pelos biomarcadores em brânquias de organismos expostos ao EE2. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos com os biomarcadores em brânquias demonstraram que, com relação às fase I, DBF foi inibida na maior concentração (48h). Com relação aos biomarcadores de efeito, foi observado um aumento significativo na atividade de ChE na concentração de 300 ng/L com 48h de exposição.

As atividades de EROD, DBF, GST, GPX e ChE, bem como LPO e danos em DNA no tecido das glândulas digestivas estão demonstrados na Figura 3.

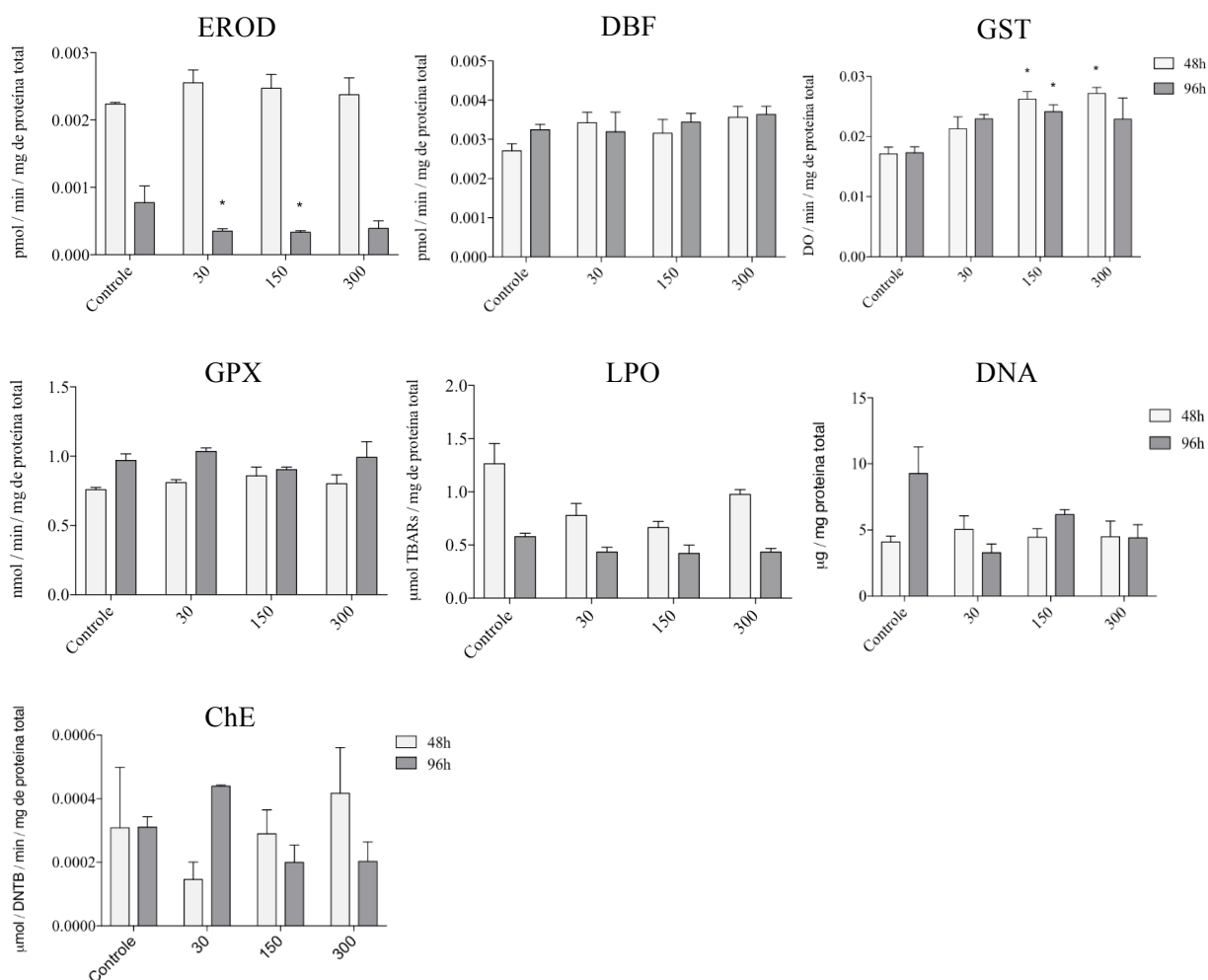


Figura 3. Resultados obtidos pelos biomarcadores em glândulas digestivas de organismos expostos a EE2. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle (p<0,05).

Os resultados obtidos com as análises dos biomarcadores em glândulas digestivas demonstraram inibição da atividade de EROD na concentração de 30 ng/L e 150 ng/L com 96h de exposição. Um aumento significativo na atividade da GST foi observado com 48h de exposição nas concentrações de 150 ng/L e 300 ng/L e com 96h de exposição na concentração de 150 ng/L.

Os efeitos do EE2 sobre a estabilidade da membrana lisossomal estão demonstrados na Figura 4.

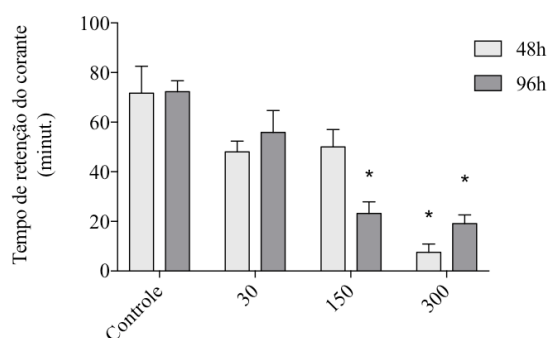


Figura 4. Resultado do ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Efeitos significativos na estabilidade da membrana lisossômica ocorreram a partir de 48h de exposição na concentração de 300 ng/L. Com 96h de exposição, efeitos significativos foram observados nas concentrações de 150 ng/L e 300 ng/L.

4 Discussão

O fármaco 17α -etinilestradiol é utilizado em quase todas as formulações modernas de pílulas anticoncepcionais orais combinadas e é um dos medicamentos mais consumidos em âmbito global (Aris et al., 2014; Cunha et al., 2016). De acordo com Burkina et al. (2015), duas vias podem explicar os efeitos de fármacos no metabolismo de Fase I. Em primeiro lugar, os fármacos podem causar diminuições na atividade do CYP450 através de uma inibição reversível ou baseada em um mecanismo (mecanismos não mediados por receptores). Em segundo lugar, os fármacos podem causar a indução ou inibição do CYP450 por respostas mediadas pelos receptores. No presente estudo, as enzimas de fase I DBF e EROD,

relacionadas ao processo de biotransformação, foram inibidas significativamente nos tecidos de brânquias e glândulas digestivas.

No estudo realizado por Arukwe & Goksoyr (1997) foi observado uma diminuição significativa na atividade da EROD durante o período reprodutivo da espécie de peixe *Scophthalmus maximus*, associada a um aumento nos níveis de estradiol (E2) no plasma sanguíneo. Os mesmos autores relatam que o E2 pode afetar a atividade catalítica das izoenzimas P450, além disso E2 é considerado um inibidor direto da atividade da EROD. Solé et al (2000) observaram uma inibição significativa da atividade da EROD na espécie de peixe *Cyprinus carpio* 8 dias após a injeção intraperitoneal de 50 µg/Kg (dose única) de EE2. Nesse mesmo estudo foi observado um aumento na atividade da GST porém sem apresentar diferença significativa em relação ao controle, fato que difere dos dados obtidos no presente estudo relacionado a esta enzima (aumento significativo na atividade da GST em glândula digestiva a partir da concentração de 150 ng/L).

No presente estudo não foram evidenciados alteração na atividade antioxidante da GPX em nenhum dos tecidos analisados. Esses dados coincidem com o estudo realizado por Solé et al. (2014) com a espécie de peixe *Solea senegalenses*, no qual, 2 dias após a injeção de EE2 (1mg/Kg), não foi evidenciado alteração significativa na atividade da GPX. Torna-se importante ressaltar que não foram evidenciados danos oxidativos com reflexos na lipoperoxidação e no DNA, em ambos os tecidos analisados. A ausência de indução da atividade antioxidante medida pela GPX, bem como de danos em DNA e lipoperoxidação pode estar relacionado com a inibição das enzimas envolvidas no metabolismo de biotransformação. De acordo com Solé et al. (2000), uma diminuição nos processos de biotransformação causados por substâncias estrogênicas, expressos principalmente como uma inibição seletiva da EROD, poderia reduzir a quantidade de espécies reativas originadas como subprodutos desses processos e, portanto, reduzir a resposta nas defesas antioxidantes, bem como nos consequentes danos relacionados.

Um aumento significativo da atividade da ChE ocorreu pontualmente na concentração de 300 ng/L (brânquias) com 48h de exposição. A indução da ChE está associada à apoptose celular em várias células humanas e de outros mamíferos, possivelmente porque a ChE é liberada após a ruptura da membrana celular (Zhang et al., 2002). Nesse sentido, é possível que o aumento da atividade dessa enzima esteja relacionado aos efeitos membranotrópicos mensurados, sendo que, o menor tempo de retenção estimado ocorreu na mesma concentração e tempo que causou o aumento significativo da ChE (300 ng/L - 48h).

Efeitos na estabilidade da membrana lisossomal foram observados a partir de 48h de exposição (300 ng/L). Esse fato pode estar relacionado à capacidade de hormônios esteróides interferirem na estabilidade lisossômica (Szego, 1975). Em um estudo com ênfase fisiológica realizado por Moore et al. (1978) com o bivalve *Mytilus edulis*, foi observado que o hormônio estradiol-17 β (E2) induziu a desestabilização dos lisossomos de células digestivas 2h após a injeção de 100 μ L 5.10^{-7} (concentração fisiológica) de E2 no músculo adutor. Nesse mesmo estudo foi realizado um experimento *in vitro* no qual, lâminas preparadas com células digestivas de *M. edulis* foram incubadas por 15 minutos em uma solução de E2 na concentração de 10^{-6} M e, efeitos significativos na estabilidade da membrana lisossomal foram evidenciados. Além disso, estudos toxicológicos pretéritos (roedores como modelo biológico) podem fundamentar os efeitos membranotrópicos encontrados no presente estudo, uma vez que demonstraram a capacidade do EE2 diminuir a atividade da bomba Na⁺, K⁺ - ATPase, como consequência de alterações promovidas pelo fármaco na composição e estrutura lipídica da membrana celular, diminuindo a fluidez. Essas alterações estão intimamente correlacionadas com a atividade da bomba de sódio, sugerindo que o estado físico dos lipídios de membrana desempenha um papel importante na regulação do transporte através das membranas (Davis et al., 1978; Rosario et al., 1988). Em um estudo realizado com a espécie de peixe *Oreochromis mossambicus*, Vijayan et al. (2001) demonstraram a capacidade do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol desregular o sistema enzimático Na⁺/K⁺-ATPase responsável pelo transporte de íons. Essa desregulação pode comprometer a homeostase e a permeabilidade de membranas celulares.

Dentre os biomarcadores de efeito empregados no presente estudo, somente a estabilidade da membrana lisossomal apresentou alterações significativas. Nesse sentido, torna-se importante ressaltar a relevância ecológica desse *endpoint*. Ringwood et al. (2004) demonstraram, em um estudo conduzido com o bivalve *Crassostrea virginica*, uma forte relação entre o aumento nos efeitos na estabilidade da membrana lisossomal com a diminuição do desenvolvimento normal de embriões, fato que pode levar ao comprometimento do sucesso reprodutivo da espécie (viabilidade de gametas). Nessa mesma linha, Pereira et al. (2014) observaram que xenobióticos podem induzir um estresse fisiológico (estabilidade da membrana lisossomal) que se associou a efeitos na reprodução e alterações estrutura da comunidade bentônica dos locais estudados. Cabe ressaltar ainda, que a redução da integridade da membrana lisossômica implica em estresse fisiológico significativo, uma vez que a atividade lisossomal em bivalves está diretamente relacionada à

imunorreatividade, pois lisossomos desempenham um papel central na degradação de materiais fagocitados. Alterações na estabilidade da membrana lisossômica também podem resultar em redução do crescimento e do potencial reprodutivo de bivalves (Moore e Viarengo, 1987).

As concentrações de EE2 que alteraram as atividade enzimáticas e que causaram estresse fisiológico (estabilidade da membrana lisossomal) enquadraram-se em um range de concentrações já detectadas em efluentes de ETE (Fernandez et al., 2007; Yang et al., 2011) e são próximas de concentrações encontradas em zonas costeiras. Ribeiro et al. (2009), detectaram EE2 em concentrações de até 101,9 ng/L na região estuarina do Rio Douro (Portugal). No estudo realizado por Rocha et al. (2012) em uma zona portuária situada na cidade do Porto (Portugal), EE2 foi detectado em duas praias nas concentrações de 2,1 ng/L e 2,8 ng/L.

5 Conclusão

Os efeitos do EE2 sobre a estabilidade da membrana lisossomal em baixas concentrações (150 ng/L) apontam para o potencial citotóxico de hormônios sintéticos, além dos já conhecidos comprometimentos do sistema endócrino. A relevância fisiológica e ecológica das alterações lisossomais na espécie utilizada sugerem que este *endpoint* pode ser empregado em futuros estudos de avaliação do mecanismos de ação e risco ambiental, uma vez que desdobramentos desse efeito podem comprometer o sistema imunológico, o crescimento e o potencial reprodutivo das espécie expostas.

Referências

- Aris, A.Z., Shamsuddin, A.S., Praveena, S.M. 2014. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ Int*, vol 69, pp 104-119.
- Arukwe, A., Goksøyr, A. 1997. Changes in Three Hepatic Cytochrome P450 Subfamilies During a Reproductive Cycle in Turbot (*Scophthalmus maximus L.*). *J Exp Zool*, vol 277, pp 313-325.
- Borysko, L., Ross, P.M. 2014. Adult exposure to the synthetic hormone 17 α -ethynylestradiol affects offspring of the gastropods *Nassarius burchardi* and *Nassarius jonasii*. *Ecotoxicol Environ Saf*, vol 103, pp 91-100.
- Burkina, V., Zlabeka, V., Zamaratskaia, G. 2015. Effects of pharmaceuticals present in aquatic environment on Phase I metabolism in fish. *Environ Toxicol Pharmacol*, vol 40, pp 430-444.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v 72, pp 248–254.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, 2016. Relatório de qualidade das praias no estado de São Paulo. Série Relatórios (pp 184).
- Cunha, D.L., Silva, S.M.C., Bila, D.M., Oliveira, J.L.M., Sarcinelli, P.N., Larentis, A.L. 2016. Regulamentação do estrogênio sintético 17 α -etinilestradiol em matrizes aquáticas na Europa, Estados Unidos e Brasil. *Cad Saude Publica*, vol 32(3):e00056715.
- Chen, Y., Li, M., Yuan, L., Xie, Y., Li, B., Xu, W., Meng, F., Wang, R. 2017. Growth, blood health, antioxidant status and immune response in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to α -ethynylestradiol (EE2). *Fish Shellfish Immunol*, vol 69, pp 1-5.
- Darbre, P.D. 2015. What are endocrine disrupters and where are they found? In *Endocrine disruption and human health* (pp. 3–26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801139-3.00001-6>.

Davis, R.A., Kern, F., Showalter, R., Sutherland, E., Sinensky, M., Simon, F.R. 1978. Alterations of hepatic Na⁺, K⁺ - ATPase and bile flow by estrogen: Effects on liver surface membrane lipid structure and function. *Proc Natl Acad Sci*, vol 75, pp 4130-4134.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, v 7, pp 88–95.

EC e European Commission, 2013. Directive 2013/39/UE of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013, amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official J. Eur. Union*, 24.8.2013 L 226/1.

Ferguson, E.M., Allinson, M., Allinson, G., Swearer, S.E., Hassell, K.L. 2013. Fluctuations in natural and synthetic estrogen concentrations in a tidal estuary in south-eastern Australia. *Water Res*, vol 47, pp 1604-1615.

Fernandez, M.P., Ikonomou, M.G., Buchanan, I. 2007. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Sci Total Environ*, vol 373, pp 250-269.

Gagné, F., Blaise, C. 1993. Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Water Res*, v 27, pp 1669–1682.

Gagné, F., André, C., Cejka, P., Gagnon, C., Blaise, C., 2007. Toxicological effects of primary- treated urban wastewaters, before and after ozone treatment, on freshwater mussels (*Elliptio complanata*). *Comp Biochem Physiol, Part C: Toxicol Pharmacol*, v 145, pp 542–552.

Huang, B., Wang, B., Ren, D., Jin, W., Liu, J., Peng, J., Pan, X. 2013, Occurrence, removal and bioaccumulation of steroid estrogens in Dianchi Lake catchment, China. *Environ Int*, vol 59, pp 262-273.

Leonard, J.A., Copea, W.G., Barnhart, M.C., Bringolf, R.B. 2014. Metabolomic, behavioral, and reproductive effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the unionid mussel *Lampsilis fasciola*. *Aquat Toxicol*, vol 150, pp 103-116.

Li, J., Fu, J., Zhang, H., Li, Z., Ma, Y., Wu, M., Liu, X. 2013. Spatial and seasonal variations of occurrences and concentrations of endocrine disrupting chemicals in unconfined and confined aquifers recharged by reclaimed water: A field study along the Chaobai River, Beijing. *Sci Total Environ*, vol 450, pp 162-168.

Lowe, D.M., Pipe, R.K. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat Toxicol*, v 30, pp 357–365.

Luzio, A., Santos, D., Fontáinhas-Fernandes, A.A., Monteiro, S.M., Coimbra, A.M. 2016. Effects of 17 α -ethinylestradiol at different water temperatures on zebrafish sex differentiation and gonad development. *Aquat Toxicol*, vol 174, pp 22-35.

Miege, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusebe, M., Coquery, M. 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. *Environ Pollut*, vol 157, pp 1721-1726.

Moore, M. N., Viarengo, A. 1987. Lysosomal Membrane Fragility and Catabolism of Cytosolic Proteins: Evidence for a Direct Relationship. *Experientia*, vol 43, pp 320-323.

Mc Farland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., Mccant, D.D. 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bull-head, *Ameiurus nebulosus*. *Arch Environ Contam Toxicol*, v 241, pp 236–241.

Nasuhoglu, D., Berk, D., Yargeau, V. 2012. Photocatalytic removal of 17 α -ethinylestradiol (EE2) and levonorgestrel (LNG) from contraceptive pill manufacturing plant wastewater under UVC radiation. *Chem Eng Process*, vol 185, pp 52-60.

Olive, P.L. 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen*, v 11, pp 487–495.

Pereira, C.D.S., Abessa, D.M.S., Choueri, R.B., Almagro-Pastor, V., Cesar, A., Maranhão, L.A., Martín-Díaz, M.L., Torres, R.J., Gusso-Choueri, P.K., Almeida, J.E., Cortez, F.S., Mozeto, A.A., Silbiger, H.L.N., Sousa, E.C.P.M., DelValls, T.A., Bairy, A.C.D. 2014. Ecological relevance of sentinels' biomarker responses: A multi-level approach. *Mar Environ Res*, vol 96, pp 118-126.

Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environ Int*, vol 450, pp 162-168.

Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Rocha, E., Rocha, M.J. 2009. Seasonal and Spatial Distribution of Several Endocrine-Disrupting Compounds in the Douro River Estuary, Portugal. *Arch Environ Contam Toxicol*, vol 56, pp 1–11.

Ringwood, A.H., Hoguet, J., Keppler, C., Gielazyn, M. 2004. Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters – *Crassostrea virginica*. *Mar Environ Res*, vol 58, pp 151-155.

Rocha, M.J., Ribeiro, M., Ribeiro, C., Couto, C., Cruzeiro, C., Rocha, E. 2012. Endocrine disruptors in the Leça River and nearby Porto Coast (NW Portugal): presence of estrogenic compounds and hypoxic conditions, *Toxicol Environ Chem*, vol 94:2, pp 262-274.

Rosario, J., Sutherland, E., Zacarro, L., Simon, F.R. 1988. Ethinylestradiol administration selectively alters liver sinusoidal membrane lipid fluidity and protein composition. *Biochemistry*, vol 27, pp 3939-3946.

Santos, D.M., Buruaem, L., Gonçalves, R.M., Williams, M., Abessa, D.M.S., Kookanad, R., Marchi, M.R.R. 2018. Multiresidue determination and predicted risk assessment of contaminants of emerging concern in marine sediments from the vicinities of submarine sewage outfalls. *Mar Pollut Bull*, vol 129, pp 299-307.

Solé, M., Porte, C., Barceló, D. 2000. Vitellogenin Induction and Other Biochemical Responses in Carp, *Cyprinus carpio*, After Experimental Injection with 17 -Ethinylestradiol. *Arch Environ Contam Toxicol*, vol 38, pp 494–500.

Solé, M., Fortuny, A., Mañanós, E. 2014. Effects of selected xenobiotics on hepatic and plasmatic biomarkers in juveniles of *Solea senegalensis*. *Environ Res*, vol 135, pp 227-235.

Szego, C.M. 1975. Lysosomal function in nucleocytoplasmic communication. *Lysosomes in biology and pathology*, vol 4 (J.T. Dingle and R. Dean, eds.), pp. 385-477. Amsterdam-London-New York: North Holland/American Elsevier 1975.

Valcarce, D.G., Vuelta, E., Robles, V., Herráez, M.P. 2017. Paternal exposure to environmental 17 α -ethinylestradiol concentrations modifies testicular transcription, affecting the sperm transcript content and the offspring performance in zebrafish. *Aquat Toxicol*, vol 193, pp 18-29.

Vijayan, M.M., Takemura, A., Mommsen, T.P. 2001. Estradiol impairs hyposmoregulatory capacity in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, vol 281, pp 1161-1168.

Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F. 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat Toxicol*, vol 85, pp 133-142.

Wills, E.D. 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell, K., Mullock, B. (Eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, USA, pp 127–150.

Yan, Z., Lu, G., Liu, J., Jin, S. 2012. An integrated assessment of estrogenic contamination and feminization risk in fish in Taihu Lake, China. *Ecotoxicol Environ Saf*, vol 84, pp 334-340.

Yang, X., Flowers, R.C., Weinberg, H.S., Singer, P.C. 2011. Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant. *Water Res*, vol 45, pp 5218-5228.

Ying, G-G., Kookana, R.S., Ru, Y-J. 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ Int*, vol 28, pp 545-551.

Zhang, X.J., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J.P., He, H.Y., Jin, Q.H., Guo, L.H., Alemany, M., Zhang, L.Y., Shi, Y.F., 2002. *Cell Death Differ*, vol 9, pp 790–800.

*CAPÍTULO 6 - Amoxicilina: Ocorrência na baía de Santos e efeitos
sub-letais em mexilhões de cultivo*

1 Introdução

Dentre as diferentes classes terapêuticas, os antibióticos são amplamente usados na medicina humana e veterinária, bem como em aquicultura, com a finalidade de prevenir (tratamento profilático) ou tratar infecções microbianas (Kummerer, 2009) e despertam grande preocupação, uma vez que exposições prolongadas e o uso indiscriminado podem promover resistência em microorganismos (Hernández et al., 2007; Thomas & Depledge, 2015). O estudo realizado por Klein et al. (2018) demonstrou que o consumo global de antibióticos aumentou em 65% entre os anos de 2000 e 2015, sendo que em 2015, os principais consumidores de antibióticos dentre os países de alta renda foram os Estados Unidos, a França e a Itália, enquanto os principais consumidores de baixa e média renda foram a Índia, a China e o Paquistão. Nesse mesmo estudo, os autores apontam para os riscos associados à resistência aos antibióticos, a qual leva à morte milhões de pessoas anualmente por infecções resistentes. De acordo com Taylor et al. (2014) a carga global de doenças resistentes aos medicamentos é projetada para se tornar uma das principais causas de mortalidade global.

A classe terapêutica dos antibióticos compreende um grupo diversificado de substâncias químicas que podem ser divididas em subgrupos como β -lactâmicos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas (Kummerer, 2009). Os antibióticos β -lactâmicos, grupo o qual está inserida a amoxicilina (AMOX), estão entre os mais comumente consumidos em âmbito global e representa 65% do mercado total de antibióticos (Minh et al., 2009; Thakuria & Lahan, 2013). Esse fármaco possui seu mecanismo de ação associado à inativação das proteínas de ligação à penicilina, interferindo na reticulação das cadeias de peptidoglicano, necessárias para a resistência e rigidez da parede celular bacteriana. Isso interrompe a síntese da parede celular e resulta no enfraquecimento da mesma ocasionando a lise celular (Istifli & Topagtas, 2010).

No estudo realizado por Fusier et al. (2017) nos maiores hospitais universitários de Paris (França), o fármaco AMOX (nesse caso, combinado com clavulanato de potássio) foi considerado o antibiótico mais prescrito e foi definido pela Agência Francesa para a Segurança de Produtos de Saúde como um antibiótico crítico. No Brasil, esse antibiótico está inserido na relação nacional de medicamentos essenciais que tem como base a lista modelo de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS), além disso possui distribuição gratuita pela rede pública de saúde (RENAME, 2017).

Além dos problemas relacionados à saúde humana, estudos tem demonstrado a ocorrência de antibióticos em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE), sendo essa a principal via de entrada de antibióticos para o meio ambiente em regiões urbanas e metrópoles (Watkinson et al., 2009; Manzetti et al., 2014; Hanna et al., 2018; Kafaei et al., 2018). A introdução de antibióticos no ambiente aquático ressalta preocupações ecotoxicológicas, pelo fato dos efeitos tóxicos em organismos aquáticos não serem bem compreendidos; da introdução contínua levar ao desenvolvimento de bactérias resistentes e, em concentrações baixas, alterar a diversidade microbiana natural nos ecossistemas aquáticos (Fatta-Kassino et al., 2011).

Em um estudo realizado em diferentes cidades da Itália, as concentrações de AMOX nos efluentes de ETEs variaram de <1,80 ng/L a 120 ng/L (Andreozzi et al. 2004). No estudo realizado por Minh et al. (2009) em Hong Kong, AMOX foi detectada em amostras de efluentes de ETEs em um range de concentração que variou de 64 ng/L a 1660 ng/L. Na Alemanha, Rossman et al. (2014) detectaram concentrações de AMOX de 1270 ng/L e 187 ng/L em amostras de influente e efluente, respectivamente. Em um estudo com antimicrobianos e antibióticos realizado em Singapura, Tran et al. (2016) em amostras de influente e efluente tratado observaram concentrações de AMOX que variaram de 2935 - 6516 ng/L e de < que o limite de quantificação - 883 ng/L, respectivamente. No estudo realizado por Mirzaei et al. (2018) em Teerã (Irã), AMOX foi detectada em amostras de influente em concentrações que variaram de 114 ng/L a 586,3 ng/L e, em amostras de efluente tratado em concentrações que variaram de 24,52 - 94,57 ng/L.

Em águas receptoras dulcícolas, Watkinson et al. (2009) detectaram AMOX na concentração máxima de 200 ng/L e com uma frequência de detecção de 30%. No estudo realizado por Mirzaei et al. (2018), AMOX foi detectada em água superficial dulcícola (Teerã) em concentrações de até 15,55 ng/L. Em zonas costeiras são poucos os estudos sobre a ocorrência em águas marinhas ou estuarinas. O fármaco AMOX foi detectado em diferentes regiões do globo, tais como Hong Kong, Mar Mediterrâneo e norte do Golfo Pérsico em concentrações que variaram de 0,64 ng/L a 127,8 ng/L (Minh et al., 2009; Alygizakis et al., 2016; Kalafei et al., 2018).

A maior parte dos estudos ecotoxicológicos com antibióticos, incluso AMOX, vem sendo realizados com espécies de cianobactérias (Liu et al., 2012), microalgas (Fu et al., 2017; Jaclyn et al., 2017), microcrustáceos (Martins et a., 2013), rotíferos (González-Pérez et al., 2016) e peixes (Laville et al., 2004; Oliveira et al., 2013; Elizalde-Velásquez et al., 2016).

Carballeira et al. (2012) avaliaram a toxicidade de substâncias químicas (dentre elas a AMOX) utilizadas na piscicultura marinha, com o emprego de duas espécies de ouriço-do-mar, *Paracentrotus lividus* e *Arbacia lixula*. Matozzo et al. (2016a; 2016b) empregaram duas espécies de bivalves marinhos, *Ruditapes philippinarum* e *Mytilus galloprovincialis* para avaliar a toxicidade do fármaco AMOX em parâmetros hemocitários, bem como avaliar alterações na atividade de enzimas antioxidantes e efeitos oxidativos.

Nesse contexto, para ampliar o conhecimento sobre os potenciais efeitos tóxicos do fármaco AMOX em organismos marinhos, o presente estudo visou determinar a ocorrência desse antibiótico em amostras de água marinha coletadas nas adjacências do emissário submarino de Santos - SP, bem como avaliar diferentes parâmetros bioquímicos e fisiológicos associados a efeitos subletais oriundos da exposição de mexilhões *Perna perna* de cultivo à amoxicilina.

2 Material e Métodos

2.1 Fármaco de interesse

O fármaco AMOX bem como todos os outros reagentes utilizados nesse estudo foram adquiridos na Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). A Figura 1 apresenta a estrutura química da amoxicilina.

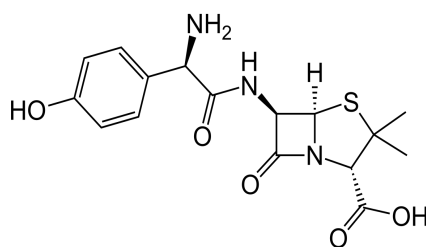


Figura 1. Estrutura química do fármaco Amoxicilina

2.2 Área de estudo e amostragem

A coleta das amostras de água foi realizada em 6 pontos (superfície - S e fundo - F) no entorno do emissário submarino de esgoto na Baía de Santos (Figura 2), considerando as possibilidades de dispersão da pluma de efluente. Em cada estação de amostragem foram

coletados três litros de água superficial (S- 1m) e água de fundo (F-8m) utilizando uma garrafa de Van Dorn. As amostras foram colocadas em frascos de vidro âmbar previamente limpos com HNO₃, metanol e água destilada e foram transportados para o laboratório em caixa térmica com gelo (<6°C), posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o processamento.



Figura 2. Baía de Santos e pontos de amostragem

2.3 Preparação das amostras

As amostras de água do mar foram preparadas de acordo com Pereira et al. (2016). Inicialmente, o pH de cada amostra foi ajustado para $7,0 \pm 0,5$ antes da extração, utilizando uma solução de HCl (1M) e, posteriormente, as amostras foram filtradas através de papel filtro Whatman (diâmetro GF / C 47 mm, retenção de partículas 1,2 μ m, Merck, Darmstadt, Alemanha). Os filtros foram lavados com 2 ml de metanol e o extrato de metanol recolhido foi adicionado à amostra filtrada. As amostras foram então submetidas a extração em fase sólida usando cartuchos Chromabond HR-X (3 mL, 200 mg, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Os cartuchos de SPE foram pré-condicionados com 5 mL de metanol e 5 mL de água Milli-Q e as amostras filtradas (misturadas com extrato de metanol) foram carregadas nos cartuchos. Após as amostras terem sido carregadas, os cartuchos foram lavados com 5 mL de água Mili-Q (2 vezes) e depois secos sob vácuo durante 30 minutos. A etapa de eluição foi

realizada com 5 mL de acetona e duas vezes com 5 mL de metanol. Após a eluição, as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio, ressuspensas em 1 mL com solução de água/acetonitrila (95: 5, v / v) e filtradas em filtro de 0,45 µM (Millipore) antes da análise por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

2.4 Análise química (LC-MS/MS)

Para determinação da AMOX nas amostras de água marinha, 10 µL do eluato de cada amostra foram analisadas por um HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, CA, EUA) combinado com um espectrômetro de massas triplo quadrupolo híbrido íon trap/LC-QqLIT ABSciex, Ontario (Canadá). As amostras de água do mar foram analisadas por uma coluna Agilent Eclipse XDB-C18 4,6 × 50 mm, 1,8 µm a 25°C, e a fase móvel em 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich LC-MS Grade) em água (solvente A) e acetonitrila (JT Baker LC-MS Grade) (solvente B). Um gradiente linear de 0,7 mL·min⁻¹ foi usado, começando com uma mistura de 95% de solvente A e 5% de solvente B. A concentração do solvente “A” diminuiu linearmente de 95% para 5% ao longo de 5 min. e esta condição foi mantida por 1 minuto. A mistura foi então devolvida às condições iniciais ao longo de 2 minutos e a AMOX foi detectada e quantificada usando fonte de ionização por “electrospray” (ESI - modo positivo) no modo Monitoramento de Reação Múltipla (MRM), com a seleção de um íon precursor e dois produtos de íons para quantificar e qualificar o composto (Tabela 1) (Pereira et al. 2016). Os parâmetros da fonte de íons adotados foram (i) gás de interface - 20 a.u; (ii) gás de colisão - 8 a.u; (iii) voltagem da ESI - 5500; (iv) temperatura do gás de origem - 650°C; (v) gás do nebulizador - 45 a.u; (vi) gás de aquecimento - 65 a.u. Posteriormente foi empregada uma curva de calibração matriz, como descrito por Wille et al. (2010).

Tabela 1. Parâmetros MRM para o modo de íon positivo, limite de detecção, limite de quantificação e tempo de retenção.

Fármaco	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	RT (min.)
Amoxicilina	366,1	114,1	26	23	4	0,5	1,65	0,84
		208,2	26	17	4			

Q1 (primeiro quadrupolo); Q3 (último quadrupolo); DP (potencial de desagregação); CE (energia de colisão); CXP (Potencial de Saída de Colisão); LOD (Limites de detecção); LOQ (limites de quantificação); RT (tempo de retenção). No Q3, na célula superior, encontra-se o íon quantificador e na célula inferior o íon qualificador.

2.5 Coleta e manutenção do organismo modelo - molusco bivalve *Perna perna*

Mexilhões adultos foram adquiridos de um cultivo localizado na Praia da Cocanha (Caraguatatuba, SP, Brasil), devido a boa qualidade ambiental da área (CETESB, 2016). Os organismos foram transportados ao laboratório em caixa térmica, mantidos em um tanque de 300 L de água do mar com fornecimento de alimentos (microalga), sob temperatura constante ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e sistema de aeração e filtração para aclimação durante 7 dias.

2.6 Biomarcadores

2.6.1 Exposição dos organismos

Após o período de aclimação, os organismos (n=21) foram dispostos em aquários com diferentes concentrações de AMOX (10 ng/L; 100 ng/L e 1000 ng/L) e controle de água, em triplicata, por 96 horas. Essas concentrações foram determinadas de acordo com estudos préteritos que detectaram AMOX em efluentes e águas superficiais.

Para cada réplica de todos os tratamentos, 7 organismos foram expostos em 10 L de soluções-teste e controles. Após 48h de exposição todas as réplicas das soluções-teste e os controles foram renovados. A água do mar natural usada no ensaio foi filtrada através de uma membrana de 200 μm para remoção de partículas e, dessa forma manter um suprimento de alimento (fitoplâncton), uma vez que durante o experimento nenhuma outra fonte de alimento foi adicionada.

2.6.2 Extração e armazenamento de tecidos

Os tecidos hemolinfa, brânquia e glândula digestiva foram extraídos para análise dos biomarcadores em três tempos de exposição; T0, T48h e T96h. Nesse sentido, os organismos foram removidos aleatoriamente de cada réplica dos diferentes tratamentos, totalizando 10 mexilhões para T48h e 11 mexilhões para T96h. Imediatamente após a remoção da hemolinfa, as lâminas foram preparadas para análise da estabilidade da membrana lisossomal (EML). Após este procedimento as brânquias e as glândulas digestivas foram dissecadas, separadas em microtubos devidamente identificados e estocadas em ultrafreezer (-80°C) até a análise dos biomarcadores.

2.6.3 Preparação de tecidos brânquia e glândula digestiva

As brânquias e glândulas digestivas de cada organismo foram descongeladas em gelo, pesadas e homogeneizadas com 4 vezes o volume do tampão constituído por NaCl 100 mM, HEPES-NaOH 25 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM, pH 7,5, com uso de um homogeneizador (Tissue Tearor). Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado a 4°C a 15.000g por 20 minutos, obtendo-se a fração sobrenadante, onde as atividades de CYP450 like (Etoxiresorufina-O-deetilase - EROD e Dibenzilfluoresceína - DBF), Glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPX), colinesterase (ChE), bem como a concentração de proteínas na fração de células citoplasmáticas, foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976). Separou-se uma alíquota de tecido homogeneizado para análises de Lipoperoxidação (LPO) e de danos em DNA. A concentração de proteína dessa alíquota também foi avaliada pelo método de Bradford (1976).

2.6.4 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

A atividade do EROD foi avaliada pelo método adaptado de Gagné e Blaise (1993). A transformação de 7-hidroxiresorufina em resorufina (atividade EROD) foi determinada fluorometricamente usando filtros de 520 nm (excitação) e 590 nm (emissão). A determinação da 7-hidroxiresorufina nas amostras foi realizada utilizando uma curva de calibração padrão de 7-hidroxiresorufina. Os resultados foram expressos como pmol/min./mg de proteína.

2.6.5 Dibenzilfluoresceína (DBF)

A determinação da atividade da DBF foi realizada de acordo com o método descrito por Gagné et al. (2007). Para isso, foi utilizado como substrato, 10 μ M de dibenzilfluoresceína incubada com uma solução de 1 mM de NADPH em uma solução de teste (50 mM de NaCl contendo 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,4). A fluorescência da amostra foi medida com um filtro de excitação de 485 nm e 516 nm. Os resultados foram expressos em pmol/min./mg de proteína.

2.6.6 Glutathione-S-Transferase (GST)

O método utilizado para determinar a atividade da GST foi adaptado de Mc Farland et al. (1999). A atividade foi analisada usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 42 mM (CDNB), GSH 1 mM como substrato e medido a 340 nm a cada 30 segundos durante 3 minutos. Os resultados foram expressos como OD/min./mg de proteínas.

2.6.7 Glutathione peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da GPx foi realizada de acordo com o método proposto por Mc Farland et al. (1999). A atividade da GPx foi medida a 340 nm a cada 2 minutos durante 10 minutos, utilizando hidroperóxido de cumeno 1 mM como substrato. A diminuição na absorbância de NADPH medida a 340 nm durante a oxidação de NADPH a NADP⁺ foi indicativa da atividade de GPx. Os resultados foram expressos como nmol/min./mg de proteína.

2.6.8 Lipoperoxidação (LPO)

A análise de peroxidação lipídica foi realizada pelo método do ácido tiobarbitúrico (Wills, 1987). Esta determinação foi empregada por fluorescência utilizando 516 nm (excitação) e 600 nm (emissão). Os padrões de tetrametoxipropano foram preparados em solução de homogeneização. Os resultados foram expressos em μ M TBARs/mg proteínas.

2.6.9 Danos em DNA

O dano ao DNA foi avaliado pelo ensaio de precipitação alcalina (Olive, 1988), utilizando fluorescência para quantificar traços de DNA (Gagné & Blaise, 1993). Mediu-se a fluorescência utilizando um filtro de 360 nm (excitação) e 450 nm (emissão) e utilizou-se um padrão de DNA genômico de espermatozoides de salmão (Sigma) para a calibração. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína.

2.6.10 Colinesterase (ChE)

A análise das atividades de ChE das brânquias e glândulas digestivas foram realizadas de acordo com o método descrito por Ellman et al. (1961) utilizando uma concentração de 0,3 mM de iodeto de acetilcolina no ensaio enzimático. A variação da absorbância por minuto em 412 nm a 25°C foi registrada em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol DNTB}/\text{min.}/\text{mg}$ de proteína.

2.6.11 Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro (VN)

O ensaio de VN foi realizado de acordo com o método descrito por Lowe et al. (1994) para avaliar a estabilidade da membrana lisossomal (EML).

Os mexilhões foram removidos dos aquários e com o auxílio de uma seringa contendo soro fisiológico (pH 7,3) foram retirados 40 μL de hemolinfa de cada organismo e colocados em lâminas de vidro, que foram transferidas para câmara escura e úmida por 15 minutos para promover a aderência das células na lâmina. Em seguida, o excesso de líquido foi removido e 40 μL do corante vermelho neutro (NR) foram adicionados em todas as lâminas. Após mais 15 minutos de incubação, as lâminas foram analisadas periodicamente (a cada 15 minutos). O ponto final foi o tempo em que pelo menos 50% das células examinadas por microscopia óptica (400x) exibiram perda de corante dos lisossomos para o citosol ou anormalidades estruturais.

2.7 Análise dos dados

O teste T de *Student* foi empregado para avaliar diferenças entre o T0 e os controles de água. Como não foi detectada diferença, controles de água foram utilizados como referências para os tempos de exposição de 48h e 96h. Posteriormente foi empregado análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett para identificar as concentrações significativamente diferentes dos controles de água. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. O software Prism v.7 foi empregado para ANOVA e análise pos-hoc.

3 Resultados

3.1 Concentrações Ambientais

O fármaco AMOX não foi detectado em água superficial e de fundo em nenhum dos pontos amostrados.

3.2 Biomarcadores

As atividades de EROD, DBF, GST, GPX, bem como LPO, dano em DNA, e ChE no tecido das brânquias, estão demonstrados na Figura 3.

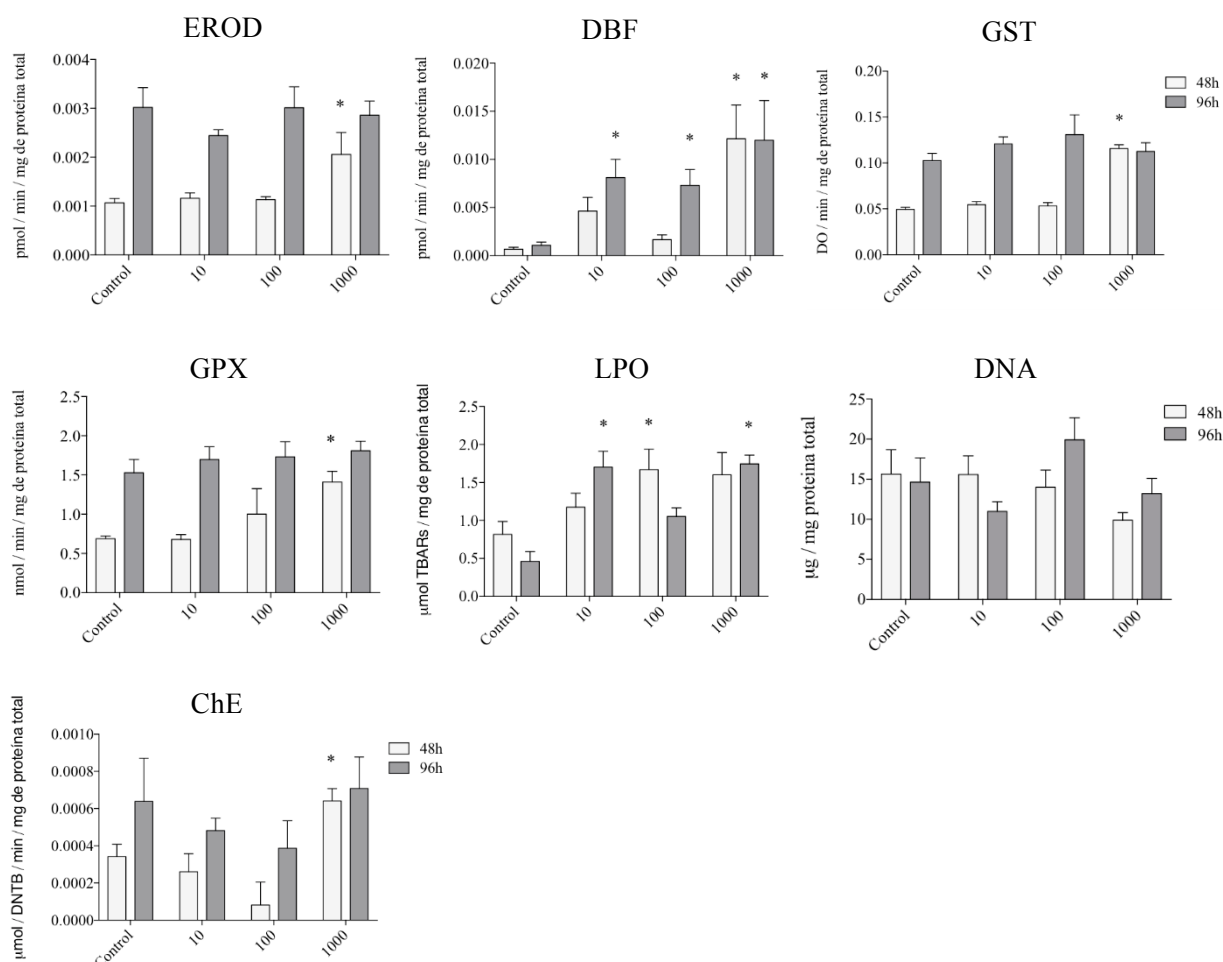


Figura 3. Resultados obtidos pelos biomarcadores em brânquias de organismos expostos a amoxicilina. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos com os biomarcadores em brânquias demonstraram que, com relação à biotransformação, a atividade enzimática EROD foi significativamente ativada com 48h de exposição na maior concentração testada (1000 ng/L), enquanto que DBF apresentou diferenças significativas com 48h de exposição na maior concentração e com 96h de exposição em todas as concentrações testadas. A enzima GST foi significativamente ativada com 48h de exposição também na maior concentração testada. A atividade antioxidante da GPx apresentou diferença significativa em relação ao controle com 48h de exposição na concentração de 1000 ng/L. Efeitos oxidativos, estimados também pela peroxidação lipídica foram observados com 48h de exposição na maior concentração testada e, com 96h de exposição nas concentrações de 10 ng/L e 1000 ng/L. A ChE apresentou um aumento significativo em sua atividade na maior concentração testada com 48h de exposição.

No tecido das glândulas digestivas, alterações significativas na atividade da EROD e DBF foram observadas na concentração de 10 ng/L com 96h de exposição. A indução da atividade da GPx foi observada com 96h de exposição também na concentração de 10 ng/L.

As atividades de EROD, DBF, GST, GPX, bem como LPO, dano em DNA e ChE no tecido das glândulas digestivas, estão demonstrados na Figura 4.

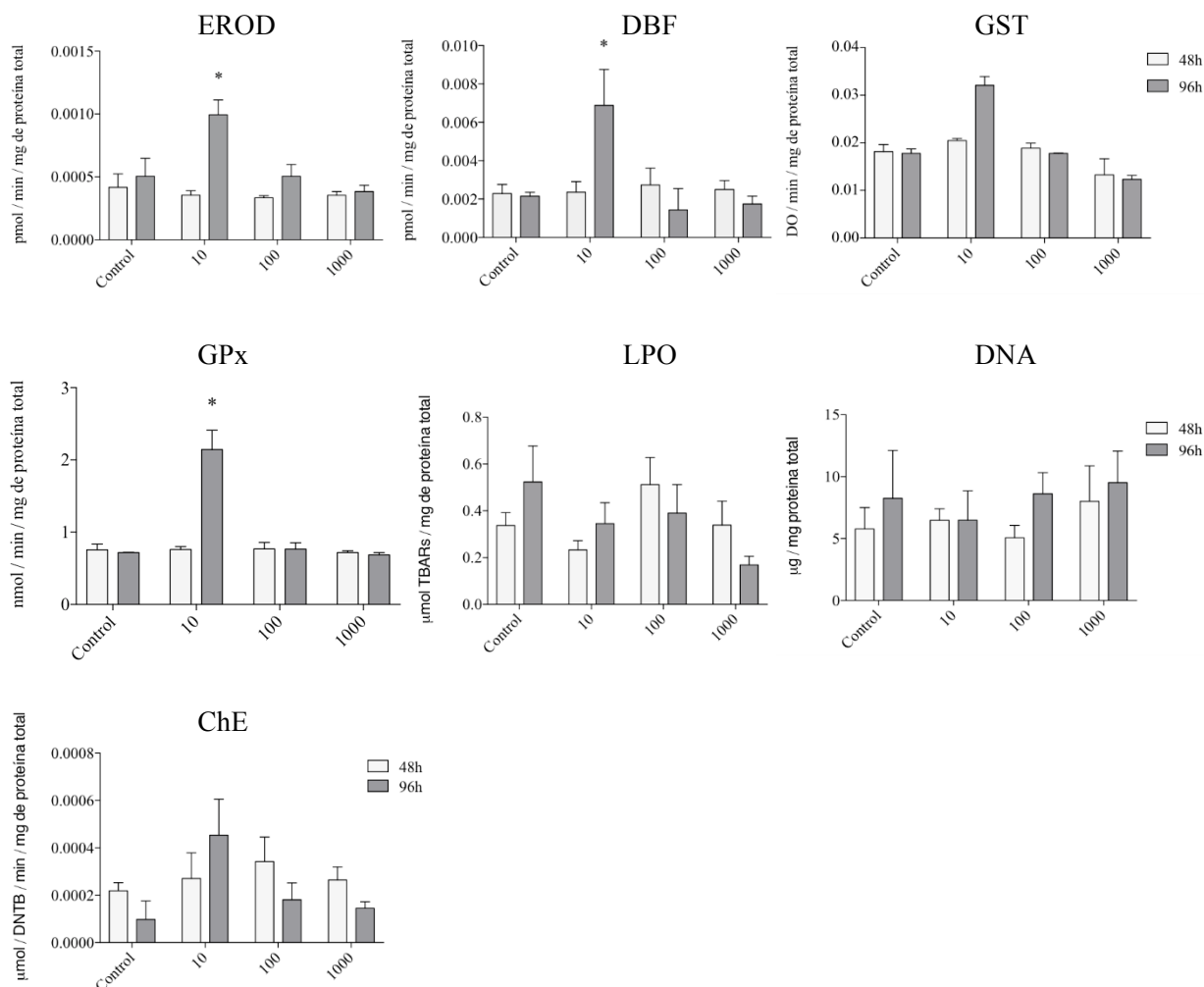


Figura 4. Resultados obtidos pelos biomarcadores em glândulas digestivas de organismos expostos a amoxicilina. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Efeitos significativos na estabilidade da membrana lisossômica ocorreram somente com 96h de exposição nas concentrações de 100 ng/L e 1000 ng/L. Os efeitos da AMOX sobre a estabilidade da membrana lisossomal estão demonstrados na Figura 5.

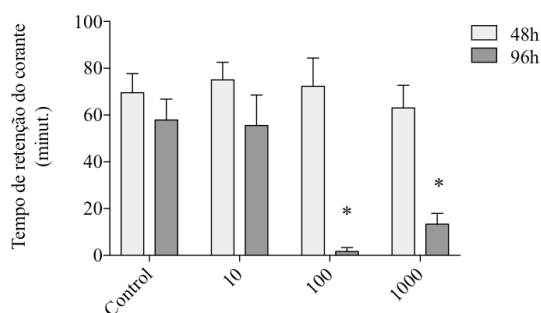


Figura 5. Resultado do ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

4 Discussão

Os antibióticos são utilizados como medicamentos há mais de 50 anos e surgiram recentemente como poluentes ambientais emergentes (Manzetti et al., 2014). Embora estudos tenham detectado o antibiótico AMOX em efluentes e em matrizes ambientais (Watkinson et al., 2009; Tran et al., 2016; Alygizakis et al., 2016; Mirzaei et al., 2018), alguns autores relatam que a susceptibilidade desse fármaco à hidrólise do anel lactâmico, a oxidação pela cloração, a irradiação ultravioleta, bem como a alta taxa de remoção em STPs (média de 80%) são responsáveis pela frequente ausência da AMOX em amostras analisadas (Watkinson et al., 2007; Navalon et al., 2008; Tran et al., 2016; Kafaei et al., 2018).

No presente estudo, o fármaco AMOX não foi detectado em nenhuma das amostras de água marinha (superfície e fundo) coletadas na Baía de Santos, fato que pode estar relacionado às características da molécula e à cloração que o efluente recebe antes de ser lançado a 4,5 Km da praia de Santos. Esses dados coincidem com o estudo realizado Biel-Maeso et al. (2018) o qual avaliou a ocorrência e distribuição de 78 substâncias farmacêuticas em amostras de água marinha do Golfo de Cádiz (Espanha) e, o fármaco AMOX também não foi detectado. Por outro lado, Minh et al. (2009) detectaram AMOX em água marinha em “Victoria Harbour” (Hong Kong) na maioria das amostras analisadas em um range de concentração que variou de 0,64 ng/L a 76 ng/L, indicando ocorrência generalizada desse fármaco devido à introdução contínua no ambiente aquático.

A ocorrência e distribuição de 158 fármacos foi determinada em água marinha de diferentes profundidades no Mar Mediterrâneo (Golfo Savonikos e Baía Elefsis - 9 pontos amostrais) no estudo realizado por Alygizakis et al. (2018) e, interessante, a AMOX se

destacou pela alta concentração observada de até 127,8 ng/L com uma frequência de detecção de 90,9%. No Golfo Pérsico (litoral de Bushehr - Irã), Kafei et al. (2018) realizaram um estudo sobre a ocorrência e frequência de detecção dos 6 antibióticos mais prescritos e, a AMOX foi detectada em água superficial em um range de concentração que variou de 0,8 ng/L a 3,6 ng/L (81% das amostras) e, em sedimentos, as concentrações detectadas variaram de 1,1 ng/g a 5,3 ng/g (75% das amostras). Os estudos que detectaram o antibiótico AMOX em amostras ambientais demonstram que o alto uso dessa substância, bem como a pseudo-persistência característica dos fármacos em geral, os quais são introduzidos continuamente no ambiente aquático, contribuem com a ocorrência e com a exposição crônica da biota mesmo para fármacos com tempo de vida curto (Daughton & Ternes, 1999; Zenker et al., 2014).

Com relação à toxicidade da AMOX, torna-se importante ressaltar que há na literatura uma escassez de estudos sobre a avaliação dos efeitos subletais do fármaco com invertebrados marinhos, especialmente com moluscos bivalves (Carballeira et al., 2012; Matozzo et al., 2016a; 2016b). Os dados obtidos pelas análises dos biomarcadores demonstram que a AMOX promove alterações significativas no metabolismo em ambos os tecidos analisados, bem como efeitos oxidativos evidenciados pela lipoperoxidação em brânquias e estabilidade da membrana dos lisossomos. Na fase I do metabolismo (biotransformação) a atividade da EROD e DBF (“CYP like”) foram significativamente induzidas em ambos os tecidos analisados. O metabolismo celular em organismos aeróbios envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Valavanidis et al., 2006) e estudos tem demonstrado que o antibiótico AMOX possui a capacidade de aumentar o nível intracelular de ROS, bem como de causar danos oxidativos. Liu et al. (2015) observaram que a exposição à AMOX estimulou a produção de ROS na cianobactéria *Microcystis aeruginosa* com o aumento progressivo durante os 7 dias de exposição. No estudo realizado por Li et al. (2007) com células de mamíferos (humanos e hamster) foi evidenciada a capacidade da AMOX (10 mM) aumentar significativamente os níveis de ROS com 1h de exposição. Esse fato pode estar relacionado ao aumento significativo da atividade da GST observado no tecido das brânquias na maior concentração analisada (1000 ng/L), uma vez que essa enzima desempenha um papel importante na remoção de ROS e na fase II do metabolismo (conjugação) de substâncias químicas exógenas com a finalidade de facilitar a excreção (Meister, 1988). Em um estudo sobre respostas antioxidantes da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* expostas por 7 dias à concentrações ambientalmente relevantes de AMOX (50, 100, 500 e 1000 ng/L), Liu et al.

(2012) observaram um aumento significativo da atividade da GST, em todas as concentrações testadas a partir do quarto dia de exposição. Nesse estudo, a maior concentração testada (1000 ng/L) coincide com a concentração de AMOX que alterou significativamente a atividade da GST no presente estudo. A exposição da espécie de peixe *Danio rerio* à concentrações de AMOX (1,0 - 100 mg/L) por 96h, induziu significativamente a atividade da GST no tecido de músculo e demonstrou uma tendência de aumento na atividade no tecido das brânquias (Oliveira et al., 2013).

Com relação à atividade antioxidante da enzima GPx, foram observadas alterações significativas em relação ao controle em ambos os tecidos analisados (brânquias - 48h; 1000 ng/L / glândula digestiva - 96h; 10 ng/L). Elizalde-Velázquez et al. (2016) detectaram alterações significativas da GPx em peixes da espécie *Cyprinus carpio*, a partir de 24h de exposição na concentração de 10 ng/L de AMOX. Essas alterações foram evidenciadas também em outros órgãos como fígado, rim e cérebro. Liu et al. (2012) observaram que a concentração de 1 µg/L de AMOX induziu significativamente a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) na cianobactéria *Microcystis aeruginosa* após 4 dias de exposição, fato que denota a capacidade que o antibiótico AMOX tem de gerar ROS e consequentemente induzir a atividade de enzimas antioxidantes.

No presente estudo, o sistema antioxidante possivelmente foi sobreposto no tecido das brânquias, uma vez que efeitos como peroxidação lipídica foram evidenciados em ambos os tempos analisados (48h; 100 ng/L e 96h; 10 ng/L e 1000 ng/L). O aumento significativo no níveis de malondialdeído (MDA), um importante biomarcador de estresse oxidativo, foi observado em *M. aeruginosa* a partir do quarto dia de exposição à diferentes concentrações de AMOX (Liu et al., 2012; Liu et al., 2015). A capacidade da AMOX causar peroxidação lipídica foi demonstrada também em brânquias da espécie de peixe *C. carpio* em concentrações a partir de 10 ng/L e 24h de exposição (Elizalde-Velázquez et al., 2016). Os dados obtidos no presente estudo com relação à LPO vão de encontro com os achados de Matozzo et al. (2016a) com duas espécies de bivalves marinhos, *Mytilus galloprovincialis* e *Ruditapes philippinarum*, expostas por sete dias a diferentes concentrações de AMOX (100 µg/L; 200 µg/L e 400 µg/L). Nesse estudo, não foi observado lipoperoxidação em nenhuma das concentrações testadas para *M. galloprovincialis*, enquanto que apenas a concentração de 200 µg/L causou lipoperoxidação no tecido de glândulas digestivas de *R. philippinarum* no sétimo dia de exposição.

A indução significativa da atividade da ChE pode estar associada aos efeitos membranotrópicos, uma vez que estudos pretéritos realizados com substâncias farmacêuticas relataram a indução da atividade da ChE em moluscos bivalves (Mesquita et al., 2011; Gonzalez-Rey e Bebianno, 2014; Cortez et al., 2018), fato que coincide com os dados obtidos para o antibiótico AMOX. No estudo realizado por Zhang et al. (2002) foi observado que a indução de ChE está associada à apoptose celular em várias células humanas e de outros mamíferos, possivelmente porque o ChE é liberado após a ruptura da membrana celular. Essa hipótese foi reforçada no presente estudo, pelos efeitos citotóxicos observados na estabilidade da membrana lisossomal (ensaio VN) que ocorreram a partir de 100 ng/L de AMOX com 96h de exposição e, que podem também estar relacionados às ROS geradas no processo de detoxicação e pela ação da AMOX.

A citotoxicidade da AMOX também foi estimada por Souza et al. (2016) por meio do método do VN e, com a exposição do bivalve marinho *Perna perna* por 72h às concentrações de 1 ng/L; 5 ng/L e 10 ng/L. Nesse estudo, os efeitos na estabilidade da membrana lisossomal foram estimados a partir 1 ng/L com 24h de exposição. No estudo realizado por Matozzo et al. (2016b) foram avaliados os efeitos da AMOX (100 µg/L; 200 µg/L e 400 µg/L) em parâmetros hemocitários de duas espécies de bivalves marinho (*Mytilus galloprovincialis* e *Ruditapes philippinarum*) expostos por 7 dias e, não foram evidenciados alterações significativas no número total, no volume e diâmetro dos hemócitos em nenhuma das espécies. Nesse mesmo estudo a citotoxicidade foi avaliada pela atividade da lactato dehydrogenase (LDH), enzima que é liberada para o citosol por células danificadas, e os resultados para ambas as espécies, diferentemente dos dados obtidos no presente estudo, demonstraram que a AMOX não foi capaz de alterar a estabilidade das membranas. Por outro lado, os autores observaram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em ambas as espécies empregadas, fato que denota a capacidade da AMOX de causar danos cromossômicos e genômicos. Considerando os dados de lipoperoxidação e de efeitos na estabilidade da membrana lisossomal obtidos no presente estudo, é possível afirmar que o molusco bivalve *Perna perna* apresenta maior sensibilidade à AMOX, quando comparado às espécies de bivalves marinhos empregados nos estudos de Matozzo et al. (2016a; 2016b), uma vez que foram estimadas concentrações de efeito na ordem de ng/L.

Interessantemente, as repostas das enzimas de fase I e II (EROD, DBF, GST), bem como a atividade antioxidante da GPx em brânquias demonstraram alterações associadas, uma vez que as repostas ocorreram nas mesmas concentrações e tempos de exposição analisados.

Essa mesma tendência ocorreu em glândulas digestivas com as mesmas enzimas, embora GST não tenha apresentado diferença significativa, demonstrou uma tendência de aumento na mesma concentração e tempo analisado (10 ng/L - 96h).

No geral, os dados obtidos no presente estudo vem ao encontro da necessidade de um melhor entendimento sobre os potenciais efeitos tóxicos da AMOX em organismos aquáticos, uma vez que este fármaco tem sido detectado em zonas costeiras de diferentes partes do mundo, bem como introduzido em cultivos de vertebrados e invertebrados marinhos, onde podem causar efeitos adversos ligados ao estresse oxidativo com desdobramentos em processos citotóxicos.

5 Conclusão

A capacidade do antibiótico AMOX alterar significativamente as enzimas envolvidas no mecanismo de detoxicação de fase I e II, bem como de induzir a atividade antioxidante foi evidenciada. Possivelmente o sistema antioxidante foi sobreposto, visto que efeitos como lipoperoxidação (brânquias) e alterações na estabilidade da membrana lisossomal foram também observados. Embora a AMOX não tenha sido detectada em nenhuma das amostras de água marinha da Baía de Santos, as alterações enzimáticas, bem como os efeitos sub-letais ocorreram em mexilhões de cultivo expostos a concentrações ambientalmente relevantes observadas em outras zonas costeiras, especialmente em áreas dedicadas a técnicas de aquicultura que empregam esse antibiótico para fins terapêuticos ou profiláticos.

Referências

- Alygizakis, N.A., Gago-Ferrero, P., Borova, V.L., Pavlidou, A., Hatzianestis, I., Thomaidis, N.S. 2016. Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. *Sci Total Environ*, vol 541, pp 1097 - 1105.
- Andreozzi, R., Caprio, V., Ciniglia, V., Champdoré, M., Giudice, R., Marotta, R., Zucatto, E. 2004. Antibiotics in the Environment: Occurrence in Italian STPs, Fate, and Preliminary Assessment on Algal Toxicity of Amoxicillin. *Environ Sci Technol*, vol 38, pp 6832 - 6838.
- Biel-Maeso, M., Baena-Nogueras, R.M., Corada-Fernández, C., Lara-Martín, P.A. 2018. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Sci Total Environ*, v 612, pp 649-659.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v 72, pp 248–254.
- Carballeira, C., Orte, M.R., Viana, I.G., DelValls, T.A., Carballeira, A. 2012. 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*, vol 63, pp 249 - 261.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, 2016. Relatório de qualidade das praias no estado de São Paulo. Série Relatórios (pp 184).
- Cortez, F.S., Souza, L.S., Guimarães, L.L., Almeida, J.E., Pusceddu, F.H., Maranhão, L.A., Mota, L.G., Nobre, C.R., Moreno, B.B., Abessa, D.M.S., Cesar, A., Santos, A.R., Pereira, C.D.S. 2018. Ecotoxicological effects of losartan on the brown mussel *Perna perna* and its occurrence in seawater from Santos Bay (Brazil). *Sci Total Environ*, vol 637-638, pp 1363 - 1371.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A. 1999. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environ Health Perspect*, vol 107, pp 907 - 938.

Elizalde-Velázquez, A., Martínez-Rodríguez, H., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Islas-Flores, H., Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., Lizcano-Sanz, I., Gómez-Oliván, L.M. 2016. Effect of Amoxicillin Exposure on Brain, Gill, Liver, and Kidney of Common Carp (*Cyprinus Carpio*): The Role of Amoxicilloic Acid. *Environ Toxicol*, Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/tox.22307.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, v 7, pp 88–95.

Fatta-Kassinos, D., Meric, S., Nikolaou, A. 2011. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Anal Bioanal Chem*, vol 399, pp 251–275.

Fu, L., Huang, T., Wang, S., Wang, X., Su, L., Li, C., Zhao, Y. 2017. Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action. *Chemosphere*, vol 168, pp 217 - 222.

Fusier, I., O. Curzon, P., Touratier, S., Escaut, L., Lafaurie, M., Fournier, S., Sinègre, M., Lechat, P., D. Vittecoq, D., The Anti-Infective Drug Committee (COMAI) of the public hospital system of the city of Paris (AP–HP). 2017. Amoxicillin–clavulanic acid prescriptions at the Greater Paris University Hospitals (AP–HP). *Med Mal Infect*, vol 47, pp 42 -49.

Gagné, F., Blaise, C. 1993. Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Water Res*, v 27, pp 1669–1682.

Gagné, F., André, C., Cejka, P., Gagnon, C., Blaise, C., 2007. Toxicological effects of primary- treated urban wastewaters, before and after ozone treatment, on freshwater mussels (*Elliptio complanata*). *Comp Biochem Physiol, Part C: Toxicol Pharmacol*, v 145, pp 542–552.

González-Pérez, B.K., S.S.S. Sarma, S.S.S., Nandini, S. 2016. Effects of selected pharmaceuticals (ibuprofen and amoxicillin) on the demography of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera). *Egypt J Aquat Res*, vol 42, pp 341 - 347.

Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., 2014. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*, vol 148, pp 221–230.

Hannaa, N., Sun, P., Sun, Q., Li, X., Yang, X., Ji, X., Zou, H., Ottoson, J., Nilssone, L.E., Berglund, B., Dyar, O.J., Tamhankar, A.J., Lundborg, C.S. 2018. Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: Its potential for resistance development and ecological and human risk. *Environ Int*, vol 114, pp 131 - 142.

Hernández, F., Sancho, J.F., Ibáñez, M., Guerrero, C. 2007. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *Trends Analyt Chem*, vol 26, pp 466-485.

Istifli, E.S., Topaktas, M. Cytogenetic Genotoxicity of Amoxicillin. *Environ Mol Mutagen*, vol 51, pp 222-228.

Jaclyn, T.J., Granek, E.F. 2017. Effects of environmentally-relevant antibiotic mixtures on marine microalgal growth. *Sci Total Environ*, vol 580, pp 43 - 49.

Kafaei, R., Papari, F., Seyedabadi, M., Sahebi, S., Tahmasebi, R., Ahmadi, M., Sorial, G.A., Asgari, G., Ramavandi, B. 2018. Occurrence, distribution, and potential sources of antibiotics pollution in the water-sediment of the northern coastline of the Persian Gulf, Iran. *Sci Total Environ*, vol 627, pp 703 - 712.

Klein, E.Y., Boeckel, T.P.V., Martinez, E.M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S.A., Goossens, H., Laxminarayan, R. 2018. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Environmental Sciences*. pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1717295115, pp 1-8.

Kümmerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, vol 75, pp 417 - 434.

Laville, N., Ait-Aissa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M. 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*, vol 196, pp 41 - 55.

- Li, P-Y., Chang, Y-C., Tzang, B-S., Chen, C-C., Liu, Y-C. 2007. Antibiotic amoxicillin induces DNA lesions in mammalian cells possibly via the reactive oxygen species. *Mutat Res*, vol 629, pp 133 - 139.
- Liu, Y., Guan, Y., Gao, B., Yue, Q. 2012. Antioxidant responses and degradation of two antibiotic contaminants in *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicol Environ Saf*, vol 86, pp 23 - 30.
- Liu, Y., Wang, F., Chen, X., Zhang, J., Gao, B. 2015. Cellular responses and biodegradation of amoxicillin in *Microcystis aeruginosa* at different nitrogen levels. *Ecotoxicol Environ Saf*, vol 111, pp 138 - 145.
- Lowe, D.M., Pipe, R.K. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat Toxicol*, v 30, pp 357–365.
- Manzetti, S., Ghisi, R. 2014. The environmental release and fate of antibiotics. *Mar Pollut Bull*, vol 79, pp 7 - 15.
- Martins, A., Guimarães, L., Guilhermino, L. 2013. Chronic toxicity of the veterinary antibiotic florfenicol to *Daphnia magna* assessed at two temperatures. *Environ Toxicol Pharmacol*, vol 36, pp 1022 - 1032.
- Matozzo, V., Battistara, M., Marisa, I., Bertin, V., Orsetti, A. 2016a. Assessing the effects of amoxicillin on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and protein carbonyl content in the Clam *Ruditapes philippinarum* and the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bull Environ Contam Toxicol*, vol 97, pp 521 - 527.
- Matozzo, V., Bertin, V., Battistara, M., Guidolin, A., Masiero, L., Marisa, I., Orsetti, A. 2016b. Does the antibiotic amoxicillin affect haemocyte parameters in non- target aquatic invertebrates? The clam *Ruditapes philippinarum* and the mussel *Mytilus galloprovincialis* as model organisms. *Mar Environ Res*, vol 119, pp 51 - 58.
- Meister, A. 1988. Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. *J Biol Chem*, vol 263, pp 17205 - 17208.
- Mesquita, S.R., Guilhermino, L., Guimarães, L., 2011. Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Chemosphere*, vol 85, pp 967–976.

Minh, T.B., Leung, H.W., Loi, I.H., Chan, W.H., So, M.K., Mao, J.Q., Choi, D., Lam, J.C.W., Zheng, G., Martin, M., Lee, J.H.W., Lam, P.K.S., Richardson, B.J. 2009. Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: Ubiquitous distribution and fate in Victoria Harbour. *Mar Pollut Bull*, vol 58, pp 1052 - 1062.

Mirzaei, R., Yunesian, M., Nasser, S., Gholami, M., Jalilzadeh, E., Shoeibi, S., Mesdaghinia, A. Occurrence and fate of most prescribed antibiotics in different water environments of Tehran, Iran. *Sci Total Environ*, vol 620, pp 446 - 459.

Mc Farland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., Mccant, D.D. 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bull-head, *Ameiurus nebulosus*. *Arch Environ Contam Toxicol*, v 241, pp 236–241.

Navalon, S., Alvaro, M., Garcia, H. 2008. Reaction of chlorine dioxide with emergent water pollutants: Product study of the reaction of three β -lactam antibiotics with ClO_2 . *Water Res*, vol 42, pp 1935 - 1942.

Olive, P.L. 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen*, v 11, pp 487–495.

Oliveira, R., McDonough, S., Jessica C.L. Ladewig, J.C.L., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., Domingues, I. 2013. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Pharmacol*, vol 36, pp 903 - 912.

Pereira, C.D.S., Maranhão, L.A., Cortez, F.S., Pusceddu, F.H., Santos, A.R., Ribeiro, D.A., Cesar, A., Guimarães, L.L., 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Sci Total Environ*, vol, 548–549, pp 148–154.

RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - 2017. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, pp 210.

Rossmann, J., Schubert, S., Gurke, R., Oertel, R., Kirch, W. 2014. Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC–MS/MS. *J Chromatogr B*, vol 969, pp 162 - 170.

Souza, A., Moreno, B.B., Almeida, J.E., Rogero, S.O., Pereira, C.D.S., Rogero, J.R. 2016. Cytotoxicity evaluation of Amoxicillin and Potassium Clavulanate in *Perna perna* mussels. *Ecotoxicol Environ Contam*, vol 11, pp 21-26.

Tran, N. H., Chen, H., Reinhard, M., Mao, F., Gin, K.Y-H. 2016. Occurrence and removal of multiple classes of antibiotics and antimicrobial agents in biological wastewater treatment processes. *Water Res*, vol 104, pp 461 - 472.

Taylor, J., Hafner, M., Yerushalmi, E., Smith, R., Bellasio, J., Vardavas, R., Bienkowska-Gibbs, T., Rubi, J. 2014. Estimating the economic costs of antimicrobial resistance - Model and Results. Published by the RAND Corporation, Santa Monica, Calif., and Cambridge, UK, 87 p.

Thakuria, B., Lahon, K. 2013. The beta lactam antibiotics as an empirical therapy in a developing country: An update on their current status and recommendations to counter the resistance against them. *J Clin Diagn Res*, vol 7, pp 1207 - 1214.

Thomas, F., Depledge, M. 2015. Medicine ‘misuse’: Implications for health and environmental sustainability. *Soc Sci Med*, vol 143, pp 81 - 87.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf*, vol 64, pp 178 - 189.

Watkinson, A.J., Murby, E.J., Costanzo, S.D. 2007. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Res*, vol 41, pp 4164 - 4176.

Watkinson, A.J., Murby, E.J., Kolpin, D.W., Costanzo, D.W. 2009. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Sci Total Environ*, vol 407, pp 2711 - 2723.

Wille, K., Noppe, H., Verheyden, K., Vanden Bussche, J., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., De Brabander, H.F., Vanhaecke, L., 2010. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. *Anal Bioanal Chem*, vol 397, pp 1797–1808.

Wills, E.D. 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: Snell, K., Mullock, B. (Eds.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, USA, pp 127–150.

Zhang, X.J., Yang, L., Zhao, Q., Caen, J.P., He, H.Y., Jin, Q.H., Guo, L.H., Alemany, M., Zhang, L.Y., Shi, Y.F., 2002. *Cell Death Differ*, vol 9, pp 790–800.

Zenker, A., Cicero, M.R., Prestinaci, F., Bottoni, P., Carere, M. 2014. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J Environ Manage*, vol 133, pp 378 - 387.

**CAPÍTULO 7 - Avaliação do risco ambiental do antimicrobiano
triclosan em zonas costeiras**

1 Introdução

O Triclosan (TCS) é um antimicrobiano clorado que promove atividade bacteriostática de amplo espectro contra bactérias gram-negativas, gram-positivas, fungos e leveduras (McAvoy et al., 2002). A eficiência desse antimicrobiano faz com que seja amplamente utilizado em âmbito global como ingrediente ativo em desinfetantes, sabonetes, detergentes, creme dental, tecidos, desodorantes, xampus e aditivos plásticos, além de inúmeros outros produtos de cuidados pessoais, veterinários, industriais e domésticos (USEPA, 2008; Dann & Hontela, 2010).

O enorme consumo de antimicrobianos gerou em 2014, um mercado multibilionário nos EUA com mais de 2000 produtos e uma movimentação de US\$ 1,4 bilhões (Halden, 2014). Por outro lado, o amplo uso dessa substância tem gerado grande preocupação em relação à saúde ambiental e humana devido a alguns fatores, tais como a possibilidade de conversão do TCS por fotodegradação em dioxinas e furanos; a semelhança estrutural com o bisfenol-A (disruptor endócrino); a ocorrência de metilação biológica que gera uma molécula mais tóxica e lipofílica (metil triclosan); a estabilidade e capacidade de bioacumular em tecidos e a inerente toxicidade para organismos não-alvos (Lindstrom et al., 2002; Latch et al., 2003; Sanchez- Prado et al., 2006; Aranami & Readman, 2007; Coogan et al., 2007; Binelli et al., 2009; Fair et al., 2009; Hwang et al., 2014; Park et al., 2017; Di Poi et al., 2018).

Nesse contexto, diversos estudos tem reportado a ocorrência desse antimicrobiano em efluentes de ETE, bem como em compartimentos ambientais de diferentes ecossistemas (McAvoy et al., 2002; Chau et al., 2008; Xu et al., 2014; Sun et al., 2016; Brumovsky et al., 2017; Pusceddu et al., 2018). Torna-se importante ressaltar que o TCS é considerado um indicador da presença de esgotos (Chen et al., 2014) e, além disso foi classificado como um dos sete principais contaminantes em águas superficiais nos EUA (Kolpin et al., 2002). No estudo realizado por McAvoy et al. (2002), TCS foi detectado em amostras de efluente tratado e um range de concentração que variou de 0,2 a 2,7 µg/L e uma taxa de remoção de 96% foi determinada com o tratamento por lodo ativado. Lozano et al. (2013) observaram concentrações medias de TCS em amostras de influente e efluente de 8,05 µg/L e 0,23 µg/L, respectivamente. Em um estudo sobre a ocorrência de TCS em seis diferentes ETEs na África do Sul, Lehutso et al. (2017) detectaram um range concentrações de TCS de 2,01 µg/L a 17,6 µg/L em amostras de influente e de 0,99 µg/L a 13,0 µg/L em amostras de efluente. Em zonas costeiras, concentrações de TCS foram observadas em água superficial estuarina e marinha em um range de concentração que variou de < 0,55 ng/L a 310 ng/L (Wu et al., 2007; Chau et

al., 2008; Xie et al., 2008; Fair et al., 2009; Bayen et al., 2013; Singh et al., 2010; Lv et al., 2014; Pintado-Herrera et al., 2014; Brumovsky et al., 2017).

Diferentes organismos aquáticos (peixes, crustáceos, moluscos e algas) de ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos, têm sido utilizados como modelo para estudos sobre os efeitos biológicos adversos do antimicrobiano TCS. Considerando as amplas diferenças fisiológicas entre os modelos biológicos empregados, as concentrações de efeitos estimadas nesses estudos variam na ordem de ng/L (ambientalmente relevante) a mg/L (Orvos et al., 2002; DeLorenzo et al., 2008; Oliveira et al., 2009; Matozzo et al., 2012; Cortez et al., 2012; Hwang et al., 2014; Park et al., 2017; Di Poi et al., 2018; Tato et al., 2018). Como resultado da onipresença do TCS no ambiente aquático e, devido à preocupação com os possíveis efeitos biológicos adversos em concentrações ambientalmente relevantes, é de suma importância avaliar os riscos ambientais dessa substância.

Avaliações de risco têm sido realizadas com TCS considerando principalmente concentrações detectadas em efluentes de ETEs e em ambientes dulcícolas, sendo poucos os estudos no ambiente marinho (Zhao et al., 2010; Blair et al., 2013; Papageorgiou et al., 2016; Peng et al., 2017; Chen et al., 2018; Pusceddu et al., 2018; Tato et al., 2018). Nesse cenário de amplo uso do TCS e ocorrência em águas superficiais de zonas costeiras, o presente estudo objetivou avaliar o risco ambiental desse antimicrobiano, com base em concentrações de efeitos obtidas na literatura e no presente estudo. Para isso, serão considerados os resultados dos ensaios de toxicidade com ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (taxa de fertilização e desenvolvimento embriolarval), com o copépodo *Nitokra sp* (mortalidade) e com o bivalve *Perna perna* (taxa de fertilização e desenvolvimento embriolarval) dos estudos de Cortez (2011) e Cortez et al. (2012). O presente estudo complementou os dados de toxicidade por meio do ensaio com *Nitokra sp* (reprodução). Para o estabelecimento do quociente de risco (RQ), foram utilizadas concentrações ambientais de TCS medidas (MEC) em amostras de água do mar da Baía de Santos, sudeste do Brasil, bem como concentrações detectadas em zonas costeiras de outras localidades.

2 Material e Métodos

2.1 Substância de interesse

O antimicrobiano Triclosan (CAS Number 3380-34-5; peso molecular 289,54; pureza $\geq 98\%$) bem como todos os outros reagentes utilizados nesse estudo foram adquiridos na Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

A Figura 1 apresenta a estrutura química do Triclosan.

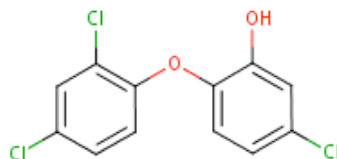


Figura 1. Estrutura química do antimicrobiano Triclosan

2.2 Área de estudo e amostragem

A região estuarina de Santos e São Vicente está localizada na zona costeira do Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. Abriga um complexo industrial petroquímico; o maior porto da América Latina e é uma área turística e densamente povoada, onde o esgoto doméstico é coletado, pré-condicionado e lançado na Baía de Santos por meio de um emissário submarino distante 4,5 km da praia (Figura 2).



Figura 2. Baía de Santos e pontos de amostragem

A coleta das amostras de água foi realizada em 6 estações (superfície - S e fundo - F) no entorno do emissário submarino de esgoto na Baía de Santos, considerando as possibilidades de dispersão da pluma de efluente. Em cada estação de amostragem foram coletados três litros de água superficial (S - 1m) e água de fundo (F - 8m) utilizando uma garrafa de Van Dorn. As amostras foram colocadas em frascos de vidro âmbar previamente limpos com HNO₃, metanol e água destilada e foram transportados para o laboratório em caixa térmica com gelo (<6°C), posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o processamento.

2.3 Preparação das amostras

As amostras de água do mar foram preparadas de acordo com Pereira et al. (2016). Inicialmente, o pH de cada amostra foi ajustado para 7,0±0,5 antes da extração, utilizando uma solução de HCl (1M) e, posteriormente, as amostras foram filtradas através de papel filtro Whatman (diâmetro GF / C 47 mm, retenção de partículas 1,2 µm, Merck, Darmstadt, Alemanha). Os filtros foram lavados com 2 ml de metanol e o extrato de metanol recolhido foi adicionado à amostra filtrada. As amostras foram então submetidas a extração em fase sólida usando cartuchos Chromabond HR-X (3 mL, 200 mg, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). Os cartuchos de SPE foram pré-condicionados com 5 ml de metanol e 5 ml de água Milli-Q e as amostras filtradas (misturadas com extrato de metanol) foram carregadas nos cartuchos. Após as amostras terem sido carregadas, os cartuchos foram lavados com 5 mL de água Mili-Q (2 vezes) e depois secos sob vácuo durante 30 minutos. A etapa de eluição foi realizada com 5 mL de acetona e duas vezes com 5 mL de metanol. Após a eluição, as amostras foram secas sob fluxo de nitrogênio, ressuspensas em 1 mL com solução de água/acetonitrila (95: 5, v / v) e filtradas em filtro de 0,45 µM (Millipore) antes da análise por espectrometria de massas (LC-MS/MS).

2.4 Análise química (LC-MS/MS)

Para determinação do TCS nas amostras ambientais, 10 µL do eluato de cada amostra foram analisadas por um HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, CA, EUA) combinado com um espectrômetro de massas triplo quadrupolo híbrido íon trap/LC-QqLIT ABSciex, Ontario (Canadá). As amostras de água do mar foram analisadas por uma coluna Agilent

Eclipse XDB-C18 4,6 × 50 mm, 1,8 µm a 25°C, e a fase móvel em 0,1% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich LC-MS Grade) em água (solvente A) e acetonitrila (JT Baker LC-MS Grade) (solvente B). Um gradiente linear de 0,7 mL·min⁻¹ foi usado, começando com uma mistura de 95% de solvente A e 5% de solvente B. A concentração do solvente “A” diminuiu linearmente de 95% para 5% ao longo de 5 min e esta condição foi mantida por 1 minuto. A mistura foi então devolvida às condições iniciais ao longo de 2 minutos e o TCS foi detectado e quantificada usando fonte de ionização por “electrospray” (ESI - modo negativo) no modo Monitoramento de Reação Múltipla (MRM), com a seleção de um íon precursor e o produto de íon para quantificar e qualificar a substância (Tabela 1) (Pereira et al. 2016). Os parâmetros da fonte de íons adotados foram (i) gás de interface - 20 a.u; (ii) gás de colisão - 6 a.u; (iii) voltagem da ESI - (-) 4200; (iv) temperatura do gás de origem - 650°C; (v) gás do nebulizador - 40 a.u; (vi) gás de aquecimento - 65 a.u. Posteriormente foi empregada uma curva de calibração matriz, como descrito por Wille et al. (2010).

Tabela 1. Parâmetros MRM para o modo de íon negativo, limite de detecção, limite de quantificação e tempo de retenção.

Fármaco	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	RT (min.)
Triclosan	287	35	-35	-6	-6	0.17	0.56	6,40

Q1 (primeiro quadrupolo); Q3 (último quadrupolo); DP (potencial de desagregação); CE (energia de colisão); CXP (Potencial de Saída de Colisão); LOD (Limites de detecção); LOQ (limites de quantificação); RT (tempo de retenção).

2.6 Ensaio de toxicidade

2.6.1 Coleta e cultivo dos organismos modelo - copépodo *Nitokra sp* e ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

Os copépodos *Nitokra sp* empregados nos ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo e crônico foram cultivados em Erlenmeyers com capacidade para 1 litro, contendo cerca de 750 mL de água do mar reconstituída com salinidade entre 20 e 25 UPS e pH entre 6 e 7. Os frascos foram fechados com tampão de algodão e gaze para permitir as trocas gasosas e ao mesmo tempo evitar a evaporação da água. Os organismos em cultivo

foram alimentados três vezes por semana com um composto alimentar a base de ração de peixe e microalgas.

Os exemplares de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e do molusco bivalve *Perna perna* empregados nos ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo e crônico foram coletados por meio de mergulho livre na Ilha das Palmas, localizada no município do Guarujá, SP. Os organismos foram transportados em caixa térmica, recobertos com algas do gênero *Ulva sp* até a chegada ao laboratório onde foram mantidos em tanque de 300 L de água do mar com sistema de aeração, filtração, até o momento da realização dos ensaios.

2.6.2 Preparo das soluções-teste

Por possuir baixa solubilidade em água, Triclosan foi diluído em Dimetilsufóxido (DMSO) MERCK®, para posteriormente ser diluído em água do mar no preparo das soluções-teste.

Para todos os ensaios realizados com TCS, foram preparadas soluções, tendo como ponto de partida a concentração de 1:1000, ou seja, 1g de Triclosan em 1 litro de DMSO. Mantendo a proporção indicada, pesou-se 0,01g de Triclosan, sendo dissolvido em 10 mL de DMSO. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, foram coletados 5 (cinco) mL da solução de Triclosan e DMSO, que corresponde a 5 (cinco) mg de Triclosan, e avolumados para 1000 mL com água do mar, obtendo-se assim, uma solução- estoque com a concentração de 5 mg/L. A partir desta solução estoque, foram preparadas as soluções-teste dos ensaios realizados com TCS.

2.6.3 Controle positivo com o solvente Dimetilsufóxido (DMSO)

A fim de avaliar possíveis efeitos nos organismos-teste relacionados ao solvente (DMSO) utilizado na diluição de Triclosan, foi realizado nos ensaios de toxicidade um controle positivo do solvente com a maior concentração testada de cada ensaio.

2.6.4 Ensaio para avaliação de efeito agudo (mortalidade) com *Nitokra sp* (Crustácea, Harpacticoida)

O ensaio para avaliação de efeito agudo com a fração líquida seguiu o método descrito por Lotufo e Abessa (2002) que consiste na exposição de fêmeas adultas por 96 horas e

observação de efeitos letais (mortalidade) e foi conduzido conforme descrito no estudo realizado por Cortez (2011).

2.6.5 Ensaio para avaliação de efeito agudo (fertilização) com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea).

O ensaio seguiu o protocolo da USEPA (1991) com adaptação para espécie *Lytechinus variegatus*. O método consiste na exposição de espermatozoides de ouriço-do-mar (5×10^7 espermatozoides/mL), por um período de 1 hora, a diferentes concentrações de uma substância química e/ou amostras ambientais e foi conduzido conforme descrito no estudo de Cortez (2011).

2.6.6 Ensaio para avaliação de efeito agudo (fertilização) com *Perna perna* (Molusco, Bivalve)

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo da USEPA (1991) com adaptações (Zaroni et al., 2005), conforme descrito em Cortez et al. (2012).

2.6.7 Ensaio para avaliação de efeito crônico (sucesso reprodutivo) com *Nitokra sp* (Crustácea, Harpacticoida)

O ensaio para avaliação de efeito crônico com a fração líquida, seguiu o método descrito por Lotufo e Abessa (2002) que consiste na exposição de fêmeas adultas ovadas por 96 horas e observação de efeitos subletais (sucesso na eclosão de ovos). O ensaio foi realizado em tubos de ensaio com 4 (quatro) réplicas por concentração. Cada tubo recebeu 10 ml das soluções-teste de TCS (0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 mg/L). Os organismos expostos foram alimentados com uma solução de microalgas planctônicas no início do teste e após este procedimento, os recipientes-teste foram mantidos a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ por 96 horas em sala climatizada. Ao final do ensaio, foi adicionado uma solução de formol com o corante rosa de Bengala e, com auxílio de um estereomicroscópio, foi contado o número de náuplios e copepoditos em todas as concentrações.

2.6.8 Ensaio para avaliação de efeito crônico (embriolarval) de curta duração com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea).

O método de ensaio seguiu a norma técnica ABNT/NBR 15350:2012, que consiste na exposição de ovos de ouriço-do-mar a diferentes concentrações da substância química a ser testada e/ou amostras ambientais durante o período de desenvolvimento embriolarval, ou seja, de 24h à 28h para *Lytechinus variegatus* (Cortez, 2011).

2.6.9 Ensaio para avaliação de efeito crônico (embriolarval) com o bivalve *Perna perna* (Molusco, Bivalve)

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo da ASTM (1992) com pequenas adaptações (Zaroni et al., 2005), conforme descrito em Cortez et al. (2012).

2.7 Avaliação do risco ambiental em zona costeira

A avaliação do risco do TCS em água marinha foi realizada com base no protocolo da Agência Europeia de Medicamentos (EMA, 2006) por meio do cálculo do quociente de risco (QR). O QR foi estimado pela razão entre as concentrações ambientais de TCS analisadas em água superficial marinha e estuarina (MEC - mensuradas no presente estudo e com dados de zonas costeiras obtidos na literatura) e as concentrações de efeitos não previstos (PNEC). De acordo com o protocolo da EMA, a PNEC é calculada considerando as menores concentrações de efeito não observado (CENO) dividida por um fator de 10 (EMA, 2006), que faz referência a variações e incertezas dos dados obtidos em laboratório e à extrapolação de impacto no ambiente. Os critérios para estabelecer os níveis de risco (QR) foram: risco baixo (0,01 a 0,1); risco médio (0,1 a 1) e risco alto (>1) (Blair et al., 2013).

2.8 Análise dos dados

O teste T de *Student* foi empregado para avaliar diferenças entre controle de DMSO e o controle de água. Nos resultados dos ensaios para avaliação de efeito agudo que apresentaram dados normais (Chi-quadrado – χ^2), foi estabelecida a concentração letal que causou a mortalidade em 50% dos organismos expostos (CL50) para *Nitokra sp* e a concentração que causou a inibição da fertilização em 50% das células expostas para

Lytechinus variegatus, com o emprego do método de Próbitos. Os dados que não se apresentaram normais, a CL50 e a CE50 foram estimadas através do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton, 1977).

Nos resultados dos ensaios para avaliação de efeito crônico com *Lytechinus variegatus* foram estabelecidas as concentrações onde não foram detectados efeitos de importância biológica (CENO) e, as concentrações pontuais que causaram uma porcentagem específica de redução da resposta (CI 50 – Concentração de Inibição) através do teste de hipóteses e do método de estimativa pontual, respectivamente.

Para o estabelecimento da CENO, os dados foram analisados quanto à normalidade através do método do Chi-quadrado (χ^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 com o controle. Para todas as análises diferenças significativas foram determinadas quando $p < 0,05$. A determinação das concentrações pontuais (relação dose/resposta) que causaram inibição do desenvolvimento embriolarval em 50% dos organismos expostos foi calculada através do método de interpolação linear (Norberg-King, 1988).

3 Resultados

3.1 Concentrações Ambientais

A Tabela 2 apresenta as concentrações ambientais de TCS detectadas na Baía de Santos. O antimicrobiano foi detectado em água superficial nos pontos 1, 2, 4, 5 e 6 e em água de fundo nos pontos 2, 3, 4, 5 e 6. No entanto, apenas em água superficial dos pontos 1 e 2, o TCS esteve acima do limite de quantificação.

Tabela 2. Concentração ambiental do TCS em amostras de água superficial e de fundo (1-6 estações de amostragem) da Baía de Santos.

Concentração de TCS (ng/L)						
	1	2	3	4	5	6
Superfície (S)	4,70	2,64	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Fundo (F)	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

3.2 Ensaio de toxicidade

3.2.1 Controle do solvente DMSO

Não foi observada diferença estatística significativa (Teste *t* - *Student*) entre o controle de água e as maiores concentrações (0,50 mg/L e 0,60 mg/L) do solvente DMSO nos ensaios com *Nitokra sp*, *L. variegatus* e *P. perna*.

3.2.2 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito agudo com o copépodo *Nitokra sp* e com o ouriço-do-mar *L. variegatus*.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade para avaliação de toxicidade aguda com *Nitokra sp* e *Lytechinus variegatus*, *Perna perna*.

Tabela 3. Resultados dos ensaios para avaliação de efeito agudo (µg/L)

Organismo	CL50;96h	CI50;1h
<i>Nitokra sp</i> ^a	180 (170 - 190)	-
<i>Lytechinus variegatus</i> ^a	-	239 (237 - 241)
<i>Perna perna</i> ^b	-	410 (380 - 460)

a - Cortez (2011); b - Cortez et al., (2012)

3.2.3 Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico com o copépodo *Nitokra sp*, com o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e com o bivalve *Perna perna*.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade para avaliação de toxicidade crônica com *Nitokra sp*, *Lytechinus variegatus* e *Perna perna*.

Tabela 4. Resultados dos ensaios para avaliação de efeito crônico (µg/L)

Organismo	CENO	CEO
<i>Nitokra sp</i> (presente estudo)	12,5	25
<i>Lytechinus variegatus</i> ^a	40	60
<i>Perna perna</i> ^b	56	76
<i>Perna perna</i> (citotoxicidade) ^b	0,012	0,12

CENO - concentração de efeito não observado; CEO - concentração de efeito observado; a - Cortez (2011); b - Cortez et al. (2012).

Em todos os ensaios para avaliação de efeito agudo e crônico, o copépodo *Nitokra sp* demonstrou maior sensibilidade ao TCS, em relação aos outros organismos, quando considerado os ensaios tradicionais, com exceção ao ensaio de citotoxicidade com mexilhões adultos.

3.2.4 Avaliação do risco ambiental do TCS em zonas costeiras

A Tabela 5 apresenta os resultados da avaliação do risco ambiental do TCS, considerando os dados de toxicidade crônica (CENO), os dados de concentrações ambientais obtidos no presente estudo, bem como concentrações máximas detectadas em águas superficiais estuarinas e marinhas de outras localidades.

Tabela 5. Risco ambiental do TCS em zonas costeiras

Localidade	Concentração (µg/L)	Referência	Organismos	endpoint	PNEC	QR	Nível de risco
Baía de Santos	0,0047	Presente estudo	<i>L. variegatus</i> ^a	Des. embriolarval	4	0,0011	baixo
			<i>Nitokra sp</i>	reprodução	1,25	0,0037	baixo
			<i>Perna perna</i> ^b	Des. embriolarval	5,6	0,0008	baixo
				citotoxicidade	0,0012	3,91	alto
Hong Kong	0,0993	Wu et al. (2007)	<i>L. variegatus</i> ^a	Des. embriolarval	4	0,02	baixo
			<i>Nitokra sp</i>	reprodução	1,25	0,07	baixo
			<i>Perna perna</i> ^b	Des. embriolarval	5,6	0,017	baixo
				citotoxicidade	0,0012	82,75	alto
Espanha	0,31	Pintado-Herrera et al. (2014)	<i>L. variegatus</i> ^a	Des. embriolarval	4	0,07	baixo
			<i>Nitokra sp</i>	reprodução	1,25	0,24	médio
			<i>Perna perna</i> ^b	Des. embriolarval	5,6	0,05	baixo
				citotoxicidade	0,0012	258,3	alto
França	0,014	Di Poi et al. (2018)	<i>L. variegatus</i> ^a	Des. embriolarval	4	0,003	baixo
			<i>Nitokra sp</i>	reprodução	1,25	0,01	baixo
			<i>Perna perna</i> ^b	Des. embriolarval	5,6	0,002	baixo
				citotoxicidade	0,0012	11,6	alto

a - Cortez (2011); b - Cortez et al. (2012);

Considerando os resultados dos ensaios tradicionais empregados (desenvolvimento embrionário e sucesso reprodutivo), os níveis de risco ambiental do antimicrobiano TCS foram considerados “baixo” e “médio” (apenas em um cenário - *Nitokra sp*). Em todos os cenários de concentrações ambientais de TCS expostos, quando considerado os efeitos citotóxicos (estabilidade da membrana lisossomal) do estudo de Cortez et al. (2012), o nível de risco ambiental foi considerado “alto”.

4 Discussão

4.1 Ocorrência de TCS em água marinha

A ocorrência e a rota de contaminantes de preocupação emergente, tais como fármacos e produtos de higiene e cuidados pessoal em ambientes de água doce tem sido bem documentado na literatura científica. No entanto, a ocorrência dessa classe de substâncias em águas costeiras e marinhas são menos estudados e compreendidas (Brumovsky et al., 2017).

O antimicrobiano TCS vêm sendo detectado globalmente em águas superficiais estuarinas e marinhas (Wu et al., 2007; Chau et al., 2008; Xie et al., 2008; Fair et al., 2009; Bayen et al., 2013; Singh et al., 2010; Lv et al., 2014; Pintado-Herrera et al., 2014; Brumovsky et al., 2017, Di Poi et al., 2018). Na literatura sobre a ocorrência de TCS em águas costeiras, dois estudos se destacam com relação às concentrações máximas encontradas. Wu et al. (2007), em um estudo realizado em Hong Kong, detectaram um range de concentração de TCS que variou de 16,2 ng/L a 99,3 ng/L. No estudo realizado por Pintado-Herrera et al. (2014) o TCS foi detectado em água superficial do estuário de Guadalete (Cádiz, Espanha) em um range de concentração que variou de 27 ng/L a 310 ng/L. Em ambos os estudos, as altas concentrações de TCS encontradas foram associadas a áreas fortemente influenciadas pelo descarte de efluentes municipais com e sem tratamento.

No presente estudo as concentrações de TCS detectadas na Baía de Santos (< LOQ a 4,70 ng/L) encontraram-se em um range mais baixo, possivelmente devido à cloração que o efluente coletado no município de Santos e São Vicente recebe antes de ser lançado. Canosa et al. (2005) demonstraram que a cloração do anel fenólico é uma das principais vias de degradação do TCS. Outro fator que pode influenciar para uma

menor concentração de TCS em águas, está relacionado a tendência dessa molécula adsorver em material particulado e consequentemente acumular em sedimentos por processos de deposição e partição, uma vez que possui um valor de LogKow de 4,8 (Zhao et al., 2010). No estudo realizado por Pusceddu et al. (2018), TCS foi detectado em uma amostra composta (5 pontos de coleta) de sedimento da Baía de Santos na concentração de 15,14 ng/g. Agüera et al. (2003) detectaram TCS em sedimentos da costa da Almería (Espanha) em um range de concentração que variou de 0,27 µg/kg a 130,7 µg/kg.

Por outro lado, as concentrações de TCS detectadas no presente estudo coincidem com o range de concentrações observados na maioria dos estudos realizados em zonas costeiras. Por exemplo, no estudo realizado por Xie et al. (2008), a distribuição espacial do TCS foi determinada em águas superficiais marinhas da Baía Bight na Alemanha. As maiores concentrações de Triclosan foram encontradas em amostras coletadas próximas ao estuário, com uma variação de 1,21 ng/L a 6,87 ng/L. Na Flórida (EUA), Singh et al. (2010) detectaram uma concentração máxima de TCS de 9,2 ng/L e o antimicrobiano foi a substância mais frequentemente detectada. Bayen et al. (2013) detectaram TCS em amostras de água marinha coletadas na costa de Singapura e o range de concentração de TCS variou de < 0,55 ng/L a 10,5 ng/L. Na costa oeste da Suécia, Gustavsson et al. (2017) observaram concentrações de TCS que variaram de < 6,8 ng/L a 9,8 ng/L. Na costa da França, em uma área de cultivo de bivalves, Di Poi et al. (2018) observaram em água superficial, uma concentração máxima de TCS de 14,23 ng/L.

4.2 Efeitos biológicos adversos do TCS em organismos não-alvo

A constante descarga de águas residuais em zonas costeiras tropicais e a ocorrência de TCS nesses ambientes leva à necessidade da realização de estudos ecotoxicológicos com organismos representantes dos ecossistemas dessas regiões. De acordo com Khatikarn et al. (2016), os efeitos tóxicos do TCS em organismos de regiões temperadas têm sido amplamente reportados, no entanto há necessidade de uma melhor caracterização dos efeitos biológicos adversos em organismos de regiões tropicais.

Embora os estágios embrionários e larvais de invertebrados marinhos sejam mais sensíveis à diferentes substâncias químicas em relação aos organismos adultos (Huffman Ringwood, 1991), os resultados de toxicidade aguda e crônica obtidos no presente estudo demonstraram que o copépodo *Nitokra sp* foi ligeiramente mais sensível ao TCS, quando comparado ao ouriço-do-mar *L. variegatus*. O fato dos copépodos terem recebido alimento a base de microalgas no início dos experimentos, pode ter contribuído para uma outra via de exposição ao TCS, uma vez que essa substância pode bioacumular em razão de sua lipofilicidade. No estudo realizado por Coogan et al. (2007) foi demonstrado a bioacumulação do TCS e seu metabólito, metil-Triclosan, na microalga *Cladophora sp.*, com ordem de grandeza três vezes maior do que as concentrações ambientais detectadas neste mesmo estudo. Os efeitos nocivos do TCS (mortalidade de adultos e náuplios, fecundidade) sobre o copépodo marinho *Tigriopus japonicus* foi estudado por Park et al. (2017). Nesse estudo foram estimadas concentrações letais de 0,4 mg/L e 0,052 mg/L (CL50;48h) em adultos e náuplios, respectivamente. A concentração de efeito observado (CEO) que inibiu a fecundidade (número de náuplios gerados) de *T. japonicus* foi de 0,1 mg/L enquanto que a CENO foi 0,05 mg/L. No estudo realizado por Tato et al. (2018) foi estudado os efeitos do TCS na sobrevivência do copépodo *Acartia clausi* (náuplios) e, a CE50 e a CENO estimadas foram de 0,06 mg/L e 0,094 mg/L, respectivamente. Com relação aos efeitos do TCS sobre o copépodo *Nitokra sp*, é possível afirmar que os adultos dessa espécie mostraram-se mais sensíveis ao TCS em relação a *T. japonicus* (48h), possivelmente pelo maior tempo de exposição (96h). Em relação aos estudos com copépodos, o emprego de náuplios para avaliação dos efeitos biológicos adversos do TCS demonstrou ser mais adequado, devido à obtenção de respostas ainda mais sensíveis em relação aos adultos de *Nitokra sp* e *T. japonicus*.

Estudos com equinodermos também têm sido empregados para avaliar os efeitos tóxicos do TCS. No estudo realizado por Hwang et al. (2014) foram estimados os efeitos biológicos adversos do TCS sobre a taxa de fertilização e sobre o desenvolvimento embriolarval da espécie de ouriço-do-mar *Strongylocentrotus nudus*. A concentração estimada que causou a inibição significativa da taxa de fertilização foi de 0,43 mg/L (CE50), enquanto que a inibição do desenvolvimento embriolarval normal ocorreu na concentração de 0,11 mg/L (CEO). Tato et al. (2018) observaram efeitos do TCS no desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* e,

estimaram concentrações de 0,1 mg/L (CENO) e 0,149 mg/L (CE50). Ambos os estudos com as diferentes espécies de ouriço-do-mar apresentaram sensibilidade similar ao TCS, no entanto quando comparado com os dados obtidos no presente estudo nota-se uma maior sensibilidade da espécie *L. variegatus* (CENO - 0,04 mg/L). Os dados de efeito crônico obtidos no presente estudo com *L. variegatus* coincidem com os resultados obtidos no estudo realizado por Cortez et al. (2012) com o bivalve marinho *Perna perna* (desenvolvimento embriolarval), no qual foi estimada uma CENO de 0,056 mg/L. Di Poi et al. (2018) estimaram uma CE50 de 0,04 mg/L de TCS sobre o desenvolvimento embriolarval do bivalve *Crassostrea gigas*, fato que demonstra maior sensibilidade desse organismo em relação aos outros invertebrados utilizados nos estudos expostos. O efeitos nocivos do TCS no sucesso reprodutivo de invertebrados por estar relacionado também à capacidade dessa substância agir como um disruptor endócrino que pode alterar os processos reprodutivos normais (Park et al., 2017). Os resultados obtidos demonstram que o TCS altera significativamente a sobrevivência e o sucesso reprodutivo de invertebrados marinhos, porém mesmo quando utilizado fases mais sensíveis do desenvolvimento desses organismos, as concentrações de efeito estimadas (mg/L) são superiores às concentrações detectadas em águas superficiais de regiões costeiras. Nesse sentido, vale ressaltar que no estudo pretérito realizado por nosso grupo (Cortez et al., 2012), efeitos adversos biológicos do TCS foram observados em concentrações ambientalmente relevantes (CEO - 12 ng/L; 72h) quando o mecanismo de ação do fármaco foi considerado pelo ensaio de citotoxicidade (estabilidade da membrana lisossomal). Estes dados reforçam que a estabilidade lisossomal pode ser adequada de forma prognóstica para avaliar o risco ambiental do TCS em ambientes aquáticos.

4.3 Avaliação do risco ambiental do TCS em zonas costeiras

No estudo de Wijnen et al. (2017) foi elaborado um modelo global para simular a exportação de TCS pelos rios para águas costeiras e, os resultados, projetam um cenário de aumento significativo do aporte de TCS e estima que o número de rios com uma concentração média anual de TCS de 26,2 ng/L duplique entre os anos 2000 e 2050. Essas projeções, juntamente com o estudos que demonstraram a ocorrência de TCS em regiões costeiras, levam à necessidade de se avaliar os riscos ambientais do TCS nesses ecossistemas.

Estudos sobre a avaliação de risco do TCS em ambientes dulcícolas (rios) tem demonstrado níveis de risco que variam de “médio” a “alto” (Zhang et al., 2010; Peng et al., 2017).

A Tabela 5 apresenta concentrações de TCS (concentrações medidas - MEC) detectadas em águas estuarinas e marinhas de diferentes regiões do globo (Hong Kong, Espanha, França e Brasil) e, o nível de risco ambiental, baseado nos resultados dos ensaios de toxicidade com organismos marinhos realizados nesse estudo e nos estudos de Cortez (2011) e Cortez et al. (2012). Os resultados obtidos demonstram que quando considerados os ensaios tradicionais (reprodução de *Nitokra sp*, embriolarval com *L. variegatus* e com *P. perna*) o risco ambiental do TCS em todos os cenários analisados foi baixo, com exceção do copépodo *Nitokra sp* que, no cenário de concentração ambiental (maior concentração encontrada na literatura - 310 ng/L) detectada por Pintado-Herrera et al. (2014), apresentou risco ambiental médio. No estudo realizado por Tato et al. (2018) foram empregadas diferentes espécies marinhas (microalga, ouriço-do-mar, bivalve e crustáceo (náuplios)) para avaliar o risco ambiental de aditivos utilizados em materiais plásticos, incluso o TCS. Os resultados desse estudo demonstraram, para todas as espécies, que o risco ambiental do TCS em águas costeiras variou de “muito baixo” a “baixo”, coincidindo com os dados obtidos no presente estudo quando considerados os ensaios de toxicidade tradicionais. Por outro lado, Pusceddu et al. (2018) realizaram uma avaliação de risco ambiental do TCS e do fármaco ibuprofeno em sedimentos marinhos (baía de Santos) com o emprego de concentrações medidas (MEC) e resultados de ensaios tradicionais (desenvolvimento embriolarval com ouriço e bivalve). Diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, o risco do TCS em sedimentos marinhos foi “alto” mesmo considerando *endpoints* como desenvolvimento embriolarval. No estudo realizado por Santos et al. (2018) com amostras de sedimento do entorno de emissários submarinos da costa de São Paulo (Brasil), o risco ambiental do antimicrobiano TCS variou de “médio” a “alto”, de acordo com as concentrações medidas (MEC) nas diferentes localidades e com dados de concentrações de efeito obtidos na literatura. As estimativas de “médio” e “alto” risco em sedimentos marinhos pode estar relacionada às características hidrofóbicas do TCS e à tendência de adsorver em material particulado e depositar em sedimentos, o que leva as concentrações nesse compartimento ambiental serem mais

altas em relação a coluna de água (Zhao et al., 2010; Dann & Hontela, 2011; Pintado-Herrera et al., 2014).

Considerando os dados de efeitos do TCS sobre a estabilidade da membrana lisossômica do estudo de Cortez et al. (2012) e as concentrações ambientais de TCS das diferentes regiões, o risco ambiental do TCS foi “alto” em todos os cenários. A sensibilidade desse método com efeitos adversos estimados em concentrações ambientalmente relevantes pode estar relacionada ao mecanismo de ação do antimicrobiano. Estudos demonstraram a capacidade do TCS de inibir a síntese de ácidos graxos, prejudicar a função mitocondrial e promover efeitos membranotrópicos por meio da ação antibacteriana (Heath et al. 2001; Villalaín et al., 2001; Newton et al., 2005). Nesse sentido, tratando-se de uma avaliação de risco ambiental, torna-se importante ressaltar a relevância ecológica desse *endpoint*, uma vez que os dados podem suportar decisões regulatórias sobre o uso desse antimicrobiano e a proteção dos ecossistemas costeiros. Alguns autores demonstraram que os efeitos adversos sobre a estabilidade da membrana do lisossomo pode implicar em um estresse fisiológico significativo, uma vez que a atividade lisossomal em bivalves está diretamente relacionada à imunorreatividade, pois lisossomos desempenham um papel central na degradação de materiais fagocitados, além de comprometer o sucesso reprodutivo de espécies (bivalves), bem como apresenta relação com mudanças na estrutura da comunidade bentônica (Moore e Viarengo, 1987; Ringwood et al., 2004; Pereira et al., 2014).

Os resultados obtidos apontam para necessidade de inserir nas avaliações de risco ambiental, além dos ensaios tradicionais (nível indivíduo/população), métodos para avaliação dos efeitos biológicos que sejam orientados pelo mecanismo de ação da substância de interesse de forma a gerar avaliações de risco ambiental mais precisas e protectivas.

5 Conclusão

As concentrações ambientais detectadas na Baía de Santos enquandram-se em um range já demonstrado em outros estudos em regiões costeiras. O antimicrobiano apresentou “baixo” risco em todos os cenários de concentrações ambientais quando considerado os resultados dos ensaios tradicionais, com exceção dos efeitos sobre a

reprodução de *Nitocra* em concentrações relatadas no litoral da Espanha, quando o QR apontou para “médio” risco. Efeitos adversos em concentrações ambientalmente relevantes, bem como a determinação de risco “alto” em águas costeiras ocorreu quando considerado os efeitos na estabilidade da membrana lisossomal. Nesse contexto, se faz necessário aprofundar os estudos ecotoxicológicos com TCS empregando *endpoints* orientados pelo mecanismo de ação tóxica, para melhor caracterizar os riscos associados à introdução contínua desse antimicrobiano em ecossistemas aquáticos.

Referências

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas – 2012. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). Rio de Janeiro. NBR 15350:2012.

Aguera, A., Alba-Fernández, A. R., Piedra, L., Mézcua, M., Gómez, M.J. 2003. Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, vol 480, pp 193-205.

Aranami, K., Readman, J.W. 2007. Photolytic degradation of Triclosan in freshwater and seawater. *Chemosphere*, vol 66, pp 1052-1056.

ASTM - American Society of Testing and Materials. E 724-89. 1992. 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, vol. 11, pp. 377e394.

Bayen, S., Zhang, H., Desai, M.M., Ooi, S.K., Kelly, B.C. 2013. Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore's marine environment: Influence of hydrodynamics and physical-chemical properties. *Environ Pollut*, vol 182, pp 1 - 8.

Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., Provini, A. 2009. In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and citotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes. *Aquat Toxicol*, vol 91, pp 238 – 244.

Blair, B.D., Crago, J.P., Hedman, C.J., Klaper, R.D. 2013. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere*, vol 93, pp 2116 - 2123.

Brumovský, M., Becanova, J., Kohoutek, J., Borghini, M., Nizzetto, L. 2017. Contaminants of emerging concern in the open sea waters of the Western Mediterranean. *Environ Pollut*, vol 229, pp 976 - 983.

- Canosa, P., Morales, S., Rodríguez, I., Rubí, E., Cela, R., Gómez, M. 2005. Aquatic degradation of triclosan and formation of toxic chlorophenols in presence of low concentrations of free chlorine. *Anal Bioanal Chem*, vol 383, pp 1119–1126.
- Coogan, M.A., Edziyie, R.E., LaPoint, T.W., Venables, B.J. 2007. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere*, vol 67, pp 1911-1918.
- Cortez, F.S., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Cesar, A., Choueri, R.B., Martini, G.A., Bohrer-Morel, M.B., 2012. Biological effects of environmentally relevant concentrations of the pharmaceutical Triclosan in the marine mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Environ Pollut*, vol 168, pp 145–150.
- Chau, W.C., Wu, J-L., Cai, Z. 2008. Investigation of levels and fate of triclosan in environmental waters from the analysis of gas chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. *Chemosphere*, vol 73, pp 513 - 517.
- Chen, Z-F., Ying, G-G., Liu, Y-S., Zhang, Q-Q., Zhao, J-L., Liu, S-S., Chen, J., Peng, F-J., Lai, H-J., Pan, C-G. 2014. Triclosan as a surrogate for household biocides: An investigation into biocides in aquatic environments of a highly urbanized region. *Water Res*, vol 58, pp 269 - 279.
- Chen Z-F., Wen, H-B., Dai, X., Yan, S-C., Zhang, H., Chen, Y-Y., Du, Z., Liu, G., Cai, Z. 2018. Contamination and risk profiles of triclosan and triclocarban in sediments from a less urbanized region in China. *J Hazard Mater*, vol 357, pp 376 - 383.
- Dann, A.B., Hontela, A. 2011. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J Appl Toxicol*, vol 31, pp 285–311.
- DeLorenzo, M. E., Fleming, J. 2008. Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch Environ Contam Toxicol*, vol 54, pp 203–210.
- Di Poi, C., Costil, K., Bouchart, V., Halm-Lemeille, M-P. 2018. Toxicity assessment of five emerging pollutants, alone and in binary or ternary mixtures, towards three aquatic organisms. *Environ Sci Pollut Res*, vol 25, pp 6122–6134.

Fair, P.A., Lee, H-B., Adams, J., Darling, C., Pacepavicius, G., Alae, M., Bossart, G. D., Henry, N., Muir, D. 2009. Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and their environment. *Environ Pollut*, vol 157, pp 2248-2254.

Gustavsson, B.M., Magnér, J., Almroth, B.C., Eriksson, M.K., Sturve, J., Backhaus, T. 2017. Chemical monitoring of Swedish coastal waters indicates common exceedances of environmental thresholds, both for individual substances as well as their mixtures. *Mar Poll Bull*, vol 122, pp 409 - 419.

Hamilton, M. A., Russo R. C., Thurston R. V. 1977. Trimmed Spearman–Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol* 11:71.

Heath, R.J., White, S.W., Rock, C.O. 2001. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog Lipid Res*, vol 40, pp 467–497.

Hwang, J., Suh, S-S., Chang, M., Park, S.Y., Ryu, T.K., Lee, S., Lee, T-K. 2014. Effects of triclosan on reproductive parameters and embryonic development of sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. *Ecotoxicol Environ Saf*, vol 100, pp 148 - 152.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewaters contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol*, vol 36, pp 1202 - 1211.

Khatikarn, J., Satapornvanit, K., Price, O.R., Van den Brink, P.J. 2016. Effects of triclosan on aquatic invertebrates in tropics and the influence of pH on its toxicity on microalgae. *Environ Sci Pollut Res*, doi:10.1007/s11356-016-7302-0.

Latch, D.E., Packer, J.L., Arnold, W.A., McNeill, K. 2003. Photochemical conversion of triclosan to 2,8–dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution. *J Photoch Photobio A*, vol 158, pp 63-66.

- Lehutso, R.F., Daso, A.P., Okonkwo, J.O. 2017. Occurrence and environmental levels of triclosan and triclocarban in selected wastewater treatment plants in Gauteng Province, South Africa. EMCs, vol 3, pp 107 - 114.
- Lindstrom, A., Buerge, I.J., Poiger, T., Bergqvist, P-A., Muller, M.D., Buser, H-R. 2002. Occurrence and Environmental Behavior of the Bactericide Triclosan and its Methyl Derivative in Surface Waters and in Wastewater. Environ Sci Technol, vol 36, pp 2322-2329.
- Lotufo, G. R., Abessa, D. M. S. 2002. Testes de toxicidade com sedimento e água intersticial estuarinos utilizando copépodos bentônicos. In: Métodos em Ecotoxicologia Marinha - Aplicações no Brasil. São Carlos, Resumos, p.151 - 162.
- Lozano, N., Rice, C.P., Ramirez, M., Torrents, A. 2013. Fate of Triclocarban, Triclosan and Methyltriclosan during wastewater and biosolids treatment processes. Water Res, vol 47, pp 4519 - 4527.
- Ly, M., Sun, Q., Xu, H., Lin, L., Chen, M., Yu, C-P. 2014. Occurrence and fate of triclosan and triclocarban in a subtropical river and its estuary. Mar Pollut Bull, vol 88, pp 383 - 388.
- Matozzo, V., Formenti, A., Donadello, G., Marin, M.G. 2012. A multi-biomarker approach to assess effects of Triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. Mar Environ Res, vol 74, pp 40 - 46.
- Moore, M. N., Viarengo, A. 1987. Lysosomal Membrane Fragility and Catabolism of Cytosolic Proteins: Evidence for a Direct Relationship. Experientia, vol 43, pp 320-323.
- McAvoy, D.C., Schatowitz, B., Jacob, M., Hauk, A., Eckhoff, W.S. 2002. Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. Environ Toxicol Chem, vol 21, pp 1323 - 1329.
- Newton, A.P.N., Cadena, S.M.S.C., Rocha, M.E.M., Carnieri, E.S., Oliveira, M.B.M., 2005. Effect of triclosan (TRN) on energy-linked functions of rat liver mitochondria. Toxicol Lett, vol 60, pp 49 - 59.

Norberg-King, T. 1988. An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center. Technical Report pp 05-88.

Oliveira, R., Domingues, I., Grisolia, C. K., Soares, A. M. V. M. 2009. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environ Sci Pollut Res*, vol 16, pp 679–688.

Orvos, D. R., Versteeg, D. J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V. 2002. Aquatic toxicity of triclosan. *Environ Toxicol Chem*, vol 21, pp 1338- 1349.

Papageorgiou, M., Kosma, C., Lambropoulou, D. 2016. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci Total Environ*, vol 93, pp 2116 - 2123.

Park J.C., Han, J., Lee, M-C., Seo, J.S., Lee, J-S. 2017. Effects of triclosan (TCS) on fecundity, the antioxidant system, and oxidative stress-mediated gene expression in the copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquat Toxicol*, vol 189, pp 16 - 24.

Peng, F-J., Pan, C-G., Zhang, M., Zhang, N-S., Windfeld, R., Salvito, D., Selck, H., Van den Brink, P.J., Ying, G-G. 2017. Occurrence and ecological risk assessment of emerging organic chemicals in urban rivers: Guangzhou as a case study in China. *Sci Total Environ*, vol 589, pp 46 - 55.

Pereira, C.D.S., Abessa, D.M.S., Choueri, R.B., Almagro-Pastor, V., Cesar, A., Maranhão, L.A., Martín-Díaz, M.L., Torres, R.J., Gusso-Choueri, P.K., Almeida, J.E., Cortez, F.S., Mozeto, A.A., Silbiger, H.L.N., Sousa, E.C.P.M., DelValls, T.A., Bainy, A.C.D. 2014. Ecological relevance of sentinels' biomarker responses: A multi-level approach. *Mar Environ Res*, vol 96, pp 118-126.

Pereira, C.D.S., Maranhão, L.A., Cortez, F.S., Pusceddu, F.H., Santos, A.R., Ribeiro, D.A., Cesar, A., Guimarães, L.L., 2016. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Sci Total Environ*, vol 548–549, pp 148–154.

Pintado-Herrera, M.G., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A. 2014. Determining the distribution of triclosan and methyl triclosan in estuarine settings. *Chemosphere*, vol 95, pp 478 - 485.

Pusceddu, F.H., Choueri, R.B., Pereira, C.D.S., Cortez, F.S., Santos, D.R.A., Moreno, B.B., Santos, A.R., Rogero, J.R., Cesar, A. 2018. Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints. *Environ Pollut*, vol 232, pp 274 - 283.

Ringwood, A.H. 1991. Short-term accumulation of cadmium by embryos, larvae and adults of an Hawaiian bivalve, *Isognomon californicum*. *J Exp Mar Bio Ecol*, vol 149, pp 55 - 66.

Ringwood, A.H., Hoguet, J., Keppler, C., Gielazyn, M. 2004. Linkages between cellular biomarker responses and reproductive success in oysters – *Crassostrea virginica*. *Mar Environ Res*, vol 58, pp 151-155.

Sanchez-Prado, L., Llompart, M., Lores, M., García-Jares, C., Bayona, J.M., Cela, R. 2006. Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction. *Chemosphere*, vol 65, pp 1338–1347.

Santos, D.M., Buruaem, L., Gonçalves, R.M., Williams, M., Abessa, D.M.S., Kookana, R., Marchi, M.R.R. 2018. Multiresidue determination and predicted risk assessment of contaminants of emerging concern in marine sediments from the vicinities of submarine sewage outfalls. *Mar Pollut Bull*, vol 129, pp 299 - 307.

Singh, S.P., Azua, A., Chaudhary, A., Khan, S., Willett, K.L., Gardinali, P.R. 2010. Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. *Ecotoxicology*, vol 19, pp 338–350.

Sun, Q., Li, Y., Li, M., Ashfaq, M., Lv, M., Wang, H., Hu, A., Yu, C-P. 2016. PPCPs in Jiulong River estuary (China): Spatiotemporal distributions, fate, and their use as chemical markers of wastewater. *Chemosphere*, vol 150, pp 596 - 604.

Tato, T., Salgueiro-Gonzalez, N., Leo, V.M., Gonzalez, S., Beiras, R. 2018. Ecotoxicological evaluation of the risk posed by bisphenol A, triclosan, and 4-

nonylphenol in coastal waters using early life stages of marine organisms (*Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus* and *Acartia clausi*). Environmental Pollution, vol 232, pp 173 - 182.

US EPA - United States Environmental Protection Agency. 1991. 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.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. 2008. Reregistration Eligibility Decision for Triclosan. List B. Case N°. 2340. p. 98.

Villalain, J., Mateo, C.R., Aranda, F.J., Shapiro, S., Micol, V. 2001. Membranotropic effects on the antibacterial agent Triclosan. Arch Biochem Biophys, vol 390, pp 128 - 136.

Wille, K., Noppe, H., Verheyden, K., Vanden Bussche, J., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., De Brabander, H.F., Vanhaecke, L., 2010. Validation and application of an LC-MS/ MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. Anal Bioanal Chem, vol 397, pp 1797–1808.

Wu, J-L., Lam, N.P., Martens, D., Kettrup, A., Cai, Z. 2007. Triclosan determination in water related to wastewater treatment. Talanta, vol 72, pp 1650–1654.

Wijnen, J.V., Ragas, A.M.J., Kroeze, C. 2017. River export of triclosan from land to sea: A global modelling approach. Sci Total Environ, doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.100

Xie, Z., Ebinghaus, R., Floser, G., Caba, A., Ruck, W. 2008. Occurrence and distribution of triclosan in the German Bight (North Sea). Environ Pollut, vol 156, pp 1190–1195.

Xu, E.G.B., Liu, S., Ying, G-G., Zheng, G.J.S., Lee, J.H.W., Leung, K.M.Y. 2014. The occurrence and ecological risks of endocrine disrupting chemicals in sewage effluents from three different sewage treatment plants, and in natural seawater from a marine reserve of Hong Kong. Mar Pollut Bull, vol 85, pp 352 - 362.

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

Zhao, J-L., Ying, G-G., Liu, Y-S., Chen, F., Yang, J-F., Wang, L. 2010. Occurrence and risks of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: From source to the receiving environment. *J Hazard Mater*, vol 179, pp 215 - 222.

CAPÍTULO 8 - Conclusões

- ⇒ O antihipertensivo losartan foi quantificado em 100% das amostras da baía de Santos, variando de 0,2 a 8,6 ng/L. Enquanto efeitos sobre gametas e embriões ocorreram apenas em exposições na ordem de mg/L, o metabolismo de fase I (DBF), fase II (GST) e o sistema antioxidante (GPX) foram alterados, bem como efeitos subletais foram observados após exposição ao range de ng/L a µg/L, aproximando-se às concentrações reportadas para efluentes e matrizes ambientais;
- ⇒ O antidepressivo fluoxetina foi detectado em amostras superficiais e de fundo na baía de Santos e quantificada na concentração máxima de 0,58 ng/L. FLX ativou o metabolismo de detoxicação de fase I (EROD e DBF) e fase II (GST) e causou efeitos subletais em concentrações ambientalmente relevantes. Destaca-se a citotoxicidade do fármaco a partir de efeitos sobre membranas e lisossomos demonstrados no presente trabalho e corroborado por estudos pretéritos, sugerindo que baixas concentrações de FLX (ng/L) podem causar alterações em processos celulares e fisiológicos, comprometendo o estado geral de saúde em bivalves;
- ⇒ O antidiabético metformina foi quantificado na baía de Santos em concentrações de até 2,77 ng/L. Exposição a curto prazo (48h) a MET alterou significativamente o metabolismo de detoxificação, bem como promoveu efeitos citogenotóxicos em concentrações ambientalmente relevantes (300 ng/L). Esse é o primeiro estudo sobre os efeitos subletais da MET em um invertebrado marinho e os resultados poderão subsidiar avaliações de risco ambiental dessa substância frequentemente encontrada em ambientes aquáticos na ordem de µg/L;
- ⇒ O hormônio sintético 17 α -etinilestradiol provocou alterações nas atividades da EROD e GST, ambos nos tecidos da glândula digestiva. Os efeitos do EE2 sobre a estabilidade da membrana lisossomal em baixas concentrações (150 ng/L) apontam para o potencial citotóxico de hormônios sintéticos, além dos já conhecidos comprometimentos do sistema endócrino. A relevância fisiológica e ecológica das alterações lisossomais na espécie utilizada sugerem que este *endpoint* pode ser empregado em futuros estudos de avaliação do mecanismos de ação e risco ambiental, uma vez que desdobramentos desse efeito podem comprometer o sistema imunológico, o crescimento e o potencial reprodutivo das espécie expostas;

- ⇒ O antibiótico amoxicilina ativou o metabolismo de detoxificação de fase I (EROD e DBF) e fase II (GST), bem como o sistema antioxidante (GPX). Efeitos subletais, tais como lipoperoxidação e desestabilização da membrana lisossômica também foram observados. Embora a AMOX não tenha sido detectada na Baía de Santos, as alterações enzimáticas (DBF) e os efeitos biológicos adversos ocorreram em concentrações já reportadas em ecossistemas aquáticos, onde além da presença em efluentes domésticos, amoxicilina é introduzida por práticas de cultivos de vertebrados e invertebrados, podendo causar efeitos adversos ligados ao estresse oxidativo com desdobramentos em processos citotóxicos;
- ⇒ O antimicrobiano triclosan inibiu significativamente a reprodução do copépodo *Nitokra sp* em concentrações na ordem de mg/L. Considerando os dados de toxicidade dos ensaios tradicionais dos estudos de Cortez (2011) e Cortez et al. (2012) o risco ambiental do triclosan foi “baixo”. Risco “médio” ocorreu quando considerado os dados de efeito crônico com o copépodo *Nitokra sp* em um cenário de concentração ambiental detectado por Pintado-Herrera et al. (2014). O antimicrobiano promoveu um risco ambiental “alto” em todos os cenários de concentrações ambientais apresentados, quando considerado os dados de citotoxicidade do estudo realizado por Cortez et al. (2012);
- ⇒ O bivalve marinho *Perna perna*, espécie utilizada como modelo biológico, demonstrou ser adequada para estudos com substâncias bioativas, e os tecidos brânquias e hemolinfa foram os mais responsivos. Destaca-se a estabilidade da membrana lisossomal como biomarcador eficiente para todas as classes de fármacos estudadas, e considerando a relevância ecológica desse *endpoint*, futuros estudos podem considerar sua utilização para fins de avaliação/monitoramento ambiental;
- ⇒ Nossos resultados apontam para a necessidade de soluções técnicas para remoção de fármacos nas ETEs e ETAs, tais como tratamento secundário, terciário, processos oxidativos avançados, ozonização, adsorção (carvão ativado) e osmose reversa;

- ⇒ Visando a proteção de comunidades aquáticas prevista na legislação ambiental vigente, torna-se necessário a realização de estudos ecotoxicológicos focados no mecanismo de ação tóxica que possibilitem a geração de bancos de dados e suportem a elaboração de diretrizes específicas para o estabelecimento de padrões de emissão, monitoramentos e avaliações de risco ambiental de substâncias farmacêuticas;
- ⇒ Por fim, aponta-se a necessidade de conscientização da população com relação ao consumo sustentável e descarte apropriado de medicamentos vencidos, bem como a prescrição consciente pelos profissionais da área da saúde, com foco em moléculas ambientalmente mais seguras e, com base em um sistema que indique o potencial tóxico dos diferentes medicamentos para dar suporte às decisões.

Apêndice

