

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA
CONSIDERANDO SUA PRESENÇA NO AMBIENTE AQUÁTICO

Lara Barroso Brito

Goiânia
2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Lara Barroso Brito

Título do trabalho: Avaliação ecotoxicológica do antibiótico amoxicilina considerando sua presença no ambiente aquático

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Lara Barroso Brito
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 25.01.2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO ANTIBIÓTICO AMOXICILINA
CONSIDERANDO SUA PRESENÇA NO AMBIENTE AQUÁTICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientada: Lara Barroso Brito

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Goiânia
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Brito, Lara Barroso

Avaliação ecotoxicológica do antibiótico amoxicilina considerando sua presença no ambiente aquático [manuscrito] / Lara Barroso Brito. - 2016.

55 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira; co orientadora Dra. Marize Campos Valadares.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Ecotoxicidade. 2. Fármacos. 3. β -lactâmicos. 4. Zebrafish (Danio rerio). 5. Biomarcadores enzimáticos. I. Oliveira, Gisele Augusto Rodrigues de, orient. II. Título.

CDU 615



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aluno (a): Lara Barroso de Brito

Orientador (a): Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Título da Dissertação: "Avaliação ecotoxicológica do antibiótico amoxicilina considerando sua presença no ambiente aquático".

Data: 23 de março de 2016

Horário: 09:00 horas

Local: Sala da pós-graduação/anexo II da Faculdade de Farmácia

Sugestões*:

*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

A aluna deverá fazer as alterações sugeridas pela banca no relatório final, principalmente relacionadas à discussão do trabalho.

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/R eaprovado	Assinatura
Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG) - Presidente	Aprovada	Gisele A. Rodrigues Oliveira
Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira (USP)	Aprovado	Danielle Palma de Oliveira
Prof. Dr. Rhaul de Oliveira (UnB)	Aprovado	Rhaul de Oliveira
Prof. Dr. Eric de Souza Gil (FF/UFG) - Suplente		
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha (FF/UFG) - Suplente		

Parecer Final	Aprovado/Reprovado	APROVADA
----------------------	---------------------------	-----------------

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BRITO, Lara Barroso

Título do trabalho: Avaliação Ecotoxicológica do Antibiótico Amoxicilina Considerando sua Presença no Ambiente Aquático

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Nordman e Jadivan, pelo amor incondicional, por acreditarem sempre em mim e pelo apoio nessa jornada.

Aos meus irmãos e minha cunhada, Nordman Junior, Pedro Henrique e Aira, por sempre me mostrarem que a vida não é só estudar e me ensinarem a levar a vida de forma mais leve. E pelo presente de ser madrinha do bebê João.

Ao meu marido, Cristiano, por sempre acreditar no meu potencial, pelo amor, paciência e companheirismo.

À minha orientadora, Dra. Gisele, pela confiança, dedicação, ensinamentos, paciência, compreensão e amizade.

À minha co-orientadora, Dra. Marize, pelo oportunidade de aprendizado desde a graduação, pela confiança e apoio nesse projeto.

Ao Dr. César e toda sua equipe, em especial ao Dr. Rhaul, pela recepção, oportunidade e aprendizado durante os ensaio de zebrafish, realizados em Brasília.

À Laís, minha companheira de projeto e da vida, agradeço pelo apoio, companheirismo e ajuda nos momentos difíceis desse mestrado.

Aos colegas de laboratório, pelos conhecimentos compartilhados, ajudas e palavras de apoio quando necessário, pelos cafés e bolos da tarde.

Aos amigos que a vida me presenteou, pelo incentivo, apoio e compreensão.

À secretaria da Pós-graduação, Fernanda, pela ajuda, carinho, profissionalismo, competência e amizade.

Ao Cnpq pelo apoio financeiro.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os fármacos e insumos farmacêuticos podem ser introduzidos no ambiente de forma direta, ou seja, através do descarte doméstico ou por efluentes da indústria farmacêutica, e ainda indiretamente, por meio da excreção humana e animal. Os antibióticos são considerados contaminantes emergentes, uma vez que são detectados em concentrações muito baixas no ambiente e seus efeitos sobre o ambiente e saúde humana permanecem incertos. Os β -lactâmicos representam mais de 70% dos antibióticos consumidos no Brasil. Assim, dentro deste contexto, este trabalho propôs avaliar o impacto ambiental do antibiótico amoxicilina (AMX) em diferentes organismos, considerando a sua presença nos recursos hídricos. Para tanto foram utilizados os ensaios de fitotoxicidade com sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e alface (*Lactuca sativa*) e de toxicidade aguda com *Artemia salina*, assim como o teste com o estágio embrionário larval de zebrafish (*Danio rerio*), considerando os efeitos letais, subletais e atividade de biomarcadores enzimáticos. A AMX não foi tóxica para as sementes de tomate, pepino e alface, não apresentando diferenças estatísticas significativas para os parâmetros de germinação das sementes e do desenvolvimento das raízes. Para o microcrustáceo *A. salina*, a AMX não induziu mortalidade significativa com valores de CL_{50} maior que 100 mg/L para 24 h e 48 h de exposição, sendo classificada como não tóxica (não categorizada) de acordo com o Globally Harmonized System (GHS). A AMX não provocou mortalidade significativa nos embriões e larvas de zebrafish durante as 168 h de exposição, assim como não alterou significativamente a eclosão dos embriões e o equilíbrio de larvas de zebrafish. Entretanto, o antibiótico aumentou significativamente o tamanho das larvas desse peixe nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25 mg/L. As atividades da catalase (CAT), da glutathione S-transferase (GST) e da lactato desidrogenase (LDH) de embriões e larvas de peixe-zebra foram inibidas significativamente nas exposições à 12,5 mg/L de AMX, 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L de AMX e 1,5; 3,0; 6,25 e 12,5 mg/L de AMX, respectivamente. Portanto, o antibiótico AMX não apresenta toxicidade aguda relevante para os organismos testados, mas causa alguns efeitos subletais em larvas de zebrafish em concentrações superiores às encontradas no ambiente aquático, o que indica a necessidade de se investigar exposições a esse composto a longo prazo.

Palavras-chave: ecotoxicidade, fármacos, β -lactâmico, sementes, *Artemia salina*, zebrafish (*Danio rerio*), biomarcadores enzimáticos.

ABSTRACT

Pharmaceuticals can be introduced directly into the environment by household disposal or pharmaceutical industry waste and indirectly through the excretion of humans and animals. Antibiotics are considered emerging contaminants because they are typically present at very low levels in the environment and their human or ecological health effects are unclear. β -lactams represent more than 70% of antibiotics consumed in Brazil. Thus, in this context, this work evaluated the environmental impact of antibiotic amoxicillin (AMX) in different organisms, considering its presence in water. For that, we used the phytotoxicity test with seeds of tomato (*Lycopersicon esculentum*), cucumber (*Cucumis sativus*) and lettuce (*Lactuca sativa*), brine shrimp toxicity assay (*Artemia salina*), and embryo-larval toxicity test zebrafish (*D. rerio*), considering the lethal and sublethal effects and biomarkers determinations. AMX showed no toxicity to seeds of tomato, cucumber and lettuce in relation to seed germination and root elongation endpoints. For microcrustacean *A. salina*, AMX did not induce significant mortality after 24 h and 48 h exposure ($LC_{50} > 100$ mg/L) and it was classified as non-toxic (not categorized) according to the Globally Harmonized System (GHS). AMX also did not cause significant mortality in embryos and larvae zebrafish during 168 h of exposure. It had no significant effect on embryos hatching and larvae equilibrium. However, AMX significantly increased the larvae size at 6.25, 12.5 and 25 mg/L. Catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) activities in embryos and larvae of zebrafish were inhibited at 12.5 mg/L of AMX, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 mg/L of AMX and 1.5, 3.0, 6.25 and 12.5 mg/L of AMX, respectively. Therefore, AMX showed no significant acute toxicity to tested organisms, but it induced sublethal effects on larvae zebrafish in concentrations greater than those found in the aquatic environment, indicating that long-term chronic exposures must be investigated.

Keywords: Ecotoxicity, pharmaceuticals, β -lactam, seeds, *Artemia salina*, zebrafish (*Danio rerio*), enzymatic biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema com as possíveis rotas de entrada de fármacos e medicamentos no meio ambiente.....	17
FIGURA 2. Estrutura química geral das penicilinas.	19
FIGURA 3. Fórmula estrutural da amoxicilina.....	21
FIGURA 4. Desenvolvimento das sementes de pepino (<i>Cucumis sativus</i>) após 120 horas de incubação com água destilada - controle negativo (A) e com sulfato de zinco - controle positivo (B).	30
FIGURA 5. Artefatos utilizados para eclosão dos ovos de <i>A. salina</i>	31
FIGURA 6. Modelo do delineamento experimental do Fish Embryo Extend Toxicity Test em placas de 24 poços, onde nC representa o controle negativo, nX corresponde as concentrações testadas de amoxicilina e iC o controle interno da placa	33
FIGURA 7. Efeitos da amoxicilina sobre a mortalidade de embriões e larvas de zebrafish após 168 h de exposição	37
FIGURA 8. Efeito da amoxicilina sobre a taxa de eclosão dos ovos de zebrafish após 168 h de exposição.....	38
FIGURA 9. Efeito da amoxicilina sobre a perda de equilíbrio das larvas de zebrafish após 168 h de exposição	38
FIGURA 10. Fotomicroscopia obtida neste trabalho, mostrando larvas de zebrafish expostas: (A) larva do controle negativo após 72 h (3,2X); (B) larva exposta à 50 mg/L após 72 h de exposição (4X), apresentando edema cardíaco (EC), deformação na cauda (DC) e alteração na absorção do saco vitelínico (SV); (C) larva exposta à 100 mg/L após 72 h (4X), apresentando edema cardíaco (EC), deformação na cauda (DC) e alteração na absorção do saco vitelínico (SV).....	39
FIGURA 11. Efeito da amoxicilina sobre o tamanho das larvas após 168 h de exposição.....	39
FIGURA 12. Efeitos subletais da amoxicilina em larvas de zebrafish sobre a atividade de biomarcadores enzimáticos.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Porcentagem das vendas globais das indústrias farmacêuticas distribuídas por região no ano de 2014.	16
TABELA 2. Vendas globais de medicamentos por classes terapêuticas no ano de 2014.	16
TABELA 3. Concentrações dos principais antibióticos presentes nos recursos hídricos de diferentes locais do mundo.	20
TABELA 4. Concentrações do antibiótico amoxicilina presentes em diferentes recursos hídricos de diversos países.	22
TABELA 5. Efeitos agudos e subcrônicos da amoxicilina em diferentes organismos da cadeia trófica e tempos de exposição.	22
TABELA 6. Taxa de germinação e comprimento das raízes de pepino (<i>C. sativus</i>), alface (<i>L. sativa</i>) e tomate (<i>L. esculentum</i>) após 120 horas de exposição à amoxicilina. Resultados apresentados em média da triplicata \pm DP (desvio padrão).	35
TABELA 7. Mortalidade de <i>A. salina</i> induzida por 24 h e 48 h de exposição à amoxicilina.	36
TABELA 8. Taxa de germinação e comprimento das raízes de pepino (<i>C. sativus</i>), alface (<i>L. sativa</i>) e tomate (<i>L. esculentum</i>) após 120 horas de exposição à amoxicilina.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMX	Amoxicilina
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catalase
CE ₅₀	Concentração média de efeito
CE ₁₀	Concentração de efeito em 10% da população
CE ₂₅	Concentração de efeito em 25% da população
CI ₅₀	Concentração média de inibição
CL ₅₀	Concentração média letal
DL ₅₀	Dose letal 50%
ETA	Estação de tratamento de água
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FET	Fish Embryo Acute Toxicity
GHS	Globally Harmonized System
GST	Glutathione S-transferase
LDH	Lactato desidrogenase
MEC	Concentração ambiental calculada
PBS	Tampão fosfato-alcalino
PMS	Sobrenadante pós-mitocondrial
ROS	Espécies reativas de oxigênio
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A Evolução da Indústria Farmacêutica	15
2.2 A Presença e o Impacto de Fármacos no Meio Ambiente	16
2.2.1 Antibióticos	18
2.3 Efeitos Ecotoxicológicos	23
2.3.1 Teste de fitotoxicidade.....	23
2.3.2 Teste de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>	24
2.3.3 Ensaio de toxicidade com embriões e larvas de zebrafish (<i>D. rerio</i>)	24
3 OBJETIVOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Material	28
4.1.1 Substância química	28
4.1.2 Preparo das soluções.....	28
4.2 Métodos	28
4.2.1 Teste de fitotoxicidade utilizando sementes de tomate (<i>L. esculentum</i>), pepino (<i>C. sativus</i>) e alface (<i>L. sativa</i>)	28
4.2.2 Teste de toxicidade aguda com <i>A. salina</i>	30
4.2.3 Teste de toxicidade com o estágio embrio-larval de zebrafish (<i>D. rerio</i>) ..	31
4.2.4 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Avaliação da fitotoxicidade	35
5.2 Avaliação da toxicidade aguda com <i>A. salina</i>	35
5.3 Avaliação dos efeitos letais e subletais com embriões e larvas de zebrafish (<i>D. rerio</i>)	36
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICE	55
Apêndice – Resultados preliminares do ensaio de fitotoxicidade com semente de pepino (<i>C. sativus</i>), alface (<i>L. sativa</i>) e tomate (<i>L. esculentum</i>). ..	55
ANEXO	56
Anexo – Comitê de Ética aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA).....	56

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e as conquistas do homem contemporâneo desencadeiam condições para a melhoria da qualidade de vida, ao mesmo tempo em que aumentam os fenômenos de contaminação ambiental (Salles; Pelegrini; Pelegrini, 2006). Nesse sentido, as águas superficiais, como rios, lagos e mares recebem grandes quantidades de rejeitos de fontes industriais, agrícolas e domésticas (Petrie; Barden; Kasprzyk-Hordern, 2015).

Há diversos tipos de substâncias presentes na água que são consideradas contaminantes emergentes, tais como fármacos e medicamentos, praguicidas, produtos de higiene pessoal, nanomateriais, retardantes de chama e toxinas de algas (Richardson, 2008; Matamoros et al., 2012). Esses compostos podem ser definidos como substâncias cuja presença nos ecossistemas aquáticos foi constatada recentemente ou, cuja ocorrência e persistência estão relacionadas a níveis significativamente diferentes do esperado e, seus riscos sobre a saúde humana e o ambiente ainda permanecem incertos (USEPA, 2014).

Anualmente, são produzidas toneladas de fármacos e insumos farmacêuticos com diferentes propriedades físico-químicas e biológicas para serem aplicados tanto na medicina humana como na veterinária (Bila, Dezotti, 2003; Giri, Pal, 2014). Eles apresentam elevada reatividade com os sistemas biológicos e são, em sua maioria, estáveis (Damasio et al., 2011).

O monitoramento de fármacos em sistemas hídricos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, devido ao fato de serem frequentemente encontrados em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) e na água para abastecimento, uma vez que os processos e tecnologias convencionais de tratamento são limitados e incapazes de remover completamente esses contaminantes (Bila, Dezotti, 2003; Zhou et al., 2014).

Embora esses compostos sejam encontrados em níveis vestigiais no ambiente, ou seja, em concentrações na ordem de nanogramas a microgramas por litro (ng/L a µg/L), algumas classes terapêuticas apresentam pouca solubilidade em água e conseqüentemente, alto potencial de persistência podendo provocar a bioacumulação e a biomagnificação desses contaminantes. A bioacumulação pode induzir efeitos tóxicos em animais e seres humanos e atingir regiões distantes da

população inicial e a biomagnificação pode impactar os diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (Crane, Watts, Boucard, 2006; Carvalho et al., 2009; Pereira et al., 2015).

Sendo assim, algumas classes de fármacos merecem atenção especial, entre elas, estão os antibióticos, devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana (Américo et al., 2013) e pelos impactos das exposições crônicas a esses compostos ainda serem desconhecidos (Ding, He, 2010; Oliveira et al., 2013).

Os antimicrobianos alcançam o ambiente de forma direta, ou seja, através do descarte intencional de medicamentos vencidos ou não desejados em pias e vasos sanitários, assim como por efluentes das indústrias farmacêuticas ou ainda indiretamente, por meio da excreção na urina e fezes humanas e de animais. Outra forma de serem introduzidos no ambiente é através da sua aplicação na aquicultura, atividade que utiliza grandes quantidades e uma diversidade de antibióticos como estimulante do crescimento e para a prevenção de doenças (Boxall, 2004; Oliveira et al., 2013).

Dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) mostram que o consumo anual de antibióticos no Brasil excedeu 1200 toneladas em 2004 e 2005, com cerca de 390 toneladas consumidas de amoxicilina, seguida por 184 toneladas de ampicilina, 163 toneladas de cefalexina, 133 toneladas de sulfametoxazol, 45 toneladas de tetraciclina, 38 toneladas de norfloxacina, 30 toneladas de ciprofloxacina e 27 toneladas de trimetoprim (Locatelli; Sodré; Jardim, 2011).

Em 2011, a ANVISA publicou medidas regulatórias (RDC n  20/2011) para controlar o uso indiscriminado de antimicrobianos com o propósito de prevenir a resistência bacteriana e reduzir o impacto desses compostos   saúde humana social. Nesse período foi observada uma redu o significativa nas vendas de antibióticos no país, mas a partir de abril de 2012 os números voltaram a crescer (Silva-Carvalho et al., 2009).

Como descrito acima, a amoxicilina (AMX), um antibiótico β -lactâmico,   amplamente utilizada e facilmente detectada em sistemas hídricos, já que a sua metaboliza o   muito baixa e cerca de 80 a 90% desse fármaco   excretado, atingindo os efluentes na forma inalterada (Pérez-Parada et al., 2011). Neste contexto, o presente trabalho avaliou os efeitos tóxicos induzidos pela AMX em diferentes organismos, com o intuito de esclarecer os prováveis impactos ambientais e   saúde humana, advindos da presença desse fármaco nos sistemas hídricos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Evolução da Indústria Farmacêutica

A indústria farmacêutica iniciou suas atividades na Europa, com pequenos boticários, onde os medicamentos eram elaborados a base de ervas ou substâncias químicas, em doses individuais e, artesanalmente (Isse, 2011). No Brasil, esse setor teve início, em 1930, também a partir de pequenos laboratórios (boticas) (Selan, Kannebley, Porto, 2007).

Após a Segunda Guerra Mundial, iniciou-se o desenvolvimento do complexo farmacêutico internacional, concentrado principalmente, na Alemanha, Inglaterra, Japão e EUA, devido à necessidade crescente por novos medicamentos (Oliveira, 1998). No Brasil, a dificuldade de importações, nesse momento, estimulou a produção de inúmeros ativos farmacêuticos, extratos glandulares e hormônios aumentando assim, a atratividade das empresas multinacionais e, iniciando a internacionalização da indústria farmacêutica (Palmeira-Filho, Pan, 2003; Isse, 2011; Santos, Ferreira, 2012).

Nos anos 90, mudanças regulatórias e econômicas como, a redução da proteção tarifária e das barreiras não tarifárias, a estabilização da moeda, a política cambial flexível, o controle da inflação, a criação da agência reguladora para o setor, nesse caso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a promulgação da Lei sobre Patentes e da Lei dos Genéricos, propiciaram o crescimento do mercado farmacêutico nacional (Selan, Kannebley, Porto, 2007; Rosenberg, Fonseca, Ávila, 2010; Santos, Ferreira, 2012).

Atualmente, o setor industrial farmacêutico é composto, mundialmente, por mais de 10 mil empresas. Em 2014, esse setor cresceu 8,8%, com empresas líderes sediadas nos Estados Unidos e na Europa e suas subsidiárias presentes em diversos países (Santos, Ferreira, 2012; IMS Health, 2015). Como pode ser observado na Tabela 1, as vendas globais das indústrias farmacêuticas totalizaram US\$ 1.014,2 bilhões de dólares em 2014, com a América do Norte captando o maior percentual desse valor (IMS Health, 2015).

TABELA 1. Porcentagem das vendas globais das indústrias farmacêuticas distribuídas por região no ano de 2014.

Região	Percentual	US\$ Bilhões
América do Norte	40,0	406,2
Europa	24,0	243
Ásia, África e Austrália	19,8	201,5
Japão	8,8	88
América Latina	7,4	75,5
TOTAL	100	1.014,2

Fonte: Modificado de IMS Health (2015).

Os EUA são os maiores produtores e consumidores desse mercado, seguidos pela Alemanha. Em 2010, o Brasil foi o 8º maior mercado farmacêutico do mundo, com previsão de subir algumas posições nesse ranking, em relação ao consumo mundial, nos próximos anos (Santos, Ferreira, 2012; IMS Health, 2015).

As principais características de competição desse setor são os investimentos em pesquisa e desenvolvimento, com as estratégias de promoção e marketing para inserção das marcas no mercado e a diferenciação dos produtos por meio das classes terapêuticas (Rosenberg; Fonseca; Ávila, 2010).

Ainda em relação à movimentação financeira desse setor industrial, na Tabela 2 podem ser observadas as cinco classes de medicamentos mais vendidas no mundo e os valores em dólares que cada uma dessas classes representou nesse mercado, em 2014 (IMS Health, 2015).

TABELA 2. Vendas globais de medicamentos por classes terapêuticas no ano de 2014.

Classe terapêutica	Vendas (US\$ Milhões)
Antineoplásicos	74,45
Antidiabéticos	63,57
Analgésicos	59,79
Anti-hipertensivos	47,54
Antibióticos	40,27

Fonte: Modificado de IMS Health (2015).

2.2 A Presença e o Impacto de Fármacos no Meio Ambiente

Atualmente, existem vários estudos que indicam a presença de uma variedade de compostos farmacêuticos e seus metabólitos no meio ambiente, principalmente nos recursos hídricos, em concentrações na ordem de microgramas

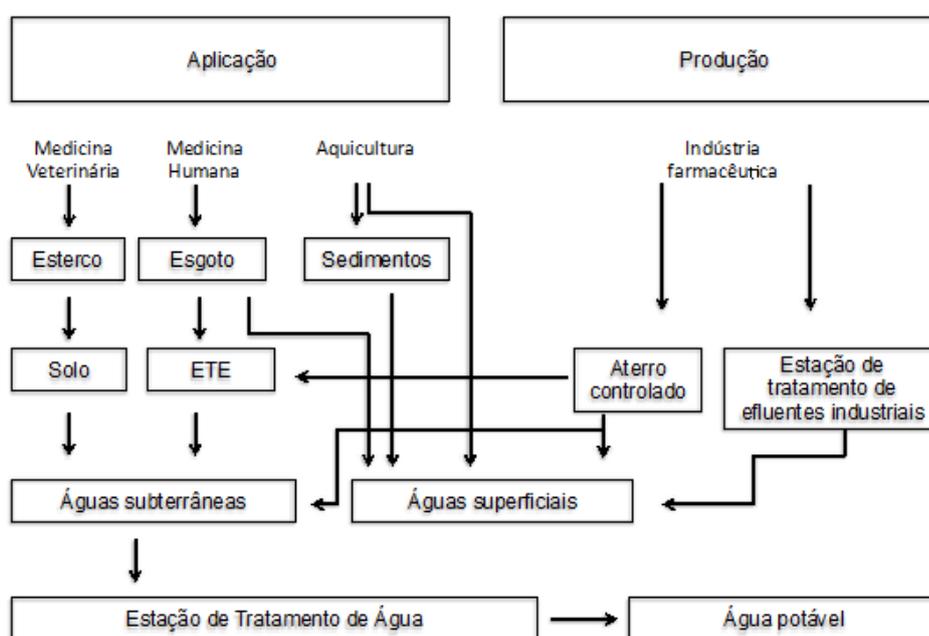
a nanogramas por litro ($\mu\text{g/L}$ - ng/L) (Bila, Dezotii, 2003; Brain et al. 2004; Crane, Watts, Boucard, 2006; Américo et al., 2013).

Os fármacos são moléculas biologicamente ativas e a grande maioria deles apresentam características lipofílicas, baixa volatilidade e pouca biodegradabilidade. Esses fatores sugerem a susceptibilidade de serem transportados para o ambiente aquático, assim como o potencial para bioacumulação e persistência no ambiente (Crane, Watts, Boucard, 2006; Américo et al., 2013).

Esses compostos são considerados contaminantes emergentes, uma vez que foram constatados recentemente no ambiente ou porque seus efeitos sobre a biota ainda são pouco conhecidos ou permanecem incertos e, por esse motivo ainda não foram inseridos na legislação que regulamenta a qualidade da água (USEPA, 2014).

Fármacos e medicamentos podem ser introduzidos no ambiente de várias maneiras como demonstrado na Figura 1, atingindo as águas superficiais e até mesmo as subterrâneas. O solo e a água podem ser contaminados por esses compostos através das excretas humana e de animais, na forma original ou como um metabólito ativo, assim como, pelo descarte incorreto de medicamentos vencidos ou em desuso nas pias, vasos sanitários ou no lixo comum (Andreozzi et al., 2004; Carvalho et al., 2009; Américo et al., 2013; Giri, Pal, 2014).

FIGURA 1. Esquema com as possíveis rotas de entrada de fármacos e medicamentos no meio ambiente.



Fonte: Adaptado de Américo et al. (2013).

Outra fonte importante de contaminação ambiental por fármacos se dá através dos efluentes gerados pelas indústrias farmacêuticas durante a síntese, processamento e envasamento (Andreozzi et al., 2004; Carvalho et al., 2009; Américo et al., 2013; Giri, Pal, 2014). A aquicultura também colabora com a contaminação das águas superficiais, subterrâneas e do sedimento, devido ao uso de antibióticos como aditivos alimentares de peixes, com o intuito de promover o crescimento e prevenir doenças (Bila, Dezotii, 2003).

O fator preocupante em relação à presença de fármacos e medicamentos no ambiente aquático é que as tecnologias convencionais de tratamento utilizadas pelas estações de tratamento de água (ETA) e de esgotos (ETE) apresentam limitações na remoção desses contaminantes. Tal fato favorece a presença dos mesmos na água utilizada para o consumo humano (Andreozzi et al., 2004; Crane, Watts, Boucard, 2006; Fent, Weston, Caminada, 2006; Américo et al., 2013; Giri, Pal, 2014), assim como afeta os organismos integrantes da cadeia trófica aquática, resultando no desequilíbrio das populações (Carvalho et al., 2009; Américo et al., 2013).

Como apresentado anteriormente na Tabela 2, os antibióticos se destacam entre as classes terapêuticas mais vendidas mundialmente e, conseqüentemente, constituem-se um importante contaminante ambiental.

2.2.1 Antibióticos

Os antibióticos são compostos capazes de inibir o crescimento ou induzir a morte de fungos ou bactérias, sendo assim classificados como bacteriostáticos e bactericidas, respectivamente (Guimarães; Momesso; Pupo, 2010). Eles ocupam a quinta colocação em consumo mundial das classes medicamentosas (Tabela 2), pois são extremamente utilizados na medicina humana e veterinária para prevenir e tratar infecções microbianas (Kümmerer, 2009).

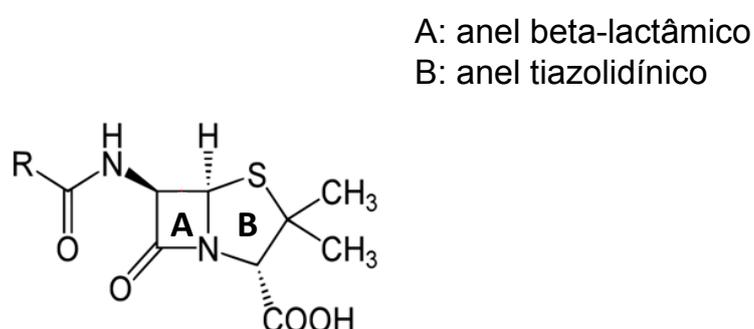
Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos podem ser classificados em beta-lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos, estreptograminas e, os de origem sintética em sulfonamidas, fluorquinolonas e oxazolidinonas (Guimarães; Momesso; Pupo, 2010).

Os β -lactâmicos são os mais prescritos, pois apresentam um amplo espectro de ação, eficácia clínica e segurança (Marín, Gudiol, 2003; Guimarães; Momesso; Pupo, 2010). Eles inibem irreversivelmente a enzima transpeptidase, que confere

uma estrutura rígida à parede celular da bactéria, responsável pela proteção desse microrganismo contra as variações osmóticas do meio (Guimarães; Momesso; Pupo, 2010; Katzung, 2010).

A presença do anel beta-lactâmico (Figura 2 – A), grupo farmacofórico que define essa classe, fundido a um anel tiazolidínico (Figura 2 – B), origina as penicilinas (Figura 2), as quais apresentam cadeias laterais no anel β -lactâmico, que determinam suas propriedades farmacológicas e antibacterianas.

FIGURA 2. Estrutura química geral das penicilinas.



Fonte: Adaptado de Calixto e Cavalheiro (2012).

Dados da ANVISA mostram que, o consumo anual de antibióticos no Brasil excedeu 1.200 toneladas em 2004 e 2005 sendo que, os β -lactâmicos representaram mais de 70% dos antimicrobianos consumidos em ambos os anos, com destaque para a amoxicilina e ampicilina (Locatelli; Sodré; Jardim, 2011).

Além da aplicação humana, os criadouros de gados, aves, suínos, equinos, ovinos e também a aquicultura utilizam antibióticos, frequentemente, como promotores de crescimento dos animais e para prevenir e controlar suas doenças. Tal fato também contribui com a distribuição desses contaminantes no ambiente, principalmente nos ecossistemas aquáticos (Brain et al., 2004; Carballeira, et al., 2012; Américo et al., 2013; Giri, Pal, 2014). A Tabela 3 apresenta as concentrações dos principais antibióticos encontrados nos recursos hídricos, entre eles, os β -lactâmicos.

TABELA 3. Concentrações dos principais antibióticos presentes nos recursos hídricos de diferentes locais do mundo.

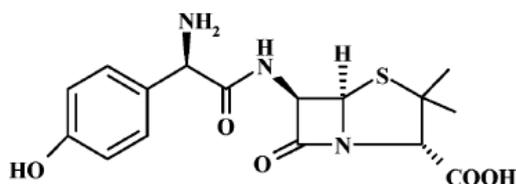
Matriz	Classe	Antibiótico	[] µg/L	Local	Referência	
Água superficial	β-lactâmico	Ampicilina	0,025	China	Yin et al. (2010)	
		Penicilina G	0,040	China	Yin et al. (2010)	
		Cefalexina	0,029	Brasil	Locatelli; Sodré; Jardim (2011)	
	Macrolídeo	Eritromicina	0,60	China	Xu et al. (2007)	
		Eritromicina	2,40	Espanha	Smith; Balaam; Ward (2007)	
		Eritromicina	0,10	Alemanha	Smith; Balaam; Ward (2007)	
	Quinolona	Ciprofloxacino	0,0280	Áustria	Ferdig; Kaleta; Buchberger (2005)	
		Ciprofloxacino	0,0025	Brasil	Locatelli; Sodré; Jardim (2011)	
		Ofloxacino	0,0280	Áustria	Ferdig; Kaleta; Buchberger (2005)	
	Sulfonamida	Sulfametoxazol	4,70	Espanha	Smith; Balaam; Ward (2007)	
		Sulfametoxazol	6,30	Países Baixos	Smith; Balaam; Ward (2007)	
		Sulfametoxazol	0,30	Alemanha	Smith; Balaam; Ward (2007)	
	�guas residuais	β-lactâmico	Penicilina G	5,20	EUA	Brown et al. (2006)
		Lincosamida	Lincomicina	2,00	EUA	Brown et al. (2006)
		Macrolídeo	Claritromicina	0,30	Su�a	McArdell et al. (2003)
Eritromicina			0,20	Su�a	McArdell et al. (2003)	
Quinolona		Ciprofloxacino	0,67	Portugal	Seifrtov� et al. (2008)	
		Ciprofloxacino	11,00	Portugal	Seifrtov� et al. (2008)	
		Norfloxacino	0,23	Portugal	Seifrtov� et al. (2008)	
		Norfloxacino	0,0022	Brasil	Locatelli et al. (2011)	
		Ofloxacino	0,24	Áustria	Ferdig; Kaleta; Buchberger (2005)	
		Ofloxacino	35,50	EUA	Brown et al. (2006)	
Ofloxacino	10,70	Portugal	Seifrtov� et al. (2008)			

A maior preocupação em relação à presença de antibióticos no ambiente é quanto à possibilidade da indução de resistência bacteriana, um efeito irreversível favorecido por concentrações baixas desse composto, como as que são encontradas no ambiente (Bila, Dezotii, 2003; Andreozzi et al., 2004; Crane, Watts, Boucard, 2006), e pelos impactos das exposições crônicas a esses compostos que ainda são desconhecidas (Oliveira et al., 2013).

2.2.1.1. Amoxicilina

A amoxicilina (AMX), objeto desse estudo, é uma aminopenicilina (Figura 3) de amplo espectro, ou seja, com ação tanto em bactérias gram-positivas como em gram-negativas. Esse fármaco pode ser comercializado em associação ao ácido clavulânico, que é um inibidor de betalactamase (Marín, Gudiol, 2003; Andreozzi et al, 2004; Medrano, Pedroche, Garrido, 2006).

FIGURA 3. Fórmula estrutural da amoxicilina.



Fonte: Locatelli; Sodré; Jardim (2011).

A AMX é amplamente utilizada em terapias humanas e veterinárias e é facilmente detectada em sistemas hídricos, já que sua metabolização é muito baixa e, cerca de 80 a 90% desse fármaco é excretado, atingindo os efluentes na sua forma inalterada (Pérez-Parada et al., 2011).

Ela constitui o antibiótico mais vendido na Itália, Alemanha, Reino Unido e Brasil (Andreozzi et al, 2004). Em 2005, de acordo com a ANVISA, cerca de 390 toneladas de AMX foram consumidas no Brasil (Locatelli; Sodré; Jardim, 2011). Devido ao alto consumo a nível mundial, esse fármaco é encontrado com frequência no ambiente aquático, como demonstra a Tabela 4.

TABELA 4. Concentrações do antibiótico amoxicilina presentes em diferentes recursos hídricos de diversos países.

Matriz	Meio	[] (µg/L)	Local	Referência
Águas residuais	ETE	6,94	Austrália	Watkinson et al. (2009)
	ETE	1,66	Hong Kong	Minh et al. (2009)
	Efluente hospitalar	0,9	Austrália	Ferdig; Kaleta; Buchberger (2005)
Água superficial	Rio	0,024	Itália	Bruno et al. (2001)
	Rio	0,2	Austrália	Ferdig; Kaleta; Buchberger (2005)
	Rio	0,025	China	Yin et al. (2010)
	Rio	0,017	Brasil	Locatelli; Sodre; Jardim (2011)
	Mar	0,076	Hong Kong	Minh et al. (2009)
Água de consumo	Água da torneira	0,0125	China	Yin et al. (2010)

Na literatura há alguns estudos sobre os efeitos agudos e subcrônicos da AMX para algas, bactérias, microcrustáceos e peixes como podem ser observados na Tabela 5.

TABELA 5. Efeitos agudos e subcrônicos da amoxicilina em diferentes organismos da cadeia trófica e tempos de exposição.

Espécie	Duração	Efeito/Endpoint	[] mg/L	Referência
<i>Vibrio fischeri</i>	5 min	Luminescência/IC ₅₀	1320	Park; Choi (2008)
<i>V. fischeri</i>	15 min	Luminescência/IC ₅₀	3597	Park; Choi (2008)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	7 dias	Crescimento/EC ₅₀	0,0037	Holten-Lützhøft et al. (1999)
<i>Rhodomonas salina</i>	7 dias	Crescimento/EC ₅₀	3108	Holten-Lützhøft et al. (1999)
<i>Synechococcus leopolensis</i>	96 h	Crescimento/EC ₅₀	0,0022	Andreozzi et al. (2004)
<i>Lemma gibba</i>	7 dias	Peso úmido, clorofila e carotenoides/EC ₁₀	>1	Brain et al. (2004)
<i>Daphnia magna</i>	24 h	Imobilização/EC ₅₀	>1000	Park; Choi (2008)
<i>D. magna</i>	48 h	Imobilização/EC ₅₀	>1000	Park; Choi (2008)
<i>Moina macrocopa</i>	24 h	Imobilização/EC ₅₀	>1000	Park; Choi (2008)
<i>M. macrocopa</i>	48 h	Imobilização/EC ₅₀	>1000	Park; Choi (2008)
<i>Oryzias latipes</i>	48 h	Mortalidade/LC ₅₀	>1000	Park; Choi (2008)
<i>O. latipes</i>	96 h	Mortalidade/LC ₅₀	>1000	Park; Choi (2008)
<i>Danio rerio</i>	96 h	Mortalidade/LC ₅₀	>1125	Oliveira et al. (2013)

A maior preocupação com esse contaminante está relacionada a sua persistência no meio ambiente e, conseqüentemente, aos efeitos induzidos à biota aquática e à saúde humana, em longo prazo, ou seja, pela exposição crônica (Crane; Watts; Boucard, 2006).

2.3 Efeitos Ecotoxicológicos

Diante do exposto, há uma preocupação crescente com a presença de fármacos e seus metabólitos no ambiente em relação aos possíveis efeitos sobre a saúde humana e ambiental (Vasconcelos, 2011; Américo et al, 2013).

Dentro deste contexto, este trabalho propôs avaliar o impacto ambiental do antibiótico amoxicilina em diferentes organismos do ecossistema, considerando a presença desse contaminante no ambiente aquático.

2.3.1 Teste de fitotoxicidade

O ensaio de toxicidade aguda com sementes é um teste simples de biomonitoramento ambiental, desenvolvido para avaliar os efeitos de contaminantes na germinação de sementes e no desenvolvimento da raiz (Salvatore, Carafa, Carratù, 2008; Mitelut, Popa, 2011; Souza, 2011).

Durante a germinação da semente um dos fatores ambientais mais influentes nesse processo é a disponibilidade de água. A reidratação dos tecidos ocorre pela absorção de água por embebição e, conseqüentemente, a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que resultam no fornecimento de energia e nutrientes necessários para o crescimento do embrião (Brito-Peigrini et al., 2005).

Assim, durante as etapas de germinação da semente e desenvolvimento da raiz ocorrem inúmeros processos fisiológicos que possibilitam que os contaminantes presentes no solo ou na água possam ser absorvidos e acumulados nos tecidos das plantas em concentrações suficientes para provocar danos e retardar o seu crescimento (Souza, 2011; Brito-Peigrini et al., 2005).

O parâmetro de determinação do desenvolvimento da raiz é mais sensível do que o de germinação das sementes no teste de fitotoxicidade, porém as duas informações se complementam no que se refere aos efeitos tóxicos sobre organismos vegetais (Brito-Peigrini et al., 2005; Mitelut, Popa, 2011; Souza, 2011).

As vantagens dos ensaios de fitotoxicidade são: a redução do tempo de exposição, o baixo custo, a independência de aparelhos sofisticados e ambientes extremamente controlados para realização do teste e a facilidade de obtenção de sementes em comércio local (Brito-Pelegrini et al., 2005; Souza, 2011).

2.3.2 Teste de toxicidade aguda com *Artemia salina*

A. salina é um microcrustáceo de água salgada utilizado como bioindicador de contaminação ambiental para estabelecer a toxicidade de contaminantes através da estimativa da concentração média letal (CL₅₀) (Bednarczuk et al., 2010; Pimentel et al., 2011; Rotini et al., 2015).

Esse microcrustáceo apresenta ampla distribuição geográfica, o que pode ser atribuída à reprodução partenogenética, ou seja, produção de descendentes na ausência do macho. A *A. salina* é um organismo filtrador com tolerância à salinidade e com capacidade de eclosão em um curto espaço de tempo. Ela se locomove ativamente em direção à luz (fototropismo positivo) e serve de alimento para organismos maiores na cadeia trófica, sendo assim, um elo entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores (Bednarczuk et al., 2010; Pimentel et al., 2011).

Portanto, devido a essas características esse microcrustáceo é utilizado na avaliação da ecotoxicidade. Além disso, o teste de toxicidade aguda com *A. salina* é de fácil execução, baixo custo, rápido e não exige equipamentos especiais para sua realização (Bednarczuk et al., 2010; Pimentel et al., 2011; Rotini et al., 2015).

2.3.3 Ensaio de toxicidade com embriões e larvas de zebrafish (*D. rerio*)

O zebrafish, também conhecido como paulistinha ou zebrafish, é um teleósteo, de 3-4 cm de tamanho, tropical de água doce, nativo de rios do Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Nepal e Paquistão), pertencente à família dos Cyprinidae, à ordem dos Cypriniformes e a espécie *Danio rerio*. A característica mais marcante desse peixe é o seu padrão de listras pretas e brancas ao longo do corpo. Ele possui nadadeiras anal e caudal e, os machos são geralmente mais delgados e escuros que as fêmeas (Lawrence, 2007; Spence et al., 2008; Scholz et al., 2008).

Como outros peixes, o zebrafish apresenta os estágios larval, juvenil e adulto de desenvolvimento. O estágio larval inicia-se logo após a eclosão do ovo, que ocorre em 48-72 horas pós-fertilização (hpf). Em 24-48 horas após a eclosão, as

larvas inflam suas bexigas natatórias e 5 dias pós-fertilização (dpf), a organogênese dos principais órgãos é concluída. Portanto, o zebrafish apresenta um curto ciclo de desenvolvimento, atingindo a maturidade sexual com cerca de 3 meses de idade (Scholz et al., 2008).

Nas últimas décadas, ensaios utilizando embriões e larvas do zebrafish (*D. rerio*) têm atraído à atenção de toxicologistas como organismos modelo para estudos da toxicidade de compostos químicos em relação ao desenvolvimento desse vertebrado tanto para a avaliação do risco ambiental quanto humano (Scholz et al., 2008; Carlsson et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Oliveira et al., 2016).

Algumas outras características têm contribuído para a popularidade do zebrafish entre a comunidade científica internacional como modelo experimental, são elas: o tamanho pequeno e a facilidade de manutenção em laboratório, o rápido desenvolvimento e o alto rendimento na produção de ovos (100 ovos por dia e por fêmea), a transparência desses ovos e larvas, permitindo assim acompanhar toda a organogênese do peixe e observar a presença de malformações, além da similaridade genética com os humanos, que oferece uma posição privilegiada desse organismo-teste na investigação genética e toxicológica (Kimmel et al., 1995; Lawrence, 2007; Spence et al., 2008; Scholz et al., 2008; Domingues et al., 2010; Tierney, 2011). Além disso, o genoma do zebrafish já está totalmente sequenciado e apresenta uma similaridade genética de aproximadamente 70% com os humanos (Howe et al., 2013).

O teste com embriões permite avaliar uma grande variedade de parâmetros letais e subletais relacionados à sobrevivência e ao desenvolvimento, assim como parâmetros bioquímicos através da determinação de biomarcadores enzimáticos. Além disso, a correlação forte na toxicidade aguda entre os estágios iniciais da vida e os adultos, os testes com os estágios embrio-larval de zebrafish foram propostos, principalmente por razões éticas, como substituto para testes com organismos adultos. No entanto, tal correlação ainda deve ser verificada em níveis sub-letais. Por esta razão, é importante comparar a sensibilidade dos parâmetros como comportamento, marcadores bioquímicos e genotoxicidade em diferentes estágios (Domingues et al., 2010).

2.3.3.1 Atividade de biomarcadores enzimáticos em larvas de zebrafish (*D. rerio*)

Os biomarcadores são parâmetros que permitem explorar a resposta biológica do organismo através de alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas e comportamentais relacionadas e assim, determinar a intensidade de um efeito tóxico (Jesus; Carvalho, 2008; Pitanga, 2011; Oliveira, 2014).

Na monitoração ambiental existem diferentes grupos de biomarcadores utilizados, dentre eles os de biotransformação, estresse oxidativo e estresse químico. Os biomarcadores de biotransformação apresentam o principal mecanismo para manter a homeostase durante a exposição a toxicantes, envolvendo a destoxificação e eliminação desses contaminantes. A glutathione S-transferase (GST) é a principal enzima envolvida no processo de destoxificação de fase II. Ela está presente no fígado em elevadas concentrações catalisando a conjugação da glutathione com diversos compostos que possuem centro eletrofílicos (Brandão, 2011; Neves, 2012; Oliveira, 2014).

O estresse oxidativo é produzido por um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e os sistemas antioxidantes do organismo (Brandão, 2011; Oliveira, 2014). As ROS podem atacar vários constituintes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos levando à interrupção da função e integridade celular (Brandão, 2011). O estresse oxidativo pode ser avaliado por diversos biomarcadores, como por exemplo a catalase (CAT) que age contra a ROS convertendo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Neves, 2012; Oliveira et al., 2013).

Já as alterações na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) têm sido observadas em condições de estresse químico. Essa enzima está envolvida no processo de conversão de piruvato em lactato pela via anaeróbia nos processos de produção de energia celular, e simultaneamente converte o NADH em NAD⁺. Pelo fato desta enzima ser induzida a baixos níveis de oxigênio, ela também é uma ferramenta importante na avaliação do estado respiratório dos organismos aquáticos (Neves, 2012; Silva, 2015).

3 OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o impacto ambiental da amoxicilina, em diferentes organismos de um ecossistema, considerando a sua presença nos recursos hídricos.

Para atingir este objetivo, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a fitotoxicidade da amoxicilina utilizando sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e alface (*Lactuca sativa*);
- Avaliar a toxicidade aguda da amoxicilina utilizando o microcrustáceo *A. salina*;
- Avaliar os efeitos letais e subletais da amoxicilina sobre o desenvolvimento embrio-larval de zebrafish (*D. rerio*);
- Avaliar as alterações bioquímicas da amoxicilina sobre as larvas de zebrafish (*D. rerio*), através de biomarcadores enzimáticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Substância química

A amoxicilina trihidratada (CAS nº. 61336-70-7) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich®, com 98,7% de pureza.

4.1.2 Preparo das soluções

O fármaco foi preparado com água MiliQ ultra pura e colocado em ultrassom por 20 minutos para completa dissolução. As soluções-estoques foram preparadas no momento do uso.

As concentrações dos ensaios com sementes, *A. salina* e zebrafish foram determinadas de acordo com os protocolos Seed Germination/Root Elongation Toxicity (US EPA, 1996), OECD 202 (2004) e Meyer e colaboradores (1982) e OECD 236 (2013), respectivamente, e estabelecidas após teste preliminares.

4.2 Métodos

4.2.1 Teste de fitotoxicidade utilizando sementes de tomate (*L. esculentum*), pepino (*C. sativus*) e alface (*L. sativa*)

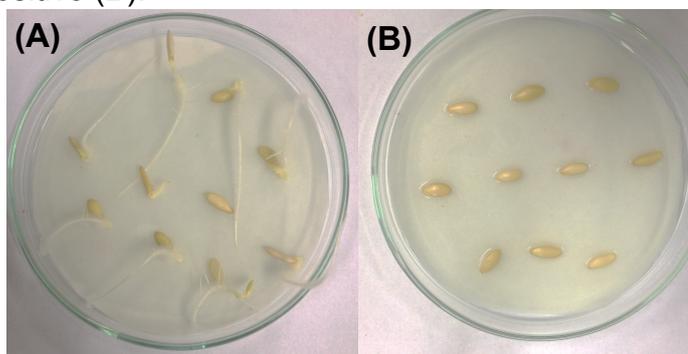
O ensaio de fitotoxicidade foi realizado de acordo com Ecological Effects Teste Guideline - Seed Germination/Root Elongation Toxicity Teste (OPPTS 850.4200), desenvolvido pela Agência de Proteção Ambiental (US EPA, 1996) com algumas adaptações a fim de avaliar os efeitos da amoxicilina em relação à germinação das sementes (número de sementes germinadas) e ao crescimento das raízes (medição do comprimento da radícula de cada plântula formada).

As sementes de tomate (*L. esculentum*), pepino (*C. sativus*) e alface (*L. sativa*) da marca Topseed foram obtidas em comércio local. Antes de iniciar o ensaio, foi realizada uma etapa de assepsia das mesmas em solução de hipoclorito de sódio 0,1% por 10 minutos, visando prevenir o crescimento microbiano e/ou fúngico. Posteriormente, as sementes foram enxaguadas em água deionizada, por três vezes.

A etapa de separação das sementes danificadas foi realizada a fim de remover aquelas que não tinham capacidade germinativa. Para isso, um béquer contendo água deionizada suficiente para cobrir as sementes foi utilizado e, com o auxílio do bastão de vidro, agitou-se a água em movimentos circulares de modo que as sementes com capacidade germinativa ficassem no fundo do recipiente e aquelas sem capacidade germinativa ou danificadas, na superfície. O conteúdo da parte superior foi removido com auxílio de uma peneira e a água foi descartada preservando as sementes do fundo do béquer.

O ensaio foi conduzido utilizando 10 sementes distribuídas uniformemente em placa de Petri. As placas de Petri foram preenchidas com discos de papel de filtro Whatman número 2 (9 cm de diâmetro) e esterilizadas em luz UV por 20 minutos a fim de evitar possíveis contaminações por fungos. Um volume de 2,5 mL das soluções de AMX foi utilizado para umedecer toda a extensão do papel tendo o cuidado de evitar a formação de bolsas de ar e assim possibilitar a saturação do papel. Todos os testes foram realizados em triplicata e na presença de controles negativo (água destilada) e positivo (sulfato de zinco heptaidratado a 10 mg/L). Ensaio preliminares foram realizados, como recomendado pelo protocolo, com as seguintes concentrações: 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 mg/L (Apêndice A). Em seguida, foram determinadas as seguintes concentrações para o teste: 0,15; 0,3; 0,75; 1,5; 3,0; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L. As placas de Petri assim preparadas, foram incubadas em estufa à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 120 horas, sob ausência de luz. Após a incubação, as placas foram observadas em relação à germinação das sementes e ao crescimento das raízes e comparadas com os respectivos controles negativos, obedecendo o critério de validação, no qual 80% das sementes do controle negativo devem germinar e ter pelo menos 5 mm de protrusão radicular (Figura 4).

FIGURA 4. Desenvolvimento das sementes de pepino (*Cucumis sativus*) após 120 horas de incubação com água destilada - controle negativo (A) e com sulfato de zinco - controle positivo (B).



Fonte: O próprio autor

4.2.2 Teste de toxicidade aguda com *A. salina*

O teste de toxicidade aguda com *A. salina* foi desenvolvido de acordo com o protocolo de Meyer e colaboradores (1982) com algumas modificações. O parâmetro utilizado para avaliar o efeito tóxico agudo da AMX sobre os náuplios de *A. salina* foi a imobilidade.

A água salina para eclosão dos cistos desidratados e seleção dos náuplios de *A. salina* foi preparada com sal marinho sintético (3,5%) e água deionizada. Essa mesma água foi utilizada para preparar as soluções de AMX. Para eclosão dos ovos, os cistos foram colocados em água salina por 48 horas, sob aeração e iluminação constante, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 5). As diluições foram preparadas para se obter as seguintes concentrações do fármaco: 0,15; 0,3; 0,75; 1,5; 3,0; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L.

Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços adicionando 2 mL de cada concentração testada em quadruplicada e com 5 náuplios por poço, coletados individualmente com auxílio de uma pipeta Pasteur. O teste foi realizado na presença de controles negativo (água salina) e positivo (Dodecil sulfato de sódio; 10 mg/L). Após 24 e 48 horas de exposição, com auxílio de lupa, os organismos que permaneciam imóveis mesmo com uma leve agitação ou que só fossem capazes de movimentar as antenas foram considerados mortos e contados a fim de se obter a porcentagem de imobilidade comparada ao controle negativo. A CL_{50} foi determinada como a concentração estimada capaz de matar 50% dos náuplios após 24 e 48 horas de exposição. Os valores de CL_{50} foram calculados pelo método de análise Probit e a classificação da toxicidade aguda foi realizada de acordo com o

Globally Harmonized System (GHS) em categoria I ($CL_{50} \leq 1$ mg/L), categoria II ($1 < CL_{50} \leq 10$ mg/L) e categoria III ($10 < CL_{50} < 100$ mg/L).

FIGURA 5. Artefatos utilizados para eclosão dos ovos de *A. salina*.



Fonte: O próprio autor

4.2.3 Teste de toxicidade com o estágio embrio-larval de zebrafish (*D. rerio*)

4.2.3.1 Manutenção dos peixes adultos

Os peixes adultos machos e fêmeas de zebrafish (*D. rerio*) foram gentilmente fornecidos pelo Instituto de Ciências Biológicas (IB/UnB), Universidade de Brasília (Brasília, DF, Brasil) e mantidos em sistema de recirculação ZebTEC (Tecniplast, West Chester, Pensilvânia, EUA) usando água obtida por osmose reversa (comitê de ética aprovado – PROTOCOLO No. 102/14). A água passa por vários níveis de filtragem (filtro de carbono ativado e filtro biológico) é então desinfetada por luz UV e os parâmetros de pH e condutividade são regulados automaticamente.

A temperatura foi mantida à $26 \pm 1^\circ\text{C}$, condutividade à 750 ± 50 $\mu\text{S/cm}$, pH a $7,5 \pm 0,5$ e oxigênio dissolvido igual ou acima de 95% de saturação, com ciclo claro:escuro de 12:12h, mantido por temporizador. Os peixes adultos foram alimentados duas vezes ao dia com uma ração comercial (TetraMin Tropical Flakes®) e uma vez ao dia com organismo vivo (*A. salina*). O excesso de alimentação foi rigorosamente evitado e o restante dos alimentos e fezes foram removidas diariamente para assegurar a qualidade ideal da água.

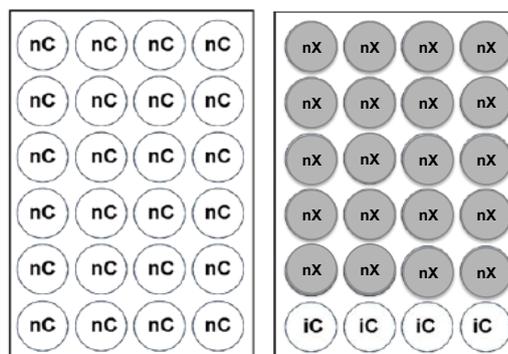
4.2.3.2 Obtenção dos ovos

No dia anterior ao teste, machos e fêmeas em uma proporção de 2:1, foram colocados em câmaras de reprodução com água nas condições citadas acima, imediatamente antes do início da escuridão artificial. Os machos podem ser distinguidos das fêmeas por sua forma de corpo mais esguio e uma tonalidade laranja-avermelhada nas faixas ao longo do corpo, enquanto as fêmeas devido ao grande número de ovos produzidos se apresentam com o abdômen mais distendido. Na câmaras de reprodução foram adicionadas bolas de vidro para coleta dos ovos. O acasalamento e a desova ocorreram nos primeiros 30 minutos do ciclo claro acionado por temporizador (luz acesa). Cerca de 30 minutos após a desova, os ovos foram coletados e transferidos para uma placa de Petri para lavagem com água de manutenção. Todos os ovos foram analisados em estereomicroscópio (Carl Zeiss Stemi 2000-C & Axio Vert A1, San Jose, Califórnia, EUA) e os não fertilizados foram descartados. Para os experimentos, foram selecionados ovos que alcançaram o estágio de blástula.

4.2.3.3 Teste de toxicidade com embriões e larvas de zebrafish

O teste de toxicidade com embriões de zebrafish foi realizado de acordo com a OECD 236 - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (2013), com alterações no tempo de exposição, sendo estendido até 168 h (7 dias) e, portanto, denominado Fish Embryo Extend Toxicity (FEET) Test. Após a seleção dos ovos fertilizados, esses foram distribuídos em placas de cultura com 24 poços, dispostos individualmente em poços com 2,0 mL de cada concentração da solução de AMX (0,75; 1,5; 3,0; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/L) assim como para o controle negativo (água de manutenção). Os experimentos foram realizados em triplicata e cada réplica foi constituída por 24 embriões para o controle negativo (nC) e 20 embriões para cada concentração testada de AMX (nX), com seu respectivo controle interno da placa (iC), como demonstra a Figura 6.

FIGURA 6. Modelo do delineamento experimental do Fish Embryo Extend Toxicity Test em placas de 24 poços, onde nC representa o controle negativo, nX corresponde as concentrações testadas de amoxicilina e iC o controle interno da placa.



Fonte: Adaptado da OECD 236 (2013).

As placas foram incubadas à $26 \pm 1^\circ\text{C}$, em ciclo claro:escuro de 12:12h e o desenvolvimento embrio-larval foi avaliado por 168 h, utilizando um estereomicroscópio (Zeiss Stemi 2000C & Axio Vert A1, San Jose, Califórnia, EUA). Houve reposição das soluções de AMX no quarto dia de exposição. Durante todo o ensaio não houve adição de alimento e nem de aeração.

A distinção entre o desenvolvimento normal e anormal de embriões e larvas foi estabelecida de acordo com Kimmel et al. (1995). A cada 24 horas foram avaliados os seguintes parâmetros letais: coagulação do ovo, formação dos somitos, circulação, descolamento da cauda a partir do saco vitelino. Outros parâmetros subletais foram avaliados de acordo com o desenvolvimento, como: formação do olho, pigmentação corporal, absorção do saco vitelino, alterações do líquido amniótico, eclosão, equilíbrio, deformidades da coluna vertebral e tamanho das larvas.

4.2.3.4. Determinação da atividade de biomarcadores enzimáticos em larvas de zebrafish (*D. rerio*)

As larvas expostas à AMX por 168 h foram congeladas em 350 μL de PBS a 0,1 mM (pH 7,4) e mantidos à -80°C . Antes de iniciar a análise enzimática, as amostras foram descongeladas, homogeneizadas utilizando um sonicador e centrifugadas à 4°C a 6000 rpm durante 20 min, para separar o sobrenadante pós-mitocondrial (PMS).

A atividade da CAT foi medida em 240 nm por monitorização (3 min) e a diminuição da absorbância devido à degradação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como descrito por Clairborne (1985). Foram adicionados à 30 μ L de PMS diluídos em 135 μ L de PBS (pH 7,0), 135 μ L de solução de reação (H_2O_2 , 30 mM).

A avaliação da atividade de GST foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Habig e Jakoby (1981) e modificado por Frasco e Guilhermino (2002). A leitura espectrofotométrica de 30 μ L de PMS adicionados à 70 μ L da mistura composta por 10 mM de glutathiona reduzida (GSH) e 60 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno em PBS a 0,05 M (pH 6,5) foi realizada em 340 nm pelo monitoramento da diminuição da absorbância (5 min).

A atividade de LDH foi determinada à 240 nm, pelo monitoramento da diminuição da absorbância (5 min), provocada pela oxidação de NADH. O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Vassault (1983) e modificada por Diamantino et al. (2001). Para a reação, 20 μ L de PMS foram adicionados a 20 μ L de NADH a 0,24 mM e 110 μ L de piruvato a 10 mM em PBS a 0,05 mM (pH 7,2).

A determinação dos biomarcadores enzimáticos foi realizada em triplicata e expressa em nanomol (nmol) de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína. As concentrações de proteínas nas amostras também foram determinadas em quadruplicata através do método Bradford (1976), em 595 nm, usando γ -globulina como padrão.

4.2.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de múltipla comparação de Dunnett ($\alpha=0,05$), com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 ® (version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) ou do programa Sigma plot 11.0 (Systat, San Jose, Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da fitotoxicidade

Os efeitos apresentados sobre a porcentagem de germinação das sementes e comprimento das raízes de cada semente germinada de pepino, alface e tomate expostas à AMX estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6. Taxa de germinação e comprimento das raízes de pepino (*C. sativus*), alface (*L. sativa*) e tomate (*L. esculentum*) após 120 horas de exposição à amoxicilina. Resultados apresentados em média da triplicata \pm DP (desvio padrão).

Taxa de germinação e comprimento das raízes (média \pm DP)						
	<i>C. sativus</i>		<i>L. sativa</i>		<i>L. esculentum</i>	
[] mg/L	Semente (%)	Raiz (cm)	Semente (%)	Raiz (cm)	Semente (%)	Raiz (cm)
CN	100,0 \pm 0,58	4,7 \pm 0,99	100,0 \pm 0,58	4,9 \pm 0,57	100,0 \pm 1,15	1,9 \pm 0,48
0,15	100,0 \pm 0,58	4,6 \pm 0,39	103,6 \pm 0,58	4,6 \pm 1,15	92,0 \pm 2,08	1,9 \pm 0,41
0,3	93,1 \pm 1,73	5,2 \pm 0,01	100,0 \pm 0,58	4,4 \pm 0,80	100,0 \pm 0,58	1,9 \pm 0,25
0,75	103,4 \pm 0,0	5,0 \pm 0,38	107,1 \pm 0,0	3,3 \pm 0,61	92,0 \pm 2,31	2,0 \pm 0,63
1,5	100,0 \pm 0,58	5,4 \pm 0,46	96,4 \pm 1,00	5,1 \pm 0,37	92,0 \pm 1,53	2,1 \pm 0,26
3,0	96,6 \pm 0,58	4,8 \pm 0,36	107,1 \pm 0,0	4,0 \pm 0,24	92,0 \pm 1,53	2,6 \pm 0,17
6,25	100,0 \pm 0,58	5,1 \pm 0,01	103,6 \pm 0,58	4,6 \pm 0,23	108,0 \pm 1,00	2,8 \pm 0,87
12,5	96,6 \pm 0,58	5,1 \pm 1,12	103,6 \pm 0,58	4,6 \pm 0,15	80,0 \pm 0,58	2,2 \pm 0,08
25	100,0 \pm 0,58	5,5 \pm 0,28	103,6 \pm 0,58	5,5 \pm 0,56	88,0 \pm 0,58	2,0 \pm 0,37
50	103,4 \pm 0,0	4,7 \pm 0,99	103,6 \pm 0,58	5,0 \pm 0,76	100,0 \pm 0,58	2,6 \pm 0,44
100	100,0 \pm 0,58	5,3 \pm 0,35	103,6 \pm 0,58	4,7 \pm 0,42	104,0 \pm 0,58	2,5 \pm 0,13

CN = controle negative

Todas as espécies de sementes expostas à AMX não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as concentrações analisadas e os respectivos controles negativos para a germinação das sementes e para o comprimento das raízes. Assim, nessas condições, a AMX não foi um agente fitotóxico.

5.2 Avaliação da toxicidade aguda com *A. salina*

O efeito da AMX sobre a mortalidade do microcústáceo *A. salina* após 24 h e 48 h de exposição está representado na Tabela 7.

Tabela 7. Mortalidade de *A. salina* induzida por 24 h e 48 h de exposição à amoxicilina.

24 h		Número de organismos mortos				Imobilidade	
AMX (mg/L)	1	2	3	4	Total	%	
CN	0	0	0	0	0/20	0	
0,15	0	0	0	0	0/20	0	
0,3	0	0	0	0	0/20	0	
0,75	0	0	0	0	0/20	0	
1,5	0	0	0	0	0/20	0	
3,0	0	0	0	0	0/20	0	
6,25	1	0	0	0	1/20	5	
12,5	0	0	0	0	0/20	0	
25	0	0	0	0	0/20	0	
50	0	0	0	0	0/20	0	
100	0	0	0	0	0/20	0	
48 h		Número de organismos mortos				Imobilidade	
AMX (mg/L)	1	2	3	4	Total	%	
CN	0	0	0	0	0/20	0	
0,15	0	1	0	0	1/20	5	
0,3	0	0	0	0	0/20	0	
0,75	2	0	0	0	2/20	10	
1,5	0	0	0	0	0/20	0	
3,0	0	0	0	1	1/20	5	
6,25	2	0	0	1	3/20	15	
12,5	0	0	0	0	0/20	0	
25	0	0	0	0	0/20	0	
50	0	1	0	0	1/20	5	
100	0	0	0	2	2/20	10	

CN = controle negativo

Nas concentrações testadas, a AMX não induziu mortalidade significativa em *A. salina*, quando comparadas ao controle negativo, em 24 h e 48 h de exposição. Como pode ser observado, não houve um perfil dose-resposta nos dois períodos de exposição. Os valores de CL_{50} , tanto em 24 h como em 48 h, foram maior que 100 mg/L, portanto o antibiótico AMX foi classificado como não-tóxico (não categorizado) de acordo com GHS.

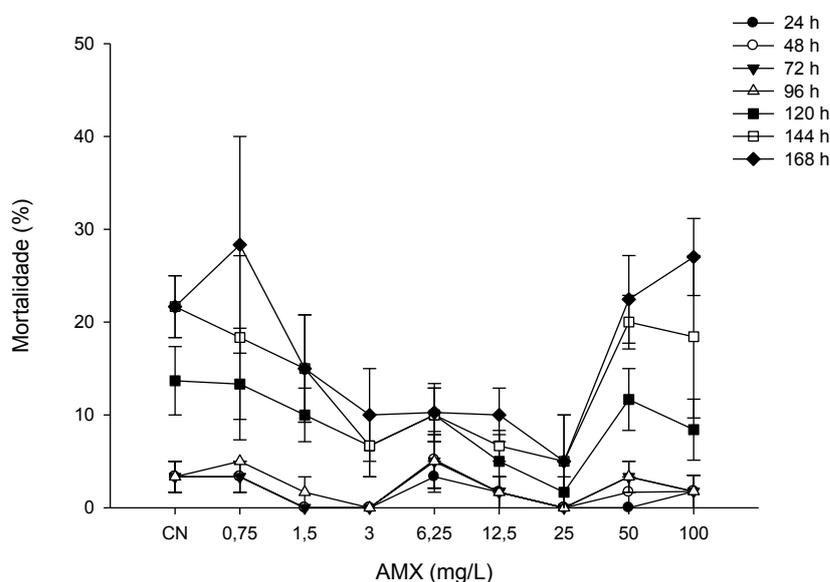
5.3 Avaliação dos efeitos letais e subletais com embriões e larvas de zebrafish (*D. rerio*)

No teste de toxicidade (FEET) com embriões de zebrafish expostos à AMX 168 h (7 dias), foram avaliados os seguintes parâmetros: coagulação, formação dos

somitoss, circulação, descolamento da cauda a partir do saco vitelino, formação do olho, pigmentação corporal, absorção do saco vitelino, alteração do líquido amniótico, eclosão, equilíbrio, deformidades da coluna vertebral e o tamanho das larvas.

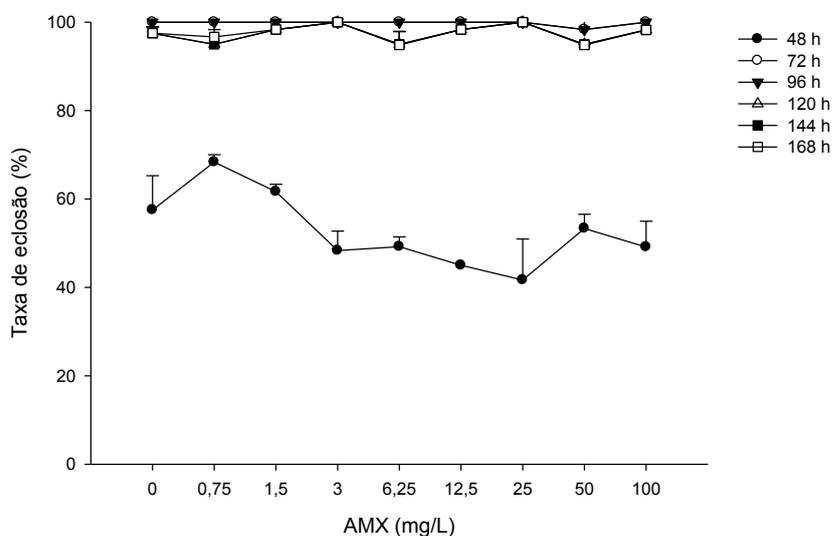
Como mostra a Figura 7, a AMX não induziu efeitos letais a embriões e larvas de zebrafish, mesmo com a extensão do tempo de exposio para 7 dias, apresentando 22 e 27% de mortalidade nas concentrao de 50 e 100 mg/L, respectivamente.

FIGURA 7. Efeitos da amoxicilina sobre a mortalidade de embriões e larvas de zebrafish, após 168 h de exposio.



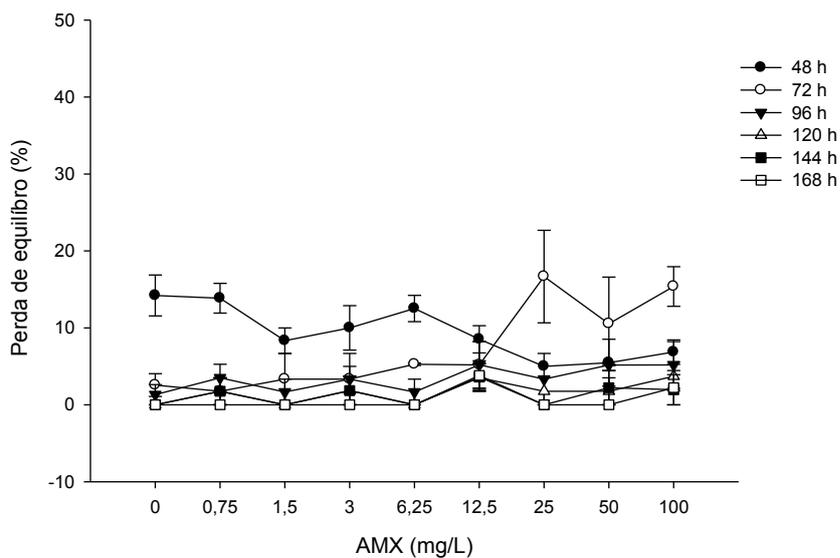
Na Figura 8 podem ser observados os efeitos da AMX sobre a taxa de eclosão dos ovos de zebrafish que geralmente ocorre até 72 h. A AMX não alterou a taxa de eclosão dos ovos expostos quando comparados ao controle negativo. A eclosão dos ovos iniciou-se em 48 h de exposio, chegando a 100% de ovos vivos eclodidos em 72h.

FIGURA 8. Efeito da amoxicilina sobre a taxa de eclosão dos ovos de zebrafish após 168 h de exposição.



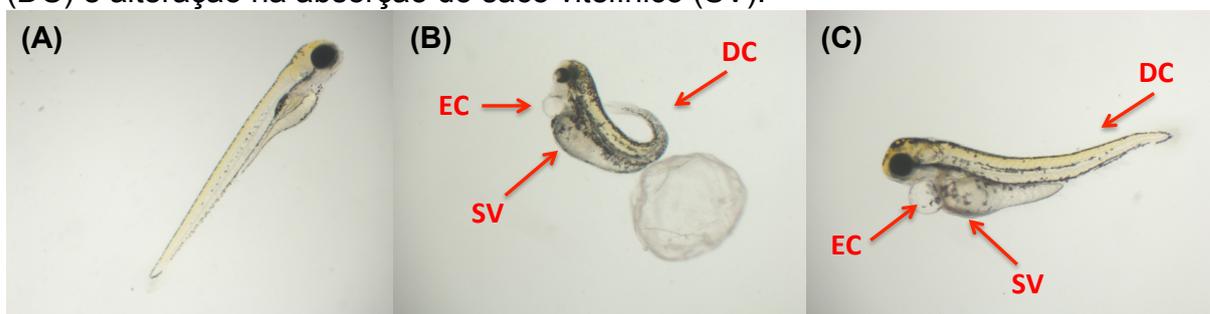
O efeito da AMX sobre o equilíbrio das larvas durante 168 h de exposição está demonstrado na Figura 9. A AMX não induziu perda de equilíbrio nas larvas de zebrafish durante as 168 h de exposição quando comparadas ao controle negativo.

FIGURA 9. Efeito da amoxicilina sobre a perda de equilíbrio das larvas de zebrafish após 168 h de exposição.



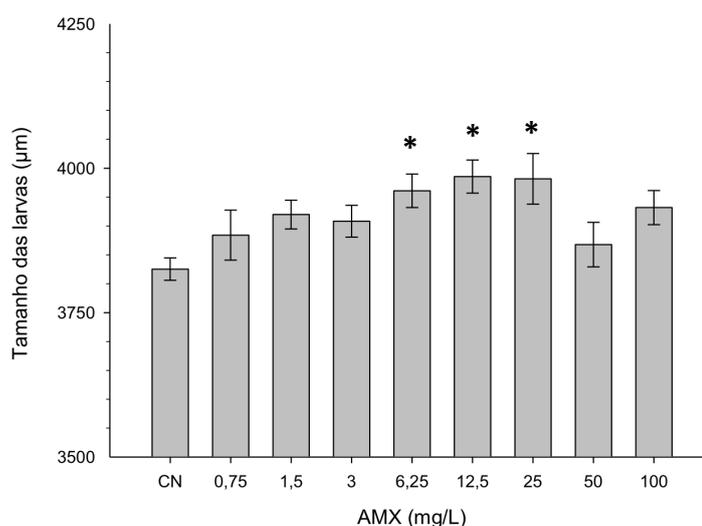
Apesar das duas maiores concentrações (50 e 100 mg/L) de AMX induzirem malformações nas larvas de zebrafish como, edema cardíaco, falha na absorção de saco vitelínico e encurvamento da cauda após 72 h de exposição, nenhum desses efeitos foram significativos em relação ao respectivo controle negativo.

FIGURA 10. Fotomicroscopia obtida neste trabalho, mostrando larvas de zebrafish expostas: (A) larva do controle negativo após 72 h (3,2X); (B) larva exposta à 50 mg/L após 72 h de exposição (4X), apresentando edema cardíaco (EC), deformação na cauda (DC) e alteração na absorção do saco vitelínico (SV); (C) larva exposta à 100 mg/L após 72 h (4X), apresentando edema cardíaco (EC), deformação na cauda (DC) e alteração na absorção do saco vitelínico (SV).



Após 168 h de exposição, o tamanho das larvas foi avaliado e as concentrações de 6,25; 12,5 e 25 mg/L apresentaram um aumento significativo quando comparadas ao controle negativo, como mostra a Figura 11, não apresentando uma dose-resposta.

FIGURA 11. Efeito da amoxicilina sobre o tamanho das larvas após 168 h de exposição.

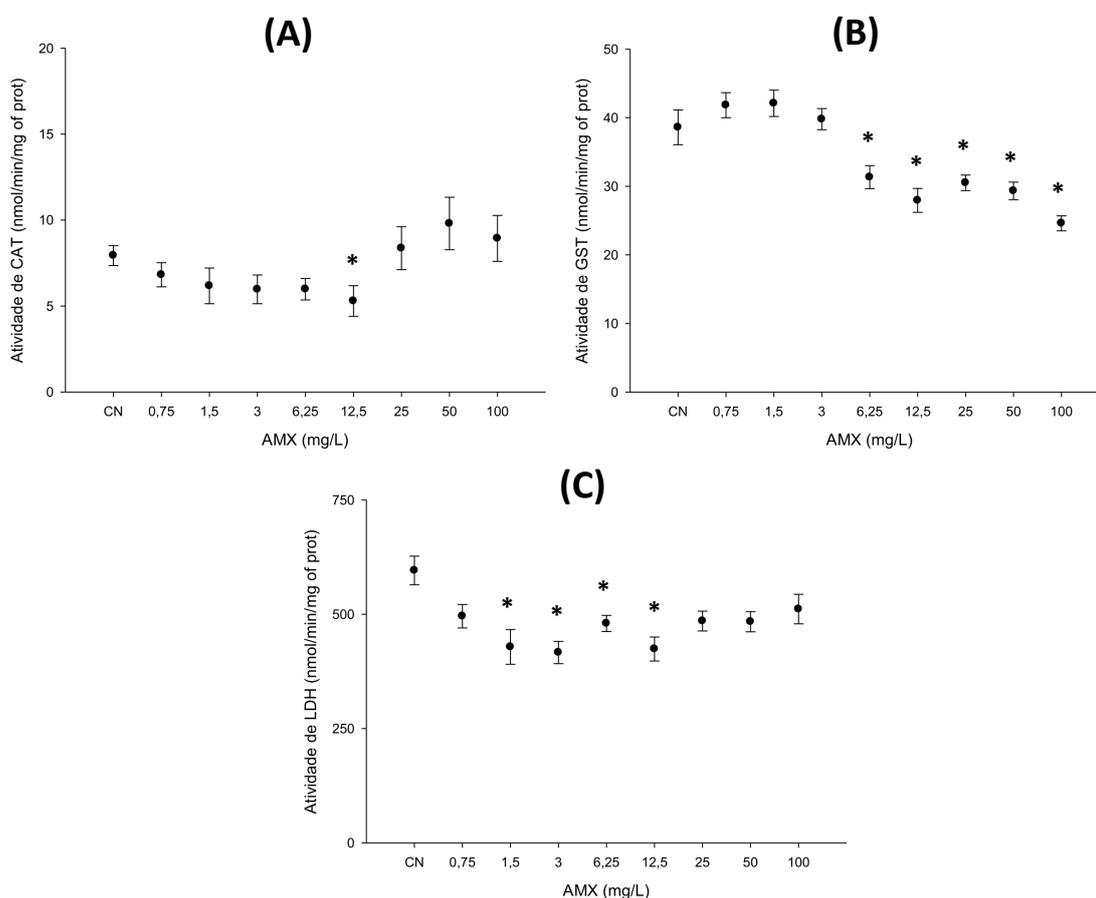


*p<0,05 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo

O ensaio com biomarcadores enzimáticos avaliaram os efeitos subletais da AMX em larvas de zebrafish. Os resultados obtidos mostraram que a AMX inibiu significativamente a atividade das enzimas CAT, GST e LDH nas condições testadas.

Como demonstrado na Figura 12 A, após 7 dias de exposição, a AMX inibiu a atividade da CAT apenas nas larvas expostas a 12,5 mg/L. Já a enzima GST foi inibida nas larvas expostas a partir da concentração de 6,25 mg/L de AMX (Figura 12 B). Na Figura 12 C, a inibição da atividade da LDH iniciou-se em 1,5 mg/L e permaneceu até 12,5 mg/L de AMX.

FIGURA 12. Efeitos subletais da amoxicilina em larvas de zebrafish sobre a atividade de biomarcadores enzimáticos.



*p<0,05 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo

6 DISCUSSÃO

Os riscos potenciais associados com a introdução de produtos farmacêuticos no ambiente tornaram-se uma questão cada vez mais importante para os reguladores ambientais e para a indústria farmacêutica (Crane; Watts; Boucard, 2006).

Os antibióticos podem afetar a diversidade biológica das comunidade de fitoplâncton e zooplâncton (Carballeira et al., 2012). A avaliação desses possíveis efeitos pode ser realizada através de bioensaios que avaliam a toxicidade desses compostos. Os bioensaios são importantes, pois somente as análises físico-químicas tradicionalmente realizadas não são suficientes para avaliar o impacto ambiental dos contaminantes. Os parâmetros de toxicidade mais empregados são: concentração média letal (CL_{50}), concentração média de efeito (CE_{50}) e concentração média de inibição (CI_{50}) (Iannacone, Alvariño, 2009; Oliveira, 2013).

Como exposto anteriormente, os antibióticos podem atingir o ambiente de diversas maneiras e ter efeitos sobre o ecossistema, seja na biota do solo ou do ambiente aquático (Ding, He, 2010; Larsson, 2014).

O solo desempenha um papel fundamental no ecossistema, pois servem como base de nutrientes primários e habitat para plantas e organismos e funcionam como um grande biorreator para degradar poluentes e facilitar a transformação de nutrientes. A presença de antibióticos no solo se dá pela aplicação de esterco como fertilizantes e pela irrigação com água contaminada (Ding; He, 2010).

O bioensaio de fitotoxicidade utiliza plantas sensíveis às substâncias tóxicas como indicadores de qualidade do ambiente (Oliveira, 2013). Esse ensaio foi escolhido para avaliar os efeitos da AMX sobre organismos fotossintetizantes (produtores). Nossos dados mostraram que a AMX não foi fitotóxica para os dois parâmetros avaliados, germinação das sementes e desenvolvimento da raiz, para as três sementes testadas, de pepino (*C. sativus*), alface (*L. sativa*) e tomate (*L. esculentum*).

Hillis e colaboradores (2011) também avaliaram a fitotoxicidade da AMX em sementes de alface (*L. sativa*), alfafa (*Medicago sativa*) e cenoura (*Daucus carota*) e, observaram que, esse antibiótico não induziu inibição no processo de germinação das três sementes avaliadas. Porém, em relação ao desenvolvimento das raízes, a alfafa mostrou um aumento significativo no crescimento da raiz apenas na concentração de 1,0 µg/L e a cenoura apresentou uma redução significativa nesse

parâmetro com CE_{25} de 9,343 mg/L. Nesse trabalho, a cenoura foi a semente mais sensível à AMX. Em outro estudo, uma planta aquática superior, a *L. gibba* foi exposta a AMX, e os autores observaram que esse antibiótico não foi fitotóxico com $CE_{50} > 1$ mg/L (Brain et al., 2004).

A AMX está presente na água em quantidades não desprezíveis para a biota aquática (0,0125 a 6,94 μ g/L) (Minh et al., 2009; Watkinson et al., 2009; Yin et al., 2010; Locatelli, Sodré, Jardim, 2011). Na literatura, os dados que relatam os efeitos potenciais da AMX na vida aquática são escassos, provavelmente porque na maioria dos casos foi associado a valores de $EC_{50} > 1.000$ mg/L, indicando assim baixa toxicidade (Park, Choi, 2008, Caballeira et al., 2012; Oliveira et al., 2013).

Testes de toxicidade com invertebrados aquáticos são importantes para a avalia o da qualidade da  gua. O bioensaio de toxicidade aguda com microcrustáceo *A. salina*   uma alternativa para identificar os efeitos tóxicos de contaminantes (Caldwell, Bentley, Olive, 2003; Oliveira, 2013).

A AMX, nas concentra es avaliadas, não induziu imobilidade significativa em *A. salina*, em 24 h e 48 h de exposi o, com valores de CL_{50} 24 h e 48 h maior que 100 mg/L, sendo classificada como um composto não-tóxico ou não categorizado de acordo com o GHS.

Diferentes estudos avaliaram o microcrustáceos *D. magna*, um em 24 h e 48 h e outro em 96 h de exposi o   AMX e foram observados valores de CL_{50} maior que 1000 mg/L e de 6950 mg/L, respectivamente. Outro microcrustáceo a *M. Macrocopa* também foi avaliada em 24 h e 48 h e sua CL_{50} foi maior que 100 mg/L, o que corrobora com nossos resultados (Park, Choi, 2008; Iannacone, Alvarino, 2009). Caballeira e colaboradores (2012) avaliaram os efeitos da AMX em duas espécies de ouriço, *Arbacia lixula* e *Paracentrotus lividus*. Eles observaram a presença de larvas anormais na exposi o a 750 mg/L de AMX. A CE_{10} para *A. lixula* foi de 1276 mg/L e para *P. lividus* foi de 108 mg/L. Os resultados mostraram que concentra es maiores que 100 mg/L de AMX, podem aumentar o desenvolvimento das larvas de ouriço do mar.

Park e Choi (2008) realizaram um estudo com peixe da espécie *Oryzias latipes*, expostos   AMX, por 96 h, e o CL_{50} foi maior que 1000 mg/L. Esse mesmo estudo determinou a concentra o ambiental calculada (MEC) de 6,0 ng/L para as águas superficiais de AMX.

Oliveira e colaboradores (2013) avaliaram a toxicidade aguda da AMX sobre embriões e larvas de zebrafish, em concentrações elevadas (75, 128, 221, 380, 654 e 1125 mg/L). Assim como os nossos dados esses autores mostram que as alterações nesse organismo aparecem em concentrações mais elevadas. Eles observaram que até 96 h de exposição, a AMX não apresentou mortalidade significativa para os organismos expostos, porém esse composto provocou eclosão prematura nos embriões com CE_{50} de 132,4 mg/L, em 48 h. Na maior concentração (1125 mg/L) os autores também observaram algumas malformações, como edema e deformidades na cauda.

Nesse trabalho foi realizado o ensaio de toxicidade da AMX com os estágios embrio-larval de zebrafish com tempo de exposição estendido para 168 h para comparação com o estudo de toxicidade aguda realizado por Oliveira e colaboradores (2013). Vale ressaltar que o consumo contínuo de antibióticos em condições sub-terapêuticas representa uma ameaça potencial para a saúde ambiental e pública, já que muitos organismos não-alvos são expostos inadvertidamente a essas substâncias ativas liberadas para o ambiente (Giri; Pal, 2014).

No nosso estudo, a AMX também não induziu mortalidade significativa durante as 168 h de exposição, apresentando 22 e 27% de mortalidade nas concentrações de 50 e 100 mg/L, porém não apresentou efeito significativo sobre a eclosão. Também apresentou algumas malformações como edema cardíaco, falha na absorção do saco vitelínico e deformidade na cauda, nas maiores concentrações testadas (50 e 100 mg/L) após 72 h de exposição à AMX, mas nenhuma dessas deformidades foram significativas quando comparados ao controle negativo.

Assim, podemos concluir que a AMX não apresentou efeito nos parâmetros letais avaliados nos ensaios com zebrafish, nas condições testadas. Porém de acordo com nosso estudo a AMX apresentou efeito sobre parâmetros sub-letais avaliados como no tamanho das larvas e nos biomarcadores enzimáticos (GST, LDH e CAT).

Nossos dados mostraram que o tamanho das larvas de zebrafish expostas à 6,25, 12,5 e 25 mg/L de AMX foi significativamente diferente do controle negativo (3,82 mm) após 168 h de exposição. De acordo com Kimmel et al. (1995), após 32 h de desenvolvimento, o crescimento do zebrafish ocorre a uma taxa aproximadamente constante de cerca de 20 $\mu\text{m/h}$ através da embriogênese. O

comprimento normal do embrião a 72 h é de cerca de 3,5 mm. De fato, vários antibióticos são usados para estimular o crescimento do peixe (Done, Venkatesan, Halden, 2015, Reda et al., 2013) e aumentar a eficiência alimentar do gado (Andreozzi et al., 2004; Carballeira et al., 2012; Reda et al., 2013), sugerindo uma melhora na absorção de nutrientes por ganho de peso. Até o presente momento, os mecanismos de promoção do crescimento como resultado da suplementação com antibióticos na dieta ainda não são exatamente conhecidos (Reda et al., 2013).

Oliveira et al (2013) também avaliaram a atividade de biomarcadores, GST (envolvida na fase II do processo de desintoxicação) e LDH (envolvida na forma anaeróbica de produção de energia) em larvas (75, 128 e 221 mg/L) e peixes adultos (1, 10, 25, 50 e 100 mg/L) de zebrafish e CAT (envolvida na defesa contra antioxidantes) apenas em peixes adultos expostos à AMX por 96 h. Os biomarcadores têm sido muito utilizados no controle de qualidade de ecossistemas aquáticos (Oliveira et al., 2009).

No nosso trabalho, a exposição prolongada (7 dias) à AMX apresentou efeitos subletais em larvas de zebrafish com relação à atividade enzimáticas de CAT, GST e LDH. A CAT diminuiu significativamente a 12,5 mg/L de AMX, enquanto que GST foi inibida de 6,25 a 100 mg/L e LDH de 1,5 a 12,5 mg/L. Oliveira et al. (2013) observaram que em diferentes tecidos (cabeça, músculo, fígado e brânquias) dos adultos, a CAT também foi significativamente inibida nas brânquias (de 25 mg/L a 100 mg/L) e nas amostras de cabeça a 50 mg/L e 100 mg/L. Considerando que a CAT atua contra as espécies oxidativas reativas (ROS), convertendo H_2O_2 em H_2O e O_2 (Coelho et al., 2011), foi possível observar que em maior tempo de exposição (168 h) à AMX reduziu cerca de duas vezes a capacidade de prevenção de danos por estresse oxidativo das larvas expostas.

Já as enzimas GST e LDH nas larvas de zebrafish (75, 128, 221 mg/L) não sofreram alterações no trabalho de Oliveira e colaboradores (2013). Considerando que a GST catalisa a conjugação de glutatona com xenobióticos produzidos durante a peroxidação lipídica, nossos resultados mostraram que a AMX diminui a desintoxicação em concentrações iguais ou acima de 6,25 mg/L.

A LDH é uma enzima chave na via anaeróbia da produção de energia, responsável pela catálise da interconversão do piruvato para o lactato na glicólise e está envolvida no metabolismo dos carboidratos (Coelho et al., 2011; Andrade et al., 2016). Assim como, no estudo de Oliveira et al. (2013), esse biomarcador enzimático

de estresse químico em embriões de zebrafish e adultos (Coelho et al., 2011; Sancho et al., 2009) não foi conclusivo com os resultados obtidos.

Portanto, assumindo que esses biomarcadores são utilizados como respostas biológicas adaptativas a estressores, que são evidenciadas por alterações bioquímicas, celulares, histopatológicas, fisiológicas ou comportamentais, os dados obtidos confirmam a importância de avaliar a exposição a longo prazo em baixas concentrações para uma melhor compreensão dos potenciais efeitos adversos potenciais da AMX em peixes.

7 CONCLUSÕES

Portanto, com base em nossos resultados podemos concluir que:

- A AMX não foi fitotóxica para as sementes tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e alface (*Lactuca sativa*);
- A AMX apresentou valores de CL₅₀ maior que 100 mg/L pra *A. salina*, sendo classificada como não tóxica (não categorizada), de acordo com o GHS;
- A AMX não provocou mortalidade significativa nos embriões e larvas de zebrafish durante as 168 h de exposição, assim como não alterou significativamente a eclosão dos embriões e o equilíbrio de larvas de zebrafish. Nas maiores concentrações testadas, a AMX induziu malformações nas larvas do zebrafish como, edema cardíaco, alteração na absorção do saco vitelínico e deformidades na cauda, porém esses efeitos também não foram significativos. Já as concentrações 6,25; 12,5 e 25 mg/L de AMX aumentaram significativamente o tamanho das larvas de zebrafish.
- A AMX inibiu significativamente a atividade dos biomarcadores enzimáticos avaliados. A atividade de CAT diminuiu significativamente a 12,5 mg/L de AMX, enquanto que GST foi inibida de 6,25 a 100 mg/L e LDH de 1,5 a 12,5 mg/L.
- Nossos dados confirmam que, o antibiótico AMX não apresenta toxicidade aguda relevante para os diferentes organismos testados. Entretanto, alguns efeitos subletais foram identificados em larvas de zebrafish, o que confirma a necessidade de se avaliar os efeitos das exposições crônicas em concentrações mais baixas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMÉRICO, J.H.P. et al. Ocorrência, destino e potenciais impactos dos fármacos no ambiente. *Saúde e Biol*, v.8, n.2, p.59-72, mai./ago., 2013.
- ANDRADE, T.S. et al. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, v. 170, p. 390-399, 2016.
- ANDREOZZI, R. et al. Antibiotics in the environment: occurrence in italian stps, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environ. Sci. Technol.*, v.38, p.6832-6838, 2004.
- BEDNARCZUK, V.O. et al. Tests in vitro and in vivo used in the toxicological screening of natural products. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.11, n.2, 2010.
- BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v.26, n.4, p.523-530, 2003.
- BOXALL, A.B.A. The environmental side effects of medication. *European Molecular Biology Organization*, v.5, n.12, 2004.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254, 1976.
- BRAIN, R.A. et al. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.23, n.2, p.371–382, 2004.
- BRANDÃO, M.F.P. *Impacto de fármacos em biomarcadores de Lepomis gibbosus*. 2011. 68 f. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia, Aveiro, Portugal, 2011.
- BRASIL. Resolução RDC nº20, de 5 de maio de 2011. “Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acessado em 10 de novembro de 2015.
- BRITO-PELEGRINI, N.N. et al. Ensaio biológico com sementes para avaliar a redução da toxicidade do chorume tratados por processo fotoquímico. *Minerva*, v.6, n.3, p.219-228, 2005.
- BROWN, K.D. et al. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, v.366, p.772–783, 2006.

BRUNO, F. et al. Method development for measuring trace levels of penicillins in aqueous environmental samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, v.15, p.1391-1400, 2001.

CALDWELL, G.S.; BENTLEY, M.G.; OLIVE, P.J.W. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. *Toxicon*, v.42, p.301–306, 2003.

CALIXTO, C.M.F.; CAVALHEIRO E.T.G., Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico no Desenvolvimento Científico. *Química Nova na Escola*. v.34, n.3, p.118-123, 2012.

CARBALLEIRA, C. et al. Assessing the toxicity of chemical compounds associated with land-based marine fish farms: the sea urchin embryo bioassay with *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*. *Arch Environ Contam*, v.63, p.249–261, 2012.

CARLSSON, G. et al. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology*, v. 126, p. 30-41, 2013.

CARVALHO, E.V. et al. Aspectos legais e toxicológicos do descarte de medicamentos. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 22, n.1-2, p.1-8, 2009.

CLAIRBORNE, A. Catalase activity. In: RA, G. (Ed.), CRC handbook of methods in oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 283–284, 1985.

COELHO, S. et al. Assessing lethal and sub-lethal effects of trichlorfon on different trophic levels. *Aquatic Toxicology*, v.103, p. 191-198, 2011.

CRANE, M.; WATTS, C.; BOUCARD, T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Sci Total Environ*. v.367, n.1, p.23-41, 2006.

DAMÁSIO, J. et al. Are pharmaceuticals more harmful than other pollutants to aquatic invertebrate species: a hypothesis tested using multi-biomarker and multi-species responses in field collected and transplanted organisms. *Chemosphere*, v.85, p.1548–1554, 2011.

DIAMANTINO, T.C. et al. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus. *Chemosphere*, 45(4-5), pp.553–560, 2001.

DIN, C.; HE, J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.87, p.925–941, 2010.

DOMINGUES, I. et al. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, v.152, n.3, p.338-45, 2010.

DONE, H.Y.; VENKATESAN, A.K.; HALDEN, R.U. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with

land animal production in agriculture? *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 17, n. 3, p. 513-524, 2015.

FENT, K.; WESTON, A.A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.*, v.76, n.2, p.122-59, 2006.

FERDIG, M., KALETA, A., BUCHBERGER, W., Improved liquid chromatographic determination of nine currently used (fluoro)quinolones with fluorescence and mass spectrometric detection for environmental samples. *Journal of Separation Science*, v.28, p.1448-1456, 2005.

FRASCO, M.F.; GUILHERMINO, L. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(2), pp.149–156. 2002.

GIRI, P.; PAL, C. Ecotoxicological aspects of pharmaceuticals on aquatic Environment. *American Journal of Drug Discover*, v.1, p. 10-24, 2014.

GUIMARÃES, D.O; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova*, v.33, N.3, p.667-679, 2010.

HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Method. Enzymol.* 77, 398–405, 1981.

HILLIS, D.G. et al. Effects of Ten Antibiotics on Seed Germination and Root Elongation in Three Plant Species. *Arch Environ Contam Toxicol*, v.60, p/ 220-232, 2011.

HOLTEN-LÜTZHØFT, H.C. et al. Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.36, p.1–6, 1999.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v. 496, p. 498-503, 2013.

IANNACONE, J.; ALVARIÑO, L. Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*: aquatic risk assessment of seven pharmaceutical products on *Daphnia magna*. *Ecología Aplicada*, v.8, n.2, 2009.

IMS HEALTH. *Banco de Dados e Instituto de Pesquisa Mercadológicas*. Disponível em: <<http://www.ims-global.com.br>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

ISSE, K.F. *A Indústria Farmacêutica Nacional e a Importância dos Medicamentos Genéricos no seu Desenvolvimento*. 2011. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Econômicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2011.

JESUS, T.B.; CARVALHO, E.V. Utilização de Biomarcadores em Peixes como Ferramenta para Avaliação de Contaminação Ambiental por Mercúrio (Hg). *O ecol. Bras.*, v.12, p. 680-693, 2008.

KATZUNG, B.G. *Farmacologia básica e clínica*. 10ª edição. AMGH Editora Ltda, p.1046, 2010.

KIMMEL, C.B. et al. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, v.203, p.253-310, 1995.

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

LARSSON, D.G.J. Antibiotics in the environment. *Upsala Journal of Medical Sciences*, v.119, p.108–112, 2014.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, v. 269, p. 1-20, 2007.

LOCATELLI, M.A.F.; SODRÉ, F.F.; JARDIM, W.F. Determination of Antibiotics in Brazilian Surface Waters Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Arch Environ Contam Toxicol*. v.60, p.385–393, 2011.

MARÍN, M.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v.21, n.1, p.42-55, 2003.

MATAMOROS, V. et al. Evaluation of aquatic plants for removing polar microcontaminants: a microcosm experiment. *Chemosphere*, v.88, n.10, p.1257-64, 2012.

MCARDELL, C.S. et al. Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science & Technology*, v.37, n.24, 2003.

MEDRANO, F.L.; PEDROCHE, C.D.; GARRIDO, R.S.J. Antibióticos betalactámicos I. *Medicine*, v.9, n.51, p.3344-3350, 2006.

MEYER, B.N. et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, v.45, p.31-34, 1982.

MINH, T.B. et al. Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: Ubiquitous distribution and fate in Victoria Harbour. *Marine Pollution Bulletin*, v.58, p.1052–1062, 2009.

MITELUT, A.C.; POPA, M.E. Seed germination bioassay for toxicity evaluation of different composting biodegradable materials. *Romanian Biotechnological Letters*, v.16, n.1, 2011.

NEVES, H.M.P. *Avaliação ecotoxicológica da Barrina de Esmoriz, utilizando uma análise integrada de biomarcadores enzimáticos e histopatológicos*. 2012. 131 f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Porto, Portugal, 2012.

OLIVEIRA, G.A.R. *Avaliação toxicogenética e ecotoxicológica de corantes têxteis*. 2013. 125 f. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, 2013.

OLIVEIRA, G.A.R. et al. Textile dyes induce toxicity on zebrafish early life stages. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.35, n. 2, p. 429-434, 2016.

OLIVEIRA, G.G. *A Indústria Farmacêutica e o Controle Internacional de Medicamentos*. Brasília: Senado, 1998.

OLIVEIRA, L.L.D. *Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos*. 2014. 279 f. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2014.

OLIVEIRA, R. et al. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environ Sci Pollut Res*, v. 16, p. 679-688, 2009.

OLIVEIRA, R. et al. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.3, n.6, p.903–912, 2013.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD]. Guideline for testing of chemicals, *Daphnia sp. Acute Immobilization Test* (Guideline No. 202), France, 2004.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT [OECD]. Guidelines for Testing of Chemicals, *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test* (Guideline 236), 2013.

PALMEIRA-FILHO, P.L.; PAN, S.S.K. Cadeia farmacêutica no brasil: avaliação preliminar e perspectivas. *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, n. 18, p. 3-22, 2003.

PARK, S.; CHOI, K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*, v.17, p.526–538, 2008.

PEREIRA, L.C. et al. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. *Environ Sci Pollut Res*, v. 22, p. 13800-13823, 2015.

PÉREZ-PARADA, A. et al. Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, v.25, n.6, p.731-742, 2011.

PETRIE, B; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDEM, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, v.72, p. 3-27, 2015.

PIMENTEL, M.F. et al. O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v.6, n.1, p.15-22, 2011.

PITANGA, F. L. *The effect of sodium hypochlorite in different aquatic organisms*. 2011. Dissertação de Mestrado – Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal, 2011.

REDA, R.M. et al. Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 39, p.241–248, 2013.

RICHARDSON, S.D. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, v.80, p.4373–4402, Rio de Janeiro 2008.

ROSENBERG, G.; FONSECA, M.G.D.; AVILA, L.A. Análise Comparativa da Concentração Industrial e de *Turnover* da Indústria Farmacêutica no Brasil para os Segmentos de Medicamentos de Marca e Genérico. *Economia e Sociedade*, Campinas, v.19, n.1(38), p.107-134, 2010.

ROTINI, A. et al. Can *Artemia* Hatching Assay Be a (Sensitive) Alternative Tool to Acute Toxicity Test? *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 2015.

SALLES, P.T.F; PELEGRINI, N.N.B.; PELEGRINI, R.T. Tratamento eletroquímico de efluentes industrial contendo corante reativo. *Engenharia Ambiental*, Espírito Santo do Pinhal, v. 3, p. 25-40, 2006.

SALVATORE, M.,D.; CARAFA, A.M.; CARRATÙ, G. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: a comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, v.73, n.9, p.1461-4., 2008.

SANCHO, E. et al. Physiological effects of triclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 150, p. 25-32, 2009.

SANTOS, E.C.; FERREIRA, M.A. A Indústria Farmacêutica e a Introdução de Medicamentos Genéricos no Mercado Brasileiro. *Nexos Econômicos*, Bahia, v.6, n.2, 2012.

SCHOLZ, S. et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 15, n.5, p.394-404, 2008.

SEIFRTOVÁ, M. et al. Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Anal. Bioanal.Chem.*, v.391, p.799-805, 2008.

SELAN, B.; KANNEBLEY JR, S.; PORTO, G.S. Relatório Setorial sobre Inovação Tecnológica na Indústria Farmacêutica Brasileira: Uma Análise a partir dos

Indicadores de Inovação. *Parque Tecnológico de Ribeirão Preto*, Ribeirão Preto, 2007.

SILVA-CARVALHO, M.C. et al. Emergence of multiresistant variants of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage ST1-SCCmecIV in 2 hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, v.65, n.3, p.300-305, 2009.

SILVA, S. R. *Quantificação de substâncias com atividade estrogênica e caracterização da toxicidade embriolarval em zebrafish (Danio rerio) nos efluentes das Estações de Tratamento de Esgotos Sul e Norte e no Lago Paranoá, Brasília-DF*. 2015. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2015.

SMITH, A.J.; BALAAM, J.L.; WARD, A. The development of a rapid screening technique to measure antibiotic activity in effluents and surface water samples. *Marine Pollution Bulletin*, v.54, p.1940–1946, 2007.

SOUZA, B.S. *Avaliação do processo H₂O₂/UV como pós-tratamento e remoção da atrazina de um efluente secundário de ETE para fins de reuso*. 2011. 183 f. Tese de Doutorado – Programa de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.*, v. 83, p. 13-34, 2008.

TIERNEY, K.B. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1812, p.381-389, 2011.

US EPA, 1996. United States Environmental Protection Agency. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.4200. *Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test*. EPA 712-C-96-154, 1996.

USEPA, 2014. United States Environmental Protection Agency. *Contaminants of Emerging Concern*. Disponível em: < <http://water.epa.gov/scitech/cec/>>. Acessado em: 10 de novembro de 2015.

VASCONCELOS, O.M.S.R. *Degradação do antibiótico amoxicilina em efluente de indústria farmacêutica*. 2011. 136 f. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2011.

VASSAULT, A. Lactate dehydrogenase. Methods of enzymatic analysis, enzymes: oxireductases, transferase. *Academic Press, New York*, pp. 118–126, 1983.

WATKINSON, A.J. et al. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of the total environment*, v.407, p.2711-2723, 2009.

XU, W.H. et al. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Environmental Pollution*, v.145, p.672-679, 2007.

YIN, J. et al. Pseudo-template molecularly imprinted polymer for selective screening of trace β -lactam antibiotics in river and tap water. *Journal of Chromatography A*, v.1217, p.5420–5426, 2010.

ZHOU, H. et al. Systematic screening of common wastewater-marking pharmaceuticals in urban aquatic environments: implications for environmental risk control. *Environ Sci Pollut Res Int.*, v.21, n.11, p.7113-29, 2014.

APÊNDICE

Apêndice – Resultados preliminares do ensaio de fitotoxicidade com semente de pepino (*C. sativus*), alface (*L. sativa*) e tomate (*L. esculentum*).

TABELA 8. Taxa de germinação e comprimento das raízes de pepino (*C. sativus*), alface (*L. sativa*) e tomate (*L. esculentum*) após 120 horas de exposição à amoxicilina.

Taxa de germinação e comprimento das raízes (média ± desvio padrão)						
	<i>C. sativus</i>		<i>L. sativa</i>		<i>L. esculentum</i>	
	Semente (%)	Raíz (cm)	Semente (%)	Raíz (cm)	Semente (%)	Raíz (cm)
CN	100,0 ± 5,80	10,7 ± 2,22	100,0 ± 1,00	2,6 ± 0,13	100,0 ± 1,00	5,2 ± 1,37
0,01	93,1 ± 0,00	10,3 ± 2,86	96,3 ± 0,60	3,5 ± 0,47	91,7 ± 5,80	5,3 ± 0,90
0,1	93,1 ± 10,00	12,6 ± 1,06	96,3 ± 1,20	4,3 ± 0,13*	70,8 ± 5,80	5,0 ± 2,24
1	96,6 ± 11,50	12,7 ± 0,82	92,6 ± 1,20	3,1 ± 0,58	79,2 ± 5,80	4,1 ± 1,41
10	96,6 ± 5,80	13,3 ± 0,08	103,7 ± 0,60	3,1 ± 0,63	108,3 ± 5,80	4,6 ± 1,00
100	100,0 ± 5,80	12,7 ± 0,23	103,8 ± 1,00	2,6 ± 0,58	83,3 ± 5,80	3,9 ± 0,78
1000	103,4 ± 0,00	12,5 ± 1,94	112,0 ± 0,60	2,9 ± 0,10	95,8 ± 15,30	3,9 ± 0,17

*p<0,05 estatisticamente diferente em relação ao controle negativo

ANEXO

Anexo – Comitê de Ética aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 08 de Dezembro de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 102/14.

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Iniciação Científica (IC) e Dissertação de mestrado.

II - Identificação:

- Título do projeto:** Avaliação ecotoxicológica e toxicogenética de contaminantes emergentes presentes em sistemas hídricos.
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira.
- Pesquisadores Participantes:** Aline Rangel Silva Araújo (IC) e Lara Barroso Brito (Dissertação).
- Unidade onde será realizado:** Faculdade de Farmácia/UFG.
- Data de apresentação a CEUA:** 06/11/2014.

III - Objetivos e justificativa do projeto: Esse trabalho propõe avaliar os impactos ambientais e para saúde humana, provocados pela presença de contaminantes emergentes (fármacos, praguicidas e corantes têxteis) em sistemas hídricos, empregando ensaios ecotoxicológicos e toxicogenéticos com células HepG2 (células derivadas de um hepatoblastoma) e embriões/larvas de zebrafish (*Danio rerio*).

IV - Sumário do projeto:

- Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** A avaliação da toxicidade de contaminantes emergentes pode ser realizada com culturas celulares e bactérias como método alternativo à experimentação animal. Células HepG2, provenientes de hepatoblastoma humano serão utilizadas nesse projeto para avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade desses contaminantes, entretanto os testes *in vitro* são limitados pelo tempo de exposição (máximo de 72 horas). Esse projeto também propõe o ensaio de mutagenicidade com *Salmonella/microsoma*, que se limita a avaliação de apenas um endpoint de toxicidade, que é a mutagenicidade em bactéria *Salmonella typhimurium*. Assim, para ampliar os endpoints avaliados, ou seja, analisar os efeitos letais (mortalidade), subletais (malformações) e genotóxicos (danos ao DNA), assim como aumentar o tempo de exposição aos contaminantes simulando uma exposição subcrônica, esse projeto pretende utilizar embriões e larvas de zebrafish. O ensaio de toxicidade com embriões de zebrafish é uma metodologia que permite a redução ou substituição do uso de animais adultos na avaliação da ecotoxicidade.
- Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):** Serão utilizados 60 animais adultos de zebrafish (*Danio rerio*), com idade entre 3 e 6 meses, que serão mantidos em 4 tanques de 15 litros com cerca de 15 peixes cada, os quais serão monitorados e mantidos em quarentena. Os peixes serão cedidos pelo Instituto de Ciências Biológicas da UnB.
- Espécie e número total de animais utilizados:** 60 Peixes *Danio rerio* (40 machos e 20 fêmeas)

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
 CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
 Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



❑ Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação: Os peixes adultos serão alocados em 4 aquários de 15L em uma sala de manutenção e reprodução, protegida de luminosidade, correntes de ar e ruídos, vibração externa, com fotoperíodo e temperatura controlada. Os parâmetros da água como temperatura, pH, condutividade, dureza, oxigênio dissolvido e dosagem de amônia e nitrito serão monitorados periodicamente. Os peixes serão alimentados 2 vezes ao dia com ração comercial para a espécie *Danio rerio*. Na semana anterior à reprodução, os peixes receberão alimento vivo (*Artemia salina*) a fim de aumentar a viabilidade dos ovos e como forma de recompensa ao acasalamento. Para aquisição dos ovos, no dia anterior à desova, peixes na proporção de 2 machos para 1 fêmea serão colocados para acasalar na presença de plantas artificiais e bolas de vidro. Esses peixes serão distribuídos em 3 tanques de 10 litros, com 6 peixes machos e 3 fêmeas, por tanque, totalizando 9 peixes em cada aquário, com o intuito de obter pelo menos 200 ovos por reprodução. Cerca de 30 minutos após a desova os ovos serão coletados e analisados para o descarte dos ovos não fertilizados e seleção daqueles que alcançaram o estágio de blástula. Os ensaios para avaliação dos endpoints letais, subletais e genotóxicos serão realizados em triplicata para cada substância-teste (um antibiótico, um herbicida a base de glifosato e um azo corante), sendo necessários grupos de peixes distintos para cada reprodução e fêmeas com pelo menos uma semana de intervalo entre as reproduções. De acordo com a OECD, por réplica, serão expostos 168 ovos de zebrafish distribuídos em placas de 24 poços, sendo testadas cinco concentrações de cada contaminante emergente, um controle negativo, um controle interno das placas e um controle positivo, sendo necessário ao todo cerca de 2000 ovos gerados em cerca de 10 acasalamentos distintos. As placas com os ovos serão colocadas em incubadora BOD e o desenvolvimento embrionário-larval será analisado com 4, 24, 48, 72 e 96 horas de pós-fertilização, podendo se estender até 30 dias. Após finalizar a avaliação dos endpoints de subletalidade, embriões e larvas de zebrafish serão sacrificados por crioaanestesia, ou seja, a anestesia por resfriamento intenso, aceita como um dos métodos para a eutanásia de zebrafish, de acordo com Guideline for Use of Zebrafish in the NIH (2009). Os ensaios toxicogenéticos *in vitro* serão realizados com células provenientes de um hepatoblastoma primário (HepG2).

❑ Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos: Não se aplica a utilização de agente infeccioso. Os riscos do referido trabalho se referem a falhas na manipulação dos equipamentos durante o período experimental. No entanto, os pesquisadores que atuarão na criação, manutenção, reprodução e análise dos embriões serão devidamente treinados para exercerem suas atividades.

❑ Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais: A metodologia está bem clara e devidamente detalhada, sendo tomadas todas as medidas mitigadoras para minimizar o sofrimento dos animais.

❑ Método de eutanásia: Não se aplica.

❑ Destino do animal: Não é descrito o destino dos animais adultos utilizados como reprodutores.

IV – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

❑ Quanto a documentos: Foram apresentados todos os documentos solicitados pela CEUA.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFPG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -

CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



- ❑ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Os procedimentos de criação, manutenção e cuidados com os animais mimetizam o ambiente natural da espécie e garantem seu bem-estar. Os riscos desta pesquisa estão relacionados a falhas na manipulação de equipamentos, sendo minimizados com treinamento apropriado de toda a equipe.

V - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas **APROVOU** o pedido de emenda de prorrogação do prazo do projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFPG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFPG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 30/03/2018.

VI - Data da reunião: 08/12/2014

Dra. Marina Pacheco Miguel
Vice-coordenadora da CEUA/PRPI/UFPG