

Respostas Aguda e Crónica da *Daphnia magna* a Cefalexina

Maria Fernanda Ferreira Marques

Dissertação de Mestrado em Medicina Legal

Maria Fernanda Ferreira Marques

Respostas Aguda e Crónica da *Daphnia magna* a Cefalexina

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em
Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor Lúcia Guilhermino

Categoria – Professora Catedrática

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel
Salazar da Universidade do Porto; Laboratório de
Ecotoxicologia do Centro Interdisciplinar de
Investigação Marinha e Ambiental.

in memoriam

Rui Manuel Marques,

a vida continua para os que ficam, mas farás sempre parte
da minha vida!

agradecimentos

À Professora Doutora Lúcia Guilhermino, minha orientadora. Pela possibilidade de integrar o Laboratório de Ecotoxicologia do CIIMAR, permitindo a realização do meu trabalho e dos conhecimentos científicos adquiridos.

À Mestre Alexandra Martins. Pela ajuda em todos os momentos, pela disponibilidade e paciência, mas acima de tudo, pela amizade.

À Professora Doutora Maria José Pinto da Costa pelos conhecimentos transmitidos, pela simpatia, pela amizade e pelo interesse em ajudar os seus alunos em todas as fases da vida.

À minha Mãe, à minha Irmã e ao meu Pai pelo apoio constante.

Aos meus amigos, pela amizade e incentivo.

Aos colegas do LE do CIIMAR, Doutor Marcus e Dra. Andreia por me integrarem no grupo.

Ao ICBAS e ao CIIMAR pela oportunidade científica disponibilizada.

Por último, mas, não menos importantes, a todas as dáfnias sacrificadas em prole do bem comum!

Resumo

Hoje em dia, o consumo de produtos farmacêuticos é um facto presente nas sociedades por diversas razões. Este aumento de consumo causa no meio ambiente, principalmente, nos sistemas aquáticos, uma contaminação por substâncias farmacologicamente activas. Esta presença de substâncias nos ecossistemas representa uma crescente preocupação ambiental, devido à possível interferência nos diversos sistemas biológicos. O presente trabalho teve como principal objectivo avaliar os efeitos agudos e crónicos induzidos pela substância cefalexina em organismos aquáticos não-alvo. Para o efeito, foram efectuados dois bioensaios agudos, utilizando a morte como critério de toxicidade, e um bioensaio crónico, utilizando a reprodução e o crescimento como critérios de efeito tóxico em *Daphnia magna*.

Nos ensaios agudos, a morte dos organismos não foi verificada.

No ensaio crónico, foi possível verificar uma diminuição de juvenis, contudo não foi possível observar alterações no crescimento da *Daphnia magna*. Contudo, não existem muitos dados das concentrações presentes em meios aquáticos, sendo necessário, mais estudos desta substância e outras de uso humano e veterinário.

Em suma, a cefalexina afecta a reprodução da *Daphnia magna*, ao nível da segunda concentração mais alta usada no teste.

Abstract

Nowadays, the consumption of pharmaceutical products is a present fact in the societies for diverse reasons. These increase of consumption cause in the environment, mainly, in the aquatic systems, a contamination with pharmacological active substances. The presence of this substance in ecosystems represents an increasing environmental concern, due to possible interference in the diverse biological systems. The present work had as main objective to evaluate induced acute and chronic effects for the cefalexina substance in aquatic organisms not-target. For the effect, two acute bioassays had been effected, using the mortality as toxicity criterion, and a chronic bioassay, using the reproduction and the growth as criteria of toxic effect in *Daphnia magna*. In the acute bioassays, the death of the organisms was not verified. In the chronic bioassay, it was possible to verify a reduction of neonates, however it wasn't possible to observe alterations in the growth of the *Daphnia magna*. However, don't exists much data of concentrations in aquatic systems, being necessary, more studies of this substance and others of human and veterinary use. In summary, the cefalexina affects the reproduction of the *Daphnia magna*, on the second higher concentration used in the test.

Resumé

Aujourd'hui, la consommation de produits pharmaceutiques est un fait présent dans les sociétés pour de diverses raisons. Cette augmentation de consommation cause dans l'environnement, principalement, nous systèmes aquatiques, une contamination par des substances pharmacologiquement actives. Cette présence de substances dans les écosystèmes représente une croissante préoccupation environnementale, dû à la possible interférence dans les divers systèmes biologiques. Le présent travail a comme principal objectif évaluer les effets aigus et chroniques induits par la substance cefalexine dans des organismes aquatiques non-but. À cet effet, ont été effectuées deux bioessais aigus, en utilisant la mort comme critère de toxicité, et un bioessai chronique, en utilisant la reproduction et la croissance comme des critères d'effet toxique dans *Daphnia magna*. Dans les essais aigus, la mortalité des organismes n'a pas été vérifiée. Dans l'essai chronique, a été possible de vérifier une diminution de juvéniles, néanmoins il n'a pas été possible d'observer des modifications dans la croissance du *Daphnia magna*. Néanmoins, n'existent pas des données des concentrations présentes dans les systèmes aquatiques. En étant nécessaire, plus études de cette substance et autres de l'usage humain et vétérinaire humain. En résumé, la cefalexine affecte la reproduction du *Daphnia magna*, au niveau de seconde concentration plus haute utilisée dans l'essai.

"Antes de iniciares o trabalho de mudar o mundo, dá três voltas pela tua casa."

Provérbio chinês

ÍNDICE

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	ii
Capítulo I. Introdução Geral	2
I.1. Enquadramento do tema	3
I.2. Objectivos	13
I.3. Estrutura da Dissertação	13
Capítulo II. Efeitos agudos e crónicos da cefalexina no crustáceo cladócero <i>Daphnia magna</i>	14
II.1. Introdução	16
II.2. Material e Métodos	17
II.3. Resultados	19
II.4. Discussão	23
II.5. Conclusão	24
II.6. Referências bibliográficas	24
Capítulo III. Discussão Geral	29
III.1. Discussão Geral	30
III.2. Bibliografia	31
Anexos	43
Anexo 1	44
Anexo 2	45

Lista de Figuras

I. **Figura 1:** Número total de embalagens vendidas em ambulatório (2003-2007). (INFARMED, Estatística do Medicamento, 2003, 2004,2005, 2006 e 2007).

I. **Figura 2:** Número de embalagens vendidas (medicamentos anti-infecciosos/antibióticos) no mercado do SNS (2003-2007). (INFARMED, Estatística do Medicamento, 2003, 2004,2005, 2006 e 2007).

I. **Figura 3:** Consumo de antibióticos na Europa. (ESAC, 2006).

I. **Figura 4:** Estrutura molecular da cefalexina. (SIGMA, 2006).

II. **Figura 1:** Média de juvenis produzidos (a), juvenis móveis (b) e ovos abortados (c) por fêmea durante os 21 dias de exposição de *Daphnia magna* à cefalexina. As barras representam o desvio-padrão e * indica as diferenças significativas relativamente ao grupo-controlo.

II. **Figura 2:** Média de juvenis imóveis (d) por fêmea durante os 21 dias de exposição de *Daphnia magna* à cefalexina. As barras representam o desvio-padrão e * indica as diferenças significativas relativamente ao grupo-controlo.

II. **Figura 3:** Média do crescimento das dáfnias antes do nascimento da primeira ninhada (a), crescimento entre o nascimento da primeira ninhada e o final do teste (b) e o crescimento total (c) por fêmea durante os 21 dias de exposição de *Daphnia magna* à cefalexina. As barras representam o desvio-padrão e * indica as diferenças significativas relativamente ao grupo-controlo. 1 – correspondente à primeira carapaça libertada; n1 – correspondente à carapaça libertada após o nascimento da primeira ninhada; Last – correspondente à última carapaça libertada.

Lista de Tabelas

II. Tabela 1: Valores de CENO e CEO da cefalexina para *Daphnia magna* a 20°C durante os 21 dias do bioensaio crónico. 1 – correspondente à primeira carapaça libertada; n1 – correspondente à carapaça libertada após o nascimento da primeira ninhada; Last – correspondente à última carapaça libertada; – - não determinado.

Anexo 1. Tabela 2: Valores médios da Temperatura (°C), pH, Oxigénio Dissolvido (%) e Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) medidos durante o bioensaio agudo da exposição da *Daphnia magna* à cefalexina, com o respectivo desvio-padrão (desv.pad).

Anexo 2. Tabela 3: Valores médios da Temperatura (°C), pH, Oxigénio Dissolvido (%) e Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) medidos durante o bioensaio crónico da exposição da *Daphnia magna* à cefalexina, com o respectivo desvio-padrão (desv.pad).

Capítulo I

Introdução Geral

Introdução Geral

1. Enquadramento do Tema

A Medicina Legal é uma ciência muito abrangente, que engloba várias disciplinas, tais como: a tanatologia, a toxicologia, a biologia/genética, a psicologia/psiquiatria, a biologia, a ecologia e o direito (França, 2005).

A Toxicologia é a ciência responsável pela identificação e quantificação dos efeitos adversos no organismo, associados à exposição a determinados agentes ou substâncias químicas. Neste contexto, são denominados por tóxicos e a sua natureza pode ser orgânica ou inorgânica. Em suma, a Toxicologia engloba o estudo dos tóxicos, estabelecendo os limites de segurança entre meios biológicos e as substâncias químicas. A Toxicologia divide-se em três principais ramos: Toxicologia Descritiva, a Toxicologia Reguladora e a Toxicologia Mecanística. E pode-se subdividir em: clínica, forense e ambiental (toxicologia ambiental ou ecotoxicologia) (Kendall *et al.*, 2001).

Desde a Pré-História que se conhecem diversas espécies de plantas e animais venenosas. No Egito, foi encontrado o Papiro de Ebers (1500 AC), este continha referências ao uso de diversos tóxicos, tais como: aconite, ópio, metais (chumbo, cobre, antimónio) e venenos de plantas (cicuta, abeloura e beladona). Durante a civilização grega e romana, existem muitas menções a venenos e antídotos, por exemplo, o uso de cicuta na morte de Sócrates, a morte de Cleópatra por uma áspide e de Cláudio envenenado com um cogumelo *Amanita phalloides*. Desde a Idade Média até à Renascença, existem relatos sobre Avicena (980-1036), médico árabe, uma autoridade em venenos e antídotos. Em 1200, o rabi e médico Maimonides, escreveu o livro “Os Venenos e os seus Antídotos”. Em Itália, os Medici e os Borgia, ficaram conhecidos pelo uso dos venenos como arma política. Catarina de Medici (1519-1589) foi a responsável pelo conhecimento rudimentar da toxicologia experimental: a rapidez da resposta, a noção de potência, local de acção e sua especificidade, sinais e sintomas clínicos. Paracelsus (1493-1541) definiu a toxicologia como disciplina científica, afirmando que a resposta a uma substância está relacionada com a dose de tóxico. Segundo ele, todas as substâncias são venenos, é a dose que faz o veneno. Orfila (1787-1853) estabeleceu a primeira correlação entre propriedades químicas e biológicas dos venenos conhecidos, demonstrou, ainda, os seus efeitos em diferentes órgãos. Também, desenvolveu a aproximação analítica, base da toxicologia forense, tornando-se o pai da toxicologia

moderna. Mais tarde, em 1962, Rachel Carson expôs no seu livro *Silent Spring*, os danos causados ao meio ambiente pelo uso indiscriminado de pesticidas, nomeadamente o dicloro-difenil-tricloetano (DDT).

Hoje em dia, a quantidade de agentes tóxicos para o homem e meio ambiente, é muito grande e variada, desde pesticidas, fármacos, aditivos alimentares, entre outros.

Uma substância é tóxica, quando é capaz de causar danos, variando o grau de intensidade e gravidade. Alguns são de tal modo intensos, que a vida do intoxicado é posta em risco, podendo ocorrer sequelas persistentes ou até a morte. As intoxicações podem ser agudas (exposição única), sub-agudas (exposição curta repetida), sub-crónicas e crónicas (exposição prolongada). Quando as perturbações fisiológicas surgem abruptamente, geralmente proporcionais à quantidade ingerida de tóxico, denomina-se por intoxicação aguda. O efeito nocivo de um tóxico pode ser exercido a nível local (lesões na pele ou mucosas causadas por cáusticos e corrosivos) e a nível sistémico. Os efeitos tóxicos sobre os sistemas enzimáticos podem ser reversíveis ou irreversíveis. A gravidade de uma intoxicação varia consoante a quantidade e o tipo de tóxico, assim como da via de administração, da idade da pessoa, a presença ou ausência de patologia anterior e o tempo de exposição (Esteves, 2001; França, 2005)

São diversos os factores que influenciam os efeitos tóxicos no organismo do intoxicado, tais como: a quantidade de substância absorvida, características físico-químicas do tóxico e a presença de outros químicos, a via de administração, a duração e frequência da exposição, sexo, idade e a cinética das substâncias tóxicas: absorção, distribuição, metabolização (biotransformação) e excreção. A metabolização é muito importante, devido ao facto de originar novas moléculas, denominadas por metabolitos, por transformação dessas substâncias exógenas ou xenobióticos, através de alterações metabólicas no organismo (Esteves, 2001).

As intoxicações podem ser criminais, acidentais, voluntárias e legais (pena de morte) (França, 2005).

A investigação toxicológica, em toxicologia clínica, tem como objectivo a identificação e quantificação dos tóxicos para diagnóstico da intoxicação e respectivo tratamento. Na actualidade, a actividade da Toxicologia Forense é muito mais ampla, devido às perícias no vivo, no cadáver e, também, em questões de saúde pública, tais como: no local de trabalho e no meio ambiente. Tendo como objectivo, o esclarecimento de questões legais relacionadas com o potencial risco da exposição humana a substâncias tóxicas (França, 2005).

A Ecotoxicologia é o ramo da toxicologia que estuda os efeitos dos tóxicos, naturais ou sintéticos, sobre os organismos vivos constituintes dos ecossistemas, num contexto

integrado (Truhaut, 1977). Mais tarde, a Ecotoxicologia foi definida como “o estudo dos efeitos nefastos das substâncias químicas nos ecossistemas” (Walker *et al.*, 1996).

O aumento do consumo de medicamentos é uma realidade de todos os quadrantes da sociedade mundial e, por sua vez, a emissão de resíduos, é também responsável pelo impacto no meio ambiente (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Stuer-Lauridsen *et al.*, 2000).

O “medicamento” é um bem, cujo objectivo é a diminuição das doenças e consequentemente, um aumento da qualidade de vida e um aumento da esperança média de vida (Schwab *et al.*, 2005). Deste modo, é um bem indispensável nas sociedades actuais (Dietrich *et al.*, 2002). Nos Estados Unidos da América, a cada quatro em cinco pacientes são prescritos medicamentos em consulta médica (Daughton, 2003). Na União Europeia, existe um elevado número de fármacos para uso humano, mas, também, existe grande número de substâncias farmacêuticas de uso veterinário (Fent *et al.*, 2006).

No mundo, têm sido detectados dezenas de produtos farmacêuticos de uso humano e veterinário em águas residuais, devido ao consumo global e pela maior sensibilidade dos métodos analíticos (Buser *et al.*, 1998; Ternes 1998; Ternes *et al.*, 1999; Kümmerer, 2001; Kolpin *et al.*, 2002).

O uso humano, veterinário, agrícola e industrial de fármacos é responsável pela sua presença no meio aquático (Jørgensen e Halling-Sørensen, 2000). Contudo, a nível industrial, essa presença de produtos farmacêuticos é, tendencialmente, menor, devido ao elevado custo de produção e às leis governamentais restritas (Jørgensen e Halling-Sørensen, 2000). Por exemplo, medicamentos fora do prazo de validade ou não usados a nível doméstico são frequente e deliberadamente introduzidos na rede de saneamento (Kuspis e Krenzelok, 1996). As estações de tratamentos de águas não eliminam eficazmente muitas substâncias farmacêuticas (Ternes, 1998), o que provoca a sua presença em águas superficiais, subterrâneas e até na água para consumo humano (Kolpin *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2003). Os medicamentos veterinários, tais como os antibióticos, muito usados, por exemplo nos tratamentos de animais de produção, podem ser introduzidos nos sistemas aquáticos próximos (Migliore *et al.*, 1996; Boxall *et al.*, 2004). São também muito utilizados em aquacultura, acabando por serem libertados nos sistemas aquáticos (Holmström *et al.*, 2003).

Muitos fármacos têm tempos de semi-vida curtos, mas apresentam uma exposição crónica na natureza, devido à sua contínua adição ao meio ambiente (Daughton e Ternes, 1999). Apesar das concentrações individuais destas substâncias serem geralmente baixas, uma vez que se trata de substâncias biologicamente activas e, que se encontram geralmente presentes em misturas no meio ambiente, podendo ocorrer

interacções toxicológicas, os efeitos adversos exercidos na componente biótica dos ecossistemas pode ser muito significativo (Brain *et al.*, 2004).

Apesar do aumento das preocupações, em relação ao destino e transporte de diversos fármacos, incluindo medicamentos de uso humano e veterinário, resíduos industriais, hormonas, entre outros (Kolpin *et al.*, 2002), poucos estudos de impacto ambiental em organismos aquáticos não-alvo, foram realizados (Brooks *et al.*, 2003a, b; Cleuvers, 2003; Wilson *et al.*, 2003; Sanderson *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2005, 2006, 2008). A maioria dos testes ecotoxicológicos efectuados para avaliar a toxicidade de substâncias farmacêuticas para organismos aquáticos e o seu impacto nestes ecossistemas, são bioensaios agudos (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Ayscough *et al.*, 2002; Cunningham *et al.*, 2004; Webb 2004a). A implementação de bioensaios crónicos, em organismos aquáticos, nos estudos de impacto ambiental para fármacos de uso humano elaborados pela Agência Europeia do Medicamento (EMA, 2005) e apoiados pela Directiva 2001/83/EC (EC, 2001), resultou dos constantes alertas de diversos organismos e autores (Environment Agency, 2003; Daughton, 2003; Bound e Voulvoulis, 2004; Ferrari *et al.*, 2004; Zuccato *et al.*, 2004b; Emmanuel *et al.*, 2005) e da preocupação com os seus efeitos no ambiente e no Homem, devido à exposição, do meio aquático, a concentrações baixas mas, contínuas de compostos farmacêuticos.

Hoje em dia, os antibióticos constituem um importante grupo de fármacos na medicina moderna. Para além do uso em infecções humanas, também são usados em veterinária, como profilaxia e tratamento de infecções (Hirsch *et al.*, 1999).

O uso excessivo de antibióticos, em animais para consumo humano, pode causar níveis residuais no leite, carne e tecidos, e, conseqüentemente, provocar problemas sérios de saúde pública, tais como resistência das bactérias aos antibióticos e problemas tecnológicos de produção (Romano *et al.*, 2002; Grunwald e Petz, 2003). Por isto, a presença de antibióticos no leite é regulado, tanto nos Estados Unidos da América pela FDA (Food and Drug Administration), como no espaço europeu pelo Conselho de Regulação Europeu (EEC) 2377/90 (Oliveira *et al.*, 2007). Os limites residuais máximos (MRLs) foram estabelecidos para o leite e tecidos (EEC, 1990; FDA, 1999). Por exemplo, no leite bovino, os limites residuais máximos da cefalexina são 100 ng/mL.

Desde os tempos primitivos, que o Homem lida com o aparecimento de doenças infecciosas, principalmente, as responsáveis por epidemias. Desenvolvendo-se diversas teorias e tratamentos para essas infecções, desde Hipócrates, passando por Galeno, Pasteur e Koch, até à era da antibioticoterapia. Foi a descoberta da penicilina por Fleming, responsável pelo avanço terapêutico. Nas últimas décadas do século XX, a criação de novos antibióticos e novas substâncias químicas cresceu a um ritmo acelerado, assim como um maior conhecimento dos mecanismos de acção, indicações

terapêuticas, efeitos secundários, limitações, etc., criando êxitos, mas também problemas muito sérios (Garrett e Moura, 2001).

Hoje em dia, as doenças infecto-contagiosas podem ser tratadas, na sua maioria, devido à existência de um grande número de medicamentos anti-infecciosos de uso clínico. No entanto, devido à multiplicidade de antibióticos, é importantíssimo a selecção correcta deste, para evitar problemas individuais e colectivos. Por isso, deve-se conhecer o microrganismo, das características do antibiótico e do doente. Desta forma, evitam-se superinfecções, sensibilização alérgica, infecções nosocomiais, escolha errada, tratamentos longos (resistências), tratamentos curtos (recidivas), uso de antibióticos em situações não definidas (febres de etiologia desconhecida), defesas imunitárias deficitárias e a automedicação (Osswald, 2001).

As doenças infecciosas podem provocar grande incapacidade física, com processos inflamatórios e infecciosos mais ou menos severos, e, por vezes, hospitalização, levando que as comunidades sociais actuais recorram a estes medicamentos, fazendo com que este grupo fosse, segundo o Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), em 2007, um dos mais consumidos em Portugal (5.º lugar), no grupo de medicamentos comparticipados pelo Serviço Nacional de Saúde (SNS).

2. Dados de Consumo de Medicamentos em Portugal

O consumo de medicamentos, em Portugal, é muito elevado, segundo dados disponibilizados pelo INFARMED. Na Europa, o consumo de algumas substâncias farmacêuticas é superior a 100 toneladas por ano (CSTEE, 2001).

As vendas de especialidades farmacêuticas, em geral, relativas ao mercado do Serviço Nacional de Saúde (SNS), em ambulatório, no período 2003-2007, apresentam um aumento de 7,1%, em número de embalagens vendidas (figura 1) (INFARMED, Estatística do Medicamento, 2003, 2004, 2005, 2006 e 2007).

Os dados referem-se apenas às embalagens vendidas e comparticipadas pelo SNS, não englobando as usadas em meio hospitalar.

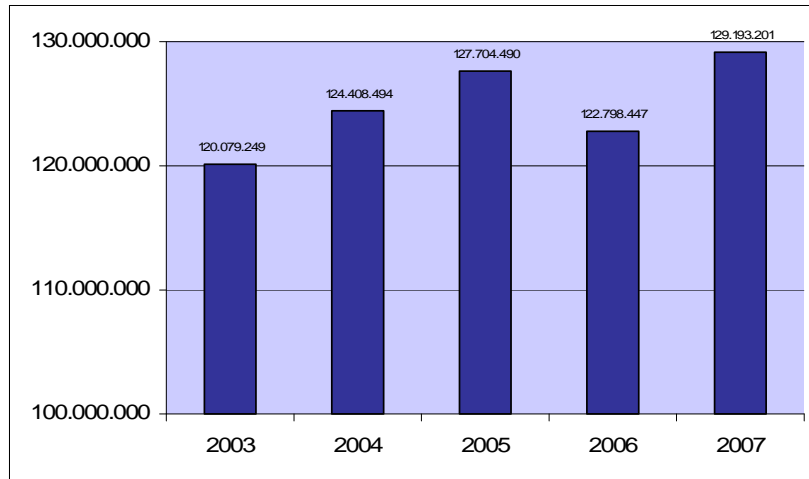


Fig. 1. Número total de embalagens vendidas em ambulatório (2003-2007).
 Fonte: INFARMED, Estatística do Medicamento, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007

O número de embalagens vendidas de medicamentos anti-infecciosos e, em particular, de antibióticos, no período de 2003-2007, em ambulatório, tem sido mais ou menos constante (Figura 2) (INFARMED, Estatística do Medicamento, 2003, 2004, 2005, 2006 e 2007).

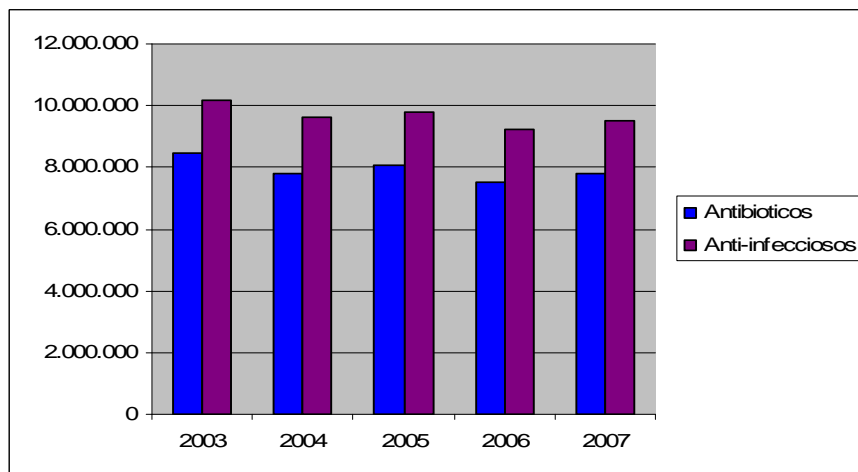


Fig. 2. Número de embalagens vendidas (medicamentos anti-infecciosos/antibióticos) no mercado do SNS (2003-2007)

Fonte: INFARMED, Estatística do Medicamento, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007



Fig. 3. Consumo de antibióticos na Europa.
Fonte: ESAC (2006)

Os países do sul e leste da Europa apresentam um maior consumo do que os países do Norte de Europa e a Rússia (figura 3) (ESAC, 2006).

Em 2006, segundo o ESAC (European Surveillance of Antimicrobial Consumption), foram vendidas em Portugal, 22,75 Dose Diária Definida (DDD) por 1000 habitantes por dia numa população de 8.048.626, em ambulatório e comparticipadas pelo SNS. A Dose Diária Definida é a dose média diária de manutenção para um medicamento, em adultos, usada para a sua principal indicação, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Das quais 2,72 DDD/1000 por dia foram antibióticos denominados por Outros Antibacterianos β -lactâmicos, representando 12%. No entanto, o consumo total de antibióticos diminuiu 7,5% em relação ao ano 2005 (ESAC, 2006).

A quantidade e o tipo de antibióticos, libertados para o meio ambiente, são preocupantes, devido: à contaminação de pessoas e matérias-primas, águas tratadas e reutilizadas para beber, rega e locais lúdicos e ao aumento de bactérias resistentes aos antibióticos. A maioria (30 a 90%) dos antibióticos administrados, aos humanos e aos animais, são excretados pela urina, ainda activos (Rang *et al.* 1999). Predominantemente, os antibióticos são solúveis em água e entram no meio aquático, devido à rede de esgotos, quintas, matadouros e campos agrícolas (Daughton e Ternes, 1999). O uso de antibióticos em gado vivo (uso veterinário) é maior do que o uso humano, e, também, com diferentes funções, por exemplo, como coadjuvante de crescimento (Collingnon, 1999).

O princípio activo cefalexina foi introduzido em 1967 por Eli Lilly & Company, tornando-se o Keflex (Lilly), uma das marcas comerciais mais conhecida (Sneader, 2005).

A forma mais utilizada de cefalexina nos medicamentos de uso humano é a forma ácida (monohidrato) de cefalexina (AHFS, 2006), sendo classificada como um antibiótico β -lactâmico, uma cefalosporina de primeira geração, derivada do ácido 7-amino-cefalosporânico (Garrett e Guimarães, 2001).

A cefalexina está indicada nas infecções provocadas por microrganismos Gram + e Gram - susceptíveis. São indicados nas infecções urinárias, nas infecções respiratórias, amigdalites, faringites e infecções da pele e tecidos moles, por exemplo, celulite. Mas a sua principal indicação terapêutica é como preventivo da ocorrência da infecção de ferida cirúrgica, administrado 48h antes da cirurgia. Possui pouca actividade sobre *Haemophylus influnzae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Garrett e Guimarães, 2001).

Não está indicada em meningites por não atravessar a barreira hematoencefálica (Garrett e Guimarães, 2001). Está contra-indicada em doentes com porfíria e em doentes com história de hipersensibilidade às penicilinas (10% risco de reacção de hipersensibilidade). Não administrar concomitantemente com probenecida, devido à inibição da secreção tubular das cefalosporinas, aumentando as concentrações séricas (Garrett e Guimarães, 2001).

É absorvida pelo tracto gastrointestinal, por isso não deve ser administrar juntamente com alimentos, para diminuir a sua absorção (Garrett e Guimarães, 2001; AFHS, 2006). Atravessa a barreira placentária e pode-se encontrar, em pequenas doses, no leite materno (Garrett e Guimarães, 2001). Também, distribui-se, facilmente, pelos líquidos sinovial e pericárdico. O tempo de semi-vida da cefalexina encontra-se entre 0,7-1,2H. Esta é pouco metabolizada, sendo 70-80% eliminada (urina) na forma intacta. A eliminação é feita por filtração glomerular e secreção tubular (Garrett e Guimarães, 2001). As cefalosporinas são pouco tóxicas, contudo podem surgir alguns transtornos gastrointestinais (náuseas, vômitos, diarreia), manifestações de reacção de hipersensibilidade (erupções cutâneas, urticária, prurido) e, menos frequentemente, febre, artralguas e anemia hemolítica. A probabilidade de ocorrência de reacção anafiláctica grave é muito reduzida e, apesar do núcleo químico das cefalosporinas ser diferente das penicilinas, existe 10% de risco de reacção alérgica grave (Garrett e Guimarães, 2001).

Em 2005, a cefalexina ocupou o segundo lugar dos antibióticos mais prescritos na Austrália (Constanzo *et al.*, 2005). Em 2008, a cefalexina registou o maior número de prescrições, mais de 25 milhões, em relação a outras cefalosporinas, referindo apenas os genéricos, e com um volume de vendas de 255 milhões de dólares (FDA, 2008).

A cefalexina é, também, um medicamento usado em veterinária. Sendo, o sal sódico de cefalexina, utilizado, por via intramuscular, no tratamento de infecções de gado bovino, ovino e suíno. E a forma monohidratada de cefalexina, no tratamento de mastites em vacas lactantes (EMEA, 2000).

Na Austrália, verificou-se uma elevada concentração (2000 ng/L) de cefalexina em águas residuais e mesmo, após o tratamento dos efluentes, este antibiótico foi detectado a 500m do local da descarga (Constanzo *et al.*, 2005).

Cefalexina – Ácido (6*R*,7*R*)-7-[(2*R*)-2-amino-2-fenilacetamido]-3-metil-8-oxo-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]-oct-2-eno-2-carboxílico (CAS 15686-71-2, SIGMA) (Figura 1) é solúvel em cerca 100 partes de água, hidróxido de amónia (50 mg/mL) e, praticamente, insolúvel em álcool, clorofórmio e éter (SIGMA).

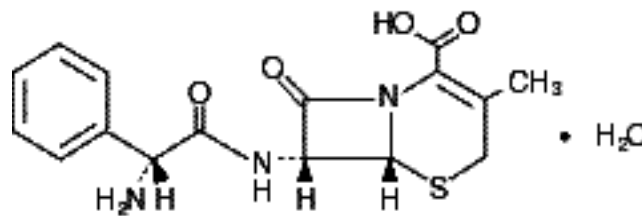


Fig. 4. Estrutura molecular da Cefalexina
Fonte: SIGMA, 2006.

Um dos animais mais utilizados em Ecotoxicologia aquática é *Daphnia magna* Straus, clone A (sensus Baird *et al.*, 1989a). É um invertebrado de água doce, vulgarmente denominado pulga de água. É um microcrustáceo planctónico, de 5 a 6 mm de comprimento, que actua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática, alimentando-se por filtração de material orgânico em suspensão. A descendência de fêmeas é produzida sob condições óptimas, tais como a temperatura (20°C) e o fotoperíodo (luz 16h e escuridão de 8 h), baixa aglomeração e alimento adequado. Inversamente, a produção de machos de *D. magna* parece ser despoletado por alterações ambientais, tais como: o fotoperíodo e a temperatura reduzidos e, também, pela elevada densidade da cultura (Korpelainen, 1986; Hobaek e Larsson, 1990).

O organismo foi seleccionado para esta pesquisa por ser amplamente conhecido, facilmente cultivado e mantido em laboratório (Koivisto, 1995) e por ter reprodução partenogenética, obtendo uma variabilidade genética relativamente baixa (Dodson e Frey, 1991). Apresentam um ciclo de vida curto e uma elevada taxa de fecundidade (Antunes, 2001). É, também, um dos representantes mais importantes de zooplâncton e,

consequentemente, da cadeia alimentar aquática, e tem uma elevada sensibilidade aos xenobióticos, em relação a outros invertebrados de água doce (Mark e Solbé, 1998; Hanazato, 2001). Estes organismos têm sido usados, em larga escala, em estudos de toxicidade de curta e longa exposições para avaliação dos efeitos de diversos químicos na sua sobrevivência, crescimento e reprodução (Martinez-Jerónimo *et al.*, 2000; Knops *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2004a, b; Flaherty e Dodson, 2005) e, como consequência dos efeitos causados neste organismo, o meio ambiente envolvente e os organismos alimentados por este, podem ser afectados (Flaherty e Dodson, 2005). São, também, uma alternativa ao uso de mamíferos nos estudos preliminares sobre a toxicidade mortal em novas substâncias químicas (Guilhermino, 2000).

O objectivo central do presente trabalho foi estudar os efeitos agudos e crónicos induzidos pela substância cefalexina em *Daphnia magna*. Para o efeito, foram efectuados dois bioensaios agudos, utilizando a morte como critério de toxicidade, e um bioensaio crónico, utilizando a reprodução e o crescimento como critérios de efeito tóxico.

A presente dissertação divide-se em três capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma introdução geral sobre o tema, o objectivo e a estrutura da dissertação. O segundo capítulo é a explanação das respostas agudas e crónicas à Cefalexina, sendo o terceiro capítulo formado por uma discussão geral e o conjunto total das referências bibliográficas que serviram para a elaboração da dissertação e que foram citadas em cada capítulo. Estes capítulos apresentam-se sob a forma de artigos científicos.

Capítulo II

Efeitos Agudos e Crônicos da Cefalexina no Crustáceo Cladóceros *Daphnia magna*

Fernanda Marques^{1,2}, Maria José Pinto da Costa², Lúcia Guilhermino^{1,3}

¹ CIMAR-LA/CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Laboratório de Ecotoxicologia, Rua dos Bragas 289, 4050-123 Porto, Portugal

² ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Departamento do Mestrado em Medicina Legal, Lg. Prof. Abel Salazar 2, 4099-003 Porto, Portugal

³ ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Departamento de Estudo de Populações, Laboratório de Ecotoxicologia, Lg. Prof. Abel Salazar 2, 4099-003 Porto, Portugal

Resumo

A contaminação ambiental causada por produtos farmacêuticos, libertados para o meio ambiente, principalmente, no meio aquático, tem vindo a aumentar nos últimos anos. O presente estudo analisa os efeitos agudos e crónicos do antibiótico cefalexina (antibacteriano β -lactâmico, cefalosporina de primeira geração) nos parâmetros do ciclo de vida (sobrevivência, reprodução e crescimento) do crustáceo cladóceros *Daphnia magna*. Nos bioensaios agudos, não se verificou qualquer mortalidade, após 48h de exposição à cefalexina. Nos bioensaios crónicos, os parâmetros reprodutivos foram avaliados: número total de juvenis, número de juvenis viáveis e número de ovos abortados, para determinar os efeitos a longo prazo, mas, também foram verificados o crescimento e a mortalidade das mães. As dáfnias sobreviveram até ao fim do teste crónico (21 dias).

Palavras-chave: Antibióticos, cefalexina, ecossistemas aquáticos, *Daphnia magna*, toxicidade aguda e crónica.

1. Introdução

Na actualidade, a contaminação ambiental é encarada como um potencial factor de risco para a saúde humana. Nas últimas décadas, a preocupação com o meio ambiente aquático tem aumentado, tanto na Europa (EU), como na América do Norte (Daughton e Ternes, 1999), devido à existência de pesquisas e relatórios sobre produtos farmacêuticos e os seus efeitos no meio ambiente e, também, pela natureza ubíqua destes (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Kolpin *et al.*, 2002; Herberer, 2002). Os fármacos têm como função um efeito biológico e, como tal, têm comportamentos físico-químicos característicos dos xenobióticos (por exemplo, atravessar membranas celulares) e, também, mantêm-se bioactivos, pelo menos, até terem efeito terapêutico (Halling-Sørensen *et al.*, 1998).

O risco de efeitos adversos na saúde humana, devido à exposição de produtos farmacêuticos no meio ambiente, é baixo, segundo Christensen (1998). Apesar de que, os potenciais efeitos ambientais, são, na maioria, desconhecidos (Jørgensen e Halling-Sørensen, 2000). Contudo, 10-15% do volume de fármacos analisados, em águas residuais, são de natureza tóxica (EU, 2001b; Sanderson *et al.* 2003).

Cefalexina é uma cefalosporina semi-sintética de 1.^a geração com propriedades similares à cefalotina e à cefazolina (SIGMA, 2006). Tem como alvo as proteínas de ligação das penicilinas dos *Bacillus licheniformis* (Lepage *et al.*, 1995) também, afecta a síntese da membrana celular das bactérias (Gullbrand *et al.*, 1999) e, em algumas cianobactérias, inibe a actividade da nitrogenase (El-Shehawey *et al.*, 2003). Cefalexina é usada tanto em medicamentos humanos, como em medicamentos de uso veterinário (EMEA, 2000).

A falta de dados na literatura referentes aos efeitos crónicos da exposição aos fármacos é preocupante (Fent *et al.*, 2006) e este estudo espera contribuir para um maior conhecimento neste assunto tão importante.

O crustáceo cladóceros *Daphnia magna* é muito utilizado em estudos toxicológicos e ecotoxicológicos (De Samber *et al.*, 2008), devido à sua sensibilidade a diferentes tóxicos, ao seu ciclo de vida curto, à sua reprodução assexuada por partenogénese (baixa variabilidade genética) e ao seu fácil cultivo e manuseamento em laboratório (Peters e De Bernardi, 1987; Koivisto, 1995; Barata *et al.*, 2000; Flaherty e Dodson, 2005).

O presente estudo tem, como objectivo, avaliar efeitos agudos (mortalidade) e crónicos (sobrevivência, crescimento e reprodução) da cefalexina em cladóceros (*Daphnia magna*).

2. Material e Métodos

2.1. Cultura de *Daphnia magna*

Neste trabalho, foi utilizada *Daphnia magna* Straus, nomeadamente o clone A (sensus Baird *et al.* 1989a), que tem vindo a ser mantido no laboratório de Ecotoxicologia do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental há mais de dez anos. Os animais utilizados foram cultivados individualmente em frascos de vidro (200 mL) com 100 mL de água dura ASTM (ASTM, 1980), com vitaminas, renovada de dois em dois dias. Foram alimentados diariamente com a alga verde dulçaquícola *Chlorella vulgaris* com 3×10^5 células/mL por dia e por indivíduo, obtida a partir de culturas laboratoriais desta espécie. Forneceu-se ainda um suplemento orgânico extraído de algas marinhas *Ascophyllum nodosum* Scorpiodes (Baird *et al.*, 1989b) (ração diária 0,4 mL de extracto por cada 100 mL). As dáfias foram mantidas numa sala com temperatura ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodos controlados (16 horas de luz: 8 horas de escuro). Os recém-nascidos da terceira ninhada foram usados para reiniciar novas culturas. Nestas condições, as dáfias reproduzem-se por partenogénese cíclica, permitindo reduzir a variabilidade de origem genética, que pode interferir com os resultados (OCDE, 1998).

2.2. Bioensaios agudos

Os ensaios agudos foram iniciados com juvenis da terceira à quinta ninhadas, com mais de 6 horas e menos de 24 horas de idade (Barata e Baird, 1998).

O teste teve a duração de 96 horas, tendo seguido em termos gerais a norma 202 da OCDE (OCDE, 2004), e sido realizados em sala com fotoperíodo e temperatura controlados, conforme indicado anteriormente. Não foi fornecido alimento durante o teste e o critério de efeito de mortalidade após 24 horas e 48 horas de exposição ao agente tóxico, reconhecida pela imobilidade durante 15 segundos, sob estímulo luminoso.

Os valores de concentração letal mediana (CL50), ou seja, a concentração do agente tóxico que provocou 50% de mortalidade na população estudada nas condições específicas do teste.

As soluções de teste foram preparadas por diluições sucessivas em água dura ASTM de uma solução de cefalexina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) preparada, no próprio dia, em água ultra-pura. Em cada ensaio, foram testadas cinco concentrações de cefalexina (62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg/L no 1.º ensaio; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 mg/L

no 2.º ensaio), sendo o controlo constituído por água dura ASTM. As dáfnias foram expostas, em grupo de cinco animais, por cada recipiente contendo 50 mL de solução-teste (ou ASTM no caso do controlo). Para cada tratamento, 4 grupos de animais foram utilizados, totalizando 20 dáfnias por tratamento. Às 0, 24 e 48 horas, foram determinados os valores da temperatura, pH, oxigénio dissolvido e condutividade das soluções-teste para validação do ensaio, utilizando uma sonda Multi 340i/SET (Germany). O número de indivíduos mortos (imóveis) foi determinado às 24, 48, 72 e 96 horas.

2.3. Bioensaios crónicos

Os ensaios crónicos foram iniciados com juvenis da terceira à quinta ninhadas, com mais de 6 horas e menos de 24 horas de idade (Barata e Baird, 1998).

O teste teve a duração de 21 dias, tendo seguido em termos gerais a norma 211 da OCDE (OCDE, 1998), e sido realizados em sala com fotoperíodo e temperatura controlados, conforme indicado anteriormente. Foi fornecido alimento e vitaminas, diariamente, durante o teste. As soluções de teste foram preparadas por diluições sucessivas em água dura ASTM de uma solução de cefalexina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) preparada, no próprio dia, em água ultra-pura. Em cada ensaio, foram testadas seis concentrações de cefalexina (7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250 mg/L), sendo o controlo constituído por água dura ASTM. As dáfnias foram expostas, individualmente, em cada recipiente contendo 50 mL de solução-teste (ou ASTM no caso do controlo). Para cada tratamento, 10 animais foram utilizados. O meio foi renovado três vezes por semana e foram medidos os valores da temperatura, pH, oxigénio dissolvido e condutividade das soluções-teste para validação do ensaio, utilizando uma sonda Multi 340i/SET (Germany), em ambos os meios (novo e antigo).

Os recipientes foram verificados, diariamente, para detecção de animais mortos e a descendência (número total de juvenis, juvenis móveis e ovos abortados) foi contada. As carapaças foram recolhidas para posterior medição num estereoscópio (Nikon SMZ800).

Os parâmetros reprodutivos analisados foram: o número total de juvenis, o número de juvenis imóveis, o número de ovos abortados e a idade da primeira ninhada. Para verificação de possíveis efeitos no crescimento das dáfnias, o crescimento total foi calculado, através da diferença entre a última e a primeira carapaça libertadas durante o teste. O crescimento anterior à primeira reprodução foi calculado através da diferença da carapaça libertada após a primeira geração e a primeira carapaça libertada. O crescimento verificado durante a reprodução foi calculado através da diferença entre a última carapaça libertada e a carapaça libertada na primeira reprodução. O crescimento foi verificado através da medição do primeiro exopodito da segunda antena, devido à

importante correlação com o tamanho total do corpo e pela medição ser mais precisa (Soares, 1989).

2.4. Análise estatística

Nestes ensaios, determinaram-se ainda os valores de concentração de efeito não observado (CENO), correspondendo à concentração testada que não induziu mortalidade superior a 10%, e da concentração de efeito observado (CEO), correspondendo à concentração mais baixa testada que induziu uma mortalidade superior a 10%.

No teste crônico, para cada parâmetro, os diferentes grupos foram comparados, recorrendo ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis. O teste Mann-Whitney ou teste U, sempre que se detectam diferenças significativas entre tratamentos para determinar os valores de CENO e CEO. O nível de significância foi de 0,05. O programa estatístico SPSS, versão 16.0, foi usado para toda a análise estatística.

3. Resultados

3.1. Bioensaios agudos

A variação da temperatura, pH, oxigénio dissolvido e condutividade durante os testes estão apresentados no Anexo 1, Tabela 3 e permitem a validação dos bioensaios. Os valores de LC50, CENO e CEO nos bioensaios agudos não foram possíveis determinar pela não existência de mortalidade dos juvenis.

3.2. Bioensaios crónicos

A variação da temperatura, pH, oxigénio dissolvido e condutividade durante os testes estão apresentados no Anexo 2, Tabela 4 e permitem a validação dos bioensaios. Os bioensaios crónicos cumpriram a norma 211 da OCDE (OCDE, 1998).

Nos bioensaios crónicos, não existiu mortalidade.

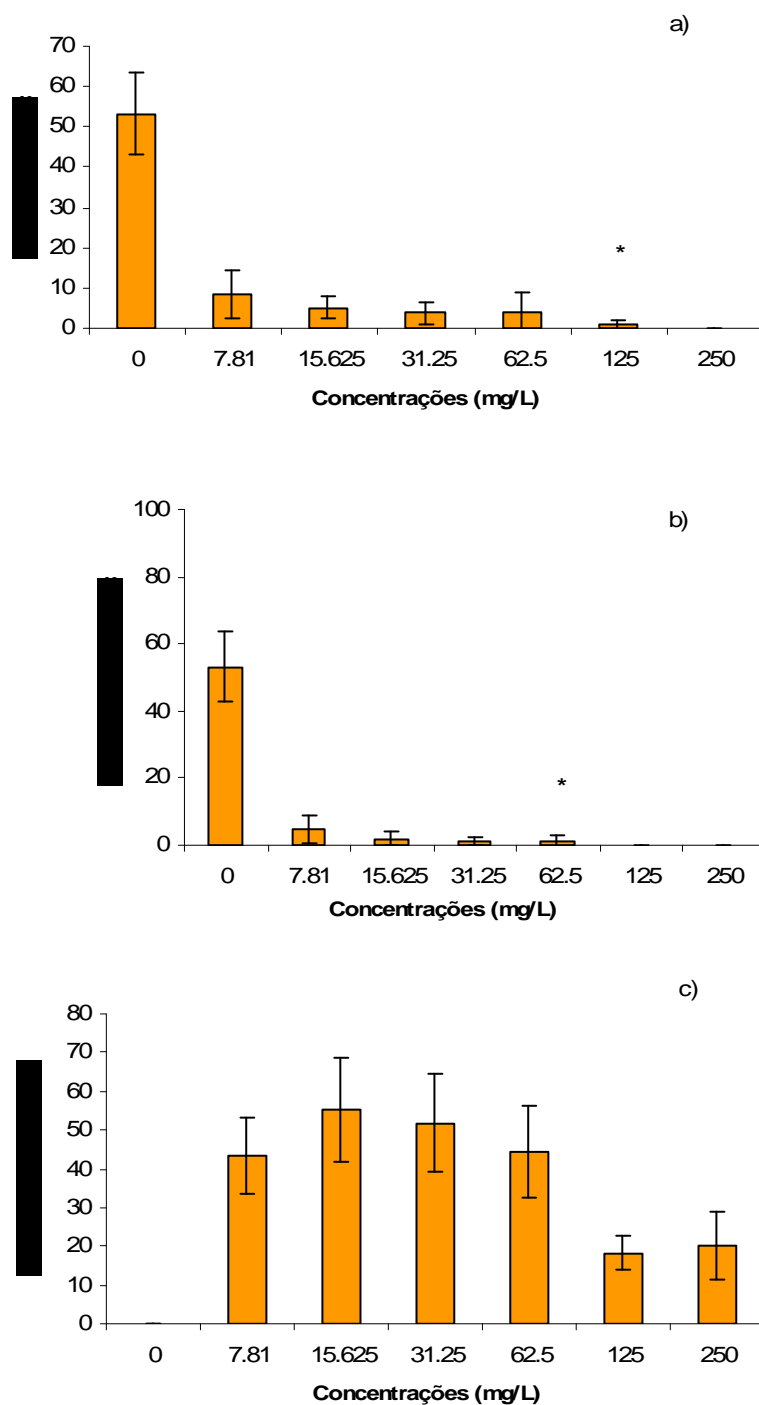


Figura 1: Média de juvenis produzidos (a), juvenis móveis (b) e ovos abortados (c) por fêmea durante os 21 dias de exposição de *Daphnia magna* à cefalexina. As barras representam o desvio-padrão e * indica as diferenças significativas relativamente ao grupo-controlo.

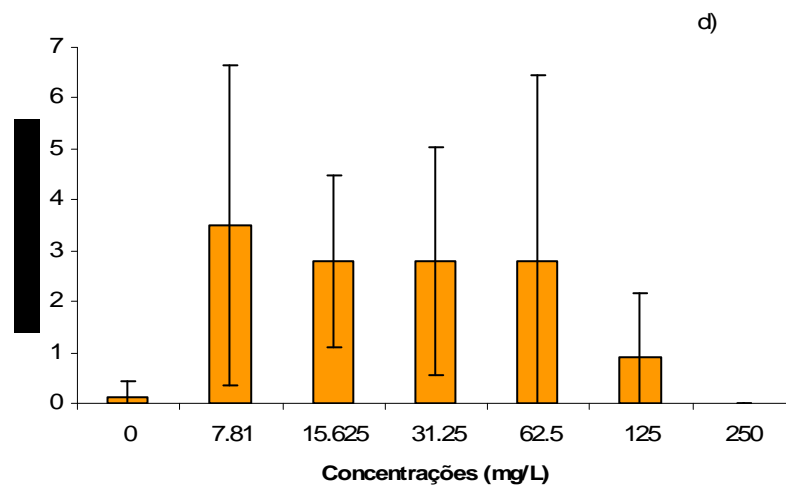


Figura 2: Média de juvenis imóveis (d) por fêmea durante os 21 dias de exposição de *Daphnia magna* à cefalexina. As barras representam o desvio-padrão e * indica as diferenças significativas relativamente ao grupo-controlo.

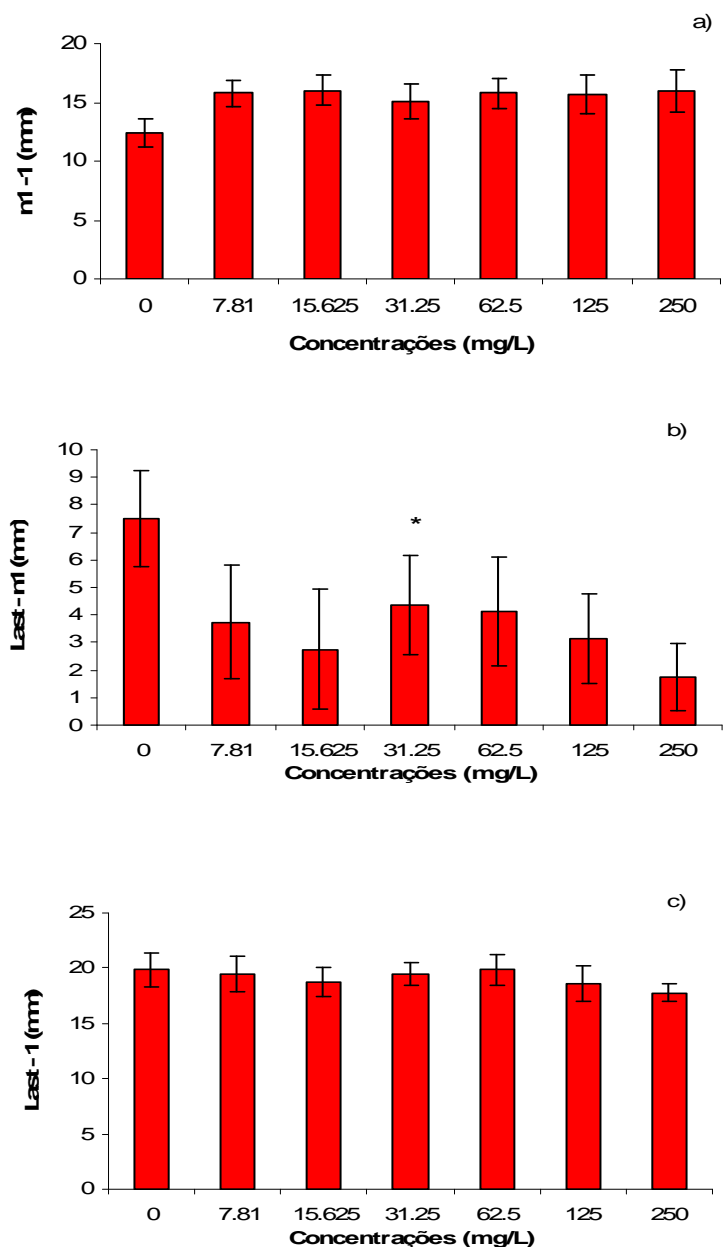


Figura 3: Média do crescimento das dáfias antes do nascimento da primeira ninhada (a), crescimento entre o nascimento da primeira ninhada e o final do teste (b) e o crescimento total (c) por fêmea durante os 21 dias de exposição de *Daphnia magna* à cefalexina. As barras representam o desvio-padrão e * indica as diferenças significativas relativamente ao grupo-controlo. 1 – correspondente à primeira carapaça libertada; n1 – correspondente à carapaça libertada após o nascimento da primeira ninhada; Last – correspondente à última carapaça libertada.

Tabela 1: Valores de CENO e CEO de cefalexina para *Daphnia magna* a 20°C durante os 21 dias do bioensaio crónico. 1 – correspondente à primeira carapaça libertada; n1 – correspondente à carapaça libertada após o nascimento da primeira ninhada; Last – correspondente à última carapaça libertada; – - não determinado.

		20 °C – 21.º dia	
		CENO	CEO
Fecundidade			
Total		62,5	125
Móveis		<7,8	7,8
Ovos abortados		<7,8	7,8
Imóveis		<7,8	7,8
Crescimento			
n1-1		<7,8	7,8
Last-n1		<7,8	7,8
Last-1		250	–

4. Discussão

Nos ensaios ecotoxicológicos efectuados, não foram detectadas evidências de efeitos agudos (mortalidade), mas foram detectados efeitos crónicos no cladóceros *Daphnia magna*, tais como: redução do número de juvenis nascidos, aumento de juvenis imóveis e de ovos abortados em concentrações iguais ou superiores a 125 mg/L a 20°C. Sendo preocupante, porque é um antibiótico usado tanto em humanos, como de uso veterinário (EMEA, 2000).

Nos bioensaios crónicos, a concentração mais baixa na qual se detectou efeito, foi a de 125 mg/L, no parâmetro fecundidade (total). Todos os grupos (móveis, ovos abortados, imóveis, n1-1 e last-n1) foram diferentes do grupo-controlo, por isso, torna-se necessário repetir os bioensaios em concentrações mais baixas. O crescimento total não foi afectado, porque não apresenta diferenças entre os grupos e o controlo. Por isso, será necessário repetir os ensaios ecotoxicológicos em concentrações mais altas.

5. Conclusão

A cefalexina é um antibiótico ainda utilizado a nível mundial, tanto em veterinária como em humanos. Este estudo não demonstrou efeitos na sobrevivência e no crescimento do crustáceo cladóceros *Daphnia magna*, mas verificou algumas alterações na reprodução, nomeadamente no número de juvenis móveis e no número de ovos abortados. As concentrações testadas são mais elevadas do que as encontradas no meio ambiente aquático, mas devemos ter em conta de que os organismos estão expostos a misturas de diferentes compostos, podendo ocorrer efeitos sinérgicos.

6. Referências Bibliográficas

American Society for Testing and Materials (ASTM), 1980. Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians, Report E-729-80. ASTM, Philadelphia.

Baird, D. J., Barber, I., Bradley, M., Callow, P., Soares, A. M. V. M., 1989a. The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia* **188/189**:403-406.

Baird, D. J., Soares, A. M. V. M., Girling, A., Barber, I., Bradley, M., Callow, P., 1989b. The Long-Term Maintenance of *Daphnia magna* Straus for Use in Ecotoxicity Tests: Problems and Prospects. In: Lokke, H., Tyle, H., Bro-Rasmussen, F. (Eds.), Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology. Lyngby, 144-148.

Barata, C., Baird, D. J., 1998. Phenotypic plasticity and constancy life-history traits in laboratory clones of *Daphnia magna* effects of neonatal length. *Functional Ecology* **12**:442-452.

Barata, C., Baird, D. J., Miñarro, A., Soares, A. M. V. M., 2000. Do genotype responses always converge from lethal to non-lethal toxicant exposure levels? Hypothesis tested using clones of *Daphnia magna* Straus. *Toxicology and Chemistry* **19**:2314-2322.

Brain, R. A., Jonhson, D. J., Richards, S. M., Sanderson, H., Sibley, P. K., Solomon, K. R., 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**:371-382.

Brain, R. A., Jonhson, D. J., Richards, S. M., Hanson, M. L., Sanderson, Lam, M. W., Young, C., Mabury, S. A., Sibley, P. K., Solomon, K. R., 2004. Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicology* **70**:23-40.

Christensen, F. M., 1998. Pharmaceuticals in the environment – A Human Risk? *Regulament Toxicology and Pharmacology* **28**:212-221.

Daughton, C. G., Ternes, T. A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspective* **107**:907-938.

De Samber, B., Evens, R., De Schamphelaere, K., Silversmit, G., Masschaele, B., Schoonjans, T., Vekemans, B., Janssen, C. R., Van Hoorebeke, L., Szalóki, I., Vanhaecke, F., Falkenberg, G., Vincze, L., 2008. A combination of synchrotron and laboratory X-ray techniques for studying tissue-specific trace level metal distributions in *Daphnia magna*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **23**:829-839.

El-Shehawy, R., Bergman, B., 2003. Inhibition of cell division blocks the synthesis of the second nitrogenase (Nif2) in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEMS Microbiology Letters* **219**:23-25.

EMEA, 2000. Cefalexin – summary report. Committee for veterinary medicinal products. UK: Veterinary Medicines Evaluation Unit. (July 1999 EMEA/MRL/627/99).

EU, 2001b. White paper. Strategy for a future chemicals policy, COM (2001) 88 final. Disponível em: http://europa.eu.int/comm/environment/chemicals/0188_en.pdf.

Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* **76**:122–159.

Ferreira, C. S. G., Nunes, B. A., Henriques-Almeida, J. M. M., Guilhermino, L., 2007. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **67**:452-458.

- Finney, D. J.**, 1971. *Probit Analysis*, 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Flaherty, C. M., Dodson, S. I.**, 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth and reproduction. *Chemosphere* **61**:200-207.
- Guilhermino, L., Sobral, O., Chastinet, C., Ribeiro, R., Gonçalves, F., Silva, M. C., Soares, A. M. V. M.**, 1999. A *Daphnia magna* First-Brood Chronic Test: Na Alternative to the Conventional 21-Day Chronic Bioassay? *Ecotoxicology and Environmental Safety* **42**:67-74.
- Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M. C., Soares, A. M. V. M.**, 2000. Acute Toxicity Test with *Daphnia magna*: An Alternative to Mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety* **46**:357-362.
- Gullbrand, B., et al.**, 1999. On the origin of branches in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**:6607-6614.
- Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., Jørgensen, S. E.**, 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* **36**:357-393.
- Heberer, T.**, 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* **131**:5-17
- Jørgensen, S. E., Halling-Sørensen, B.**, 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere* **40**:691-699.
- Koivisto, S.**, 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution* **90**:263-267.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T.**, 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology* **36**:1202-1211.
- Lepage, S., et al.**, 1995. Kinetic properties of the *Bacillus licheniformis* penicillin-binding proteins. *Biochemistry Journal* **309**:49-53.

Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2006. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere* **62**:581-594.

OECD, 1998. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. OCDE Guideline for Testing of Chemicals, 1-21.

OECD, 2004. Test No. 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. OCDE Guideline for Testing of Chemicals, 1-12.

Peters, R. H., De Bernardi, R. (Eds), 1987. *Memorie Dell'Instituto Italiano di Idrobiologia Dott. Marco de Marchi, Volume 45, Daphnia.* Consiglio Nazionale delle Riccerche, Instituto Italiano di Idrobiologia, Verbania, Pallanza.

Sanderson, H., Johnson, D. J., Wilson, C.J., Brain, R. A. Solomon, K. R., 2003. Probabilistic hazard assessment of environmental occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicology Letters*, **144**:383-395.

SIGMA, 2006a. Folha de Dados de Segurança do Produto (Cephalexin hydrate). Sigma-Aldrich Sucursal em Portugal.

SIGMA, 2006b. C4895 Cephalexin hydrate – Properties (Solubility) Sigma-Aldrich, St. Louis – Missouri, United States of America. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/C4895>

Sneider, W., 2005. Cephalosporin analogous. In: *Drug discovery: a history.* New York. Wiley: 324. ISBN 0-471-89980-1.

Soares, A. M. V. M., 1989. Clonal Variation in Life-History Traits in *Daphnia magna* Straus (*Crustacea, Cladocera*). Implications for Ecotoxicology. Ph.D. thesis. University of Sheffield, Sheffield.

Capítulo III

Discussão Geral

