

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM SANEAMENTO E**  
**MEIO AMBIENTE**

**MONOGRAFIA DE FINAL DE CURSO**

**ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COMO**  
**FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DE**  
**EFLUENTES CONTAMINADOS COM**  
**FÁRMACOS: UMA REVISÃO**

**Raquel Sampaio Jacob**

**Belo Horizonte**

**2011**

**Raquel Sampaio Jacob**

**Ensaio Ecotoxicológico como Ferramenta para  
Avaliação de Efluentes Contaminados com  
Fármacos: Uma Revisão**

Monografia apresentado ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Saneamento e Meio Ambiente.

Área de concentração: Controle Ambiental na Indústria

Orientador: Profa. Dra. Liséte Celina Lange

Co-orientador: Msc. Lucilaine Valéria de Souza Santos

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2011

## **AGRADECIMENTOS**

A todos que contribuíram para a construção e realização deste trabalho, fica expressa aqui a minha imensa gratidão, especialmente:

À Professora Liséte Celina Lange, pela orientação e, sobretudo, pelo carinho com que me conduziu nessa etapa e pela disposição em continuar me acompanhando em um novo e estimulante capítulo da minha vida, o mestrado.

À minha co-orientadora, Lucilaine Valéria de Souza Santos, pelo incentivo, solicitude e paciência com que dividiu comigo seu projeto de doutorado e seus preciosos conhecimentos.

Aos professores da especialização, por haverem somado e ensinado tanto, sempre dispostos a dedicar um pouco do seu tempo a mim e minhas intermináveis dúvidas.

Aos velhos amigos, que continuam presentes, acompanhando animados cada passo de minha vida.

Aos meus colegas de classe, pelo carinho, rica troca de experiências e oportunidade de convivência.

Aos amigos da PUC Minas, que foram inestimáveis durante esse período, auxiliando para que eu tivesse força e calma para superar os novos desafios.

Ao Erick, pela dedicação, companheirismo e paciência com que me acompanhou durante mais um ano.

Aos meus irmãos, pelo auxílio e momentos de descontração.

Aos meus pais, pelo incentivo e amor incondicional.

*“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder  
o entusiasmo.”*

*Winston Churchill*

## RESUMO

Uma grande quantidade de fármacos de diferentes classes é consumida anualmente em todo o mundo. Estes compostos farmacêuticos incluem antiinflamatórios, antipiréticos, analgésicos, reguladores lipídicos, antibióticos, antidepressivos, agentes quimioterápicos, contraceptivos e outros mais. Essas substâncias químicas, uma vez dispostas ou excretadas por residências, hospitais ou indústrias, tanto em sua forma original quanto em forma de metabólitos, muitas vezes permanecem estáveis após tratamentos convencionais ou mesmo avançados. A ecotoxicologia aquática é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos, como fármacos. Seus instrumentos de análise são capazes de responder preditivamente à toxicidade de substâncias químicas, sinalizando os potenciais ecotoxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma revisão bibliográfica a cerca dos ensaios ecotoxicológicos e sua utilização enquanto ferramenta para avaliação de efluentes contaminados com fármacos. Na realização da busca bibliográfica dirigiu-se aos indexadores Google Acadêmico (Google Scholar), SciELO (Scientific Eletronic Library On-line), Web of Science, Web of Knowledge, sobretudo, através do Portal de Periódicos da CAPES. Nessas circunstâncias, procedeu-se com a caracterização de efluentes contaminados com fármacos e as importantes conseqüências ecotoxicológicas desse tipo de poluição, acompanhada da discussão dos métodos de remediação e suas limitações. Nesse sentido, os testes de toxicidade – crônica e aguda – são de grande importância. Amplamente utilizados para diversos fins, esses testes levam em consideração o sinergismo ou antagonismo entre substâncias químicas, mensurando seus respectivos efeitos nos mais diversos ecossistemas. No Brasil, a regulamentação dessas análises acontece através da Resolução CONAMA 357/05 e Minas Gerais acompanha através da COPAM/CERH-MG 01/08. Além disso, as normas da ABNT normalizam esses testes, facilitando sua reprodução em todo o país. Os resultados do trabalho apontam para a importância do monitoramento da contaminação dos corpos d'água por fármacos, tendo como aliado os testes ecotoxicológicos.

**Palavras chave:** Ecotoxicologia; testes ecotoxicológicos; toxicidade aguda; toxicidade crônica; contaminação por fármacos.

## ABSTRACT

A lot of different classes of pharmaceutical drugs are consumed annually worldwide. They include anti-inflammatory, antipyretics, analgesics, lipid regulators, antibiotics, antidepressants, chemotherapy agents, contraceptives and more. These chemicals, once excreted by residences, hospitals and industries, both in its original form and as metabolites, very often remain stable after conventional or even advanced treatments. Aquatic ecotoxicology is the science which has emerged to help in the fight against water bodies contaminated with toxic compounds such as drugs. Its analysis tools are capable of predicting the toxicity of chemicals, signaling the ecotoxicological potential and its mechanisms of action in living organisms. The aim of this study is to develop a literature review about ecotoxicological testing and its use as an instrument to evaluate drug contaminated wastewater. Regarding to the literature basis, it was addressed to the following indexes: Google Scholar, SciELO (Scientific Electronic Library Online), Web of Science, Web of Knowledge and mainly CAPES Periodicals Portal. By this approach, it was performed the characterization of drug contaminated wastewater, as well as the important ecotoxicological consequences of such pollution, followed by the discussion of remediation methods and their limits. In this sense, the toxicity tests – acute and chronic – are of great significance. These widely used tests take into account the synergism or antagonism involving chemicals, measuring up their effects in a range of ecosystems. Particularly in Brazil, the guidelines of these analyses are given by the decree ‘Resolução CONAMA 357/05’ and the state of Minas Gerais follows the state decree ‘COPAM/CERH-MG 01/08’. In addition, ABNT rules standardize these tests in order to facilitate its reproduction throughout the country. The results of the study point to the relevance of monitoring the drug contamination of water bodies using the ecotoxicological tests.

**Keywords:** Ecotoxicology; ecotoxicology tests; acute toxicity; chronic toxicity; pharmaceuticals contamination.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>ABNT</b>	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração Efetiva Média
<b>CENO</b>	Concentração de Efeito Não Observado
<b>CEO</b>	Concentração de Efeito Observado
<b>CERH</b>	Conselho Estadual de Recursos Hídricos
<b>CETESB</b>	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração Letal Média
<b>CONAMA</b>	Conselho Nacional de Meio Ambiente
<b>COPAM</b>	Conselho de Política Ambiental
<b>D.N</b>	Deliberação Normativa
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose Letal Média
<b>ETE</b>	Estação de Tratamento de Esgoto
<b>g</b>	Grama
<b>h</b>	Hora
<b>ICSU</b>	Committee of International Council of Scientific Unions
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
<b>L</b>	Litro
<b>mg</b>	Miligrama
<b>ng</b>	Nanograma
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>POA</b>	Processos Oxidativos Avançados
<b>SciELO</b>	Scientific Eletronic Library On-line
<b>SMA</b>	Secretaria de Meio Ambiente
<b>USEPA</b>	United States Environmental Protection Agency
<b>UV</b>	Ultra Violeta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1 Objetivo Geral .....	12
2.2 Objetivos Específicos .....	12
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>13</b>
<b>4 CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTES CONTAMINADOS COM FÁRMACOS ...</b>	<b>14</b>
4.1 Efeitos tóxicos .....	15
4.2 Métodos de tratamento para remoção de fármacos .....	18
4.3 Antibióticos: um caso especial .....	20
<b>5 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS .....</b>	<b>22</b>
5.1 Tipos de testes ecotoxicológicos .....	22
5.1.1 <i>Teste de toxicidade aguda</i> .....	23
5.1.2 <i>Teste de toxicidade crônica</i> .....	25
5.2 Escolha do organismo-teste .....	26
5.3 Relação dose-resposta.....	27
<b>6 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS: ASPECTOS LEGISLADOS E PRÁTICAS VIGENTES .....</b>	<b>30</b>
6.1 Aspectos legislados .....	30
6.2 Prática vigente .....	32
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>36</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Uma grande quantidade de fármacos de diferentes classes é consumida anualmente em todo o mundo. Estes compostos farmacêuticos incluem antiinflamatórios, antipiréticos, analgésicos, reguladores lipídicos, antibióticos, antidepressivos, agentes quimioterápicos, contraceptivos e outros mais. Depois do uso, esses compostos são parcialmente metabolizados e excretados na urina e fezes, e subseqüentemente entram nas estações de tratamento de esgoto (ETEs), onde são tratados, juntamente com outros constituintes orgânicos e inorgânicos do efluente (TAMBOSI, 2008). De acordo com Gebhardt e Schröder (2007), esses fármacos, uma vez dispostos ou excretados, tanto em sua forma original quanto em forma de metabólitos, muitas vezes permanecem estáveis após tratamentos convencionais ou mesmo avançados. Portanto, ainda que alguns desses fármacos, altamente polares e móveis, possam ser parcialmente removidos por meio da sorção, degradação biótica/abiótica ou tecnologias com membranas – como a osmose reversa ou nanofiltração – eles podem eventualmente alcançar corpos d’água superficiais e subterrâneos, que são fontes de água potável (GEBHARDT; SCHRÖDER, 2007; TAMBOSI, 2008).

A contaminação de corpos d’água por fármacos pode advir de esgotos domésticos e hospitalares, mas a contribuição de efluentes e resíduos industriais também é significativa (STACKELBERG *et al.*, 2004). Exemplo disso são os aterros industriais, que recebem grande diversidade de resíduos, o que geralmente leva a formação de um lixiviado contaminado por fármacos (TURNER; HARDY; TAPPER, 1993; HOLM *et al.*, 1995). A indústria farmacêutica também exerce grande influência nesse cenário (LARRSON; PEDRO; PAXEUS, 2007), os efluentes gerados são altamente contaminados por fármacos e podem, em geral, serem caracterizados por uma fração orgânica rapidamente biodegradável e compostos refratários, que não são removidos por tratamentos biológicos convencionais, como no caso da formulação de antibióticos, cujo efluente apresenta baixa biodegradabilidade (ALMEIDA *et al.*, 2004). A suinocultura e bovinocultura também contribuem para a contaminação de corpos d’água. Estudos evidenciam que em criações de bovinos e suínos, não apenas os efluentes estão

contaminados por antibióticos e hormônios, como também as águas subterrâneas próximas (BARTELT-HUNT; SNOW; DAMON-POWELL, 2010).

A ecotoxicologia aquática é uma ciência que surgiu para dar suporte no enfrentamento dos problemas de contaminação dos corpos d'água por compostos tóxicos, como fármacos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Seus instrumentos de análise são capazes de responder preditivamente à toxicidade de compostos químicos, sinalizando os potenciais ecotoxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos. Exemplos da funcionalidade desse exame para o objeto de estudo do presente trabalho são estudos recentes, que indicam que antibióticos, como os do grupo das penicilinas, podem exercer efeitos tóxicos a organismos aquáticos e até promover o desenvolvimento de cepas bacterianas multi-resistentes (ALMEIDA *et al*, 2004). A inserção dos ensaios ecotoxicológicos como ferramenta de avaliação ambiental é de fundamental importância, pois alguns fatores não são avaliados pelas variáveis abióticas, como por exemplo, a biodisponibilidade e a interação entre os efeitos dos poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

De acordo com Gebhardt e Schröder (2007); Tambosi (2008) e Löffler *et al.* (2005), a eficácia dos métodos tradicionais de tratamento não garantem uma redução significativa na concentração dos fármacos ou de seus metabólitos nos corpos d'água. Mesmo diante desse cenário, os trabalhos que abordam a contaminação de efluentes por fármacos são escassos na literatura (GEBHARDT; SCHRÖDER, 2007), sobretudo, os que analisam a importância de estudos ecotoxicológicos nesse contexto. Um dos motivos que explica essa situação é o fato de que a investigação extensiva da ocorrência de fármacos no ambiente iniciou-se na década de 1990, com o aprimoramento dos métodos analíticos que possibilitaram determinar fármacos em concentrações de ng/L ou µg/L em matrizes aquosas, tais como esgotos, efluentes industriais, águas superficiais, subterrâneas e mesmo potável (LÖFFLER *et al.*, 2005). A tecnologia desenvolvida para esse fim ainda é incipiente, tornando ainda mais difícil esse tipo de investigação (DIAZ-CRUZ; DE ALDA; BARCELO, 2003).

Sendo assim, urge a necessidade de levantamento e análise de bibliografias que abordem a questão da contaminação de efluentes e corpos d'água com fármacos, bem como a importância de análises ecotoxicológicas para a avaliação da efetividade ou não

da descontaminação dos mesmos. Esse trabalho busca contribuir para o desenvolvimento de trabalhos futuros, servindo como base e fonte de pesquisa. Foi feito um trabalho de revisão bibliográfica que pretendeu caracterizar os efluentes contaminados com fármacos, além de esclarecer o conceito e as aplicações de análises ecotoxicológicas. Também foi realizada investigação com relação à legislação brasileira pertinente e os métodos mais usuais de avaliação de toxicidade, como: CONAMA 357/95, COPAM/CERH 01/86 e as normas ABNT. De posse dessas informações, pretende-se esclarecer a importância e significância desses estudos como ferramentas para avaliação sobre o efeito dos medicamentos no meio ambiente, bem como para julgar se os processos utilizados para tratar efluentes com fármacos são eficazes sob a ótica ecotoxicológica.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Levantamento de revisão bibliográfica referente aos ensaios ecotoxicológicos e sua utilização enquanto ferramenta para avaliação de efluentes contaminados com fármacos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Realizar levantamento bibliográfico sobre efluentes contendo fármacos e sua caracterização;
- Efetuar levantamento bibliográfico do conteúdo ensaios ecotoxicológicos, buscando conceituá-los, avaliar sua importância, distinguir os tipos de teste, discutir a escolha do organismo-teste e caracterizar os mecanismos de dose-resposta;
- Levantar a legislação pertinente para aplicação de testes ecotoxicológicos, bem como as práticas mais usuais.

### 3 METODOLOGIA

Trata-se de um trabalho de revisão bibliográfica mediante busca de estudos de cunho científicos. Essa busca foi realizada durante o período de julho e dezembro do ano de 2011.

Procurou-se identificar estudos que atendessem aos seguintes critérios:

- Focou-se em artigos publicados após o ano 2000 em revistas de maior circulação – fator de impacto acima de 1 (um);
- Buscou-se aqueles que tinham como tema central os estudos ecotoxicológicos e/ou contaminação de efluentes por fármacos;
- Os artigos selecionados deveriam apresentar resumos claros, além de considerável número de citações por outros autores.

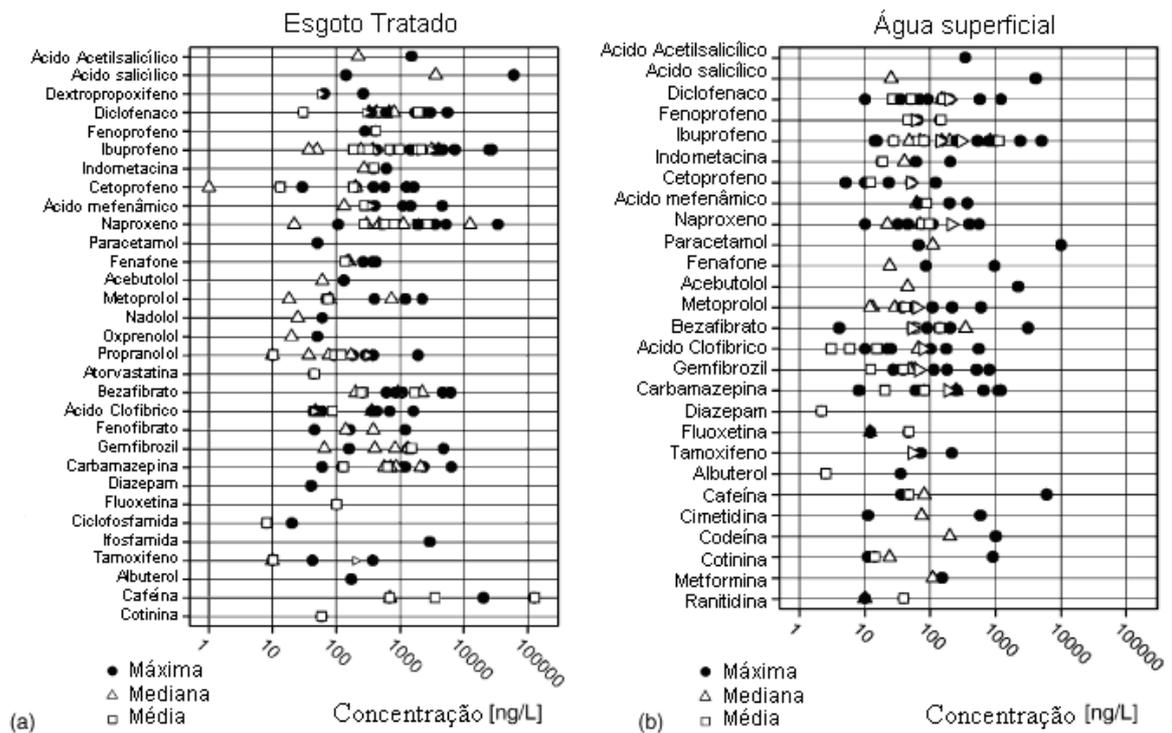
Na realização da busca bibliográfica utilizou-se os indexadores Google Acadêmico (Google Scholar), SciELO (Scientific Eletronic Library On-line), Web of Science, Web of Knowledge, sobretudo, através do Portal de Periódicos da CAPES.

Para seleção ampla de possíveis trabalhos de interesse foi feita uma busca inicial, fundamentada na pesquisa dos títulos e resumo dos estudos. Após este levantamento bibliográfico realizou-se a leitura na íntegra dos documentos pré selecionados e foram incluídos na revisão somente aqueles que preenchiam os critérios pré-definidos.

#### **4 CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTES CONTAMINADOS COM FÁRMACOS**

O lançamento de carga proveniente de efluentes diretamente em lagos e rios é motivo de crescente preocupação. Medicamentos são frequentemente detectados em efluentes em níveis que variam de 1 ng/L até g/L. Dentre os efeitos causados por este nível de contaminação, cita-se a feminização de peixes, em função da presença de hormônios; efeitos negativos na reprodutividade e sobrevivência de organismos em função da exposição em laboratório a propranolol, diclofenaco, gemfibrozil, ibuprofeno e fluoxetina, além do aparecimento de bactérias resistentes à antibióticos (LARRSON; PEDRO; PAXEUS, 2007).

Os fármacos são uma classe emergente de contaminantes ambientais que tem crescente aplicação, tanto para uso humano, quanto para medicina veterinária. Na União Européia, por exemplo, cerca de 300 (trezentas) diferentes substâncias são utilizadas no auxílio das mazelas humanas, veterinárias e de plantas. Esses compostos químicos são desenvolvidos para apresentarem um modo muito específico de ação e muitos deles são altamente persistentes no ambiente. Dentre os diversos fármacos usualmente encontrados em rios, lagoas, efluentes sanitários tratados, água subterrânea e mesmo água potável (Figura 1), os mais frequentemente listados são antiinflamatórios não-esteroidais, como o ácido acetilsalicílico e o diclofenaco, além da metformina, antibióticos, reguladores de colesterol e carbamazepina (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). Fent; Weston e Caminada (2006) citando Ternes (1998) exemplificam tal situação através de trabalho que encontrou 32 (trinta e dois) diferentes tipos de medicamentos em esgoto sanitário tratado, rios e lagoas na Alemanha.



**Figura 1:** Concentração de fármacos em esgoto tratado (a) e águas superficiais (b).  
**Fonte:** Adaptado de FENT; WESTON & CAMINADA (2006).

#### 4.1 Efeitos tóxicos

Os fármacos são projetados para atuar em vias metabólicas e moleculares específicas de humanos e animais, mas frequentemente exibem efeitos colaterais importantes. Quando introduzidos no meio ambiente podem afetar organismos que tenham estrutura similar aos humanos, bem como organismos com estruturas distintas, em que os mecanismos de ação desses químicos é desconhecido (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

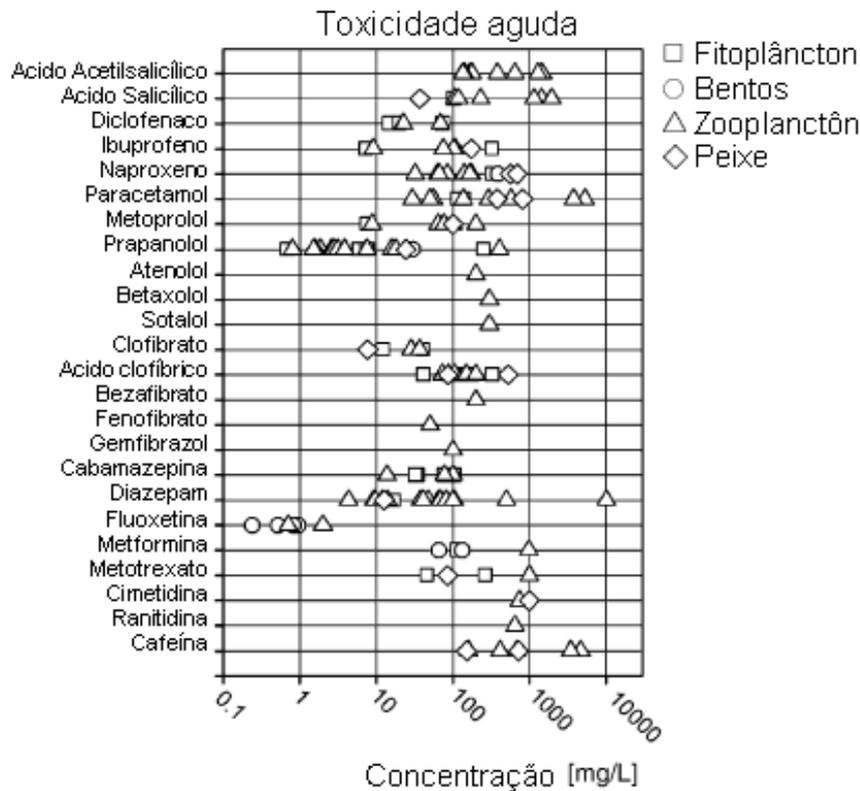
Nesse sentido, Quinn; Gagné e Blaise (2008) avaliaram o potencial tóxico de 11 (onze) fármacos sobre a cnidária *Hydra attenuata*, um microrganismo invertebrado existente nas águas doces da Europa, da Ásia e nas Américas. Os autores observaram que a regeneração do microrganismo foi inibida nas concentrações de 0,1; 5 e 1 mg L<sup>-1</sup> de genfibrozil, ibuprofeno e naproxeno, respectivamente e a altas concentrações de 50 mg L<sup>-1</sup> para bezafibrato e trimetropim. Por outro lado, a carbamazepina e os antibióticos

sulfapiridina e oxitetraciclina estimularam a regeneração da cnidária quando aplicados em concentrações de 25, 5 e 50 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

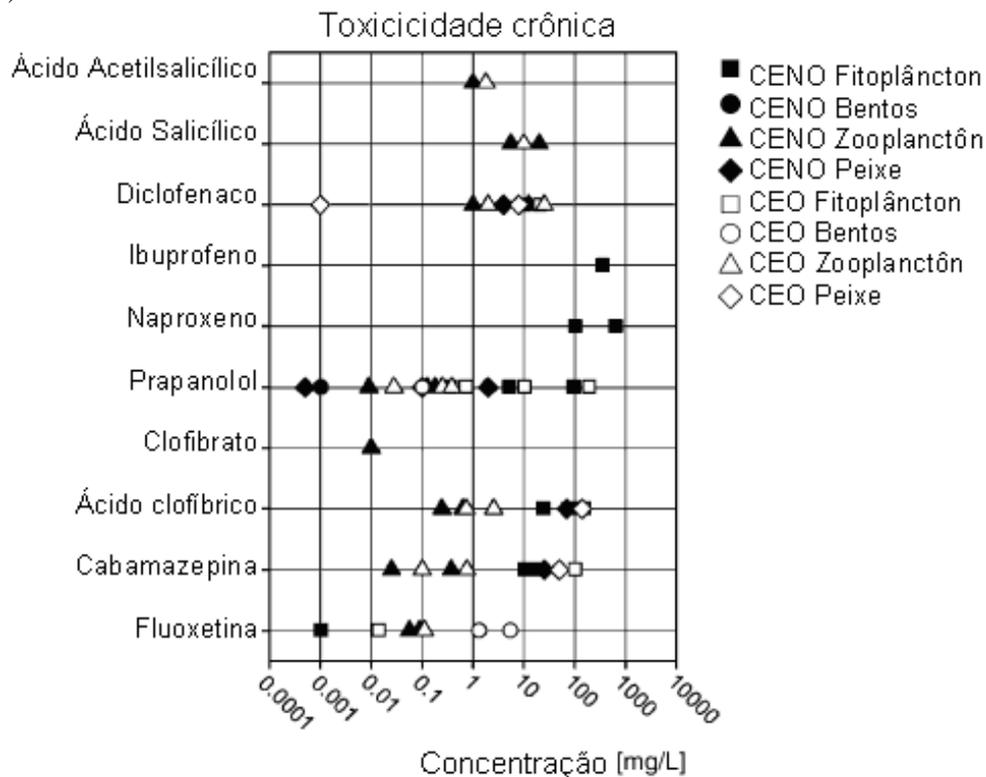
Dados que corroboram com os citados são os de Gunnarsson e colaboradores (2009), que avaliaram o efeito de exposição de efluente industrial altamente diluído (1:500) na espécie de peixe Truta Arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os resultados mostraram influência na expressão gênica e atividade enzimática do animal, como também na função hepática e renal, na atividade do citocromo P450 1A e alteração nos níveis de fosfato no plasma sanguíneo.

Buscando conhecer com mais clareza os efeitos de medicamentos em organismos no meio ambiente, são feitos testes ecotoxicológicos. De acordo com Webb (2001) citado por Fent; Weston e Caminada (2006), os testes de toxicidade aguda que comparam diferentes níveis tróficos, sugerem que algas são mais sensíveis ao contato com fármacos que a *Daphnia magna*, seguidos pelos peixes. Os mesmos estudos demonstram, ainda, que as classes mais tóxicas de fármacos são os antidepressivos, antibióticos e antipsicóticos. No entanto, a ação desses compostos apresenta efeitos muito variáveis entre os diversos filões de seres vivos. Já com relação à toxicidade crônica, os experimentos são escassos. São raros os trabalhos que buscam identificar os efeitos principais da exposição de fármacos a longo prazo ou conseqüências nos diferentes estágios do ciclo de vida dos organismos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006). A figura 2 mostra dados de toxicidade crônica e aguda compilados por Fent; Weston e Caminada (2006).

A figura 2 permite observar o amplo espectro de variação do efeito dos fármacos entre indivíduos de espécies diferentes. Evidencia, ainda, a elevada toxicidade de fármacos como a fluoxetina, que em concentrações inferiores ou próximas a 1 mg/L é capaz de causar efeito deletério em testes de toxicidade aguda com fitoplâncton, zooplâncton, organismos bentônicos e peixes.



(a)



(b)

**Figura 2:** (a) Toxicidade aguda de 24 fármacos, expressa em valores de CE<sub>50</sub> ou CL<sub>50</sub> para diferentes tipos de organismos. (b) Toxicidade crônica de 10 fármacos, expressa em valores de Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e Concentração de Efeito Observado (CEO).

**Fonte:** Adaptado de FENT; WESTON & CAMINADA (2006).

## 4.2 Métodos de tratamento para remoção de fármacos

Um balanço realizado entre as concentrações de fármacos na entrada e saída das plantas de tratamento de esgotos e efluentes revela que durante o tratamento nem todos os fármacos são completamente removidos (TERNES, 1998). Conseqüentemente, eles são encontrados nas águas superficiais (Tabela 1), uma importante fonte de água potável.

**Tabela 1:** Alguns fármacos e metabólitos monitorados no Brasil nos anos de 1996 e 1997.

Substância	Classe das Substâncias	Concentração	
		no meio ambiente	Condições
Ácido Clofibríco	Maior metabólito de três agentes reguladores de lipídeos	1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
		0,2-0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Correntes do rio Paraíba do Sul/RJ
Ácido Fenofibríco	Maior metabólito do fenofibrato	0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
Bezafibrato	Agente regulador de lipídeos	1,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
Genfibrozila	Agente regulador de lipídeos	$\approx 0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
Ibuprofeno	Antiinflamatório	$\approx 0,35 \mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
Diclofenaco	Antiinflamatório	$\approx 0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
		0,02–0,06 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Correntes do rio Paraíba do Sul/RJ
Cetoprofeno	Antiinflamatório	$\approx 0,55 \mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ
Indometacina	Antiinflamatório	0,95 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Esgoto doméstico/RJ

Fonte: STUMPF *et al.* (1999) *apud* KRAUSE (2009).

Com relação ao processo de remoção por sorção, muito comum em ETEs, alguns fármacos ácidos, como os antiinflamatórios ibuprofeno e ácido acetilsalisílico e os reguladores de lipídios ácido clofibríco e benzafibrato, são carregados negativamente

em pH neutro, devido aos seus grupamentos carboxílicos estarem desprotonados. Para todos esses fármacos polares, a sorção no lodo é muito pequena (COELHO, 2008).

Já com relação à degradação biológica, ela apenas será possível tratando-se de fármaco biodegradável (Tabela 2) e se houver um outro substrato disponível para a multiplicação microbiana. Isso porque, os fármacos chegam às ETEs em baixíssimas concentrações (COELHO, 2008), sendo insuficientes para proporcionar o crescimento de bactérias que degradam a matéria orgânica. Outra variável importante é a idade do lodo, que interfere na afinidade entre a bactéria e o fármaco. Buser; Poiser e Müller (1998) citado por Coelho (2008) mostrou que ibuprofeno, a sulfametoxazol, o benzafibrato e o ácido acetilsalisílico requerem uma idade do lodo entre 2 (dois) a 5 (cinco) dias para obter-se uma boa degradação. Para o 17  $\alpha$ -etinilestradiol, o diclofenaco, o iopromida e a roxitromicina é necessário uma idade do lodo de 5 (cinco) a 15 (quinze) dias. No caso da carbamazepina e do diazepam não foi observada degradação até mesmo com lodo com idade superior a 20 (vinte) dias.

**Tabela 2:** Avaliação da biodegradabilidade de alguns fármacos.

<b>Fármacos</b>	<b>Biodegradabilidade</b>
Ampicilina	48% biodegradável
Ibuprofeno	biodegradável
Naproxeno	não biodegradável
Sulfametazol	não biodegradável
Tetraciclina	não biodegradável

**Fonte:** Adaptado de RICHARDSON & BOWRON, 1985 *apud* COELHO, 2008.

Os processos oxidativos avançados (POA) vêm se mostrando eficientes na degradação e remoção de medicamentos, sendo frequentemente empregados na remediação de efluentes industriais, esgotos domésticos, águas de superfície, subsolo contaminados e lixiviado de aterros sanitários. Trata-se de processos extremamente eficientes para mineralizar substâncias orgânicas de difícil degradação e em baixas concentrações (KRAUSE, 2009). Exemplos são trabalhos que, utilizando os processos com UV, reagente FENTON, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ozônio (O<sub>3</sub>), O<sub>3</sub>/UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, alcançam altíssima eficiência na remoção de medicamentos diluídos em

efluentes (ADAMS; ASCE e WANG *et al.*,2002; KIM; YAMADA e TSUNO *et al.*, 2004).

A busca de um tratamento que seja 100 % eficiente é um desafio. Por um lado existem efluentes com diferentes composições, e por outro existem diferentes tipos de tratamentos. Dependendo da qualidade da água, das exigências finais e dos aspectos econômicos, alguns processos são mais adequados que outros. Andreozzi; Marrota e Paxéus (2003) realizaram um estudo comparativo de oito técnicas para a remoção de sete antibióticos (carbadox, sulfacloropiridazina, sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfatiazol e trimetoprima). Eles concluíram que a adsorção em carvão ativado, a osmose inversa, a cloração e a ozonização são técnicas eficientes para a remoção dos antibióticos estudados, sob os parâmetros de uma planta típica de tratamento de água. Contrariamente, a coagulação/floculação/sedimentação com sais de alumínio e de ferro, o abrandamento com excesso de soda, a fotólise e a troca iônica foram métodos relativamente ineficientes na remoção desses fármacos.

#### **4.3 Antibióticos: um caso especial**

Antibióticos são, provavelmente, a família de medicamentos de mais sucesso já desenvolvida para garantir a melhoria da saúde humana. Além dessa aplicação fundamental, esses medicamentos vêm sendo utilizados para prevenir e tratar infecções de animais e plantas, além de promover o crescimento no ramo da agropecuária (MARTINEZ, 2009). Por esse motivo, antibióticos correspondem à maior categoria de fármacos utilizados na medicina humana e veterinária. Eles normalmente são detectados em afluentes e efluentes de plantas de tratamento de esgotos municipais na ordem de ng/L e µg/L. Recente estudo mostra que vários antibióticos possuem uma moderada persistência em águas superficiais, tanto em condições aeróbias, como anaeróbias (KRAUSE, 2009).

A grande discussão sobre a importância da remoção dos antibióticos em sistemas de tratamento de efluentes se deve ao fato deles promoverem a resistência bacteriana (KRAUSE, 2009). Como foi afirmado pela Organização Mundial da Saúde, o aumento

significativo de patógenos humanos com resistência a antibióticos é uma preocupação especial, não apenas no que diz respeito ao tratamento de doenças infecciosas, como também para outras patologias em que a profilaxia com antibióticos é necessária para evitar infecções oportunistas. Neste sentido, a propagação de bactérias resistentes “significa que procedimentos médicos comuns, anteriormente consagrados, podem mostrar-se inúteis” (OMS, 2000).

Vale lembrar que mesmo que a poluição por antibióticos seja extinta a população de bactérias resistentes permanece por várias gerações. De acordo com Martinez (2009), vários mecanismos permitem a manutenção e, eventualmente, disseminação de genes de resistência antibiótica em ecossistemas naturais, de modo que diferentemente da contaminação por antibióticos, a poluição por genes de resistência não desaparece com a extinção da contaminação.

Ainda de acordo com Martinez (2009), com o objetivo de reduzir os efeitos da liberação de antibióticos na seleção de patógenos mais resistentes, a União Européia banuiu o uso de antibióticos de relevância humana para a promoção do crescimento na agropecuária em 1998. Em 2006 a proibição foi estendida para todos os antibióticos e compostos afins. De maneira similar, vários países restringiram o uso de antibióticos na aquicultura, incluindo exigentes proibições no uso de profilaxia antibiótica, além de restrições à utilização de antibióticos que são úteis no tratamento de infecções humanas. Por exemplo, a utilização de quinolonas para aquicultura foi proibido, isso porque esses antibióticos podem permanecer ativos em sedimentos por longos períodos e a resistência a um membro da família do fármaco, geralmente confere resistência a todas as quinolonas.

## 5 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

O século XIX foi marcado pela segunda revolução industrial, distinta pelo notável crescimento da indústria química, petroquímica e metalomecânica, o que permitiu uma considerável atuação antrópica nas paisagens e no meio ambiente, perdurando até os dias atuais. A quantidade de substâncias químicas que passaram a compor a atmosfera, a água e o solo interferiram e interferem de modo crucial nos ecossistemas terrestres, sendo hodiernamente um dos assuntos mais debatidos na esfera pública, aliados a um considerável aumento populacional e acidentes industriais de repercussão internacional. Esse é o contexto que permitiu o chamado monitoramento ambiental, de onde advém a ecotoxicologia.

O termo foi cunhado no ano de 1969 pelo francês René Truhaut (TRUHAUT, 1977), durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo. Por ecotoxicologia, entende-se "ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado" (PLAA; HEWITT, 1982).

Nesse sentido, os testes ecotoxicológicos são métodos utilizados para detectar e avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos danosos em organismos vivos.

Nos países da União Europeia há normas que já exigem análises de ecotoxicidade para o monitoramento ambiental. Amplamente utilizado para diversos fins, esses testes levam em consideração o sinergismo ou antagonismo entre substâncias químicas, mensurando seus respectivos efeitos nos mais diversos ecossistemas (SILVA *et al*, 2011).

### 5.1 Tipos de testes ecotoxicológicos

Os testes de toxicidade podem ser classificados em agudos e crônicos. Esses testes diferem na duração e nas respostas finais avaliadas.

### *5.1.1 Teste de toxicidade aguda*

Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos a um estímulo que se manifesta, em geral, em um intervalo de 0 a 96 h (RAND; PATROCELLI, 1985). Os efeitos tóxicos medidos em testes de toxicidade aguda incluem qualquer resposta exibida por um organismo-teste ou população resultante de um estímulo químico. Normalmente, o efeito observado é a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede como, por exemplo, o estado de imobilidade (COSTA *et al*, 2008).

A avaliação ecotoxicológica aguda constitui-se, geralmente, uma abordagem exploratória para evidenciar um problema de qualidade de corpos hídricos que recebem despejos industriais ou domésticos (BERTOLETTI; ZAGATO, 2006 *apud* MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Esse tipo de teste também pode ser aplicado para avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos para um determinado agente tóxico isolado e as concentrações seguras de agentes químicos para preservação da vida aquática e do ambiente (RASGALLA JR *et al*, 2002 *apud* MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). São objetivos de testes de toxicidade aguda identificar a variabilidade das respostas ao agente entre as diferentes espécies, identificar a toxicidade comparativa e detectar contaminações agudas. De acordo com Magalhães e Ferrão Filho (2008), no Brasil, esses testes vem sendo empregados com o intuito de minimizar o impacto ambiental, avaliar a eficiência de estações de tratamento, bem como requisito para obtenção e manutenção de licenças junto aos órgãos ambientais de alguns estados.

Os testes de toxicidade aguda permitem que sejam determinados por métodos estatísticos, valores de Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>) e Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) (Tabela 3). Geralmente, os valores de concentrações efetivas e letais são expressos em relação a 50% dos organismos, uma vez que estas respostas são de fácil

reprodução, podem ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (COSTA *et al*, 2008).

**Tabela 3:** Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade

PARÂMETRO	DEFINIÇÃO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO
DL <sub>50</sub>	Dose Letal Média: dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e condições do teste.	24 a 96 h
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal Média: concentração de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 a 96 h
CE <sub>50</sub>	Concentração Efetiva Média: concentração de amostra que causa um efeito agudo (imobilidade, por exemplo) a 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 ou 48 h
CENO	Concentração de Efeito Não Observado: maior concentração de agente tóxico que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 dias
CEO	Concentração de Efeito Observado: menor concentração de agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 dias

Fonte: COSTA *et al*, 2008

Exemplo da relevância de estudos de toxicidade crônica para a área de contaminação de efluentes foi verificado por Yoshimura e Endoh (2005), em que a toxicidade aguda de cinco fármacos (bitionol, pirimetamina, cloridrato de levamisol, cloridrato de ambroxol e triclorfon), empregados no campo da medicina veterinária, foi testada em *Oryzias latipes*, *Daphnia magna* e *Brachionus calyciflorus*. O objetivo do trabalho foi determinar a 24, 48, 72 e 96 h CL<sub>50</sub> para os três organismos, além dos valores de 24 e 48 h CE<sub>50</sub> para *D. magna* e 24 h CE<sub>50</sub> para *B. calyciflorus*. Dentre os fármacos pesquisados, o bitionol seguido pela pirimetamina foram os mais tóxicos e o cloridrato

de ambroxol mostrou-se o menos nocivo. A exceção foi o resultado obtido com o crustáceo *D. magna*, que é mais sensível ao triclorfon.

### 5.1.2 Teste de toxicidade crônica

Testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas sobre espécies aquáticas por um período que pode abranger de 1/10 a todo o ciclo de vida do organismo-teste. O fato de uma substância química não produzir efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos em testes de toxicidade aguda não indica que ela não seja tóxica para eles (COSTA *et al*, 2008). Testes de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações subletais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação.

Os testes de toxicidade crônica dependem diretamente dos resultados de toxicidade aguda, uma vez que as concentrações subletais são calculadas a partir do CL<sub>50</sub>. Comparado aos testes agudos, esses testes são mais sensíveis à elevada diluição esperada em amostras ambientais (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). São, portanto, comumente utilizados quando os testes de toxicidade aguda são insuficientes para caracterizar um efeito tóxico mensurável.

Os resultados obtidos em testes de toxicidade crônica são geralmente expressos como Concentração de Efeito Não observado (CENO) ou Concentração de Efeito Observado (CEO) (Tabela 3), mas também podem ser expressos como Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>).

Alguns trabalhos evidenciam a importância de realização de testes de toxicidade crônica em complementação aos de toxicidade aguda ao verificarem que, embora antibióticos em corpos d'água afetem pouco a bioluminescência de *Vibrio fischeri* e *Vibrio harveyi* em testes produzidos em curto espaço de tempo, são capazes de trazer efeitos danosos

significativos na reprodução desses indivíduos em testes realizados em maior intervalo de tempo (THOMULKA e MCGEE, 1993; BACKHAUS e GRIMME, 1999).

## 5.2 Escolha do organismo-teste

Observa-se que é corrente o uso de mais de um organismo nos testes ecotoxicológicos, com o intuito de se avaliar a cadeia alimentar do modo menos fragmentado possível. (SILVA *et al*, 2011; KÜSTER; DORUSCH; ALTENBURGER, 2005; MARQUES, 2011; MACKEN *et al*, 2009; PARK *et al*, 2005; MANFRA, 2007; KUNGOLOS *et al*, 2004; PALMA *et al*, 2008).

Em geral, esses testes são realizados com espécies de microcrustáceos (sendo comum as espécies do gênero *Daphnia*), decompositores (igualmente comum a bactéria *Vibrio fischeri*) e, em alguns casos, espécies de algas ou animais.

A escolha do organismo que testa a ecotoxicidade é de extrema importância, uma vez que a ausência de resposta de uma determinada espécie a certa substância pode traduzir apenas uma resistência específica, ainda que a substância em questão seja tóxica ou danosa ao ambiente analisado.

Magalhães e Ferrão Filho (2008) citando Rand e Petrocelli (1985), afirmam que, para a escolha do organismo teste, diversos critérios devem ser observados: abundância e disponibilidade, significativa representação ecológica na biocenose, cosmopolitismo da espécie, conhecimento prévio de sua fisiologia, biologia e hábitos, estabilidade genética e uniformidade populacional, sazonalidade, sensibilidade constante e apurada, importância comercial e facilidade de cultivo em laboratório. Esses quesitos dificultam a existência de um arquétipo ideal para exames toxicológicos. Portanto, exige-se uma padronização de espécies para cada ecossistema em estudo e, ademais, não se eximiria o uso de espécies encontradas no próprio ecossistema (espécies nativas). Os autores, ainda, observando o problema da inexistência de uma espécie que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema, recomendam utilizar

três exemplares de diferentes níveis tróficos, aumentando a probabilidade de respostas tóxicas diferenciadas, através de organismos de maior ou menor sensibilidade a certas substâncias.

Exemplo dessa recomendação foi verificado por Palma *et al* (2008), que avaliou a toxicidade aguda de pesticidas na região do Alentejo, em Portugal. Os resultados indicaram que a resposta a um determinado composto é fortemente dependente da sensibilidade àquela mesma substância. Também constatou-se que as bactérias são notadamente menos resistentes a herbicidas e inseticidas do que crustáceos. Além disso, notou-se como algumas espécies - no caso, o crustáceo *Thamnocephalus platyurus* -, apresentam melhores resultados em determinados exames, a despeito de espécies já amplamente utilizadas e divulgadas no meio científico, como *Daphnia magna*, *Daphnia carinata* e *Vibrio fischeri*.

Nesse mesmo sentido, Silva *et al* (2011) avaliou a toxicidade de resíduos industriais que passaram pelo tratamento de estabilização-solidificação. Os testes com *Daphnia magna* mostraram-se mais sensíveis do que aqueles com o *Vibrio fisheri*, sendo ambos mais sensíveis que as algas do gênero *Scenedesmus subspicatus*.

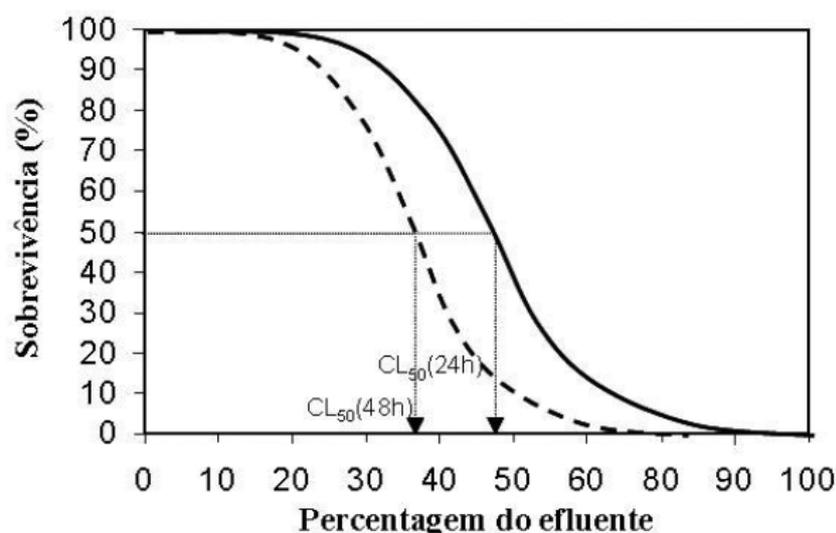
Vale ressaltar que a seleção razoável de espécies, além da adequação e da melhor precisão, permite que se encontre novas alternativas para organismos em franco uso nos testes ecotoxicológicos que, notadamente, são de difícil cultivo. É o caso do *T. platyurus*, alternativa à *D. magna* em análises de certas substâncias encontradas em ambientes impactados, como os pesticidas atrazina, sulfato de endosulfan e cloropirifo (PALMA *et al*, 2008) e certos metais traços, como zinco, cobre e dióxido de titânio (HEINLAAN *et al*, 2008 *apud* PALMA *et al*, 2008).

### 5.3 Relação dose-resposta

A relação entre a concentração de uma substância química à qual é exposto um determinado organismo e o efeito nocivo que lhe é produzido, conhecida como relação dose-resposta, é um dos aspectos mais importantes da ecotoxicologia aquática. A

relação dose-resposta constitui a base fundamental para a avaliação do risco gerado pelas substâncias químicas no meio ambiente, porque permite quantificar a toxicidade aguda dessas substâncias. Com menos frequência, a expressão dose-efeito pode ser empregada. No entanto, em toxicologia os termos “efeito” e “resposta” se diferenciam (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Utiliza-se o termo “efeito” para denominar uma alteração biológica e o termo “resposta” para indicar a proporção de uma população que manifesta um efeito definido.

Em geral, as curvas que representam a relação dose-resposta apresentam comportamento não-retilíneo do tipo sigmóide (Figura 3). Dois parâmetros importantes podem ser determinados a partir das curvas dose-resposta: a concentração ou dose, que resulta em 50% do efeito medido, ou seja, os valores de  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$  e o coeficiente angular da porção linear da curva que passa pelo ponto correspondente à  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$  (COSTA *et al*, 2008). Os dois parâmetros são necessários para descrever precisamente a relação entre a concentração do agente químico e o efeito deletério provocado nos organismos-teste. Ainda de acordo com COSTA *et al* (2008), diferentes substâncias químicas podem apresentar diferentes valores de  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$ , mas podem apresentar os mesmos valores de coeficientes angulares. Valores similares de coeficientes angulares podem indicar que os modos de ação das substâncias químicas analisadas são similares.



**Figura 3:** Curva de dose-resposta hipotética para um efluente qualquer. A concentração do efluente é dada pela porcentagem de diluição da amostra do efluente na solução-teste. A linha contínua representa a resposta nas primeiras 24 horas e a linha pontilhada após 48 horas de exposição

Fonte: MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008

Uma forma de explicar variações de configuração em uma curva dose-resposta é dizer que cada indivíduo de uma população tem uma tolerância própria e requer uma determinada dose antes de responder com um efeito. Pode-se reconhecer uma região inicial, onde o efeito não se apresenta, seguida de uma região intermediária, onde os efeitos desenvolvem-se rapidamente e uma região final, onde o efeito diminui assintoticamente.

Costa e colaboradores (2008) citando Yu (2005) esclarecem que um importante problema refletido nos valores  $CL_{50}$  e  $CE_{50}$  é que expressam concentrações ambientais de substâncias tóxicas referentes a um determinado tempo de exposição, estabelecido para cada teste. Assim, uma substância que se move lentamente nos tecidos, por exemplo, pode apresentar uma toxicidade menor no período do teste, simplesmente pelo fato de sua concentração no tecido alvo não ter atingido níveis suficientes para provocar efeito tóxico durante o intervalo de tempo considerado.

## **6 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS: ASPECTOS LEGISLADOS E PRÁTICAS VIGENTES**

Ensaio ecotoxicológico com organismos aquáticos fazem parte das exigências da legislação federal e estadual na avaliação da qualidade ambiental visando à preservação da vida aquática. Estes ensaios também são utilizados no controle do lançamento de efluentes industriais e de materiais dragados, tanto em ambientes marinho, estuarino ou de água doce, para assegurar a manutenção das condições e padrões de qualidade previamente estabelecidos para um determinado corpo d'água

### **6.1 Aspectos legislados**

A Resolução CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. A Resolução estabelece no parágrafo 1º do artigo 34 que efluentes líquidos não devem causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos para organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios estabelecidos pelo órgão ambiental. Ainda no artigo 34, parágrafo 2º esclarece-se que os critérios de toxicidade previstos no parágrafo 1º devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente. No entanto, de acordo com o parágrafo 3º, nos corpos de água em que as condições e padrões de qualidade previstos na Resolução não incluam restrições de toxicidade a organismos aquáticos, não se aplicam as exigências anteriormente mencionadas. Esta resolução faz uso dos ensaios ecotoxicológicos, portanto, para o estabelecimento de critérios de toxicidade para os corpos d'água, de forma a garantir a preservação da biodiversidade dos corpos hídricos quando do lançamento de efluentes.

Vale mencionar que a Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a

Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do CONAMA, não aborda a questão dos testes ecotoxicológicos.

Para atender as exigências da legislação federal, o estado de Minas Gerais estabeleceu a Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº 01, de 05 de maio de 2008, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Essa Deliberação ratifica o estabelecido no artigo 34 da Resolução CONAMA 357/05 e, ainda, acrescenta em seu artigo 7, parágrafo 4º que as possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes listados ou não nesta Deliberação Normativa, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas, utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, análises de bioacumulação e efeitos endócrinos ou outros métodos cientificamente reconhecidos. Isso significa que, além do que já estava previsto na Resolução CONAMA 357/05, o estado de Minas Gerais exige a realização de testes ecotoxicológicos em efluentes, objetivando garantir que não haverá prejuízo ao ecossistema.

Ainda nesse sentido, existem as Normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Fundada em 1940, a ABNT é o órgão responsável pela normalização e padronização técnica no país, fornecendo a base necessária ao desenvolvimento tecnológico brasileiro. A utilização de testes padronizados é vantajosa, principalmente, por permitir a reprodução de análises, além da seleção de um ou mais testes uniformes e úteis para uma variedade de laboratórios, facilitando a comparação dos dados e contribuindo para aumentar a utilização dos dados publicados (COSTA *et al*, 2008). A ABNT possui 12 (doze) normas tratando a respeito dos testes ecotoxicológicos, buscando estabelecer critérios para seleção de organismos-teste, bem como de amostragem e análise de resultados (Tabela 4).

**Tabela 4:** Normas da ABNT que normalizam a realização de teste ecotoxicológicos

<b>NORMAS DA ABNT PARA TESTES ECOTOXICOLÓGICOS</b>	
<b>ABNT. NBR 15469:</b> Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras.	<b>ABNT NBR 15088:2011</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes
<b>ABNT NBR 13373:2010</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com <i>Ceriodaphnia</i> spp (Crustacea, Cladocera)	<b>ABNT NBR 12713:2009</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com <i>Daphnia</i> spp (Crustacea, Cladocera)
<b>ABNT NBR 15499:2007</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes	<b>ABNT NBR 15470:2007</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade em sedimento - Método de ensaio com <i>Hyaella</i> spp (Amphipoda)
<b>ABNT NBR 15411-1:2006</b> Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de <i>Vibrio fischeri</i> (ensaio de bactéria luminescente)	<b>ABNT NBR 15411-2:2006</b> Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz <i>Vibrio fischeri</i> (ensaio de bactéria luminescente)
<b>ABNT NBR 15411-3:2006</b> Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de <i>Vibrio fischeri</i> (Ensaio de bactéria luminescente)	<b>ABNT NBR 15350:2006</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata:Echinoidea)
<b>ABNT NBR 15308:2005</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com misidáceos (crustacea)	<b>ABNT NBR 12648:2005</b> Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)

A tabela permite observar que os testes com os peixes, *Ceriodaphnia sp.*, *Daphina sp.*, *Hyaella sp.*, *Vibrio fischeri*, *Echinodermata*, *Chlorophyceae* e *Misidáceos* são regulamentados e, portanto, pode-se utilizar esses indivíduos como organismos-teste.

## 6.2 Prática vigente

Para atender aos requisitos da legislação federal, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) utiliza a Resolução da SMA 03/2000 na elaboração de seus manuais relacionados à ecotoxicologia (BERTOLETTI, 2009). Os manuais da CETESB (Tabela 5) fornecem informações que funcionam como um guia para realização de procedimentos que o órgão ambiental do estado de São Paulo julga mais adequados. Por

esse motivo, esses documentos são indicativos das práticas usualmente empregadas e importantes para delimitação de uma metodologia mais adequada para realização de teste ecotoxicológicos.

**Tabela 5:** Manuais CETESB para padronização de testes ecotoxicológicos

Norma	Identificação
L5.018	Testes de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> Claus, 1879 (Cladocera, Crustacea)
L5.019	Teste de toxicidade aguda com peixes. Parte I: Sistema Estático. Parte II: Sistema Semi-estático. Parte III: Sistema de Fluxo Contínuo.
L5.020	Teste de toxicidade com <i>Chlororella vulgaris</i> (Chlorophyceae)
L5.022	Avaliação de toxicidade crônica utilizando <i>Ceriodaphnia dubia</i> Richard, 1984 (Cladocera, Crustacea)
L5.227	Bioensaio de toxicidade aguda com <i>Photobacterium phosphoreum</i> (Sistema Microtox)
L5.228	Teste de toxicidade aguda utilizando <i>Spirillum volutans</i>
L5.250	Água do Mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com <i>Lytechinus variegatus</i> Lamarck, 1816 (Echinodermata, Echinoidea)
L5.251	Água do Mar - Teste de toxicidade aguda com <i>Mysidopsis juniae</i> Silva, 1979 (Mysidacea, Crustacea)

**Fonte:** Adaptado de MAGALHÃES & FERRÃO FILHO (2008)

Para corpos de água doce, a CETESB recomenda a realização simultânea dos ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*. No caso de reavaliação do limite de toxicidade, além dos dois ensaios já citados, sugere-se o ensaio crônico com uma espécie de peixe (BERTOLETTI, 2009).

Ainda de acordo com Bertoletti (2009), para efluentes lançados em ambientes marinhos ou estuarinos, a CETESB recomenda a execução simultânea dos ensaios de ecotoxicidade aguda com misidáceos ou *Vibrio fisheri* e do ensaio de ecotoxicidade crônica com ouriço-do-mar. Na reavaliação do limite de toxicidade de corpos d'água, devem ser apresentados os resultados dos três ensaios anteriormente citados.

Além disso, a CETESB não recomenda o congelamento de amostras. Embora exista a indicação de congelamento na norma ABNT para amostras que não podem ser processadas em até 48h após a coleta, os manuais USEPA (2002 a,b), no item específico referente à preservação de amostras de efluente, orientam a realização do ensaio com

amostra fresca em até 36h após a coleta e que, em nenhum caso, o intervalo entre a coleta e a primeira utilização da amostra deve ultrapassar 72 horas. Dados de literatura mostram que os componentes de resíduos sólidos (filtráveis e não filtráveis) da amostra se alteram com o congelamento e descongelamento (USEPA, 1982). Desta forma, quando não se conhece a interferência do congelamento na amostra (efluente ou água superficial) recomenda-se que seja adotado a refrigeração, considerado o melhor procedimento de preservação, uma vez que pouco altera as características da amostra.

Na análise dos dados, conforme estabelecido pela ABNT, a CETESB recomenda que seja adotado o teste t por bioequivalência no cálculo estatístico, conforme BERTOLETTI *et al* (2007) (Tabela 6).

**Tabela 6:** Constante de bioequivalência para ensaios ecotoxicológicos com espécies de água doce e marinha.

Tipo de amostra	Espécie	Tipo de Ensaio	Efeito Observado	Constante de Bioequivalência
Água	Daphnia similis	Agudo	Imobilidade	0,86
Efluente	Daphnia similis	Agudo	Imobilidade	0,73
Água	Ceriodaphnia dubia	Crônico	Reprodução	0,79
Efluente	Ceriodaphnia dubia	Crônico	Reprodução	0,72
Sedimento / Água	Lytechinus variegatus	Crônico	Desenvolvimento Embrional	0,91
Efluente	Lytechinus variegatus	Crônico	Desenvolvimento Embrional	0,86

Fonte: BERTOLETTI *et al* (2007)

Finalmente, com relação à apresentação de relatório de ensaios ecotoxicológicos, a CETESB exige que esteja acompanhado de selo do INMETRO (ou Declaração de Responsabilidade), devendo ser anexada a carta controle atualizada da sensibilidade dos organismos-teste, bem como o resultado do teste com substância de referência realizado na época dos ensaios das respectivas amostras. Devem, ainda, serem apresentados os valores, iniciais e finais, de pH e oxigênio dissolvido (BERTOLETTI, 2009).

## 7 CONCLUSÃO

O efeito ecotoxicológico dos fármacos diluídos em corpos d'água já é reconhecido. No contexto ecológico, essas substâncias apresentam elevado poder de ocasionar distúrbios negativos, alterando o desempenho de vários organismos no meio ambiente. Apesar disso, no Brasil, estudos sobre a redução da toxicidade em efluentes contaminados são incipientes e pouca informação está disponível. Como consequência, muito ainda há para ser pesquisado sobre o assunto, sobretudo com relação aos efeitos de exposição crônica aos medicamentos. É necessário, ainda, desenvolver o conhecimento a respeito da eliminação dos fármacos por técnicas de tratamento de água, objetivando encontrar métodos mais adequados e eficientes.

O monitoramento da contaminação do meio ambiente por medicamentos é, portanto, aconselhável. Mas muitos desafios se impõem a esse objetivo, um monitoramento completo é difícil devido ao excessivo número existente de fármacos e metabólitos, com diferentes estruturas químicas e propriedades físico-químicas. Além disso, o baixo poder de detecção dos métodos analíticos para substâncias presentes em pequena concentração dificulta a pesquisa na área.

Nesse sentido, os resultados dos estudos ecotoxicológicos são de grande auxílio. Eles podem ser empregados como instrumentos de vigilância no acompanhamento contínuo das condições dos ecossistemas, podendo ser utilizados como marcadores cientificamente aprovados das alterações ambientais significativas. Podem convir, ainda, como instrumentos reguladores, permitindo a proibição ou liberação do uso e descarte de novos fármacos.

O presente trabalho contribui, portanto, como subsídio teórico, visando o desenvolvimento de análises futuras, servindo como base e fonte de pesquisa nesse cenário de escassez de estudos e conhecimentos na área, sobretudo levando-se em consideração a necessidade urgente de investigação a cerca do tema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. NBR 12649: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com algas (Chlorophyceae)*. Rio de Janeiro, 2005.
- ABNT. NBR 15308: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com misidáceos (Crustacea)*. Rio de Janeiro, 2005.
- ABNT. NBR 15350: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica de Curta Duração – Método de Ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15411-1: *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15411-2: *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15411-3: *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*. Rio de Janeiro, 2006.
- ABNT. NBR 15469: *Ecotoxicologia aquática - Preservação e preparo de amostras*. Rio de Janeiro, 2007.
- ABNT. NBR 15470: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade em Sedimento – Método de Ensaio com Hyalella spp. (Amphipoda)*. Rio de Janeiro, 2007.
- ABNT. NBR 15499: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica de Curta Duração – Método de Ensaio com peixes*. Rio de Janeiro, 2007.
- ABNT. NBR 12713: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Daphnia spp. (Crustacea, Cladocera)*. Rio de Janeiro, 2009.
- ABNT. NBR 13373: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com Ceriodaphnia spp. (Crustacea, Cladocera)*. Rio de Janeiro, 2010.
- ABNT. NBR 15088: *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Peixes*. Rio de Janeiro, 2011.
- ADAMS, C., ASCE, M., WANG, Y. Removal of Antibiotics from Surface and Distilled Water in Conventional Water Treatment Processes. *Journal Environmental Engineering*, v.128, p.253-260. 2002.
- ANDREOZZI, R., MAROTTA, R., PAXÉUS, N.. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere*, v. 50, p. 1319-1330, 2003.

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M.R.; ROSA, M.A.; DURÁN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. *Quím. Nova*, São Paulo, v.27, n.5, 2004.

BACKHAUS T, GRIMME LH. The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, v. 38, p.291-301. 1999.

BARTELT-HUNT, S.; SNOW D. D.; DAMON-POWELL T. Occurrence of steroid hormones and antibiotics in groundwater impacted by livestock waste control facilities. In: World Environmental and Water Resources Congress: Challenges of Change, 2010, Rhode Island. *Anais...* Rhode Island: American Society of Civil Engineers, 2010. p.1052-1061.

BERTOLETTI, E. *Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo*. Série Manuais. São Paulo: CETESB, 2009. 36p.

BERTOLETTI, E. ; BURATINI, S.A.; PRÓSPERI, V.A.; ARÚJO, R.P.A.; WERNER, L.I. Selection of relevant effects levels for using bioequivalence hypothesis testing. *J.Braz. Soc. Ecotoxicolol.*, v.2, n.2, p.139-145, 2007.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Aplicação dos ensaios ecotoxicológicos e legislação pertinente. P. 347-379. In: ZAGATTO, P. A; BERTOLETTI E. (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*. Rima. São Paulo. São Carlos. 478 p.

BRASIL. CONAMA. Resolução 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 17 de março de 2005, edição n.53, seção 1, p.58-63.

BRASIL. CONAMA. Resolução 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 13 de maio de 2011.

BUSER, H. R., POISER, T., MÜLLER, M. D. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a Lake. *Environmental Science and Technology*, v 32, p. 3449-3456. 1998.

COELHO, A. D. *Degradação dos antiinflamatórios diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno por ozonização*. 214f. Tese (Doutorado) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Programa de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova*, v. 31, n. 7, p.1820-1830, 2008

DIAZ-CRUZ, M. S.; DE ALDA, M. J. L.; BARCELO, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Anal. Chem*, v.22, p.340-351, 2003

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122–159, 2006.

GEBHARDT W.; SCHRÖDER H.F. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *J. Chromatogr. A*, v.1160, p.34-43, 2007.

GUNNARSSON, L *et al.* Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Pharmaceutical Industry Effluent Diluted 1:500 Affects Global Gene Expression, Cytochrome P450 1A Activity, and Plasma Phosphate in Fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, n. 12, p.2639–2647, 2009.

HEINLAAN M.; IVASK A., BLINOVA I., DUBOURGUIER H.C., KAHRU A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*; v. 71, p.1308–1316, 2008.

KIM, S.-E.; YAMADA, H.; TSUNO, H. Evaluation of Estrogenicity for 17 $\beta$ -Estradiol Decomposition During Ozonation. *Ozone Science & Engineering*, v. 26, n.6, p. 563-571. 2004.

HOLM J. V., RUGGE K., BJERG P. L., CHRISTENSEN T. H. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill, Grindsted, Denmark. *Envir on Sci Techno*; v. 29, n. 5, p. 1415, 1995.

KRAUSE, L. G. T. *Degradação do antibiótico sulfametoxazol por ozonização e Avaliação da atividade antimicrobiana*. 92f. Tese (Doutorado) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

KUNGOLOS, A. et al. Toxic properties of metals and organotin compounds and their interactions on *daphnia magna* and *vibrio fischeri*. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 4, p.101–110, 2004.

KÜSTER, E.; DORUSCH, F.; ALTENBURGER, R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus Vacuolatus* and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, n.10, p. 2621–2629, 2005.

LARRSON, D. G. J.; PEDRO C.; PAXEUS N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of hazardous materials*, v.148, p. 751-755, 2007.

LÖFFLER, D. *et al.* Environmental Fate of Pharmaceuticals in Water/ Sediment Systems. *Environmental Science Technology*., v.39, p.5209-5218, 2005.

- MACKEN, A. A test battery approach to the ecotoxicological valuation of cadmium and copper employing a battery of marine bioassays. *Ecotoxicology*, v.18, p.470–480, 2009.
- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A S. A ecotoxicologia como ferramenta para o biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* v.13, n.3, p.355-381, 2008.
- MANFRA, L. et al. Metal Content and Toxicity of Produced Formation Water (PFW): Study of the Possible Effects of the Discharge on Marine Environment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, v.53, p.183–190, 2007.
- MARQUES, C. R. et al. Ecotoxicological effects of MIKADO and VIPER on *Algae* and *Daphnids*. *Environmental Toxicology*, Março 2011.
- MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, v. 157, p.2893–2902, 2009.
- MINAS GERAIS. Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº 01, de 05 de maio de 2008. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário do Executivo*, Secretaria de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, MG, 05 de Maio de 2005.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Overcoming Antibiotic Resistance, World Health Organization Report in Infectious Diseases*. OMS, Geneva. 2000
- PALMA, P. et al. Acute Toxicity of Atrazine, Endosulfan Sulphate and Chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, Relative to Their Concentrations in Surface Waters from the Alentejo Region of Portugal. *Bull Environ Contam Toxicol*, v.81, p.485–489, 2008.
- PARK, G. S. et al. Ecotoxicological Evaluation of Sewage Sludge Using Bioluminescent Marine Bacteria and Rotifer. *Ocean Science Journal*, v. 40, N. 2, p.91-100, 2005.
- PLAA, G.L.; HEWITT W.R. Toxicology of the liver. *Raven Press*, New York, p.103-210, 1982.
- QUINN, B., GAGNÉ, F., BLAISE, C. The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuate*. *Science of The Total Environment*, v. 402, p. 62-69, 2008
- RAND, G. M. & S.R. PETROCELLI. *Fundamental of aquatic toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington. 666p, 1985.
- RASGALLA JR., C.; NOLDIN, J.A.; SANTOS, A. L.; SATO, G. EBERHARDT, D. S. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticida utilizados na cultura de arroz irrigado sobre juvenis de carpas (*Cyprinus carpio*). *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 12, p. 59-68, 2002.

- RICHARDSON, M. L., BOWRON, J. M.. The fate of pharmaceutical chemicals in the environment. *Journal Pharm. Pharmacol.*, v. 37. p. 1-12, 1985.
- SÃO PAULO. Resolução SMA nº 03, de 22/02/2000. Implementa o controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo. Diário Oficial do Estado, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, SP, 22 de fevereiro de 2000.
- SILVA, M.A.R *et al.* Environmental impact of industrial sludge stabilization/solidification products: Chemical or ecotoxicological hazard evaluation? *J. Hazard. Mater.* v.192, n.3, p.1108-1113, 2011.
- STACKELBERG, P. E. *et al.* Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of the Total Environment*, v.329, p.99–113, 2004.
- TAMBOSI, J. L. *Remoção de fármacos e avaliação de seus Produtos de degradação através de Tecnologias avançadas de tratamento.* 141f. Tese (Doutorado) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- TERNES, T.A.. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.*, v. 32, n. 11, p. 3245–3260. 1998.
- THOMULKA K.W. & MCGEE D.J. Detection of biohazardous materials in water by measuring bioluminescence reduction with the marine organism *Vibrio harveyi*. *Environ Sci Health*, v. 28, p. 53-66. 1993.
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspective. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.1, p.151-173, 1977.
- TURNER K. S., HARDY M. A., TAPPER R. J. Water-quality reconnaissance of the perimeter of the Rolling Knoll landfill near Green Village, New Jersey, and electromagnetic survey of the parts of the landfill within the Great Swamp National Wildlife Refuge. *US Geological Survey Open-File*, p.92-153, 1993.
- U.S.EPA. *Handbook for sampling and sample preservation of water and wastewater.* Cincinnati, Ohio: U.S.EPA, 402p., 1982.
- U.S.EPA. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.* 5 ed. Washington, D.C.: U.S.EPA, 266p., 2002a.
- U.S.EPA. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.* 4 ed. Washington, D.C.: U.S.EPA, 335p., 2002b.
- WEBB, S.F. A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals II: aquatic risk characterisation. In: Kummerer, K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks.* Springer-Verlag, Berlin, p.319–343. 2001

YOSHIMURA, H. & ENDOH, Y. R. Acute Toxicity to Freshwater Organisms of Antiparasitic Drugs for Veterinary Use. *Environ. Toxicol.*, v. 20, p. 60-66. 2005.

YU, M.H. *Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants*, 2nd ed., CRC Press: Boca Raton, 2005.