



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA**



Marya Anne Von Wolff

**Avaliação Ecotoxicológica do Antidepressivo
Cloridrato de Fluoxetina**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Tecnologia – FT/UNICAMP
para a obtenção do título de mestre em
Tecnologia.

Área Concentração: Tecnologia e Inovação
para o Ambiente, Saneamento e
Construção.

Orientadora – Profa Dr^a Cassiana M. Reganhan Coneglian

Limeira - 2011

06/2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA UNIFICADA FT/CTL DA UNICAMP

V897e	<p>Von Wolff, Marya Anne Estudo ecotoxicológico de antidepressivo cloridrato de fluoxetina / Marya Anne Von Wolff. – Limeira, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Cassiana Maria Reganhan Coneglian. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia.</p> <p>1. Antidepressivos. 2. Toxicologia. 3. Fluoxetina. I. Coneglian, Cassiana Maria Reganhan. II. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia. III. Título.</p>
-------	--

Título em inglês: Ecotoxicological study of the antidepressant fluoxetine hydrochloride

Palavras-chave em inglês (Keywords):

- 1- Antidepressants
- 2- Toxicology
- 3- Fluoxetine

Área de concentração: Tecnologia para o Ambiente, Saneamento e Construção

Titulação: Mestre em Tecnologia

Banca examinadora: Marta Siviero Guilherme Pires, Regina Teresa Rosim Monteiro

Data da Defesa: 25-02-2011

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

**Avaliação Ecotoxicológica do Antidepressivo
Cloridrato de Fluoxetina**

Autor: Marya Anne Von Wolff

Orientador: Profª. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação



Profª. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian
Universidade Estadual de Campinas – FT/UNICAMP



Profª. Dra. Regina Teresa Rosati Monticini
Universidade de São Paulo – USP



Profª. Dra. Marta Síviesi Guilherme Pires
Universidade Estadual de Campinas – FT/UNICAMP

Limeira, SP
Fevereiro de 2011.

DEDICATÓRIA

A meu amor Rafael, com admiração, amor e gratidão, por sua compreensão, carinho, presença e apoio em todos os momentos.

A minha mãe Analice, com muita gratidão, afeto e carinho, pelas palavras de conforto que sempre me ajudaram a não desistir.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a minha existência;

A minha família, pelo carinho, amor incondicional e apoio em todos os momentos;

Ao CNPq, pelos anos concedidos de bolsa, os quais foram fundamentais para a conclusão de minha dissertação de mestrado;

A minha orientadora Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian, pela paciência e confiança em me auxiliar neste trabalho;

A Paulo Clairmont pelo fornecimento do composto de fluoxetina e pelas análises realizadas que foram fundamentais para a conclusão dos objetivos;

A Regina Monteiro e Gisela Umbuzeiro pelas grandes contribuições que ajudaram na melhoria deste projeto.

Aos meus especiais amigos Alyson Rogério, Lidiane Nobre, Juliana Malta e Marilen Segredo pela paciência e pelos momentos de alegria proporcionados durante a realização deste projeto;

Ao meu grande amor Rafael Gonçalves da Costa pelo apoio, amor e dedicação;

Aos grandes amigos Raphael Bellis, Alexandro Carvalho e Evandro Luiz, pela realização e grande auxílio em etapas importantes de minha vida;

Aos meus colegas do laboratório de ecotoxicologia, pelo companheirismo;

Aos companheiros Ádria, Gilberto, Geraldo, Josiane e Anjaína, amigos e funcionários dos laboratórios de saneamento;

Ao programa de Pós Graduação em Tecnologia e Inovação da faculdade de Tecnologia da UNICAMP, pela oportunidade de ampliar os conhecimentos e a convivência com funcionários, professores conceituados e altamente capacitados durante todo o mestrado;

A todos os demais companheiros e colegas de curso e da faculdade.

*“Não deixe que a saudade sufoque,
que a rotina acomode,
que o medo impeça de tentar.
Desconfie do destino e acredite em você.
Gaste mais horas realizando que sonhando,
fazendo que planejando,
vivendo que esperando porque,
embora quem quase morre esteja vivo,
quem quase vive já morreu.”*

Luiz Fernando Veríssimo

RESUMO

Fármacos para tratamento de distúrbios psíquicos estão entre as substâncias ativas mais prescritas no mundo. A ocorrência destes em matrizes ambientais torna-se cada vez mais frequente. Estudos recentes indicam que o fármaco cloridrato de fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação da serotonina, está presente em estações de tratamento de efluentes e em águas de superfície. O aumento nas pesquisas ambientais acerca dos fármacos está ligado a sua baixa biodegradabilidade e sua persistência no ambiente. Este trabalho revisa os dados da literatura relacionados à ocorrência ambiental e dados de toxicidade para os organismos não-alvo do medicamento cloridrato de fluoxetina e contribui para a literatura científica com testes de toxicidade do fármaco com os organismos-testes *Daphnia similis* e *Pseudokirchneriella subcaptata*. Com base em resultados obtidos, realizou-se a estimativa de impacto ambiental para a Estação de Tratamento de Esgotos do rio Piracicamirim. No entanto, não existem padrões estabelecidos para a concentração de fármacos no ambiente, pois não são totalmente conhecidos seus efeitos ecotoxicológicos. Os dados compilados têm o intuito de contribuir para a priorização e determinação da necessidade de estudos que indiquem a ocorrência, destino, transporte, saúde e elucidação dos efeitos causados por fármacos, para a contínua melhoria dos padrões de água no Brasil e no mundo.

Palavras chave: Ecotoxicologia, Fármacos, Fluoxetina.

ABSTRACT

Drugs for treating mental disorders are among the most active substances prescribed in the world. The occurrence of these in environmental matrices is becoming increasingly common. Recent studies indicate that the drug fluoxetine hydrochloride, a selective inhibitor of serotonin, is present in sewage treatment effluents and in surface waters. The large increase in environmental research about the drug is linked to its low biodegradability and its persistence in the environment. This paper reviews the literature related to the occurrence and environmental toxicity data for the non-target organisms of the drug fluoxetine hydrochloride. An increase in contributions from the scientific literature is done on the species *Daphnia similis* and *Pseudokirchneriella subcaptata* exposure to fluoxetine hydrochloride. Based on results obtained, we carried out the environmental impact assessment for the Sewage Treatment Station Piracicamirim River. However, there are no established standards for the concentration of pharmaceuticals in the environment because they are not fully known ecotoxicological effects. The data collected are intended to help prioritize and determine the need for studies that indicate the occurrence, destiny, transport, health and elucidation of the effects caused by drugs, for the continuous improvement of standards of water in Brazil and worldwide.

Key words: Ecotoxicology, Drugs, Fluoxetine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma esquemático representando as principais rotas de exposição de fármacos em matrizes ambientais (fonte: Halling- Sorensen <i>et al.</i> , 1998).	8
Figura 2. Vista aérea da ETE Piracicamirim	31
Figura 3. Teste agudo com o medicamento genérico Cloridrato de Fluoxetina mediante o organismo-teste <i>Daphnia similis</i>	38
Figura 4. Teste crônico com o medicamento Cloridrato de Fluoxetina mediante o organismo-teste <i>P. subcaptata</i>	41
Figura 5. Imagem JSPEAR do ensaio de toxicidade aguda da entrada da ETE.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da Fluoxetina.....	18
Tabela 2. Resultados do teste de toxicidade crônica com <i>P. subcaptata</i>	64
Tabela 3. Crescimento algal no teste crônico em concentrações crescentes de cloridrato de fluoxetina.....	64
Tabela 4. Dados brutos do ensaio de toxicidade aguda da saída da ETE.....	65
Tabela 5. Dados brutos do ensaio de toxicidade aguda da entrada da ETE	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Fármacos e principais rotas de exposição ambiental.....	6
3.2 Detecção de Fármacos no Ambiente	12
3.3 Efeito dos fármacos na biota	16
3.4. Fluoxetina e Toxicidade	18
3.5 Estimativa do potencial de impacto ambiental.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Coleta das amostras	31
4.2 Materiais	32
4.3 Soluções de Cloridrato de Fluoxetina.....	33
4.4 Testes ecotoxicológicos <i>Daphnia similis</i>	34
4.5 Teste de toxicidade crônica com o organismo <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i>	35
4.6 Quantificação do Cloridrato de Fluoxetina no efluente de ETE	36
4.7 Avaliação de Parâmetros Físico - químicos	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1 Testes de Toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	37
5.1.2 Resultados do teste de toxicidade com cloridrato de fluoxetina (comercial).....	38
5.1.3 Resultados obtidos do composto padrão Cloridrato Fluoxetina.....	39
5.1.4 Resultados Obtidos dos ensaios de toxicidade aguda do Efluente da ETE Piracicamirim	40
5.2. Testes de Toxicidade crônica com <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i>	40
5.3 Cálculo da estimativa do Potencial de impacto ambiental	41
5.4 Estabelecimento da Ecotoxicidade Permissível para efluentes	43
5.5 Quantificação do cloridrato de Fluoxetina no efluente da ETE	44

6 CONCLUSÕES.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS	64
ANEXO A – Dados brutos dos ensaios de toxicidade crônica com <i>P. subcaptata</i>	64
ANEXO B – Dados Brutos: Ensaios ETE Piracicamirim	65

1 INTRODUÇÃO

Os estudos de impacto ambiental causados pelos produtos farmacêuticos têm sido considerados relevantes e com crescentes investigações. O aumento de estudos nessa última década é justificado pelo grande número de artigos publicados, a ocorrência generalizada desses compostos, suas propriedades particulares como a persistência no ambiente bem como sua capacidade de interferência em organismos mesmo em concentrações extremamente baixas.

Inicialmente, o problema foi destaque nos EUA na década de 1970 (GARRISON *et al.*, 1976; HIGNITE *et al.*, 1977) e quase uma década mais tarde, na Inglaterra (RICHARDSON *et al.*, 1985; AHERNE *et al.*, 1985; AHERNE *et al.*, 1990). No entanto, foi apenas em meados dos anos 90 com os avanços das técnicas de análises químicas que aumentou o interesse e conhecimentos sobre a presença desses compostos no ambiente.

Fármacos e produtos de cuidado pessoal tem sido o foco das pesquisas ambientais mais recentes, considerados contaminantes ambientais emergentes. Os fármacos são considerados contaminantes emergentes devido a estas moléculas serem biologicamente ativas. Além disso, a

grande maioria destes possui características lipofílicas e frequentemente apresentam baixa biodegradabilidade no ambiente. Estas propriedades intrínsecas apresentam grande potencial para bioacumulação e persistência no ambiente (CHRISTENSEN, 1998).

A variedade de especialidades químicas fármaco-terapêuticas bem como os metabólitos gerados, os fármacos excretados inalterados ou na forma conjugada através de urina e fezes, assim como os descartes inadequados e os medicamentos vencidos indicam a necessidade de estudos relacionados aos aspectos ecotoxicológicos, quantificação e identificação quanto à presença destes compostos nas várias matrizes ambientais e eficiência na remoção dos mesmos (CAMINADA, 2008).

Técnicas de cromatografia cada vez mais avançadas de detecção e quantificação com intervalos na faixa de $\mu\text{g/L}$ e ng/L permitiram que pesquisadores quantificassem grande número de compostos, ou seja, os fármacos, seus principais metabólitos e seus excipientes no ambiente, gerando como consequência maior preocupação na comunidade científica (KUMMERER *et al.*, 2001; PFLUGER *et al.*, 2001; ZUCCATO *et al.*, 2006; BUCHBERGER, 2007).

As substâncias são encontradas no ambiente de forma inalterada e/ou metabolizada. Han *et al.* (2006) descreve que na forma de metabólitos, algumas substâncias são mais lipofílicas e mais persistentes do que a droga original, não metabolizada.

Entre as substâncias ativas mais prescritas no mundo estão os fármacos da classe psiquiátrica como os antidepressivos, sedativos, ansiolíticos e hipnóticos. Os antidepressivos são responsáveis pela inibição seletiva da recaptação da serotonina, sendo que sua ação ocorre na modulação dos níveis do neurotransmissor serotonina (BROOKS *et al.*, 2003).

A fluoxetina é um medicamento antidepressivo sendo frequentemente utilizada para outros fins terapêuticos. Entre o grande número de compostos farmacologicamente ativos, esta droga deve ter atenção especial, pois tem sido detectada frequentemente em matrizes ambientais. Os episódios de ocorrência são uma consequência do elevado uso pela população e inadequado sistema de tratamento de águas residuárias nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs).

O conhecimento da eficiência de remoção dos compostos farmacêuticos nos sistemas atuais de tratamento é de grande importância, pois no futuro podem ser necessárias adaptações, ou mesmo a implantação de sistemas de tratamento complementares e mais eficazes para a remoção de fármacos do ambiente (BROOKS *et al.*, 2002).

No entanto, não há nenhum padrão estabelecido pelos órgãos ambientais para a concentração de fármacos nos efluentes. Com isso é necessário conhecer os padrões ecotoxicológicos, para poder relacioná-los às concentrações presentes nos efluentes. Para isso há diversos organismos que podem ser utilizados para testes ecotoxicológicos, entre eles estão a *Daphnia similis* e *Pseudokirchneriella subcaptata* organismos amplamente utilizados em ensaios para avaliar a toxicidade aguda e a toxicidade crônica, respectivamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência do medicamento cloridrato de fluoxetina no ambiente aquático.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar testes de ecotoxicidade com o medicamento genérico que contém Cloridrato de Fluoxetina, obtido comercialmente, utilizando os organismos-teste *Daphnia similis* e *Pseudokirchneriella subcaptata*;
- Realizar testes de ecotoxicidade com o composto padrão de Cloridrato de Fluoxetina utilizando o organismo-teste *Daphnia similis*;

- Comparar os resultados do medicamento genérico com os resultados do composto padrão de Cloridrato de Fluoxetina;
- Avaliar e quantificar a presença do medicamento Cloridrato de Fluoxetina em efluente final da Estação de Tratamento de Esgoto de Piracicaba;
- A partir dos dados da literatura e aqueles obtidos no presente estudo, pretendeu-se estimar o potencial da fluoxetina em causar impacto no corpo receptor estudado (Ribeirão Piracicamirim).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fármacos e principais rotas de exposição ambiental

A principal rota de exposição ambiental aos fármacos é causada pelo homem através da excreção inalterada de medicamentos na urina e fezes e disposição através do sistema de tratamento de esgoto (HOLM *et al.*, 1995). Outras fontes importantes de contaminação ambiental por produtos farmacêuticos são os efluentes das indústrias de produção farmacêutica e as águas residuárias provenientes de hospitais (LIN e TSAI 2002; PASCOE *et al.*, 2003; LARSSON *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008).

De modo geral, 40% a 90% da dose administrada de um fármaco são excretados inalterados ou na forma de seus metabólitos, principalmente na urina, fezes ou esterco animal, sendo frequentemente encontrados no esgoto doméstico (MULROY, 2001; CALAMARI *et al.*, 2003; BENDZ *et al.*, 2005).

Estudos têm aumentado a eficácia de busca por determinados produtos farmacêuticos no ambiente, resultando em maior número de publicações e contribuições na literatura científica. (CHRISTEN, 2010). Países e regiões do mundo divergem sobre a prevalência de doenças, resíduos de processos de tratamento, hábitos culturais e limitações econômicas relacionadas ao mercado farmacêutico (ZUCCATO *et al.*, 2006). No entanto, as regiões urbanas são as principais fontes de contaminação, devido à proximidade de hospitais e Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs). Além disso, a contribuição de resíduos provenientes de regiões rurais onde a agricultura, pecuária e aquicultura representam importantes formas de vida devem também ser consideradas como importante.

Uma das maiores preocupações com os fármacos na água são em lugares onde há o reuso indireto da água, ou seja, o efluente é descartado em córregos e rios, e então retornam como fonte natural para ser usado na produção de água potável nas Estações de Tratamento de Água (ETA) (NYENJE, 2010). Mesmo em baixas concentrações de fármacos é desaconselhável o reuso da água, devido à possível bioacumulação (JONES *et al.*, 2005).

Segundo Halling-Sorensen *et al.* (1998) as principais rotas de exposição dos diferentes tipos de fármacos no ambiente podem ser visualizadas em fluxograma esquemático na Figura 1.

A utilização em grande escala de medicamentos é decorrente do tratamento e da prevenção de doenças da humanidade e dos animais, além da automedicação da população, que sem prescrição médica utiliza remédios comuns, como os analgésicos, antiinflamatórios etc., e conseqüentemente resultam na grande quantidade de medicamentos nos corpos d'água, na flora e a fauna aquática (BOXALL, 2004; O'BRIEN, 2004).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2009) o consumo indiscriminado de medicamentos é devido às prescrições médicas incoerentes e vendas irregulares, aliado as propagandas ajudando a incentivar o consumo irregular dos mesmos.

EXPOSIÇÃO

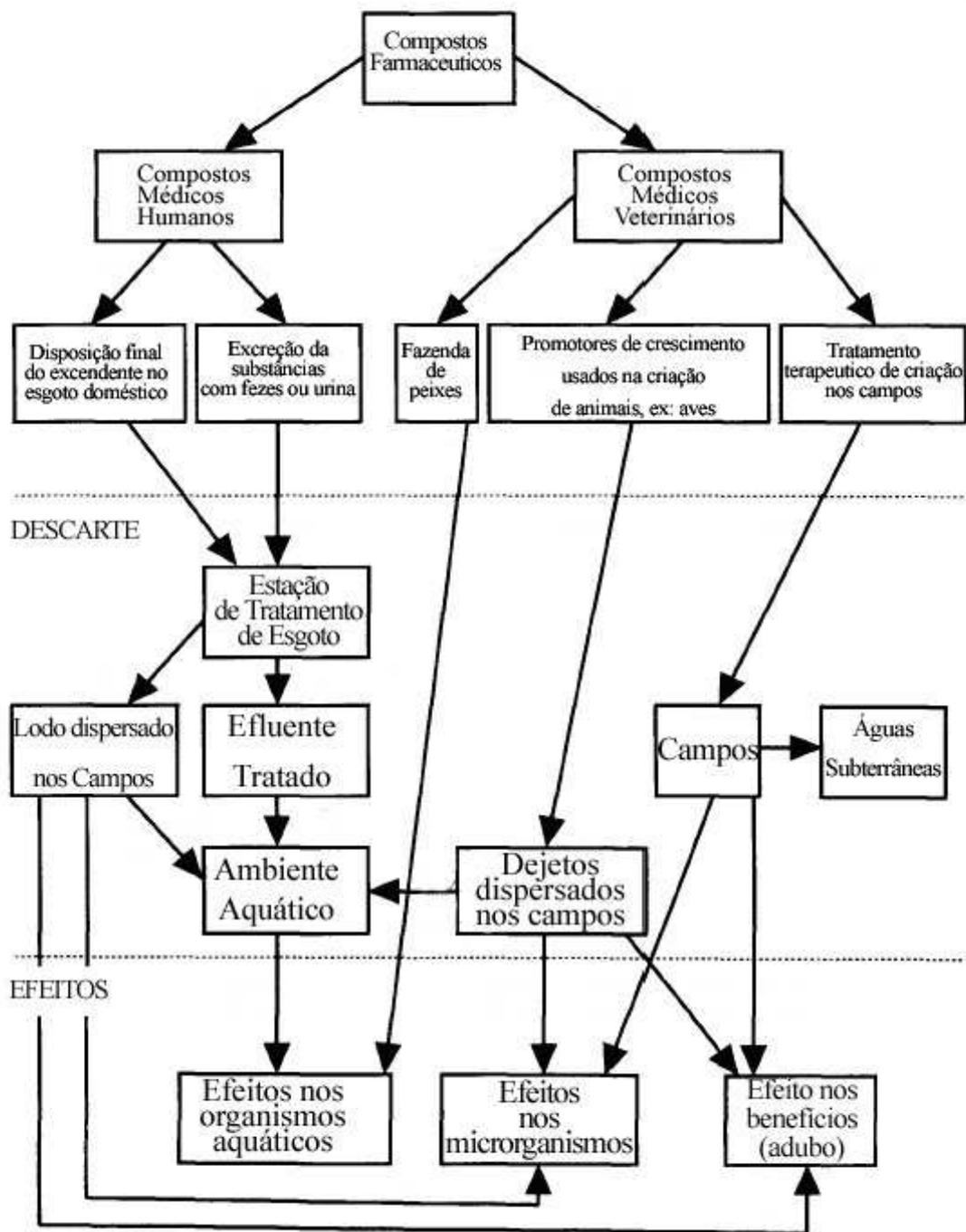


Figura 1. Fluxograma esquemático representando as principais rotas de exposição de fármacos em matrizes ambientais (fonte: Halling- Sorensen *et al.*, 1998).

A entrada dos medicamentos nas matrizes ambientais ocorre por diferentes rotas, incluindo a liberação de resíduos no processo de fabricação. A liberação para o ambiente pode ocorrer via administração do fármaco pelo seguinte caminho: depois da administração, o medicamento é absorvido, metabolizado e então excretado para a rede de esgoto e deste para o sistema de tratamento de esgoto ou diretamente para o ambiente (BOXALL, 2004). Os medicamentos podem também ser ingeridos e uma parte não ser metabolizada pelo organismo, sendo excretada na sua forma inalterada, desta forma estas substâncias são encontradas no ambiente de forma inalterada ou metabolizada.

A entrada de substâncias farmacêuticas nos sistemas aquáticos tem sido evidenciada pela sua presença em sistemas de tratamento de esgoto, rios, mares e águas subterrâneas (ASHTON *et al.*, 2004).

De acordo com Moretto *et al.* (2006) nas indústrias farmacêuticas os rejeitos são liberados das seguintes áreas de atuação:

- Área de Pesquisa e desenvolvimento: onde os rejeitos são desde solventes, sais e compostos orgânicos até corrosivos, oxidantes, resíduos biológicos e radionuclídeos;
- Síntese química: a maioria das drogas é produzida sinteticamente e os despejos são as substâncias que são utilizadas para purificar o composto;
- Extração de produtos naturais e fermentação: despejando como rejeito material orgânico;
- Na formulação dos medicamentos: os rejeitos são compostos sanitizantes e de esterilização para a limpeza do local.

Devido ao excesso do uso de remédios pela população, torna-se necessário o monitoramento da concentração de fármacos nos efluentes. A Coreia, por exemplo, tem dado grande atenção ao aumento das bactérias resistentes, devido ao uso frequente de antibióticos, com isso, a preocupação com o risco ambiental surgiu como o principal ponto de estudo no país (LEE *et al.*, 2008). No Brasil, a compra de medicamentos sempre foi controlada pela apresentação da receita médica, no entanto, alguns antibióticos eram vendidos sem a receita. De acordo com a nova determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) esta prática foi proibida. Com a resolução nº44 de 26 de outubro de 2010, todo e qualquer medicamento deve ser

vendido através de receita médica, em especial os antibióticos e remédios de tarja preta, sendo que as farmácias terão que ficar com uma cópia dessa receita e prestar contas no sistema da ANVISA.

Os impactos da saúde ambiental são mais difíceis de serem avaliados. A *United State Food and Drug Administration* (FDA), desde 1980 avalia os riscos ambientais do uso dos medicamentos veterinários que afetam os organismos aquáticos e terrestres, enquanto que para os medicamentos humanos a investigação acontece quando a concentração no ambiente aquático é $\geq 1 \mu\text{g/L}$. Estes estudos de impacto ambiental investigam o potencial de efeito negativo em peixes, *Daphnias*, algas, bactérias, minhocas, plantas e invertebrados. Para a avaliação de risco são usualmente feitos padrões de teste ecotoxicológico, utilizando-se organismo-teste, frequentemente com ciclo de vida curto, com foco na mortalidade do organismo e nas diferentes concentrações de compostos determinados (BOXALL, 2004).

A probabilidade de impactos ambientais pelos produtos farmacêuticos pode ser avaliada através de abordagens probabilísticas, usando dados existentes para contribuir para uma avaliação dos riscos ambientais (CHRISTESEN *et al.*, 2009).

Enick e Moore (2007) desenvolveram uma análise mostrando que se os valores de contaminação farmacêutica do ambiente são incorporados a avaliação, caracterização e gestão do risco, os resultados das avaliações refletem com mais precisão as necessidades dos vários intervenientes. Esse reconhecimento e precaução fornecem uma direção para futuras pesquisas e o desenvolvimento de políticas públicas.

As misturas de diferentes fármacos ilustram a necessidade de considerar o papel dos metabólitos na avaliação de riscos. Resultados experimentais confirmam que metabólitos ativos podem contribuir significativamente para o quociente de risco da mistura (ESCHER *et al.*, 2010).

A diretiva 93/67 da Comissão da Comunidade Européia classifica os fármacos de acordo com a concentração efetiva mediana em diferentes classes para os organismos aquáticos, sendo (*apud* CLEUVERS, 2003):

- Muito tóxico: Valor < 1mg/L;
- Tóxico: 1 – 10 mg/L;
- Nocivo: 10 – 100 mg/L.

Entre os fármacos encontrados em ambientes aquáticos estão os analgésicos, contraceptivos, antiinflamatórios, betabloqueadores, antibióticos, reguladores lipídicos, compostos neuroativos, entre muitos outros. Os organismos aquáticos são importantes alvos porque constantemente são expostos aos efluentes domésticos e industriais em toda sua vida (FENT *et al.*, 2006).

No processo de tratamento tradicional de água, que compreende as etapas de coagulação, floculação, sedimentação e filtração, seguido pela desinfecção não há eliminação completa dos fármacos (HAN *et al.*, 2006). Já no tratamento de esgotos pode haver reduções significativas ou não dos fármacos, pelo fato da presença elevada da diversidade microbológica presente nos sistemas biológicos de tratamento de águas residuárias.

Vários pesquisadores têm relatado a presença de compostos farmacêuticos, tanto de origem veterinária, quanto humana, em afluentes e efluentes de ETEs, ETAs e em outras matrizes ambientais tais como solo, sedimento e águas naturais, em concentrações que variam na faixa de $\mu\text{g/L}$ e ng/L (HALLING-SORENSEN *et al.*, 1998; STUMPF *et al.*, 1999; GHISELLI e JARDIM, 2006; ZUCCATO *et al.*, 2006;).

No tratamento de esgoto dois processos são geralmente importantes: adsorção às partículas de sólidos suspensos e biodegradação. A adsorção depende da interação hidrofóbica e eletrostática do fármaco com as partículas e a biodegradação depende de micro-organismos específicos. A fotodegradação tem demonstrado grandes eficiências nos tratamentos, mas exige que haja alta irradiação solar e, portanto, deve ser realizada em lugares com latitude e estação do ano de acordo com a irradiação (FENT *et al.*, 2006).

A avaliação da eficiência de remoção em ETEs foi estudada em detalhe, mostrando taxas de remoção que podem variar de 1 a 99% (TERNES, 1998; STUMPF *et al.*, 1999; LINDQVIST *et al.*, 2005; ROBERTS e THOMAS, 2006).

Normalmente, os melhores resultados de biodegradação dos fármacos são obtidos quando o tratamento de lodos ativados é realizado mediante o aumento no tempo de retenção hidráulica e da utilização de lodos estabilizados (FENT *et al.*, 2006). Torna-se importante ressaltar que se um fármaco específico não é detectado em efluente de ETE, não implica que ele tenha sido totalmente removido, mas que em algumas ocasiões, podem ter sido degradados, dando origem a metabólitos desconhecidos que posteriormente contaminam as águas superficiais (DAUGHTON e TERNES, 1999; ZWIENER *et al.*, 2001; HEBERER, 2002).

Tendo em vista que ainda é necessário melhor conhecimento do impacto que os fármacos produzem na saúde do ecossistema e na interação dos diferentes compostos, métodos são discutidos para reduzir essas substâncias no ambiente. Vários processos são desenvolvidos, por enquanto, somente em teoria como o controle de fármacos na fonte, a segregação, o tratamento dos resíduos para remover compostos farmacêuticos e a melhoria do sistema disponível para dados médicos. Essas fontes incluem a etiquetagem dos resíduos, disposição de controle e separação da urina (BOXALL, 2004).

Fármacos são projetados para ter um modo específico de ação e muitos deles são persistentes no corpo. Estas características tornam os produtos farmacêuticos importantes alvos de pesquisa onde devem ser avaliados para potenciais efeitos sobre a flora e fauna aquáticas (KAR e ROY, 2010; SANTOS *et al.*, 2010).

3.2 Detecção de Fármacos no Ambiente

Até poucos anos atrás o foco das pesquisas estava direcionado ao tratamento de efluentes, que apresentavam quantidades elevadas de nitratos, fosfatos e surfactantes. Ao longo dos últimos

dez anos, observaram-se quase universalmente melhorias quanto a esses critérios (HLUG, 2004). Sendo essas cargas poluidoras menos proeminentes objetivaram-se outros focos. Nestes são incluídos os resíduos de produtos farmacêuticos presentes na água. Em 1954, Demoll expressou sua preocupação com esta questão. No entanto, o trabalho de Demoll incluía apenas medicamentos veterinários, com repercussão para o direcionamento da questão no âmbito da medicina humana.

Nas décadas de 1970 e 1980 as disposições e pesquisas foram feitas somente em águas superficiais, onde Garrison *et al.* (1976) demonstraram a presença de 0.8 µg/L de ciprofloxacina em águas residuárias.

Richardson e Bowron (1985) relataram a presença de 186 substâncias na água superficial incluindo 0.44 µg/L carbamazepina (anticonvulsivante), 6.3 µg/L ciprofloxacina (regulador lipídico) e 3 ng/L 17α-etinilestradiol (hormônio).

Nos anos seguintes houve aumento relevante das detecções de fármacos, tornando-se cada vez mais evidente a presença de resíduos de produtos farmacêuticos em águas superficiais. A razão para a crescente ocorrência não está no descarte ilegal, mas no fato de que muitas dessas substâncias são resistentes à biodegradação. Outro fator importante são as melhorias de sensibilidade e eficiência dos métodos analíticos com limites de detecção em concentrações muito baixas.

Kasprzy-Hordern *et al.* (2008) relataram a presença de diversos compostos farmacêuticos, produtos de uso pessoal, disruptores endócrinos e drogas ilícitas em águas superficiais nos rios Taff e Ely em South Wales no Reino Unido. Entre os diversos compostos detectados, o medicamento antidepressivo amitriptilina foi detectado em quantidades de até 2,1 ng/L.

Carballa *et al.* (2008) realizaram estudo do consumo e taxas de excreção de 17 fármacos e dois perfumes (musk) pela população espanhola. Constatou-se a presença de diversos compostos em quantidades muito elevadas. Estima-se que a quantidade de alguns produtos farmacêuticos alcança a marca de centenas de toneladas por ano.

Farre *et al.* (2008), descreve a presença de fármacos, seus metabólitos e os produtos de transformação em águas superficiais e esgotos em Barcelona, na Espanha. Ainda na Espanha, Calderon-Preciado (2011), detectou a presença de 26 compostos farmacêuticos em locais de constante uso da irrigação agrícola.

Um estudo realizado ao longo do rio Llobregat na Espanha detectou 29 fármacos comumente utilizados pela população, entre eles a presença da fluoxetina ($\mu\text{g/L}$) e outros fármacos para tratamentos psíquicos. O rio possui taxas seguras para os organismos aquáticos apenas à montante (GINEBREDÁ *et al.*, 2010).

Drogas de abuso como ecstasy, heroína, anfetamina, morfina, cocaína, entre outros, foram detectados em águas superficiais ao longo da bacia do rio Ebro na Espanha. Apesar da impossibilidade na quantificação desses compostos, a presença deles estava na faixa de $\mu\text{g/L}$. A Espanha estima que haja um consumo total anual de 36 toneladas desses compostos, movimentando 1,1 bilhões de euros no mercado negro (POSTIGO *et al.*, 2010).

O governo da Suécia encomendou estudo sobre os efeitos dos produtos farmacêuticos. Os fatores considerados foram tempo de meia-vida, biodegradabilidade, ocorrência ambiental e estatísticas de vendas da Suécia. Foram selecionados 27 ingredientes farmacêuticos ativos para avaliações de perigos e riscos ambientais. No entanto, apenas 9 foram identificadas como perigosas para o ambiente, entre os compostos destacam-se os hormônios (CARLSSON *et al.*, 2006).

Estudos realizados com o efluente hospitalar na Suíça revelaram que a maior carga de fármacos era proveniente do centro de psiquiatria onde foram detectados 42 fármacos diferentes (ESCHER *et al.*, 2011).

Clarke e Smith (2011) realizaram estudos sobre os compostos químicos frequentemente presentes nos lodos de ETE. Os compostos foram avaliados com base na persistência no meio ambiente, toxicidade humana, bioacumulação nos seres humanos e ao meio ambiente,

ecotoxicidade e no número de estudos realizados sobre esses compostos. As substâncias químicas identificadas foram classificadas em ordem decrescente de prioridade: compostos perfluorados, alcanos policlorados, bifenilos naftalenos, organoestânicos, éteres difenil polibromados, triclosan, triclocarban, benzotiazóis, antibióticos e medicamentos; almíscares sintéticos; bisfenol A, compostos de amônio quaternário, esteróides, ésteres de ftalato ácido e polidimetilsiloxanos.

Águas subterrâneas em sítios nos Estados Unidos também foram avaliadas. Em 20% das amostras foram detectadas a presença de compostos farmacêuticos (FOCAZIO *et al.*, 2008). Ensaio posteriores foram realizados constatando que a presença de contaminantes agrícolas afetam o ciclo de vida do organismo *Chironomus riparius* em concentrações de $\mu\text{g/L}$ (PARK *et al.*, 2010).

Pesquisas analisaram os produtos farmacêuticos em efluentes a partir de uma estação de tratamento de águas residuais que serve cerca de 90 fabricantes de medicamentos a granel em Patancheru, perto de Hyderabad, Índia, local de grande produção de medicamentos genéricos para o mercado mundial. As amostras continham os mais altos níveis de produtos farmacêuticos relatados em qualquer efluente mundial. Os altos níveis de antibióticos de largo espectro levantaram preocupações sobre o desenvolvimento de resistência de bactérias. A concentração da droga abundante (ciprofloxacina) foi detectada em até 31.000 g / L; superior a níveis tóxicos para algumas bactérias em mais de 1000 vezes (LARSSON *et al.*, 2007).

A presença de fármacos foi também avaliada em lagoas de estabilização no Canadá onde diversos compostos foram detectados entre eles a fluoxetina em níveis de $\eta\text{g/L}$. No entanto, as maiores preocupações são acerca dos antibióticos, os quais interferem no processo de tratamento (MACLEOD e WONG, 2010).

No Rio Douro em Portugal, foram detectados seis diferentes fármacos onde a carbamazepina esteve presente em 100% das 87 amostras coletadas (MADUREIRA *et al.*, 2010).

Na África Subsaariana, atualmente menos de 30% dos esgotos são tratados, todo o restante é descartado em águas superficiais e subterrâneas, voltando como fonte de água potável. A qualidade dessas águas ficam comprometidas devido a grande quantidade de poluentes, e

consequentemente, ocorrem diversos danos ao ambiente, como por exemplo, a mortalidade dos organismos aquáticos. Existe grande necessidade de estudos para elucidação dos efeitos nessa região, além do aumento do saneamento básico ao alcance da população (NYENJE, 2010).

Além disso, há uma necessidade de pesquisas de subprodutos (metabólitos e produtos de transformação) na ocorrência, caracterização e destino em todos os tipos de água, principalmente na água potável (MONPELAT, et al. 2009).

3.3 Efeito dos fármacos na biota

Até o momento existem poucas informações sobre os possíveis efeitos ambientais causados por resíduos farmacêuticos, em particular poucas informações sobre os efeitos crônicos (OETKEN *et al.*, 2005). Estima-se que as investigações sobre esses efeitos aumentem, dado o número crescente de medicamentos oferecidos.

Contatou-se que as concentrações ambientais de produtos farmacêuticos podem causar efeitos na vida selvagem, se apropriadas ferramentas não são aplicadas para a avaliação do efeito (KUMMERER, 2009).

Pouco se sabe sobre a atividade potencial dos hormônios, que é de particular interesse devido a potenciais efeitos em longo prazo sobre a fertilidade e reprodução de organismos aquáticos. Além disso, há a necessidade de avaliar a atividade combinada de misturas de produtos farmacêuticos (FENT *et al.*, 2006). Estudos avaliaram o comportamento de peixes adultos quando expostos a diferentes tipos de hormônios e percebeu-se alterações no sistema endócrino e aumento da agressividade da espécie após a exposição (CLOTFELTER e RODRIGUEZ, 2006; CLUBBS e BROOKS, 2007).

A substância 17 α -etinilestradiol em concentrações de ng/L é capaz de causar a feminização em peixes e as concentrações detectadas são ambientalmente relevantes. Os efeitos dos tóxicos

não letais podem ser exemplificados pela disfunção hormonal causada no sistema sexual de moluscos por disruptores endócrinos presentes em ambientes contaminados, sendo este um problema mundial, pois ao alterar os órgãos sexuais dos moluscos, a multiplicação destes organismos torna-se impossível, não ocorrendo a perpetuação da espécie (STROBEN *et al.*, 1992; OEHLMANN *et al.*, 1996; BAUER *et al.*, 1997).

No início de 1990, especialmente no continente americano verificou-se a deformação de anfíbios, sendo detectadas rãs com pernas extras ou aparelho vocal atrofiado (OUELLET *et al.*, 1997, GARDINER e HOPPE, 1999). A causa desses efeitos está relacionada à presença dos pesticidas, hormônios e outros xenobióticos (HAYES *et al.*, 2002). A falta do aparelho vocal nestes organismos afeta a sua reprodução, uma vez que a vocalização tem a função de atrair parceiros. Da mesma forma, as pernas adicionais comprometem a reprodução impedindo o apego aos parceiros.

Oaks *et al.* (2004) observaram a extinção em massa entre as populações de abutres no sudeste asiático, provocada por diclofenaco. Os animais consumiram carne de gado doente contaminada com elevadas concentrações deste fármaco (droga antiinflamatória), como resultado de gota visceral, a deposição resultou em cálculos de ácido úrico em todos os órgãos das aves.

Os efeitos prejudiciais ainda não são claramente observáveis, entretanto Triebkorn *et al.* (1994) relatam que etinilestradiol, outros hormônios e desreguladores endócrinos provocaram o perda de peso e a mudança comportamentais em larvas de truta arco-íris. A microscopia eletrônica também pode identificar outros danos como disfunção do sistema celular óptico e no estrato do nervo óptico dos peixes.

As baixas concentrações de poluentes nem sempre são seguras, pois são capazes de provocar extinção em massa visível de organismos, com séria ameaça para as populações. Espera-se que futuramente todas as substâncias estranhas sejam revistas para potenciais efeitos nocivos, para se necessário introduzir medidas mitigadoras de redução da entrada desses poluentes no meio aquático. Isto também se aplica aos fármacos detectados no ambiente, mesmo aqueles que se apresentam em pequenas quantidades.

3.4. Fluoxetina e Toxicidade

A molécula de Fluoxetina foi descrita pela primeira vez na Literatura Científica como Lilly 110140 (na forma cloridrato), demonstrando alto potencial de inibição seletiva da recaptção de serotonina, sendo publicado na revista *Life Sciences* de Agosto de 1974. Desde então, amostras suplementares do composto Cloridrato de Fluoxetina têm sido disponibilizadas para investigadores fora dos laboratórios de pesquisa Lilly. A inibição da recaptção da serotonina permanece nas considerações como o principal mecanismo de ação da fluoxetina, um agente farmacológico extensamente usado, mesmo após mais de 30 anos de extensas investigações (FERNANDES *et al.*, 2009).

No início dos anos 70, surgiram evidências do desempenho da serotonina (5-hidroxitriptamina, ou 5-HT) no combate à depressão e ganhou corpo a hipótese de que o aumento da neurotransmissão da 5-HT seria um mecanismo viável para mediar a resposta antidepressiva. Baseado nesta hipótese, foram iniciados esforços para sintetizar agentes que inibissem a recaptção da 5-HT da junção sináptica. Estes estudos levaram à descoberta do Cloridrato de Fluoxetina, como inibidor seletivo da recaptção da serotonina (Prozac®; Eli Lilly), que teve a sua ação antidepressiva comprovada pela primeira vez no ano de 1979. O medicamento foi aprovado para o tratamento da depressão na Bélgica em 1986 e pela FDA dos Estados Unidos em 1987 (FERNANDES *et al.*, 2009).

A Tabela 1 expressa algumas características da molécula de fluoxetina.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da Fluoxetina

Nome IUPAC:	N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil) fenoxi]propano-1-amina
CAS NUMBER	54910893 (EPA, 2009)

Agente	Antidepressivo
Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO.HCl
Peso molecular	309,32613g/mol
Estado	Sólido cristalino
Cor	Pó branco cristalino ou quase branco
Ponto de fusão	158,4 °C e 158,9 °C
Solubilidade:	Facilmente solúvel em metanol, solúvel em água na concentração de 50 mg/ml e em diclorometano

O medicamento cloridrato de fluoxetina deve ser utilizado de acordo com a patologia variando-se a posologia de 20 a 60 mg/dia.

A fluoxetina é parcialmente metabolizada no fígado à norfluoxetina e ambos são excretados na urina. A meia vida de eliminação da fluoxetina é de 4 a 6 dias e a de seu metabólito ativo é de 4 a 16 dias. Cerca de 20-30% da dose de fluoxetina ingerida por humanos é excretada na sua forma de metabólito, ou seja, norfluoxetina (HARTKLE e MUTSLER, 1993).

A taxa de excreção da forma inalterada depende do fármaco, da dose e do indivíduo. Após administração oral, a fluoxetina é excretada em sua forma original em quantidade próxima a 10% principalmente através da urina (HIEMKE e HEARTTER, 2000).

De acordo com Besse e Garric (2010) em estudo realizado na França revelou que a fluoxetina é um dos medicamentos que requerem atenção especial por seus relevantes efeitos adversos.

Segundo Brooks *et al.* (2003) existe grande desconhecimento sobre o comportamento ambiental da fluoxetina, a ocorrência de resíduos deste composto em águas e sedimentos e seu potencial efeito sobre os organismos aquáticos, especialmente em invertebrados aquáticos.

Kolpin *et al.* (2002) detectaram em águas superficiais dos Estados Unidos 0,012 µg/L de Cloridrato de Fluoxetina. Em estudos posteriores, Kolpin *et al.* (2004) detectaram 0,018 µg/L de fluoxetina, além da presença de outros 75 compostos farmacêuticos em rios canadenses. Outra

demonstração da ocorrência da fluoxetina no ambiente aquático foi realizada por Metcalfe *et al.* (2003) encontrando 0.099 µg/L de cloridrato de fluoxetina rio Little (Ontário, Canadá).

Fármacos como fluoxetina, paracetamol, ibuprofeno, carbamazepina entre outros, foram detectados em terras agrícolas no Canadá a cerca de aproximadamente 0,10 m de profundidade do solo em quantidades de ng/L (LISSEMORE *et al.*, 2006; EDWARDS *et al.*, 2009).

Em estudos realizados na Croácia, Sérvia e Bósnia, foram quantificados 70 compostos químicos e a concentração de fluoxetina presente nas águas superficiais foi de 0,035µg/L (TERZIC, 2008).

Em outro estudo realizado em diversos rios em cidades da Espanha, a fluoxetina estava presente em 80% das amostras de águas superficiais sendo detectada em quantidades de 44 µg/L. Os rios de Madrid foram os mais contaminados pela presença dos fármacos (GONZALEZ-ALONSO *et al.*, 2010).

Um estudo encomendado pelos EUA, referente à toxicidade dos antidepressivos para algas/fitoplancton revelou inibição do crescimento, má distribuição das espécies e danos no microcosmo. A sertralina foi o composto mais tóxico testado seguido de fluoxetina e fluvoxamina (JOHNSON *et al.*, 2007). Em pesquisas posteriores elegeu-se um ranking com os 100 produtos farmacêuticos com nível de alerta, onde a fluoxetina apareceu em oitava posição na lista de produtos com potencial para causar efeitos ecológicos e seu metabólito, a norfluoxetina aparece na trigésima terceira posição na lista geral de compostos. Nesse estudo, a fluoxetina ainda aparece na lista de compostos com potencial efeitos teratogênicos, ocupando a décima nona posição (KUMAR e XAGORARAKI, 2010). Os lodos das estações de tratamento também foram analisados, sendo identificados 72 produtos farmacêuticos. A fluoxetina foi quantificada nos lodos em média de 171µg/L. A soma dos produtos investigados que são destinados ao solo foram estimadas em 210 – 250 mil toneladas de fármacos por ano (MCCLELLAN e HALDEN, 2010).

Desde que a União Européia proibiu o descarte de lodos no mar, passou-se a utilizar parte deles para fins agrícolas como modo de adubação das terras. No entanto, muitos compostos podem ser transportados ao longo da cadeia produtiva, como produtos orgânicos e fármacos. Redshaw *et al.* (2008) pesquisaram a capacidade de absorção da fluoxetina em hastes de *Brassica oleracea var botrytis* (Couve-flor) onde notou-se absorção de 5% da carga aplicada. Em pesquisas posteriores acerca da presença de compostos farmacêuticos em solos agrícolas, percebeu-se a persistência da fluoxetina durante os três anos de estudo, sem diminuição das taxas iniciais (WALTERS *et al.*, 2010).

Segundo Brooks *et al.* (2003) a fluoxetina acumula-se no cérebro, fígado e tecidos dos peixes. Os mesmos autores realizaram ensaios de toxicidade utilizando hidrócloridrato de fluoxetina com os organismos-teste *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* e *Pimephales promelas* onde a concentração letal (CL₅₀) foi 234 µg/L, 820 µg/L, e 705 µg/L, respectivamente. Para o organismo-teste *Pseudokirchneriella subcaptata* a concentração de 14 µg/L diminuiu a resposta de crescimento, e a concentração de 223 µg/L mostrou inibição da reprodução para *Ceriodaphnia dubia*. Realizaram ainda ensaios de toxicidade avaliando o crescimento com os organismos *Oryzias latipes*, *Chironomus tentans* e *Hyalella azteca*. O organismo *Oryzias latipes* foi afetado pela exposição à fluoxetina na concentração de 8,9 mg/L. Para *Chironomus tentans* e *Hyalella azteca* observou-se diminuição do crescimento em concentrações de 1,3 mg/kg e 5,6 mg/kg respectivamente.

Stanley *et al.* (2007) realizaram ensaios de toxicidade com *Daphnia magna* e *Pimephales promelas* utilizando hidrócloridrato de fluoxetina, sendo que a CL₅₀ foi de 170 µg/L e 133 µg/L respectivamente.

Nentwig (2006) realizou ensaios de toxicidade utilizando quatro classes de fármacos incluindo o medicamento fluoxetina para os organismos *Chironomus riparius*, *Lumbriculus variegates* e *Potamopyrgus antipodarum*, onde as concentrações que afetaram o crescimento/desenvolvimento estavam na faixa de µg/L.

A exposição crônica de *Daphnia magna* à fluoxetina na concentração de 36 µg/L, produziu efeitos evidentes sobre o processo de vida normal do organismo causando danos na taxa de fecundidade, razão sexual e mortalidade. Quando o medicamento foi combinado com ácido clofibrato resultou em deformidades significativas, incluindo carapaças malformadas e dificuldade de movimentação devido à falta de membros locomotores (FLAHERTY e DODSON, 2005). Uma explicação para esse resultado é que a fluoxetina, como um inibidor seletivo da recaptação da serotonina, aumenta a atividade da serotonina, cuja produção está ligada ao crescimento metabólico de *D. magna* (HECKMANN *et al.*, 2007; HANSEN *et al.*, 2008). Neuwoehner *et al.* (2010) em estudos sobre a toxicidade da fluoxetina para *Daphnia magna* constataram que ocorre aumento da toxicidade de acordo com o aumento do pH das soluções-teste.

Pery *et al.* (2008) realizaram ensaios de toxicidade para fluoxetina utilizando como organismo-teste *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Potamopyrgus antipodarum* e *Chironomus riparius*. Para *D. magna*, um estudo multi-geracional foi realizado com a exposição de organismos recém-nascidos. Os efeitos da fluoxetina sobre a população de *D. magna* e *P. antipodarum* foram em quantidades de 8,9 e 10 µg/L respectivamente. Os dafnídeos sofreram alterações no crescimento e a partir da segunda geração, efeitos mais pronunciados foram identificados. Os efeitos em *H. azteca* ocorreram na faixa de 33 µg/L, afetando o crescimento dos organismos expostos. Não houveram efeitos perceptíveis em *C. riparius*, sugerindo que a fluoxetina possui mecanismos específicos de ação sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas.

De-Lange *et al.* (2006) avaliaram o efeito de três medicamentos incluindo fluoxetina para a espécie de invertebrados bentônicos *Gammarus pulex*. Constataram que exposições a baixas concentrações de fluoxetina (10 ng/L) resultaram em diminuição significativa na atividade dos organismos e diminuição do crescimento populacional.

As concentrações de efeito observável de fluoxetina para o zooplâncton e organismos bentônicos foram em µg/L, ou seja, próximas às concentrações medidas no efluente das ETEs.

Em águas superficiais as medidas foram mais baixas (ng/L) mostrando o risco ambiental para efeitos crônicos (FENT *et al.*, 2006).

Estudos demonstraram a toxicidade da mistura de diferentes inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), incluindo a fluoxetina, fluvoxamina e sertralina, para a comunidade zooplanctônica, onde foram analisados 12.000 microcosmos. Os rotíferos e os copépodos foram mais sensíveis a essa mistura apresentando leves alterações em níveis de ng/L (LAIRD *et al.*, 2007; BLASCO e PICO, 2009; MORLEY, 2009,).

Estudos detectaram a presença de compostos farmacêuticos em células do fígado de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) do Canadá, influenciando no metabolismo oxidativo das células e provocando conseqüentemente danos aos organismos. Entre os compostos detectados o destaque é para a fluoxetina com altos índices de citotoxicidade (GAGNÉ *et al.*, (2006); THIBAUT e PORTE, 2008; SCHNELL *et al.*, 2009).

A exposição de peixes da espécie *Morone saxatilis* à fluoxetina durante 6 dias numa concentração de aproximadamente 20 µg/L diminuiu a atividade cerebral e a capacidade do organismo em capturar presas. Quando colocados em período de recuperação em água limpa, os danos permaneceram (LAVILLE *et al.*, 2004; GAWORECKI *et al.*, 2008). A injeção de fluoxetina em baixas concentrações em peixes dourados (*Carassius auratus*) provocou alterações no crescimento, danos no hipotálamo e telencéfalo, diminuição da ingestão de alimento e modificações nos níveis hormonais mostrando perturbações na fisiologia reprodutiva (MENNIGEN *et al.*, 2009; MENNIGEN *et al.*, 2010A e B). A exposição ambiental à fluoxetina tem o potencial de afetar os mecanismos de osmoregulação intestinal e excreção de nitrogênio branquial em peixes (MORANDO *et al.*, 2009).

Nakamura *et al.* (2008) e Paterson e Metcalf (2008) realizaram pesquisas acerca da bioacumulação da fluoxetina em peixes (*Oryzias latipes*). No teste de bioacumulação, as concentrações de fluoxetina e seu metabólito principal, norfluoxetina, no corpo dos organismos e no fígado foram medidos. Os fatores de bioconcentração de fluoxetina foram de 8,8; 3,0 x 10 e

$2,6 \times 10^2 \mu\text{g kg}^{-1}$ no corpo e $3,3 \times 10^2$; $5,8 \times 10^2$ e $3,1 \times 10^3 \mu\text{g kg}^{-1}$ no fígado em pH 7,8 e 9, respectivamente.

A exposição crônica de anfípodos marinhos à concentrações de 100 ng/L de fluoxetina alterou a fototaxia e geotaxia desses organismos, além dos níveis de serotonina. Os parasitas hospedeiros desses organismos também sofreram alterações comportamentais (GULER e FORD, 2010).

A exposição de dois gastrópodos de água doce (*Valvata piscinalis* e *Potamopyrgus antipodarum*) à presença de fluoxetina em níveis de mg/L foi avaliada, ocorrendo diminuição dos parâmetros de reprodução (tais como o número de recém-nascidos e o número de embriões na bolsa incubadora), tamanho dos organismos, aumento no tempo de maturação dos organismos jovens e alterações nos níveis de testosterona (GUST *et al.*, 2009; GUST *et al.*, 2010 a, b e c).

Em bioensaio utilizando peixe *Oryzias latipes*, Foran *et al.* (2004) mostraram os níveis de estrógeno no peixe fêmea e Iwamatsu *et al.* (1993) observaram maturação precoce de oócitos, fatores estes ocasionados pela exposição ao cloridrato de fluoxetina.

Em ensaios com *Chironomus tentans* foram identificados por Brooks *et al.* (2003) um CL50 de 15,2 mg/kg de sedimento contendo cloridrato de fluoxetina. O crescimento das larvas também se mostrou reduzido.

Em ensaios com ratos, há relatos de toxicidade aguda em níveis de mg/L para fluoxetina e seu metabólito, norfluoxetina (NALECZ-JAWECKI, 2007).

Testes de toxicidade aguda geralmente têm falhado na detecção da ação sutil provocada pelos compostos farmacêuticos em concentrações ambientalmente relevantes e têm muitas vezes, negligenciado o fato de que a toxicidade pode ser influenciada por efeitos cumulativos e sinérgicos (SCHNELL, 2009).

3.5 Estimativa do potencial de impacto ambiental

O controle das características dos efluentes líquidos, baseado em análises químicas e limites estabelecidos, tem sido efetuado desde o ano de 1976 para verificação dos limites estabelecidos na legislação brasileira. Tais limites foram originários de documentos norte-americanos, no entanto, naquela época, imaginava-se que os limites individuais das substâncias seriam suficientes para preservar a vida aquática dos corpos hídricos receptores de efluentes. Ao mesmo tempo, nos países norte-americanos, o controle legal das características dos efluentes foi diferenciado, o qual se baseou na implantação progressiva de tratamentos no período de 1972 até 1984 e, posteriormente, em ações fiscalizatórias previstas quando todos os efluentes líquidos possuísem tratamento para remoção de poluentes convencionais tais como Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), pH, sólidos, bactérias patogênicas, entre outros (MOUNT, 1984).

Embora a abordagem norte-americana de controle de efluentes líquidos tenha sido diferente daquela utilizada no Brasil, ambas convergiram para a necessidade de tratamento de emissões líquidas. Nesse contexto, a experiência norte-americana permitiu constatar que os efluentes, mesmo após o tratamento não estavam isentos de provocar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos. Um levantamento parcial realizado nos EUA, no início dos anos 1980, indicou que 79% dos efluentes domésticos e 62% dos efluentes industriais apresentavam efeitos tóxicos após os tratamentos para remoção de poluentes convencionais. Ainda mais relevante foi o fato de que 43% dos efluentes domésticos e 46% dos efluentes industriais tinham potencial de causar efeitos tóxicos em diferentes recursos hídricos (TEBO, 1986).

Estudos brasileiros demonstraram que os sistemas de tratamento em muitos casos são ineficientes para a remoção da toxicidade de efluentes, mesmo quando o despejo atende os limites estabelecidos nos padrões de emissão (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Nesses estudos também foi demonstrado que a toxicidade remanescente dos efluentes, após os tratamentos pode causar efeitos nos respectivos corpos hídricos receptores. Portanto, hoje é reconhecido que somente os ensaios ecotoxicológicos possuem a peculiaridade de caracterizar os efluentes líquidos de forma mais abrangente, englobando todos os seus constituintes químicos,

principalmente pelo fato de acusar a biodisponibilidade das substâncias presentes, bem como em detectar o efeito tóxico resultante das interações entre essas substâncias químicas.

Desde 1990 a CETESB tem efetuado o enquadramento legal dos efluentes que causam efeitos tóxicos em um corpo hídrico, com base nos ensaios ecotoxicológicos. Para tanto, foram utilizados os artigos 2º e 3º (inciso V) do regulamento da Lei nº 997 (SÃO PAULO, 2003a) aprovado pelo Decreto Estadual nº 8468 (SÃO PAULO, 2003b) e suas alterações. Assim, no passado o controle ecotoxicológico ocorreu de maneira implícita uma vez que, resumidamente, os artigos mencionados proibem a liberação de poluentes que tornem ou possam tornar o meio aquático impróprio, nocivo ou ofensivo à fauna e à flora.

No entanto, recentemente os instrumentos legais se tornam explícitos quanto ao controle ecotoxicológico de efluentes. De acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, Art. 34, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam as condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis:

§ 1º O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente (BRASIL, 2005).

O princípio “não deverá causar” significa que o órgão ambiental deve autuar o emissor com base na constatação direta de que o efluente causa efeitos tóxicos (agudos ou crônicos) no corpo receptor. Além desse, outro fundamento legal específico pode ser utilizado quando a redução dos efeitos tóxicos no efluente líquido implicar em melhorias significativas para o ambiente aquático, mesmo que atendendo a Resolução SMA-03/00 (SÃO PAULO, 2000). Nesse sentido, o artigo 24 (parágrafo único) da Resolução CONAMA 357/2005 permite ao órgão ambiental competente a exigência de critérios ecotoxicológicos mais restritivos para o efluente, ou mesmo de melhor tecnologia para o seu tratamento, desde que haja uma fundamentação técnica proveniente dessa entidade.

Partindo desses princípios, para a estimativa do potencial de efeito tóxico de um efluente é necessária uma avaliação inicial (estabelecimento da ecotoxicidade permissível), além da qual pode ser necessária uma avaliação complementar (reavaliação do limite de ecotoxicidade), que possibilite angariar conhecimentos específicos tanto da ecotoxicidade como da dispersão do efluente.

A presença de agentes químicos nos ecossistemas aquáticos representa sempre um risco aos seres vivos, não existindo na prática o que se possa chamar de risco zero, ou seja, 100% de segurança de que não ocorram efeitos tóxicos quando da exposição dos organismos aos agentes químicos. Nesse sentido, o risco que um agente químico impõe aos organismos aquáticos é avaliado por meio do julgamento científico da probabilidade de danos que suas concentrações ambientais, conhecidas ou estimadas, podem causar (CETESB, 2010).

No caso de efluentes líquidos a avaliação de risco também é pertinente, visto que esses despejos são constituídos por vários agentes químicos lançados continuamente nos recursos hídricos. Assim, no processo de julgamento científico para avaliar o risco que um efluente impõe ao ambiente aquático são consideradas, inicialmente, sua ecotoxicidade e sua diluição no corpo de água (CETESB, 2010).

De acordo com CETESB (2010) a avaliação do impacto é estimada comparando-se a concentração do efeito tóxico nos testes de toxicidade com a concentração do efluente no corpo receptor.

A concentração do efluente no corpo receptor (CER) expressa em porcentagens é calculada pela equação (01):

$$CER = \frac{QE}{QE + Q_{7,10}} \times 100 \quad (01)$$

Onde:

QE = vazão do efluente;

$Q_{7, 10}$ = vazão mínima anual do rio, média de sete dias consecutivos, com probabilidade de 10 anos de retorno.

Quando o $Q_{7, 10}$ não se aplica a um determinado corpo receptor, devem ser utilizados os dados de vazão mínima apropriados. Quanto ao teste de toxicidade aguda, foi demonstrado experimentalmente que ao nível de 1/3 da Concentração Letal (CL_{50}) ou Concentração Efetiva (CE_{50}) praticamente cessam os efeitos tóxicos agudos. Assim, a estimativa de impacto para prevenir os efeitos agudos é obtida como pode ser visto na equação (02):

$$CER < \text{ou} = \frac{CE_{50} \text{ ou } CL_{50}}{3} \quad (02)$$

Sabe-se, também, que a relação entre a CL_{50} ou CE_{50} e Concentração Efeito Não Observável (CENO) está na ordem de 1/10. Portanto, com a obtenção dos dados de toxicidade aguda (CL_{50} ou CE_{50}) é possível estimar a toxicidade crônica, expressa em CENO. Desse modo, a estimativa de impacto para prevenir efeitos crônicos é obtida tanto com os resultados estimados através de testes agudos como através de testes crônicos, como mostrado na equação (03):

$$CER < \text{ou} = \frac{CE_{50} \text{ ou } CL_{50}}{10} \quad \text{ou} \quad CER < \text{ou} = CENO \quad (03)$$

A estimativa apresentada até este ponto se aplica as situações de mistura completa do efluente no corpo receptor, baseando-se na utilização de 3 espécies, no mínimo de organismos aquáticos bem como na suposição que não exista variabilidade na toxicidade do efluente ao longo do tempo. No entanto, a utilização de um número reduzido de espécies pode gerar razoável incerteza quando se efetua uma estimativa de impacto, pois alguns estudos têm demonstrado que a sensibilidade entre as diversas espécies de organismos pode variar ao redor de dez vezes. Portanto, esse fator de incerteza deve ser considerado, pois é praticamente impossível avaliar a toxicidade de um efluente com a maioria dos grupos taxonômicos existentes.

No que se refere à variabilidade na toxicidade de efluentes foi demonstrado que pode haver variações ao redor de dez vezes. Assim, até que seja demonstrado que o efluente mantém um

nível de toxicidade constante, o fator dez deve ser também considerado em uma estimativa de impacto. Considerando as fontes de incerteza acima, recomenda-se que a estimativa de impacto seja efetuada utilizando-se as equações 4, 5 e 6:

- Para evitar efeitos tóxicos agudos

$$\text{CER} < \text{ou} = \frac{\text{CE50 ou CL50}}{300} \quad (04)$$

- Para evitar efeitos tóxicos crônicos

$$\text{CER} < \text{ou} = \frac{\text{CE50 ou CL50}}{1000} \quad (05)$$

ou ,

$$\text{CER} < \text{ou} = \frac{\text{CENO}}{100} \quad (06)$$

Os níveis de incerteza apresentados podem ser reduzidos desde que seja efetuada uma avaliação da toxicidade do efluente, e a variabilidade nos níveis de toxicidade seja determinada juntamente com um estudo quantitativo da dispersão do efluente no rio.

É importante ressaltar que para os efeitos tóxicos carcinogênicos, assume-se que há a probabilidade de ocorrência de dano em qualquer nível de exposição, ou seja, não há limiar de tolerância, não sendo estabelecida dose de referência. Alguns estudos têm demonstrado que uma significativa redução da toxicidade de efluentes brutos pode ser obtida através de tratamentos convencionais. No entanto, mesmo após o tratamento, os efluentes podem apresentar toxicidade remanescente, a qual pode ser incompatível com a qualidade de água para preservação da vida aquática. Nesses casos, a toxicidade do efluente deve ser reduzida aos níveis solicitados pelo órgão de controle, utilizando a metodologia e o conhecimento técnico científico disponível (FENT *et al.*, 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram realizados ensaios ecotoxicológicos com três diferentes tipos de amostras.

Na primeira etapa dos ensaios foram preparadas soluções-teste a partir do medicamento genérico de cloridrato de fluoxetina obtido comercialmente.

Na segunda etapa os ensaios de toxicidade foram realizados a partir de uma solução padrão de cloridrato de fluoxetina, ou seja, sem os excipientes. O composto puro foi fornecido pelo laboratório de Análises Cromatográficas da USP/São Carlos.

Na terceira etapa de avaliação da toxicidade foram realizados ensaios com amostras ambientais coletadas na ETE Piracicamirim, município de Piracicaba, SP. Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados com o organismo teste *Daphnia similis* devido à sensibilidade do organismo a diversos agentes químicos; possibilidade de cultivo e manutenção no Laboratório; ampla distribuição geográfica, o que representa a importância da resposta biológica obtida; a utilização dos crustáceos na ecotoxicologia na grande maioria dos países, o que permite a comparação entre os estudos e a proteção do ambiente aquático.

Relizou-se ensaios de toxicidade crônica com o organismo *Pseudokirchneriella subcaptata* com a finalidade de comparação dos resultados do medicamento genérico.

4.1 Coleta das amostras

Para a quantificação do cloridrato de fluoxetina coletou-se amostras de efluente na ETE Piracicamirim, no Município de Piracicaba – SP (FIGURA 2).



**Figura 2. Vista aérea da ETE Piracicamirim
(Fonte: COM Engenharia)**

O sistema de tratamento de esgoto da bacia do ribeirão Piracicamirim foi projetado para atender 100.000 habitantes, sendo composta por:

- Estação Elevatória de Esgoto (EEE) que contém: gradeamento, medidor de vazão, conjuntos moto-bombas com inversores de frequência, gerador e cabine de força com transformadores.

- Linha de recalque confeccionada em poliéster reforçado com fibra de vidro com diâmetro de 600 mm e extensão de aproximadamente 600 m.

- ETE com as seguintes unidades: gradeamento mecanizado, caixa de areia, reatores anaeróbios de fluxo ascendente, lagoa aerada, decantador laminar, tratamento e recirculação de lodo, tratamento de gases, oficina, laboratórios e salas de administração, ocupando área total de 30.000 m².

O ribeirão Piracicamirim, enquadrado como classe 2 é o corpo receptor dos esgotos tratados, pela ETE. As vazões típicas do ribeirão segundo dados fornecidos pelo DAEE (Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo) são:

Q médio = 1.100 L/s (plurianual)

Q 7,10 = 246 L/s

Q 95 = 400 L/s

As amostras da ETE Piracicamirim foram coletadas nos pontos de entrada e saída da estação. Os recipientes foram ambientados e preenchidos em toda sua capacidade, afim de que não houvesse alterações das propriedades das amostras.

As amostras foram conservadas sob refrigeração desde o momento da coleta. Parte da amostra foi destinada ao laboratório de análises Cromatográficas da USP/São Carlos para realizar a detecção de diversos compostos farmacêuticos, entre eles o cloridrato de fluoxetina.

4.2 Materiais

A realização dos ensaios utilizou um conjunto de vidrarias que foi previamente separada, identificada e lavada conforme os Procedimentos Operacionais Padrão do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Microbiologia Ambiental (LEAL) e após sua utilização foi lavada novamente com acetona P.A. e ácido nítrico (10%) a fim de que não houvesse contaminação do material e não fossem disseminados no laboratório resíduos ou materiais contaminados com cloridrato de fluoxetina.

Para a realização dos testes agudos utilizou-se:

- Balões volumétricos com capacidade para 50 e 100 mL;
- Pipetas graduadas;

- Pipetas Pasteur;
- Cálices para teste-agudo com *D. similis*;
- Microplaca para teste-crônico com *P. subcaptata*;

4.3 Soluções de Cloridrato de Fluoxetina

O Medicamento cloridrato de fluoxetina (20 mg/mL) foi obtido comercialmente e produzido pela EMS/AS.

De acordo com as informações da bula do medicamento genérico, cada mL da solução contém em sua composição:

- Cloridrato de fluoxetina = 22,4 mg (equivalente a 20 mg de Fluoxetina);
- Veículo q.s.p. (quantidade suficiente para) = 1 mL (ácido cítrico, aroma de pêssego, edetato dissódico diidratado, metabissulfato de sódio, propilenoglicol, sacarina diidratada sódica, água deionizada).

A empresa não disponibilizou dados quanto ao grau de pureza do cloridrato de fluoxetina usado na fabricação do medicamento. A utilização desta marca de cloridrato de fluoxetina está relacionada com as informações obtidas no comércio de que é o genérico mais utilizado pela população.

O Laboratório de Análises Cromatográficas cedeu gentilmente a solução padrão de Fluoxetina na concentração de 1 g/L^{-1} para realização dos ensaios de toxicidade aguda.

Para o preparo dessa solução pesou-se 10 mg de Cloridrato de Fluoxetina e diluiu-se em 10 mL de água ultra pura de filtro de $0,22 \mu\text{m}$ sem a presença de micro-organismos patogênicos. Obteve-se assim, uma solução de 1000 mg/L^{-1} ou seja, 1 g/L^{-1} .

4.4 Testes ecotoxicológicos *Daphnia similis*

Foram preparadas as águas de diluição reconstituídas de acordo com a necessidade do organismo-teste. Para o organismo *Daphnia similis* a água de diluição foi preparada com água mineral.

Os testes ecotoxicológicos seguiram a ABNT/NBR 12.713 (2004), que define o método de ensaio com o organismo-teste *Daphnia similis*, tendo em vista as características quanto à dureza, a qual deve estar entre 40 e 48 mg/L de CaCO₃.

As soluções-teste utilizadas na primeira etapa foram preparadas a partir da solução estoque de fluoxetina (comercial) 20 mg/20 mL, ou, 1000 mg/L, acrescida de água de cultivo.

As concentrações utilizadas nesses testes foram limitadas pela menor concentração que causa imobilidade a 100% dos organismos expostos e a maior que não apresenta efeito, sendo utilizadas as seguintes concentrações de Cloridrato de Fluoxetina (medicamento genérico): 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0; e 1,5 µg/L.

Neonatos de *D. similis* com idade entre 6 e 24 horas foram expostos às diferentes concentrações, sendo que a imobilidade ou morte resultantes da exposição dos organismos à amostra foram tratados para a obtenção do parâmetro final, em períodos de exposição de 48 horas em condições padronizadas de ensaio. Cada um dos ensaios foi realizado juntamente com um controle, no qual vinte organismos foram expostos somente à água do cultivo, sem alimentação e permaneceram nas mesmas condições do ensaio. Esse controle não permite a perda (imobilidade ou morte) de 10% do total e foi útil para validar os ensaios com as amostras ambientais.

A leitura dos ensaios foi feita por meio da observação da impossibilidade do organismo se movimentar na coluna d'água (imobilidade). Os resultados obtidos foram registrados em formulários padronizados.

A partir dos dados obtidos, o número de organismos imóveis nas várias concentrações de amostras que fizeram parte do teste, foi calculado o valor da CE 50, 48 horas e o respectivo intervalo de confiança, utilizando-se o programa JSPEAR SPEARMAN-KARBER.

Na segunda etapa foram realizados os ensaios de Toxicidade aguda utilizando soluções-teste preparadas a partir da solução padrão de fluoxetina da USP/SC.

Os procedimentos operacionais para o ensaio seguiram os mesmos procedimentos anteriores da ABNT/NBR 12.713 (2004). As concentrações utilizadas para os ensaios foram: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 µg/L.

Foram realizados na terceira etapa, os ensaios de toxicidade aguda com o efluente bruto e tratado da ETE Piracicamirim, onde foram avaliados os pontos de entrada e saída em diferentes diluições. As diluições das amostras iniciais foram: 1; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 e 100% para cada ponto de coleta.

4.5 Teste de toxicidade crônica com o organismo *Pseudokirchneriella subcaptata*

Os ensaios de toxicidade para o organismo *Pseudokirchneriella subcaptata* em microplaca seguiram normatização canadense EPS 1/RM/25, onde o organismo é exposto a diferentes concentrações de Cloridrato de Fluoxetina e comparado com um controle negativo adequado, de acordo com o diluente utilizado no preparo da amostra.

A microplaca permanece sob condições controladas de luminosidade, temperatura e agitação, por um período de 72h. Os resultados são avaliados através de uma curva dose resposta e a CI (Concentração de Inibição) 50% que são calculadas para cada teste realizado. A contagem das células é feita com a utilização de uma câmera de Neubauer.

4.6 Quantificação do Cloridrato de Fluoxetina no efluente de ETE

As análises e detecções do medicamento cloridrato de fluoxetina no efluente da ETE Piracicamirim foram desenvolvidas em parceria com o Laboratório de Análises Químicas da USP/São Carlos.

A coleta de amostras foi realizada em 09 de junho de 2010 na ETE Piracicaba-SP e encaminhadas para o laboratório de análises químicas da USP/São Carlos. A técnica utilizada para análise do medicamento foi a de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com um Espectrofotômetro de Massa.

4.7 Avaliação de Parâmetros Físico - químicos

Os parâmetros físico-químicos estão diretamente relacionados à presença de matéria orgânica e inorgânica na água e influenciam a toxicidade. Os parâmetros que mais interferem na toxicidade são o pH, a presença de resíduos sólidos, íons e de contaminantes propriamente ditos.

Para que não houvesse contaminação dos equipamentos de laboratório, não foram avaliados os parâmetros das soluções-teste, mas obteve-se previamente os valores de pH, OD, Dureza e Condutividade da água de cultivo dos organismos-teste.

Os parâmetros pH, temperatura e condutividade do efluente da ETE foram avaliados no momento da coleta com equipamentos do departamento de esgotos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo estão organizados os resultados obtidos durante o período de estudo.

5.1 Testes de Toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Todos os organismos-teste *Daphnia similis* utilizados neste trabalho permaneceram na faixa de sensibilidade de 0,28 a 0,40 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, correspondente à carta controle do LEAL - FT/UNICAMP.

Os testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* foram divididos em três etapas, onde a primeira corresponde aos ensaios utilizando o produto comercial Cloridrato de Fluoxetina. A segunda etapa corresponde aos ensaios de toxicidade aguda utilizando o composto padrão (98%) de Cloridrato de Fluoxetina obtido pelo Laboratório de Análises Cromatográficas da USP São Carlos e a terceira etapa compreende os testes de toxicidade aguda realizados com o efluente da ETE Piracicamirim.

5.1.2 Resultados do teste de toxicidade com cloridrato de fluoxetina (comercial)

Nos resultados obtidos não se observou efeito na concentração 0,1 µg/L e na concentração de 1,5 µg/L o efeito tóxico afetou 100% da população exposta, levando a total imobilidade.

O CE50 observado nos testes de toxicidade aguda do medicamento genérico cloridrato de fluoxetina obtido comercialmente foi de 0,70 µg/L e intervalo de confiança entre 0,66 e 0,75. A Figura 3 expressa os resultados obtidos.

De acordo com dados obtidos na bula do medicamento utilizado, cada 20 mg/mL de cloridrato de fluoxetina corresponde a 20 mg/mL de Fluoxetina. Portanto, os resultados expressam a quantidade de Fluoxetina capaz de causar efeito aos organismos-teste.

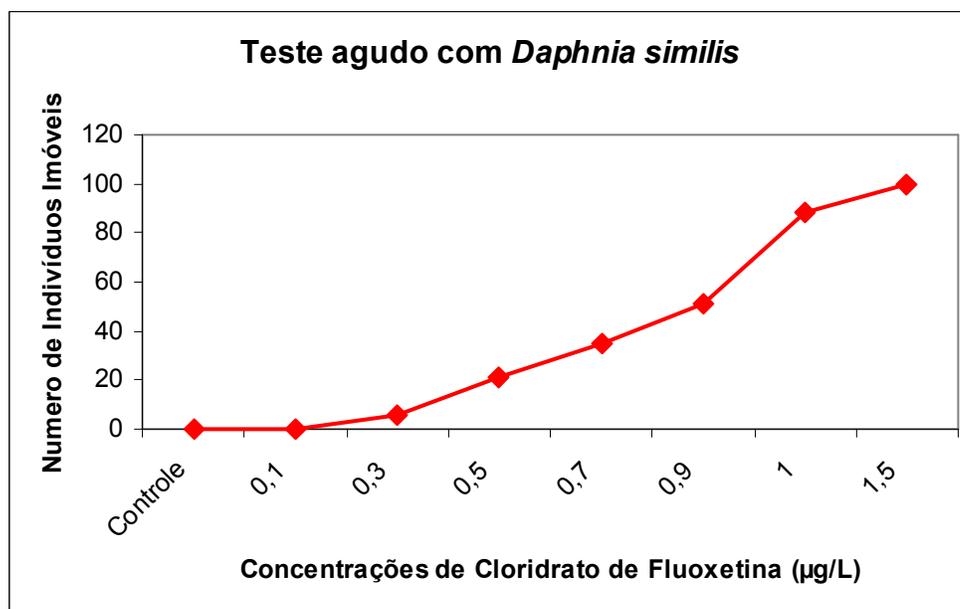


Figura 3. Teste agudo com o medicamento genérico Cloridrato de Fluoxetina mediante o organismo-teste *Daphnia similis*.

O resultado obtido CE50 com o medicamento genérico cloridrato de fluoxetina, demonstrou comportamento próximo aos testes realizados por Pery *et al.* (2008). De todos os trabalhos realizados, este foi de 8,9 µg/L para *Daphnia magna*. Deve-se levar em consideração que esse organismo-teste apresenta maior resistência frente a alguns poluentes quando comparado à *Daphnia similis*.

5.1.3 Resultados obtidos do composto padrão Cloridrato Fluoxetina

Nos resultados obtidos através destes ensaios pode-se observar em primeiro lugar que as concentrações de diluição aumentaram proporcionalmente devido a pureza do composto. As concentrações utilizadas foram: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 µg/L.

O CE50 observado foi de 502µg/L com intervalo de confiança entre 434 e 581.

Acredita-se que a diferença entre os resultados do medicamento genérico e do composto padrão pode ter ocorrido devido aos excipientes presentes na solução do medicamento genérico. Esses compostos são necessários na comercialização do medicamento por muitos fatores, como por exemplo a dissolução completa, estabilização do princípio ativo, aumento do prazo de validade e melhoria das condições de apresentação do medicamento.

No entanto, recomenda-se avaliar a toxicidade desses excipientes para maior elucidação dos efeitos ecotoxicológicos, pois os mesmos podem ser os possíveis causadores da toxicidade adicional apresentada nos resultados. Outro fator importante que pode ocasionar diferenças nos resultados é a sensibilidade da cultura. Com maior aprofundamento dos estudos poderemos chegar a níveis seguros de exposição a esses compostos e controlar a presença deles nas matrizes ambientais.

5.1.4 Resultados Obtidos dos ensaios de toxicidade aguda do Efluente da ETE Piracicamirim

Nesta etapa de avaliação da toxicidade aguda foram obtidos resultados referentes aos pontos de entrada e saída da ETE. As diluições das amostras iniciais foram: 1; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 e 100% para cada ponto de coleta.

O CE50 da entrada da ETE foi 52,5% com intervalo de confiança entre 43,6 – 63,4. O efluente final da ETE não apresentou toxicidade aguda para o organismo *Daphnia similis* em nenhuma das concentrações testadas.

Pode-se perceber através destes resultados a eficiência de remoção da toxicidade, pois o efluente de entrada se mostrou mais tóxico do que o efluente da saída em relação à população de organismos-teste.

5.2. Testes de Toxicidade crônica com *Pseudokirchneriella subcaptata*

Na Tabela 2 (Anexo A) estão expressos os resultados referentes ao ensaio preliminar com o organismo *Pseudokirchneriella subcaptata*.

Notou-se a partir dos resultados preliminares que todas as concentrações de Cloridrato de Fluoxetina apresentaram toxicidade aguda para ao organismo *P. subcaptata*.

Devido aos resultados obtidos no ensaio preliminar estipulou-se as concentrações para os ensaios definitivos. As concentrações de cloridrato de fluoxetina testadas foram 0,0001; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,3 µg/L que são apresentadas na Tabela 3 (Anexo A) e Figura 4 onde expressam os resultados obtidos no teste de toxicidade crônica com *P. Subcaptata*.

A concentração de Inibição para 50% da população de *P. Subcaptata* foi de 0,001 µg/L.

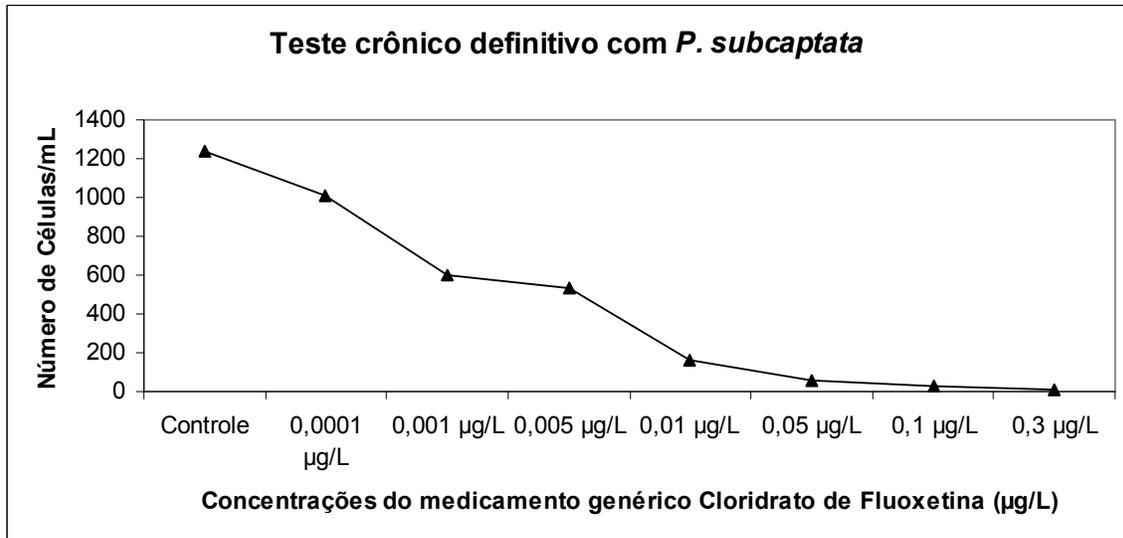


Figura 4. Teste crônico com o medicamento Cloridrato de Fluoxetina mediante o organismo-teste *P. subcaptata*.

No trabalho de Brooks *et al.* (2003) a fluoxetina causou toxicidade para a população de algas em quantidades superiores aos resultados obtidos com o medicamento genérico deste estudo. Todavia, acredita-se que essa diferença entre os resultados foi ocasionada também devido aos excipientes presentes no cloridrato de fluoxetina, medicamento genérico. Portanto, faz-se necessária a aplicação dos testes com o organismo-teste *P. subcaptata* utilizando o composto padrão, para melhor comparação de dados.

5.3 Cálculo da estimativa do Potencial de impacto ambiental

O ribeirão Piracicamirim é o corpo receptor dos efluentes tratados pela ETE. As vazões típicas do ribeirão segundo dados fornecidos pelo DAEE (Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo) são as seguintes:

$$Q_{\text{médio}} = 1.100 \text{ l/s (plurianual)}$$

$$Q_{7,10} = 246 \text{ l/s}$$

$$Q_{95} = 400 \text{ l/s}$$

$$Q_{\text{médio ETE}} = 240 \text{ L/s}$$

$$DER = \frac{QE}{QE + Q_{7,10}} \times 100 \quad (01)$$

Onde:

QE = vazão do efluente;

$Q_{7,10}$ = vazão mínima anual do rio, média de sete dias consecutivos, com probabilidade de 10 anos de retorno.

Quando o $Q_{7,10}$ não se aplica a um determinado corpo receptor, devem ser utilizados os dados de vazão mínima apropriados. Quanto ao teste de toxicidade aguda, foi demonstrado experimentalmente, que ao nível de 1/3 da Concentração Letal (CL_{50}) ou Concentração Efetiva (CE_{50}) praticamente cessam os efeitos tóxicos agudos. Assim, a estimativa de impacto, para prevenir os efeitos agudos, é obtida como pode ser visto na equação (02)

$$DER < \text{ou} = \frac{CE_{50} \text{ ou } CL_{50}}{3} \quad (02)$$

Utilizando a equação (1) tem-se:

$$DER = \frac{240 \text{ L/s}}{240 + 246} \times 100 \quad (01)$$

$$DER = 49,38\%$$

5.4 Estabelecimento da Ecotoxicidade Permissível para efluentes

Como os resultados do teste agudo a partir do efluente de saída da ETE não se mostraram tóxicos para a população de *Daphnia similis*, não realizou-se o cálculo da ecotoxicidade permissível do efluente da ETE Piracicamirim.

Contudo, pode-se realizar um estabelecimento prévio do limite de ecotoxicidade para outros cenários de estudo. O limite de ecotoxicidade pode ser estabelecido para efluentes de empreendimento projetado para o futuro. Para tanto, deve-se utilizar as mesmas relações matemáticas descritas anteriormente.

Exemplificando, é possível que um empreendimento produza um efluente que tenha uma vazão média projetada de 20 L/s e, ainda, que será lançado em um rio com vazão (em $Q_{7,10}$) igual a 2.000 L/s. Assim, com base no cálculo do balanço de massas das vazões disponíveis, A D.E.R. (diluição do efluente no corpo receptor) será igual a 0,99%, sendo que a substituição desse valor na equação, tem-se:

$$\begin{aligned} D.E.R. &\leq \frac{CENO}{10} \\ 0,99\% &\leq \frac{CENO}{10} \end{aligned}$$

$$CENO \geq 9,9\%$$

Onde CENO = Concentração do efluente que não causa efeito crônico observável a população do microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* (na sobrevivência ou reprodução), em 7 dias de exposição, expressa em %.

Desse modo, o efluente que será lançado pelo empreendimento deve possuir valor mínimo de ecotoxicidade crônica igual ou superior a 9,9%. Esse limite permissível deve ser confirmado por meio de ensaio ecotoxicológico, após o início da geração do efluente.

O cálculo demonstrado pode ser utilizado também para estimar o limite de ecotoxicidade permissível de um efluente já existente, desde que a informação sobre as vazões (do efluente e do corpo receptor) estejam disponíveis. Torna-se importante mencionar que caso o valor de ecotoxicidade resultante seja maior que 100% o efluente em questão deve ser considerado como isento de ecotoxicidade (aguda ou crônica).

Do mesmo modo, é possível estimar a vazão média do efluente apropriada para evitar os efeitos tóxicos, bem como a vazão do corpo receptor compatível para o efluente a ser produzido.

Portanto, classifica-se o efluente de saída da ETE Piracicamirim como isento de toxicidade aguda.

5.5 Quantificação do cloridrato de Fluoxetina no efluente da ETE

Cada amostra de entrada e saída da ETE foi analisada em duplicata, sendo utilizados 11 mL em cada extração. As curvas de calibração variaram de uma concentração de 500 $\eta\text{g L}^{-1}$ a 10000 $\eta\text{g L}^{-1}$ para cada fármaco, no caso ibuprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, naproxeno, cetoprofeno, cloridrato de fluoxetina, sinvastatina, 17- β -estradiol e estrona.

Os limites de quantificação (LOQ) foram de 500 $\eta\text{g L}^{-1}$ para todos os fármacos citados anteriormente. No efluente final da ETE todos os fármacos se encontravam em quantidades inferiores ao LOQ de cada analito, não permitindo afirmar a quantidade de fármaco presente na amostra com precisão e confiança. Foi possível observar nos cromatogramas a presença de todos os fármacos nessas amostras, sendo necessário um método com menor limite de detecção. Na amostra de entrada da ETE, foi possível quantificar 2 fármacos, sendo o ibuprofeno e ketoprofeno. Estes estavam nas concentrações de 583,3 e 1175,5 $\eta\text{g L}^{-1}$ para o ibuprofeno e cetoprofeno, respectivamente.

Deve-se evidenciar que o medicamento cloridrato de fluoxetina foi detectado no efluente da ETE, no entanto, o limite de detecção do método impossibilitou a quantificação do composto.

Em trabalhos como Brooks *et al.* (2003) e Kolpin *et al.* (2002), a quantidade de cloridrato de fluoxetina nos efluentes estava em níveis de $\mu\text{g/L}$; nas pesquisas realizadas por Lissemore *et al.* (2006) e Edwards *et al.* (2009) a fluoxetina foi detectada em níveis de ng/L .

Nos estudos realizados recentemente nos EUA, a fluoxetina foi classificada como um produto com potencial para causar efeitos toxicológicos e teratogênicos e ainda, responsável por causar toxicidade em algas. Os estudos indicam que a presença da fluoxetina no cenário ambiental está cada vez mais frequente e que medidas mitigadoras são necessárias para contenção dos efeitos toxicológicos sobre as comunidades aquáticas.

6 CONCLUSÕES

Através dos dados obtidos nos estudos apresentados conclui-se que, segundo as análises estatísticas (JSPEAR), as concentrações de cloridrato de fluoxetina (medicamento genérico) que ocasionaram efeito de toxicidade aguda aos organismos-teste *Daphnia similis* foram em $\mu\text{g/L}$.

O valor de cloridrato de fluoxetina (composto padrão) responsável por ocasionar toxicidade aguda aos organismos-teste foi em $\mu\text{g/L}$. No entanto, o composto padrão apresentou-se menos tóxico por não conter excipientes em sua formulação.

Os ensaios de toxicidade aguda da ETE Piracicamirim, no ponto de entrada, revelaram toxicidade aguda reduzida mediante o organismo-teste *Daphnia similis*. O efluente da saída da ETE não se mostrou tóxico a população aquática exposta, evidenciando a eficiência no tratamento de resíduos no local.

Conclui-se também que, segundo análises estatísticas, o cloridrato de fluoxetina (medicamento genérico) foi responsável por causar efeito tóxico crônico na população de *Pseudokirchneriella subcaptata*. O organismo-teste se mostrou mais sensível diante do cloridrato de fluoxetina.

A estimativa de impacto ambiental, realizada de acordo com os cálculos da CETESB, indicou que o efluente de saída da ETE Piracicamirim estava isento de ecotoxicidade aguda. Todavia, ressalta-se a particularidade do cenário de estudo, que possui baixo volume de água na época de estiagem e recomenda-se que um acompanhamento periódico desse efluente seja realizado.

No efluente da ETE Piracicamirim foram detectados os fármacos ibuprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, naproxeno, cetoprofeno, cloridrato de fluoxetina, sinvastatina, 17- β -estradiol e estrona. No entanto, a substância de estudo não pode ser quantificada, indicando sua presença abaixo do limite de detecção do método cromatográfico.

Não existem Legislações que estabeleçam limites de tais xenobióticos no ambiente por não haver totais conhecimentos de seu potencial efeito tóxico. Portanto, há necessidade de estudar amplamente esses efeitos para melhorar os critérios de qualidade das águas residuárias provenientes das Estações de Tratamento Esgoto, estabelecendo padrões de lançamento pelas fontes poluidoras como hospitais e fábricas de fármacos.

Assim, considerando-se as informações em questão, deve-se ter especial atenção com a fluoxetina, pois esta possui alta potencialidade para causar efeitos tóxicos em populações aquáticas, interferindo efetivamente no desenvolvimento e na reprodução de organismos de similar sensibilidade, que em longo prazo, poderá gerar possível desequilíbrio ecológico, pois o extermínio de uma espécie afeta a cadeia alimentar de todos os organismos dependentes deste.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERNE, G.W.; HARDCASTLE, A.; NIELD, A.H. **Cytotoxic drugs and the aquatic environment: estimation of bleomycin in river and water samples.** J. Pharm. Pharmacol. 42 741–742, 1990.

AHERNE, G.W.; ENGLISH, J.; MARKS, V. **The role of imunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples.** Ecotoxicol. Environ. Saf. 9 79–83, 1985.

ANVISA – **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº44 de 26 de outubro de 2010. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias>. Acesso em 18 jan, 2011.

ASHTON, D.; HILTON, M.; THOMAS, K. V. **Investigation the Environmental transport of human pharmaceuticals streams in the United Kingdom.** Science of the Total Environment v.333 p. 167-184, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 12.713.** Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustácea). Rio de Janeiro, 21p. 2004a.

BAUER, B.; FIORONI, P.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; OEHLMANN, J.; KALBFUS, W. **The use of *Littorina littorea* for tributyltin (TBT) effect monitoring — results from the german TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments.** Environ Pollut 96(3): 299-309, 1997.

BENDZ, D.; PAXEUS, N. A.; GINN, T. R.; LOGR, F. J. J. **Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Swede.** J. Hazard, pp. 195–204. Mater. 122, 2005.

BESSE, J. P.; GARRIC, J. **Human pharmaceuticals in surface waters Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation.** Toxicology Letters 176,104–123, 2008.

BLASCO, C.; PICO, Y. **Prospects for combining chemical and biological methods for integrated environmental assessment.** Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 6, 2009.

BOXALL, A. B. A. **The Environmental side effects of medication.** EMBO reports v.5 p1110, 2004.

BRASIL. CONAMA. **Resolução n. 357**, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União: Republica Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 53, de 18 de março de 2005. Seção 1, p 58-63. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>. Acesso em: 20 jul 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Publicidade irregular estimula automedicação.** Disponível em URL: < <http://portal.saude.gov.br/portal/saude> >Acesso em 03 out. 2009.

BROOKS, B. W.; TURNER, P. K.; STANLEY, J. K.; WESTON, J. J.; GLIDEWELL, E. A.; FORAN, C. M.; SLATTERY, M.; LA POINT, T. W.; HUGGETT, D. B. (A): **Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms.** Chemosphere 52(1): 135-142, 2002.

BROOKS, B. W.; FORAN, C. M.; RICHARDS, S. M.; WESTON, J.; TURNER, P. K.; STANLEY, J. K.; SOLOMON, K. R.; SLATTERY, M.; LA POINT, T. W. (B): **Aquatic ecotoxicology of fluoxetine.** Toxicology Letters 142: 169-183, 2003.

BUCHBERGER, W. W. **Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge.** Analitica Chimica Acta 593: 129–139, 2007.

CALAMARI, D.; ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; FANELLI, R. **Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy.** Environmental Science & Technology, v. 37, n. 7, p.1241-1248, 2003.

CALDERON-PRECIADO, D.; JIMENEZ-CARTAGENA, C.; MATAMOROS, V.; BAYONA, J. M. **Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading.** Water research 45, 221 e 231, 2011.

CAMINADA, S. M. L. **Estudo da biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina, empregando ensaios de respirometria e toxicidade.** Tese de mestrado da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 139p. 2008.

CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J. M. **Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage.** Chemosphere 72, 1118–1123, 2008.

CARLSSON, C.; JOHANSSON, A. K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K.; KUHNER, T. **Are pharmaceuticals potent environmental pollutants Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients.** Science of the Total Environment 364, 67– 87, 2006.

CHRISTEN, A. V.; HICKMANN, S.; RECHENBERG, B.; FENTA, K. **Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action.** Aquatic Toxicology 96, 167–181, 2010.

CHRISTENSEN, A. M.; MARKUSSEN, B.; BAUN, A.; HALLING-SØRENSEN, B. **Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges.** Chemosphere 77, 351–358, 2009.

CLARKE, B. O.; SMITH, S. R. **Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids.** Environment International 37, 226–247, 2011.

COM Engenharia – **Imagem da ETE Piracicamirim.** Disponível em:
<http://www.comeng.com.br/index.php?dsFormFile=ProjectDoneSanitationForm>. Acesso em: 23 jul 2010.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Controle Ecotoxicológico de Efluentes Líquidos no Estado de São Paulo**; série manuais. São Paulo-SP, 2010.

CHRISTENSEN, F. M. **Pharmaceuticals in the Environment - A Human Risk?** Regulatory Toxicology and Pharmacology 28, 212–221, 1998.

CLEUVERS, M. **Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects.** Toxicology letters, v.142 p. 185-194, 2003.

CLOTFELTER, E. D.; RODRIGUEZ, A. C. **Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens.** Environmental Pollution 144, 833-839, 2006.

CLUBBS, R. L.; BROOKS, B. W. ***Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study.** Ecotoxicology and Environmental Safety 67, 385–398, 2007.

CRANE, M.; WATTS, C.; BOUCARD, T. **Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals.** Science of the Total Environment 367, 23–41, 2006.

DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. **Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle changes?** Environ. Health Perspect. 107, 907–938, 1999.

DE-LANGE, H. J.; NOORDOVEN, W.; MURK, A. J.; LURLING, M.; PEETERS, E. T. H. M. **Behavioral responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipod) to low concentrations of pharmaceuticals.** Aquatic Toxicology 78, 209–216, 2006.

DEMOLL, R. **Viren, Hormone, Wuchsstoffe und Antibiotica in Abwasser.** Gwf Wasser Abwasser. Ausgabe Wasser 95(4): 97-100, 1954.

EDWARDS, M.; TOPP, E.; METCALFE, C. D.; LI, H.; GOTTSCHALL, N.; BOLTON, P.; CURNOE, W.; PAYNE, M.; BECK, A.; KLEYWEGT, S.; LAPEN, D. R. **Pharmaceutical and personal care products in tile drainage following surface spreading and injection of dewatered municipal biosolids to an agricultural field.** Science of the Total Environment 407, 4220–4230, 2009.

ELI LILLY, Laboratórios Lilly Ltda. do Brasil. **Bulário Prozac, Cloridrato de Fluoxetina**. Disponível em: <http://www.lilly.com.br/adm/upload/Prozac.pdf> Acesso em: 10/03/2009.

ENICK, O. V.; MOORE, M. M. **Assessing the assessments: Pharmaceuticals in the environment**. Environmental Impact Assessment Review 27, 707–729, 2007.

EPA – Environmental Protection Agency. **Ecotox Database**. Disponível em: http://cfpub.epa.gov/ecotox/browse_index.cfm?sub=chemical Acesso em: 21 out. de 2009.

EPS – **Environmental Science and Technology Centre**: Science and Technology Branch. Segunda edição. Canadá: Environment Canada. 2007.

ESCHER, B. I.; BRAMAZ, N.; LIENERT, J.; NEUWOEHNER, J.; STRAUB, J. O. **Mixture toxicity of the antiviral drug Tamiflu (oseltamivir ethylester) and its active metabolite oseltamivir acid**. Aquatic Toxicology 96, 194–202, 2010.

ESCHER, B. I.; BAUMGARTNER, R.; KOLLER, M.; TREYER, K.; LIENERT, J.; MCARDELL, C. S. **Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater**. Water research 45, 75 e 92, 2011.

FARRE, M.; PEREZ, S.; KANTIANI, L.; BARCELO, D. **Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment**. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 27, No. 11, 2008

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

FERNANDES, A.; BRAGA, A.; RUIZ, A. R. **Fluoxetina, monografia**. Disponível em: http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g52_fluoxetina/FLUOXETINA/pag2.htm >. UNIVERSIDADE DO PORTO Acesso em: 20 de out. de 2009.

FLAHERTY, C. M.; DODSON, S. I. **Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction**. Chemosphere 61, 200–207, 2005.

FOCAZIO, M. J.; KOLPIN, D. W.; BARNES, K. K.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; THURMAN, M. E. **A national reconnaissance for**

pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — II) Untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment* 402, 201 – 216, 2008.

FORAN, C. M.; WESTON, J.; SLATTERY, M.; BROOKS, B. W.; HUGGETT, D. B. **Reproductive assessment of japanese Medaka (*Oryzias latipes*) following a four week fluoxetine (SSRI) exposure.** *Arch Environ Cont Toxicol* 46(4): 511-517, 2004.

GAGNE, F.; BLAISE, C.; ANDRE, C. **Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 329–336, 2006.

GARDINER, D. M.; HOPPE, D. M. **Environmentally induced limb malformations in mink frogs (*Rana septentrionalis*).** *J Exp Zool* 284(2): 207-216, 1999.

GARRISON, A. W.; POPE, J. D.; ALLEN, F. R. **GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters.** In: Keith, L. H.: *Identification & analysis of organic pollutants in water.* Ann Arbor Science Publishers, Inc. Ann Arbor, Michigan. S. 517-556, 1976.

GAWORECKI, K. M.; KLAINE, S. J. **Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure.** *Aquatic Toxicology* 88, 207–213, 2008.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. **Avaliação da Qualidade das Águas Destinadas ao Abastecimento Público na Região de Campinas: Ocorrência e Determinação dos Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP).** Tese de doutorado. Área de Química Analítica, sistema de bibliotecas da UNICAMP, 2006. Disponível em: <http://cutter.unicamp.br/document/?code=vtls000398476> Acesso em: 20 out, 2010.

GINEBREDI, A.; MUÑOZ, I.; ALDA, M. L.; BRIX, R.; LÓPEZ-DOVAL, J.; BARCELÓ, D. **Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macro invertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain).** *Environment International* 36,153–162, 2010.

GONZÁLEZ ALONSO, S.; CATALÁ, M.; ROMO MAROTO, R.; LUIS RODRÍGUEZ GIL, J.; GIL DE MIGUEL, A.; VALCÁRCEL, Y. **Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain).** *Environment International* 36, 195–201, 2010.

GULER, Y.; FORD, A. T. **Anti-depressants make amphipods see the light.** *Aquatic Toxicology* 99, 397–404, 2010.

GUST, M.; BURONFOSSE, T.; ANDRÉ, C.; MONS, R.; GAGNÉ, F.; GARRIC, J. **Is exposure temperature a confounding factor for assessment of reproductive parameters of New Zealand mudsnails *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)?**. *Aquatic Toxicology*, doi:10.1016/j.aquatox.2010.11.013, 2010 B

GUST, M.; GARRIC, J.; GIAMBERINI, L.; MONS, R.; ABBACI, K.; GARNIER, F.; BURONFOSSE, T. **Sensitivity of New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) to a specific aromatase inhibitor.** *Chemosphere* 79, 47–53. 2010C

GUST, M.; BURONFOSSE, T.; GIAMBERINI, L.; RAMIL, M.; MONS, R.; GARRIC, J. **Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*.** *Environmental Pollution* 157, 423–429, 2009A.

GUST, M.; BURONFOSSE, T.; GEFFARD, O.; MONS, R.; QUEAU, H.; MOUTHON, J.; GARRIC, J. **In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges.** *Water Research* 44, 4517 e 4528, 2010.

HALLING-SORENSEN, B.; NORS-NIELSEN, S.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; HOLTEN-LUTZHOFT, H. C.; JORGENSEN, S. E. **Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review.** *Chemosphere* 36 2, pp. 357–393, 1998.

HAN, G. H.; HUR, H. G.; KIM, S. D. **Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*** *Environmental Toxicology and Chemistry* v.25 p. 265-271, 2006.

HANSEN, L. K.; FROST, P. C.; LARSON, J. H.; METCALFE, C. D. **Poor elemental food quality reduces the toxicity of fluoxetine on *Daphnia magna*.** *Aquatic Toxicology* 86, 99–103, 2008.

HARTKLE, K.; MUTSLER, E. **Deutsches Arzneibuch DAB 10-Kommentar**, 10a ed, v. II e III, 3ed. Supplement, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart, 1993.

HAYES, T. B.; COLLINS, A.; LEE, M.; MENDOZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A. A.; VONK, A. **Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses.** PNAS 99(8): 5476-5480, 2002.

HEBERER, T. **Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data,** Toxicol. Lett. 131, 5–17, 2002.

HECKMANN, L. H.; CALLAGHAN, A.; HOOPER, H. L.; CONNON, R.; HUTCHINSON, T. H.; MAUND, S. J.; SIBLY, R. M. **Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics.** Toxicology Letters 172, 137–145, 2007.

HIEMKE, C.; HEARTTER, S. **Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors.** Pharmacology & Therapeutics 85 11–28. Elsevier, 2000.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D.L. **Drugs and drugs metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent,** Life Science. 20, 337–341, 1977.

HLUG - **Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie,** Hessischer Gewässergütebericht zum Hesttag. Wiesbaden, 2004.

HOLM, J.V.; RUGGE, K.; BJERG, P.L.; CHRISTENSEN, T. H. **Occurrence and distribution of pharmaceutical organic-compounds in the groundwater down gradient of a landfill (Grindsted, Denmark).** Environ. Sci. Technol. 29 (5), 1415–1420, 1995.

IWAMATSU, T.; TOYA, Y.; SAKAI, N.; YASUTAKA, T.; NAGATA, R.; NAGAHAMA, Y. **Effect of 5-hydroxytryptamine on steroidogenesis and oocyte maturation in pre-ovulatory follicles of the medaka *Oryzias latipes*.** Dev Growth Differ 35, 625-630, 1993.

JOHNSON, D. J.; SANDERSON, H.; BRAIN, R. A.; WILSON, C. J.; SOLOMON, K. R. **Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae.** Ecotoxicology and Environmental Safety 67, 128–139, 2007.

JONES, O. A.; LESTER, J. N.; VOULVOULINS, N. **Pharmaceuticals: a threat to drink water?** Trends in Biotechnology v.23 p163-167, 2005.

KAR, S.; ROY, K. **First report on interspecies quantitative correlation of ecotoxicity of pharmaceuticals.** Chemosphere 81, 738–747, 2010.

KASPRZY-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. **The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK.** Water Research, Elsevier 42, 3498-3518, 2008.

KOLPIN D. W.; SKOPEC, M.; MEYER, M. T.; FURLONG, E.T.; ZAUGG, S. D. **Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to stream during differing flow conditions.** Science of Total Environmental. 32, 119-130, 2004.

KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. **Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams.** A national reconnaissance. Environ Sci Technol 36(6): 1202-1211, 2002.

KUMAR, A.; XAGORARAKI, I. **Pharmaceuticals, personal care products and endocrine-disrupting chemicals in U.S. surface and finished drinking waters: A proposed ranking system.** Science of the Total Environment 408, 5972–5989, 2010.

KUMMERER, K. **Introduction: pharmaceuticals in the environment,** in: KUMMERER, K.; (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer, Berlin, pp. 1–8, 2001.

KUMMERER, K. **The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges.** Journal of Environmental Management 90, 2354–2366, 2009.

LAIRD, B. D.; BRAIN, R. A.; JOHNSON, D. J.; WILSON, C. J.; SANDERSON, H.; SOLOMON, K. R. **Toxicity and hazard of a mixture of SSRIs to zooplankton communities evaluated in aquatic microcosms.** Chemosphere 69, 949–954, 2007.

LARSSON, D.G.J.; PEDRO, C.; PAXEUS, N. **Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals.** J. Hazard. Mater. 148, 751–755, 2007.

LAVILLE, N.; AIT-AISSA, S.; GOMEZ, E.; CASELLAS, C.; PORCHER, J. M. **Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes.** *Toxicology* 196, 41–55, 2004.

LEE, Y. J.; LEE, S. E.; LEE, D. S.; KIM Y. H. **Risk Assessment of human antibiotics in Korean aquatic environment.** Elsevier B. N., 2008.

LI, D.; YANG, M.; HU, J.; ZHANG, Y.; CHANG, H.; JIN, F. **Determination of penicillin and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river,** *Water Res.* 42, 307–317, 2008.

LIN, A.Y.-C.; TSAI, Y. T. **Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities,** *Sci. Total Environ.* 407 3793–3802, 2002.

LINDQVIST, N.; TUHKANEN, T.; KRONBERG, L.; **Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters,** *Water Res.* 39 2219–2228, 2005.

LISSEMORE, L.; HAO, C.; YANG, P.; SIBLEY, P. K.; MABURY, S.; SOLOMON, K. R. **An exposure assessment for selected pharmaceuticals within a watershed in Southern Ontario.** *Chemosphere* 64, 717–729, 2006.

MCCLELLAN, K.; HALDEN, R. U. **Pharmaceuticals and personal care products in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey.** *water research* 44, 658 – 668, 2010.

MACLEOD, S. L.; WONG, C. S. **Loadings, trends, comparisons, and fate of achiral and chiral pharmaceuticals in wastewaters from urban tertiary and rural aerated lagoon treatments.** *Water research* 44, 533 – 544, 2010.

MADUREIRA, T. V.; BARREIRO, J. C.; ROCHA, M. J.; ROCHA, E.; CASS, Q. B.; TIRITAN. M. E. **Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal).** *Science of the Total Environment* 408, 5513–5520, 2010.

MENNIGEN, J. A.; SASSINE, J.; TRUDEAU, V. L.; MOON, T. W. **Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*.** *Aquatic Toxicology* 100, 128–137, 2010A.

MENNIGEN, J. A.; LADOA, W. E.; ZAMORA, J. M.; DUARTE-GUTERMANA, P.; LANGLOIS, V. S.; METCALFE, C. D.; CHANG, J. P.; MOON, T. W.; TRUDEAU, V. L. **Waterborne fluoxetine disrupts the reproductive axis in sexually mature male goldfish, *Carassius auratus*.** *Aquatic Toxicology* 100, 354–364 2010B.

MENNIGEN, J. A.; HARRIS, E. A.; CHANG, J. P.; MOON, T. W.; TRUDEAU, V. L. **Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain.** *Regulatory Peptides* 155 (2009) 99–104, 2009.

METCALFE, C. D.; MIAO, X.-S.; KOENIG, B. G.; STRUGER, J.: **Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada.** *Environ Toxicol Chem* 22(12): 2881-2889, 2003.

MONPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. **Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water.** *Environment International* 35, 803–814, 2009.

MORANDO, M. B.; MEDEIROS, L. R.; MCDONALD, M. D. **Fluoxetine treatment affects nitrogen waste excretion and osmoregulation in a marine teleost fish.** *Aquatic Toxicology* 95, 164–171, 2009.

MORETTO, L. D.; JÚNIOR N. S. **Gerenciamento de Resíduos na Indústria Farmacêutica.** Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica. v.1, 2006.

MORLEY, N. J. **Environmental risk and toxicology of human and veterinary waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host–parasite relationships.** *Environmental Toxicology and Pharmacology* 27, 161–175, 2009.

MOUNT, D.I.; **The role of biological assessment in effluent control. In: International Workshop of Biological Testing of effluents and related receiving waters.** Proceedings. Minnesota: OECD, 15-30, 1984.

MOUNT, D.I.; NORBERG-KING, T. J. **Methods for aquatic toxicity identification evaluations: phase III toxicity confirmations procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity.** Duluth, MN: EPA, 1993. (EPA-600/R-92/081). Disponível em: <<http://www.epa.gov/npdes/pubs/owm0341.pdf>> Acesso em jul 2010.

MULROY, A. **Monitoring and Analysis of Water and Wastes.** Water Environmental Technology; v. 13, p. 32; 2001.

NAKAMURA, Y.; YAMAMOTO, H.; SEKIZAWA, J.; KONDO, T.; HIRAI, N.; TATARAZAKO, N. **The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka(*Oryzias latipes*): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish.** Chemosphere 70, 865–873, 2008.

NALECZ-JAWECKI, G. **Evaluation of the in vitro biotransformation of fluoxetine with HPLC, mass spectrometry and ecotoxicological tests.** Chemosphere 70, 29–35, 2007.

NENTWIG, G.; **Arzneimittel als Umweltrisiko? Ökotoxikologische Untersuchung und Risikobewertung für vier in der aquatischen Umwelt nachgewiesene Pharmaka.** Universität in Frankfurt am Main. 186p. 2006.

NEUWOEHNER, J.; ZILBERMAN, T.; FENNER, K.; ESCHER, B. I. **QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids.** Aquatic Toxicology 97, 58–67. 2010.

NYENJE, P.M.; FOPPEN, J.W.; UHLENBROOK, S.; KULABAKO, R.; MUWANGA, A. **Eutrophication and nutrient release in urban areas of sub-Saharan Africa — A review.** Science of the Total Environment 408, 447–455, 2010.

OAKS, J. L.; GILBERT, M.; VIRANI, M. Z.; WATSON, R. T.; METEYER, C. U.; RIDEOUT, B. A.; SHIVAPRASAD, H. L.; AHMED, S.; IQBAL CHAUDHRY, M. J.; ARSHAD, M.; MAHMOOD, S.; ALI, A.; AHMED KHAN, A.: **Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan.** Nature 427(6975): 630-633, 2004.

O'BRIEN, E.; DIETRICH, D. R. **Hindsight rather than foresight: reality versus the EU draft guideline on pharmaceuticals in the environment.** Trends in Biotechnology Vol.22 No.7 July, 2004.

OEHLMANN, J.; FIORONI, P.; STROBEN, E.; MARKERT, B. **Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline.** Sci Total Environ 188(2-3): 205-223, 1996.

OETKEN, M.; NENTWIG, G.; LÖFFLER, D.; TERNES, T. A.; OEHLMANN, J. **Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I: the antiepileptic drug carbamazepine.** Arch Environ Cont Toxicol 49: 353-361, 2005.

OUELLET, M.; BONIN, J.; RODRIGUE, J.; DESGRANGES, J.; LAIR, S. **Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats.** J Wildl Dis 33(1): 95-104, 1997.

PARK, K.; PARK, J.; KIM, J.; KWAK, I. S. **Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid).** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 151, 439–446, 2010.

PASCOE D.; KARNTANUT W.; MULLER C. T. **Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*.** Chemosphere. v.12 p. 521-528, 2003.

PATERSON, G.; METCALFE, C. D. **Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*).** Chemosphere 74, 125–130, 2008.

PERY, A. R. R.; GUST, M.; VOLLAT, B.; MONS, R.; RAMIL, M.; FINK, G.; TERNES, T.; GARRIC, J. **Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates.** Chemosphere 73, 300–304, 2008.

PFLUGER, P.; DIETRICH, D.R. **Effects on pharmaceuticals in the environment—an overview and principle considerations.** In: K. Kummerer (Ed.), Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks, Springer, Berlin, pp. 11–17, 2001.

POSTIGO, C.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. **Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: Occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation.** Environment International 36, 75–84, 2010.

REDSHAW, C. H.; WOOTTON, V. G.; STEVEN J. ROWLAND, S. J. **Uptake of the pharmaceutical Fluoxetine Hydrochloride from growth medium by *Brassicaceae*.** Phytochemistry 69, 2510–2516, 2008.

RICHARDSON, M. L.; BOWRON, J. M. **The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment.** J Pharm Pharmacol 37: p. 1-12, 1985.

ROBERTS, P.H.; THOMAS, K.V. **The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment,** Sci. Total Environ. 356,143–153, 2006.

SANTOS, L. H. M. L. M.; ARAÚJO, A.N.; FACHINIA, A.; PENA, A.; DELERUE-MATOS, C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. **Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment.** Journal of Hazardous Materials 175, 45–95, 2010.

SÃO PAULO (Estado). **Resolução SMA n. 3,** de 22 de fevereiro de 2000. Diário Oficial do Estado de São Paulo, Poder executivo, São Paulo, v110, n. 39, Seção 1, p 24, 2000.

SÃO PAULO (Estado). **Lei n. 997,** de 31 de maio de 1976. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br>. Acesso em: 31 jul 2009.

SÃO PAULO (Estado). **Decreto n. 8468,** de 8 de setembro de 1976. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br>. Acesso em 31 jul 2009.

SCHNELL, S.; BOLS, N. C.; BARATA, C.; PORTEA, C. **Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1.** Aquatic Toxicology 93, 244–252, 2009.

SCHWABE, U.; PAFFRATH, D. **Arzneiverordnungs-Report : aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare.** Springer Verlag, Berlin, Heidelberg u. a., 2004.

STANLEY, J. K.; RAMIREZ, A. J.; CHAMBLISS, C. K.; BROOKS, B. W. **Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate.** Chemosphere 69, 9–16, 2007.

STUMPF, M.; TERNES, T.A.; WILKEN, R. D.; RODRIGUES, S.V.; BAUMANN, W. **Polar drug residue in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil,** Sci. Total Environ. 225, 135–141, 1999.

STROBEN, E.; OEHLMANN, J.; FIORONI, P. **The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributultin pollution.** Mar Biol (Historical Archive) 113(4): 625-636, 1992.

TEBO JR., L. B.; **Effluent monitoring historical perspective.** In: BERGMAN, H. L.; KIMERLE, A. A.; MAKI, A. W. (Eds.). Environmental hazard assessment of effluent. Elmsford: Pergamon Press, p. 13-31, 1986.

TERNES, T. A.; **Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers,** Water Res. 32, 3245–3260, 1998.

TERZIC, S.; SENTA, I.; AHEL, M.; GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELO, D.; MÜLLER, J.; KNEPPER, T.; MARTÍ, I.; VENTURA, F.; JOVANČIĆ, P.; JABUČAR, D. **Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region.** Science of the total environment 399, 66 – 77, 2008.

THIBAUT, R.; PORTE, C. **Effects of fibrates, anti-inflammatory drugs and antidepressants in the fish hepatoma cell line PLHC-1: Cytotoxicity and interactions with cytochrome P450 1A.** Toxicology in Vitro 22, 1128–1135, 2008.

TISO, N.; MORO, E.; ARGENTON, F.; **Zebrafish pancreas development.** Molecular and Cellular Endocrinology 312, 24–30 Elsevier, 2009.

TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.-R.; KÖRTJE, K.-H.; NEGELE, R.-D.; RAHMANN, H.; BRAUNBECK, T. (B): **Evaluation of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) neurotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II. Ultrastructural diagnosis and tin localization by energy filtering transmission electron microscopy (EFTEM).** Aquatic Toxicol 30: 199-213, 1994.

WALTERS, E.; MCCLELLAN, K.; HALDEN, R. U. **Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids/soil mixtures in outdoor mesocosms.** water research 44, 6011 – 6020, 2010.

ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org). **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações.** Sao Carlos: Editora Rima, p 347-382, 2006.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; FANELLI, R.; REITANO, G.; BAGNATI, R.; CHIABRANDO, C.; POMATI, F.; ROSSETTI, C.; CALAMARI, D.; **Pharmaceuticals in the**

environment in Italy: causes, occurrence, effects and control, Environ. Sci. Pollut. Res. 13 15–21. 2006.

ZWIENER, C.; GREMM, T.J.; FRIMMEL, F.H. **Pharmaceutical residues in the aquatic environment and their significance for drinking water production**, in: K.Kummerer (Ed.), **Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks**, Springer, Berlin, 81–89, 2001.

ANEXOS

ANEXO A – Dados brutos dos ensaios de toxicidade crônica com *P. subcaptata*Tabela 2. Resultados do teste de toxicidade crônica com *P. subcaptata*

Concentrações	1	2	3	M
Controle	1500	1200	1562	1420
0.01 µg/L	486	482	452	473
0.05 µg/L	60	70	100	77
0.1 µg/L	05	31	33	23
0.3 µg/L	04	12	01	06
0.5 µg/L	02	01	00	01
0.7 µg/L	00	00	00	00

Tabela 3. Crescimento algal no teste crônico em concentrações crescentes de cloridrato de fluoxetina

Concentrações	1	2	3	M
Controle	1310	1220	1195	1242
0,0001 µg/L	1001	1031	997	1009
0,001 µg/L	555	556	687	599
0,005 µg/L	664	427	520	537
0,01 µg/L	149	190	152	163
0,05 µg/L	60	59	63	60
0,1 µg/L	28	29	30	29
0,3 µg/L	10	08	07	8

ANEXO B – Dados Brutos: Ensaios ETE Piracicamirim

Tabela 4. Dados brutos do ensaio de toxicidade aguda da saída da ETE

Concentrações Efluente	Numero total de indivíduos imóveis
Controle	0
10%	0
20%	0
30%	0
40%	0
50%	0
60%	0
70%	0
80%	0
90%	0
100%	0

Dados do efluente de saída da ETE antes e após o ensaio de toxicidade aguda:

Antes: pH= 7,6; Cond= 147,6; OD= 2,80

Depois: pH= 6,5; Cond= 184,0; OD= 3,90

Tabela 5. Dados brutos do ensaio de toxicidade aguda da entrada da ETE

Concentrações Efluente	Numero total de indivíduos imóveis
Controle	0
5%	0
10%	0
20%	2
30%	3
40%	9
50%	10
50%	11
60%	13
70%	13
80%	13
90%	13
100%	15

```

C:\DOCUME~1\adriaco\Desktop\JSPEAR~1\GWBASIC.EXE
4: 9
5: 10
6: 11
7: 13
8: 13
9: 13
10: 15
WOULD YOU LIKE A DATA GRAPH (Y/N)? n
WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION (Y/N)? y
DATE 18/01/20 TEST NUMBER 02 DURATION 48 h
CHEMICAL Fluoxetine SPECIES Daphnia similis
RAW DATA
CONCENTRATION(%) 10.00 20.00 30.00 40.00 50.00 60.00 70.00
80.00 90.00 100.00
NUMBER EXPOSED 20 20 20 20 20 20 20
MORTALITIES 0 2 3 9 10 11 13
13 13 15
SPEARMAN-KARBER TRIM 25.00
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES eC50 52.5801849
95% LOWER CONFIDENCE 43.62
95% UPPER CONFIDENCE 63.38
-----
WOULD YOU LIKE TO HAVE A COPY SENT TO THE PRINTER(Y/N)?
1|LIST | 2|RUN| 3|LOAD| 4|SAVE| 5|CONT| 6,|LPT1| 7|TRON| 8|TROFF| 9|KEY | 0|SCREEN

```

Figura 5. Imagem JSPEAR do ensaio de toxicidade aguda da entrada da ETE

Dados do efluente de entrada da ETE antes e após o ensaio de toxicidade aguda:

Antes: pH= 8,1; Cond= 257,4; OD= 0,65

Depois: pH= 6,7; Cond= 299,0; OD= 2,60