

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG

**Bianca de Souza Maselli**

**Ensaio Ecotoxicológico Aplicado à Avaliação de Resíduos da Produção  
de Medicamentos Veterinários**

Alfenas – MG

2013

**BIANCA DE SOUZA MASELLI**

**Ensaio Ecotoxicológico Aplicado a Avaliação de Resíduos da Produção  
de Medicamentos Veterinários**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tecnologia Ambiental.

Orientador: Fábio Kummrow

Co-orientador: Prof. Dr. Sandro Barbosa

Alfenas – MG

2013

Maselli, Bianca de Souza.

Ensaio ecotoxicológicos aplicados a avaliação de resíduos da produção de medicamentos veterinários / Bianca de Souza Maselli. - 2013.

54 f. -

Orientador: Fábio Kummrow.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Toxicidade Aguda. 2. Toxicidade Crônica. 3. Drogas Veterinárias. I. Kummrow, Fábio. II. Título.

CDD: 615.9

**BIANCA DE SOUZA MASELLI**

**Ensaio Ecotoxicológico Aplicado a Avaliação de Resíduos da  
Produção de Medicamentos Veterinários**

A Banca examinadora abaixo-assinada,  
aprova a Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental  
pela Universidade Federal de Minas Gerais.  
Área de concentração: Tecnologia  
Ambiental.

Prof. Dr. Fábio Kummrow

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - *campus* Diadema

---

Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

Instituição: Faculdade de Tecnologia – Unicamp – *campus* Limeira

---

Prof. Dr. Paulo Augusto Zaitune Pamplin

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG – *campus* Poços de  
Caldas

---

Dedico aos meus pais, meus irmãos e  
aos meus amigos.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me darem mais uma chance acreditando na minha capacidade e dando todo apoio para seguir em frente.

À minha família, por serem sempre pacientes e estarem do meu lado nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade, ao CNPq pelo financiamento para o desenvolvimento de todo trabalho e a FAPEMIG pela bolsa de apoio ao estudante.

Ao Prof. Fábio Kummrow, meu orientador, pela confiança, paciência e dedicação.

Aos Professores Sandro Barbosa, Gisela Umbuzeiro e Luiz Beijo pela co-orientação e colaborações importantes.

Aos amigos Joice, Karla, Luis, Luana e Ana Carolina, pelo tempo dedicado em ajudar e pelos momentos mais importantes desta etapa.

Aos amigos Marina, Rafael e Pórtya pelo apoio dado a todo o momento.

A toda equipe do BIOGEN, a turma do PPG-ETA e a aqueles que de alguma forma me apoiaram nesta jornada.

Serei grata a todos vocês por toda minha vida.

"O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém. "

(Dalai Lama)

## RESUMO

O crescimento do mercado de medicamentos veterinários faz com que esse setor invista em novas tecnologias e produtos com menores impactos ambientais, pois os resíduos dos fármacos de uso veterinário têm sido detectados em diversos compartimentos. Ensaio de toxicidade aguda e crônica permitem a detecção dos efeitos deletérios de substâncias tóxicas em concentrações muito baixas. Neste contexto, o objetivo desse trabalho é avaliar a toxicidade dos efluentes brutos e tratados gerados na produção de medicamentos veterinários, empregando ensaios ecotoxicológicos. Foram realizadas cinco campanhas de amostragem entre outubro de 2011 e julho de 2012 em uma indústria farmacêutica veterinária. Amostras de efluentes brutos, tratados quimicamente e tratados biologicamente foram coletadas e submetidas aos testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* (NBR 12713) e de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* (NBR 13373). Os parâmetros avaliados nestes ensaios foram a imobilidade e a reprodução dos microcrustáceos (*D. similis* e *C. dubia*). Todas as amostras dos efluentes brutos e tratados apresentaram elevada toxicidade aguda para *D. similis*. Nos testes crônicos com *C. dubia* observou-se uma toxicidade ainda maior, de acordo com o tipo de efluente em grande parte das campanhas de amostragem. Os efluentes brutos e tratados quimicamente apresentaram importante toxicidade e em geral o tratamento biológico foi capaz de reduzir os efeitos observados. Adequações no tratamento serão necessárias para completa eliminação desta toxicidade dos efluentes dessa indústria.

Palavras - chave: Toxicidade aguda. Toxicidade crônica. Medicamentos veterinários.



## ABSTRACT

The growing market for veterinary medicines makes this industry invest in new technologies and products with lower environmental impacts, because veterinary drug residues have been detected in several compartments. Tests for acute and chronic toxicity allow the detection of the harmful effects of toxic substances in very low concentrations. In this context, the aim of this study was to evaluate the toxicity raw and treated effluent generated in the production of veterinary medicines, employing ecotoxicological tests. There were performed five samplings between October of 2011 and July of 2012, in a veterinary pharmaceutical industry. Samples of raw effluent, chemically treated and biologically treated were collected and subjected to acute toxicity tests with *D. similis* (NBR 12713), chronic toxicity with *C. dubia* (NBR 13373). Endpoints evaluated in these tests were the immobility and the reproduction of microcrustaceans (*D. similis* and *C. dubia*). All samples of raw and treated effluent showed high acute toxicity to *D. similis*. In chronic tests with *C. dubia*, there was an even greater toxicity, according to the type of effluent in a large part of performed samplings. The raw and chemically treated effluents showed significant toxicity and general biological treatment was able to reduce the effects observed. Adjustments in treatment will be necessary for complete elimination of this toxicity of effluents in this industry.

Keywords: Acute toxicity. Chronic toxicity. Veterinary medicines.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
2	<b>DESENVOLVIMENTO</b> .....	11
2.1	INDÚSTRIA FARMACÊUTICA VETERINÁRIA NO BRASIL .....	11
2.2	FÁRMACOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS COMO CONTAMINANTES AMBIENTAIS .....	12
2.3	AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS .....	15
2.4	ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS APLICADOS NAS ANÁLISES DE RESÍDUOS GERADOS NA PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS .....	17
2.4.1	Organismos utilizados nos testes de toxicidade aguda .....	18
2.4.2	Organismos utilizados nos testes de toxicidade crônica .....	19
2.5	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	20
2.6	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
2.6.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	21
2.6.2	<b>Objetivo Específico</b> .....	21
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1	CARACTERÍSTICAS DO TRATAMENTO DE EFLUENTES E AMOSTRAGEM .....	22
3.2	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS AMOSTRAS .....	24
3.3	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA .....	25
3.3.1	Empregando a bactéria <i>Daphnia similis</i> .....	25
3.4	TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA .....	26
3.4.1	Empregando o microcrustáceo <i>Ceriodaphnia dubia</i> .....	26
3.5	ANÁLISES DOS DADOS .....	28
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
	ANEXO A - ARTIGO “ECOTOXICIDADE DE EFLUENTES BRUTOS E TRATADOS PROVENIENTES DE UMA FÁBRICA DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS” .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento dos resíduos gerados em decorrência da crescente fabricação de produtos farmacêuticos tornou-se um dos maiores desafios ambientais da atualidade (BOUND; VOULVOULIS, 2004; AKINTONWA et al., 2009; CALISTO; ESTEVES, 2009; KOSONEN; KRONBERG, 2009). Estudos demonstraram que uma vasta gama de fármacos (antibióticos, anti-inflamatórios, antilipêmicos, antiepiléticos,  $\beta$ -bloqueadores, etc) e seus metabólitos estão presentes em ambientes aquáticos em vários países como Alemanha, Brasil, Canadá, Holanda, Inglaterra, Itália, Suécia, Estados Unidos, Reino Unido e Índia (BILA; DEZOTTI, 2003; CLEUVERS, 2003; BOUND; VOULVOULIS, 2004; KIM; AGA, 2007; BESSE; GARRIC, 2008; LIN et al., 2008; CALISTO; ESTEVES, 2009; TAMBOSI et al., 2010). Assim, o monitoramento do destino dos resíduos de produtos farmacêuticos deveria se tornar obrigatório (BESSE; GARRIC, 2008).

O monitoramento de fármacos no meio ambiente tem atraído grande interesse devido ao fato de muitas dessas substâncias serem frequentemente encontradas em efluentes finais de estações de tratamento de esgoto (ETE) (BILA; DEZOTTI, 2003; BOUND; VOULVOULIS, 2004; OLLER et al., 2011). Essas substâncias são lançadas nos corpos hídricos receptores em concentrações na faixa de  $\text{ng.L}^{-1}$  a  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , podendo causar efeitos adversos à saúde humana e para os organismos aquáticos (KIM; AGA, 2007; CARLSSON et al., 2009). Apesar das baixas concentrações frequentemente encontradas nos compartimentos ambientais, a combinação dos efeitos de diferentes fármacos (ex.: sinergismo), sua persistência e o seu potencial de bioacumulação devem ser levados em conta na avaliação do seu risco ambiental (BOUND; VOULVOULIS, 2004; REIS FILHO et al., 2007).

A toxicologia ambiental é o termo usado para descrever o estudo científico dos efeitos adversos causados aos organismos vivos pelas substâncias químicas presentes no ambiente (CHASIN; PEDROZO, 2003). Inserida na toxicologia ambiental encontra-se a ecotoxicologia, que é a ciência que estuda os impactos de poluentes ambientais sobre populações de organismos vivos ou ecossistemas, considerando a interação dos poluentes com o próprio meio ambiente (BRENTANO, 2006). Na ecotoxicologia, o uso de ensaios biológicos permite a detecção dos efeitos deletérios de substâncias presentes muitas vezes em concentrações menores que os limites de detecção dos métodos de análises químicas, bem como em geral apresentam menor custo. Desta forma, testes ecotoxicológicos têm se tornado

uma importante ferramenta para auxiliar a tomada de decisões visando à preservação da biota aquática (BRENTANO, 2006; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Os efeitos tóxicos de fármacos têm sido avaliados utilizando-se organismos aquáticos, no entanto, poucos dados experimentais têm sido obtidos para organismos terrestres (BILA; DEZOTTI, 2003). A aplicação de ensaios ecotoxicológicos demanda a seleção de organismos teste e essa escolha deve ser baseada nos seguintes critérios: disponibilidade e abundância no ambiente, facilidade de cultivo em laboratório e conhecimento da sua biologia (BOHRER, 1995).

Assim como ocorre com relação aos medicamentos utilizados pelo homem, a presença de medicamentos veterinários no ambiente pode ser um motivo de preocupação, pois eles possuem importantes efeitos biológicos (HALLING-SØRENSEN et al., 1998). A quantidade exata de medicamentos veterinários produzidos e os dados relativos ao consumo de produtos farmacêuticos no Brasil não estão disponíveis (TAMBOSI et al., 2010). Mas em vista do elevado crescimento do setor agropecuário podemos imaginar que toneladas são produzidas e consumidas todos os anos em nosso país. Assim, o aumento dos resíduos gerados pelo uso crescente de produtos farmacêuticos, e considerando-se a possibilidade de um aumento proporcional do lançamento desses resíduos no ambiente, o gerenciamento da presença dessas substâncias nos compartimentos ambientais tornou-se urgente (BOUND; VOULVOULIS, 2004; AKINTONWA et al., 2009; CALISTO; ESTEVES, 2009; KOSONEN; KRONBERG, 2009).

A literatura recente relata os possíveis riscos ambientais causados por medicamentos veterinários, por exemplo, aqueles usados na criação de gado, tanques de criação de peixes e suinocultura que podem ser lançados no solo, subsolo e nas águas superficiais. Com isso, vários pesquisadores vêm desenvolvendo ensaios ecotoxicológicos e modelos para avaliação de risco ambiental para esses compostos químicos (BILA; DEZOTTI, 2003; BOXALL et al., 2003; BOXALL et al., 2004).

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 INDÚSTRIA FARMACÊUTICA VETERINÁRIA NO BRASIL

A indústria de saúde animal é responsável por manter a saúde e a produtividade dos diversos rebanhos em todo o mundo, bem como por assegurar a sanidade e a abundância do alimento que produzem. Além disso, também é responsável por prover a saúde e o bem-estar de animais domésticos (CAPANEMA et al., 2007).

O segmento do agronegócio tem apresentado um crescimento econômico durante a última década no Brasil, sendo responsável, por aproximadamente 27% do produto interno bruto e 37% da mão-de-obra empregada no país. Em relação ao mercado de produtos e medicamentos veterinários, esse crescimento tem estimulado as empresas da indústria agroquímica a investir em novas tecnologias para o desenvolvimento de produtos que minimizem os impactos ambientais, bem como proporcionem eficácia e lucratividade na sua utilização (CALARGE et al., 2007).

Os produtos farmacêuticos veterinários podem ser agrupados por classe farmacêutica (biológicos, fármacos e suplementos nutricionais) e direcionados a diferentes segmentos de animais, divididos em grandes e pequenos animais (*pet*). Atualmente, o Brasil é um dos cinco maiores mercados veterinários em todo o mundo. A entidade representativa desse setor é o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (Sindan), que congrega cerca de 100 laboratórios atuantes no mercado nacional e, segundo seus dados, o faturamento da indústria de saúde animal, em 2006, foi de R\$ 2.365,6 bilhões (CAPANEMA et al., 2007).

Esse segmento industrial é caracterizado por dois modelos de empresas: (1) grandes multinacionais químico-farmacêuticas, com atuação global, (2) empresas nacionais de pequeno porte. As primeiras caracterizam-se por liderar o processo de inovação e as segundas por serem seguidoras. No grupo das multinacionais praticamente não há casos de especialização no mercado veterinário, como acontece com as empresas regionais (WAACK, 2000). Um aspecto particular das pequenas indústrias é a existência de nichos abertos às empresas nacionais por causa das diferenças entre o padrão de distribuição das espécies e a ocorrência de problemas sanitários e nutricionais próprios de cada país (CAPANEMA et al., 2007).

No que diz respeito, especificamente, ao setor pecuário, verifica-se que de 1990 a

2003 a produção de carne bovina aumentou 85,2% (uma média de 6,1% ao ano), passando de 4,1 milhões para 7,6 milhões de toneladas produzidas. Nesse período, a suinocultura cresceu 173,3% (média de 12,4% ao ano), saltando de 1 milhão para 2,9 milhões de toneladas produzidas. Este crescimento não se apresenta diferente quando se analisa o mercado de produtos veterinários, o qual possui um forte relacionamento com o setor agropecuário. Esse setor apresentou um crescimento de 18,5% entre os anos de 2002 e 2004 (CALARGE et al., 2007).

Em relação ao mercado mundial, a América Latina foi responsável, no ano de 2003, por um faturamento de US\$ 1,4 bilhões, o que representava 11,1% do faturamento mundial. O Brasil, no ano de 2005, obteve um faturamento de US\$ 615 milhões, o que representa aproximadamente 44,0% do mercado latino-americano e 5,0% do mercado mundial (CALARGE et al., 2007).

## 2.2 FÁRMACOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS COMO CONTAMINANTES AMBIENTAIS

Os fármacos são uma das mais importantes classes de poluentes emergentes (FATTA-KASSINOS et al., 2011). Poluentes emergentes podem ser definidos como qualquer agente químico não incluído em programas nacionais ou internacionais de monitoramento e não incluídos anteriormente em regulamentações de qualidade ambiental, mas que é introduzido continuamente nos compartimentos ambientais por atividades antrópicas. Esses compostos não são necessariamente novos porém o seu comportamento ambiental e ecotoxicológico não são plenamente conhecidos (HORVAT et al., 2012).

Recentemente, baixos níveis de fármacos de uso veterinário foram detectados em diferentes partes do mundo nos solos, em sedimentos, no lodo proveniente do tratamento de esgoto doméstico, nas águas superficiais, nas águas subterrâneas e em efluentes industriais (BOXALL et al., 2003; DÍAZ-CRUZ et al., 2003; AKINTONWA et al., 2009; WATANABE et al., 2010). Os fármacos, necessariamente são compostos biologicamente ativos desenvolvidos para resistir à biodegradação, devido a sua resistência aos processos de biotransformação, característica que normalmente aumenta os seus efeitos terapêuticos. Porém, essa mesma característica contribui para sua persistência ambiental (FATTA-KASSINOS et al., 2011).

Particularmente, os produtos farmacêuticos veterinários são substâncias com elevada atividade fisiológica, utilizadas na agroindústria para combater parasitas, prevenção e

tratamento de doenças transmitidas por bactérias e como agentes promotores de crescimento na produção de carne (TOLLS, 2001; BOXALL et al., 2003). Os medicamentos veterinários são administrados aos animais por via oral, com a alimentação, por via parenteral ou por aplicação tópica. Dependendo do fármaco e da espécie animal sua excreção pode ocorrer nas formas inalterada, como conjugados, ou ainda como produtos de biotransformação oxidados, reduzidos ou hidrolisados (TOLLS, 2001).

Normalmente, produtos farmacêuticos para uso humano e veterinário são considerados separadamente na avaliação de riscos devido a diferenças nas suas rotas de ingresso nos compartimentos ambientais. Enquanto as fontes de fármacos de uso humano tendem a ser pontuais, as de uso veterinário normalmente são difusas. As potenciais vias de introdução, no meio ambiente, das substâncias utilizadas em criação animal são os lançamentos diretos, sua disposição, a aplicação de excretas como fertilizantes e dissolução direta em corpos d'água onde há aquicultura (JONES et al., 2004). Nesse contexto, considera-se como a principal rota de introdução de produtos farmacêuticos veterinários, no meio ambiente, a aplicação em solos de esterco (ZWIENER, 2007; FATTA-KASSINOS et al., 2011).

Contudo, as indústrias farmacêuticas geram efluentes, emissões atmosféricas e resíduos sólidos variados. Particularmente os efluentes líquidos resultantes da limpeza dos equipamentos, após a produção em batelada dos medicamentos, e podem conter compostos orgânicos tóxicos. Sua composição varia de acordo com o produto fabricado, os materiais utilizados no processo, e de outras características do processo envolvido. Assim, a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), o teor de sólidos em suspensão, bem como a quantidade de fenol e o pH desses efluentes não são constantes, dependendo diretamente do medicamento fabricado, das matérias primas empregadas e da tecnologia de processamento (AKINTONWA et al., 2009).

Os riscos dos efluentes industriais farmacêuticos à saúde humana e às espécies não alvo não podem ser subestimados e, portanto, há grande necessidade do seu reconhecimento. Para que possa ser realizada a avaliação de risco, a agência norte americana *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda que testes de toxicidade utilizando espécies aquáticas (ex.: algas) e terrestres (ex.: plantas superiores) devam ser continuamente realizados para caracterização dos efluentes de indústrias farmacêuticas (AKINTONWA et al., 2009).

No Brasil, embora a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente 430 (2011) não trate especificamente da presença de fármacos em efluentes, essa determina que apenas efluentes enquadrados nas condições de lançamento podem ser efetivamente dispostos no meio ambiente. Entre as condições previstas estão parâmetros inorgânicos (ex.: metais

tóxicos) e poucos orgânicos (ex.: benzeno, tolueno, xileno entre outros), pH (entre 5-9), temperatura (inferior a 40 °C), materiais sedimentáveis (até 1 mg.L<sup>-1</sup>), regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vez a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor, óleos minerais (até 20 mg.L<sup>-1</sup>), óleos vegetais e gorduras animais (até 50 mg.L<sup>-1</sup>), ausência de materiais flutuantes, DBO 5 dias com remoção de mínima de 60%. Além desses parâmetros, 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. Esses critérios devem ser baseados em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos e realizados nos próprios efluentes com organismos de pelo menos dois níveis tróficos (CONAMA, 2011). Na ausência de critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental para avaliar a toxicidade do efluente no corpo receptor a Resolução CONAMA 430 (2011) estabelece critérios mínimos baseados na classe do corpo d'água receptor de acordo com a resolução CONAMA 357 (2005).

As práticas sanitárias modernas resultam em grandes volumes de resíduos de origem antropogênica, como por exemplo, esgotos domésticos e industriais, que tem sido coletados e tratados em estações de tratamento de esgoto comuns. As estações de tratamento produzem efluentes líquidos para lançar nos corpos d'água e, por consequência o lodo - resíduo sólido ou semissólido proveniente do tratamento de efluentes - o qual é normalmente tratado, por métodos de compostagem e depois reutilizado como fertilizantes e condicionadores de solos ou dispostos como resíduo em aterros (JONES-LEPP; STEVENS, 2007). No Brasil a resolução CONAMA 375 (2006) não permite o uso agrícola de lodos de origem industrial.

Tanto nesses resíduos líquidos, quanto nos sólidos podem estar presentes grandes quantidades de substâncias tóxicas conhecidas e desconhecidas, bem como os seus produtos de transformação, que podem ser gerados durante os processos de tratamento ou ainda no próprio meio ambiente por processos bióticos e abióticos (HEWITT; MARVIN, 2005; WATANABE et al., 2005; SHARMA, et al., 2007). Quando a composição química dos resíduos é conhecida, os efeitos nocivos associados ao seu lançamento no ambiente podem ser avaliados utilizando métodos de estimativa de toxicidade baseados na estrutura molecular dos compostos presentes e na sua abundância. Porém, determinar quimicamente todos os toxicantes presentes nos efluentes e no lodo é uma tarefa impraticável. Além disso, a complexidade das relações entre os compostos químicos e a biota, e o desconhecimento de alguns constituintes dos efluentes, associados a possíveis efeitos aditivos, sinérgicos ou antagonísticos, resultantes das interações entre os seus constituintes, demonstram que os dados



obtidos por métodos embasados somente em análises químicas são, em muitos casos, inadequados para uma correta avaliação do potencial tóxico desse tipo de resíduos, sendo recomendável uma caracterização complementar com ensaios ecotoxicológicos (KAPANEN; ITAVAARA, 2001; ROSA et al., 2001; WILKE et al., 2008).

### 2.3 AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Embora a indústria farmacêutica não seja considerada “suja”, em comparação com muitos outros setores produtivos, seu grande desafio atual é o controle e prevenção da poluição ambiental (BERRY; RONDINELLI, 2000). A ocorrência de fármacos no ambiente ainda está cercada de muitas perguntas sem resposta, como por exemplo, qual seu potencial de causar efeitos biológicos relevantes para a flora, fauna e seres humanos, entre eles a interferência endócrina e outros tipos de efeitos deletérios considerados relevantes (FATTA-KASSINOS et al., 2011).

Os impactos de certos fármacos veterinários, especialmente anti-helmínticos e antibióticos, têm sido amplamente estudados, porém muitos outros produtos farmacêuticos, presentes no ambiente, permanecem pouco estudados e compreendidos (BOXALL et al., 2003). Informações com melhor qualidade e o aperfeiçoamento dos processos de avaliação de risco são necessárias para estimar potenciais efeitos tóxicos, agudos e crônicos, dos próprios fármacos e dos seus produtos de transformação presentes nas matrizes ambientais. Além disso, investigações mais aprofundadas do potencial ecotoxicológico de suas misturas são fundamentais (FATTA-KASSINOS et al., 2011).

Os medicamentos de uso humano e veterinário estão continuamente sendo lançados, no meio ambiente, devido aos processos de fabricação, disposição inadequada e via excreção dos fármacos inalterados e dos seus produtos de biotransformação. As rotas mais importantes de introdução desses produtos nos compartimentos ambientais são os efluentes de estações de tratamento de esgoto e a disposição das excretas de animais de criação. Além disso, vários fármacos não são completamente degradados durante o tratamento do esgoto e de efluentes permanecendo em concentrações relevantes nos efluentes tratados (HERNANDO et al., 2006).

Pouco se conhece sobre o destino e o comportamento dos fármacos nos ambientes aquáticos e terrestres, assim como não está claro quais organismos são afetados e em que grau

isso ocorre (BILA; DEZOTTI, 2003; REIS FILHO et al., 2007), porém a ocorrência de traços de medicamentos no meio ambiente pode causar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres, mesmo em concentrações na ordem de  $\text{ng.L}^{-1}$ . Esses efeitos podem ocorrer em qualquer nível da hierarquia biológica: célula, órgão, organismo, população, comunidade ou ecossistema (BILA; DEZOTTI, 2003; REIS FILHO et al., 2007; TAMBOSI, et al., 2010). Esses efeitos podem incluir também: a seleção genética, a desregulação endócrina, a genotoxicidade e as mudanças no comportamento e no funcionamento metabólico das espécies que compõem um ecossistema (TAMBOSI et al., 2010).

O processo de avaliação dos impactos ambientais de um fármaco varia entre os diferentes países. Os protocolos mais criteriosos são os da União Europeia e dos Estados Unidos. O procedimento de avaliação dos impactos ambientais de um novo fármaco é um processo desenvolvido em dois níveis. Inicialmente, o fabricante deve estimar as concentrações que serão introduzidas nos compartimentos ambientais, com base nas estimativas totais de cinco anos de produção. Se a concentração de entrada no ambiente do fármaco, ou dos seus produtos de transformação ativos, no ponto de lançamento (por exemplo, via efluentes) nos ambientes aquáticos for menor que  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (1 ppb) a produção desse fármaco é considerada aceitável e não será necessário ampliar a avaliação dos seus riscos. Nesse caso não será implementado o monitoramento para confirmar as suas concentrações após sua entrada no mercado (JONES et al., 2004).

No caso da concentração calculada ser maior que  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  uma avaliação formal e completa deverá ser conduzida, contemplando dados sobre destino ambiental e de ensaios ecotoxicológicos. Os dados ecotoxicológicos básicos, considerado nessa avaliação, devem compreender parâmetros como metabolismo bacteriano, toxicidade aguda para pelo menos uma espécie de alga, uma de invertebrados aquáticos e uma de peixes. Testes para avaliação da toxicidade crônica seriam empregados apenas em certas situações, como por exemplo, se o fármaco tem potencial de bioacumulação (JONES et al., 2004).

Alguns dos ensaios ecotoxicológicos mais empregados para avaliação de produtos farmacêuticos são aqueles que utilizam: algas (*Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus leopoliensis*, *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus acutus* entre outras), cnidários (*Hydra attenuata*), moluscos (*Chironomus tentans* e *Chironomus riparius*), camarões (*Palaemonetes pugio*), copépodes (*Nitocra spinipes*), anfípodos (*Hyaella azteca*), peixes (*Gambusia affinis*, *Oryzias latipes*, *Salmo trutta*, *Pimephales promelas*), bactérias (*Vibrio fischeri*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas salmonicida*), crustáceos (*Daphnia magna*, *Moina macrocopa*, *Gammarus pulex*, *Artemia salina* e *Ceriodaphnia dubia*), rotíferos

(*Brachionus calyciflours*), diatomáceas (*Cyclotella meneghiniana*), plantas (*Amaranthus retroflexus*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Raphanus sativus*, *Zea mays*), macrófitas aquáticas (*Lemna minor*, *Lemna gibba* e *Myriophyllum sibiricum*), anelídeos e enquitreídeos (FATTA-KASSINOS et al., 2011).

Embora os ensaios ecotoxicológicos sejam recomendados para a caracterização do perigo de fármacos e de amostras ambientais poucos estudos focados na avaliação de resíduos industriais da produção de medicamentos veterinários estão disponíveis. No Brasil há estudos focados na determinação e quantificação de fármacos usados para tratamento humano (SODRÉ et al., 2010; LOCATTELI et al., 2011), porém, não foram encontrados na literatura revisada, estudos sobre a contaminação ambiental por fármacos de uso veterinário. Assim, a caracterização ecotoxicológica dos resíduos de indústrias farmacêuticas veterinárias pode ser o primeiro passo para o entendimento dos impactos ambientais desses produtos.

#### 2.4 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS APLICADOS NAS ANÁLISES DOS RESÍDUOS GERADOS NA PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

A utilização de ensaios ecotoxicológicos para o monitoramento da atividade biológica de extratos, suas frações e compostos químicos isolados tem sido frequentemente incorporada à identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas (NOLDIN et al., 2003; BAGATINI, 2009). Eles permitem, geralmente, uma avaliação bastante segura do potencial tóxico de substâncias ou de meios contaminados, permitindo também deduções indiretas do seu risco para o meio ambiente. Desta forma, os ensaios ecotoxicológicos são ótimas ferramentas para auxiliar na tomada de decisões visando à preservação da biota (BRENTANO, 2006; MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

As aplicações dos princípios da ecotoxicologia demandam a seleção de um organismo teste para ser utilizado em ensaios realizados sob condições específicas e controladas, os organismos são expostos a diferentes concentrações de uma amostra em que seus efeitos tóxicos são observados e quantificados (COSTA et al., 2008). São consideradas espécies indicadoras, preferencialmente, espécies sensíveis e locais (BOHRER, 1995). Seguindo os critérios utilizados para a escolha de um organismo teste e buscando uma avaliação mais ampla dos possíveis efeitos tóxicos para diferentes níveis da cadeia trófica foram selecionados para a realização desse trabalho as espécies *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*.

### 2.4.1 Organismos utilizados nos testes de toxicidade aguda

Na ecotoxicologia, os testes podem ser classificados em agudos e crônicos, diferenciando apenas na duração da exposição dos organismos teste e na severidade das respostas finais avaliadas (COSTA et al., 2008). Nos testes de toxicidade aguda os organismos são expostos a uma dose única ou doses múltiplas durante um curto período de tempo (normalmente 24 h) em relação ao seu período de vida. Essa exposição pode ocorrer por qualquer via (NORBERG et al., 2007; COSTA et al., 2008). O curto período de tempo implica em um período de 24 horas e em alguns casos os efeitos considerados agudos podem ocorrer até 96 h após o início da exposição dependendo do organismo utilizado. Este tipo de teste tem como objetivo prever a dose ou concentração de qualquer substância tóxica capaz de produzir uma resposta específica mensurável em uma espécie alvo num período de tempo relativamente curto (COSTA et al., 2008). A letalidade ou o estado de imobilidade são efeitos tóxicos agudos frequentemente medidos nos organismos teste (COSTA et al., 2008). A toxicidade aguda mensurada nos testes é expressa normalmente em concentração efetiva (CE), ou seja, a concentração de uma substância que provoca uma resposta máxima ou que mata um organismo após um tempo de exposição indicado. Por exemplo, a concentração efetiva mediana (CE<sub>50</sub>) o qual afeta cinquenta por cento da população exposta a um agente tóxico após um determinado tempo (NORBERG et al., 2007; NORBERG et al., 2009). A concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) também é um outro valor determinado por este teste (COSTA et al., 2008). *Allium cepa*, *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Hydra attenuata* e *Lactuca sativa* são exemplos de organismos padronizados para ensaios ecotoxicológicos agudos (COSTA et al., 2008).

Os microcrustáceos de água doce da ordem Cladocera e dos gêneros *Daphnia* e *Ceriodaphnia* são muito usados para avaliação de toxicidade por serem amplamente distribuídos nos corpos d'água e importantes em muitas cadeias alimentares do zooplâncton. Estes apresentam um ciclo de vida consideravelmente curto, são de fácil cultivo em laboratório e sensíveis a vários contaminantes do ambiente aquático. Devido ao seu tamanho, necessitam de pequenos volumes de amostras e de água de diluição. Além disso, a reprodução assexuada por partenogênese permite a produção de organismos geneticamente idênticos, obtendo assim, organismos teste com sensibilidade constante (BRENTANO, 2006; COSTA et al., 2008).

A *Daphnia similis* Straus, 1820 atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática. É uma das espécies mais utilizadas desse gênero em testes ecotoxicológicos e um

grande número de informações sobre as técnicas de cultivo, temperatura, luz, nutrientes e resposta à exposição a muitas substâncias tóxicas estão disponíveis na literatura. Alimentam-se por filtração e tem larga distribuição no hemisfério norte (BRENTANO, 2006; COSTA et al., 2008).

A toxicidade aguda é avaliada através de alterações na motilidade das *Daphnias*. Este ensaio, como descrito na norma NBR 12713 (ABNT, 2009), utiliza organismos com 24 h de idade. Os testes são realizados no escuro a uma temperatura constante. A imobilidade dos recém-nascidos é avaliada após 24 e 48 h do início da exposição, e esta é considerada quando os organismos se encontram no fundo dos frascos e não se movimentam dentro dos 15 segundos de observação. A resposta final medida é determinada quando a concentração estimada (CE<sub>50</sub>) imobilizar 50% dos dafinídeos após 48 h de exposição ao toxicante (FERNÁNDEZ-ALBA et al., 2002).

#### **2.4.2 Organismos utilizados nos testes de toxicidade crônica**

Efeitos crônicos acontecem após exposição repetida ou prolongada, podendo abranger parte ou todo ciclo de vida do organismo (NORBERG et al., 2007; COSTA et al., 2008; NORBERG et al., 2009). Porém, em casos específicos, estes efeitos também podem ocorrer após uma única exposição se desenvolvendo lentamente ou por um longo período, sendo muitas vezes irreversíveis. Os efeitos crônicos podem estar associados ao acúmulo de uma substância tóxica ou de produtos formados durante a sua biotransformação (NORBERG et al., 2007). O fato de uma substância não apresentar efeitos tóxicos sobre organismos teste em ensaios de toxicidade aguda, não significa que ela não seja tóxica (COSTA et al., 2008). Os teste crônicos permitem a utilização de concentrações sub-letais nas quais os organismos teste sobrevivem, porém suas funções biológicas são afetadas, tais como reprodução e desenvolvimento de ovos (COSTA et al., 2008). Os resultados obtidos neste teste são expressos como CEO (Concentração de Efeito Observado) ou CENO (Concentração de Efeito não Observado), mas podem ser também expressas em CE<sub>50</sub> (NORBERG et al., 2007; COSTA et al., 2008; NORBERG et al., 2009). Organismos como *C. dubia*, *P. subcapitata*, *O. niloticus* e até mesmo *D. similis* são utilizados em ensaios de toxicidade crônica.

Devido ao seu papel funcional nos ecossistemas e, por ser uma espécie de ampla distribuição geográfica, a *Ceriodaphnia dubia* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera, Daphnidae) da região Neotropical tem sido muito utilizada como organismo teste. Outras

vantagens do seu uso em ensaios ecotoxicológicos são seu fácil cultivo em laboratório, sua sensibilidade quando expostas a efluentes, seu curto ciclo de vida e pelo fato de ser um grupo responsável pela conversão do fitoplâncton e bactérias em proteína animal disponibilizada para animais superiores (FONSECA; ROCHA, 2004).

De acordo com a NBR 13373 (ABNT, 2010), o ensaio com *C. dubia* se inicia com a seleção de organismos com até 24 horas, que serão expostos as amostras por até 8 dias. A cada dois dias a solução é renovada, os organismos são alimentados e é registrada a sobrevivência e o número de filhotes por indivíduo. Por se tratar de um organismo partenogenético (reprodução assexuada) os indivíduos são mantidos individualmente e o parâmetro avaliado neste ensaio é a sobrevivência e a reprodução dos indivíduos durante todo o período do teste. Os resultados de sobrevivência e a reprodução dos organismos são comparados com os do grupo controle. Segundo o protocolo, o nível máximo de mortalidade permitido no grupo controle é de 20%, (ABNT, 2010; BRENTANO, 2006).

## 2.5 JUSTIFICATIVA

Os fármacos de uso veterinário estão sendo encontrados em diferentes compartimentos ambientais em várias partes do mundo. Embora não se conheça os riscos à saúde humana, relacionados à sua presença, alguns autores destacam a relevância dos seus impactos sobre a biota (BOUND; VOULVOULIS, 2004). Segundo Bila e Dezotti (2003), alguns grupos de fármacos como os antibióticos (utilizados como promotores de crescimento do gado, na aquicultura e na produção avícola e suína) acarretam problemas ambientais como a contaminação de corpos hídricos e o desenvolvimento de micro-organismos resistentes a estes fármacos.

No Brasil, existem estudos focados em fármacos usados para tratamento humano, porém não foram encontrados estudos sobre a contaminação ambiental por fármacos de uso veterinários (SODRÉ et al., 2010; LOCATTELI et al., 2011). A produção de rebanhos no Brasil conforme IBGE (2009) é da ordem de 3 bilhões de cabeças. Estima-se que a demanda interna de carne apenas para o rebanho bovino no Brasil, em 2012, seria de 8 milhões de toneladas (KUNZ, 2009). Assim, espera-se que a presença destes fármacos no ambiente ocorra no Brasil, devido a alta demanda, colocando o país, juntamente com os Estados Unidos, França e Alemanha como os maiores consumidores de medicamentos em todo o

mundo (PEDROZO, 2007). O valor exato da quantidade de medicamentos veterinário produzidos no Brasil não está disponível e os dados relativos ao consumo desses produtos não foram encontrados (TAMBOSI et al., 2010). Mas em vista do elevado crescimento do setor agropecuário podemos inferir que toneladas são produzidas e consumidas todos os anos.

Os resíduos gerados durante a produção de fármacos veterinários possuem alto potencial poluidor. A realização de ensaios ecotoxicológicos permite a avaliação desses resíduos como um todo, detectando a toxicidade relativa ao somatório de todas as substâncias tóxicas presentes e também a toxicidade resultante das interações que podem ocorrer entre elas. A utilização de ensaios biológicos é uma estratégia eficiente para a descoberta de novos toxicantes, para a avaliação do potencial tóxico de amostras complexas e para o monitoramento ambiental. O desenvolvimento de baterias de ensaios ecotoxicológicos validadas pode se tornar uma importante ferramenta na avaliação da eficiência dos procedimentos de tratamentos de resíduos, útil no fornecimento de subsídios para o seu correto gerenciamento e para monitoramento dos seus impactos ao meio ambiente. Nesse contexto o presente trabalho empregou ensaios ecotoxicológicos para avaliar a toxicidade de resíduos gerados por uma indústria farmacêutica veterinária localizada na região sudeste.

## 2.6 OBJETIVOS

### 2.6.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade de efluentes brutos e tratados gerados durante a produção de medicamentos veterinários empregando os ensaios ecotoxicológicos de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*.

### 2.6.2 Objetivo Específico

- a) Avaliar os efeitos tóxicos agudos e crônicos dos efluentes resultantes da fabricação de medicamentos veterinários, bem como impacto do tratamento de efluentes na toxicidade observada;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os testes ecotoxicológicos bem como o preparo das amostras foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade do Instituto de Ciências da Natureza (ICN) da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG e no Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental "Prof. Dr. Abílio Lopes" da Faculdade de Tecnologia - FT da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp – *campus* Limeira.

Os testes foram utilizados para avaliar a toxicidade de efluentes brutos e tratados gerados durante o processo de fabricação de medicamentos veterinários em uma indústria farmacêutica localizada na região sudeste, Brasil, onde são produzidos fármacos das seguintes classes: antibióticos, hormônios, antiparasitários e complexos vitamínicos. Esse estudo empregou como organismos teste dois organismos aquáticos, os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* (FIGURA 1).



Figura 1 - Organismos empregados para ensaios de toxicidade – *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*.

Fonte: MBL Aquaculture

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS DO TRATAMENTO DE EFLUENTES E AMOSTRAGEM

O sistema de tratamento de efluentes da indústria farmacêutica é composto por uma etapa de tratamento químico, realizado por meio de floculação e seguido de uma etapa de tratamento biológico do tipo aeróbio. No tratamento químico são utilizados o hidróxido de sódio para ajuste de pH, o sulfato de alumínio como floculante e polímeros orgânicos para a flotação e consequente redução de sólidos suspensos. Os efluentes resultantes do tratamento químico são encaminhados para o tratamento biológico aeróbio convencional. A Figura 2



mostra as etapas do tratamento de efluentes onde foram coletadas as amostras avaliadas nesse trabalho.

Foram realizadas 5 campanhas de amostragem bimestralmente entre outubro de 2011 e julho de 2012. As amostras de efluentes brutos, tratados quimicamente e tratados biologicamente foram coletadas na indústria farmacêutica veterinária utilizando recipiente de polietileno lavado e desinfestado. Todas as amostras foram armazenadas em frascos estéreis de plástico atóxico e mantidas congeladas a menos  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 3) até a realização dos testes ecotoxicológicos, por no máximo três meses.



Figura 2- Etapas do tratamento na ETE da indústria onde foram coletadas as amostras de efluente bruto (1), efluente tratado quimicamente (2) e efluente tratado biologicamente (3).

Fonte: Do autor



Figura 3- Amostras armazenadas em frascos estéreis e atóxicos e mantidas refrigeradas para transporte.  
Fonte: Do autor

### 3.2 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS AMOSTRAS

As amostras coletadas foram submetidas à determinação dos seguintes parâmetros físico-químicos: pH (utilizando medidor de pH portátil – PHTEK- modelo PH100); temperatura e oxigênio dissolvido (OD) (empregando um oxímetro da marca OAKTLON modelo 600), condutividade (empregando condutivímetro, modelo W120 – BEL) (CESAR et al., 1997) e o teor de amônia (empregando eletrodo de íon de amônia - High Performance Ammonia Ion Selective Electrode – Thermo Scientific) (FIGURA 4).



Figura 4- Determinação dos parâmetros físico-químicos das amostras de efluentes bruto, pós-tratamento químico e pós - tratamento biológico.

Fonte: Do autor

### 3.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Neste estudo, foi utilizado para avaliar a toxicidade aguda das amostras coletas nas cinco campanhas, o microcrustáceo *D. similis*. Os ensaios foram desenvolvidos de acordo com os protocolos pré-estabelecidos, no laboratório da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP – *campus* Limeira. Foram avaliados os efluentes brutos, quimicamente tratados e biologicamente tratados.

#### 3.3.1 Empregando o microcrustáceo *Daphnia similis*

Antes da realização dos testes de toxicidade aguda com a *Daphnia similis* foi necessário desenvolver o seu cultivo. A padronização da metodologia de cultivo da *D. similis* está descrita na norma brasileira NBR 12713 (ABNT, 2009). Visando a sua manutenção em laboratório sob condições que permitam a avaliação da toxicidade das amostras (BRENTANO, 2006; KIM et al., 2010), os organismos foram mantidos em recipiente de 2 L sob fotoperíodo com 16 h de luz e temperatura entre 18 e 22 °C, incubados em câmara do tipo B.O.D. (BRENTANO, 2006). Os microcrustáceos foram alimentados com *Pseudokirchneriella subcapitata* e meio MS diariamente (BRENTANO, 2006; LIGUORO et al., 2009; KIM et al., 2010).

Os indivíduos de *D. similis* foram avaliados quanto a sua sensibilidade mensalmente utilizando como controle positivo o dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ). Os testes das amostras foram conduzidos de acordo com a norma brasileira NBR 12713 (ABNT, 2009; BRENTANO, 2006). Em todos os testes foram utilizados neonatos com 2 a 26 h de idade com exposição de cinco organismos a cada concentração (0%; 0,001%; 0,01%; 0,1%; 1%; 10%; 25%; 50% e 100%), em quatro réplicas, por 48 h. Como controle negativo foi empregada água de diluição. Após o período de exposição foi contabilizado o número de indivíduos imóveis em cada concentração testada, e os resultados foram expresso em  $CE_{50}$  (FIGURA 5) (BRENTANO, 2006; LIGUORO et al., 2009).

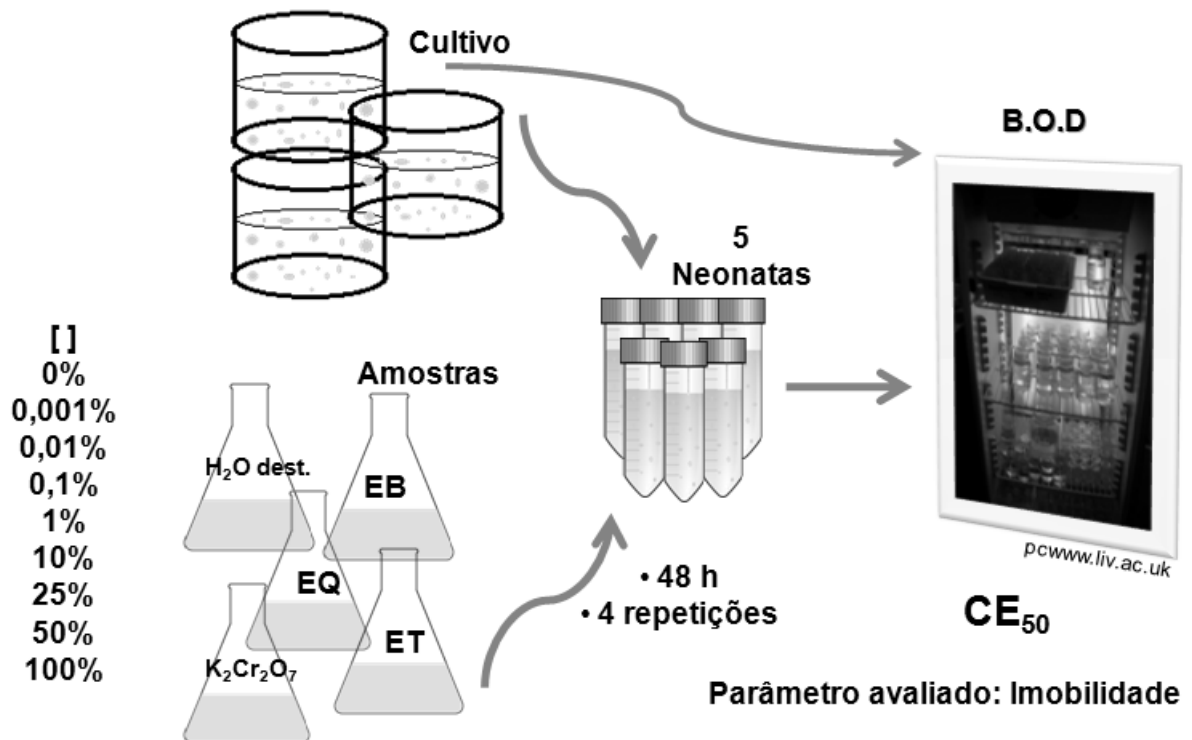


Figura 5 - Metodologia estabelecida pela NBR 12713 para ensaios de toxicidade aguda utilizando *Daphnia similis*.

Fonte: Do autor

### 3.4 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA

No teste para avaliar a toxicidade crônica das amostras foi utilizado, o microcrustáceo *C. dubia*. Os ensaios foram desenvolvidos de acordo com os protocolos pré-estabelecidos, no laboratório da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP – *campus* Limeira. Foram analisadas as amostras de efluentes brutos, quimicamente tratados e biologicamente tratados das cinco campanhas.

#### 3.4.1 Empregando o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*

A Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT desenvolveu a NBR 13373, intitulada Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (ABNT, 2010). De acordo com o título, este protocolo refere-se a testes

com o organismo *Ceriodaphnia sp*, com período de exposição dos organismos de 7 dias, com fluxo semiestático e o parâmetro avaliado é a reprodução do organismo visando a determinação da  $CI_{50}$  (BRENTANO, 2006). O cultivo em laboratório foi realizado de acordo com a norma NBR 13373 (ABNT, 2010), visando a sua manutenção em laboratório, sob condições, que permitiam a avaliação da toxicidade das amostras (BRENTANO, 2006; ROSA, 2008). Os organismos foram mantidos em recipiente de 2 L sob fotoperíodo com 16 h de luz e temperatura entre 18 e 22 °C, incubados em câmara do tipo B.O.D. (ROSA, 2008). Foram alimentados com *Pseudokirchneriella subcapitata* e Vitohormônio (ração fermentada adicionada de leveduras). Nos ensaios, os organismo foram mantidos em frascos coletores universais com meio líquido, com temperatura, luz e pH controlados e colocados em B.O.D à 25 °C com fotoperíodo de 16 h (FIGURA 6). Os microcrustáceos foram alimentados a cada 48h com a alga *P. subcapitata* e vitohormônio onde eram feitas as contagens de organismos neonatos e seu descarte, bem como, eram recolocadas 10 mL das amostras testadas (ROSA, 2008).

Para o teste de toxicidade crônica, os organismos foram expostos a diferentes concentrações dos efluentes, ajustadas as diferentes amostras de cada coleta, variando de 0,01% a 0,0000001% (v/v), de acordo com os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com *D. similis*. Como controle negativo foi usado água reconstituída e como controle positivo, NaCl (ROSA, 2008). Em todos os ensaios foram utilizados organismos neonatos e em cada concentração foi exposto um indivíduo em dez réplicas.

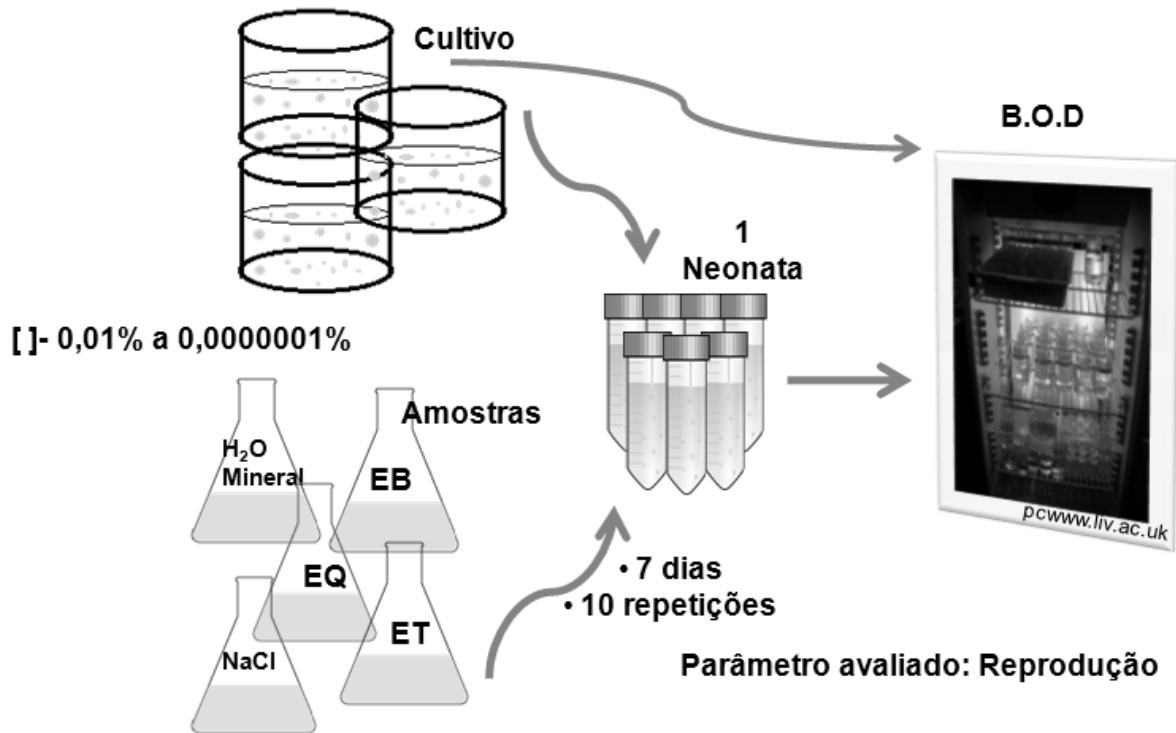


Figura 6: Metodologia estabelecida pela NBR 13373 para ensaios de toxicidade crônica utilizando *Ceriodaphnia dubia*.

Fonte: Do autor

### 3.5 ANÁLISES DOS DADOS

Os dados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda com *D. Similis* foram submetidos a análises estatísticas pelo método “Trimmed Spearman-Kärber” (HAMILTON, et al., 1997) utilizando o programa JSPEAR. Nos testes de toxicidade crônica com *C. dubia* foi utilizado o programa ICPIN (NORBERT-KING, 1993).

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados estão apresentados na forma de um artigo científico submetido à Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental intitulado como “Ecotoxicidade de Efluentes Brutos e Tratados Provenientes de Uma Fábrica de medicamentos Veterinários” (Anexo A)

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA De NORMAS TÉCNICAS. ABNT **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2 ed., 21 p., 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA De NORMAS TÉCNICAS. ABNT **NBR 13373**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2 ed., 15 p., 2010.

AKINTONWA, A. et al. Assessment of the mutagenicity of some pharmaceutical effluents. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 4, n. 4, p. 144-150, 2009.

BAGATINI, M. D. et al. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 632-636, 2009.

BERRY, M. A.; RONDINELLI, D. A. Environmental management in the pharmaceutical industry: Integrating corporate responsibility and business strategy. **Environmental quality management**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 21-35, 2000.

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

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Revisão - Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BOHRER, M. B. **Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do sistema de tratamento dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplânctônica**. 1995. 469 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, 1995.

BOUND, J. P.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals in the aquatic environment-a comparison of risk assessment strategies. **Chemosphere**, v. 56, p. 1143–1155, 2004.

BOXALL, A. B. A. et al. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental science & technology**, Washington, v. 37, n. 15, p. 286 -294, 2003.



BOXALL, A.B.A. et al. Review of Veterinary Medicines in the Environment. **Environment Agency Project Manager**, v. 8, p. 1-251, 2004.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA n° 357** de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 17 de março de 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA n° 375** de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 29 de agosto de 2006.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA n° 430** de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Diário Oficial da União, 16 de maio de 2011.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia Magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário**. 2006. 149f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Santa Catarina. 2006.

CALARGE, F. A.; SATOLO, E. G.; SATOLO, L. F. Aplicação do sistema de gestão da qualidade BPF (boas práticas de fabricação) na indústria de produtos farmacêuticos veterinários. **Gestão & Produção**, São Carlos, v. 14, n. 2, p. 379-392, 2007.

CALISTO, V.; ESTEVES, V. I. Review: Psychiatric pharmaceuticals in the environment. **Chemosphere**, v. 77, p. 1257–1274, 2009.

CAPANEMA, L. X. L. et al. Panorama da indústria veterinária. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 157-174, 2007.

CARLSSON, G.; ORN, S.; LARSSON, D. G. J. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment - Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, USA, v. 28, n. 12, p. 2656–2662, 2009.

CESAR, A.; SILVA, S. L.; SANTOS, A. R. Testes de toxicidade aquática no controle da poluição. **Universidade Santa Cecília – UNISANTA**, Santos, v. 1, p. 37, 1997.

CHASIN, A. A. M.; PEDROZO, M. F. M. O estudo da toxicologia. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (Org.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**, São Carlos, 2003, 340 p.

CLEUVERS, M. Short communication: Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology Letters**, Alemanha, v. 142, p. 185-194, 2003.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 6, p. 340-351, 2003.

FATTA-KASSINOS, D.; MERIC, S.; NIKOLAOU, A. Pharmaceutical residues in environment Waters and wastewater: current state of knowledge. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Heidelberg, v. 399, p. 251-275, 2011.

FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. et al. Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency. **Water Research**, v. 36, p. 4255-4262, 2002.

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnologica Brasiliense**, v. 16, n. 4, p. 319-328, 2004.

HALLING-SORENSEN, B. et al. A Review - Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357-393, 1998.

HAMILTON, M. A.; RUSSO R. C.; THURFTON R. B. Trimmed Spearman–Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 11, p. 714-719, 1977.

HERNANDO, M. D. et al. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, London, v. 69, p. 334–342, 2006.

HEWITT, L. M.; MARVIN, C. H. Analytical methos in environmetal effects-directed investigation of effluents. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 589, p. 208-232, 2005.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Produção Agropecuária - 2009**. Rio de Janeiro, 2009.

JONES, O. A. H.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. N. Potencial ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 34, n. 4, p. 335-350, 2004.

JONES-LEPP, T. L.; STEVENS, R. Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Heidelberg, v. 387, p. 1173-1183, 2007.

KAPANEN, A.; ITAVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 49, p. 1-16, 2001.

KIM, S.; AGA, D. S. Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, London, v. 10, n. 8, p. 559 - 573, 2007.

KIM, J. et al. Implication of global environmental changes on chemical toxicity effect of water temperature, pH, and ultraviolet B irradiation on acute toxicity of several pharmaceuticals in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**. v. 19, p. 662–669, 2010.

KOSONEN, J.; KRONBERG, L. The occurrence of antihistamines in sewage waters and in recipient rivers. **Environmental Science Pollution Research**, v.16, p. 555–564, 2009.

KUNZ, A. Transformações da produção animal no Brasil e suas consequências ambientais. In: 1º SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS DE ANIMAIS, 1, 2009, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: [s.n.], 2009.

LIGUORO, M.D.; FIORETTO, B.; POLTRONIERI, C.; GALLINA, G. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim. **Chemosphere**, v. 75, p. 1519–1524, 2009.

LIN, A. Y. C.; YU, T. H.; LIN, C. F. Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. **Chemosphere**, v. 74, p.131–141, 2008.

LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Archives of environmental contamination and toxicology**, New York, v. 60, p. 385-393, 2011.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A Ecologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, p 355-381, 2008.

MBL Aquaculture - Excepcional Aquaculture Reliable Results. Marincio Bioassay Laboratory, Inc. 2005. Disponível em: <http://www.mblaquaculture.com/content/organisms/daphnids.php>. Acesso em: 11 mar. 2013.

NOLDIN, V. F.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

NORBERT-KING, T. J. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (IC<sub>p</sub>) approach (Version 2.0). USEPA, Dulunth Minnesota., Tech. Rept. 03-93, **National Effluent Toxicity Assessment Center**, 25 p.,1993.

NORDBERG, M.; DUFFUS, J. H.; TEMPLETON, D. M. Explanatory dictionary of key terms in toxicology. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 9, p. 1583–1633, 2007.

NORDBERG, M. et al. Glossary of Terms Used in Ecotoxicology. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v. 81, n. 5, p. 829–970, 2009.

OLLER, I.; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J.A. Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination—A review. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 4141–4166, 2011.

PEDROSO, C. F. Indústria farmacêutica. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 26, 2007.

REIS FILHO, R. W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. **Journal Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 283-288, 2007.

ROSA, E. V. C. et al. Toxicity-based criteria for the evaluation of textile wastewater treatment efficiency. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 20, p. 839-845, 2001.

ROSA, G. A. B. **Estudos dos Efeitos do Fármaco Propranolol para *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crutacea) com Ênfase em Efeitos nas Populações**. 2008. 161f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SHARMA, K. P.; SHARMA, S.; SHARMA, S.; SINGH, P. K.; KUMAR, S.; GROVE, R.; SHARMA, P. K. A comparative study on characterization of textile waste waters (untreated and treated) toxicity by chemical and biological tests. **Chemosphere, Oxford**, v. 69, p. 48-54, 2007.

SODRÉ, F. F.; PESCARA, I. C.; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical journal**, New York, v. 96, n. 1, p. 92-98, 2010.

TAMBOSI, J. L.; YAMANAKA, L. Y.; JOSÉ, H. J.; MOREIRA, R. F. P. M. Recent research data on the removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP). **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 411-420, 2010.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soil: a review. **Environmental science & technology**, Washington, v.35, n. 17, p. 3397-3406, 2001.

WAACK, R. S. Fusões e aquisições na indústria farmacêutico-veterinária. **Cadernos de Pesquisas em Administração**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 81-98, 2000.

WATANABE T., OHE T., HIRAYAMA T. Occurrence and origin of mutagenicity in soil and water environment. **Environmental sciences**, Tokyo, v. 12, n. 6, p. 325-346, 2005.

WATANABE, N.; BERGAMASCHI, B.; LOFIN, K.; MEYER, T. M.; HARTER, T. Use and Environmental Occurrence of Antibiotics in Freestall Dairy Farms with Manured Forage Fields. **Environmental science & technology**, Washington, v. 44, p. 6591–6600, 2010.

WILKE, B. M.; RIEPERT, F.; KOCH, C.; KÜHNE, T. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 70, p. 283-293, 2008.

ZEWIENER, C. Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Heidelberg, v. 387, p. 1159-1162, 2007.

ANEXO A – ARTIGO INTITULADO "ECOTOXICIDADE DE EFLUENTES BRUTOS E  
TRATADOS PROVENIENTES DE UMA FÁBRICA DE MEDICAMENTOS  
VETERINÁRIOS"

**Autores:** Bianca de S. Maselli, Luis A. V. Luna, Sandro Barbosa, Luiz A. Beijo, Gisela de A. Umbuzeiro, Fábio Kummrow

**Artigo redigido conforme normas da revista Brasileira de Engenharia Agrícola e  
Ambiental**

1 **Ecotoxicidade de efluentes brutos e tratados provenientes de uma fábrica de**  
2 **medicamentos veterinários**

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10 **Resumo:** Efluentes de indústrias farmacêuticas veterinárias, que formulam medicamentos,  
11 são gerados principalmente durante a lavagem dos equipamentos. O objetivo desse trabalho  
12 foi avaliar a toxicidade aguda para *Daphnia similis* e crônica para *Ceriodaphnia dubia*, dos  
13 efluentes brutos e tratados gerados por uma indústria farmacêutica veterinária. O sistema de  
14 tratamento de efluentes usado é composto por uma etapa de tratamento químico seguida do  
15 tratamento biológico aeróbio (lodo ativado). Foram realizadas 5 amostragens entre outubro de  
16 2011 e julho de 2012. As amostras de efluentes brutos apresentaram elevada toxicidade aguda  
17 (quarta campanha com  $CE_{50} - 48 \text{ h}$  de  $<0,001\%$ ) e crônica (terceira campanha com  $CI_{50} - 7$   
18 dias  $<0,0001\%$ ). As amostras de efluentes tratados quimicamente foram as mais tóxicas com  
19  $CE_{50} - 48 \text{ h}$  entre  $<0,001$  e  $0,1\%$  e  $CI_{50} - 7$  dias entre  $0,00001$  e  $0,0001\%$ , provavelmente  
20 relacionada ao uso de sulfato de alumínio como agente floculante. O tratamento biológico  
21 levou a uma pequena diminuição da toxicidade dos efluentes. Os testes ecotoxicológicos  
22 foram adequados para identificar a toxicidade dos efluentes e úteis para avaliar a eficiência  
23 das etapas do tratamento. Mais atenção deve ser dada para melhorar o tratamento da indústria  
24 estudada, devido aos elevados níveis de toxicidade dos efluentes finais.

25 **Palavras-chave:** indústria farmacêutica veterinária, eficiência do tratamento de efluentes,  
26 *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*

## 27 **Ecotoxicity of raw and treated effluents generated by a veterinary medicines factory**

28

29 **Abstract:** Effluents from veterinary pharmaceutical industries that formulate medicines are  
30 mainly generated during the washing of the equipment's. The aim of this work was to  
31 evaluate the acute toxicity to *Daphnia similis* and chronic toxicity for *Ceriodaphnia dubia* of  
32 the raw and treated effluents generated by a veterinary pharmaceutical industry. The effluent  
33 treatment system used comprises a step of chemical treatment followed by aerobic biological  
34 treatment (activated sludge). Five samplings were performed between October 2011 and July  
35 2012. The raw effluent samples showed high acute toxicity (fourth sampling with  $EC_{50} - 48\text{ h}$   
36  $<0.001\%$ ) and chronic (third sampling with  $IC_{50} - 7\text{ days}$   $<0,0001\%$ ). The chemically treated  
37 effluent samples were the most toxic with  $EC_{50} - 48\text{ h}$  between  $<0.001$  and  $0.1\%$  and  $IC_{50} - 7$   
38 days between  $0.00001$  and  $0.0001\%$ . This increase in toxicity is probably related to the use of  
39 aluminum sulfate as flocculating agent. The biological treatment led to a small reduction in  
40 toxicity of the effluents. The ecotoxicity tests were adequate for identifying the effluent  
41 toxicity and useful for evaluating the efficiency of the steps of the treatment. More attention  
42 should be given to improve the treatment of the studied industry considering the high levels  
43 of toxicity of the final effluent.

44 **Key words:** veterinary pharmaceutical industry, efficiency of the effluent treatment, *Daphnia*  
45 *similis*, *Ceriodaphnia dubia*

46

47

48

49

50

51

52

53

54



## INTRODUÇÃO

55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85

Fármacos veterinários foram encontrados em diferentes partes do mundo no solo, em sedimento, no lodo do tratamento de esgoto, nas águas superficiais e subterrâneas e em efluentes industriais (Boxall et al., 2003; Akintonwa et al., 2009; Watanabe et al., 2010). Produtos farmacêuticos veterinários compõe uma classe especial de poluentes, pois necessariamente apresentam elevada atividade fisiológica, sendo usados na agroindústria para combater parasitas, na prevenção e tratamento de doenças bacterianas e como agentes promotores de crescimento. Por serem desenvolvidos para possuir certa resistência aos processos de biotransformação, esses compostos apresentam maior resistência à biodegradação, fato que aumenta os seus efeitos terapêuticos (Boxall et al., 2003; Fatta-Kassinis et al., 2011), mas que contribui também para sua persistência ambiental (Fatta-Kassinis et al., 2011).

As fontes de contaminação ambiental por fármacos de uso veterinário normalmente são difusas. Potenciais vias de introdução no ambiente das substâncias utilizadas em criação animal são os lançamentos diretos, seu descarte, a aplicação de excretas como fertilizantes e dissolução direta em corpos d'água onde há aquicultura (Jones et al., 2004). A aplicação de esterco em solos é considerada a principal rota de introdução de produtos farmacêuticos veterinários no meio ambiente (Zwiener, 2007; Fatta-Kassinis et al., 2011). Mesmo não sendo consideradas como importantes fontes de poluição, as indústrias farmacêuticas geram efluentes líquidos, emissões atmosféricas e resíduos sólidos (Akintonwa et al., 2009), e embora a indústria farmacêutica seja considerada de baixo impacto ambiental seu grande desafio atual é o controle e prevenção da poluição ambiental (Berry & Rondinelli, 2000).

As indústrias farmacêuticas incluem quatro tipos de processos de fabricação que são a fermentação, a síntese química, a extração e a formulação, e muitas vezes, geram efluentes recalcitrantes, dependendo dos medicamentos produzidos e dos processos de fabricação (Balcioğlu & Ötker, 2003). Particularmente os efluentes líquidos de indústrias que preparam formulações são resultantes da limpeza dos equipamentos, realizada após cada ciclo de produção, sendo essa etapa a principal responsável pela presença dos fármacos nos efluentes brutos além de outros componentes orgânicos e inorgânicos, que incluem solventes, catalisadores, reagentes diversos e pequenas quantidades de intermediários de síntese (Balcioğlu & Ötker, 2003; Akintonwa et al., 2009; Chen et al., 2011).

86 A composição desses efluentes varia de acordo com o medicamento fabricado, com os  
87 materiais usados no processo, e também de outras características do processo envolvido.  
88 Assim, a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), o  
89 teor de sólidos em suspensão, bem como o pH e as quantidades de fenol e amônia não são  
90 constantes (Akintonwa et al., 2009; Chen et al., 2011). Além disso, a toxicidade para  
91 bactérias e recalcitrância de muitos fármacos (ex.: os antibióticos) pode desempenhar um  
92 papel importante na redução da eficiência de remoção de DQO em sistemas biológicos (Chen  
93 et al., 2011).

94 Quando a composição química dos resíduos industriais é conhecida, os efeitos  
95 nocivos associados ao seu lançamento no ambiente podem ser avaliados por métodos de  
96 estimativa de toxicidade baseados na estrutura molecular dos compostos e na sua abundância.  
97 Porém, determinar quimicamente todos os toxicantes dos efluentes e no lodo gerado durante  
98 o seu tratamento é uma tarefa impraticável. Além disso, a complexidade das relações entre os  
99 compostos e a biota, e o desconhecimento de parte dos constituintes dos efluentes, associados  
100 a possíveis efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos, resultantes das interações entre os seus  
101 constituintes, demonstram que os dados obtidos por métodos embasados somente em análises  
102 químicas são, em muitos casos, inadequados para uma correta avaliação do potencial tóxico  
103 desses resíduos, sendo recomendável uma caracterização complementar com testes  
104 ecotoxicológicos (Kapanen & Itävaara, 2001; Wilke et al., 2008).

105 A ocorrência de fármacos no ambiente ainda está cercada de muitas dúvidas, como  
106 por exemplo, qual seu potencial de causar efeitos tóxicos relevantes para a flora, fauna e seres  
107 humanos, entre eles a interferência endócrina (Fatta-Kassinos et al., 2011). E, embora os  
108 testes ecotoxicológicos sejam recomendados para a caracterização do perigo de fármacos e de  
109 amostras ambientais, poucos estudos dedicados à avaliação de resíduos industriais da  
110 produção de medicamentos veterinários estão disponíveis. No Brasil há estudos focados na  
111 determinação e quantificação de fármacos usados para tratamento humano (Sodré et al.,  
112 2010; Locatteli et al., 2011), porém, não foram encontrados na literatura revisada, estudos  
113 nacionais sobre a contaminação ambiental por fármacos de uso veterinário. Nesse contexto, o  
114 objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade aguda, para *Daphnia similis*, e crônica, para  
115 *Ceriodaphnia dubia*, dos efluentes brutos e tratados de uma indústria farmacêutica veterinária  
116 localizada na região sudeste do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

117

118 O preparo das amostras e os testes ecotoxicológicos e foram realizados no Laboratório  
119 de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade do Instituto de Ciências da Natureza (ICN) da  
120 Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG) e no Laboratório de Ecotoxicologia e  
121 Microbiologia Ambiental "Prof. Dr. Abílio Lopes" da Faculdade de Tecnologia (FT) da  
122 Universidade Estadual de Campinas (Unicamp - *campus* Limeira). Foram avaliados os efeitos  
123 tóxicos agudos e crônicos de amostras de efluentes brutos, tratados quimicamente e tratados  
124 biologicamente, gerados durante o processo de fabricação de medicamentos veterinários e nas  
125 etapas do processo de tratamento da estação de tratamento de efluentes (ETE) de uma  
126 indústria farmacêutica localizada na região sudeste do Brasil.

127 A indústria farmacêutica veterinária, onde as amostras de efluentes foram coletadas,  
128 realiza formulações e emprega o sistema de produção em batelada, sendo fabricadas  
129 anualmente 4 classes de medicamentos (antibióticos, hormônios, antiparasitários e complexos  
130 vitamínicos). Durante as campanhas de coleta estavam sendo fabricados medicamentos das  
131 classes terapêuticas dos antibióticos, antiparasitários e hormônios.

132 O sistema implantado na ETE dessa indústria farmacêutica veterinária é composto por  
133 uma etapa de tratamento químico realizado por meio de floculação e de uma etapa de  
134 tratamento biológico aeróbio convencional do tipo lodo ativado. No tratamento químico são  
135 utilizados o hidróxido de sódio (NaOH) para ajuste de pH, o sulfato de alumínio ( $Al_2(SO_4)_3$ )  
136 como floculante e polímeros orgânicos para a flotação e consequente redução de sólidos  
137 suspensos. Os efluentes resultantes do tratamento químico são encaminhados para o  
138 tratamento biológico.

139 Foram realizadas cinco campanhas de amostragem bimestralmente entre outubro de  
140 2011 e julho de 2012. As amostras de efluentes brutos, tratados quimicamente e tratados  
141 biologicamente foram coletadas na ETE da indústria farmacêutica antes da entrada no  
142 tratamento químico (efluentes brutos - EB), logo após a saída do tratamento químico  
143 (efluente tratado quimicamente - EQ) e no final do processo de tratamento logo após a etapa  
144 de tratamento biológico (efluente tratado biologicamente - EF), utilizando recipientes de  
145 polietileno lavados, de acordo com o protocolo de limpeza básica de frascaria da CETESB  
146 (2011). As amostras foram armazenadas em frascos plásticos e mantidas congeladas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ,  
147 por no máximo 60 dias (CETESB, 2011), até a realização dos testes ecotoxicológicos.

148 As amostras coletadas foram submetidas à determinação dos seguintes parâmetros  
149 físico-químicos: pH (utilizando medidor de pH portátil – PHTEK- modelo PH100);  
150 temperatura e oxigênio dissolvido (OD) (empregando um oxímetro da marca OAKTLON  
151 modelo 600); condutividade (empregando condutivímetro, modelo W120 – BEL) (CETESB,  
152 2011) e teor de amônia (empregando eletrodo de íon de amônia - High Performance  
153 Ammonia Ion Selective Electrode – Thermo Scientific).

154 Os testes de toxicidade aguda foram realizados utilizando o microcrustáceo *D. similis*  
155 de acordo com a norma brasileira NBR 12.713 (ABNT, 2009) e os testes de toxicidade  
156 crônica foram realizados de acordo com a norma brasileira NBR 13.373 (ABNT, 2010),  
157 empregando o microcrustáceo *C. dubia*. Os cultivos de ambos os organismos teste também  
158 foram realizados de acordo com as normas brasileiras (ABNT, 2009; ABNT, 2010).

159 A manutenção em laboratório, sob condições controladas de cultivos, dos organismos  
160 empregados em testes ecotoxicológicos é essencial para garantir a qualidade dos resultados  
161 gerados (Kim et al., 2010). Ambos os organismos teste foram cultivados em recipiente de 2 L  
162 sob fotoperíodo com 16 h de luz e temperatura entre 18 e 22 °C, em câmara do tipo B.O.D.  
163 (ABNT, 2009; ABNT, 2010). Trocas totais da água de cultivo, com limpeza dos recipientes e  
164 contagem dos organismos adultos, foram realizadas a cada 48 h. Nesse momento as *D. similis*  
165 foram alimentadas com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e meio MS, e as *C. dubia*  
166 foram alimentadas com *P. subcapitata* e Vitohormônio (ração fermentada adicionada de  
167 leveduras). As sensibilidades das *D. similis* e das *C. dubia* foram avaliada mensalmente  
168 utilizando como controle positivo o cloreto de sódio (NaCl) (ABNT, 2009; Liguoro et al.,  
169 2009; ABNT, 2010; Kim et al., 2010).

170 Para os testes com *D. similis*, das amostras de efluentes, foram utilizadas neonatas  
171 com 2 a 26 h de idade (ABNT, 2009). Cinco organismos foram expostos a cada concentração  
172 (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 25; 50 e 100% v/v) das diferentes amostras de efluentes, em quatro  
173 réplicas, por um período 48 h de exposição, com ausência de luz e alimento. Como controle  
174 negativo foi empregada água de diluição. Após o período de exposição foi contabilizado o  
175 número de indivíduos imóveis em cada concentração testada e os resultados foram expressos  
176 em concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) (Liguoro et al., 2009).

177 A Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT desenvolveu a NBR 13.373,  
178 intitulada Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com

179 *Ceriodaphnia* spp. (ABNT, 2010). Este protocolo refere-se a testes com período de exposição  
180 dos organismos de 7 dias, com fluxo semiestático. As ceriodaphnias foram mantidas em  
181 frascos coletores universais com meio líquido em câmaras do tipo B.O.D à 25 °C com  
182 fotoperíodo de 16 h. Os microcrustáceos foram alimentados com a alga *P. subcapitata* e  
183 vitohormônio a cada dois dias durante a execução dos testes (ABNT, 2010). Para o teste de  
184 toxicidade crônica, os organismos foram expostos a diferentes concentrações dos efluentes,  
185 ajustadas para cada amostra, variando de 0,01 a 0,0000001% (v/v), com base nos resultados  
186 obtidos para os testes de toxicidade aguda com *D. similis*. Como controle negativo foi usado  
187 água reconstituída. O parâmetro avaliado foi a reprodução dos organismos, visando a  
188 determinação da concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>). Em todos os ensaios foram utilizados  
189 organismos neonatos, e para cada concentração foi exposto um indivíduo em dez réplicas.

190 Os dados obtidos nos testes ecotoxicológicos agudos e crônicos foram submetidos a  
191 análises estatísticas para obtenção das concentrações mediana de imobilização (CE<sub>50</sub> - 48 h),  
192 e concentrações medianas inibitórias da reprodução (CI<sub>50</sub> - 7 dias) calculadas através dos  
193 métodos “Trimmed Spearman-Kraber” e de Interpolação Linear, disponível nos programas  
194 JSPEAR e ICPIN (Hamilton, et al., 1977; Norbert-King, 1993).

195

196

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

197 As amostras de efluentes brutos e tratados testadas apresentaram elevada toxicidade  
198 aguda e crônica. Parte dessa toxicidade poderia ser atribuída a fármacos, reconhecidamente  
199 tóxicos (Reis Filho et al., 2007; Santos et al., 2010), empregados na fabricação dos  
200 medicamentos veterinários e incorporados aos efluentes brutos. A toxicidade observada nos  
201 efluentes tratados pode estar relacionada às substâncias químicas empregadas na etapa de  
202 tratamento químico ou aos próprios fármacos e os seus produtos de degradação, pois é  
203 amplamente aceito que sistemas convencionais de tratamento de efluentes apresentam baixa  
204 remoção de micropoluentes como produtos farmacêuticos (Fatta-Kassinou et al., 2011).

205 Características físico-químicas dos efluentes podem interferir nos resultados dos testes  
206 ecotoxicológicos e assim é de grande importância que se faça as suas determinações e ajuste  
207 sempre que necessário antes da realização dos testes. Neste trabalho foram determinados os  
208 parâmetros: pH, OD, temperatura, condutividade e concentração de amônia. Os resultados  
209 destas determinações e os fármacos que estavam sendo utilizados durante o período de cada

210 amostragem são apresentados na Tabela 1. O pH, a temperatura e o OD apresentaram  
 211 variação relativamente pequena entre as campanhas, porém, a condutividade e a concentração  
 212 de amônia apresentaram maiores variações.

213 Tabela 1. Parâmetros físicos e químicos dos efluentes da produção de medicamentos veterinários, coletados em diferentes  
 214 estágios da ETE, e fármacos que estavam sendo empregados na fabricação dos medicamentos no período de cada campanha  
 215 de amostragem

Coleta	Fármacos	pH			T (°C)			**OD (mg.L <sup>-1</sup> )			Condutividade (µS.cm <sup>-1</sup> )			Amônia (mg.L <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> )		
		*EB	&EQ	#EF	EB	EQ	EF	EB	EQ	EF	EB	EQ	EF	EB	EQ	EF
1	Sulfadiazina															
	Sulfaguanidina															
	Penicilina G procaína potássica	7,0	6,5	6,4	24,3	20,6	23,7	6,2	0,2	1,2	99,7	313,0	276,0	0,9	13,9	3,0
	Penicilina G procaína benzitina															
2	Norfloxacin															
	Norfloxacin															
	Oxitetraciclina	7,1	6,1	6,3	26,7	24,6	26,7	5,3	1,4	1,0	94,7	96,1	97,5	0,9	12,9	11,9
	Medroxiprogesterona															
3	Estreptomocina															
	Enrofloxacin															
	Norfloxacin	7,0	5,0	6,5	23,1	21,4	27,6	4,9	2,4	3,7	470,0	389,0	324,0	14,3	8,7	0,9
	Penicilina G procaína potássica															
4	Sulfadiazina															
	Sulfaguanidina															
	Oxitetraciclina	5,5	6,6	6,2	20,4	19,6	21,7	2,4	2,7	2,3	550,0	553,0	405,0	17,9	19,8	17,7
	Penicilina G procaína potássica															
5	Norfloxacin	7,1	7,6	6,3	15,8	15,0	19,2	8,1	1,4	2,7	1041,0	716,0	411,0	58,8	30,8	5,8
	Enrofloxacin															
	Ivermectina															

216 \*EB - Efluente bruto; &EQ - efluente pós-tratamento químico; #ET - efluente pós-tratamento biológico; \*\*OD - Oxigênio  
 217 dissolvido

218 Os níveis de OD têm forte influência na manutenção de processos de autodepuração  
 219 em sistemas aquáticos naturais e nas ETE. É considerada como condição ideal para a  
 220 realização dos testes ecotoxicológicos que sua concentração seja maior que 2 mg.L<sup>-1</sup>  
 221 (Morales, 2004). Efluentes com elevados valores de DBO e/ou DQO ou que contenham  
 222 populações bacterianas em suas composições podem apresentar concentrações de OD  
 223 menores do que as encontradas nas águas naturais, o que pode provocar estresse ou  
 224 mortalidade dos organismos teste, fazendo com que a toxicidade seja superestimada (Costa et  
 225 al., 2008).

226 A maior parte das amostras de efluentes avaliadas apresentaram valores de OD maior  
227 que 2 mg.L<sup>-1</sup>. Nos efluentes brutos, os níveis de OD não devem ter contribuído para a  
228 toxicidade observada. Porém, para as amostras de efluentes tratados quimicamente que em  
229 geral apresentaram as maiores toxicidades, foram observados os menores valores de OD, fato  
230 que pode ter contribuído para a toxicidade observada. Porém, tanto nos testes de toxicidade  
231 aguda quanto nos testes de toxicidade crônica as CE<sub>50</sub> - 48 h e CI<sub>50</sub> - 7 dias, respectivamente,  
232 foram o determinadas em concentrações bastante diluídas dos efluentes e assim a diluição  
233 deve ter compensado os baixos níveis de OD dos efluentes.

234 O pH é um dos fatores limitantes à sobrevivência dos organismos aquáticos e tem  
235 forte influência sobre toxicidade de metais e de muitos compostos orgânicos, frequentemente  
236 encontrados em efluentes. Em todas as amostras coletadas o pH estava de acordo com a faixa  
237 tolerada por organismos aquáticos (pH entre 6 e 9) (Morales, 2004), exceto nas amostras de  
238 efluente quimicamente tratado (pH 5,0) da terceira campanha e de efluente bruto (pH 5,5) da  
239 quarta campanha em que o pH teve que ser corrigido com NaOH. Não foi observada variação  
240 dos valores de pH durante os testes e assim este fator não influenciou na toxicidade das  
241 amostras analisadas.

242 Tipicamente, os parâmetros de integração, tais como condutividade, sólidos  
243 dissolvidos totais, ou salinidade são utilizados como medida das concentrações de íons em  
244 amostras líquidas. Embora em certos casos haja correlação entre o aumento de condutividade  
245 ou de sólidos dissolvidos totais e aumento da toxicidade, esses parâmetros não são preditores  
246 robustos de toxicidade. Em estudos com águas de drenagem de irrigação, foram encontradas,  
247 para *C. dubia*, valores CL<sub>50</sub> correspondentes a valores de condutividades entre 3500 e 4000  
248 µS.cm<sup>-1</sup>. Efluentes industriais apresentaram importante toxicidade para *C. dubia* com  
249 condutividade de apenas 1800 µS.cm<sup>-1</sup>. Em geral amostras líquidas com elevados níveis de  
250 sólidos dissolvidos totais apresentaram alta toxicidade para *D. magna* (Mount et al., 1997).  
251 Assim podemos inferir que condutividade também não interferiu nos testes ecotoxicológicos,  
252 pois embora algumas amostras apresentarem valores elevados, sugerindo presença de íons em  
253 solução e de alguns nutrientes, os valores de condutividade estão abaixo daqueles que  
254 normalmente elevam ou causam toxicidade.

255 A presença de amônia foi constatada em todas as amostras de efluentes, porém em  
256 quantidades em que não se espera influência na toxicidade da amostra testada. Exceto na

257 última campanha onde os efluentes bruto e quimicamente tratado apresentaram quantidades  
 258 relativamente elevadas de amônia, com valores de 58,84 e 30,80 mg.L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>,  
 259 respectivamente. Contudo essas amostras apresentaram toxicidades aguda e crônica nas  
 260 mesmas faixas das demais amostras que continham concentrações relativamente baixas de  
 261 amônia.

262 Os resultados dos testes de toxicidade aguda para *D. similis* e crônica para *C. dubia*  
 263 são apresentados nas Tabelas 2 e 3. Esses organismos teste foram escolhidos devido a sua  
 264 elevada sensibilidade a diversos poluentes e por apresentarem protocolos padronizados e  
 265 validados, sendo amplamente utilizados para avaliação de amostras de efluentes (Costa et al.,  
 266 2008; Fatta-Kassionos et al., 2011).

267 No delineamento experimental utilizado para os testes de toxicidade crônica, as  
 268 concentrações de efluentes testadas foram determinadas a partir dos resultados obtidos nos  
 269 testes de toxicidade aguda com *D. similis*. A menor concentração que causasse 100% de  
 270 letalidade para *D. similis* foi dividida por 100, para então estabelecer qual seria a maior  
 271 concentração usada nos teste de toxicidade com *C. dubia*, sendo as amostras de efluente  
 272 testadas após elevadas diluições.

273 Tabela 2. Toxicidade aguda para *D. similis*, expressa em CE<sub>50</sub> - 48 h, das amostras de efluentes brutos e tratados gerados na  
 274 produção de medicamentos veterinários

Coleta	CE <sub>50</sub> - 48h (%)		
	EB*	EQ <sup>&amp;</sup>	ET <sup>#</sup>
1	<0, 1	<0, 1	<0, 1
2	0,56	<0,001	0,02
3	0,03	<0,001	0,03
4	<0,001	<0,001	0,02
5	0,02	0,03	0,08

275 \*EB: Efluente bruto; <sup>&</sup>EQ: efluente pós-tratamento químico; <sup>#</sup>ET: efluente pós-tratamento biológico

276 Os efluentes brutos apresentaram a maior variação nos níveis de toxicidade aguda,  
 277 com CE<sub>50</sub> - 48 h que variaram entre <0,001 e 0,56% (Tabela 2). Essa maior variação e  
 278 elevada toxicidade observada poderiam ser parcialmente explicadas pelo tipo de fármacos e  
 279 adjuvantes que estavam sendo empregados, durante os diferentes períodos de coleta, e por  
 280 diferenças no ritmo de produção, mas como não foram determinadas suas concentrações não  
 281 foi possível confirmar essa hipótese. Durante todos os períodos de amostragem os  
 282 antibióticos foram os fármacos mais empregados na produção de medicamentos veterinários



283 (Tabela 1). Sanderson et al. (2004) demonstraram que 16% dos antibióticos avaliados foram  
 284 considerados extremamente tóxicos para os dafinídeos com  $CE_{50} - 48h < 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ .

285 Mesmo aumentando a diluição dos efluentes para a realização dos testes crônicos foi  
 286 observada elevada toxicidade em várias amostras (Tabela 3). Os efluentes brutos da quarta e  
 287 quinta campanhas não foram tóxicos, mesmo nas maiores doses testadas. Na primeira,  
 288 segunda e terceira campanhas foi observada toxicidade crônica relativamente alta com  $CI_{50} -$   
 289 7dias de 0,0005, 0,0019 e  $< 0,0001\%$ .

290 Tabela 3. Toxicidade crônica para *C. dubia*, expressa em  $CI_{50} - 7$  dias, das amostras de efluentes brutos e tratados gerados na  
 291 produção de medicamentos veterinários

Coleta	$CI_{50} - 7$ dias (%)		
	EB*	EQ <sup>&amp;</sup>	ET <sup>#</sup>
1	0,0005	0,0003	0,0006
2	0,0019	0,00001	0,0009
3	$< 0,0001$	0,0001	-
4	**	0,00001	-
5	-	0,00001	-

292 \*EB: Efluente bruto; &EQ: efluente pós-tratamento químico; #ET: efluente pós-tratamento biológico; \*\*:  $CI_{50} - 7$  dias não  
 293 pode ser determinada, pois estão acima das maiores concentrações testadas

294 Efluentes gerados na formulação de antibióticos tem baixa degradabilidade, uma vez  
 295 que contem elevada carga de princípios ativos recalcitrantes (Balcioglu & Ötker, 2003),  
 296 perdidos durante a fabricação dos medicamentos, para os efluentes brutos, que são gerados  
 297 predominantemente durante a lavagem do maquinário. Antibióticos de uso humano e  
 298 veterinário são especialmente prejudiciais a organismos aquáticos como algas, cladoceras e  
 299 artêmias (Jones et al., 2004). Foram encontrados na literatura dados de toxicidade para  
 300 cladoceras de alguns dos antibióticos usados na indústria durante os períodos em que as  
 301 amostras foram coletadas. Para *Daphnia magna* a enrofloxacin apresenta  $CE_{50} - 48 \text{ h}$  de 58,7  
 302  $\text{mg.L}^{-1}$  e em testes crônicos apresentou concentração de efeito não observado (CENO) (21  
 303 dias) de 5  $\text{mg.L}^{-1}$ . Nos testes agudos e crônicos com *D. magna* a sulfadiazina apresenta  $CE_{50} -$   
 304 48 h de 221,0  $\text{mg.L}^{-1}$  e  $CI_{50} - 21$  dias (para reprodução) de 13,7  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. A  
 305 oxitetraciclina apresenta  $CE_{50} - 48 \text{ h}$  para *D. magna* de 621,2  $\text{mg.L}^{-1}$  e  $CI_{50} - 7$  dias (inibição  
 306 do crescimento populacional) para *C. dubia* de 0,18  $\text{mg.L}^{-1}$  (Santos et al., 2010).

307 Além dos antibióticos, o hormônio e o antiparasitário usados na indústria, durante os  
 308 períodos de amostragem, podem ter contribuído para a toxicidade aguda e crônica das

309 amostras. Os hormônios fazem parte do grupo dos interferentes endócrinos, considerados  
310 muito tóxicos, pois atuam no sistema endócrino dos organismos mesmo em concentrações  
311 extremamente baixa (Reis Filho et al., 2007). Os antiparasitários são muito utilizados para  
312 combater tanto ectoparasitas como endoparasitas e estão entre os fármacos veterinários com  
313 maior risco ambiental, principalmente para a biota aquática. A ivermectina, fármaco que  
314 estava sendo empregado durante o período da quinta campanha de coleta, apresenta elevada  
315 toxicidade aguda para daphnídeos com  $CE_{50}$  - 48 h de  $0,00045 \text{ mg L}^{-1}$  (Boxall et al., 2003).

316 As amostras de efluente tratado quimicamente apresentaram, em sua maioria, as  
317 maiores toxicidades agudas com  $CE_{50}$  - 48 h que variaram entre  $<0,001$  e  $0,003\%$  (Tabela 2).  
318 Somente na quinta campanha de coleta a amostra de efluente bruto foi mais tóxica ( $CE_{50}$  - 48  
319 h  $0,02\%$ ) que a amostra de efluente tratado quimicamente tratado quimicamente ( $CE_{50}$  - 48 h  
320  $0,03\%$ ), porém a diferença entre as toxicidades foi pequena. Nos testes crônicos os efluentes  
321 quimicamente tratados também foram os mais tóxicos com valores de  $CI_{50}$  - 7 dias entre  
322  $0,00001$  e  $0,003\%$  (Tabela 3).

323 Embora a etapa de pré tratamento químico seja necessária para melhorar a  
324 tratabilidade de efluentes gerados na produção de antibióticos (Balcioglu & Ötker, 2003), o  
325 processo empregado na ETE da indústria onde foram coletadas as amostras elevou toxicidade  
326 dos efluentes brutos. O aumento na toxicidade das amostras dos efluentes tratados  
327 quimicamente poderia estar relacionado à adição de reagentes tóxicos, como por exemplo, o  
328 sulfato de alumínio ( $Al_2(SO_4)_3$ ), usado como agente floculante. Os tratamentos de águas e de  
329 efluentes industriais e domésticos estão entre as principais fontes antropogênicas de  
330 contaminação ambiental por alumínio (Wren & Stephenson, 1991), indicando que parte desse  
331 sal é perdida com os efluentes finais.

332 A toxicidade do alumínio para invertebrados de águas doces é espécie específica e  
333 variável. Em amostras com pH maior que 6, é normalmente baixa variando entre 320 a 832  
334  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Os organismos aquáticos mais sensíveis ao alumínio são os cladóceros (Wren &  
335 Stephenson, 1991). A toxicidade observada, principalmente nos testes agudos que avaliaram  
336 as amostras de efluentes menos diluídas, parece estar relacionada ao  $Al_2(SO_4)_3$ . Porém outro  
337 fator que pode ter influenciado no aumento da toxicidade dessas amostras é a formação  
338 produtos intermediários de degradação com toxicidade igual ou maior que a dos compostos

339 químicos provenientes diretamente da produção dos medicamentos veterinários (Tambosi et  
340 al., 2010; Fatta-Kassinos et al., 2011).

341 As amostras de efluentes tratados biologicamente das três primeiras campanhas  
342 apresentaram toxicidade aguda igual (campanhas 1 e 3) ou superior (campanha 2) aquelas  
343 apresentadas pelas amostras de efluentes brutos (Tabela 2). Porém, nas duas últimas  
344 campanhas houve redução na toxicidade dos efluentes tratados biologicamente (mais  
345 pronunciada na quarta campanha). As amostras de efluentes tratados biologicamente das  
346 últimas três campanhas não apresentaram toxicidade crônica nas doses testadas. Os valores  
347 de  $CI_{50}$  - 7 dias das amostras das duas primeiras campanhas foram relativamente altas com  
348 valores de 0,0006 e 0,0009% (Tabela 3).

349 Larsson et al. (2007) determinaram as concentrações de 59 fármacos e avaliaram a  
350 toxicidade de efluentes finais de um complexo de indústrias produtoras de medicamentos  
351 genéricos para uso humano localizado na Índia. Dentre os 11 fármacos encontrados em maior  
352 abundância 5 eram antibióticos (ciprofloxacina, norfloxacina, lomefloxacina, enoxacina e  
353 ofloxacina), presentes em concentrações que variaram entre 150 e 31000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Nos testes  
354 de toxicidade aguda com *D. magna*, dos mesmos efluentes, os valores de  $EC_{50}$  - 48 h  
355 variaram entre 6,7 e 7,2%. Mesmo sendo espécies de daphnias diferentes, a toxicidade das  
356 amostras de efluentes finais (coletadas após o tratamento biológico) das cinco campanhas de  
357 amostragem apresentaram toxicidade aguda muito superior aquelas observadas por Larson et  
358 al., (2007) para amostras com elevadas concentrações de fármacos.

359 Nos ambientes aquáticos, devido ao grande fator de diluição, geralmente os  
360 organismos estão expostos a concentrações subletais dos poluentes e essa exposição a baixas  
361 concentrações pode levar a distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais em longo prazo. Os  
362 efluentes avaliados nesse trabalho, mesmo em elevadas diluições, apresentaram toxicidade  
363 crônica para *C. dubia* e, portanto poderiam representar riscos aos organismos aquáticos.  
364 Porém, os efluentes finais da indústria farmacêutica avaliada são lançados na rede municipal  
365 coletora de esgotos e, além de sofrer grande diluição no esgoto predominantemente  
366 doméstico, são levados à estação municipal de tratamento de esgoto onde passam novamente  
367 por um tratamento biológico.

368 Caso não sejam naturalmente biodegradados, fotodegradados ou eficientemente  
369 removidos nas estações de tratamento de esgoto e de efluentes os fármacos podem atingir os  
370 ambiente aquático (Melo et al., 2009). Nos sistemas de tratamento de efluentes, dois  
371 processos de eliminação de fármacos são geralmente importantes: a adsorção aos sólidos  
372 suspensos (ex.: provenientes de esgotamento sanitário) e a biodegradação. A adsorção é  
373 dependente de interações hidrofóbicas e eletrostáticas dos fármacos com partículas e  
374 bactérias em suspensão. Porém, quando os fármacos estão presentes preferencialmente na  
375 fase solúvel, a biodegradação é o processo de eliminação mais importante. A degradação  
376 pode ocorrer em zonas aeróbias (e em alguns casos anaeróbias) nos tratamentos por lodos  
377 ativados, e no geral a decomposição biológica de fármacos aumenta com o aumento do tempo  
378 de retenção hidráulica e com a idade do lodo (Tambosi et al., 2010). Como a etapa de  
379 tratamento biológico da ETE, onde foram coletadas as amostras, trata conjuntamente os  
380 efluentes sanitários e os efluentes industriais esperávamos maior remoção da toxicidade  
381 atribuída aos fármacos por ambos os processos envolvidos na remoção.

382 O tratamento de efluentes é considerado como a etapa chave para proteção dos  
383 ambientes aquáticos, pelo menos, no que diz respeito a introdução de fármacos. Basicamente  
384 existem quatro abordagens para melhorar a remoção de fármacos dos efluentes: otimização  
385 de tecnologias de tratamento existentes, a modernização de equipamentos de tratamento  
386 existentes com novas tecnologias, os métodos de segregação na fonte, e as medidas de  
387 controle na fonte. Melhorar as plantas de tratamento de esgoto/efluentes e aplicação de  
388 medidas de controle na fonte são as abordagens tradicionais para a melhoria da qualidade dos  
389 efluentes. Segregação na fonte é uma abordagem recente com uma crescente aceitação na  
390 comunidade de tratamento de esgoto (Tambosi et al., 2010). Diferentes processos oxidativos  
391 avançados aplicados à degradação de fármacos de diferentes classes terapêuticas apresentam  
392 alta eficiência de degradação quando são encontradas baixas concentrações de fármacos nos  
393 efluentes (Melo et al., 2009). Essas alternativas parecem ser meios eficazes para a redução da  
394 toxicidade aguda e crônica dos efluentes da indústria farmacêutica avaliada e se implantadas  
395 pode reduzir seus possíveis impactos ambientais.

396

## CONCLUSÃO

397 1. Os efluentes brutos e tratados da indústria de medicamentos veterinários estudada  
398 apresentam elevada toxicidade aguda para *D. simillis* e crônica para *C. dubia*.

- 399 2. Os testes de toxicidade, aguda e crônica, realizados se mostraram sensíveis e  
400 adequados para a avaliação da toxicidade dos efluentes brutos e tratados gerados na  
401 produção de medicamentos veterinários e também para avaliação da eficiência das  
402 diferentes etapas do processo de tratamento de efluentes.
- 403 3. Os efluentes tratados quimicamente apresentaram maior toxicidade para a maioria das  
404 amostras testadas quando comparados aos efluentes brutos. Essa etapa não melhora a  
405 tratabilidade dos efluentes e, a elevada toxicidade observada pode estar relacionada ao  
406 sulfato de alumínio empregado nessa etapa como agente floculante.
- 407 4. Melhorais no processo de tratamento de efluentes da ETE seriam necessárias para  
408 reduzir a toxicidade dos efluentes e prevenir impactos ambientais decorrente desses  
409 despejos.

#### 410 AGRADecIMENTOS

411 Os autores agradecem o financiamento dado ao projeto pelo CNPq (processo n°  
412 475243/2011-0) e ao apoio de Joice O. Palmeira e Anjaina F. Albuquerque na realização dos  
413 testes. Bianca de S. Maselli agradece a FAPEMIG pela bolsa de mestrado concedida.

#### 414 LITERATURA CITADA

- 415 ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática –  
416 Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de  
417 Janeiro: ABNT, 2 ed., 2009. 21p.
- 418 ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 13373: Ecotoxicologia aquática –  
419 Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Cladocera, Crustacea).  
420 Rio de Janeiro: ABNT, 2 ed., 2010, 15p.
- 421 Akintonwa, A.; Awodele, O.; Olofinnade, A. T.; Anyakora, C.; Afolayan, G. O.; Coker, H.  
422 A. B. Assessment of the mutagenicity of some pharmaceutical effluents. American Journal  
423 of Pharmacology and Toxicology, v.4, p.144-150, 2009.
- 424 Balcioglu, I. A.; Ötker, M. Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by  
425 O<sub>3</sub> and O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes. Chemosphere, v.50, p.85-95, 2003.

- 426 Berry, M. A.; Rondinelli, D. A. Environmental management in the pharmaceutical industry:  
427 Integrating corporate responsibility and business strategy. *Environmental Quality*  
428 *Management*, v.9, p.21-35, 2000.
- 429 Boxall, A. B. A.; Kolpin, D. W.; Halling-Sørensen, B.; Tolls, J. Are veterinary medicines  
430 causing environmental risks?. *Environmental Science & Technology*, v.37, p.286A-294A,  
431 2003.
- 432 CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Guia nacional de coleta e  
433 preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos.  
434 1.ed. São Paulo: CETESB, 2011. 325 p.
- 435 Chen, Z.; Wang, H.; Chen Z.; Ren, N.; Wang A.; Shi Y.; Li X. Performance and model of a  
436 full-scale up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) to treat the pharmaceutical  
437 wastewater containing 6-APA and amoxicillin. *Journal of Hazardous Materials*, v.185,  
438 p.905-913, 2011.
- 439 Costa, C. R.; Olivi, P.; Botta, C. M. R.; Espindola, E. L. G. A toxicidade em ambientes  
440 aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v.31, p.1820-1830, 2008.
- 441 Fatta-Kassinos, D.; Meric, S.; Nikolaou, A. Pharmaceutical residues in environment Waters  
442 and wastewater: current state of knowledge. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,  
443 v.399, p.251-275, 2011.
- 444 Hamilton, M. A.; Russo R. C.; Thurfton R. B. Trimmed Spearman–Karber method for  
445 estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environmental Science and*  
446 *Technology*, v.11, p.714-719, 1977.
- 447 Jones, O. A. H.; Voulvoulis, N.; Lester, J. N. Potential ecological and human health risks  
448 associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic  
449 environment. *Critical Reviews in Toxicology*, v.34, p.335-350, 2004.
- 450 Kapanen, A.; Itavaara, M. Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicology and*  
451 *Environmental Safety*, v.49, p.1-16, 2001.
- 452 Kim, J.; Park, J.; Kim, P. G.; Lee, C.; Choi, K. Implication of global environmental changes  
453 on chemical toxicity effect of water temperature, pH, and ultraviolet B irradiation on acute

- 454 toxicity of several pharmaceuticals in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, v.19, p.662-669,  
455 2010.
- 456 Larsson, D. G. J.; Pedro, C.; Paxeus, N. Effluent from drug manufactures contains extremely  
457 high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, v.148, p.751-755, 2007.
- 458 Liguoro, M. D.; Fioretto, B.; Poltronieri, C.; Gallina, G. The toxicity of sulfamethazine to  
459 *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim.  
460 *Chemosphere*, v.75, p.1519-1524, 2009.
- 461 Locatelli, M. A. F.; Sodré, F. F.; Jardim, W. F. Determination of Antibiotics in Brazilian  
462 Surface Waters Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry.  
463 *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.60, p.385-393, 2011.
- 464 Melo, S. A. S.; Trovó, A. G.; Bautitz, I. R.; Nogueira R. F. P. Degradação de fármacos  
465 residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, v. 32, p.188-197, 2009.
- 466 Morales, G. C. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas:  
467 Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. 1.ed. México: IMTA, 2004.  
468 189p.
- 469 Mount, D. R.; Gulley, D. D.; Hockett, J. R.; Garrison, T. D.; Evans, J. M. Statistical models  
470 to predict the toxicity of major ions to *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* and  
471 *Pimephales promelas* (fathead minnows). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.16,  
472 p.2009-2019, 1997.
- 473 Norbert-King, T. J. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition  
474 concentration (ICp) approach (Version 2.0). USEPA, Dulunth Minnesota., Tech. Rept. 03-  
475 93, National Effluent Toxicity Assessment Center, 1993. 25p.
- 476 Reis Filho, R. W.; Barreiro, J. C.; Vieira, E. M.; Cass, Q. B. Fármacos, ETEs e corpos  
477 hídricos. *Revista Ambiente e Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Sciece*, v.2,  
478 p.54-61, 2007.
- 479 Sanderson, H.; Brain, R. A.; Johnson, D. J.; Wilson, C. J.; Solomon, R. K. Toxicity  
480 classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics,  
481 cardiovascular, and sex hormones. *Toxicology*, v.203, p.27-40, 2004.

- 482 Santos, L. H. M. L. M.; Araújo, A. N.; Frachini, A.; Pena, A.; Delerue-Matos, C.;  
483 Montenegro, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of  
484 pharmaceuticals in the aquatic environments. *Journal of Hazardous Materials*, v.175, p.45-  
485 95, 2010.
- 486 Sodré, F. F.; Pescara, I. C.; Montagner, C. C.; Jardim, W. F. Assessing selected estrogens and  
487 xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass  
488 spectrometry. *Microchemical Journal*, v.96, p.92-98, 2010.
- 489 Tambosi, J. L.; Yamanaka, L. Y.; José, H. J.; Moreira, R. F. P. M.; Schröder, H. F. Recent  
490 research data on the removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP).  
491 *Química Nova*, v.33, p.411-420, 2010.
- 492 Watanabe, N.; Bergamaschi, B.; Lofin, K.; Meyer, T. M.; Harter, T. Use and environmental  
493 occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manured forage fields.  
494 *Environmental Science & Technology*, v.44, p.6591-6600, 2010.
- 495 Wilke, B. M.; Riepert, F.; Koch, C.; Kühne, T. Ecotoxicological characterization of  
496 hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.70, p.283-293, 2008.
- 497 Wren, C. D.; Stephenson G. L. The effect of acidification on the accumulation and toxicity of  
498 metals to freshwater invertebrates. *Environmental Pollution*, v.71, p.205-241, 1991.
- 499 Zewiener, C. Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products  
500 in drinking water treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.387, p.1159-1162,  
501 2007.
- 502