

Ensaio toxicológicos aplicados à análise de águas contaminadas por fármacos

Toxicological tests applied to the analysis of water contaminated by drugs

Cássia Cabral Souza¹ , Sergio Francisco Aquino² , Silvana de Queiroz Silva^{3*} 

RESUMO

Fármacos de diversas classes têm sido detectados no ambiente aquático nos últimos anos. A presença desses compostos químicos deve-se, sobretudo, ao lançamento de esgoto *in natura* ou à remoção incompleta durante as etapas do tratamento de esgoto. Embora tais materiais sejam detectados em baixas concentrações (ng.L^{-1} - $\mu\text{g.L}^{-1}$), os impactos de alguns fármacos à biota aquática já são conhecidos, sendo os efeitos na saúde humana, especialmente aqueles relacionados à exposição crônica, ainda pouco conhecidos e/ou controversos. Ensaio biológicos são ferramentas valiosas para avaliar a toxicidade de fármacos aos organismos expostos, e a sua adoção conjunta aos ensaios de tratabilidade da água e efluentes permitiria preencher lacunas de conhecimento e a construção de consenso na literatura científica sobre os seus efeitos toxicológicos. Pelo exposto, este artigo de revisão apresenta uma visão geral da ocorrência de fármacos em amostras ambientais do país e a toxicidade observada por meio de diferentes ensaios biológicos.

Palavras-chave: fármacos; ecotoxicidade; toxicidade; microcontaminantes; contaminantes de preocupação emergente; qualidade de água.

ABSTRACT

Drugs of several classes have been detected in the aquatic environment in recent years. The presence of these chemicals is mainly due to the discharge of raw sewage or to their incomplete removal in sewage treatment plants. Although they have been detected at low concentrations (ng.L^{-1} - $\mu\text{g.L}^{-1}$), the effects of pharmaceutical compounds on the aquatic biota are already acknowledged, being the effects on human health, especially those related to chronic exposure, still unknown and/or controversial. Biological assays are valuable tools for assessing drug toxicity to exposed organisms and their joint adoption in water and effluent treatability trials would fill up knowledge gaps and build consensus in the scientific literature on their toxicological effects. This review paper presents an overview of the occurrence of drugs in several Brazilian environmental samples and compiles the toxicity observed by means of different biological assays.

Keywords: drugs; ecotoxicity; toxicity; micropollutants; contaminants of emerging concern; water quality.

FÁRMACOS NO AMBIENTE

Fármacos, assim como novos pesticidas, produtos de cuidado/higiene pessoal, suplementos nutricionais, agentes de diagnóstico, entre outros compostos que têm sido detectados no ambiente e para os quais não há legislação estabelecendo padrões ou limites ambientais, são considerados contaminantes emergentes (BIRCH *et al.*, 2015). Os produtos farmacêuticos e os de higiene pessoal têm recebido atenção de pesquisadores nos últimos anos por causa da intensa produção e, principalmente, do uso generalizado e contínuo em humanos e animais (DAUGHTON, 2002).

Os fármacos são classificados pela atividade biológica, estrutura química ou modo de ação. Quanto à atividade biológica, podem ser divididos em analgésicos, antitérmicos, anti-inflamatórios, antibióticos, anti-hipertensivos, hormônios etc. (KÜMMERER, 2010).

Os mecanismos de ação dos fármacos são diversificados, variando de acordo com a classe pertencente. Uma vez administradas, essas substâncias são absorvidas no organismo, sendo parcialmente metabolizadas e então excretadas nas formas original, associada ou como metabólitos. Quando essas substâncias são excretadas pela urina e fezes de seres humanos e animais, alcançam o esgoto doméstico e/ou os corpos d'água (BILA; DEZOTTI, 2003; MELO *et al.*, 2009).

De fato, a principal rota de entrada de resíduos de fármacos no ambiente é o lançamento de esgotos domésticos, tratados ou *in natura*, nos cursos d'água. No caso dos fármacos consumidos pelo ser humano, parte deles entra no sistema aquático na forma inalterada ou como metabólito, após passagem pela estação de tratamento de esgotos, que remove apenas parcialmente a carga afluente de tais contaminantes (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013; GARTISER *et al.*,

¹Universidade Federal de Ouro Preto - Ouro Preto (MG), Brasil.

²Departamento de Química, Universidade Federal de Ouro Preto - Ouro Preto (MG), Brasil.

³Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto - Ouro Preto (MG), Brasil.

*Autora correspondente: silvana@iceb.ufop.br

Recebido: 04/08/2017 - Aceito: 26/02/2019 - Reg. ABES: 183632

2012; MELO *et al.*, 2009). Além disso, deve-se considerar o descarte de efluentes hospitalares e de fármacos não consumidos ou fora do prazo de validade, incluindo os de uso veterinário, quando as drogas são deliberadamente introduzidas no ambiente (DELGADO *et al.*, 2012; FARRÉ *et al.*, 2008; TERNES *et al.*, 2002).

Dados de monitoramento ambiental realizados no Brasil (LIMA *et al.*, 2017) indicam que fármacos são encontrados em mananciais superficiais, principalmente aqueles pouco preservados, em concentrações que variam de dezenas a centenas de nanogramas por litro (ng.L^{-1}). Para que fármacos e outros microcontaminantes não sejam encontrados na água potável, eles devem ser eficientemente removidos durante o tratamento de água, mas sabe-se que as operações unitárias (coagulação, floculação, sedimentação, filtração) utilizadas nas estações de tratamento de água (ETAs) são apenas moderadamente eficazes na remoção de tais poluentes (BENOTTI *et al.*, 2009; BILA; DEZOTTI, 2003; LIMA *et al.*, 2014; USEPA, 2001), fazendo com que a água tratada seja uma rota potencial de exposição humana a fármacos e outros contaminantes emergentes (MACHADO *et al.*, 2016). Embora a etapa de desinfecção com cloro resulte normalmente na remoção (por oxidação) do fármaco-alvo, isso em geral ocorre com a formação de subprodutos oxidados cuja toxicidade é pouco conhecida (SOUZA *et al.*, 2018). De fato, a formação de subprodutos da cloração de fármacos já foi observada para diclofenaco (QUINTANA *et al.*, 2010; RIGOBELLO, 2012), metformina (QUINTÃO *et al.*, 2016), sulfametoxazol (DODD; HUANG, 2004; SOUZA *et al.*, 2018), 17β -estradiol e estrona (PEREIRA, 2011), entre outros.

Em 2011, foram determinados os procedimentos e as responsabilidades relativos ao controle e à vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade por meio da Portaria nº 2.914/2011, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), posteriormente incorporada como Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, do referido ministério (BRASIL, 2017). Essa portaria, a exemplo do que se passa em outros países e coadunando-se com a versão mais atual dos guias de qualidade da água potável da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017), não estabelece valores de referência para a presença de fármacos na água potável. Embora alguns estudos de monitoramento realizados no Brasil indiquem a presença de tais contaminantes em mananciais de abastecimento e até mesmo em águas distribuídas à população (GHISELLI, 2006; GUIMARÃES, 2008; SODRÉ *et al.*, 2010; JARDIM *et al.*, 2011), é improvável que a exposição a eles pelo consumo de água cause significativos efeitos adversos, uma vez que esses compostos ocorrem em concentrações muito inferiores à dose terapêutica mínima. Por outro lado, a OMS (2012) salienta no documento *Pharmaceuticals in Drinking-Water* que há lacunas no conhecimento da avaliação de riscos associados à exposição a longo prazo a fármacos em baixas concentrações

e ao possível efeito combinado de misturas de substâncias químicas, incluindo os fármacos.

Na mesma linha, outros documentos da OMS (BERGMAN *et al.*, 2013; OMS, 2014) reconhecem a preocupação ambiental que se deve ter com fármacos que exibem atividade endócrina (desreguladores endócrinos) ou que induzam à resistência antimicrobiana (antibióticos).

Avanços nas técnicas analíticas têm contribuído para o aumento na detecção de fármacos e outros contaminantes de preocupação emergente na água (OMS, 2012). A seguir, são apresentados resultados de estudos de monitoramento de fármacos de diversas classes, em esgoto e águas naturais no Brasil (Tabela 1). De acordo com os dados, pode-se inferir que tanto no esgoto bruto quanto no efluente tratado há a presença de uma variada classe de fármacos indicando que algumas classes não são totalmente removidas durante o tratamento. Particularmente, a baixa eficiência ou a não remoção desses compostos em estações de tratamento de esgoto (ETE) foram observadas por diferentes grupos de pesquisa para o antilipêmico bezafibrato, o anti-inflamatório diclofenaco, os antibióticos trimetoprima e sulfametoxazol e o estrogênio sintético 17α -etinilestradiol.

A presença de fármacos no esgoto tratado é determinante para a presença de tais contaminantes nos corpos d'água. Em uma revisão publicada por Carlsson *et al.* (2006), avaliou-se e classificou-se o risco ambiental de diversos produtos farmacêuticos, como diclofenaco, ciclofosfamida, enalapril, ibuprofeno e metformina. Das 27 substâncias testadas, nove (diclofenaco, etinilestradiol, ibuprofeno, metoprolol, noretisterona, oestriol, oxazepam, paracetamol e oxitetraciclina) foram consideradas perigosas para o ambiente aquático, considerando fatores como meia-vida, biodegradabilidade, ocorrência ambiental e estatísticas de vendas no país de estudo (Suécia).

Os estudos de monitoramento de fármacos em ETA são ainda incipientes, mas os dados divulgados na literatura sugerem que tais fármacos estão presentes em pequenas concentrações na água distribuída (Tabela 2). Assim, a presença desses compostos em mananciais de abastecimento ocorre com maior frequência e em maior concentração que nas águas distribuídas.

Vale ressaltar que a simples presença de fármacos no ambiente não significa, *per se*, risco à saúde humana e/ou à biota aquática. Idealmente, uma avaliação toxicológica deve ser feita de forma preliminar ou conjunta ao monitoramento químico para avaliar o risco ambiental de tais micropoluentes. A adoção de avaliação toxicológica vai ao encontro da recomendação feita pela OMS (2011) de investigar possíveis efeitos aditivos ou efeitos sinérgicos de misturas de fármacos e outras substâncias de modo a precisar se há risco potencial à saúde humana decorrente da exposição a tais contaminantes. Os próximos itens apresentam os principais testes de toxicidade que podem ser utilizados para cumprir tal objetivo.

Tabela 1 - Estudos sobre a ocorrência de fármacos de diversas classes em esgoto bruto e em esgoto tratado em estações de tratamento de esgoto (ETEs) brasileiras.

	Fármaco	Classe	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Estado	Referência
Esgoto bruto	Ácido clofíbrico	Principal metabólico de três antilipêmicos	1,0	RJ	Stumpf <i>et al.</i> (1999)
	Bezafibrato	Antilipêmico	1,2	RJ	Stumpf <i>et al.</i> (1999)
			< 0,0043 a 0,249	MG	Brandt <i>et al.</i> (2013) Queiroz <i>et al.</i> (2012)
	Diclofenaco	Anti-inflamatório não esteroidal	0,8	RJ	Stumpf <i>et al.</i> (1999)
			2,9	SP	Ghiselli (2006)
			< 0,007 a 0,240	MG	Brandt <i>et al.</i> (2013) Queiroz <i>et al.</i> (2012)
			< 0,4 a 5,6	CE	Souza (2011)
	Dipirona	Analgésico	36,4	SP	Ghiselli (2006)
			< 2,2 a 8,9	CE	Souza (2011)
	17 α -Ethinilestradiol ¹	Inibidor da ovulação	0,005	RJ	Ternes <i>et al.</i> (1999)
			5,8	SP	Ghiselli (2006)
			< 0,0124	MG	Brandt <i>et al.</i> (2013)
			< 12,4 a < 41,3	MG	Queiroz <i>et al.</i> (2012)
			< 0,020 a 5,2	CE	Souza (2011)
	Ibuprofeno	Anti-inflamatório não esteroidal	54,2	SP	Ghiselli (2006)
Paracetamol	Analgésico	18	SP	Ghiselli (2006)	
Esgoto tratado	Sulfametoxazol	Antibiótico	< 0,0019 a 0,151	MG	Brandt <i>et al.</i> (2013) Queiroz <i>et al.</i> (2012)
	Trimetropina	Antibiótico	0,023 a 0,114	MG	Brandt <i>et al.</i> (2013) Queiroz <i>et al.</i> (2012)
Efluente de ETE	Bezafibrato	Antilipêmicos	1,0	RJ	Stumpf <i>et al.</i> (1999)
			< 4,3 a 309	MG	Brandt <i>et al.</i> (2013)
			< 4,3 a 249	MG	Queiroz <i>et al.</i> (2012)
	Diclofenaco	Anti-inflamatório não esteroidal	0,02 a 0,06	RJ	Stumpf <i>et al.</i> (1999)
			1,8	SP	Ghiselli (2006)
			< 0,007 a 0,755	MG	Brandt <i>et al.</i> (2013)
			< 0,4 a 1,9	CE	Souza (2011)
	Dipirona	Analgésico	23,7	SP	Ghiselli (2006)
			< 2,2 a 1,3	CE	Souza (2011)
	17 α -Ethinilestradiol	Inibidor da ovulação	5,4	SP	Ghiselli (2006)
			< 0,0124	MG	Brandt <i>et al.</i> (2013) Queiroz <i>et al.</i> (2012)
			< 0,020 a 1,2	CE	Souza (2011)
	Ibuprofeno	Anti-inflamatório não esteroidal	48,4	SP	Ghiselli (2006)
	Paracetamol	Analgésico	5,9	SP	Ghiselli (2006)
	Sulfametoxazol	Antibiótico	< 0,0019 a 0,124	MG	Brandt <i>et al.</i> (2013)
< 0,0019 a 0,161			MG	Queiroz <i>et al.</i> (2012)	
Trimetropina	Antibiótico	< 0,001 a 0,075	MG	Brandt <i>et al.</i> (2013)	
		< 1 a 88	MG	Queiroz <i>et al.</i> (2012)	

¹Classificação de acordo com Kolpin *et al.* (2002).

TESTES DE TOXICIDADE AQUÁTICA

Quando fármacos são liberados no ambiente por meio do lançamento de efluentes (industrial, rural ou doméstico), ou como resultado do descarte inadequado de drogas fora do prazo de validade, eles podem permanecer na forma original ou ser convertidos em produtos da transformação sob fotólise, oxidação e outros processos. Tanto os fármacos inalterados como os produtos da transformação podem ser bioativos e causar efeitos negativos em seres humanos e outros seres vivos (LI *et al.*, 2015). Além disso, a poluição dos corpos d'água por fármacos e a ampla distribuição desses compostos no

ambiente podem aumentar o risco de toxicidade, principalmente aos organismos aquáticos.

Com o intuito de investigar o risco decorrente da presença de poluentes ambientais, análises químicas e testes biológicos são continuamente desenvolvidos e empregados para quantificar os poluentes e avaliar os seus efeitos adversos (PARRELLA *et al.*, 2013). Métodos analíticos são fundamentais para detectar e quantificar microcontaminantes no ambiente (BISTAN *et al.*, 2012) enquanto os ensaios biológicos (*in vitro* ou *in vivo*) fornecem informações sobre os efeitos causados pelas substâncias no meio, servindo como uma complementação valiosa à análise química.

Tabela 2 – Estudos sobre a ocorrência de fármacos de diversas classes em mananciais e águas tratadas em estações de tratamento de água (ETAs) brasileiras.

	Fármaco	Classe	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Estado	Referência
Águas de abastecimento	Ácido acetilsalicílico	Anti-inflamatório não esteroidal	12,21 a 20,96	SP	Raimundo (2007)
			0,5 a 21	SP	Montagner e Jardim (2011)
	Ácido clofibrato	Principal metabólico de 3 antilipêmicos	0,02 a 0,03	RJ	Stumpf <i>et al.</i> (1999)
	Bezafibrato	Antilipêmicos	0,025	RJ	Stumpf <i>et al.</i> (1999)
	Cafeína	Estimulante	0,26 a 1,08	MG	Machado <i>et al.</i> (2016) Montagner e Jardim (2011) Raimundo (2007)
			1,73 a 2,57	RS	
			0,02 a 0,25	SP	
			1,1 a 41,5	SP	
			0,2 a 127	SP	
	Diclofenaco	Anti-inflamatório não esteroidal	2 a 6	SP	Ghiselli (2006)
			0,02 a 0,06	RJ	Stumpf <i>et al.</i> (1999)
			0,096 a 0,115	SP	Raimundo (2007)
			< 0,14 a 0,106	SP	Montagner e Jardim (2011)
	17 α -Ethinilestradiol	Inibidor da ovulação	0,106 a 4,39	SP	Raimundo (2007)
			1,2 a 3,5	SP	Ghiselli (2006)
			0,002 a 0,054	MG	Moreira <i>et al.</i> (2009)
			0,005 a 0,064	MG	Moreira <i>et al.</i> (2011)
			< 0,17 a 4,3	SP	Montagner e Jardim (2011)
	Ibuprofeno	Anti-inflamatório não esteroidal	0,01	RJ	Stumpf <i>et al.</i> (1999)
			< 22,3	SP	Ghiselli (2006)
< 0,51			SP	Montagner e Jardim (2011)	
Paracetamol	Analgésico	0,3 a 13,5	SP	Raimundo (2007)	
		< 8,3	SP	Ghiselli (2006)	
Água tratada	Cafeína ¹	Estimulante	0,12 a 2,8	RS	Machado <i>et al.</i> (2016)
			0,22	SP	Sodré <i>et al.</i> (2010)
	Diclofenaco	Anti-inflamatório não esteroidal	nd	SP	Ghiselli (2006)
	Paracetamol	Analgésico	nd		
	Ibuprofeno	Anti-inflamatório não esteroidal	nd		
	17 α -Ethinilestradiol	Inibidor da ovulação	1,7	SP	Ghiselli (2006)
nd			SP	Jardim <i>et al.</i> (2011)	

¹Classificação de acordo com Kolpin *et al.* (2002); nd: não detectado.

Os testes de toxicidade aguda e crônica são amplamente utilizados para avaliar os efeitos de substâncias sobre os organismos no ambiente aquático (COSTA *et al.*, 2008; FERRARI *et al.*, 2003; ISIDORI *et al.*, 2005). Os testes de toxicidade aguda são utilizados para medir os efeitos de agentes tóxicos sobre espécies aquáticas durante um curto período de tempo em relação ao período de vida do organismo-teste e permitem a determinação de valores de concentração efetiva média (CE_{50}) e concentração letal média (CL_{50}) (COSTA *et al.*, 2008). Por sua vez, testes de toxicidade crônica são realizados para medir os efeitos de substâncias químicas em espécies aquáticas por um período que pode abranger parte do ciclo de vida do organismo-teste ou todo esse ciclo, e os seus resultados são geralmente expressos como concentração de efeito não observado (CENO) ou concentração de efeito observado (CEO), mas também como CE_{50} (COSTA *et al.*, 2008).

Na literatura da área podem ser encontrados testes de toxicidade aquática, agudos e crônicos, empregados para avaliar o potencial tóxico de diversas classes de fármacos com organismos-teste distintos, como visto na Tabela 3.

Isidori *et al.* (2005) adotaram diversos testes de toxicidade aguda e crônica para avaliar os efeitos de diferentes antibióticos (Tabela 3). Segundo os autores, os ensaios crônicos são mais apropriados para detectar os impactos de fármacos em relação aos agudos, pois os efeitos foram constatados em concentrações de fármacos na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto os agudos, somente na ordem de mg.L^{-1} .

Além disso, a escolha do organismo a ser usado pode influenciar na informação gerada. Por exemplo, Ferrari *et al.* (2003), avaliando a toxicidade aguda do diclofenaco com a bactéria marinha *Vibrio fischeri* e os crustáceos *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*, revelaram que a bactéria marinha foi mais sensível ao fármaco quando comparada com os demais, enquanto o teste de toxicidade crônica revelou que das espécies estudadas a *C. dubia* foi a mais sensível (Tabela 3).

Testes de toxicidade aguda foram empregados com o microcrustáceo *D. magna*, a alga *Desmodesmus subspicatus* e a macrófita *Lemna minor* para diferentes fármacos (CLEUVERS, 2003) (Tabela 3). Os efeitos dos fármacos foram classificados de acordo com as diretrizes da Comissão das Comunidades Europeias (1996) (EU-Directive 93/67/EEC), que consideram um composto muito tóxico quando o valor de CE_{50} é menor que 1 mg.L^{-1} ; tóxico, de 1 a 10 mg.L^{-1} ; e perigoso, de 10 a 100 mg.L^{-1} . Com base nessa classificação, nenhum composto foi muito tóxico para as espécies analisadas. No geral, a toxicidade dos fármacos testados foi heterogênea entre as espécies, e a macrófita foi a mais sensível com base nos valores de CE_{50} . CLEUVERS destacou ainda que, embora os efeitos agudos sejam algumas vezes improváveis quando os compostos são testados individualmente, o estudo da combinação dos efeitos é um fator de extrema importância, mesmo quando a toxicidade da substância é baixa, para obter

uma melhor avaliação do potencial ecotoxicológico das substâncias no ambiente aquático.

Segundo a classificação EU-Directive 93/67/EEC supracitada, Nieto *et al.* (2016) observaram que o diclofenaco é tóxico para o crustáceo *Atyaephyra desmarestii* e que o ibuprofeno e a carbamazepina são perigosos. A resposta letal (CL_{50}) foi avaliada a 25 (Tabela 3) e a 20°C e indicou que o aumento da temperatura pode maximizar a toxicidade aos organismos aquáticos.

Rozas *et al.* (2016) avaliaram a toxicidade aguda de fármacos individualmente e em mistura — no segundo caso, após tratamento com $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$. A CL_{50} em *D. magna* foi determinada para os fármacos diclofenaco e triclosan (Tabela 3). A utilização de um processo oxidativo avançado como $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ para amostras de água foi justificada pelo fato de métodos tradicionais de tratamento não serem eficientes para a remoção de fármacos. Dada a possibilidade de formação de subprodutos nesses processos, os autores avaliaram ainda os efeitos das misturas de fármacos após tratamento com $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$. Os dados obtidos indicaram que os subprodutos da oxidação podem ser mais tóxicos que o fármaco individualmente. Além disso, observou-se que na mistura contendo triclosan houve 100% de imobilização de *D. magna* antes e depois do tratamento com $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$.

A diferença na resposta entre espécies também foi constatada por Magdaleno, Carusso e Moretton (2017), que testaram a toxicidade de antimicrobianos em duas espécies de algas. Embora todos os fármacos testados tenham inibido o crescimento algal, a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* foi a mais sensível (Tabela 3). Segundo Sanderson *et al.* (2004), antibióticos são considerados os fármacos mais perigosos, uma vez que podem levar à resistência microbiana, o que, segundo a OMS (2016), se configura como uma séria ameaça à saúde pública global e requer ação de setores governamentais e de toda a sociedade.

TESTES DE GENOTOXICIDADE

Uma ferramenta para avaliar o potencial genotóxico de compostos é a aplicação do teste SOS cromoteste, que utiliza bactérias *Escherichia coli* geneticamente modificadas, denominadas de PQ37. O teste *in vitro* é um ensaio colorimétrico que se baseia na expressão da enzima β -galactosidase e na resposta aos ataques de mutagênicos pela exclusão da capacidade de reparo de ácido desoxirribonucleico (DNA) (DEODATO, 2009). Isidori *et al.* (2005) testaram a genotoxicidade de antibióticos e observaram resposta positiva apenas para a ofloxacina no SOS cromoteste (Tabela 4).

O teste com *Allium cepa* baseia-se no contato direto de raízes da cebola com as amostras contendo os compostos tóxicos, com o objetivo de avaliar a citogenotoxicidade medida pelas alterações cromossômicas e de divisão das células meristemáticas dessa estrutura vegetal.

Tabela 3 - Valores de CL₅₀ e concentração efetiva média (CE₅₀) obtidos para fármacos em testes de toxicidade aguda e crônica.

Organismo/Teste	Efeito	Classe	Fármacos (s)	Concentração (mg.L ⁻¹)	Referência
Testes de Toxicidade Aguda					
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	EC ₅₀ para inibição do crescimento	Antibióticos de uso veterinário	Clortetraciclina Oxitetraciclina Enrofloxacina	3,23 7,15 10,6	Magdaleno, Carusso e Moretton (2017)
<i>Atyaephyra desmarestii</i>	CL ₅₀ em 96h	Anti-inflamatório/analgésico	Diclofenaco Ibuprofeno	6,4 10,1	Nieto <i>et al.</i> (2016)
		Antiepilético	Carbamazepina	66,4	
<i>Brachionus calyciflorus</i>	CL ₅₀ em 24h	Antibiótico	Eritromicina/Sulfametoxazol Ofloxacino/Lincomicina Claritromicina	27,53/26,27 29,88/24,94 35,46	Isidori <i>et al.</i> (2005)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	EC ₅₀ para imobilização em 48h	Anti-inflamatório	Diclofenaco	0,02	Ferrari <i>et al.</i> (2003)
		Antibióticos	Eritromicina/Sulfametoxazol Ofloxacino/Lincomicina Claritromicina	10,23/15,51 17,41/13,98 18,66	Isidori <i>et al.</i> (2005)
<i>Daphnia magna</i>	CL ₅₀ em 24h	Antiepilético Anti-inflamatório Antimicrobiano	Carbamazepina Diclofenaco Triclosan	Nd Nd 0,35	Rozas <i>et al.</i> (2016)
	CL ₅₀ em 48h			Nd 18,8 0,19	
	EC ₅₀ para imobilização em 24h	Antibióticos	Eritromicina/Sulfametoxazol Ofloxacino/Lincomicina Claritromicina	22,45/25,20 31,75/23,18 25,72	Isidori <i>et al.</i> (2005)
	EC ₅₀ para imobilização em 48h	Anti-inflamatório/analgésico	Diclofenaco	0,22	Ferrari <i>et al.</i> (2003)
		Anti-hipertensivo	Ibuprofeno Naproxeno	108,0 174,0	Cleuvers (2003)
			Captopril	>100,0	
Antilipêmico	Ácido clofibrico	72,0 >0,20	Ferrari <i>et al.</i> (2003)		
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	EC ₅₀ para inibição da taxa de crescimento	Anti-inflamatório/analgésico	Ibuprofeno Diclofenaco Naproxeno	315,0 72,0 > 320	Cleuvers (2003)
		Anti-hipertensivo	Captopril	168,0	
		Antilipêmico	Ácido clofibrico	115,0	
Testes de toxicidade aguda					
<i>Lemna minor</i>	EC ₅₀ para inibição da taxa de crescimento	Anti-inflamatório Analgésico	Ibuprofeno Diclofenaco Naproxeno	22,0 7,5 24,2	Cleuvers (2003)
		Anti-hipertensivo	Captopril	25,0	
		Antilipêmico	Ácido clofibrico	12,5	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC ₅₀ para inibição do crescimento	Antibióticos de uso veterinário	Clortetraciclina Oxitetraciclina Enrofloxacina	1,19 0,92 5,18	Magdaleno, Carusso e Moretton (2017)
<i>Vibrio fischeri</i>	EC ₅₀ para redução da luminescência	Antibióticos	Eritromicina Sulfametoxazol Ofloxacino Lincomicina Claritromicina	Sem efeito até 100 23,30 25% inibição a 100 sem efeito até 100 sem efeito até 100	Isidori <i>et al.</i> (2005)
		Anti-inflamatório	Diclofenaco	0,01	Ferrari <i>et al.</i> (2003)

Continua..

Tabela 3 - Continuação.

Organismo/Teste	Efeito	Classe	Fármacos (s)	Concentração (mg.L ⁻¹)	Referência
Testes de toxicidade crônica					
<i>Brachionus calyciflorus</i>	Alteração da reprodução após 48h	Anti-inflamatório	Diclofenaco	CENO 0,012 CEO 0,025	Ferrari <i>et al.</i> (2003)
	Inibição do crescimento em 48h	Antibióticos	Eritromicina/Sulfametoxazol Ofloxacino/Lincomicina Claritromicina	0,94/9,63 0,53/0,68 12,21	Isidori <i>et al.</i> (2005)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Inibição da reprodução após sete dias	Anti-inflamatório	Diclofenaco	CENO 0,001 CEO 0,002	Ferrari <i>et al.</i> (2003)
	Inibição do crescimento após sete dias	Antibióticos	Eritromicina/Sulfametoxazol Ofloxacino/Lincomicina Claritromicina	0,22/0,21 3,12/7,20 8,16	Isidori <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inibição do crescimento após 96h de exposição	Anti-inflamatório	Diclofenaco	CENO 0,01 CEO 0,02	Ferrari <i>et al.</i> (2003)
	Inibição do crescimento em 72h	Antibióticos	Eritromicina/Sulfametoxazol Ofloxacino/Lincomicina Claritromicina	0,020/0,52 1,44/0,07 0,0020	Isidori <i>et al.</i> (2005)

CE₅₀: Nd: Não determinado; CENO: concentração de efeito não observado; CEO: concentração de efeito observado.

Um estudo com as drogas antirretrovirais zidovudina e nevirapina demonstrou que os dois fármacos inibem o crescimento em comprimento da raiz, além de induzirem mudanças no índice mitótico e aberrações cromossômicas em *A. cepa* (ONWUAMAH *et al.*, 2014), conforme apresentado na Tabela 4.

O ensaio cometa é um teste toxicogenético para avaliar lesões genômicas. Células com o DNA danificado apresentam o formato de um cometa quando colocadas em agarose e submetidas à eletroforese (TICE *et al.*, 2000). O antibiótico trimetopina foi testado quanto ao seu potencial de induzir danos no DNA. Percebeu-se esse efeito em linfócitos humanos em concentrações específicas, como mostrado na Tabela 4 (ABOU-EISHA, 2006). Já a cafeína induziu danos no DNA de eritrócitos do peixe *Prochilodus lineatus*, e o aumento do dano foi proporcional à concentração do fármaco (SANTOS-SILVA; MONTAGNER; MARTINEZ, 2018).

Um teste para avaliar a presença e a extensão de danos cromossômicos em células expostas a agentes genotóxicos é o de micronúcleos (MN) (BONASSI *et al.*, 2007; HOSSEINIMEHR; KARAMI, 2005). Efeitos mutagênicos, expressos pela formação de micronúcleos, já foram observados com os antibióticos adriamicina (AL-HARBI, 1993), ciclofosfamida (HOSSEINIMEHR; KARAMI, 2005) e indometacina (DEVI; POLASA, 1987) (Tabela 4). Magdaleno, Carusso e Moretton (2017) avaliaram a genotoxicidade de antibióticos de uso veterinário pelo teste de MN. Dos fármacos testados, apenas a enrofloxacinina induziu à formação de MN em células de *A. cepa* (Tabela 4).

Por sua vez, para avaliação da mutagenicidade, o teste de troca entre cromátides-irmãs (TCI), traduzido do inglês, *sister chromatid exchange assay* (SCE), tem sido aplicado. O ensaio identifica o potencial de mutagenicidade cromossômica de agentes químicos

por meio do dano no DNA (STULTS; KILLEN; PIERCE, 2014) pela recombinação mitótica. Uma investigação do potencial do analgésico paracetamol de induzir danos no DNA em células da medula óssea de camundongos demonstrou que, além de provocar aberrações cromossômicas, tal fármaco aumentou a frequência da troca entre cromátides-irmãs (GIRI; SIVAM; KHAN, 1992). Tal efeito também foi notado para três diferentes anti-inflamatórios (ibuprofeno, naproxeno e cetoprofeno) usando células da medula óssea (PHILIPOSE *et al.*, 1997) (Tabela 4).

O ensaio *Salmonella*/microssoma (teste de Ames) também é amplamente utilizado para avaliar a mutagenicidade de diversos compostos, entre eles fármacos, utilizando cepas da bactéria *Salmonella typhimurium*. O analgésico dipirona já foi avaliado pelo teste de Ames com cepas TA98 e TA100 da referida bactéria (IZUMI *et al.*, 1991), o que mostrou que a dipirona é fracamente mutagênica para a cepa TA100 na presença e na ausência de metabolização. Isidori *et al.* (2005) testaram a mutagenicidade de seis antibióticos pelo teste de Ames e, entre eles, três foram mutagênicos (Tabela 4). Sulfametoxazol e lincomicina induziram à atividade mutagênica nas cepas TA98 e TA100, enquanto ofloxacinina foi mutagênica apenas na cepa TA98.

TESTES DE CITOTOXICIDADE

Um dos métodos para avaliar a citotoxicidade envolve a quantificação dos danos e da integridade da membrana celular. Quando uma célula é danificada, ocorre liberação da enzima intracelular lactato desidrogenase (LHD) para o sobrenadante celular, resultando em diminuição da viabilidade celular. O efeito do fármaco amiodarona (antiarrítmico)

sobre a liberação de LDH em mitocôndrias demonstrou que a substância inibiu a atividade dessas enzimas com uma relação dose-dependente, expondo sua citotoxicidade por meio de danos na membrana (DZIMIRI; ALMOTREFI, 1993) (Tabela 4).

Para avaliar a citotoxicidade de compostos individuais ou misturas complexas, por meio da conversão celular de um substrato em produto cromogênico, o ensaio colorimétrico denominado de MTT foi desenvolvido por Mosmann (1983) e é possivelmente um dos mais versáteis e empregados na literatura. O ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato no metabolismo celular de glicídios, usualmente pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. Essas enzimas são funcionais apenas em células vivas e reduzem bioquimicamente o MTT

(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo) ao produto violácea e insolúvel em água conhecido como formazan (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan), que pode ser quantificado pela colorimetria.

O ensaio do MTT foi empregado por Allen *et al.* (1991) para avaliar a citotoxicidade de oito anti-inflamatórios não esteroidais (indometacina, ácido mefenâmico, cetoprofeno, ibuprofeno, sulindaco, aspirina, fenilbutazona e naproxeno) em células de adenocarcinoma ileocecal humana (HCT-8). Os anti-inflamatórios foram testados em concentrações de 10 µM a 10 mM, e foi observado que até 1 mM nenhum dos fármacos induziu a efeitos citotóxicos, embora todos eles tenham induzido a efeitos tóxicos na maior concentração testada (10 mM) (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados de testes de genotoxicidade e citotoxicidade para fármacos.

Organismo-teste	Efeito	Classe	Fármaco(s)	Concentração (mg.L ⁻¹)	Parâmetro	Referência
Testes de genotoxicidade						
<i>Allium cepa</i>	Alteração cromossômica e da divisão celular	Antirretrovirais	Zidovudina Nevirapina	170 250	-	Onwuamah <i>et al.</i> (2014)
Teste cometa	Formação do cometa	Antibiótico	Trimetropina	25-150 µg/mL	-	Abou-Eisha (2006)
		Estimulante	Cafeína	0,0003-0,03	-	Santos-Silva, Montagner e Martinez (2018)
Teste de micronúcleos	Formação de micronúcleos	Antibiótico	Adriamicina	Efeitos com 15 mg	-	Al-Harbi (1993)
		Anticâncer	Ciclofosfamida	Efeitos com 50 mg	-	Hosseinimehr & Karami (2005)
		Anti-inflamatório	Indometacina	Efeitos com 36 mg	-	Devi e Polasa (1987)
		Antibiótico de uso veterinário	Enrofloxacin	1-10	-	Magdaleno, Carusso e Moretton (2017)
<i>Escherichia coli</i> PQ37	Mudança da cor do meio	Antibiótico	Eritromicina Sulfametoxazol Ofloxacin Lincomicina Claritromicina	-	0,84 ± 0,06 [*] 1,63 ± 0,18 78 ± 7,21 1,46 ± 0,08 1,20 ± 0,17	Isidori <i>et al.</i> (2005)
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98 / TA100	Deslocamento do quadro de leitura / Substituição dos pares de bases	Antibiótico	Sulfametoxazol Ofloxacin Lincomicina	-	2,7 ± 0,95**/0,2 ± 0,09 130,8 ± 18,23 / ns 2,9 ± 1,13/0,3 ± 0,14	Isidori <i>et al.</i> (2005)
Troca entre cromátides-irmãs	Dano no DNA pela recombinação mitótica	Anti-inflamatório	Ibuprofeno Ketoprofeno Naproxeno Paracetamol	-	50-100 mg/kg 50-100 mg/kg 100 mg/kg 50-400 mg	Philipose <i>et al.</i> (1997)
Testes de citotoxicidade						
Teste lactato desidrogenase (LDH)	Oxidação de NADH a NAD ⁺	Antiarrítmico	Amiodarona	7,2 µM-2,5 mM	-	Dzimiri e Almotrefi (1993)
Ensaio do MTT	Viabilidade celular/citotoxicidade	Anti-inflamatório	Indometacina, ketoprofeno, ibuprofeno etc.	10 µM	-	Allen <i>et al.</i> (1991)

DNA: ácido desoxirribonucleico; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada; *fator de indução; **revertentes/µg; ns: número de revertentes não significante.

CONCLUSÕES

Embora a presença de fármacos no ambiente tenha sido relatada por diferentes grupos de pesquisa em diversos países, informações sobre os seus efeitos adversos em diferentes organismos e, principalmente, as concentrações consideradas limiares são ainda incipientes. Foram apresentadas neste trabalho as concentrações de fármacos quantificados em águas e efluentes brasileiros e compiladas informações sobre a toxicidade de tais contaminantes em nível aquático, celular e genético. Com base nisso, concluiu-se que as concentrações tóxicas observadas, equivalentes a CE_{50} ou CL_{50} , foram de 10 a 100 vezes maiores que aquelas

achadas no ambiente. Ainda, considerando os ensaios citotóxicos e genotóxicos, em sua maioria, viu-se que os fármacos na concentração usualmente encontrada no ambiente não apresentaram toxicidade significativa. Ensaios crônicos com elevada sensibilidade são os mais apropriados para investigar os riscos associados à presença de fármacos (ou de seus subprodutos) no ambiente. A baixa disponibilidade de dados relacionados ao efeito crônico dos fármacos sugere dificuldade em aplicar tais testes no monitoramento de amostras ambientais, uma vez que nesse caso os efeitos se referem à exposição prolongada e a doses cumulativas do agente.

REFERÊNCIAS

- ABOU-EISHA, A. (2006) Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antibacterial drug, trimethoprim. *Toxicology in Vitro*, v. 20, n. 5, p. 601-607. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.10.008>
- AL-HARBI, M.M. (1993) Effect of captopril on the cytological and biochemical changes induced by adriamycin. *Food and Chemical Toxicology*, v. 31, n. 3, p. 209-212. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(93\)90095-G](https://doi.org/10.1016/0278-6915(93)90095-G)
- ALLEN, C.N.; HARPUR, E.S.; GRAY, T.J.; HIRST, B.H. (1991) Toxic effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in a human intestinal epithelial cell line (HCT-8), as assessed by the MTT and neutral red assays. *Toxicology in Vitro*, v. 5, n. 3, p. 183-191. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(91\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0887-2333(91)90016-7)
- AQUINO, S.F.; BRANDT, E.M.F.; CHERNICHARO, C.A.L. (2013) Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 18, n. 3, p. 187-204. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-41522013000300002>
- BENOTTI, M.J.; TRENHOLM, R.A.; VANDERFORD, B.J.; HOLADY, J.C.; STANFORD, B.D.; SNYDER, S.A. (2009) Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environmental Science & Technology*, v. 43, n. 3, p. 597-603. <https://doi.org/10.1021/es801845a>
- BERGMAN, A.; HEINDEL, J.J.; JOBLING, S.; KIDD, K.A.; ZOELLER, T. (2013) *Endocrine Disrupting Chemicals - 2012: An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization*. Genebra: WHO/ UNEP. 296 p.
- BILA, D.; DEZOTTI, M. (2003) Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 523-530. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000400015>
- BIRCH, G.F.; DRAGE, D.S.; THOMPSON, K.; EAGLESHAM, G.; MUELLER, J.F. (2015) Emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, a food additive and pesticides) in waters of Sydney estuary, Australia. *Marine Pollution Bulletin*, v. 97, n. 1-2, p. 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.038>
- BISTAN, M.; PODGORELEC, M.; LOGAR, R.M.; TISLER, T. (2012) Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies. *Food Technology Biotechnology*, v. 50, n. 4, p. 427-433.
- BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. (2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, v. 28, n. 3, p. 625-631. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>
- BRANDT, E.M.F.; QUEIROZ, F.B.; AFONSO, R.J.C.F.; AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A.L. (2013) Behaviour of pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in simplified sewage treatment systems. *Journal of Environmental Management*, v. 128, p. 718-726. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.003>
- BRASIL. (2011) Ministério da Saúde. *Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011*. Normas e padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano. Brasil: Ministério da Saúde.
- BRASIL. (2017) Ministério da Saúde. *Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017*. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Brasil: Ministério da Saúde.

- CARLSSON, C.; JOHANSSON, A.-K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K.; KÜHLER, T. (2006) Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *The Science of the Total Environment*, v. 364, n. 1-3, p. 67-87. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.06.035>
- CLEUVERS, M. (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, v. 142, n. 3, p. 185-194. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(03)00068-7)
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. (1996) *Technical guidance document in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances*. Part II: Environmental Risk Assessment. Luxemburgo: Office for official publications of the European Communities.
- COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. (2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>
- DAUGHTON, C. (2002) Environmental Stewardship and Drugs as Pollutants. Environmental Protection Agency. *The Lancet*, v. 360, n. 9339, p. 1035-1036. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11176-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11176-7)
- DELGADO, L.F.; CHARLES, P.; GLUCINA, K.; MORLAY, C. (2012) The removal of endocrine disrupting compounds, pharmaceutically activated compounds and cyanobacterial toxins during drinking water preparation using activated carbon-a review. *The Science of the Total Environment*, v. 435-436, p. 509-525. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.046>
- DEODATO, E.L. (2009) *Caracterização do potencial genotóxico e mutagênico de misturas 3:1 de nutrição parenteral voltadas para pacientes neonatos*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio do Janeiro.
- DEVI, P.S.; POLASA, H. (1987) Evaluation of the anti-inflammatory drug indomethacin, for its genotoxicity in mice. *Mutation Research*, v. 188, n. 4, p. 343-347. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(87\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90011-5)
- DODD, M.C.; HUANG, C.H. (2004) Transformation of the antibacterial agent sulfamethoxazole in reactions with chlorine: kinetics, mechanisms, and pathways. *Environmental Science & Technology*, v. 38, n. 21, p. 5607-5615. <https://doi.org/10.1021/es035225z>
- DZIMIRI, N.; ALMOTREFI, A.A. (1993) Actions of amiodarone on mitochondrial ATPase and lactate dehydrogenase activities in guinea pig heart preparations. *European Journal of Pharmacology*, v. 242, n. 2, p. 113-118. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90070-X](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90070-X)
- FARRÉ, M.; PÉREZ, S.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. (2008) Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 27, n. 11, p. 991-1007. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>
- FERRARI, B.; PAXÉUS, N.; LO GIUDICE, R.; POLLIO, A.; GARRIC, J. (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 55, n. 3, p. 359-370. [https://doi.org/10.1016/s0147-6513\(02\)00082-9](https://doi.org/10.1016/s0147-6513(02)00082-9)
- GARTISER, S.; HAFNER, C.; KRONENBERGER-SCHÄFER, K.; HAPPEL, O.; TRAUTWEIN, C.; KÜMMERER, K. (2012) Approach for detecting mutagenicity of biodegraded and ozonated pharmaceuticals, metabolites and transformation products from a drinking water perspective. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 19, n. 8, p. 3597-3609. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0925-x>
- GHISELLI, G. (2006) *Avaliação da Qualidade das Águas Destinadas ao Abastecimento Público na Região de Campinas: Ocorrência e Determinação dos Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoas (PFHP)*. 190f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- GIRI, A.K.; SIVAM, S.S.; KHAN, K.A. (1992) Sister-chromatid exchange and chromosome aberrations induced by paracetamol in vivo in bone-marrow cells of mice. *Mutation Research*, v. 278, n. 4, p. 253-258. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(10\)80004-7](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(10)80004-7)
- GUIMARÃES, T.S. (2008) *Deteção e quantificação dos hormônios sexuais 17 β - Estradiol (E2), Estriol (E3), Etrona (E1) e 17 α - Etilinestradiol (EE2) em água de abastecimento: Estudo de caso da cidade de São Carlos, com vistas ao saneamento ambiental*. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Carlos.
- HOSSEINIMEHR, S.J.; KARAMI, M. (2005) Chemoprotective effects of captopril against cyclophosphamide-induced genotoxicity in mouse bone marrow cells. *Archives of Toxicology*, v. 79, n. 8, p. 482-486. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0655-7>
- ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PASCARELLA, L.; PARRELLA, A. (2005) Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *The Science of the Total Environment*, v. 346, n. 1-3, p. 87-98. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.017>
- IZUMI, K.; SANO, N.; OTSUKA, H.; KINOUCHI, T.; OHNISHI, Y. (1991) Tumor promoting potential in male F344 rats and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* of dipyrone. *Carcinogenesis*, v. 12, n. 7, p. 1221-1225. <https://doi.org/10.1093/carcin/12.7.1221>
- JARDIM, W.F.; MONTAGNER, C.C.; PESCARA, I.C.; UMBUZEIRO, G.A.; BERGAMASCO, A.M.D.; ELDRIDGE, M.L.; SODRÉ, F.F. (2011) An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Separation and Purification Technology*, v. 84, p. 3-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.020>
- KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, v. 36, n. 6, p. 1202-1211. <https://doi.org/10.1021/es011055j>

- KÜMMERER, K. (2010) Pharmaceuticals in the Environment. *Annual Review of Environment and Resources*, v. 35, p. 57-75. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-052809-161223>
- LI, J.; XU, L.; SHI, Z.G.; HU, M. (2015) A novel two-dimensional liquid chromatographic system for the online toxicity prediction of pharmaceuticals and related substances. *Journal of Hazardous Materials*, v. 293, p. 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.03.035>
- LIMA, D.R.; TONUCCI, M.C.; LIBÂNIO, M.; AQUINO, S.F. (2017) Fármacos e desreguladores endócrinos em águas Brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 22, n. 6, p. 1043-1054. <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522017165207>
- LIMA, D.R.S.; AFONSO, R.J.C.F.; LIBÂNIO, M.; AQUINO, S.F. (2014) Avaliação da remoção de fármacos e de desreguladores endócrinos em águas de abastecimento por clarificação em escala de bancada. *Química Nova*, v. 37, n. 5, p. 783-788. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140126>
- MACHADO, K.C.; GRASSI, M.T.; VIDAL, C.; PESCARA, I.C.; JARDIM, W.F.; FERNANDES, A.N.; SODRÉ, F.F.; ALMEIDA, F.V.; SANTANA, J.S.; CANELA, M.C.; NUNES, C.R.O.; BICHINHO, K.M.; SEVERO, F.J.R. (2016) A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 572, p. 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.210>
- MAGDALENO, A.; CARUSSO, S.; MORETTON, J. (2017) Toxicity and genotoxicity of three antimicrobials commonly used in veterinary medicine. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, v. 99, n. 3, p. 315-320. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2091-9>
- MELO, S.A.S.; TROVÓ, A.G.; BAUTITZ, I.R.; NOGUEIRA, R.F.P. (2009) Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 188-197. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000100034>
- MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F. (2011) Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 8, p. 1452-1462. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532011000800008>
- MOREIRA, D.S.; AQUINO, S.F.; AFONSO, R.J.C.F.; SANTOS, E.P.P.C.; PÁDUA, V.L. (2009) Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. *Environmental Technology*, v. 30, n. 10, p. 1041-1049. <https://doi.org/10.1080/09593330903052830>
- MOREIRA, M.; AQUINO, S.F.; COUTRIM, M.; SILVA, J.; AFONSO, R. (2011) Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). *Environmental Technology*, v. 32, n. 11-12, p. 1409-1417. <https://doi.org/10.1080/09593330.2010.537829>
- MOSMANN, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- NIETO, E.; HAMPEL, M.; GONZÁLEZ-ORTEGÓN, E.; DRAKE, P.; BLASCO, J. (2016) Influence of temperature on toxicity of single pharmaceuticals and mixtures, in the crustacean *A. desmarestii*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 313, p. 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.061>
- ONWUAMAH, C.K.; EKAMA, S.O.; AUDU, R.A.; EZECHI, O.C.; POIRIER, M.C.; ODEIGAH, P.G.C. (2014) Exposure of *Allium cepa* root cells to zidovudine or nevirapine induces cytogenotoxic changes. *PLoS One*, v. 9, n. 3, p. 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090296>
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). (2011) *Guidelines for Drinking-water Quality*. 4. ed. Genebra: OMS. 564 p.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). (2012) *Pharmaceuticals in Drinking-water*. Genebra: Public Health and Environment Water, Sanitation, Hygiene and Health. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44630/1/9789241502085_eng.pdf>. Acesso em: jul. 2012.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). (2014) *Antimicrobial Resistance: global report on surveillance*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Genebra: OMS. 257p.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). (2016) *Antimicrobial Resistance*. Fact sheet. Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Acesso em: set. 2016.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). (2017) *Guidelines for drinking-water quality*. 4. ed. Genebra: Organização Mundial da Saúde.
- PARRELLA, A.; LAVORGNA, M.; CRISCUOLO, E.; ISIDORI, M. (2013) Mutagenicity, Genotoxicity and Estrogenic Activity of River Porewaters. *Environmental Contamination and Toxicology*, v. 65, n. 3, p. 407-420. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9928-y>
- PEREIRA, R.O. (2011) *Formação de subprodutos do estrona e 17β- estradiol na oxidação utilizando cloro e ozônio em água*. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos.
- PHILIPOSE, B.; SINGH, R.; KHAN, K.A.; GIRI, A.K. (1997) Comparative mutagenic and genotoxic effects of three propionic acid derivatives ibuprofen, ketoprofen and naproxen. *Mutation Research*, v. 393, n. 1-2, p. 123-131. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(97\)00095-8](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(97)00095-8)
- QUEIROZ, F.B.; BRANDT, E.M.F.; AQUINO, S.F.; CHERNICHARO, C.A.L.; AFONSO, R.J.C.F. (2012) Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disruptors in raw sewage and their behavior in UASB reactors operated at different hydraulic retention times. *Water Science & Technology*, v. 66, n. 12, p. 2562-2569. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.482>
- QUINTANA, J.B.; RODIL, R.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. (2010) Investigating the chlorination of acidic pharmaceuticals and by-product formation aided by an experimental design methodology. *Water Research*, v. 44, n. 1, p. 243-255. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.018>

- QUINTÃO, F.J.O.; FREITAS, J.R.L.; MACHADO, C.F.; AQUINO, S.F.; SILVA, S.Q.; AFONSO, R.J.C.F. (2016) Characterization of metformin by-products under photolysis, photocatalysis, ozonation and chlorination by high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 30, n. 21, p. 2360-2368. <https://doi.org/10.1002/rcm.7724>
- RAIMUNDO, C.C.M. (2007) *Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia*. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- RIGOBELLO, E.S. (2012) *Avaliação da remoção de diclofenaco e formação de subprodutos em tratamento de água*. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos.
- ROZAS, O.; VIDAL, C.; BAEZA, C.; JARDIM, W.F.; ROSSNER, A.; MANSILLA, H.D. (2016) Organic micropollutants (OMPs) in natural waters: Oxidation by UV/H₂O₂ treatment and toxicity assessment. *Water Research*, v. 98, p. 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.069>
- SANDERSON, H.; BRAIN, R.A.; JOHNSON, D.J.; WILSON, C.J.; SOLOMON, K.R. (2004) Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. *Toxicology*, v. 203, n. 1-3, p. 27-40. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.05.015>
- SANTOS-SILVA, T.G.; MONTAGNER, C.C.; MARTINEZ, C.B.R. (2018) Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 58, p. 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.02.002>
- SODRÉ, F.F.; PESCARA, I.C.; MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F. (2010) Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 96, n. 1, p. 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.012>
- SOUZA, B.P.; LIMA, D.R.S.; AQUINO, S.F.; QUARESMA, A.V.; BAÊTA, B.E.L.; LIBÂNIO, M. (2018) Oxidação de fármacos por cloro e formação de subprodutos em amostras aquosas em escala de bancada. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 23, n. 2, p. 207-216. <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-41522018155335>
- SOUZA, N.C. (2011) *Avaliação de Micropoluentes Emergentes em Esgotos e Águas Superficiais*. 166p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- STULTS, D.M.; KILLEN, M.W.; PIERCE, A.J. (2014) The sister chromatid exchange (SCE) assay. In: KEOHAVONG, P.; GRANT, S.G. (orgs.). *Molecular Toxicology Protocols, Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press. v. 1105. 633 p. cap. 32.
- STUMPF, M.; TERNES, T.A.; WILKEN, R.D.; RODRIGUES, S.V.; BAUMANN, W. (1999) Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the Total Environment*, v. 225, n. 1-2, p. 135-141. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(98\)00339-8](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(98)00339-8)
- TERNES, T.A.; MEISENHEIMER, M.; MCDOWELL, D.; SACHER, F.; BRAUCH, H.-J.; HAIST-GULDE, B.; PREUSS, G.; WILME, U.; ZULEI-SEIBERT, N. (2002) Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental Science & Technology*, v. 36, n. 17, p. 3855-3863. <https://doi.org/10.1021/es015757k>
- TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.D.; SERVOS, M. (1999) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment*, v. 225, n. 1-2, p. 81-90. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(98\)00334-9](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(98)00334-9)
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, n. 3, p. 206-221. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3%3C206::aid-em8%3E3.O.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3%3C206::aid-em8%3E3.O.co;2-j)
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (2001) *Removal of Endocrine Disruptor Chemicals Using Drinking Water Treatment Processes*. Washington, D.C.: USEPA. Disponível em: <<http://nepis.epa.gov/Adobe/PDF/30004HGG.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2016.