



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AMBIENTAL
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

CATIUSA KUCHAK ROSIN OTTONELLI

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE EFLUENTE HOSPITALAR UTILIZANDO
ENSAIOS EMBRIONÁRIOS COM *DANIO RERIO***

**ERECHIM – RS
2016**

CATIUSA KUCHAK ROSIN OTTONELLI

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE EFLUENTE HOSPITALAR UTILIZANDO
ENSAIOS EMBRIONÁRIOS COM *DANIO RERIO***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental sob a orientação da Prof.^a Dra. Marília Teresinha Hartmann e Prof. Dr. Paulo Afonso Hartmann.

Orientador externo: Dr. Alexandre Arenzon.

ERECHIM

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Rua General Osório, 413D

CEP: 89802-210

Caixa Postal 181

Bairro Jardim Itália

Chapecó - SC

Brasil

CATIUSA KUCHAK ROSIN OTTONELLI

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE EFLUENTE HOSPITALAR UTILIZANDO
ENSAIOS EMBRIONÁRIOS COM *DANIO RERIO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental. Orientadores: Prof^a. Dra. Marília Teresinha Hartmann, Prof^o Dr. Paulo Afonso Hartmann e Dr. Alexandre Arenzon,

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Marília Teresinha Hartmann
Orientadora

Prof^o Dr. Paulo Afonso Hartmann
Orientador

Dr. Alexandre Arenzon
Orientador externo

Prof^a Dra. Vera Maria Ferrão Vargas
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul

Prof^a Dra. Lúcia Ribeiro Rodrigues
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul

Erechim/RS, 21 de junho de 2016.

*Dedico a concretização desse sonho
a minha mãe Janete,
Por toda dedicação, amor
e trabalho. Te amo incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade, por ter me dado uma família maravilhosa e ter me propiciado momentos de aprendizado únicos no decorrer da minha trajetória;

O presente trabalho não teria sido possível sem o auxílio de inúmeras pessoas. Sou muita grata a diversos colegas e amigos que contribuíram de uma forma ou de outra, para concretização desse sonho.

Agradeço a minha querida família, principalmente a minha mãe Janete e as minhas manas Carolina e Camila por todo amor, carinho, incentivos e companheirismo. Ao meu noivo Daniel por todo auxílio e dedicação nesses últimos anos, obrigada principalmente pela ajuda e incentivo e por sempre estar ao meu lado me apoiado. Vocês preenchem um espaço importante na minha vida;

Agradeço ao meu orientador externo Dr. Alexandre Arenzon da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, pela amizade, pelo ser humano exemplar que és, pelo incentivo na busca da investigação deste trabalho, pelos inúmeros auxílios e por toda dedicação.

Agradeço também:

Aos professores e orientadores da Universidade Federal da Fronteira Sul- UFFS Dra. Marília e Dr. Paulo, pelos comentários e revisões feitas ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pelas críticas e indagações construtivas, e também pelo conhecimento e experiência.

Ao professor Dr. Fernando Pulgatti da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos membros da banca examinadora Prof^a Dr^a Vera Maria Ferrão Vargas e Prof^a Dr^a. Lúcia Ribeiro Rodrigues da UFRGS por aceitarem o convite para a avaliação do presente trabalho.

Aos demais professores e colegas do mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da UFFS, aos amigos e colegas da UFRGS foi uma honra conhece-los e aprender um pouquinho com cada um, levo comigo um pouquinho de cada um em meu coração.

RESUMO

A avaliação da toxicidade aguda seguindo o método FET (Fish Embryo Toxicity Test) apresenta como proposta a utilização de embriões de peixes como organismos-teste em substituição aos peixes adultos. Desenvolvido e padronizado originalmente na Alemanha com o objetivo de ser uma alternativa para a avaliação da toxicidade de efluentes com peixes em ensaios de 48h, foi sugerido internacionalmente pela OECD em 2013 para avaliação da toxicidade de substâncias químicas em ensaios de 96h. Contudo, a aplicabilidade do método para amostras de efluente ainda é considerada carente de maiores informações. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar se o uso da metodologia de ensaios com embriões de peixes (FET), proposto pela OECD 236/2013, com duração de 96h para avaliação da toxicidade aguda de amostras de produtos químicos, pode ser considerada uma alternativa para a avaliação dos efeitos em amostras de efluentes hospitalares. Para avaliar a eficiência do FET, os resultados obtidos foram comparados com diferentes métodos para a avaliação da toxicidade aguda com peixes: *D. rerio* em fase larval (10 ± 2 dias, método não padronizado), juvenis de *D. rerio* e larvas de *P. promelas* seguindo a NBR ISO 15088, 2011. Dois períodos de exposição (48 e 96 horas) foram analisados e os resultados de CL50; 48h e CL50; 96h foram calculados com intuito de avaliar se esse período seria suficiente para observar o potencial toxicológico da amostra. Com objetivo de aumentar a sensibilidade do FET três novos efeitos tóxicos foram incluídos na avaliação dos resultados: não eclosão, edemas e imobilidade das larvas, considerados como FET Subletal. Os ensaios de toxicidade realizados com diferentes fases do desenvolvimento de *D. rerio* com a amostra de efluente hospitalar demonstraram que o FET seguindo a metodologia OECD 236 não apresentou a maior sensibilidade quando comparada aos demais métodos utilizados. As fases larvais (*D. rerio* - 10 ± 2 dias) e *P. promelas* foram as que apresentaram as maiores sensibilidades, seguidas do FET Subletal. O método FET somente não apresentou diferenças significativas em sua sensibilidade quando comparado aos ensaios com juvenis de 2 ± 1 cm realizados seguindo a NBR ISO 15088, 2011. Os resultados dos ensaios com FET 48 horas e FET 96 horas não apresentaram diferenças significativas. Contudo, apesar dos efeitos previstos pela OECD 236 terem sido observados nas primeiras 48 horas de exposição dos organismos, o prolongamento dos ensaios até 96 horas permitiu que outros efeitos pudessem ser observados, aumentando a sensibilidade do método. O presente trabalho concluiu que o uso do método FET segundo a OECD 236 de 2013 com embriões de *D. rerio* para avaliação de toxicidade de efluente hospitalar bruto não foi o método mais sensível quando comparados aos demais e deve ser observado com cautela.

Palavras-chaves: Ensaios ecotoxicológicos; Ensaios ecotoxicológicos com embriões de peixe; *D. rerio*; Efluente hospitalar.

ABSTRACT

The acute toxicity evaluation following the FET (Fish Embryo Toxicity) method presents as a proposal the utilization of fish embryos as a replacement of adults fishes. This method was originally developed and standardized in Germany with the objective of being an alternative for the toxicity evaluation of effluents using fishes in 48h experiments. In 2013, the OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) suggested 96h experiments for the toxicity evaluation of chemical substances. However, there is a lack of information referring to this method using effluent samples. Therefore, the objective of this study was to evaluate if the 96h FET method can be used as an alternative for the evaluation of hospital effluent samples. In order to assess the FET efficiency, results were compared with different methods: larval *D. rerio* (10 ± 2 days, unstandardized method), juveniles *D. rerio* and larval *P. promelas*, following NBR ISO 15088, 2011. Two exposure periods (48 e 96h) were analyzed and the CL50 (48 and 96h) were calculated aiming to evaluate if the exposure period were sufficient to observe the sample toxicological. Intending to increase the FET sensibility, three new toxic effects were included in evaluation: no outbreak, edemas and larval immobility; these were considered as sublethal FET. The experiments with different development phases of *D. rerio* showed that the OECD 236 did not present the highest sensibility over other methods. Larval phases (*D. rerio* – 10 ± 2 days) and *P. promelas* presented the highest sensibilities, followed by Sublethal FET. FET method did not present significant differences only when compared with tests using 2 ± 1 cm juveniles, executed according to NBR ISO 15088, 2011. The results between FET 48h and 96h exposure did not present any significant differences. Nevertheless, despite that the effects provided by OECD were observed in the first 48 exposure hours, the tests extension to 96h allowed the observation of different effects, increasing the method sensibility. This study concluded that using OECD FET method with *D. rerio* embryos for the evaluation of hospital effluents toxicity was not the more sensible method when compared with others methods and it should be cautiously observed.

Key-words: ecotoxicological experiments; fish embryos ecotoxicology; *D.rerio*; hospital effluent.

LISTA DE ABREVIACOES E EXPRESSOES

- ABNT:** Associação Brasileira de Normas Técnicas.
- CL50:** Concentração Efetiva capaz de causar efeito letal a 50% da população exposta, no período de estudo.
- CONAMA:** Conselho Nacional do Meio Ambiente.
- CONSEMA:** Conselho Estadual de Meio Ambiente.
- DBO:** Demanda Bioquímica de Oxignio.
- DQO:** Demanda Química de Oxignio.
- USEPA:** Environmental Protection Agency.
- FET:** Fish Embryo Toxicity Test.
- FET SUB:** FET 96hSub- Ampliação dos "end Points" previstos na OECD 236, 2013 incluindo mais 3 efeitos: não eclosão, edema e imobilidade.
- ISO:** International Organization for Standardization.
- JUVENIL:** *D. rerio* com 2 ± 1 cm.
- Juvenil xxh:** Ensaio ecotoxicológicos com *D. rerio* segundo Norma ABNT NBR ISO 15088 (ABNT, 2011) em exposição de 48 ou 96h.
- Larvas:** *D. rerio* com 10 ± 2 dias pós eclosão.
- Larva xxh:** Larvas de 10 ± 2 dias pós-eclosão em exposição de 48h ou 96h.
- NTU:** Unidade Turbidimtrica.
- OECD:** Organisation for Economic Co-operation and Development.
- pH:** Potencial de Hidrognio.
- REACH:** Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals.
- Mpf:** minutos ps fertilização.
- Hp**f: horas pós fertilização.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Exemplares de <i>Danio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae)	18
Figura 2. Sistema de cultivo <i>Danio rerio</i> . Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS.....	19
Figura 3. Ponto de coleta do efluente utilizado. O local da coleta foi definido com base na planta hidrosanitária de um hospital da capital do Rio Grande do Sul. Coleta do efluente realizada em abril de 2015. Porto Alegre/RS.	20
Figura 4. Esquema do ensaio FET: separação dos ovos, pré-exposição dos ovos após fertilização, seleção dos ovos fertilizados com auxílio do microscópio binocular e distribuição dos ovos em placas de microtitulação (OECD, 236, 2013).....	23
Figura 5. Comparação múltipla dos resultados das análises de toxicidade aguda (CL ₅₀ ;48h e 96h) para as 3 repetições do experimento (Exp. A, B e C) e respectivos intervalos de confiança ($\alpha=0.05$) dos diferentes métodos utilizados na avaliação com a amostra de efluente hospitalar bruto sobre <i>D. rerio</i>	28
Figura 6. Efeitos observados no desenvolvimento de embriões de <i>D. rerio</i> expostos a concentrações de 50% do efluente hospitalar avaliado. (a) Desenvolvimento embrionário anormal, presença de edema no saco vitelino, não houve desprendimento da cauda e desenvolvimento anormal dos olhos; (b) Edema pericardial; (c) Má formação da larva, desenvolvimento anormal da boca e presença de edema no pericárdio; (d) Larva apresentando curvatura da espinha dorsal.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros avaliados para a caracterização física e química da amostra de efluente hospitalar bruto avaliado, unidades de medida e suas respectivas metodologias.....	21
Tabela 2. Resumo das condições dos ensaios ecotoxicológicos (Toxicidade aguda) utilizadas no presente estudo desenvolvidos com a espécie de <i>D. rerio</i> em diferentes fases do seu desenvolvimento e de <i>P. promelas</i> como espécie referência.	25
Tabela 3. Valores de CL_{50} e os respectivos intervalos de confiança ($\alpha=0.05$) observados nos diferentes métodos utilizados na avaliação da toxicidade com a amostra de efluente hospitalar bruto sobre <i>D. rerio</i>	29
Tabela 4. Resultados dos efeitos observados sobre embriões de <i>D. rerio</i> nas três repetições do experimento durante e após a exposição a concentração de 50% da amostra de efluente hospitalar e as respectivas taxas de recuperação após cessar a exposição à amostra.	31
Tabela 5. Resultado com base na CL_{50} dos ensaios realizado com <i>D. rerio</i> em diferentes fases de desenvolvimento. Média, desvio padrão e coeficiente de variação com intervalo de confiança de 95%.....	33
Tabela 6. Caracterização física e química da amostra do efluente hospitalar bruto utilizado nos ensaios ecotoxicológicos, comparando seus resultados com os limites estabelecidos pela CONSEMA 128/2006.....	34

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1 Efluente avaliado.....	20
2.2 Caracterização física e química.....	21
2.3 Ensaios de Toxicidade	22
2.4 Ensaios de toxicidade comparativos	23
2.5 Análise dos dados.....	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
3.1 Comparação da sensibilidade do FET com outros ensaios agudos com peixes	26
3.2 Variabilidade entre os métodos.....	32
3.3 Caracterização do efluente.....	33
4. CONCLUSÃO	35
5. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

Devido à importância de observar e determinar os impactos causados por agentes tóxicos no ambiente de maneira direta, a utilização de ensaios ecotoxicológicos vêm apresentando resultados eficientes na detecção de poluentes químicos e agentes estressores (BUSS, 2002; SILVA; FONSECA, 2003). Os ensaios de toxicidade servem como um complemento das análises físicas e químicas, visto que somente essas análises não são suficientes para caracterizar a qualidade de determinado ambiente (MAGALHÃES; FILHO, 2008). Apenas os organismos são capazes de detectar o efeito tóxico que algumas substâncias causam, pois muitos organismos respondem a concentrações de substâncias bem abaixo dos limites de detecção dos métodos analíticos (KNIE; LOPES, 2004; MAGALHÃES; FILHO, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos podem avaliar a toxicidade aguda ou crônica. Os primeiros avaliam a capacidade da amostra em causar efeitos deletérios do tipo morte ou imobilidade aos organismos expostos após um curto período de exposição. Nos ensaios de toxicidade crônica, os efeitos observados caracterizam distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais, identificados após um maior período de exposição à amostra (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Como nos ensaios ecotoxicológicos o que é avaliado são os danos causados aos organismos, o indicado é que os ensaios sejam realizados com três diferentes níveis tróficos (DEZOTTI, 2008), representantes da cadeia alimentar, para assegurar uma maior confiabilidade dos resultados. Os principais organismos utilizados estão entre as espécies de fotobactérias, algas, microcrustáceos e peixes (KINE; LOPES, 2004). Cada um desses organismos pode responder de forma diferenciada aos efeitos da amostra. Segundo Arenzon (2004), a variabilidade dos efeitos tóxicos pode estar relacionada com as diferenças nas sensibilidades dos organismos, na complexidade dos compostos presentes nas amostras e na biodisponibilidade de certas substâncias.

Os ensaios ecotoxicológicos que utilizam espécies de peixes vêm sendo bem aceitos em avaliações de riscos ambientais e de produtos químicos, no estabelecimento de critérios da qualidade da água, em avaliações de efluentes e no monitoramento da qualidade de rios e estuários (SANDBACKA et al, 2000; COSTA;

OLIVI, 2008; MAGALHÃES; FILHO, 2008; DUFECH, 2009). Esses organismos possuem características específicas que sustentam a sua utilização como: ciclo de vida documentado; as fases iniciais do seu ciclo são extremamente sensíveis a contaminantes; muitas espécies possuem informações científicas disponíveis sobre a sua fisiologia, genética, comportamento, facilitando a interpretação dos resultados (CLEVELAND et al, 1999), e encontram-se em contato íntimo com o ambiente aquático (KNIE; LOPES, 2004; EMBRY et al, 2010).

Em função das leis europeias de proteção animal (Direito dos Animais; DEFRA, 2006) e dos 3R (Replacement, Reduction and Refinement) proposto por Russell & Burch, (1959), com relação ao bem estar animal, muitos autores vêm trabalhando em métodos alternativos para substituir os ensaios de toxicidade aguda com vertebrados. A reavaliação da utilização de animais em experimentos tem se apresentado como tendência mundial (CAZARIN et al, 2004). No Brasil a recente Resolução ANVISA/DC Nº 35 DE 07/08/2015 restringe a utilização de animais em testes de medicamentos, cosméticos e produtos de limpeza. A medida abre um caminho para a restrição do uso de animais em pesquisas no país.

O FET (Fish Embryo Toxicity Test) foi desenvolvido em 2001 pela German Standardisation Organisation (DIN) como uma proposta de método alternativo ao uso de peixes adultos em ensaios agudos (OECD 203, 1992) para avaliação ecotoxicológica de efluentes. Segundo Lammer et al (2009) o método não transgride a legislação Europeia, pois tanto ensaios com embriões (ovo) quanto ensaios eleutereoembrios (estágio entre embrião e larva) são considerados métodos aceitos, pois nessa fase os organismos não são protegidos.

Na Alemanha o FET é utilizado em ensaios de rotina de efluentes de águas residuais exigidos pela Agência Ambiental Alemã e, posteriormente, foi padronizado internacionalmente pela ISO (DIN 38415-6, 2001) como um método alternativo ao ensaio agudo padrão (OECD 203, 1992) (EMBRY et al, 2010). Na Europa, devido a crescente preocupação ética a respeito do uso de vertebrados em ensaios ecotoxicológicos, o desenvolvimento de métodos alternativos foi fortemente recomendado por agências europeias como a REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) (EU 2006) e a European Cosmetics Directive (EU 2009). Desse modo, o FET foi aprovado pela OECD e padronizado em

2013 (OECD 236, 2013) para avaliação de toxicidade aguda de substâncias químicas (BRAUNBECK, 2014).

O FET é um método interessante, pois, além de ser considerado alternativo ao ensaio agudo padrão (EMBRY et al, 2010) e ser mais informativo que o mesmo (DOMINGUES et al, 2010), é mais econômico quando comparado com ensaios feitos em vertebrados maiores, incluindo mamíferos. A escolha da espécie *D. rerio* (Zebrafish) também trouxe vantagens ao método pelas seguintes características do organismo: córion translúcido, fácil manutenção e extensa base literária disponível (EMBRY et al, 2010). De acordo com Lammer et al (2009), embriões de peixes são excelentes modelos em estudos voltados para a compreensão dos mecanismos tóxicos e para a indicação de possíveis efeitos adversos a longo prazo.

Danio rerio é uma espécie bentopélgica, pertence à família ciprinidae originária da Ásia. Quando adulta a espécie mede cerca de 3 a 5 cm, é simples de se obter, econômica, de fácil manutenção e, sob condições apropriadas, consegue proporcionar um grande número de ovos transparentes e de fácil manuseio. Uma fêmea tem posturas de aproximadamente 50 a 200 ovos por dia (ANDRADE, 2004). O seu desenvolvimento embrionário foi descrito em vários estudos (KIMMEL et al 1990; KIMMEL et al, 1991; KIMMEL et al, 1995) e vem servindo como base para a interpretação dos efeitos provocados por poluentes ambientais. Os ensaios com embriões são modelos eficientes, pois segundo Andrade (2004) as fases de desenvolvimento iniciais dos peixes são estágios bastante sensíveis, decorrentes de seu rápido desenvolvimento. A partir de duas células iniciais, torna-se rapidamente um organismo funcional com sistemas e órgãos bem desenvolvidos. Se durante essa fase de desenvolvimento um estresse ambiental ocorrer há hipóteses de que a sua sobrevivência possa ser reduzida (ANDRADE, 2004).

Os ensaios com embriões de *D. rerio* são recomendados por Nagel (2002) como modelo em ecotoxicologia e toxicologia. Esta espécie também é recomendada pela *Environmental Protection Agency* para testes de toxicidade aguda com peixes adultos (USEPA, 1996a) e para testes de toxicidade com embriões (USEPA, 1996b).

O desenvolvimento de metodologias para análises toxicológicas de efluentes tornou-se uma ferramenta importante da ecotoxicologia aplicada (SMOLDERS et al, 2003). Os efluentes são a principal fonte de entrada direta e contínua de poluentes em ecossistemas aquáticos e o estudo dos efeitos da exposição de organismos à

efluentes possui alta relevância ecológica (AUSLEY, 2000). Os efluentes de origem hospitalar encontram-se entre um dos principais problemas ambientais, pois são constituídos por uma série de compostos químicos, produtos farmacêuticos e os utilizados em limpeza (EMMANUEL et al, 2005). E, como mencionado por Tsakona et al, (2006), além da complexidade das substâncias químicas presentes, ainda podem possuir características infecciosas.

Na maioria dos países em desenvolvimento, inclusive no Brasil, são escassos os hospitais ou centros de saúde que possuem um sistema de tratamento adequado para seus resíduos (SILVA et al, 2011) muitas vezes, os efluentes hospitalares são lançados na mesma rede de esgoto a qual são destinados resíduos urbanos, causando sérios problemas, pois possuem compostos que por vezes não são eliminados por tratamentos convencionais (SOUZA, 2011), contaminando os corpos receptores (FUENTEFRIA et al, 2007; VECCHIA et al, 2009; EMMANUEL et al, 2009; VERLICCHI et al, 2010). No entanto, as pesquisas envolvendo avaliação de riscos ecotoxicológicos e genotóxicos (BAGATINI et al, 2009; VECCHIA et al, 2009), em efluentes hospitalares ainda são incipientes, ainda que os mesmos sejam considerados uma das rotas de entrada de compostos químicos e micropoluentes no ambiente aquático (KERN, 2012).

Estudos vêm sendo desenvolvidos para caracterizar quais são as substâncias tóxicas presentes e suas respectivas concentrações, para que a partir desses dados seja possível avaliar o impacto que essas substâncias podem causar, não só para seres humanos, mas também para a biota aquática (HAO et al, 2006; LIN et al, 2006; FOCAZIO et al, 2008; KASPRZYKHORDERN et al, 2008; VAN DE STEENE e LAMBERT, 2008; NAKADA et al, 2008; COMEAU et al, 2008; CHANG et al, 2008; SPONGBERG et al, 2008; VULLIET et al, 2011).

O monitoramento da qualidade de um efluente de origem hospitalar é avaliado com base em parâmetros físicos e químicos, exigidos legalmente por órgãos ambientais para sua disposição em redes coletoras (COSTA et al, 2008). No entanto, somente esses parâmetros não são suficientes para caracterizar o real efeito que esse efluente pode vir a causar no ambiente, uma vez que carregados para os corpos d'água, os compostos tóxicos podem interagir diretamente com a biota aquática. Nesse contexto os ensaios ecotoxicológicos podem avaliar e prever a

magnitude do risco de determinados poluentes presentes nessas amostras (MAGALHÃES; FILHO, 2008).

Apesar da Resolução 430/2011 do CONAMA indicar que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados no corpo receptor após o devido tratamento e desde que atendam as condições, padrões e exigências, os efluentes hospitalares no Brasil, de um modo geral, não recebem tratamentos adequados (KERN, 2012). Estudos desenvolvidos vêm mostrando que os efluentes originários de hospitais e clínicas possuem alto potencial genotóxico em função de elevadas concentrações de fármacos (GIULIANI et al, 1996).

A ocorrência de produtos farmacêuticos no ambiente é preocupante em função dos inúmeros problemas que a presença de certos compostos podem ocasionar nos ecossistemas aquáticos e para os seres humanos (HALLING-SORENSEN et al, 1998, TERNES, 2001, KUMMERER et al, 2001; HEBERER, 2002). Apesar da crescente preocupação com a gestão de resíduos hospitalares, pouca atenção tem sido dada aos resíduos provenientes destas instituições. Além de consumir uma quantidade significativa de água, que varia entre 400 e 1200 Lt ao dia por leito/paciente, tais instituições geram, nessa mesma proporção, águas residuais carregadas com microrganismos, metais pesados, produtos químicos tóxicos e elementos radioativos (GUPTA et al, 2009).

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar se o uso da metodologia de ensaios com embriões de peixes (FET), proposto pela OECD (OECD 236, 2013), com duração de 96h para avaliação de toxicidade aguda de amostras de produtos químicos, pode ser considerada uma alternativa para a avaliação dos efeitos de amostras de efluentes hospitalares sobre vertebrados aquáticos, principalmente no que se refere a sua sensibilidade e repetibilidade. Para isso, os resultados obtidos das amostras na avaliação com embriões de *D. rerio* foram comparados aos resultados provenientes dos ensaios agudos com larvas e juvenis (NBR ISO 15088, ABNT, 2011) de *D. rerio*, e larvas de *P. promelas* (NBR ISO 15088, ABNT, 2011).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O organismo-teste utilizado nesse trabalho foi a espécie *D. rerio* (Zebrafish) um peixe de água doce, originário da Ásia, pertence à família Cyprinidae (Figura 1).



Figura 1: Exemplos de *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae)
Fonte: www.akvaristalexikon.hu

Os organismos-testes utilizados nos ensaios foram provenientes do laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os peixes reprodutores foram utilizados com idade entre 17 e 20 meses, livres de doenças externas visíveis e nunca foram submetidos a qualquer tratamento farmacêutico. Os peixes foram alimentados diariamente com artêmias adultas congeladas e náuplios recém-eclodidos. O cultivo foi mantido a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo controlado de 16 horas de iluminação e 8 horas no escuro. Este controle é primordial na regulação de crescimento e reprodução dos peixes (DAMMSKI et al, 2011). Cultivados em aquários de 25 litros, respeitando a proporção de 1g de peixe por litro de água, preconizado pela ABNT NBR 15088 (ABNT, 2011).

Da reprodução dos organismos adultos foram obtidos três diferentes lotes de embriões que foram utilizados nos ensaios de toxicidade. Cada lote apresentava uma quantidade suficiente de embriões para a realização de todos os ensaios com a espécie *D. rerio*. Assim, em cada uma das 3 ($n=3$) repetições do experimento, o mesmo lote de organismo era utilizado quando atingiam a idade exigida pela metodologia: 90 minutos pós fertilização (mpf), 10 ± 2 dias pós-eclosão, e 2 ± 1 cm (aproximadamente 60 ± 4 dias).

Para manter a qualidade da água, os aquários onde os peixes foram mantidos tinham um sistema de filtragem física na qual a água passa por material poroso que retém os detritos e a filtragem biológica ocorre pela ação de colônias de bactérias que são responsáveis pela degradação da amônia (Figura 2). Parâmetros como pH, alcalinidade, dureza, amônia e condutividade foram avaliados semanalmente e ajustados sempre que necessários. Machos e fêmeas foram mantidos em aquários separados, sendo agrupados somente um dia antes da reprodução na proporção de dois machos para uma fêmea. O acasalamento, desova e fertilização ocorreram após as luzes se acenderem e os ovos obtidos foram coletados cuidadosamente por sucção e transferidos para placas de Petri contendo água deionizada reconstituída para uma dureza de 40- 47 mg.L⁻¹ de CaCO₃ e pH 7,4 - 7,5.



Figura 2. Sistema de cultivo *Danio rerio*. Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS.

2.1 Efluente avaliado

O efluente utilizado no presente estudo foi proveniente de um Hospital de grande porte, caracterizado por ser um complexo odonto-médico-hospitalar com uma área construída de 128.339 m², com 843 leitos localizada na capital do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O hospital gera em torno de 830m³/dia de efluente originários de diferentes setores como: ala de internação, bloco cirúrgico, ambulatório, sanitários entre outros. Apesar da alta geração de efluentes o hospital não dispõe de sistemas de tratamento e os efluentes são lançados diretamente na rede coletora de esgoto municipal.

Considerando a proposta do trabalho de avaliar a variabilidade dos métodos ecotoxicológicos, todos os ensaios foram realizados com uma única amostra, coletada no mês de abril de 2015 (Figura 3). Foram coletados aproximadamente 70 litros de efluente que foram alicotados em frascos de 500 ml e 1 Lt e posteriormente mantidos em freezer a $-27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até o momento de serem utilizados.



Figura 3. Ponto de coleta do efluente utilizado. O local da coleta foi definido com base na planta hidrosanitária de um hospital da capital do Rio Grande do Sul. Coleta do efluente realizada em abril de 2015. Porto Alegre/RS.

2.2 Caracterização física e química

A amostra foi caracterizada conforme os parâmetros físicos e químicos apresentados na (Tabela 1). Os parâmetros foram analisados no Laboratório Geral e no Laboratório de Absorção Atômica Centro de Ecologia (CENECO) do Instituto de Biociências da UFRGS no mesmo dia que a coleta foi realizada.

Tabela 1. Parâmetros avaliados para a caracterização física e química da amostra de efluente hospitalar bruto avaliado, unidades de medida e suas respectivas metodologias.

Parâmetros	Unidade	Método
Nitrogênio amoniacal	mg/L-1	Nesslerização
DBO	mg/L-1	Método de Winkler
DQO	mg/L-1	Colorimétrico
Carbono Orgânico Total COT	mg/L-1	Oxidação via combustão
pH		Potenciométrico
Temperatura	mg/L-1	Termométrico
Sólidos Totais	mg/L-1	Gravimétrico
Surfactantes	mg/L-1	Espectrofotométrico
Cloretos	mg/L-1	Volumetri de precipitação
Alcalinidade	mg/L-1	Volumetri de precipitação
Aromaticidade	ABS UV 254	Espectrofotométrico
Flureto	mg/L-1	Eletrodo de íon seletivo
Ortofosfato	mg/L-1	Espectrofotométrico
Oxigênio Dissolvido	mg/L-1	Método de Winkler
Turbidez	NTU	Nefelometria
Chumbo	mg/L-1	EAA/Eletrotérmica
Cromo Total	mg/L-1	EAA/Eletrotérmica
Ferro Total	mg/L-1	EAA/Chama ar- acetileno
Mercúrio	mg/L-1	EAA/Geração de hidretos

2.3 Ensaios de Toxicidade

Visando a comparação entre os métodos de avaliação da toxicidade aguda com peixes, os ensaios com embriões de *D. rerio* realizados segundo a metodologia OECD 236 (OECD, 2013) foram comparados aos ensaios com larvas de (10 ± 2 dias pós-eclosão) e ensaios de Toxicidade aguda com juvenis (2 ± 1 cm) de *D. rerio* e larvas de *Pimephales promelas* (1 a 14 dias pós eclosão), ambas seguindo as orientações da Norma NBR 15088 (Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaios para peixes) (ABNT, 2011).

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), exceto os ensaios realizados com *P. promelas* que foram realizados por laboratório especializado em ensaios de toxicidade e com certificação NBR ISO/IEC 17025.

Os ensaios com embriões seguiram as orientações apresentadas pelo método OECD 236 (OECD, 2013). Cada ensaio com embriões iniciou até 90 (mpf). Esse período é crucial, pois antecede o início da clivagem do blastocisto (OECD, 2013). Para a caracterização da viabilidade dos ovos, estes foram observados em estereomicroscópio com aumento de 70x. Os ovos fecundados foram identificados por um espaço pré-vitelino totalmente transparente rodeado pela membrana do ovo e a gema contendo o disco germinal iniciando a formação do polo animal.

Os ovos foram transferidos para placas de Petri contendo água deionizada reconstituída para uma dureza de 40 - 47 mg.L⁻¹ de CaCO₃ e pH 7,4 - 7,5, a mesma utilizada para a diluição das amostras. Em média 30 ovos foram selecionados e transferidos para cada uma das placas de Petri contendo as seguintes concentrações do efluente hospitalar não tratado: 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e os controles negativos (água deionizada reconstituída) e controle positivo (4,0 mg/L de 3,4-Dichloroaniline). Com auxílio do estereomicroscópio os ovos fecundados foram transferidos para as placas de microtitulação com as respectivas concentrações (Figura 4), e foram mantidos em incubadora a 26 ± 1 C° e com fotoperíodo de 15L:9E.

Os embriões foram observados a cada 24 horas pós fertilização (hpf). Segundo o método OECD 236 (OECD, 2013) para indicar a toxicidade aguda quatro “end points” são avaliados: (1) coagulação, (2) ausência de somitos, (3) não despreendimento da cauda e (4) ausência de batimento cardíaco. Além dessas quatro

características, foram observadas também efeitos como não eclosão, edema pericardial e imobilidade. Para avaliar o quanto estas novas características afetariam a sobrevivência dos organismos ao final das 96h de exposição do ensaio, as larvas sobreviventes e embriões ainda não eclodidos foram transferidos das amostras de efluente hospitalar não tratado, para água com as mesmas características da utilizada para a diluição das amostras e observados a cada 24 horas por mais 3 dias.

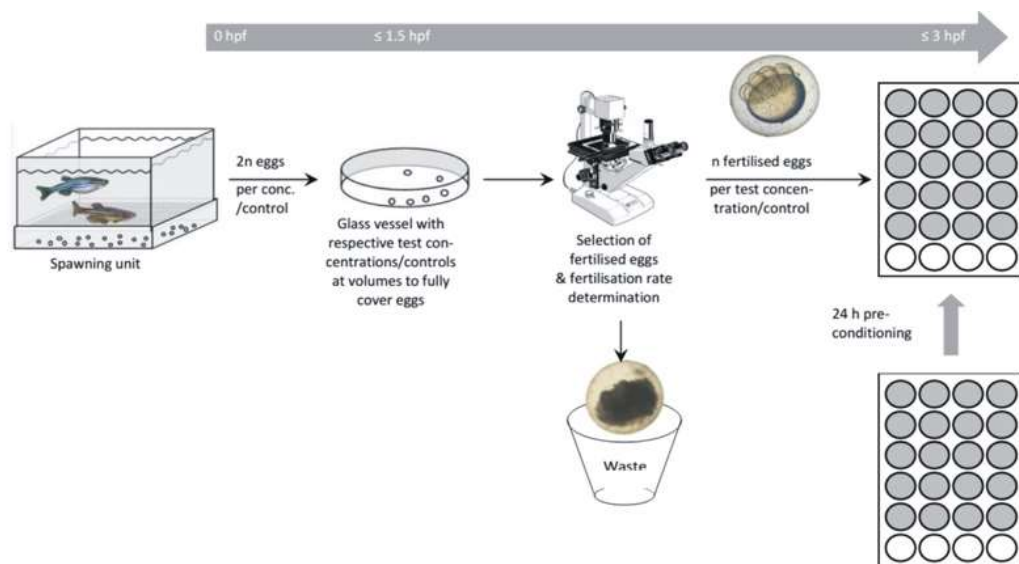


Figura 4. Esquema do ensaio FET: separação dos ovos, pré-exposição dos ovos após fertilização, seleção dos ovos fertilizados com auxílio do microscópio binocular e distribuição dos ovos em placas de microtitulação (OECD, 236, 2013).

2.4 Ensaios de toxicidade comparativos

Os resultados obtidos com os ensaios agudos com embriões de *D. rerio* foram comparados aos obtidos pelo método padronizado pela norma ABNT NBR 15088/2011 (ABNT, 2011). Foram realizados ensaios com as duas espécies de peixes indicadas pela referida norma, *Danio rerio* e *Pimephales promelas*. A espécie *P. promelas* foi utilizada na faixa de idade de 1 a 14 dias pós eclosão. Para os ensaios com *D. rerio* além da exigência da norma (organismos com 2 ± 1 cm), também foram realizados ensaios com organismos com 10 ± 2 dias pós-eclosão,

conforme sugerido por Freyri et al, (2014) por ser considerada uma fase com maior sensibilidade dos organismos (Tabela 2).

Cada ensaio foi composto por cinco concentrações de efluente hospitalar não tratado: 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e controle negativo (água de diluição 40-47 mg.L⁻¹ de CaCO₃). Os organismos-teste foram colocados em béqueres de 200 (para os ensaios com larvas de 10 ± 2 dias) e 400 ml (para os ensaios com jovens com 2 ± 1 cm). A distribuição dos organismos foi sempre da menor para a maior concentração do agente tóxico, iniciando pelo controle. Para cada concentração foram utilizadas duas réplicas com dez indivíduos em cada recipiente-teste, totalizando 120 organismos expostos por ensaio. Visando minimizar o efeito da variável tempo de exposição todos os resultados dos ensaios foram avaliados tanto em 48h quanto em 96h.

Cada uma das repetições dos ensaios realizados com *D. rerio*, considerando ensaios com embriões, ensaios com larvas de 10 ± 2 dias e ensaios com jovens com 2 ± 1 cm foram realizados com o mesmo lote de organismo conforme estes atingiam a idade/tamanho requerido pelo método. Desta forma, foi observada a variação da sensibilidade dos métodos em função da idade dos organismos.

Durante os ensaios os peixes não foram alimentados e foram monitorados os parâmetros de oxigênio dissolvido, pH e condutividade das amostras ensaiadas, tanto no início quanto após a conclusão do ensaio. O oxigênio foi monitorado com auxílio oxímetro Alfakit AT-160, a fim de garantir que a mortalidade dos organismos não acontecesse pela ausência de oxigênio, considerado que a amostra em questão apresenta elevada taxa de matéria orgânica. O pH foi verificado com pHmetro Oakton pH110, para avaliar as alterações ocorridas nas amostras durante os ensaios. E o monitoramento da condutividade, realizado com condutímetro WTW - FL197, a fim de verificar a correta diluição das amostras.

Tabela 2. Resumo das condições dos ensaios ecotoxicológicos (Toxicidade aguda) utilizadas no presente estudo desenvolvidos com a espécie de *D. rerio* em diferentes fases do seu desenvolvimento e de *P. promelas* como espécie referência.

Tipo de Ensaio	Embriões OECD 236	FET Subletal	Larvas ABNT NBR 15088	Juvenil ABNT NBR 15088	Larvas ABNT NBR 15088
Organismo-teste	<i>Danio rerio</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Pimephales promelas</i>
Idade do organismo	90 mpf. Pós eclosão	96h	10 + 2dias	2 + 1 cm	1 a 14 dias pós eclosão
Amostra Ensaída	Efluente	Água	Efluente	Efluente	Efluente
Parâmetros avaliados	Coagulação, ausência de somito, não desprendimento da cauda e ausência de batimento cardíaco	Não eclosão, Edema pericardial e Imobilidade	Mortalidade	Mortalidade	Mortalidade
Tempo de exposição	48h – 96h	72h	48h – 96h	48h – 96h	48h – 96h
Nº de Replicas	1	–	2	2	2
Nº de organismos por concentração	20	20	20	20	20
Tipo de ensaio	Estático	Estático	Semi-estático	Semi-estático	Semi-estático
Temperatura dos Ensaios	27+2°C	27+2°C	25 + 2°C	25 + 2°C	25 + 2°C
Critério de Validação do Controle	Mortalidade ≤ 10%	Taxa de Recuperação	Mortalidade ≤ 10%	Mortalidade ≤ 10%	Mortalidade ≤ 10%

2.5 Análise dos dados

Os valores de CL50, bem como os intervalos com 95% de confiança, foram obtidos pelo método das Probitas utilizando o programa SPSS. As diferenças nos valores de CL50 obtidos com cada um dos diferentes métodos de ensaios utilizados foram verificadas baseadas no método de sobreposição dos intervalos de confiança (PAYTON et al, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Comparação da sensibilidade do FET com outros ensaios agudos com peixes

Para a amostra ensaiada no presente estudo, não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos com embriões para o método FET 96h segundo a OECD, 236 (OECD, 2013) e o método padronizado pela ABNT para ensaios agudos com adultos de *D. rerio*, NBR ISO 15088 (ABNT, 2011) (Figura 5 e Tabela 3).

A similaridade entre os métodos também foi observada por outros autores. Oliveira et al, (2009) ao avaliar o mecanismo de toxicidade do triclosan em embriões e peixes adultos de *D. rerio* concluíram que os resultados entre ambos os ensaios foram semelhantes. Porém os autores destacam que os ensaios com embriões se mostraram mais informativos, permitindo que características complementares fossem observadas além da letalidade do organismo, levando em consideração o seu desenvolvimento e as modificações fenotípicas do embrião (RATTE; MARTELOS-WIRTZ, 2003; BRAUNBECK; LAMMER, 2006; LAMMER et al, 2009). Da mesma forma, Lammer et al (2008) através de uma análise de correlação entre ensaio FET e ensaios padronizados com peixe adulto OECD 203 (OECD, 1992), para substâncias químicas concluíram que, em comparação aos peixes adultos, os ensaios com embriões não resultaram em diferenças significativas.

Ao compararmos os resultados obtidos pelo método FET 96h (OECD, 236, 2013) com o resultado obtido com as larvas *P. promelas* seguindo a NBR ISO 15088 (ABNT, 2011), (Figura 5 e Tabela 3 - FET 96h x *P. promelas*), observamos que as larvas de *P. promelas* demonstraram maior sensibilidade que os embriões de *D.*

rerio (FET 96h). Ao repetirmos a metodologia NBR ISO 15088 utilizada na avaliação da toxicidade aguda com *P. promelas*, porém substituindo esta espécie por larvas de *D. rerio* (Larvas de 10 ± 2 dias pós-eclosão), observamos que a fase larval de *D. rerio* também foi mais sensível, que o FET 96h (OECD 236, 2013) (Figura 5 e Tabela 3 - Larvas 96h 10d x FET 96h). Segundo Freiry et al (2014) os ensaios agudos com *D. rerio* realizados com juvenis de 2 ± 1 cm de acordo com as metodologias apresentadas nas normas NBR ISO 15088 (ABNT, 2011) e OECD 203 (OECD, 1992) não utilizam a fase mais sensível da espécie e os resultados obtidos no presente estudo corrobora com estes autores.

O método FET pode ser controverso por duas razões principais: primeira, no que se refere à impermeabilidade do córion por moléculas com alto peso molecular e/ou altamente lipofílicas que poderiam não ter acesso ao embrião devido à função protetora do ovo e, segundo, pela suposta incapacidade do indivíduo de biotransformação, o que reduziria a biodisponibilidade dos tóxicos ao organismo (BRAUNBECK et al, 2014). No entanto, uma revisão realizada com aproximadamente 150 estudos toxicológicos usando diferentes estágios de vida de peixes, incluindo embriões e larvas, chegou à conclusão de que em pelo menos 80% dos casos a toxicidade poderia ser prevista se estágios iniciais do organismo fossem utilizados (MCKIM, 1977). Da mesma forma, Braubeck & Lammer (2006) consideram que a utilização das fases iniciais (embrião e eleuteroembriões) dos organismos-teste possa ser indicada para a realização dos ensaios ecotoxicológicos por estes serem mais suscetíveis a substâncias tóxicas.

Em relação ao tempo de exposição dos organismos à amostra, os resultados dos ensaios com FET 48 horas e FET 96 horas, não apresentaram diferenças significativas (Figura 5 e Tabela 3 - FET 48h x FET 96h). A média dos valores de CL50 encontrados para 48h e 96h de exposição entre as três repetições do experimento foram de 56,5% e 53,5%, respectivamente. Contudo, apesar dos efeitos causados pela amostra avaliada terem sido observados nas primeiras 48 horas de exposição dos organismos, a continuação dos ensaios até às 96 horas foi importante para que outros efeitos pudessem ser observados e a sensibilidade dos ensaios pudesse ser aumentada. Desta forma, durante as 96h de exposição dos ensaios, também foram observados e tabulados os dados de: não eclosão, formação de edemas e imobilidade dos organismos após a eclosão. Uma nova CL50 foi calculada

incluindo estes efeitos. Durante as 96h de exposição foi possível observar um aumento significativo na sensibilidade do método em detectar a toxicidade em todas as repetições do experimento (Figura 05, FET 96h x FET 96h Subletal). As médias dos valores de CL50 para o método FET 96h e FET 96h Subletal observado foram de 53,5% e 37,3%, respectivamente.

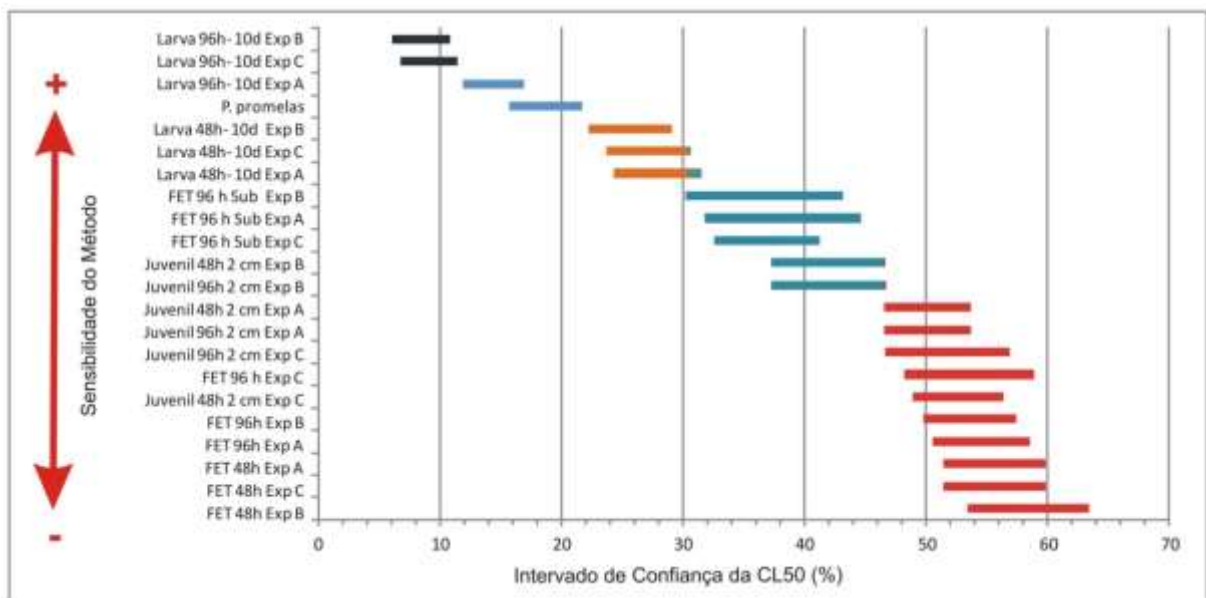


Figura 5. Comparação múltipla dos resultados das análises de toxicidade aguda (CL_{50} ; 48h e 96h) para as 3 repetições do experimento (Exp. A, B e C) e respectivos intervalos de confiança ($\alpha=0.05$) dos diferentes métodos utilizados na avaliação com a amostra de efluente hospitalar bruto sobre *D. rerio*.

Legenda: Larva xxh – 10 dias (larvas de 10 ± 2 dias pós-eclosão em exposição de 48h e 96h); *P. promelas* - Norma ABNT NBR ISO 15088 (ABNT, 2011); FET 96h - OECD 236, 2013; FET 96h Sub - OECD 236, 2013 incluindo mais 3 efeitos; e Juvenil xxh - Norma ABNT NBR ISO 15088 (ABNT, 2011) em exposição de 48h e 96h. Cores diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p = 0.05$). xxh refere-se ao tempo de exposição de 48h ou 96 de cada ensaio.

Tabela 3. Valores de CL₅₀ e os respectivos intervalos de confiança ($\alpha=0.05$) observados nos diferentes métodos utilizados na avaliação da toxicidade com a amostra de efluente hospitalar bruto sobre *D. rerio*.

Ensaio Realizados	CL50	Grupos	Limite Inf.	Limite Sup.
Larva 96h- 10d Exp B	8,46	A	6,10	10,86
Larva 96h- 10d Exp C	9,13	A	6,80	11,47
Larva 96h- 10d Exp A	14,37	B	11,90	16,89
<i>P. promelas</i>	18,64	B	15,69	21,68
Larva 48h- 10d Exp B	25,64	C	22,26	29,09
Larva 48h- 10d Exp C	27,06	c d	23,66	30,61
Larva 48h- 10d Exp A	27,84	c d	24,33	31,5
FET 96h Sub Exp B	36,72	D	30,23	43,14
FET 96h Sub Exp A	36,85	d	32,58	41,22
FET 96h Sub Exp C	38,2	d	31,81	44,65
Juvenil 48h 2 cm Exp B	42,07	d e	37,28	46,63
Juvenil 96h 2 cm Exp B	42,07	d e	37,28	46,63
Juvenil 48h 2 cm Exp A	50,09	e	46,52	53,67
Juvenil 96h 2 cm Exp A	50,09	e	46,52	53,67
Juvenil 96h 2 cm Exp C	51,72	e	46,62	56,89
FET 96h Exp C	52,58	e	48,91	56,34
Juvenil 48h 2 cm Exp C	53,47	e	48,16	58,91
FET 96h Exp B	53,48	e	49,72	57,37
FET 96h Exp A	54,45	e	50,55	58,51
FET 48h Exp A	55,53	e	51,43	59,83
FET 48h Exp C	55,53	e	51,43	59,83
FET 48h Exp B	58,29	e	53,44	63,38

Legenda: Exp. A, B e C. Larva xxh – 10 dias (larvas de 10 ± 2 dias pós-eclosão em exposição de 48h e 96h); *P. promelas* - Norma ABNT NBR ISO 15088 (ABNT, 2011); FET 96h - OECD 236, 2013; FET 96h Sub - OECD 236, 2013 incluindo mais 3 efeitos; e Juvenil xx h - Norma ABNT NBR ISO 15088 (ABNT, 2011) em exposição de 48 e 96h. Os resultados são apresentados em ordem crescente de CL50 dentro de cada método. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($p = 0.05$). xxh refere-se ao tempo de exposição de 48h ou 96h de cada ensaio.

A não eclosão dos embriões, registrada neste estudo, pode estar associada a mecanismos tóxicos que interferem na indução da enzima “chorionase” ou na incapacidade das larvas em romper a casca do ovo (HALLARE et al, 2005). A não eclosão após um período de 108 horas pós fertilização deve ser considerado letal, pois os embriões geralmente eclodem em 72 horas (LAMMER et al, 2008).

Segundo Hallare et al (2005) a presença de edemas no pericárdio dos organismos-teste pode estar associada ao vazamento dos vasos endoteliais, o que

geralmente resulta em disfunções cardiovasculares. Conforme observado por outros autores, edemas no pericárdio estão entre as anormalidades mais comuns em ensaios com embriões, após a exposição a uma ampla variedade de produtos químicos, incluindo pesticidas (FRAYSSE et al, 2006; OSTERAUER & KOHLER, 2008; DEMICCO et al, 2010), metais pesados (FRAYSSE et al, 2006; CHENG et al, 2000; DEVLIN, 2006) e produtos farmacêuticos (FRAYSSE et al, 2006; AKANDE et al, 2010. LALONE et al, 2012). Jeffries et al (2015) observaram que os antibióticos interferiram no desenvolvimento normal de *D. rerio*, causando atraso e malformações como: corpo curvado, edema no pericárdio, edema no saco vitelino e bexiga natatória não inflada.

Após interrupção da exposição dos organismos à amostra (96h) a observação dos organismos nas 72 horas seguintes indicou uma taxa de recuperação para estes efeitos de, no máximo 10%. Assim, os organismos que apresentavam edema no pericárdio, não haviam eclodido ou estavam imóveis após a eclosão permaneceram nessas condições, mesmo após terem sido transferidos para a água de diluição dos ensaios.

A reduzida taxa de recuperação dos organismos após o encerramento do período de exposição à amostra indica que tais características podem ser consideradas como indicadores de toxicidade (Tabela 4). Desta forma, ter incorporado ao método da OECD, 236 (OECD, 2013) outras características possíveis de serem observadas durante os ensaios permitiram aumentar a sensibilidade do método. Ao acrescentar estes efeitos aos dados utilizados para os cálculos das CL50, pode-se observar um aumento significativo da sensibilidade entre FET 96h (CL50 53,5%) e FET 96h Subletal (CL50 37,3%).

Tabela 4. Resultados dos efeitos observados sobre embriões de *D. rerio* nas três repetições do experimento durante e após a exposição a concentração de 50% da amostra de efluente hospitalar e as respectivas taxas de recuperação após cessar a exposição à amostra.

Concentração de 50%					
	Nº ovos expostos	Nº de organismo Efeitos Letais OECD*	Nº de Organismos com efeitos Subletais**	Nº de Organismos com efeitos	Recuperação (72h)
Experimento A	20	5	10	15	10%
Experimento B	20	8	7	15	0%
Experimento C	20	7	11	18	0%

*Efeitos Letais método FET OECD 236 (2013): coagulação, ausência de somito, ausência de batimento cardíaco, não desprendimento da cauda. * Efeitos Subletais: edema no pericárdio, não eclosão e imobilidade. Recuperação: percentual de organismos que apresentavam efeitos subletais, mas desenvolveram-se normalmente em até 72 horas após terem sido transferidos para água com as mesmas características utilizadas para diluição da amostra.

A amostra ensaiada produziu outros efeitos em uma pequena parcela dos organismos. Estes efeitos não foram quantificados, mas evidenciaram possíveis más formações causadas pela amostra em concentrações a partir de 25%. Foram observados atrasos no desenvolvimento (Figura 6a), deformidades na espinha dorsal e na cauda de algumas larvas recém-eclodidas (Figura 6e e 6d), bem como embriões com o corpo curvado (Figura 6b e 6c), edemas no pericárdio e edemas no saco vitelino (Figura 6b e 6c). Essas deformações podem estar associadas às características do efluente avaliado, por se tratar de um efluente de origem hospitalar, este pode apresentar em sua composição substâncias químicas complexas.

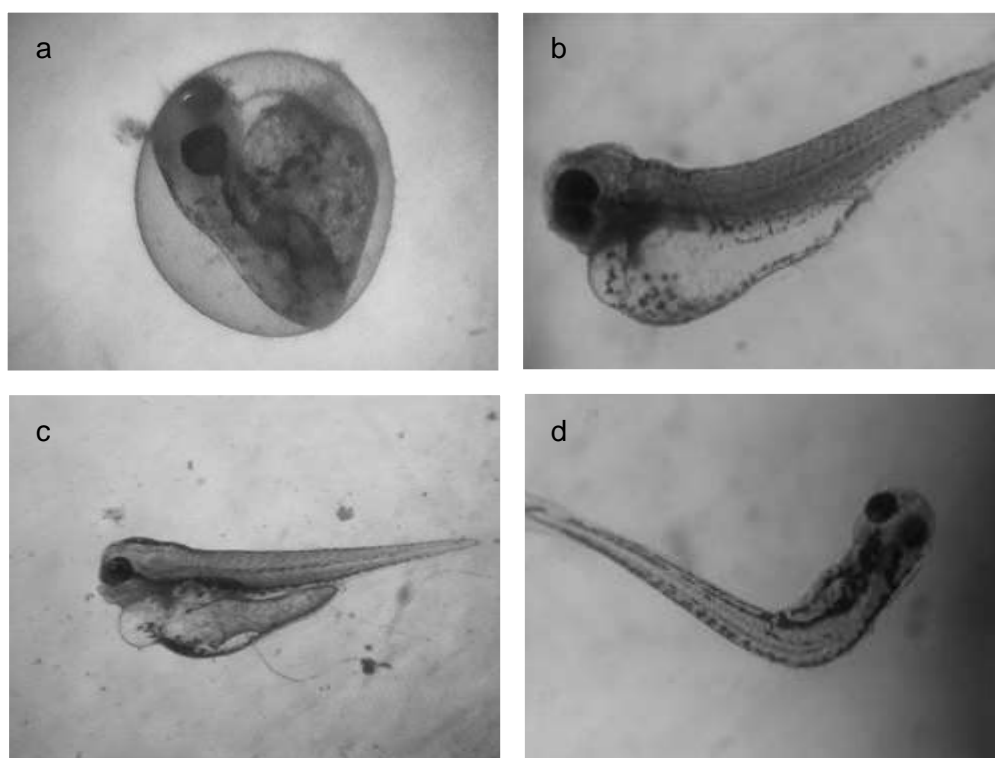


Figura 6. Efeitos observados no desenvolvimento de embriões de *D. rerio* expostos a concentrações de 50% do efluente hospitalar avaliado. (a) Desenvolvimento embrionário anormal, presença de edema no saco vitelino, não houve desprendimento da cauda e desenvolvimento anormal dos olhos; (b) Edema pericardial; (c) Má formação da larva, desenvolvimento anormal da boca e presença de edema no pericárdio; (d) Larva apresentando curvatura da espinha dorsal.

3.2 Variabilidade entre os métodos

Com relação a variabilidade entre os métodos para a avaliação da toxicidade aguda em peixes utilizados neste estudo (Tabela 3) é possível observar que, para os ensaios com larvas de 10 ± 2 dias pós-eclosão em exposição de 96 horas (Larva 96h 10d) e Juvenis de 2 ± 1 cm em exposição de 48 e 96 horas (Juvenil 48h e Juvenil 96h) foi observada diferença estatisticamente significativa entre os lotes utilizados nas avaliações. Contudo, o coeficiente de variação máximo para um mesmo método foi de 24,6% para os ensaios realizados com larvas (10 ± 2 dias); 96h (Tabela 5 – Larva 96h). Para que a variabilidade de um método seja considerada aceitável, esta deve ser igual ou inferior a 30% (ENVIRONMENT CANADA, 1990). Dessa forma as médias dos valores de CL50 podem ser consideradas como representativas ao conjunto de ensaios realizados (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado com base na CL_{50} dos ensaios realizado com *D. rerio* em diferentes fases de desenvolvimento. Média, desvio padrão e coeficiente de variação com intervalo de confiança de 95%.

	FET 48h	FET 96h	FET Sub 96h	LARVA 48h	LARVA 96h	JUVENIL 48h	JUVENIL 96h
Experimento A	55,5	54,5	36,9	27,8	14,4	50,9	50,9
Experimento B	58,3	53,5	36,7	25,6	8,5	42,1	42,1
Experimento C	55,5	52,6	38,2	27,6	9,1	53,5	51,7
Média	56,5	53,5	37,3	27,0	10,7	48,8	48,2
Desvio	1,30	0,76	0,67	0,99	2,64	4,88	4,37
C.V (%)	2,3	1,4	1,8	3,6	24,6	10,0	9,1

3.3 Caracterização do efluente

Os parâmetros cloreto, DBO, DQO, nitrogênio amoniacal, sólidos totais, surfactantes, chumbo, cromo total e mercúrio, avaliados no presente trabalho encontram-se fora dos limites estabelecidos na Resolução CONSEMA 128/2006 (Tabela 6). Esse efluente não possui um sistema de tratamento, ou seja, os resíduos gerados nesse centro de saúde são descartados diretamente na rede pública de esgoto.

Apesar dos efluentes hospitalares serem considerados similares aos efluentes domésticos por apresentarem valores próximos de parâmetros como matéria orgânica, DBO e DQO, metais, coliformes e pH (HOAG, 2008), vários autores citam as diferenças entre esgoto doméstico e o hospitalar, discutindo a prática do lançamento diretamente na rede pública (VERLICCHI et al., 2015; SANTOS et al., 2013; VERLICCHI et al., 2010; LANGFORD; THOMAS, 2009). Essas diferenças se referem principalmente à concentração de compostos farmacêuticos e quimioterápicos presentes nos efluentes hospitalares, ressaltando a importância do seu tratamento em estabelecimentos de saúde, já que as estações de tratamento de esgoto não são eficientes para a completa remoção destes poluentes.

Tabela 6. Caracterização física e química da amostra do efluente hospitalar bruto utilizado nos ensaios ecotoxicológicos, comparando seus resultados com os limites estabelecidos pela CONSEMA 128/2006.

Parâmetros	Unidade	Resultado	Resolução CONSEMA 128/2006
Alcalinidade	mgCaCO ₃ /L	125	-
Cloretos	mgCl/L	42,5	0,01
DBO	mgO ₂ /L	*	80
DQO	mgO ₂ /L	448	260
Flureto	mgF/L	0,61	10
Ortofosfato	mgPO ₄ -P/L	3,94	-
Nitrogênio Amoniacal	mgNH ₃ -N/L	35,6	20
Oxigênio Dissolvido	mgO ₂ /L	2,5	-
Sólidos Totais	Mg/L	488	80
Sulfeto	mgS ²⁻ /L	ND	-
Surfactantes	mgMBAS/L	4,96	2
Turbidez	NTU	201	-
Chumbo	mg-L ²	7,14	0,02
Cromo	mg-L ¹	15,1	0,05
Ferro	mg-L ¹	0,803	10
Mercúrio	mg-L138	0,474	0,01

Legenda: - Limite não encontrado na Legislação

ND= Não detectado

* = Análise de DBO não foi concluída, pois o oxigênio zerou em menos de 24 horas.

Nos ensaios ecotoxicológicos realizados com o efluente em questão, observamos que os valores de CL₅₀ variaram de 10,7% a 56,5% (Tabela 5), dependendo do método utilizado, considerando métodos padronizados e não padronizados conforme encontra-se disposto pela resolução do CONAMA 430/2011, efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados no corpo receptor, após o devido tratamento e desde que atenda aos limites preconizados pela legislação. Os resultados deste estudo ressaltam a importância de se realizar um tratamento diferenciado para os efluentes hospitalares, visando à redução da toxicidade e a proteção dos organismos aquáticos do corpo receptor.

4. CONCLUSÃO

Diferentes metodologias de ensaios ecotoxicológicos foram avaliadas no presente estudo a fim de comparar o método FET com embriões de *D. rerio* seguindo a OECD 236 (OECD 236, 2013) para avaliação ecotoxicológica de amostra de efluente hospitalar, com relação à sensibilidade e aplicabilidade do método. Os resultados indicaram ausência de diferenças significativas entre os resultados obtidos com o FET e os ensaios agudos padronizados com *D. rerio* segundo a ABNT NBR 15088 (ABNT, 2011), que utiliza peixes com 2 ± 1 cm. Em um primeiro momento isso poderia significar que utilização do método FET seria uma boa alternativa para avaliação ecotoxicológica de efluente hospitalar. Porém a utilização deste método deve ser observada com cautela, pois os resultados obtidos para as formas larvais tanto de *D. rerio* e *P. promelas*, demonstraram maior sensibilidade que método com os embriões.

Em relação a toxicidade do efluente hospitalar, a percepção desta mudou de acordo com o método utilizado na avaliação. Em média, o efluente pode apresentar toxicidade a partir de 10,7% para ensaios com larvas (96h) até 53,5% para os ensaios com embriões (96h). Esses resultados ressaltam a importância de se realizar um tratamento diferenciado para os efluentes hospitalares, visando à redução da toxicidade e a proteção dos organismos aquáticos do corpo receptor.

O método FET segundo a OECD 236, juntamente com os ensaios realizados com juvenis de *D. rerio* apresentaram a menor sensibilidade entre os métodos utilizados. Os ensaios com larvas, tanto com *D. rerio* quanto com *P. promelas* apresentaram as maiores sensibilidades.

Embasado pelas comparações dos resultados do método FET com os obtidos pelos demais métodos utilizados para avaliar a toxicidade do efluente hospitalar, observou-se que os resultados gerados a partir dos 4 “end points” sugeridos pela metodologia FET - OECD 236 (OECD 236, 2013) não foram satisfatórios para obter a melhor detecção de toxicidade da amostra em questão. A inclusão de outras observações tais como, não eclosão do embrião, imobilidade pós eclosão e edema no pericárdio, poderiam ser incorporadas ao método como características complementares, contribuindo dessa forma no aumento da sensibilidade do método em detectar a toxicidade, além de torná-lo mais informativo.

5. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Como possíveis trabalhos futuros, pode-se apontar:

- Avaliar a toxicidade de um número maior de amostras de efluente hospitalar;
- Avaliar a toxicidade de efluentes hospitalares em diferentes períodos (inverno e verão);
- Avaliar a toxicidade de efluentes hospitalares com outros níveis tróficos;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, R.M.S; 2004. Efeitos da exposição de peixe zebra, *Danio rerio*, a um efluente têxtil. Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 1- 100.

Akande M.G., Orn S., Norrgren L., 2010. Evaluation of the toxic effects of clozapine in zebrafish (*Danio rerio*) embryos with the fish embryo toxicity test. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research*. 1, 90-94.

Arenzon, A., 2004. Ensaio ecotoxicológicos no monitoramento da qualidade de águas subterrâneas potencialmente impactadas. Porto alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 94p. Tese de Doutorado em Ecologia. Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2011.

Ausley L.W., 2000. Reflection on whole effluent toxicity: The Pellston workshops. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19 (1), 1-2.

Bagatini, M.D., Vasconcelos, T.G., Laughinghouse, H.D., Martins, A.F., Tedesco, S. B., 2009. Biomonitoring hospital effluents by the *Allium cepa* L. test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 82 (5), 590-592.

Braunbeck, Thomas et al, 2004. Towards an Alternative for the Acute Fish LC50 Test in Chemical Assessment: The Fish Embryo Toxicity Test Goes Multispecies – an Update. In *Aquatic Ecology and Toxicology Group*. Department of Zoology, University of Heidelberg, D-Heidelberg.

Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. UBA Contract, Background Paper on Fish Embryo Toxicity Assays. Prepared for German Federal Environment Agency. 203, 1-40. 85-422.

Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider K., Stengel D., Strecker Res., 2014. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environmental Science and Pollution Research Environ*. DOI 10.1007/s11356-014-3814-7.

Bodar, C.W., Berthault, F., de Bruijn, J.H., Van Leeuwen, C.J., Pronk, M.E., Vermeire, T.G., 2003. Evaluation of EU risk assessments existing chemicals (EC Regulation 793/93). *Chemosphere*. 53, 1039-1047.

Buss, D.F., 2002. Proteção à vida aquática, participação das comunidades e políticas de recursos hídricos. *Ciência & Ambiente*. 25, 71-84.

Cazarin, K., Corrêa, C., Zambrone, F., 2004. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: Uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 40, 3, jul./set.

Chang, H., Chang, J., Hu, L., Wang, B., Shao, 2008. Occurrence of sulfonamide antibiotics in sewage treatment plants. *Chinese Science Bulletin*. 53, 514–520.

Cheng, S.H., Wing Kong Wai, A., Hung So, C., Shiu Sun Wu, R., 2000. Cellular and molecular basis of cadmium induced deformities in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19, 3024-3031.

Cleveland, L., Fairchild J.F., Little E., 1999. Biomonitoring and Ecotoxicology: Fish as Indicators of Pollution-Induced Stress in aquatic systems. *Environmental Science Forum*. 96, 195-232.

Comeau, F.C., Surette, G.L., Brun, R. Losier., 2008. The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *Science of the Total Environment*. 396, 132–146.

Costa, C., Olivi, P. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*. 31 (7), 1820-1830.

Dammski, A, P., Muller, B.,Gaya, C., Regonato, D., 2011. Zebrafish Manual de Criação em Biotério. Universidade Federal do Paraná. 1- 107.

DeMicco A, Cooper K.R, Richardson J.R, White L.A., 2010. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides in zebrafish embryos. *Toxicological Sciences* 113, 177–186.

Devlin, E.W., 2006. Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methyl mercury to fathead minnow embryos. *Ecotoxicology* 15, 97– 110.

Dezotti, M., 2008. Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos. Rio de Janeiro: E-papers. 350.

DIN 2001, DIN 38415-6: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser, Abwasser und Schlammuntersuchung - Suborganismische Testverfahren (Gruppe T) – Teil 6: Giftigkeit gegenüber Fischen; Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen.

DIN 38412-31, 1989-03. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bio-assays (group L); determining the tolerance of fish to the toxicity of waste water by way of a dilution series (L 31). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 34 (8), 1148-1154.

Domingues, I., Oliveira, R., Lourenço, J., Grisolia, C.K., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., 2010. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 152, 338-345.

Lammera, E., Kampb, H.G., Hisgenb, V., Kochb, M., Reinhardb D., Salinasb E.R., Wendlera, K., Zokb, S., Braunbeck T.h., 2009. A Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic*

Ecology and Toxicology Section, Department of Zoology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 230, D-69120 Heidelberg, Germany. *Toxicology in Vitro*. 23 (7), 1436-42. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.05.014

Dufech, A.P., 2009. Uso de assembleias de peixe com indicadoras de Degradação ambiental nos ecossistemas aquáticos do Delta do Rio Jacuí, RS. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1- 213.

EFSA (European Food Safety Administration), 2005. Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes. 292, 1-46.

Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton D.E., Léonard M.A., Lillicrap A., Norberg-King, T., Whale G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology*. 97, 79-87.

Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J.M., Vermande, P., 2005. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *Journal of Hazardous Materials*. 117(1), 1-11.

Emmanuel, E., Pierre, M.G., Perrodin, Y., Perrodin., 2009. Groundwater contamination by microbiological and chemical substances released from hospital wastewater: Health risk assessment for drinking water consumers. *Environment International*. 35, 718– 726.

Environmental Protection Agency, U. S., 1996a. Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine. *Ecological Effects Test Guidelines*. 712, 96-118.

Environmental Protection Agency, U. S., 1996b. Fish Early-Life Stage Toxicity Test. *Ecological effects Test Guidelines*. 712, 96-121.

Fraysse, B., Mons, R., Garric, J. 2006. Development of a zebrafish 4-day embryol- larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63, 253–267.

Freiry, R., Stelzer J.A., Maltchik, L., Arenzon, A., 2014. Sensitivity of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) During Two Stages of Development Based on Acute Toxicity Tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 93, 442-445.

Friccius, T.C., Schulte, C., Ensenbach, U. et al. (1995). Der Embryo test mit dem Zebrabarbling - eine neue Möglichkeit zur Priifung und Bewertung der Toxizität von Abwasserproben. *Vom Wasser*. 84, 407-418.

Focazio, M.J., Kolpin D.W., Barnes K.K., Furlong E.T., Meyer M.T., Zaugg S.D., Barber, L.B., Thurman, M.E. 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States— II) untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment*. 402, 201– 216. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.02.021.

Giuliani, F., Koller, T., Würigler, F.E., Widmwer., 1996. Detection of genotoxic activity in native hospital waste water by the umuC test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental*. 368, 49-57.

Gupta, P., Mathur, N., Bhatnagar, P., Nagar, P., Srivastava, S., 2009. Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72 (7), 1925-32.

Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Kohler H.R., Triebkorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology*. 30, 7-17.

Halling-Sorensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Lutzhoft, H.C.H., Jorgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review. *Chemosphere*. 36, 357-394.

Hao, Chunyan., Lissemore, L., Nguyen, B., Kleywegt, S., Yang, P., Solomon, K. 2006. Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 384, 505–513.

Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters*. 131, 5-17.

Hoag, L.S.A., 2008. Reuso de água em hospitais: o caso do hospital “Santa Casa de Misericórdia de Itajubá”. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Engenharia de Itajubá. Itajubá, MG, Brasil. 204.

ISO 15088, International Organization for Standardization. Prepared by Technical Committee ISO/TC 147, Water quality, Subcommittee SC 5, Biological methods. *Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (Danio rerio)*, 2007. Available: <http://www.iso.org>.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy. 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*. 42, 3498–3518.

Kern, I.D., 2012. Avaliação da eficiência da ozonização fotocatalítica no tratamento de efluentes de lavanderia hospitalar, por meio de ensaios ecotoxicológicos e genotóxicos. *Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental, área de concentração em Gestão e Tecnologia Ambiental, da Universidade de Santa Cruz do Sul*. 1-142.

Kimmel, C.B., Warga, R.M., and Schilling, T.F. 1990. Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development* 108, 581-594.

Kimmel, C.B., Kane, D.A., and Ho, R.K. 1991. Lineage specification during early embryonic development of the zebrafish. In: “Cell-Cell Interactions in Early Development,” Gerhart, J. New York: Wiley-Liss. 203-225.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203, 253-310.

Knie, J., Lopes, E., 2004. Testes ecotoxicológicos: Métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ. 289, ISBN 85-87391-05-4.

Kummerer, K., 2001. Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources -A review. *Chemosphere* 45, 957-969.

Lammer E., Carr G.J., Wendler, K., Rawlings J.M., Belanger S.E., Braunbeck Th., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 149, 196-209

LaLone C.A., Villeneuve D.L., Olmstead A.W., Medlock E.K., Kahl M.D., Jensen K.M., Durhan, E.J., Makynen E.A., Blanksma C.A., Cavallin J.E., Thomas L.M., Seidl S.M., Skolness S.Y., Wehmas L.C., Johnson R.D., Ankley, G.T., 2012. Effects of a glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone, on fathead minnow reproduction, growth, and development. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31, 611–622.

Lange, M., Gebauer, W., Markl, J., Nagel, R., 1995. Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RGT-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* 30 (11), 2087–2102.

Lin, M.H., Plumlee, M., Reinhard., 2006. Natural attenuation of pharmaceuticals and alkylphenol polyethoxylate metabolites during river transport: photochemical and biological transformation. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25, 1458–1464.

Magalhães, D.P., Filho, A.S., 2008. A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. *Oecol. Brasil* 12 (03), 355-381.

McKim, J.M., 1985. Early life stage toxicity tests. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere, New York. 58-95.

Munkittrick, K.R., McCarthy, L.S., 1995. An integrated approach to aquatic ecosystem health: Top-down, bottom-up or middle out? *Aquatic Ecosystem Health*. 4, 77–90.

Nagel, R., 2002. DarT: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* - a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. *Altex*. 19, 38-48.

Nakada, N., Kiri, K., Shinohara, T., Harada, A., Kuroda, K., Takizawa, S., Takada, N., 2008. Evaluation of Pharmaceuticals and Personal Care Products as Water-soluble Molecular Markers of Sewage. *Environmental Science & Technology*. 6347–6353. DOI: 10.1021/es7030856.

OECD 203, 1992. OECD guideline for testing chemicals. Test No. 203: Acute Fish.

Test OECD 236. 2013. Guideline for the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.

Oliveira, R., Domingues, I., Grisolia, K.C., Soares, A., 2009. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environmental Science and Pollution Research*. 16, 679–688. DOI 10.1007/s11356-009-0119-3.

Osterauer, R., Köhler H.R., 2008. Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. 86, 485 - 494.

Payton, M.E., Greenstone M.H., Schenker, N., 2003. Overlapping confidence intervals or standard error intervals: what do they mean in terms of statistical significance? *Journal of Insect Science*. 3-34. DOI: 10.1093/jis/3.1.34

Ratte, H.T., Hammers-Wirtz, M., 2003. Evaluation of the existing data base from the fish embryo test. UBA report under contract. 27.

Russell, W.M.S., Burch, R., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen.

Sandbacka, M., Christianson, L., Isomaa, B., 2000. The acute toxicity of surfactants on fish cells. *Daphnia magna* and fish: A comparative study. *Toxicology In vitro*, 61-68.

Scholz, S., Stephan F., Gündel, U., Küster, E., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*. 15, 394–404. DOI 10.1007/s11356-008-0018-z

Silva, D., Macêdo, R., Ladchumananandasivam, R., 2011. Caracterização físico-química e microbiológica de efluente hospitalar na Região Metropolitana do Natal - RN – Brasil. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. ISSN 1519-5228.

Silva, J., Fonseca, M.B., 2003. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. In: SILVA, J., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Alcance. 70- 84.

Smolders, R., Bervoets, L., Boeck De, G., Blust, R., 2002. Integrated condition indices as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 87- 93.

Souza, Costa De., 2011. Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais. Tese de Doutorado em Engenharia Civil, da Universidade Federal do Ceará. 1-183.

Spongberg, A.L., Witter, J.D., 2008 Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Science of the Total Environment*. 397, 148–157.

Ternes, T.A., Bonerz, M., Schmidt, T., 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 938, 175-185.

Van De Steene, J.C., Lambert, W., 2008. Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples. *Journal of Chromatography*. 153-160.

Vecchia, A.D., Thewes, M.R., Harb N.R., Spilki, F.R., 2009. Diagnóstico sobre a situação do tratamento do esgoto hospitalar no Brasil. *Revista Saúde e Ambiente*. (10), 2.

Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovi, P., Barcelo, D., 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*. 389, 205- 2010.

Verlicchi, P., Aukidy, M., Zambello, E., 2015. What have we learned from worldwide experiences on the management and treatment of hospital effluent? — An overview and a discussion on perspectives. *Science of the Total Environment*. 514, 467–491.

Vulliet, E., Cren-Olive, C., Grenier-Loustalot, M.F., 2011. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environmental Chemistry Letters*. 9, 103-114.