



DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Patrícia Sobierajski Barreto

**BIODEGRADABILIDADE DO ANTINEOPLÁSICO CICLOFOSFAMIDA
POR PROCESSO ANAERÓBIO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião Roberto Soares

Florianópolis, outubro de 2007

Ficha Catalográfica:

BARRETO, Patrícia Sobierajski. Biodegradabilidade do Antineoplásico Ciclofosfamida por Processo Anaeróbio.

Patrícia Sobierajski Barreto - Florianópolis, 2007, 155p. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – 2007.

Título em Inglês: Biodegradability of Antineoplastic Cyclophosphamide through Anaerobic Process.

“Modele sua vida pelo bambu-gigante. O exterior, embora liso e agradável ao contato, é duro e resistente à espada. Por dentro é macio, flexível, com muito espaço vazio para o contínuo crescimento. Sozinho, sobe alto e reto, sempre se projetando para o céu. Lá em cima espalha sua beleza ao sol. Não se apóia em nada. Cria seu próprio caminho. Talvez próximo de outros, uma parte dos outros. Mas depende basicamente de sua própria força e vigor”.

(Leo Buscaglia)

Dedicatória

*Ao meu esposo Orlando e ao nosso
filho Diego, que são a bússola da
minha vida.*



Agradecimentos

- ✓ A *DEUS*, autor da vida, e que inculuiu no ser humano o desejo e a capacidade de construir um mundo melhor.
- ✓ A Universidade Federal de Santa Catarina, através do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, foi à instituição que possibilitou a realização do doutorado, mas foram os professores, funcionários e colegas que fizeram a diferença.
- ✓ Ao meu Orientador Prof. Dr. *Sebastião Roberto Soares*, pela oportunidade de realização deste trabalho.
- ✓ Aos membros da banca por sua disponibilidade em participar da conclusão desta etapa.
- ✓ À professora Dra. *Juliet Kiyoko Sugai*, pelo incentivo durante o doutorado, e por me ensinar “*que o verdadeiro homem mede sua força quando se defronta com o obstáculo*” (Saint-Exupéry).
- ✓ Aos meus pais, *Carlos Frederico* e *Maria Theresinha*, por dispensarem parte da sua existência à minha existência.
- ✓ À Sociedade brasileira, representada pelo CNPq/CTHidro, pela concessão da bolsa de estudos permitindo assim a realização deste trabalho.
- ✓ E, finalmente profundamente a todas as pessoas que entraram na minha vida e me inspiraram, comoveram, contribuíram e iluminaram com sua presença, em especial as amigas Cátia e Sibeli.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE GRÁFICOS	10
LISTA DE QUADRO E TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1. Importância do Trabalho	16
1.2. Justificativa e Estruturação da Tese	19
1.3. Objetivos	23
1.4. Hipóteses e Premissas	24
2. QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA E CICLOFOSFAMIDA	25
2.1. Epidemiologia do Câncer	25
2.2. Quimioterapia Antineoplásica	27
2.3. Ciclofosfamida - CF	29
3. RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE: ASPECTOS BÁSICOS	33
3.1. Resíduos de Serviços de Saúde - RSS: <i>Classificação e Legislação</i>	33
3.2. Efluente Hospitalar: <i>Fármacos Residuais no Meio Ambiente</i>	37
3.3. Efluente Hospitalar: <i>Estudos no Brasil</i>	42
3.4. Efluente Hospitalar: <i>Drogas Antineoplásicas no Ambiente Aquático</i>	44
3.5. Resíduos de Antineoplásicos: <i>Contaminação Ocupacional e Ambiental</i>	46

4. TRATAMENTO DE EFLUENTES E PROCESSO ANAERÓBIO	49
4.1. Tratamento de Efluentes.....	49
4.2. Biodegradação Anaeróbia	50
4.3. Fatores que Interferem na Biodegradabilidade Anaeróbia.....	52
5. FERRAMENTAS DE ANÁLISE	55
5.1. Testes de Atividade Metanogênica Específica e Biodegradabilidade.....	55
5.2. Cromatografia para Amostras Ambientais – HPLC.....	56
5.3. Ensaio Ecotoxicológicos e Mutagênicos	59
6. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	67
6.1. Etapa Preliminar: <i>Delimitação da Abrangência do Estudo</i>	67
6.2. Etapa 1: <i>Levantamento de Dados</i>	68
6.3. Etapa 2: <i>Biodegradabilidade da Ciclofosfamida por Processo Anaeróbio</i>	68
6.4. Etapa 3: <i>Avaliação Cromatográfica</i>	75
6.5. Etapa 4: <i>Teste de Toxicidade e Mutagenicidade</i>	79
7. RESULTADOS E DISCUSSÕES	86
7.1. Etapa Preliminar: <i>Delimitação da Abrangência do Estudo</i>	86
7.2. Etapa 1: <i>Levantamento de Dados</i>	87
7.3. Etapa 2: <i>Biodegradabilidade da Ciclofosfamida por Processo Anaeróbio</i>	91
7.4. Etapa 3: <i>Avaliação Cromatográfica</i>	99
7.5. Etapa 4: <i>Teste de Toxicidade e Mutagenicidade</i>	108
8. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	116
9. REFERÊNCIAS	120
10. ANEXOS	135

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Plano de tese.....	19
FIGURA 2: Estrutura química da ciclofosfamida.....	29
FIGURA 3: Biotransformação da ciclofosfamida.....	31
FIGURA 4: Destino dos resíduos de fármacos administrados em diversos ambientes.....	38
FIGURA 5: Simulação do modelo de distribuição da ciclofosfamida em ambiente fechado.	45
FIGURA 6: Esquema das interações entre as várias fases num digestor anaeróbio	50
FIGURA 7: Seqüência de processos na digestão anaeróbia de macromoléculas complexas.....	51
FIGURA 8: Estufa DBO utilizada para armazenar o lodo anaeróbio a 35°C.....	69
FIGURA 9: Sistema utilizado para nos teste de AME e Biodegradabilidade.....	71
FIGURA 10: Amostra de efluente dos digestores (<i>amostra 1-5</i>).....	80
FIGURA 11: Esquema do teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	81
FIGURA 12: Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> realizado no LABTOX	81
FIGURA 13: Esquema do teste de toxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i>	83
FIGURA 14: A e B - Coleta de peixes <i>Oreochromis sp</i> no LAPAD/AQI/UFSC	83
FIGURA 15: A) Coleta de sangue para o Teste de Micronúcleo e B) Preparação da lâmina.	84
FIGURA 16: Teste de Micronúcleo -Aquários controle e <i>Ciclo 1, Ciclo 2, e Ciclo 3</i>	85
FIGURA 17: Teste de Micronúcleo realizado no LABTOX.	85
FIGURA 18: Localização geográfica dos prestadores de serviço oncológico em Santa Catarina.	86
FIGURA 19: Localização dos Estabelecimentos de Saúde (+) utilizados nesta pesquisa.	88
FIGURA 20: Cromatogramas dos digestores <i>antes do tratamento</i> , no tempo de retenção característico da CF.....	103
FIGURA 21: Cromatogramas dos digestores <i>após o tratamento</i> , no tempo de retenção característico da CF.....	104
FIGURA 22: A) Hemócitos Normais e B) Hemócitos micronucleados (HMN)	113

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Número de atendimentos oncológicos realizados no CEPON de SC.....	27
GRÁFICO 2: Representação cromatográfica da ciclofosfamida (HPLC).....	57
GRÁFICO 3: Volume de metano produzido em CNTP em relação ao tempo (horas).....	93
GRÁFICO 4: Produção diária de biogás nos digestores em função do tempo de teste (dias) - 1 ^o bateria.....	95
GRÁFICO 5: Produção acumulada de biogás nos digestores em função do tempo do teste (dias)- 1 ^o bateria.....	95
GRÁFICO 6: Variação da DQO solúvel <i>antes e após o tratamento</i> anaeróbio – 1 ^o bateria.....	96
GRÁFICO 7: Produção diária de biogás nos digestores em função do tempo do teste (dias) - 2 ^o bateria.....	97
GRÁFICO 8: Produção acumulada de biogás nos digestores em função do tempo do teste (dias) - 2 ^o bateria.....	97
GRÁFICO 9: Concentração de DQO solúvel <i>antes e após o tratamento</i> anaeróbio – 2 ^o bateria.....	98
GRÁFICO 10: Variação da DQO solúvel <i>antes e após o tratamento</i> anaeróbio –1 ^o e 2 ^o bateria.....	98
GRÁFICO 11: Curva de calibração externa da ciclofosfamida – HPLC-UV.....	100
GRÁFICO 12: Quantificação da CF (mg.L ⁻¹) nos digestores <i>antes e após</i> o tratamento anaeróbio.....	101
GRÁFICO 13: Cromatograma do padrão CF (vermelho) e do efluente do digestor <i>amostra 5</i> (verde).....	105
GRÁFICO 14: Espectro de massa CG-MS do pico A.....	106
GRÁFICO 15: Espectro de massa do pico B.....	106
GRÁFICO 16: CE ₅₀ 48h dos digestores para o teste de toxicidade aguda (<i>antes e após-tratamento</i>).....	109
GRÁFICO 17: Porcentagem de remoção de toxicidade aguda obtida nos efluentes <i>após-tratamento</i>	110
GRÁFICO 18: Variação da pH do lodo anaeróbio ao longo do tempo.....	136
GRÁFICO 19: Variação da DQO (g/Kg) do lodo anaeróbio ao longo do tempo.....	136

LISTA DE QUADRO E TABELAS

QUADRO 1: Classificação de alguns fármacos antineoplásicos segundo a IARC (2001)	28
TABELA 1: Trabalhos acadêmicos produzidos no Brasil entre 1993 e 2006 (fonte: CAPES).....	18
TABELA 2: Estimativa do número de casos novos de câncer segundo localização primária.....	26
TABELA 3: Metabolização e excreção de fármacos antineoplásicos.....	47
TABELA 4: Composição das Soluções Estoques	70
TABELA 5: Composição dos digestores anaeróbios (FRASCO I) - AME	72
TABELA 6: Composição dos digestores anaeróbios (FRASCO I) - 1ª bateria	73
TABELA 7: Composição dos digestores anaeróbios (FRASCO I) - 2ª bateria	74
TABELA 8: Estabelecimentos de Saúde envolvidos no tratamento do câncer em SC, por região.	86
TABELA 9: Quantificação dos antineoplásicos mais prescritos nas Clínicas de Florianópolis (2002)	89
TABELA 10:Quantificação dos antineoplásicos mais prescritos nos Hospitais em Florianópolis (2002)	89
TABELA 11: Antineoplásicos mais prescritos nos Estabelecimentos de Saúde pesquisados (2002)	90
TABELA 12: Caracterização do inóculo (lodo)	91
TABELA 13: Resultados do teste de AME para o grupo (ac. orgânicos)	92
TABELA 14: Produção acumulada de metano (mL) - 1ª bateria	94
TABELA 15: Eficiência de remoção DQO após tratamento anaeróbio (1ª bateria).....	95
TABELA 16: Produção acumulada de metano (mL) - 2ª bateria	97
TABELA 17: Eficiência de remoção DQO após tratamento anaeróbio (2ª bateria).....	98
TABELA 18: Dados da curva de calibração externa da ciclofosfamida – HPLC-UV	99
TABELA 19: Concentração de CF (mg.L ⁻¹) das amostra dos digestores, antes e após-tratamento anaeróbio.	101
TABELA 20: Resultados do teste de toxicidade aguda (antes e após o tratamento).	108
TABELA 21: Porcentagem de remoção de toxicidade aguda obtida nos digestores em função do tratamento	110
TABELA 22: Resultados do teste de mutagenicidade em amostra de água contendo CF	113
TABELA 23: Resultados do teste de mutagenicidade do efluente antes do tratamento anaeróbio.....	115
TABELA 24: Dados brutos do Teste de Biodegradabilidade - 1ª bateria	137
TABELA 25: Dados brutos do Teste de Biodegradabilidade - 2ª bateria	138
TABELA 26: N° de organismos imóveis, pH e a CE ₅₀ % 48 hs das amostras de efluentes antes-tratamento	155
TABELA 27: N° de organismos imóveis, pH e a CE ₅₀ % 48 hs das amostras de efluentes após-tratamento	155
TABELA 28: N° de organismos imóveis, pH e a CE ₅₀ % 48 hs das amostras de lodo e sol. de ácidos orgânicos	155

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN/DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ANVISA	Agencia nacional de Vigilância Sanitária
ARN/RNA	Ácido Ribonucléico
CAS	Chemical Abstract Service
CEE	Comunidade Econômica Européia
CEPON	Centro de Pesquisas Oncológicas
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CF	Ciclofosfamida
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPI	Comissão Parlamentar de Inquérito
EIAS	Estudos de Impactos Ambientais
EMIC	Environmental Mutagen Information Center
EPA	Agência de Proteção Ambiental
EPC	Equipamento de Proteção Coletivo
EPI	Equipamento de Proteção Individual
ETE	Estações de Tratamento de Esgotos
FATMA	Fundação do Meio Ambiente
FDA	Food and Drug Administration
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FUNASA	Fundação Nacional Saúde
HPLC/CLEA	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC	International Agency for Reserach on Câncer
ICPEMC	International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPCS	Programa Internacional para Segurança Química
LAI	Licença Ambiental de Instalação
LAO	Licença Ambiental de Operação
LAP	Licença Ambiental Prévia
LPS	Permeabilidade da Membrana Lipopolissacarídea
MS	Ministério da Saúde
MNs	Micronúcleo
NIST	National Institute of Standards and Technology

OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômicos
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEC	Projeção de Concentração Ambiental
PFM	Potencial de Formação Mutagênica
PM	Peso Molecular
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RCBP	Registros de Câncer de Base Populacional
RIMAS	Relatórios de Impactos Ambientais
RSS	Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde
SBR	Contadores Biológicos Rotatórios
SEM	Environmental Mutagen Society
SIM	Sistema de informações sobre Mortalidade
SISNAMA	Sistema Nacional do Meio Ambiente
SNC	Sistema Nervoso Central
USEPA	United State Environmental Protection Agency
UICC	International Union Against Cancer
USGS	Union State Geological Survey
WHO	World Health Organization

RESUMO

BARRETO, Patrícia Sobierajski. **BIODEGRADABILIDADE DO ANTINEOPLÁSICO CICLOFOSFAMIDA POR PROCESSO ANAERÓBIO**. Doutoranda em Engenharia Ambiental – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

A ciclofosfamida (CF) é um antineoplásico derivado da mostarda nitrogenada, utilizada no tratamento de vários tipos de câncer. Esse fármaco é incorporado ao meio ambiente, principalmente por excreção urinária de pacientes em tratamento antineoplásico. A CF apresenta uma baixa biodegradabilidade em estações de tratamento de esgoto que operam com sistema aeróbio (KÜMMERER, 2001), indicando que a mesma pode retornar aos corpos d'água. Esse antineoplásico foi selecionado para realização deste estudo por ser amplamente utilizado em estabelecimentos de saúde dedicados ao tratamento de câncer. Este trabalho tem como objetivo estabelecer o grau de biodegradabilidade desse fármaco, verificando também a sua interferência sobre o processo anaeróbio. O teste de biodegradabilidade foi realizado em escala laboratorial. A efetividade do processo de biodegradação da CF foi avaliada através de medição de biogás, análises cromatográficas e toxicológicas utilizando amostras dos efluentes *antes e após o tratamento*. Os resultados obtidos mostraram que a taxa de remoção de CF variou entre 75,00 a 98,17 %, não sendo detectados metabólitos da degradação da CF. A produção de biogás entre as amostras ocorreu de forma análoga, indicando que a CF não interferiu negativamente na atividade dos microrganismos anaeróbios, essenciais para o sistema. Já, nos ensaios toxicológicos, as amostras de *após o tratamento* apresentaram uma redução da toxicidade de até 77,5 % em relação às amostras *antes do tratamento*. No entanto, os valores de CE_{50} 48h encontrados nas amostras indicam que elas ainda possuem uma alta toxicidade, mesmo após o processo de tratamento anaeróbio.

Palavras chave: ciclofosfamida, biodegradação, tratamento anaeróbio.

ABSTRACT

BARRETO, Patrícia Sobierajski. **BIODEGRADABILITY OF ANTINEOPLASIC CYCLOPHOSPHAMIDE THROUGH ANAEROBIC PROCESS.** Doctor Student in Environmental Engineering – Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

The cyclophosphamide (CF) is an antineoplastic derivate from the hydrogenated mustard, used in various type of cancer treatment. This drug is integrated into the environment mainly through the urine from patients under cancer treatment. It presents a low biodegradability in wastewater treatment plants operated through aerobic system (KÜMMERER, 2001), indicating that the same is able to return to the water bodies. The CF was selected for the achievement of this study due to its extended use in the cancer health establishments. The objective of this work is to assess its biodegradability degree as well as to verify its possible interference on the anaerobic process. The biodegradability test was performed on a laboratorial scale. The CF biodegradation efficiency was determined by measuring the produced biogas and through chromatographic and toxicology analysis on effluent samples before and after the treatment. The obtained results showed that the CF removal rate, for different samples, varied between 75,00 and 98.17%, sub products of CF degradation were not detected. The biogas production between tested samples occurred in a similar form, indicating that the CF does not interfere with the activity of the anaerobic microorganisms, essentials for the system. On the other hand in the toxicological tests, the samples *after the treatment* exhibited a toxicity decrease of 77.5% related to the samples of *before the treatment*, however, the obtained values of CE₅₀ 48h in the effluents still prove its high toxicity of all the samples, even after the anaerobic treatment.

Keywords: cyclophosphamide, biodegradation, anaerobic treatment.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os fármacos antineoplásicos são desenvolvidos para serem persistentes, ou seja, devem manter suas características químicas durante o tempo necessário para servir ao propósito terapêutico. O crescente aumento do número de casos de câncer faz com que tais substâncias sejam intensamente utilizadas, tanto em ambientes hospitalares, como em consultórios médicos e residências. A partir desse uso intenso, as estações de tratamento (quando elas existem) vêm recebendo efluentes com características potencialmente perigosas ao meio ambiente. Assim, este estudo pretende avaliar, sob condições anaeróbias, a biodegradabilidade do antineoplásico ciclofosfamida (CF), um dos mais utilizados no combate às neoplasias malignas.

Este trabalho se insere nas pesquisas no campo dos resíduos de serviços de saúde e tratamento de efluentes líquidos, desenvolvidas no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC (Linha de pesquisa Resíduos Sólidos Urbanos, Industriais e Agrícolas do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental). Os trabalhos que o antecedem iniciaram-se em 1996, pelo diagnóstico da produção de resíduos infecciosos no Hospital Universitário (SOARES, 1997). Tal trabalho foi seguido pela pesquisa de SILVA (2000), sobre a composição gravimétrica de um “resíduo sólido hospitalar tipo” e pela pesquisa fomentada pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), que avaliou o comportamento de microrganismos ao longo do tempo na massa de resíduos infecciosos e no seu percolado (BARRELLA, 2002). Ainda na linha de resíduos de infecciosos, foi desenvolvido um estudo que avaliou diversos procedimentos de desinfecção de resíduos (REBELATTO, 2006). Na linha de resíduos químicos, SOUTO (2004) estudou a influência da ciclofosfamida sobre as bactérias presentes na estação de tratamento de esgoto de Florianópolis e NETO (2004) avaliou a influência da ciclofosfamida em um meio aquático simulado. Outras pesquisas, relacionadas com digestão anaeróbica e biogás (BELLI FILHO et al, 2002; PINTO, 2006), realizadas neste Departamento e subsidiadas pelo Programa de Pesquisa em Saneamento Básico (PROSAB) também cooperaram para realização deste trabalho.

Desta forma, a pesquisa em análise visa contribuir com conhecimentos específicos em resíduos químicos, pertencentes à Classe B, segundo a resolução CONAMA Nº 358/2005.

1.1. Importância do Trabalho

O trabalho procura atender os critérios que caracterizam uma tese: *contribuição científica, ineditismo e não trivialidade*.

Quanto à *contribuição científica*, a importância de avaliar a biodegradação da ciclofosfamida por processo anaeróbio está no fato de que as estações de tratamento de esgoto (ETEs), em sua maioria

por processos aeróbios, não têm sido eficientes para a remoção de compostos químicos presentes em diversos efluentes lançados em sistemas públicos (SAPIA e MORITA, 2003).

A resolução da ANVISA RDC nº. 306/2004, que regulamenta a gestão de resíduos de serviços de saúde, estabelece que os efluentes gerados por hospitais podem ser encaminhados para as ETEs. Na ausência dessas, a resolução da ANVISA RDC nº. 307/2002, que dispõe sobre o Regulamento Técnico para Projetos Físicos de Estabelecimentos Assistenciais de Saúde, adota como tratamento prévio e disposição final dos efluentes líquidos, o sistema de tanques sépticos normatizados pela NBR 13.969 da ABNT de 1997. No entanto, a presença de resíduos químicos pode comprometer a taxa de digestão anaeróbia nos tanques sépticos. No ambiente anaeróbio, a degradação microbiana é geralmente lenta e nem sempre resulta na mineralização completa das substâncias químicas. Em certos casos, a biodegradação pode ser um processo tão lento que leva a bioacumulação dos xenobióticos, que podem interferir negativamente na atividade dos microrganismos anaeróbios (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Quanto ao *ineditismo*, justifica-se a realização deste trabalho devido à constatação de que poucas pesquisas estão voltadas para os efluentes hospitalares e a presença de antineoplásicos residuais.

Os hospitais são reconhecidos como locais de grande concentração de pacientes e com potencial elevado de geração de efluentes contaminados. As suas emissões são geralmente do tipo sólido, líquido e gasoso, havendo maior ênfase sobre os resíduos sólidos (BRASIL, 2002).

No Brasil, os órgãos controladores das emissões têm grande preocupação com a geração e destinação dos resíduos sólidos, havendo para esses uma extensa produção bibliográfica e também na forma de legislação.

Para os resíduos líquidos, a legislação é genérica e mais preocupada com os efluentes industriais e, ultimamente, com o saneamento básico, ocorrendo o mesmo tratamento destinado aos resíduos e emissões industriais, entretanto alguns trabalhos de avaliação, caracterização e destinação dos efluentes líquidos têm sido encontrados na literatura brasileira (ORTOLAN et al, 2000; SILVEIRA, 2004). As pesquisas que destacam efluentes hospitalares estão voltadas principalmente para o estudo de dois grupos de fármacos residuais: os *antibióticos*, devido ao seu potencial de desenvolvimento de bactérias resistentes no meio ambiente e por serem utilizados em grandes quantidades tanto na medicina humana, quanto na veterinária (ORTOLAN, 1999), e o outro grupo de destaque é o dos *estrogênios*, sendo que sua importância reside no potencial de afetar o sistema endócrino (hormonal) tanto em organismos humanos quanto em animais (ARAUJO, 2006).

Informações obtidas junto ao Banco de Teses da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), no período compreendido entre 1993 e 2006 (CAPES, 2007) mostrou que as dissertações e teses elaboradas em vários Estados e Instituições de Ensino Superior (IES) no Brasil abordaram os seguintes temas relacionados aos Resíduos de Serviços de Saúde (RSS): *Gestão*

hospitalar (OROFINO, 1996; MACEDO, 2002; ARLEO, 2004; BURG, 2006); *Gerenciamento* (CASTRO, 1995; MAMANI, 1997; OLIVEIRA, 2002; CARVALHO, 2003; SALOMÃO, 2003; SILVA, 2004; FARIAS, 2005; HADDAD, 2006); *Legislação* (VIANA, 2004; BARBOSA, 2004; LEITE, 2006); *Caracterização* (MATTOSO, 1996; SILVA, 2000; BRANDT, 2002); *Tratamento e destinação final* (MUNÕZ, 2002; MACHADO, 2002; SPINA, 2003; SILVEIRA, 2004; REBELATTO, 2006); *Risco ocupacional* (MARTINS, 2003; INTIMA, 2004); *Resíduos radioativos* (CASTRO, 2005; MATTOS, 2005); *Efluente líquido* (ALVES, 2006; VASCONCELLOS, 2006) e, *Contaminação ambiental* (SIMONELLI, 2003; IMOLENE, 2003; SOUZA, 2005).

A TAB. 1 apresenta o número de dissertações e teses produzidas no Brasil por regiões entre 1993 e 2006 voltadas aos resíduos de serviços de saúde e efluente hospitalar.

TABELA 1: Trabalhos acadêmicos produzidos no Brasil entre 1993 e 2006 (fonte: CAPES)

Região	Instituição de Ensino	Dissertação	Tese
<i>Centro-oeste</i>	UNB/ UFMS	04	--
<i>Nordeste</i>	UFC/ UESC/ UFBA/ UFPB/ UPE	16	--
<i>Norte</i>	UEA	01	--
<i>Sudeste</i>	UFSCar/ UNESP/ UFMG/ UNIFRAN/ UNIFESP/ USP UNICAMP/ UNMEP/ UNISANTOS/ FGV/ FIOCRUZ	47	10
<i>Sul</i>	UFSC/ FURB/ UFRGS /UFMS/ UNIVALI/ UEM/ UFPR/ UTFPR/ PUC/ UNESC	28	06

Nota: PUC: Universidade Católica do Paraná; UNB: Universidade de Brasília; UFMS: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; UFC: Universidade Federal do Ceará; UESC: Universidade Estadual de Santa Cruz; UFBA: Universidade Federal da Bahia; UFPB: Universidade Federal da Paraíba; UPE: Universidade de Pernambuco; UEA: Universidade do Estado do Amazonas; USP: Universidade de São Paulo; UFSCar: Universidade Federal de São Carlos; UNESP: Universidade Estadual Paulista; UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais; UNMEP: Universidade Metodista de Piracicaba; UNISANTOS: Universidade Católica de Santos; UNIFRAN: Universidade de Franca; UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas; UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo; UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina; UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; UEM: Universidade Estadual de Maringá; UFPR: Universidade Federal do Paraná; UTFPR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná; FURB: Universidade Regional de Blumenau e UNIVALI: Universidade do Vale do Itajaí; UNIDERP: Universidade para o desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal; FEEVALE: Federação de Estabelecimento de Ensino Superior em Novo Hamburgo; FGV: Fundação Getúlio Vargas; UNESC: Universidade do Extremo Sul Catarinense; FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz.

Considerando o âmbito internacional, nos últimos anos tem aumentado as pesquisas relativas à presença de fármacos no meio ambiente (fontes, ocorrências, destino, efeitos e riscos associados). Em particular, pesquisas na Europa e América do Norte demonstraram que estas emissões não podem ser desprezadas. Relativo ao assunto deste trabalho (salvo juízo recente), não foram encontradas pesquisas que envolvam a biodegradação do antineoplásico ciclofosfamida por processo anaeróbio.

Quanto à *não trivialidade*, o trabalho elaborou um procedimento metodológico contendo um conjunto de ensaios para avaliar a capacidade de uma biomassa anaeróbia ativa de degradar o antineoplásico ciclofosfamida. Vale ressaltar que, além da avaliação da biodegradabilidade por medição de biogás, as amostras foram avaliadas por análises cromatográficas (HPLC e CG) com intuito de quantificar a concentração de ciclofosfamida biodegradada e seus metabólitos. Também,

foram realizadas análises toxicológicas do efluente (*antes e após o tratamento*) para determinar o grau de toxicidade das amostras.

1.2. Justificativa e Estruturação da Tese

Os capítulos da tese estão estruturados de acordo com a FIG. 1. O **Capítulo 1** descreve o problema abordado e apresenta os objetivos perseguidos, bem como as considerações utilizadas para tal fim. Eles estão organizados visando responder quatro questões para justificar a realização deste trabalho:

- (1) *Qual o antineoplásico mais utilizado no tratamento do câncer em Florianópolis (SC)?*
- (2) *A ciclofosfamida pode ser degradada por processo anaeróbico?*
- (3) *Como verificar a eficácia do tratamento anaeróbico na degradação da ciclofosfamida?*
- (4) *Como avaliar a qualidade do efluente gerado pelo tratamento anaeróbico?*

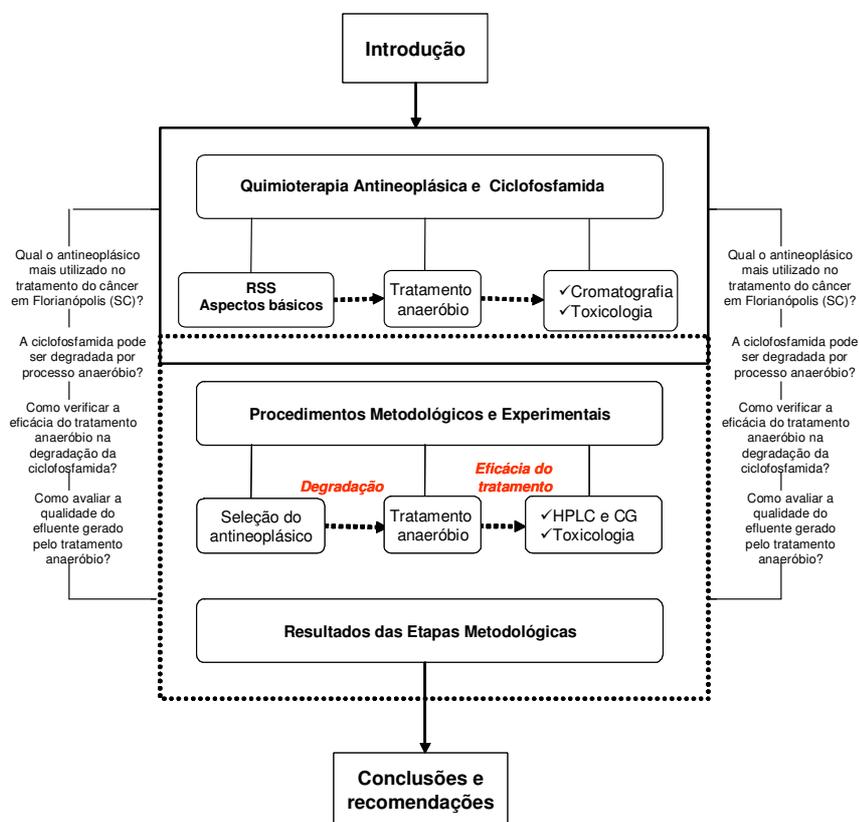


FIGURA 1: Plano de tese

Neste contexto apresentado na FIG. 1 deve-se fazer as seguintes indagações:

1. Qual o antineoplásico mais utilizado para o tratamento do câncer em Florianópolis (SC)?

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, principalmente a partir do século passado, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial. Segundo o Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON) de Santa Catarina, no ano de 2004 foram registrados 20.469 tratamentos quimioterápicos no Estado. O câncer representou a segunda causa de morte em SC entre 1996 e 2003, com 15 a 20 % de óbitos (SERRANO, 2006).

A coleta de informações junto aos estabelecimentos de saúde (públicos e particulares, envolvidos diretamente com quimioterapia antineoplásica) atuantes no estado de Santa Catarina e na cidade de Florianópolis/SC, permitiu determinar qual é o antineoplásico mais utilizado em Florianópolis.

2. Qual é o efeito da ciclofosfamida sobre o processo anaeróbio?

STEGER-HARTMANN et al (1997) estudaram a degradação biológica da CF em uma estação de tratamento de esgoto aeróbio. As conclusões obtidas foram que esse fármaco possui uma degradação muito baixa durante sua passagem pela ETE, indicando que o mesmo pode retornar aos corpos hídricos. Tais resultados concordam com o relatado pela literatura sobre a baixa biodegradabilidade da ciclofosfamida por processo aeróbio (KÜMMERER, 2004).

Dado que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Resolução RDC ANVISA nº 306/2004-item 1.1) recomenda que na ausência de ETes seja utilizado um sistema de tanques sépticos (sistema anaeróbio), é importante verificar o que acontece em um sistema anaeróbio na presença de CF. Assim, a realização de testes de biodegradabilidade anaeróbia, em escala laboratorial, permitirá avaliar a capacidade do processo de tratamento anaeróbio na degradação da CF e a interferência da mesma no referido processo.

3. Como verificar a eficácia do tratamento anaeróbio na biodegradação da ciclofosfamida?

Para a detecção de fármacos (qualitativa e quantitativamente), diferentes métodos analíticos são reportados na literatura (TURCI et al, 2002; STUMPF et al, 1999). Tais métodos são principalmente utilizados para matrizes biológicas (por exemplo, sangue e urina); no entanto, através

de alterações, esses métodos são também adequados para o estudo de amostras ambientais. Em HANSEL et al (1997) é apresentada uma metodologia analítica baseada na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para realizar a detecção de CF residual. Já, TERNES (2001) utiliza a cromatografia gasosa (CG-MS) para detectar a CF e seus metabólitos em amostras de efluentes de uma ETE simulada. Neste trabalho de tese foram adaptadas as metodologias propostas por HANSEL e TERNES para realizar a quantificação da CF e seus metabólitos em amostras *antes* e *após* tratamento anaeróbio.

4. Como avaliar a qualidade do efluente gerado pelo tratamento anaeróbio?

A qualidade de um efluente pode ser avaliada com a realização de testes de toxicidade em organismos aquáticos (CETESB, 1990). O uso de testes de toxicidade na análise de amostras ambientais é bastante abrangente, sua importância aumenta na mesma proporção em que cresce a complexibilidade das transformações químicas que ocorrem no meio ambiente. Por exemplo, GOLDSTEIN e ZAGATTO (1991) consideram que dentre os organismos recomendados para testes, a *Daphnia magna* é a mais adequada para avaliação de toxicidade, por ser sensível a diferentes grupos de agentes químicos além de sua fácil manutenção em laboratório.

Uma outra forma de avaliação é o teste do micronúcleo, utilizado para determinar os efeitos a partir de compostos mutagênicos presentes em efluentes líquidos. Esses efeitos resultam em alterações bioquímicas e fisiológicas no sangue dos peixes, indicando seu estado fisiológico. Os peixes são um instrumento muito útil para monitoramento genotóxico aquático pela habilidade de metabolizar ou bioacumular xenobióticos (FERRARO, 2003).

Ambas as ferramentas mencionadas são utilizadas neste trabalho.

Para responder estes questionamentos, o **Capítulo 2** dá uma ênfase particular para os elementos teóricos e científicos relacionados ao câncer e seu tratamento pelos antineoplásicos, dentre os quais foi selecionado o fármaco ciclofosfamida. Tal fármaco, cuja seleção é justificada na Seção de procedimentos metodológicos, foi adotado como substância de referência para os ensaios. No **Capítulo 3** são abordados os aspectos básicos e legais que envolvem o tratamento de resíduos de serviços de saúde e a presença de fármacos residuais no meio ambiente. Já no **Capítulo 4**, são expostos os aspectos gerais do processo de digestão anaeróbia e os fatores que interferem na biodegradabilidade. No **Capítulo 5** foi ressaltada a importância das análises cromatográficas e toxicológicas como ferramentas de análise para avaliar a eficiência dos sistemas de tratamento e a

qualidade do efluente gerado. O **Capítulo 6** descreve os procedimentos metodológicos para a consecução dos objetivos, sendo dividido em cinco etapas descritas brevemente a seguir.

Etapa preliminar: *Delimitação da Abrangência do Estudo*

Este estudo abarca os estabelecimentos de saúde públicos e particulares, envolvidos diretamente com quimioterapia antineoplásica, atuantes na cidade de Florianópolis/SC. O estudo foi centralizado no fármaco antineoplásico mais utilizado nos tratamentos de câncer em Florianópolis.

Etapa 1: *Levantamento de Dados*

A etapa 1 visou o levantamento de informações sobre os estabelecimentos de saúde que prestam tratamento antineoplásico em Florianópolis. O principal indicador para esta etapa foi a identificação dos antineoplásicos mais utilizados e sua quantificação mensal/anual. Assim, a partir da análise desses dados selecionou-se o antineoplásico avaliado no presente estudo.

Etapa 2: *Biodegradabilidade da Ciclofosfamida por processo anaeróbio*

Nesta etapa verificou-se a possibilidade de interferência negativa do agente em estudo sobre o processo biológico anaeróbio de tratamento. Para tal, foram realizados testes laboratoriais com a finalidade de *avaliar a atividade metanogênica específica* (Teste de AME), *avaliar a biodegradabilidade da ciclofosfamida* e *avaliar a interferência da ciclofosfamida no processo de biodegradação anaeróbia*.

Etapa 3: *Avaliação Cromatográfica*

Nesta etapa, foi identificada e quantificada a concentração de ciclofosfamida em amostras do efluente *antes e após o tratamento* anaeróbio, e os possíveis metabólitos gerados da degradação da CF em amostras *após o tratamento* (resultantes da etapa 2).

Etapa 4: *Teste de toxicidade e mutagenicidade*

Esta etapa consistiu da avaliação dos efeitos agudos causados na espécie-teste (*Daphnia magna*) e o potencial mutagênico “Ensaio de Micronúcleo” em peixes da espécie *geophagus brasilienses*, em amostras de água contendo CF.

No **Capítulo 7** são apresentados os resultados e discussões encontradas em cada uma das etapas metodológicas acima citadas. E, finalmente, no **Capítulo 8** são apresentadas às conclusões a partir dos resultados expostos e também, sugestões de pesquisa e as considerações gerais.

1.3. Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar o comportamento do antineoplásico ciclofosfamida no processo de biodegradação anaeróbia

Objetivos Específicos

1. Estimar o potencial de biodegradabilidade da ciclofosfamida e sua interferência no processo anaeróbio;
2. Investigar a eficiência do processo anaeróbio através da quantificação da concentração de ciclofosfamida e seus metabólitos por análises cromatográficas;
3. Avaliar o potencial toxicológico das amostras do efluente *antes e após o tratamento*;
4. Avaliar o potencial mutagênico da CF, por meio do ensaio de Micronúcleo.

1.4. Hipóteses e Premissas

Hipótese básica

Os resíduos do antineoplásico ciclofosfamida, oriundos de tratamentos de câncer, podem ser degradados por processos anaeróbios de tratamento de efluentes?

Hipóteses Secundárias

1. A ciclofosfamida interfere na eficiência dos processos anaeróbios de tratamento de efluentes?
2. A biodegradação anaeróbia da ciclofosfamida implica na redução da toxicidade do efluente?

Premissas

1. Drogas com efeitos tóxicos (mutagênicos, genotóxicos e/ou carcinogênicos) podem causar dano em qualquer nível de exposição, ou seja, não há tolerância nem estabelecimento de dose referência (AZEVEDO E CHASIN, 2003).
2. A detecção de produtos farmacêuticos no efluente, água superficial e na água potável, indica o potencial das substâncias químicas (estáveis e solúveis) em atingir o meio ambiente (WEBB et al, 2003).

2. QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA E CICLOFOSFAMIDA

2.1. Epidemiologia do Câncer

“A doença denotada pela palavra câncer é atribuída a Hipócrates, por analogia com o caranguejo, a mover-se lentamente em todas as direções. O câncer é entendido como uma doença em região localizada, de onde se espalha para o resto do organismo, até então sadio, comendo-o por derradeiro” (LEÃO, 1984).

O termo “câncer” é dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação do câncer (acúmulo de células cancerosas), ou neoplasias malignas.

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, principalmente a partir do século passado, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo, mais de 7 milhões de pessoas morrem anualmente da doença. Como a expectativa de vida no planeta tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer, estimada em 2002 em 11 milhões de casos novos, alcançará mais de 15 milhões, em 2020. Esta previsão, feita em 2005, é da International Union Against Cancer (UICC).

O Brasil continua a apresentar um quadro sanitário em que se combinam doenças ligadas à pobreza, típicas dos países em desenvolvimento, e doenças crônico-degenerativas, características dos países mais afluentes. Essa situação reflete, inquestionavelmente, as contradições do processo de desenvolvimento do País. Dados do INCA (2006) mostram que o envelhecimento da população indica o aumento da expectativa de vida no Brasil e, com isso, a maior incidência das doenças, dentre elas o câncer, que se constitui na segunda causa de morte por doença, ficando atrás, apenas, das doenças do aparelho circulatório. Em 2004, as neoplasias foram responsáveis por 141 mil óbitos, ou seja, 13,7% de todos os óbitos registrados.

A implementação das ações nacionais voltadas para a prevenção e controle do câncer depende diretamente das atividades relacionadas à vigilância, que são realizadas com base nas informações obtidas dos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), supervisionados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) e do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), do Ministério da Saúde (MS), centralizado nacionalmente pela Secretaria de Vigilância à Saúde (SVS/MS). A partir

destas informações, desde 1995, o INCA estima e publica anualmente a incidência de câncer, que tem sido um recurso indispensável para o planejamento destas ações.

Em 2005, o Sistema Único de Saúde (SUS) registrou 423 mil internações por neoplasias malignas, além de 1,6 milhão de consultas ambulatoriais em oncologia. Mensalmente, são tratados cerca de 128 mil pacientes em quimioterapia (INCA, 2006).

Os dados mais recentes do Ministério da Saúde, disponibilizados pelo INCA, estimaram para 2006 a ocorrência de 472.050 novos casos. No Estado de Santa Catarina, as estimativas foram de 18.870 novos casos e em Florianópolis, as estimativas da taxa de incidência são de 1260 casos novos por 100.000 habitantes, segundo localização primária (INCA, 2006).

A TAB. 2, resume a estimativa do número de casos novos de câncer, segundo localização primária para os homens e mulheres no Brasil, Santa Catarina e Florianópolis, nos anos de 2005 e 2006. Observa-se que entre os anos de 2005 e 2006 o aumento foi de quase 1%. Segundo o INCA, é necessário, contudo, destacar que as diferenças observadas nos valores estimados para 2006 podem representar apenas uma melhoria na qualidade das informações do SIM e dos RCBP. Por isso, extrapolações a partir das informações atuais devem ser feitas com cautela, particularmente quando se examinam séries temporais.

TABELA 2: Estimativa do número de casos novos de câncer segundo localização primária.

Região	Estimativa 2005		Estimativa 2006	
	<i>Homens</i>	<i>Mulheres</i>	<i>Homens</i>	<i>Mulheres</i>
<i>Florianópolis</i>	650	750	630	630
<i>Santa Catarina</i>	10.060	8.310	10.250	8.520
<i>Brasil</i>	229.650	237.830	234.570	237.480
Total de novos casos	467.440		472.050	

Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>

SERRANO (2006) ressalta que o número de casos novos de câncer de pessoas residentes em Florianópolis identificadas pelo RCBP foi superior à estimativa do INCA para esta capital em 2001. Foram encontrados em Florianópolis 1.253 casos novos ao longo do ano de 2000, enquanto o INCA estimou apenas 780. No ano de 2000 não foram calculadas estimativas para as capitais, mas tão somente para os estados.

O Centro de Pesquisas Oncológicas “Dr. Alfredo Daura Jorge” - CEPON é o serviço público de referência no tratamento oncológico em Santa Catarina e Centro de Referência da Organização Mundial de Saúde (OMS) para Medicina Paliativa no Brasil. De acordo com o disposto no Decreto Estadual nº 2.701, de 10/03/1998, que criou o Sistema Estadual de Oncologia, o CEPON é o órgão central do sistema de assistência na área do câncer em Santa Catarina. Suas funções são de controlar e

avaliar as atividades inerentes à oncologia e às pesquisas oncológicas no Estado, em consonância com a política estadual de saúde e normas federais pertinentes.

Segundo o CEPON de Santa Catarina, entre os anos de 2002 a 2005, os números apontaram para uma estabilização na evolução quantitativa na ordem de cerca de 10.000 atendimentos/ano. Já em 2006, o acréscimo de mais de 18.000 atendimentos/ano deveu-se à transferência do CEPON para o Complexo Oncológico, abertura de novos serviços e o aprimoramento dos sistemas de coleta de dados estatísticos (GRAF.1).

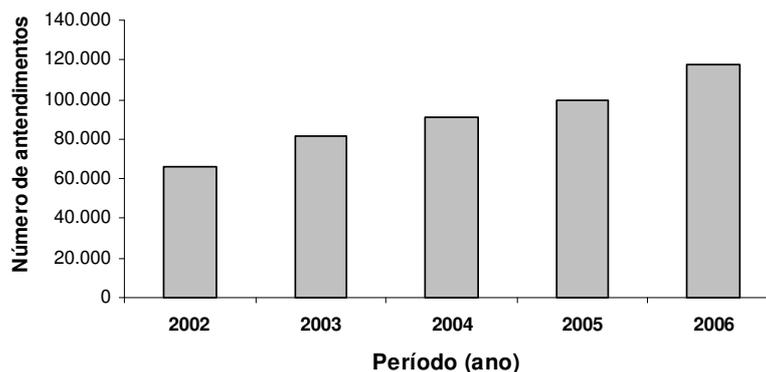


GRÁFICO 1: Número de atendimentos oncológicos realizados no CEPON de SC

Fonte: <http://fahece.org.br>. Acessado em agosto de 2007

2.2. Quimioterapia Antineoplásica

Os fármacos antineoplásicos ou citostáticos são quimioterápicos utilizados no tratamento de algumas patologias, dentre elas o câncer. Eles constituem uma categoria de fármacos cujo emprego está progressivamente aumentando, como causa do crescente número de casos diagnosticados de neoplasias. Sendo assim, consiste no uso de substâncias químicas, isoladas ou em combinação, objetivando destruir ou controlar o crescimento das células tumorais, podendo agir direta ou indiretamente sobre elas, afetando da menor forma possível a função das células normais do indivíduo. O tratamento do câncer compreende cada vez mais a quimioterapia combinada e, às vezes, associação com outros métodos de tratamentos como a radioterapia e cirurgia (MONTEIRO, 2001).

Quimicamente, o espectro das drogas antineoplásicas varia desde substâncias inorgânicas, como *carboplatina*, até compostos orgânicos como *ciclofosfamida* e proteínas como *hidroxiuréia* (ASTA MÉDICA ONCOLOGY, 2001). Muitos fármacos anticâncer são antiproliferativos, afetando também as células de divisão rápida. Eles são comumente tóxicos para inúmeras células normais do organismo. Entre os seus efeitos adversos: náuseas e vômitos, depressão da medula óssea, dificuldade de cicatrização, esterilidade e queda de cabelo (RANG et al, 2001).

O tratamento quimioterápico é totalmente contra-indicado em pacientes terminais, grávidas do primeiro trimestre, crianças abaixo de três meses ou pessoas com idade avançada, na presença de septicemia e coma (BONASSA, 2002).

Em 1981, a International Agency for Reserach on Câncer (IARC) classificou os fármacos antineoplásicos em quatro (4) grupos com relação à capacidade de produzir carcinogenicidade no homem: *Grupo 1 - carcinógenos para o ser humano; Grupo 2A - prováveis carcinógenos para o ser humano; Grupo 2B - possíveis carcinógenos para o ser humano e o Grupo 3 - não carcinógenos para o ser humano*. A IARC tem reconhecido haver evidências suficientes de carcinogenicidade para alguns fármacos, alguns exemplos são citados no QUAD. 1. Esta classificação foi revista em 2001. Quase todos os fármacos estudados por esta agência causaram danos ao embrião, bem como induziram a malformações fetais em animais de experimentação (MARTINS e DELLA ROSA, 2004). Convém salientar, que nem todos os antineoplásicos são substâncias dotadas de ação carcinogênica (ALESSIO et al, 1996).

QUADRO 1: Classificação de alguns fármacos antineoplásicos segundo a IARC (2001)

<i>GRUPO</i>	<i>FÁRMACO</i>
1 - carcinógenos para o ser humano	➤ ciclofosfamida
	➤ clorambucila
	➤ melfalano
2a - prováveis carcinógenos para o ser humano	➤ adriamicina
	➤ cisplatina
	➤ azacitidina
2b - possíveis carcinógenos para o ser humano	➤ dacarbazina
	➤ daunorrubicina
	➤ mitomicina c
3 - não carcinógenos para o ser humano	➤ ifosfamida
	➤ 5- fluorouracila
	➤ metotrexato

Fonte: MARTINS e DELLA ROSA, 2004.

2.3. Ciclofosfamida - CF

Propriedades físico-químicas

O antineoplásico ciclofosfamida (N,N-BIS(2-cloroetila)tetraidro-2H-1,3,2,-amina, 2-óxido monohidratado) é um composto cíclico derivado do agente alquilante mostarda nitrogenada e consiste de um anel fosforamida ligado a uma molécula bifuncional contendo dois grupos cloroetila responsáveis pela liberação dos grupamentos alquila. A FIG. 2, mostra a estrutura química da ciclofosfamida (C₇H₁₅CL₂N₂O₂P). A CF é um dos agentes alquilantes mais utilizados na clínica, está registrado no Chemical Abstract Service (CAS) n° 50-18-0 (CAS, 2003).

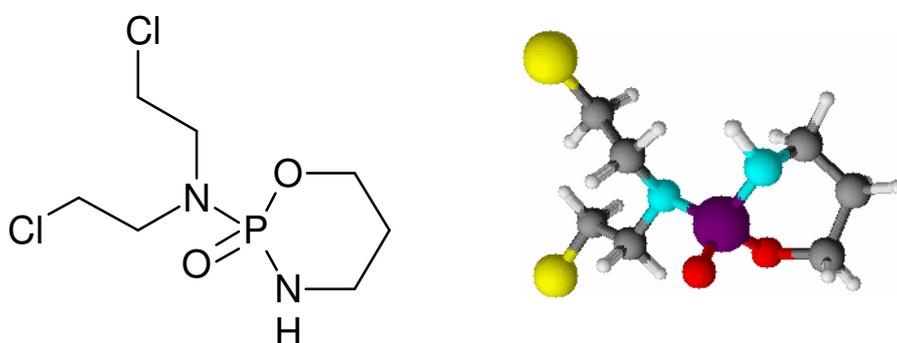


FIGURA 2: Estrutura química da ciclofosfamida.

A ciclofosfamida é um pó cristalino, fino, branco e inodoro com peso molecular (PM) de 279,10 g.mol⁻¹, apresenta temperatura de fusão de 49,9 – 53 °C e passa ao estado líquido perdendo a água de cristalização. É inflamável em temperatura acima de 110 °C, solúvel em água, sendo que a relativa solubilidade em meio aquoso implica em aumento no tempo de exposição (ANDERSON et al, 1995; MINOIA e PERBELLINI, 2000).

Usos, farmacocinética e toxicidade

A CF é indicada para o tratamento de vários tipos de câncer, dentre eles: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemias crônicas, adenocarcinoma de ovário, carcinoma de mama. A CF também tem sido usada no tratamento de doenças auto-imunes e imunopatias não específicas (por exemplo, granulomatose de Wegener), quando estas doenças se mostram resistentes aos tratamentos convencionais de primeira e segunda linha, e para prevenção da rejeição de transplantes. A CF pode ser recomendada para uso no tratamento de tumores não-malignos apenas quando os benefícios ao paciente forem superiores ao risco do tratamento com a mesma (BAXTER ONCOLOGY, 2005).

A CF também está sendo utilizada na medicina veterinária. Diversos protocolos para o seu uso em ovinos têm sido propostos, com diferentes propósitos e com doses entre 10 a 50 mg.kg⁻¹ (GORDON, 1982; PRASAD, 1986). GARCIA et al (2004) avaliaram o efeito de várias doses (10, 25 e 40 mg.kg⁻¹) como indutor de imunossupressão experimental em ovinos.

A posologia da CF varia para os adultos de 1 a 5 mg/kg/dia e a dose pediátrica de 2 a 8mg/kg/dia, com a frequência de 3 a 4 semanas. Estudos realizados com diversas quantidades têm demonstrado que a cinética deste fármaco é linear e não dose-dependente. A produção mundial estimada é de 1000 kg/ano é uma substância utilizada somente como medicamento, está disponível comercialmente na forma de pó monohidratado e anidro, em ampolas estéreis para administração injetável e em comprimidos (ANDERSON et al, 1995; MINOIA & PERBELLINI, 2000).

A CF pode ser administrada por via oral, endovenosa ou intraventralmente nas cavidades pleural e/ou peritoneal, sendo administrada na forma isolada ou em associação com outros fármacos antitumorais (IARC Monographs, 1987).

Sob a ótica farmacocinética, a CF é bem absorvida após administração oral, com biodisponibilidade maior que 75 %. A concentração plasmática máxima ocorre em torno de uma (1) hora depois de ter sido administrada. Diversos estudos têm evidenciado que a biodisponibilidade, isto é, a relação percentual entre a área sobre a curva da concentração plasmática de CF versus o tempo da administração oral e endovenosa, é de 75 a 80 %. A CF se liga, em cerca de 20 a 30 %, às proteínas plasmáticas e se distribui amplamente nos tecidos, podendo atravessar a barreira hematoencefálica e placentária (MATALON et al, 2004) e é encontrada no leite materno (BAUMANN e PREISS, 2001). O uso de CF em mulheres férteis é relacionado a uma redução da fertilidade por insuficiência ovariana, durante o primeiro trimestre de gestação é relacionado a múltiplas anomalias fetais e frequentemente acarreta abortamentos, o risco parece ser menor no segundo e terceiro trimestres. Outros perigos para o feto incluem reações adversas previstas em adultos. O aleitamento não é recomendado, porque a ciclofosfamida é excretada no leite e foi relacionada com neutropenia neonatal, supressão imune e carcinogênese (MATALON et al, 2004).

CONNOR et al (2000) identificaram a presença de CF na urina algumas horas após a aplicação de pequenas quantidades na pele. A presença de CF na urina, nas 18-24 horas após a exposição, indica que a absorção é lenta e ainda ocorre mesmo após o local de aplicação ter sido lavado. O pico plasmático dos produtos de biotransformação ativos é em torno de 3 a 6 horas, com meia-vida de eliminação de cerca de 9 horas (MINOIA & PERBELLINI, 2000).

A metabolização ocorre no fígado (FIG. 3) pelo sistema enzimático de função mista da oxidase dos microsossomos hepáticos para *4-hidroxíciclofosfamida*, que está em equilíbrio com a *aldofosfamida*. A *4-hidroxíciclofosfamida* pode ser metabolizada enzimaticamente para *4-cetociclofosfamida*. O metabólito *aldofosfamida* pode ser metabolizado enzimaticamente para *carboxifosfamida*, *mostarda fosforamida* e *acroleína* (RANG et al, 2001). Alguns estudos mostraram

que a *mostarda fosforamida* e a *acroleína* podem aumentar as propriedades citotóxicas da CF, sendo que ainda não se conhece qual é a atividade específica de cada metabólito (HUITEMA et al, 2000; SESSINK et al, 1993, 1994b).

A maior parte da dose é eliminada na forma de metabólitos, porém, de 5 % a 25 % da dose é excretada na urina, sob a forma inalterada. A excreção da CF e seus metabólitos ocorrem principalmente por via urinária, sendo que 36 % a 99 % da dose é eliminada em 24 horas (IARC Monographs, 1987). A concentração de CF nas fezes não é elevada, todavia, sua presença em grande quantidade na bile sugere que esta substância passa pelo ciclo enteroepático (MINOIA & PERBELLINI, 2000).

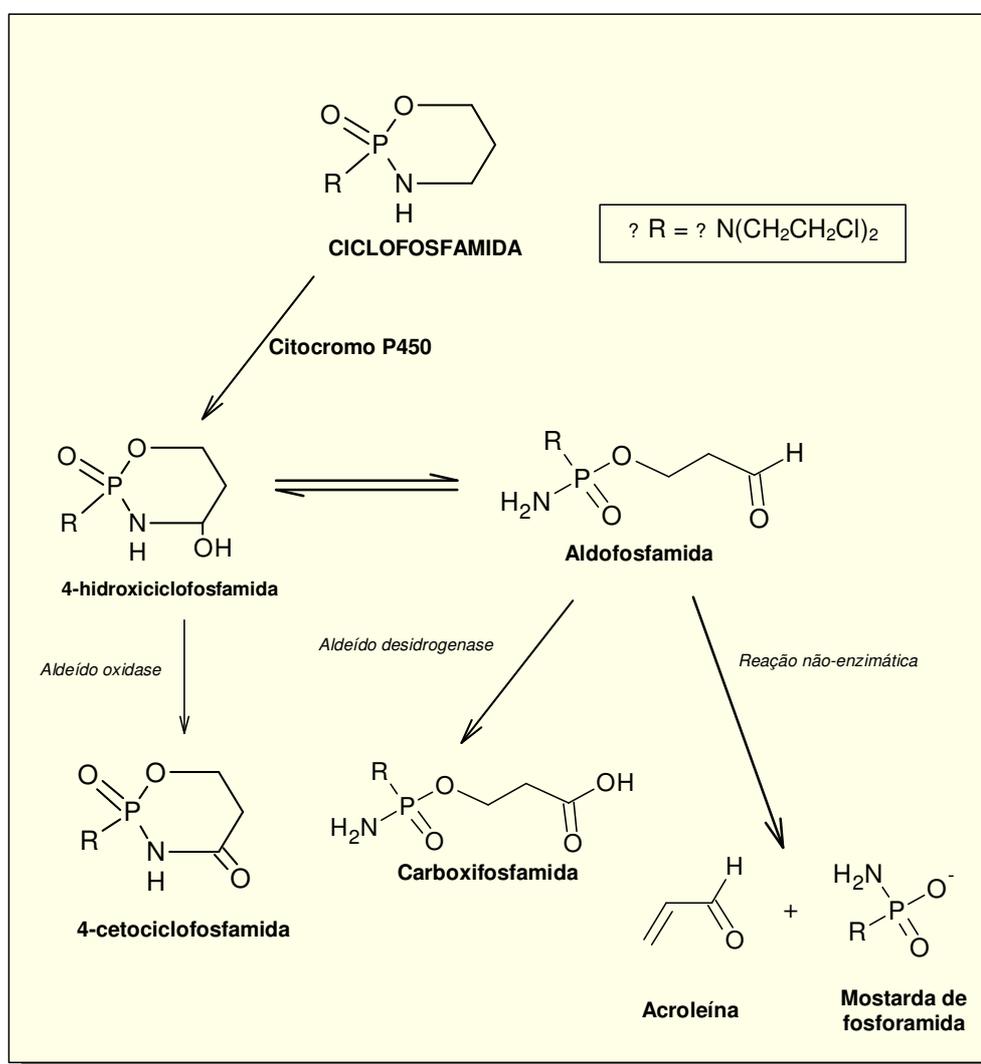


FIGURA 3: Biotransformação da ciclofosfamida.

Fonte: Martins, 2003

Durante a quimioterapia, em doses convencionais, a toxicidade limitante é a mielossupressão, que se manifesta através da leucopenia. Após a administração de dose única, o máximo de depressão medular ocorre após 1 a 2 semanas, com restabelecimento dos valores normais de glóbulos brancos no período de 3 a 4 semanas.

São indiscutíveis os efeitos benéficos da terapia antineoplásica. Todavia, as reações adversas são inevitáveis, principalmente, as devidas ao mecanismo de ação farmacológico, as incidências mais frequentes de tais reações são: febre, calafrios, dor de garganta, supressão gonadal (amenorréia), confusão, cansaço, debilidade, tosse, dispnéia, hemorragia ou hematomas não habituais, náuseas, vômitos e perda de peso (FERGUSON e PEARSON, 1996; McEVOY, 2002).

A CF não absorvida é eliminada pelos rins e armazenada na bexiga e, caso permaneça por muito tempo pode ocasionar uma cistite hemorrágica, nefrotoxicidade e necroses tubulares renais (IARC Monographs, 1987). Cerca de 20% dos pacientes tratados com ciclofosfamida apresentam cistite hemorrágica (principalmente crianças) o efeito é atribuído à irritação química dos metabólitos ativos da ciclofosfamida que acumula em urina concentrada (McEVOY, 2002).

Os pacientes tratados com CF são orientados a ingerir quantidades abundantes de líquidos antes, durante o tratamento e até pelo menos 72 horas após o mesmo. Este procedimento contribui para o aumento da diurese. É esperado, que as excretas produzidas por pacientes em tratamento siga o seu curso normal, ou seja, a rede coletora de esgotos.

No Brasil, o número de casos de câncer cresceu consideravelmente ao longo das últimas décadas, acompanhando o aumento da melhora da qualidade e da expectativa de vida.

A tendência de crescimento de câncer é inquestionável, ocasionando a utilização de fármacos antineoplásicos, entre eles a CF, como um dos recursos terapêuticos. No entanto, ela como a maioria do antineoplásicos, é dotada de ação carcinogênica ou mutagênica. A utilização destes fármacos pode acarretar alterações no meio ambiente, a médio e longo prazo, constituindo-se um grande desafio. A minimização dos resíduos de tais substâncias que, indiretamente, podem levar a outros graves problemas de saúde pública.

3. Resíduos de Serviços de Saúde: *aspectos básicos*

Os medicamentos são elementos importantes e indispensáveis da vida moderna, sendo empregados de forma extensiva tanto na medicina humana quanto na veterinária. Até 1990, poucas considerações eram feitas em relação à presença, efeito e o destino dos fármacos residuais no meio ambiente (DIETRICH et al, 2004).

3.1. Resíduos de Serviços de Saúde - RSS: *Classificação e Legislação*

Os resíduos sólidos, bem como os efluentes líquidos provenientes de Estabelecimentos de Serviços de Saúde são considerados de natureza heterogênea e representam um impacto sobre a saúde humana, cuja magnitude tem sido avaliada nos últimos anos em âmbitos científicos (BASSI e MORETON, 2003). Portanto, é necessária uma classificação para a segregação desses resíduos. Diferentes classificações foram propostas por diversas entidades, incluindo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), governos estaduais e municipais.

Alguns estados e municípios possuem legislações próprias específicas sobre o gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde, estabelecendo normas para a classificação, segregação, armazenamento, coleta, transporte e disposição final desses resíduos. Contudo, as legislações em vigor não são claras e muitas vezes são conflitantes, provocando dúvidas e impossibilitando a adoção de normas práticas eficazes para o gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde em todo o país.

A primeira Lei Federal Brasileira que menciona os Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde (RSS) é datada no ano de 1964 (Lei Federal 4320/64), a qual estabeleceu na divisão orçamentária da União, dos Estados, dos Municípios e do Distrito Federal, um percentual para ser aplicado nos serviços urbanos e serviços de saúde.

Em 1º de março de 1979, a Portaria nº 53, do Ministério do Interior, estabeleceu aos órgãos estaduais a aprovação de projetos específicos de tratamento e disposição de resíduos sólidos, bem como a fiscalização durante a implantação, operação e manutenção. Após alguns anos, a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) Nº 01 de 23 de janeiro de 1986, instituiu a necessidade de elaboração de Estudos de Impactos Ambientais (EIAS) e Relatórios de Impactos Ambientais (RIMAS) para empreendimentos potencialmente perigosos ao meio ambiente e saúde da população. Dentre as atividades sujeitas a esta resolução, estavam os aterros sanitários, o processamento e destino final de resíduos tóxicos ou perigosos.

Em 1991, a Resolução CONAMA Nº 06 de 19/09/91 estabeleceu que cabe aos Estados e Municípios, definir as normas para o tratamento dos resíduos considerados tóxicos e perigosos. A Resolução CONAMA 237 de 19/12/97 regulamentou os aspectos de licenciamento ambiental estabelecido na Política Nacional do Meio Ambiente. Sendo definidas nesse documento, que o poder público expediria, para empreendimentos, as seguintes licenças: Licença Ambiental Prévia (LAP); Licença Ambiental de Instalação (LAI) e Licença Ambiental de Operação (LAO). Dentre as atividades que necessitam de licenciamento ambiental estão incluída o tratamento e disposição de resíduos especiais tais como: RSS, agroquímicos e respectivas embalagens, entre outros (CONAMA 237/1997).

Relativos ao tratamento e destinação final dos RSS, atualmente está em vigor a Resolução CONAMA 358/2005, elaborada com intuito de harmonizar as legislações de meio ambiente e de saúde (ANVISA), considerando os princípios da prevenção, da precaução, do poluidor pagador, da correção na fonte e de integração entre os vários órgãos envolvidos para fins do licenciamento ambiental, bem como, a necessidade de ação integrada entre os órgãos federais, estaduais e municipais de meio ambiente, de saúde e de limpeza urbana, com o objetivo de regulamentar o gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde.

O responsável pelo estabelecimento gerador deve implementar um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS), definido como um conjunto de procedimentos de gestão, planejados e implementados baseando-se em normas científicas, normativas e legais, com o objetivo de minimizar a produção e proporcionar aos resíduos gerados, um encaminhamento seguro, de forma eficiente, visando a proteção dos funcionários, a preservação da saúde pública e dos recursos naturais.

A Resolução CONAMA Nº 358/2005 e ANVISA RDC 306/2004 classificam os RSS no Brasil em cinco grupos: *Grupo A* - potencialmente infectantes; *Grupo B* - químicos; *Grupo C* - rejeitos radioativos; *Grupo D* - resíduos comuns; e *Grupo E* - perfurocortantes.

- **Grupo A:** Resíduos com a possível presença de agentes biológicos que por suas características de maior virulência ou concentração, podem apresentar risco de infecção. Divididos em cinco subgrupos A1, A2, A3, A4, A5.
- **Grupo B:** Resíduos contendo substâncias químicas que podem apresentar risco à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade.
- **Grupo C:** Quaisquer materiais resultantes de atividades humanas que contenham radionuclídeos em quantidades superiores aos limites de eliminação especificados nas normas da Comissão Nacional de Energia Nuclear-CNEN e para os quais a reutilização é imprópria ou não prevista.
- **Grupo D:** Resíduos que não apresentem riscos biológicos, químicos ou radiológicos à saúde ou ao meio ambiente, podendo ser equiparados aos resíduos domiciliares.
- **Grupo E:** Materiais perfurocortantes ou escarificantes.

Essas resoluções determinam que os efluentes líquidos pertencentes ao *grupo B*, que contenham medicamentos antineoplásicos ou demais produtos considerados perigosos, conforme classificação da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) por meio da NBR 10.004 da ABNT/2004 (tóxicos, corrosivos, inflamáveis e reativos), provenientes dos estabelecimentos prestadores de serviços de saúde, para serem lançados na rede pública de esgoto ou em corpo receptor, devem atender às diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes.

Existem ainda outras classificações para os RSS, como por exemplo, a definida pela ABNT-NBR 12.808/1993. Nesta os resíduos são classificados em três classes principais: *A*, *B* e *C*; da seguinte maneira:

Classe A: *Resíduos Infectantes*

Tipo A1 - Biológico

Tipo A2 - Sangue e Hemoderivados

Tipo A3 - Cirúrgico, anatomopatológico e exsudado

Tipo A4 - Perfurante-cortante

Tipo A5 - Animal contaminado

Tipo A6 - Assistência ao paciente

Classe B: *Resíduos Especiais*

Tipo B1 - Rejeito Radioativo

Tipo B2 - Resíduo Farmacêutico

Tipo B3 - Resíduo Químico Perigoso

Classe C: *Resíduos Comuns*

Todos que não se enquadram nos tipos A e B e não oferecem risco adicional à saúde pública.

É importante salientar que os RSS podem apresentar grande quantidade de substâncias químicas como desinfetantes, antibióticos, anestésicos, metais pesados e drogas não metabolizadas por pacientes (KÜMMERER, 2001; EMMANUEL et al, 2005), decorrendo daí o risco químico e biológico. Além disso, a disposição conjunta dos resíduos contendo microrganismos como: vírus, bactérias, protozoários e helmintos, ocasionam muitas doenças com implicações à saúde pública.

TSAI (1998) detectou no efluente hospitalar a presença de coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp.

Segundo KÜMMERER (2004), a presença de fármacos, antibióticos e desinfetantes pode provocar um aumento das populações bacterianas resistentes a certos antibióticos, detectadas no

esgoto de hospitais. Dessa forma, o mau gerenciamento dos RSS pode favorecer a propagação da resistência bacteriana múltipla a antimicrobianos.

Em 1982, a Portaria Nº 157/1982 do Ministério do Interior condenou o lançamento de efluentes líquidos industriais contendo substâncias não degradáveis com alto grau de toxicidade. Tais substâncias são definidas como sendo aquelas que, no ambiente aquático, apresentem persistência caracterizada por uma meia vida superior a quatro dias. Além desses constam também às substâncias cancerígenas dentre as quais estão os antineoplásicos: *ciclofosfamida* e *vincristina*.

As condições e padrões para lançamento de efluentes, estabelecidas pela Resolução CONAMA 357/2005, concebem que o efluente de qualquer fonte poluidora somente poderá ser lançado, direto ou indiretamente, nos corpos de água se não causar ou possuir potencial para produzir efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor. Particularmente, no caso dos efluentes provenientes de serviços de saúde e estabelecimentos nos quais haja despejos de infectados com microrganismos patogênicos, só poderão ser lançados após tratamento especial.

No entanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através da Resolução RDC ANVISA nº. 306/2004 determina que: *“As excretas de pacientes tratados com quimioterápicos antineoplásicos podem ser eliminadas no esgoto, desde que haja Sistema de Tratamento de Esgotos na região onde se encontra o serviço. Caso não exista tratamento de esgoto, o efluente deve ser submetido a tratamento prévio no próprio estabelecimento definido na RDC ANVISA nº. 307/2002”*. A resolução RDC ANVISA nº. 307/2002 dispõe sobre o Regulamento Técnico para Projetos Físicos de Estabelecimentos Assistenciais de Saúde. Tal resolução adota, como tratamento prévio e disposição final dos efluentes líquidos, o sistema de tanques sépticos normatizado pela NBR 13.969 da ABNT.

O CONAMA é um organismo integrante do SISNAMA (Sistema Nacional do Meio Ambiente) criado pela lei 6.938 de 31 de agosto de 1981, que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, encarregado de estabelecer normas, critérios e padrões nacionais pertinentes à manutenção da qualidade do Meio Ambiente e todas as suas atribuições estão descritas no Art.8 da supracitada lei 6.938/81. Por isso, as resoluções oriundas do CONAMA ostentam caráter obrigatório. Por outro lado, o critério constitucional para aferir qual a diretriz preponderante na hipótese de conflito de normas, critérios e padrões de qualidade ambiental, da mesma ou de diferentes categorias é a restritividade, isto é, prepondera a norma mais rigorosa.

3.2. Efluente Hospitalar: *Fármacos Residuais no Meio Ambiente*

Um número cada vez maior de substâncias químicas tem sido encontrado em águas aptas para o consumo (CALDERON, 2002). Cerca de vinte e um milhões de compostos estão registrados na Chemical Abstract Services e desses mais de 200.000 compõem o National Chemical Inventory, por serem comercializados (CAS, 2003), sendo que, apenas uma pequena parte desses compostos foi estudada em termos de impacto ambiental (PRUESS, 1998).

Segundo o Programa Internacional para Segurança Química (IPCS), nos últimos anos, centenas de substâncias definidas como inertes ou sem efeitos ao homem, passaram a ser consideradas carcinogênicas ou tóxicas para o processo reprodutivo. Como também, foi registrado o aumento do número de compostos mutagênicos e/ou carcinogênicos em estudos realizados em animais de laboratório (LÄNGE e DIETRICH, 2002).

Vários grupos de pesquisa têm utilizado uma abordagem clássica para avaliação do risco potencial dessas substâncias no ambiente, como: cálculo de balanço de massa sobre o consumo, o monitoramento nos diferentes compartimentos ambientais a fim de avaliar o potencial de exposição, ensaios ecotoxicológicos e de degradação. Apesar do aumento do número de pesquisas que buscam elucidar as questões que envolvem o consumo de fármacos e suas conseqüência para os seres humanos e o meio ambiente, as informações e metodologias estão longe de serem consideradas adequadas, uma vez que não podem ser validadas para todas as substâncias, persistindo assim, a necessidade de adaptação, recomendação e novas abordagens (KÜMMERER, 2004).

A administração de fármacos em pacientes, seja em casa ou em estabelecimentos de serviços de saúde, pode contribuir para contaminação do meio ambiente. Isto porque, a forma de eliminação da maioria dos fármacos e seus metabólitos do corpo humano ocorrem pelas excreções e secreções corporais (STUMPF et al, 1999), sendo frequentemente encontrados no esgoto doméstico (BILA e DEZOTTI, 2003).

Os efluentes hospitalares podem apresentar semelhança aos efluentes domésticos no que diz respeito à concentração de matéria orgânica, coliformes e pH e ambos são, geralmente, coletados pela rede de esgotos e enviados para a mesma estação de tratamento. Contudo a presença de substâncias como fármacos, desinfetantes e compostos químicos, bem como organismos multirresistentes a antimicrobianos podem ocorrer em elevadas contagens nas águas residuárias hospitalares.

Muitos hospitais e clínicas lançam seus despejos “in natura” na rede coletora de esgotos, tendo como destino final um corpo receptor. Estas cargas constituem um referencial negativo do ponto de vista da saúde pública, pois grande parte destas são lançadas à montante de pontos de captação para tratamento de águas. Sabe-se que muitas vezes estes mesmos corpos receptores são as principais fontes de abastecimento de água para a população (LA ROSA et al, 1999).

A ocorrência e o destino de fármacos com propriedades ativas no ambiente aquático tem despertado interesse na área de química ambiental (ANDREOZZI et al, 2003; DAUGHTON, 2002; HEBERER, 2002 a,b).

Segundo RICHARDSON e BOWRON (1985), nas ETEs há três destinos possíveis para qualquer fármaco individual: 1) pode ser biodegradado, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água, como por exemplo, o ácido acetilsalisílico; 2) pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como as penicilinas; 3) pode ser persistente como o clofibrato, que é um antilipêmico.

Os fármacos são produtos químicos projetados para uma alta atividade biológica. Nos últimos anos, o conhecimento sobre fontes, ocorrências, destino, efeitos e riscos associados à presença de fármacos em efluentes e no ciclo das águas, tem aumentado nos países Europeus e na América do Norte. Para países como o Brasil, os dados não são adequados, tanto em qualidade quanto em disponibilidade.

Pouco se conhece sobre o destino dos fármacos residuais no meio ambiente (STUMPF et al, 1999). A FIG. 4 mostra um esquema que sugere possíveis caminhos para os fármacos.

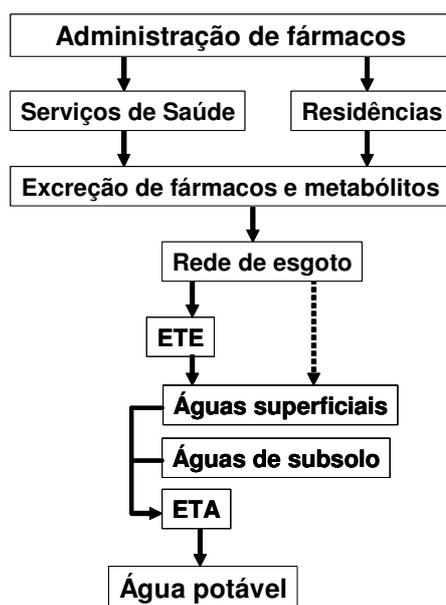


FIGURA 4: Destino dos resíduos de fármacos administrados em diversos ambientes.
Fonte: adaptada de STUMPF et al (1999).

Atualmente, há uma crescente preocupação com a presença de fármacos em ambientes aquáticos e seus possíveis impactos ambientais. A literatura mostra que vários pesquisadores detectaram muitos desses fármacos e seus metabólitos em águas naturais e em efluentes de ETEs, em várias partes do mundo, como Alemanha (TERNES, 1998; HIRSCH et al, 1999; SACHER et al,

2001), Argentina (PAZ et al, 2004; 2006), Brasil (STUMPF et al, 1999; TERNES et al, 1999), Canadá (WINKLER et al, 2001), Estados Unidos (KOLPIN et al, 2002), Espanha (CARBALLA et al, 2004; SANTOS et al, 2006), Holanda (JONHSON et al, 2000), Turquia (KUTLU et al, 2004), Inglaterra (DESBROW et al, 1998) e Itália (VIGANO et al, 2002).

Vários autores têm reportado a presença de *diclofenaco* em efluentes e águas superficiais em várias partes do mundo (ANDREOZZI et al, 2003; HEBERER, 2002a; STUMPF et al, 1999; TIXIER et al, 2003).

A Alemanha parece ter uma preocupação maior com o tema, em relação aos demais países. Em virtude da ampla bibliografia produzida, como o estudo de JOSS et al (2005), que avaliou a remoção de sete fármacos em uma ETE municipal. HIRSCH et al (1999) detectou dezoito tipos de antibióticos em amostras de efluentes de ETEs e águas superficiais. TERNES (1998) identificou a presença de *ácido clofibrico* em concentrações na faixa de $\mu\text{g/L}$, em rios, águas de subsolo e água potável do país. SACHER et al (2001) reportaram a ocorrência de *sulfametoxazol* em amostras de águas subterrâneas. HARTIG et al (1999), detectaram antibióticos *sulfonamidas* em águas superficiais e efluentes de uma ETE. KÜMMERER et al (2000), constatou que muitos fármacos apresentam baixa biodegradabilidade e não são eliminados completamente pelas ETEs.

Aproximadamente 75 toneladas por ano do antiinflamatório *diclofenaco* são vendidas com prescrição médica na Alemanha (TERNES, 2001). HEBERER (2002b) realizou monitoramento do esgoto e águas superficiais da cidade de Berlin e constatou que o *diclofenaco* é um dos fármacos mais presentes no ciclo da água. A concentração média detectada foi de 3,02 e 2,51 $\mu\text{g/L}$, para o afluente e efluente, respectivamente, indicando uma taxa baixa de remoção do composto pela ETE.

A avaliação das emissões é relatada em diversos trabalhos, sempre relacionando a presença de compostos procedentes de medicamentos, como platina excretada por pacientes após admissão de antineoplásicos (KÜMMERER e HELMERS, 1997), demonstrando que estas emissões não podem ser desprezadas. Em trabalho semelhante, KÜMMERER et al (2000) analisaram a biodegradabilidade e a genotoxicidade de diversos medicamentos (*ciprofloxacina*, *ofloxacina*, *metronidazole*) em efluentes de hospital. Os testes mostraram que nenhum dos compostos foi biodegradado e sua genotoxicidade não foi eliminada. KÜMMERER et al (1998) analisaram a presença de AOX (Teor de Halogênios Organicamente Ligados) nos efluentes de seis hospitais e nos respectivos sistemas de tratamento municipal na Alemanha, verificando a sua persistência e bioacumulação nos seres humanos e organismos. Na mesma linha KÜMMERER et al (1996) avaliaram a biodegradabilidade do antineoplásico ifosfamida e sua ocorrência nos efluentes hospitalares e estações de tratamento municipais, encontrando as mesmas concentrações na entrada e na saída das estações, indicando que não ocorreu adsorção, biodegradação ou outra forma de eliminação do composto. Neste caso a preocupação está relacionada ao fato deste agente ser cancerígeno, mutagênico, teratogênico e fetotóxico.

Drogas como *cetaminofem* (utilizado para cefaléia), *triclosan* (utilizado nos sabonetes antimicrobianos), *antibióticos* (utilizados para conter infecções bacterianas), *hormônios* sexuais femininos dos anticoncepcionais e até a *caféina* contida no pó de café, despejados no esgoto, formam “coquetéis”, os quais vêm sendo comuns em análises de água. Como exemplo dessas ocorrências, sabe-se que dos 139 rios pesquisados pela Union State Geological Survey (USGS) em 2001 nos Estados Unidos, cerca da metade deles apresentaram estes princípios ativos. Um ponto muito preocupante levantado neste estudo foi o fato das amostras terem sido coletadas após as estações de tratamento de esgoto e o impacto que esses “coquetéis de compostos químicos” podem causar para o meio ambiente e o homem ainda é desconhecido, uma vez que este é um cenário relativamente novo. No EUA estão sendo desenvolvidos estudos de estratégias para monitorar estas substâncias, assim como, identificar os riscos ambientais provocados pelas mesmas (KOLPIN, 2002).

O estudo de VIGANO (2002) comprovou a alta poluição do rio PO (Itália), pela presença de atividade mutagênica nos sedimentos coletados tanto no inverno como no verão (Teste de Ames) e a genotoxicidade em biomarcadores capturados em vários pontos do rio (Teste do Micronúcleo).

Na América Latina, em geral, a preocupação tem sido basicamente o tratamento e disposição de resíduos sólidos (GONZÁLEZ, 2004), com alguma recomendação quanto à implantação de estação compacta de tratamento de resíduos líquidos. PAZ et al (2004), avaliaram as características químicas, biológicas e toxicológicas dos resíduos líquidos de um hospital em Buenos Aires na Argentina, e constataram que o mesmo foi semelhante aos efluentes domiciliares. No entanto, visando o impacto ambiental do efluente hospitalar, os autores ressaltam a necessidade de detectar a presença de compostos tóxicos e de microorganismos resistentes.

A ocorrência de fármacos residuais no meio ambiente pode apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres. O efeito pode ser em qualquer nível da hierarquia biológica: célula - órgãos - organismo - população - ecossistema.

Neste contexto, alguns pesquisadores analisam riscos em potencial para alguns fármacos no meio ambiente. HENSCHERL et al (1997) analisaram dois fármacos, o paracetamol e o metotrexato, e dois metabólitos, o ácido salicílico e o ácido clofibríco, com relação às suas biodegradabilidades e testes de toxicidade (valores de CE_{50} com algas, microcrustáceo da espécie *Daphnia magna*, embriões de peixe e bactérias luminescentes). HALLING-SORENSEN (2000), avaliou os efeitos tóxicos (CE_{50}) de oito antibióticos em duas espécies de micro algas, *Microcystis aeruginosa* e *Selenastrum capricornutum*.

WOLLENBERGER et al (2000) investigaram as toxicidades aguda e crônica com o microcrustáceo da espécie *Daphnia magna* para nove antibióticos, dentre esses, oxitetraciclina, sulfadiazina e a tetraciclina.

Os antibióticos têm diferentes efeitos sobre o meio ambiente, e um deles é a contribuição no desenvolvimento de bactérias resistentes, assunto que tem sido largamente discutido (STEGER-

HARTMANN et al, 1997; TERNES et al, 2004; KOLPIN et al, 2002). Segundo JORGENSEN e HALLING-SORENSEN (2000), há indícios de que o desenvolvimento de resistência antibiótica é favorecido por baixas concentrações.

MIRANDA e CASTILHO (1998) investigou a incidência de resistência microbiana em uma espécie de *Aeromonas* isolada de ambientes aquáticos, constatando que a resistência ocorreu com vários antibióticos testados, dentre esses, cloranfenicol, trimetropim, sulfametoxazol e tetraciclina.

O lançamento de substâncias hormonalmente ativas em corpos hídricos, mesmo em baixas concentrações, pode acarretar sérios impactos sobre a dinâmica e estrutura das populações aquáticas (REIS FILHO et al, 2006). As conseqüências desta alteração podem ser profundas devido ao papel fundamental que os hormônios têm no controle do desenvolvimento das espécies.

A determinação da proteína vitelogenina (VTG) em organismos aquáticos, principalmente peixes, tem sido bastante utilizada na investigação por contaminantes estrogênicos (ZERULLA et al, 2002). A vitelogenina é uma fosfolipoglicoproteína sintetizada por todas as fêmeas de ovíparos durante o ciclo reprodutivo, é produzida no fígado e secretada na corrente sanguínea, onde é transportada até os ovários, acumulando-se nos ovócitos em crescimento para ser, então, utilizada como precursora das reservas nutricionais necessárias para o desenvolvimento subsequente dos embriões. Assim, a presença desta proteína no sangue destes organismos representa um biomarcador de exposição, pois sua síntese depende da presença de xenoestrógenos (REIS FILHO et al, 2006).

Diversos estudos foram realizados com intuito de detectar a presença de estrogênios naturais e contraceptivos no efluente e em águas superficiais. LARSSON et al (1999) analisaram a atividade estrogênica do efluente de uma ETE na Suécia, pela quantificação de VTG no plasma de uma espécie de peixe, *Oncorhynchus mykiss*, que foi exposta a este efluente por duas semanas.

GAGNÉ et al (2001) examinaram o efeito da atividade estrogênica dos efluentes de ETE sobre mexilhões da espécie *Elliptio complanata* proveniente de águas naturais. Os mexilhões foram expostos a um efluente de ETE por aproximadamente dois meses, onde foi constatado um aumento dos níveis de VTG em mexilhões machos e fêmeas, além de anomalias no crescimento da concha dos mexilhões.

No estudo de RODGRES-GRAY et al (2001), peixes da espécie *Rutilus rutilus* foram expostos a concentrações gradativas de efluente de ETE por 150 dias e a exposição induziu a feminilização de peixes machos, revelando a presença de estrogênios. Subseqüentemente, os peixes foram gradativamente expostos a águas naturais por mais 150 dias, resultando na redução de VTG no plasma, porém, não se observou alteração no sistema sexual feminizado dos peixes, indicando que o desenvolvimento da anomalia no sistema reprodutivo foi permanente.

Os efluentes de ETE são importantes fontes de lançamento de substâncias estrogênicas no ambiente aquático. DESBROW et al (1998) demonstraram que os estrogênios naturais (*17 β -estradiol* e *estrone*) e sintético (*17 α -etinilestradiol*) são responsáveis pela maior parte da atividade estrogênica detectada em efluentes de ETE no Reino Unido.

Os hormônios *17 β -estradiol* e *estrona*, em concentrações similares as encontradas em efluentes, causaram alterações na síntese de VTG e à inibição testicular em peixes machos da espécie *Pimephales promelas* (PANTER et al, 1998).

LEGLER et al (2002) demonstraram que as substâncias estrogênicas não só são importantes na fase aquosa, mas também podem se acumular em sedimentos marinhos e assim afetar os organismos presentes no meio. Segundo BILA e DEZOTTI (2003), a exposição a substâncias com atividade estrogênica no meio ambiente é um problema de saúde ambiental global e sua presença em ambientes aquáticos está associada ao descarte de efluentes de ETE em corpos receptores.

3.3. Efluente Hospitalar: Estudos no Brasil

Os estabelecimentos de saúde consomem aproximadamente 230 litros de água por leito/dia. Está água, após sua utilização contém diversas substâncias químicas e materiais biológicos eliminados nos mesmos e torna-se um efluente líquido com potencial poluente, podendo gerar problemas ambientais e de saúde pública caso não seja devidamente tratado (BRASIL, 2002).

Dos 420 hospitais do Rio de Janeiro, 381 deles despejam seu esgoto no mar, rios e lagos. 101 hospitais não têm estações de tratamento e 69 despejam o esgoto, com excretas e fluidos de pacientes, em praias pelo emissário de Ipanema e Baía de Guanabara.

O estudo de STUMPF et al (1999) realizado na cidade do Rio de Janeiro (Brasil), com drogas residuárias, na maioria derivada da excreção humana como: *ácido acetilsalisílico* (analgésico), *diclofenaco*, *Ibufreno*, *Ketofreno* (antiinflamatórios) e *genfibrosil* (redução de colesterol), constataram que durante a passagem pela ETE, a taxa média de remoção individual das drogas selecionadas para a pesquisa foi de 12 % a 90 %, indicando que a remoção incompleta desses resíduos pela ETE, pode trazer conseqüências negativas para o meio aquático.

Segundo TERNES et al (1999), foram encontrados estrogênios naturais (*estrona*) e contraceptivos sintéticos (*17 β -estradiol* e *17 β -etinilestradiol*) na ETE da Penha/RJ. Em esgoto bruto, os estrogênios *17 β -estradiol* e *estrona* foram detectados nas concentrações de 0,021 $\mu\text{g/L}$ e 0,04 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. As taxas de remoção de *estrona* observadas foram de 67% para o efluente tratado em filtro biológico e 83% para o efluente tratado pelo processo de lodos ativados. Para o *17 β -estradiol*, estas taxas foram de 92 e 99,9% para o efluente tratado em filtro biológico e para o efluente tratado pelo processo de lodos ativados, respectivamente. Para o estrogênio contraceptivo *17 β -etinilestradiol*, as taxas de remoção na ETE foram de 64 e 78 % para o efluente do filtro biológico e para o efluente do tanque de lodo ativado. Os autores concluíram que esses estrogênios são freqüentemente detectados nos descartes de ETE e águas naturais devido à sua remoção incompleta na passagem pela ETE.

AUGUSTINHO e FERREIRA (2004) realizaram um levantamento sobre os efluentes hospitalares em Cáceres/MT, onde foram avaliados os sistemas de tratamento convencional de quatro hospitais, baseados no conjunto fossa séptica, filtro anaeróbio, cloração e caixa de saída em labirinto e constataram deficiências de manutenção e inexistência de critérios de avaliação de seus efluentes, que têm como corpo receptor final o rio Paraguai.

SILVEIRA (2004) adotou a tecnologia SBR (contadores biológicos rotatórios) em um efluente hospitalar e constatou a redução de 88 % na DQO do efluente, sendo que o mesmo apresentou uma diminuição significativa da carga microbiológica para coliformes totais e *Escherichia coli*. Em seguida, avaliou o pós-tratamento utilizando cloração e ozonização para verificação da toxicidade aguda com *Daphnia similis*.

ORTOLAN (1999) constatou uma grande variação na composição microbiológica de um efluente hospitalar e que as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, avaliadas quanto à sensibilidade a antibióticos, em especial, as dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, altamente envolvidas em infecções hospitalares, apresentaram resistências múltiplas aos antibióticos testados, o que evidencia que os efluentes hospitalares podem ser considerados como fonte relevante de riscos potenciais às comunidades aquáticas e à saúde humana.

O estudo de GUEDES (2004), comparou um esgoto hospitalar e um esgoto doméstico, as características físicas, químicas e microbiológicas, tradicionalmente pesquisadas em esgotos sanitários, e concluiu que não existem diferenças substanciais entre os dois esgotos, no entanto, não descartou a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre a questão. Já o trabalho de SANTOS et al (2004), verificaram em amostras de esgoto de origem hospitalar uma alta ocorrência de *Cryptosporidium spp* e *Giardia spp*, indicando a necessidade de um tratamento do efluente pelo alto índice de disseminação de microrganismos patogênicos.

A pesquisa de GHISELLI (2006) revelou a presença de cafeína, bisfenol A, estradiol, etiniletradiol, progesterona, dietilftalato e dibutilftalato na água potável oriunda da sub bacia do rio Atibaia (SP), principal manancial utilizado para o abastecimento público da região, indicado que as águas estavam bastante impactadas pelos despejos industriais e domésticos desta região. As amostras de esgoto, antes e após o tratamento, apresentaram concentrações de hormônios sexuais muito próximas, indicando a ineficiência do tratamento empregado na remoção dos mesmos.

FERNANDES et al (2005) demonstraram um modelo de gestão para o Meio Ambiente de um Serviço de Radiologia no Rio de Janeiro que reduz os impactos ambientais de seus efluentes.

VASCONCELOS (2006) investigou a presença e a degradação do antimicrobial Ciprofloxacina e seus metabólitos através de processos avançados de oxidação (PAOs) em efluente do Pronto Atendimento do Hospital Universitário da cidade de Santa Maria (PA-HUSM).

3.4. Efluente Hospitalar: *Drogas Antineoplásicas no Ambiente Aquático*

As drogas citostáticas são geralmente usadas no tratamento antineoplásico. Os resíduos destas são quase que exclusivamente originados de aplicações dentro do ambiente hospitalar e podem estar presente no esgoto do hospital em baixas concentrações a nível de $\mu\text{g/L}$ (STEGGER-HATMANN et al, 1997).

Na Alemanha, a *ciclofosfamida* e a *ifosfamida* são os dois antineoplásicos mais utilizados na terapia do câncer. Segundo KÜMMERER et al (1998), no ano de 1996 foram utilizadas neste país 250 kg de ciclofosfamida e 400 kg de ifosfamida. O volume de antineoplásicos anual é quantitativamente inferior a outros grupos de fármacos, como por exemplo, os antibióticos ou analgésicos, aproximadamente 400 T/ano, com propósitos médicos. Entretanto, já se sabe que em função das suas propriedades (mutagênica, carcinogênica e teratogênica) os antineoplásicos podem causar sérios danos aos seres humanos e ao ambiente em geral.

Em plantas de tratamento municipal que recebem e tratam os efluentes hospitalares, foram encontrados traços de antineoplásicos em baixas concentrações, principalmente ao nível de ng.L^{-1} (KÜMMERER et al, 1996; STEGER-HATMANN et al, 1997; TERNES et al, 1999). STEGER-HARTMANN (1996) detectaram ifosfamida e ciclofosfamida dentro de amostras de efluentes de um hospital universitário em concentrações de 24 e 146 ng.L^{-1} , respectivamente.

KÜMMERER e HELMERS (1997) encontraram concentrações médias de ifosfamida de 109 ng.L^{-1} no efluente de um hospital oncológico. O afluente e o efluente da planta de tratamento municipal apresentaram concentrações médias entre 6,2 e $9,3 \text{ ng.L}^{-1}$, não sendo observada qualquer redução significativa durante o tratamento do esgoto. TERNES (1998) coletou 16 (dezesesseis) amostras de efluentes de uma planta de tratamento de esgoto na Alemanha e em 4 (quatro) dessas foram detectadas ciclofosfamida em concentrações de, no máximo, 20 ng.L^{-1} . Já a Ifosfamida só foi detectada em duas amostras, sendo uma das amostras em uma concentração de $2,9 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Até agora, não existem relatos da detecção de drogas citostáticas em águas superficiais, mas KÜMMERER e HELMERS (1997) calcularam a projeção de concentração ambiental (PEC) de $0,8 \text{ ng.L}^{-1}$ para ifosfamida nas águas superficiais da Alemanha. O estudo de ZUCATTO et al (2004) em amostras de água coletadas do rio Pó (Itália) entre 1997 e 2001, não detectou por HPLC, presença de ciclofosfamida, apesar de ela ser considerada bastante estável no ambiente aquático (KÜMMERER et al, 1996).

MACKAY (1996) apud KÜMMERER (2004). simulou comportamento provável no meio ambiente, de três produtos farmacêuticos: *ciclofosfamida* (antineoplásico), *diazepam* (ansiolítico) e *ivermectina*. (antiparasitário). Basicamente o programa representa uma situação ambiental em que uma quantidade fixa de uma substância química é introduzida em um sistema em equilíbrio. Baseado em informações sobre as características físico-químicas e estruturais da substância o modelo calcula, a

distribuição ou "afinidade" da mesma em seis diferentes compartimentos ambientais (água, solo, ar, sedimento, sedimento em suspensão e peixe).

A *ciclofosfamida* ficou concentrada na água (>99 %), com percentuais desprezíveis nos outros compartimentos, enquanto o *diazepam* apresentou concentrações semelhantes nos compartimentos água (53 %) e solo (49,5 %) e o *ivermectina* alcançou o equilíbrio com aproximadamente 97 % no solo. Neste estudo, não foram avaliados os metabólitos ou produtos de degradação dos fármacos em questão.

O modelo de distribuição da CF em ambiente fechado simulado é ilustrado na FIG. 5.

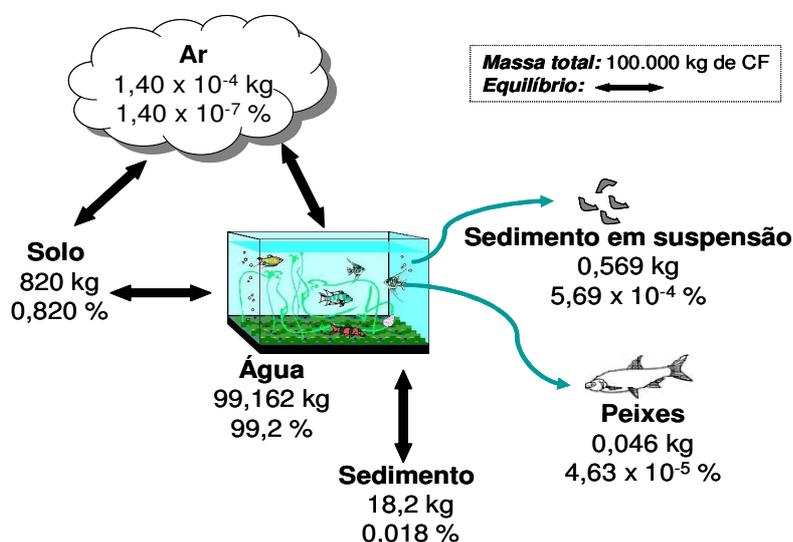


FIGURA 5: Simulação do modelo de distribuição da ciclofosfamida em ambiente fechado.

Fonte: Adaptado de KÜMMERER (2004).

Apesar da baixa emissão no ambiente, devido à sua ação farmacológica, as drogas citotóxicas frequentemente exibem propriedades carcinogênicas, mutagênicas ou teratogênicas (SKOV et al, 1990). Desse modo, investigações adicionais sobre sua ocorrência e destino podem fornecer informações sobre o potencial de risco para os seres humanos e o meio ambiente (KÜMMERER, 2001).

3.5. Resíduos de Antineoplásicos: *Contaminação Ocupacional e Ambiental*

O tratamento quimioterápico corresponde a 70% dos tratamentos de escolha para os pacientes oncológicos. Estima-se que para cada 1000 indivíduos com câncer, 700 serão submetidos à quimioterapia como tratamento de escolha, sendo este neoadjuvante, adjuvante ou paliativo (INCA, 2006).

Em virtude da ampla e crescente utilização de fármacos antineoplásicos, trabalhadores da área de saúde atuando em laboratórios, hospitais e/ou outros locais, estão expostos a numerosos riscos ocupacionais, quando não são observadas medidas apropriadas de segurança. Esta situação concerne principalmente à equipe envolvida no preparo e administração dessas substâncias em pacientes com câncer (MARTINS e DELLA ROSA, 2004).

Antineoplásicos, gases anestésicos e agentes esterilizantes são alguns dos principais causadores de problemas relacionados à reprodução, como abortos e malformações congênitas em trabalhadoras expostas, confirmando a periculosidade da sua manipulação (SKOV et al, 1990). Do mesmo modo setores de lavanderia, de limpeza e os familiares do paciente estão sendo expostos ao tratamento antineoplásico (MUTTI, 1999).

HIRST et al (1984) demonstraram que a manipulação inadequada permite que resíduos do antineoplásico ciclofosfamida sejam absorvidos através da pele íntegra. Já o estudo de PYY et al (1988) em uma clínica oncológica, constatou a presença de ciclofosfamida na urina de enfermeiras que manuseavam esse agente sem proteção especial. O estudo de GOLONI-BERTOLLO et al (1990), confirmou por meio de testes *in vivo* e *in vitro*, o efeito mutagênico dos antineoplásicos para as células, em virtude deste fato, a equipe hospitalar envolvida com o tratamento oncológico deve ser considerada um grupo de risco para a ocorrência de alterações cromossômicas.

A literatura especializada (MUTTI, 1999; TURCI et al, 2002; HUITEMA et al, 2000; SESSINK et al, 1992; 1994 a,b) atesta que os efeitos decorrentes do manuseio dos antineoplásicos sem cuidados podem levar a inúmeros efeitos tóxicos. A maioria destes estudos utiliza a urina dos trabalhadores como indicador do nível de contaminação ambiental a que se expõe e ressalta que apesar do uso de equipamentos de proteção, esta ainda ocorre. A concentração de antineoplásico na urina de um paciente em tratamento foi aproximadamente 7.000 vezes maior do que a encontrada na urina de indivíduos sujeitos à exposição ocupacional. Esta urina por sua vez segue o caminho usual, ou seja, a rede coletora de esgotos.

A concentração de antineoplásicos é maior na urina, e em função deste fato, é prudente presumir que a mesma apresenta um perigo potencial à equipe e por essa razão a manipulação da excreta de pacientes não é recomendada (KÜMMERER, 2004).

A maior parte dos quimioterápicos são eliminados por via renal, na forma de metabólito ativo ou inalterado (TAB. 3), sendo assim, os maiores riscos para quem se expõe a estes são de má

formação congênita (SKOV et al, 1990), infertilidade, aberrações cromossômicas (SESSINK et al, 1993; ENSSLIN et al, 1994).

TABELA 3: Metabolização e excreção de fármacos antineoplásicos

<i>FÁRMACOS</i>	<i>EXCREÇÃO</i>
Bleomicina	50% até 80% é eliminada como droga ativa dentro de 24 hs.
Cisplatina	27% a 34% da dose é eliminada pelos rins
Ciclofosfamida	25% é eliminada pela urina inalterada
Dactinomicina	30% eliminada na urina e fezes
Daunorubicina	14% a 23% da droga é excretada na urina dentro de 72 hs.
Doxorrubicina	Eliminada na urina em 24 hs.
Fluorouracil	15% da dose é eliminada na urina como droga intacta em 6 hs.
Ifosfamida	62% é eliminado na urina com +20% da droga metabolizada
Methotrexate	75% é eliminada na urina como droga, em 8 hs
Mitomicina	10% é eliminada na urina como droga ativa

Fonte: CRISTOFOLINI e SCHULER SOBRINHO, 1998.

No Brasil, a legislação está evoluindo não só para diminuição dos riscos ocupacionais e ambientais relacionados aos medicamentos antineoplásicos como para um sistema de gestão da saúde do trabalhador. Nesse sentido, o treinamento dos funcionários em todas as etapas de preparo da terapia antineoplásica é essencial, assim como o registro dos treinamentos e do fornecimento dos equipamentos de proteção individual (EPIs) e coletiva (EPCs). Segundo a ANVISA RDC 220/2004, “quando do manuseio dos fluidos corporais e excretas de pacientes que receberam tratamento antineoplásico nas últimas 48 horas, os funcionários devem vestir aventais e luvas de procedimento”, pois há risco de contaminação, dado que tais fluidos contêm drogas ativas ou seus metabólitos.

No ambiente ocupacional, a monitoração biológica em conjunto com a vigilância da saúde são atividades necessárias à prevenção da intoxicação (WHO, 1996). Segundo DELLA ROSA et al (2003), “esta monitoração consiste na determinação dos agentes presentes no ambiente de trabalho e/ou de seus metabólitos nos tecidos, nas secreções no ar expirado dos indivíduos expostos, para avaliar a exposição e o risco à saúde, comparando-se os resultados obtidos com referências apropriadas”. Isto confirma a necessidade de cumprir as normas de segurança previstas para o manuseio de tais drogas. Além do risco ocupacional, existem também os aspectos ambientais.

Todos os materiais residuais dos procedimentos de manipulação dos antineoplásicos devem ser considerados *resíduo hospitalar especial* (Classe B, segundo NBR 10.004 - ABNT/2004) e devem ser descartados de acordo com os procedimentos do local, com rigorosa atenção quando da liberação

para o meio ambiente. A determinação do nível de contaminação ambiental por agentes antineoplásicos é um campo relativamente novo (OMS, 1999).

O estudo realizado pela Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) mostrou que quase todos os antineoplásicos são sensíveis ao processo de incineração utilizando temperaturas acima de 1000°C, com intuito de reduzir o tempo de emissão de vapores citotóxicos na atmosfera. Este processo destrói a molécula principal da substância, mas pode dar origem a derivados de combustão que conservam a atividade mutagênica, sendo portanto, indicado efetuar um tratamento de inativação química (hipoclorito a 10% por 24 horas) antes de enviar o material para o processo de incineração (MARTINS e DELLA ROSA, 2004).

O método de degradação química também é indicado para descontaminação de equipamentos, coletores de urina, banheiros e vestimenta de proteção para manuseio com antineoplásicos. Entretanto, não é completamente satisfatório para o tratamento de fluidos corporais contaminados e efluentes líquidos, devido à possibilidade de conter outras substâncias químicas com características perigosas que podem interagir entre si. MINOIA e PERBELLINI (2000) sugerem que a urina dos pacientes que receberam tratamento antineoplásico deva ser inativada antes do descarte.

Ambos os métodos (incineração e/ou degradação química) não podem ser considerados definitivos, exigindo que os hospitais redobrem os cuidados com o despejo destes compostos (WHO, 1999). Isto demonstra a magnitude e alcance do problema, apontando à necessidade de estabelecer novas regulamentações e métodos para avaliação dos riscos decorrentes do tratamento inadequado desses compostos.

Após a administração dos antineoplásicos, uma parte significativa destes é excretada na rede de esgoto. Estudos têm demonstrado que muitas dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidas pelas ETEs. A presença desses fármacos residuais na água pode causar efeitos adversos na saúde dos seres vivos em vários níveis tróficos.

O monitoramento da eficiência de remoção desses fármacos pelos processos convencionais de tratamento das ETEs é de grande importância, pois, no futuro, poderão ser necessárias adaptações, ou mesmo implantação de outros processos de tratamento que complementem a remoção adequada desses fármacos.

4. Tratamento de Efluentes e Processo Anaeróbio

A adoção de um maior rigor nos padrões de descarte de águas residuárias tem motivado a realização de pesquisas, cujo objetivo é reduzir o impacto ambiental, especialmente em efluentes contendo elevadas cargas tóxicas, como os provenientes de estabelecimentos de serviços de saúde.

A Resolução CONAMA 357/2005, concebe que o efluente de qualquer fonte poluidora somente poderá ser lançado, direto ou indiretamente, nos corpos de água se não causar ou possuir potencial para produzir efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor.

4.1. Tratamento de Efluentes

A investigação em anaerobiose de um modo geral tem vindo a aumentar nos últimos anos (ALVES et al, 2005).

Atualmente existe um número significativo de alternativas para concepção física de unidades destinadas para conversões biológicas anaeróbias. Estas unidades deixaram de ser consideradas como simples tanques, para serem pesquisadas como reatores, onde ocorrem transformações complexas, com participação de organismos vivos. Segundo CAMPOS (1999), o desenvolvimento da tecnologia anaeróbia só foi possível com o desenvolvimento e conhecimento dos aspectos microbiológicos, bioquímicos, termodinâmicos e cinéticos dos processos anaeróbios e o mesmo tem sido reportado como um método efetivo para o tratamento diário dos efluentes (DEMIREL et al, 2005).

A composição dos efluentes hospitalares apresenta flutuações mais ou menos evidentes em sua descarga na rede de esgoto, em virtude da grande diversidade de substâncias químicas e materiais biológicos eliminados no mesmo (LA ROSA, 2000). Tais riscos incluem os possíveis efeitos patogênicos dos microrganismos e os efeitos tóxicos e genotóxicos das substâncias químicas (fármacos, desinfetantes, entre outros) utilizadas pelos estabelecimentos de saúde, que podem ocasionar problemas como *inibição aos processos biológicos de tratamento, geração de lodo com características perigosas e toxicidade à vida aquática* (SAPIA e MORITA, 2003).

A detecção de produtos farmacêuticos no esgoto, água superficial e na água potável, indica o potencial das substâncias químicas (estáveis e solúveis) em atingir o meio ambiente (WEBB et al, 2003).

ZWIENER e FRIMMEL (2003) estudaram a biodegradação de três produtos farmacêuticos: *o ácido clofibríco, o ibuprofeno e o diclofenaclo*, em uma estação de tratamento de esgoto piloto, com reatores aeróbio e anaeróbio, durante 50 horas. Ambos os processos foram considerados eficientes. O anaeróbio resultou na redução da concentração das três substâncias entre valores 60% - 80% da concentração inicial. A degradação do ibuprofeno foi observada imediatamente após o início do teste,

revelando a capacidade inerente do lodo para degradar o ibuprofeno sem necessidade de adaptação dos microrganismos. Já o processo aeróbio os valores de redução foram na ordem de 95% após trinta horas.

A maior preocupação está em estimar a eliminação eficiente dos resíduos farmacêuticos durante sua passagem pelas estações de tratamentos de esgotos municipais. Vários estudos reportam taxas de eliminação como valores de biodegradação que variam de quase nada a uma alta degradação para diversas substâncias e diferentes tipos de estações de tratamento de esgotos (KÜMMERER et al, 2000; STUMPF et al, 1999; TERNES, 1998). A comparação das taxas de eliminação das diferentes estações de tratamento municipal não gera nenhum resultado confiável devido à variedade dos efluentes, concentração de fármacos e parâmetros operacionais (ZWIENER e FRIMMEL, 2003).

4.2. Biodegradação Anaeróbia

A biodegradação é o mecanismo de degradação mais importante para os compostos orgânicos na natureza, ao contrário de outros processos, a biodegradação elimina os contaminantes sem dispersá-los nos meios. Os produtos finais dessa degradação são dióxido de carbono, água e biomassa microbiana. A velocidade e a eficiência da biodegradação depende da composição química do produto liberado, associado a fatores ambientais específicos (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Qualquer digestor anaeróbio é um reator trifásico (FIG. 6), onde interagem as diferentes fases havendo trocas recíprocas de substratos e produtos, os microrganismos presentes na fase sólida, produzem metabólitos que se distribuem entre as fases líquida e gasosa, sendo estes produtos reutilizados numa série de reações em cadeia até a obtenção dos produtos finais, predominantemente metano e gás carbônico (ALVES et al, 2005).

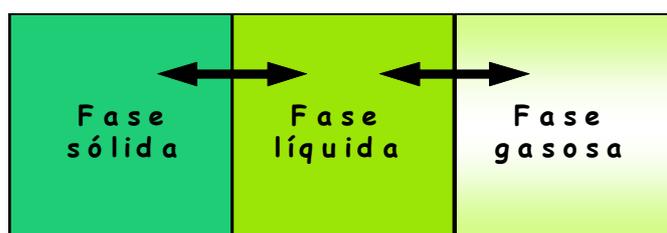


FIGURA 6: Esquema das interações entre as várias fases num digestor anaeróbio

A capacidade de uma bactéria anaeróbia decompor um determinado substrato é bastante específica, dependendo principalmente do seu sistema enzimático. As enzimas responsáveis pelas reações do processo de decomposição apresentam um alto grau de especificidade. A eficiência global de conversão da matéria orgânica em produtos estabilizados depende da eficiência de cada reação e do

equilíbrio entre as diversas espécies e entre os grupos de bactérias presentes no sistema anaeróbio (MENDES et al, 2005).

A digestão anaeróbia é um processo bioquímico complexo, sendo composto por várias reações seqüenciais, cada uma com sua população bacteriana específica. O processo de conversão envolve quatro etapas: *hidrólise*, *acidogênese*, *acetogênese* e a *metagênese* (FIG. 7).

As etapas de hidrólise e acidogênese consistem de um modo simplificado na hidrólise das macromoléculas (carboidratos, proteínas e lipídios) nos correspondentes monômeros que são posteriormente transformados em ácidos graxos voláteis, álcoois, dióxido de carbono, hidrogênio e amoníaco. Estas transformações são asseguradas por um grupo variado de bactérias mesófilicas ou termofilicas, anaeróbias estritas ou facultativas de crescimento relativamente rápido.

A etapa da acetogênese consiste na transformação dos ácidos graxos voláteis em acetato e hidrogênio sob ação de dois grupos de bactérias homoacetogênicas e sintróficas, o papel dessas bactérias no processo de degradação anaeróbia não está atualmente completamente esclarecido.

A metanogênese é a etapa final do processo final e é responsável diretamente pela produção de metano. As bactérias metanogênicas são extremamente sensíveis as variações das condições ambientais, apresentam baixa velocidade de crescimento e ocupam um papel vital sobre o processo, mantendo as concentrações de hidrogênio no sistema a níveis adequados (ALVES et al, 2005).

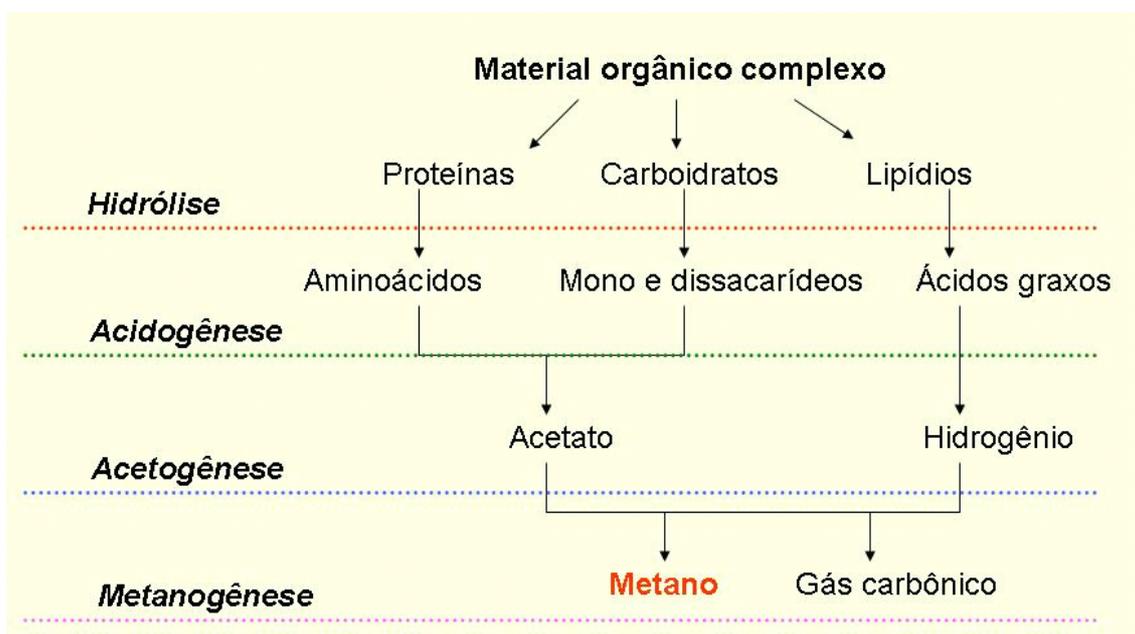


FIGURA 7: Seqüência de processos na digestão anaeróbia de macromoléculas complexas.
Fonte: adaptada de Van HAANDEL e LETTINGA, 1994.

4.3. Fatores que Interferem na Biodegradabilidade Anaeróbia

O processo anaeróbio possui uma baixa taxa de produção de biomassa, apenas 10% a 20% do volume produzido no aeróbio, devido à reduzida taxa de crescimento dos microrganismos no consórcio anaeróbio. Para que os microrganismos convertam a matéria orgânica em produtos finais, deve-se manter a biomassa de bactérias ativas e proporcionar contato desta com o material orgânico do afluente. Por isso, o processo é mais suscetível a desequilíbrios, provocados principalmente por substâncias agressivas a esses organismos (CAMPOS, 1999).

Os principais elementos químicos responsáveis pelo ataque às macromoléculas são as enzimas, as quais agem como catalisadores no processo. Estas enzimas exigem para sua ação específica, um ambiente adequado (VAZOLLER, 1999). O processo de digestão anaeróbia requer uma perfeita interação entre as bactérias fermentativas e as metanogênicas. Como o grupo de bactérias metanogênicas é o mais sensível às variações ambientais, deve-se visar a manutenção das condições ideais para as mesmas. Além das condições operacionais, os fatores ambientais que mais influem são: *temperatura, pH, e presença de nutriente e ausência de substâncias tóxicas.*

Temperatura: A temperatura é o fator ambiental de maior importância na digestão anaeróbia do esgoto. Influencia diretamente o crescimento microbiano, já que a atividade enzimática das bactérias depende da temperatura que estão expostos. A biodigestão anaeróbia tem sido observada para temperaturas entre 0°C a 97°C, no entanto, há faixas de temperatura que são consideradas ótimas para o processo (CHERNICHARO, 1997). Há aplicação do processo anaeróbio em diferentes faixas de temperatura. Em temperaturas abaixo de 20°C, o processo de digestão pode ser limitado pela velocidade da primeira etapa: *Hidrolise*. Em altas temperaturas, as taxas de reação se processam mais rapidamente resultando em uma operação mais eficiente e menor tamanho dos reatores. Duas faixas de temperatura ótima para o tratamento anaeróbio tem sido citada: uma mesofílica de 30 a 38°C e outra termofílica de 49 a 57°C, porém os digestores anaeróbios tem sido projetados para operarem na região mesofílica. O estudo de ENRIGHT et al (2005) verificou que, mesmo em baixa temperatura (15°C) as bactérias metanogênicas foram eficientes no tratamento de efluentes contendo propanolol, metanol e acetona, com uma remoção de DQO de 60 a 70%, após 450 dias de ensaio.

Potencial hidrogeniônico (pH): O valor e a estabilidade do pH do meio influenciam o desempenho da degradação. O pH ótimo para a fermentação metânica está entre 7,0 e 8,0, mas as metanobactérias não são prejudicadas se o pH cair para 6,0. Em um meio ácido, a atividade enzimática das bactérias metanogênicas é anulada, ou seja, são extremamente sensíveis as

reduções de pH. Já as bactérias acidogênicas tem um crescimento ótimo na faixa de pH entre 5 e 6, tendo uma tolerância maior a valores baixo de pH. As alterações de pH podem afetar a atividade das enzimas microbianas ou alterando o equilíbrio químico de certos compostos que ocasionam o aumento ou a diminuição da toxicidade destes. Nos processos anaeróbios os dois principais compostos que afetam o pH são o ácido carbônico e os ácidos voláteis. Na faixa de pH entre 6,0 e 7,5 a capacidade de tamponamento do sistema é quase completa, dependendo da relação gás carbônico/ alcalinidade, que em equilíbrio com a dissociação do ácido carbônico, tende a regular a concentração de íons H^+ .

Presença de nutrientes e micronutrientes: Os microrganismos necessitam de nutrientes para a formação do protoplasma (conteúdo no interior das células). O nitrogênio (N) e fósforo (P) são os mais requeridos por serem essenciais para todos os processos biológicos. Geralmente, o nitrogênio é o nutriente inorgânico requisitado em maiores concentrações para o crescimento dos microrganismos. Em condições anaeróbias, o nitrogênio nas formas de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) se encontra disponível para o crescimento bacteriano, uma vez que este é reduzido a gás nitrogênio e liberado na atmosfera. A incorporação microbiana de fósforo da digestão anaeróbia tem sido reportada como sendo de aproximadamente 1/5 a 1/7 daquela estabelecida para o nitrogênio. A quantidade de N e P, em relação à matéria orgânica presente (expressa em DQO) depende da eficiência dos microrganismos em obter energia para síntese, a partir das reações bioquímicas de oxidação do substrato orgânico. A baixa velocidade de crescimento dos microrganismos anaeróbios, comparados aos aeróbios, resulta em menor requerimento nutricional. Um grande número de outros elementos químicos, denominados de micronutrientes tem-se mostrado necessário ao crescimento dos microrganismos no processo anaeróbio. Dentre os micronutrientes considerados essenciais, destacam-se o ferro (F) o cobalto (Co), o níquel (Ni) e o zinco (Zn). A exigência exata destes é difícil de ser determinada na prática, mas parece existir uma relação entre a presença micronutrientes e o aumento da eficiência do processo anaeróbio (CHERNICHARO, 1997; CAMPOS, 1999).

Presença de substâncias tóxicas: A adequada degradação dos poluentes orgânicos por qualquer processo biológico depende da manutenção de um ambiente favorável para os microrganismos, incluindo o controle e a eliminação de constituintes tóxicos. Segundo CHERNICHARO (1997), a toxicidade é considerada um dos principais empecilhos para a aplicação de processos anaeróbios. Vários compostos orgânicos e inorgânicos podem ser tóxicos ou ter efeitos inibitórios sobre o processo de digestão anaeróbia. Os microrganismos usualmente têm uma habilidade para se adaptar a altas concentrações de muitos materiais inibidores. Uma mistura complexa de microrganismos pode se adaptar à presença de determinados xenobióticos, de

forma a aproveitar ao máximo os metabólitos produzidos entre as diferentes espécies, aumentando a eficiência do processo de degradação (FERNICOLA e OLIVEIRA, 2002). A extensão da adaptação é relativa e em muitos casos a atividade após a aclimatação pode aproximar-se da obtida na ausência do inibidor. A magnitude desse efeito depende da concentração do material em digestão, podendo ter em alguns casos, um efeito benéfico quando há baixa concentração. Materiais orgânicos sintéticos, como os detergentes, parecem ser tóxicos em concentrações de 15 mg.L^{-1} . O mesmo pode ser dito para a presença de metais pesados e substâncias organocloradas presentes no efluente a ser tratado, pois eles afetam os processos. Mesmo em concentrações muito baixas, podem ser tóxicas para as bactérias (PINTO et al, 2000). A presença de compostos não biodegradáveis ou a formação de compostos gerados da degradação parcial durante o processo anaeróbio, pode aumentar a toxicidade do efluente após o tratamento anaeróbio. ALVES et al (2005) estudaram a inibição do lodo anaeróbio por constituintes (sódio, cromo, fenol e sulfato) de efluentes laboratoriais. O estudo de PAZ et al (2004) concluiu que o efluente do Centro de Saúde pesquisado apresentou características semelhantes ao efluente domiciliar, no entanto os autores consideram a necessidade de estudar a presença de compostos tóxicos, como metais pesados, antineoplásicos e solventes. STEGER-HARTMANN et al (1996), avaliaram em escala laboratorial a degradação do antineoplásico ifosfamida. Os resultados indicaram que 50% da dose de ifosfamida, despejada em um vaso sanitário foi diluída na água e eliminada em condições metanogênicas após 120 dias. Algumas substâncias como estrógenos, presente em efluentes hospitalares é excretada na forma inativa ou conjugada, como os: *glicuronídeos* e *sulfatos*, podendo ser biotransformados por bactérias comumente encontradas em áreas de despejo de efluentes, em compostos biologicamente ativos e passíveis de desencadear efeitos deletérios ao meio ambiente aquático (SPEECE, 1996). MASSÉ et al (2000), investigaram o efeito da presença dos antibióticos *penicilina* e *tetraciclina* no lodo de suínos, sobre a digestão anaeróbia. Ambos medicamentos causaram um efeito inibitório na produção de metano de até 35%, no entanto, não foram observadas alterações na estabilidade e na eficiência do tratamento anaeróbio em relação pH, remoção DQO e sólidos voláteis e total, quando comparado ao grupo controle.

A biodegradação anaeróbia é um importante processo de tratamento na remoção substâncias indesejáveis. Fármacos residuais, com destaque para os antineoplásicos, podem ser uma ameaça à saúde pública, que ainda não está bem evidenciada, limitada a dados de detecção e remoção de fármacos existentes nas ETEs e a comparação das taxas de eliminação, que na sua maioria não geram resultados confiáveis, devido à variedade dos efluentes, concentração de fármacos e parâmetros operacionais.

5. FERRAMENTAS DE ANÁLISE

Um dos campos mais proeminentes da área ambiental é o estudo de micropoluentes orgânicos em ambientes aquáticos. Micropoluentes são usualmente detectados em concentrações abaixo de 1 parte por milhão ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e compreende um universo de milhares de compostos (utilizados para fins terapêuticos ou não), que mesmo estando presentes em pequenas concentrações, são capazes de desencadear efeitos sobre os sistemas em que são introduzidos. Precisam ser detectados, quantificados e avaliados quanto a sua periculosidade sobre a biota aquática e ETEs.

As ferramentas de análise devem estar bem definidas e de preferência padronizadas, para que se possa realizar o mesmo nível de controle em diferentes corpos receptores e em efluentes com os mais diversos poluentes.

5.1. Testes de Atividade Metanogênica Específica e Biodegradabilidade

O teste de Atividade Metanogênica Específica (AME) é uma ferramenta muito utilizada como análise de rotina, para quantificar a atividade metanogênica de lodos anaeróbios ou ainda para avaliar o comportamento da biomassa sob efeito de compostos potencialmente inibidores ou o potencial de biodegradação de um resíduo ou de uma substância química. No entanto, até o presente momento o teste de AME não está padronizado. Segundo AQUINO et al (2007) existem várias metodologias para a determinação da atividade metanogênica, o que dificulta, em parte, a comparação dos resultados absolutos obtidas a partir de cada uma delas.

ALVES et al (2005) utilizaram o teste de AME para avaliar o grau de inibição do lodo por constituintes de efluente de laboratório de controle de poluição. FURTADO et al (2002) investigaram a atividade metanogênica no sedimento de três lagoas na cidade de Macaé (RJ).

PINTO (2006) avaliou a eficiência da digestão anaeróbia na bioestabilização de sólidos orgânicos de elevada concentração, obtidos de sobras de feira livre (RSO), lodos de tanques sépticos, dejetos suínos e lixiviado, procurando definir o tipo e a quantidade de inóculo a ser usado, a possibilidade de um processo de co-digestão e qual seria a melhor proporção dejetos/RSO (em termos de sólidos voláteis) a ser adotado.

A AME pode ser definida como a capacidade máxima de produção de metano (CH_4) por um consórcio de microrganismo anaeróbio, realizadas em condições controladas de laboratório, visando viabilizar a atividade bioquímica máxima de conversão de substratos orgânicos a biogás. A determinação da capacidade do lodo anaeróbio em produzir metano é importante, porque a redução de

compostos causadores de demanda química de oxigênio (DQO), só ocorrerá com a formação do metano, que por ser praticamente insolúvel em água, escapa facilmente da fase líquida (AQUINO, et al, 2007).

Dessa forma, a partir de quantidades conhecidas de biomassa (gSVT) e de substrato (gDQO), e sob condições estabelecidas, pode-se avaliar a produção de metano ao longo do período de teste. A AME é então calculada a partir das taxas de produtividade máxima de metano (mLCH₄/gSVT.h ou gDQOCH₄/gSVT.d). O cálculo da atividade metanogênica específica máxima (AME_{MAX}) é feita de acordo com a equação abaixo (VON SPERLING, 1996).

$$AME_{MAX} = \frac{dV}{dt} \times \frac{24h/dia}{350mL/gDQO} \times \frac{1}{SV} \times \frac{1}{V}$$

Onde:

AME_{MAX} = atividade metanogênica específica expressa em gDQOCH₄/gSV.dia.

dV/dt = velocidade máxima da produção de metano expresso em ml/h.

SV = concentração em sólidos voláteis do inóculo expresso em gSV/L

V = volume do meio de reação expresso em litros

O valor de dV/dT é obtido através da equação da reta de inclinação máxima do gráfico da produção acumulada de metano (expresso em mLCH₄) em função de tempo (expresso em horas).

5.2. Cromatografia para Amostras Ambientais – HPLC

Segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), a cromatografia é um método físico de separação no qual os componentes a serem separados estão distribuídos em duas fases, sendo uma estacionária e outra móvel. O objetivo da cromatografia consiste em separar individualmente os componentes de misturas seja para identificação, quantificação ou para obtenção de substâncias puras para os mais diversos fins.

Existem diversas técnicas que compõem o elenco de variedades de cromatografias, porém, a cromatografia líquida de alta performance (HPLC ou CLAE) é a técnica mais utilizada na atualidade. O HPLC tem sido aplicado nas áreas de química, bioquímica, farmacêutica, alimentícia, biotecnologia, biológica e ambiental. Podendo detectar carboidratos, aminoácidos, ácidos nucléicos, proteínas, hormônios, fármacos, drogas de abuso, pesticidas, esteróides entre outras. Dada a sua especificidade, esta técnica garante uma precisão inquestionável para a detecção de uma diversidade enorme de substâncias químicas, acima de 14.000 substâncias (MATTOS, 2005).

A separação de uma mistura por cromatografia líquida é caracterização por um gráfico, denominado cromatograma, onde cada composto é representado por um pico e um tempo de retenção, como demonstrado no GRAF. 2. O registro desta representação depende do detector utilizado na metodologia, a qual deve estar conectado na saída da coluna para medir a variação da composição da fase móvel, fornecendo um sinal elétrico (RIBANI et al, 2005).

Os sinais elétricos são processados a partir de um microcomputador, que define o tempo de retenção, a altura e a área do composto separado da mistura.

Os picos serão detectados de forma correta se o equipamento estiver preparado com uma padronização interna específica para o composto que está sendo analisado. No entanto é necessária a determinação das condições cromatográficas: fase móvel utilizado, tipo de coluna, fluxo de fase móvel, pressão do fluxo, tipo de detector e comprimento de onda aplicado. Para isso, devem-se obter soluções padrão referentes ao composto estudado, pois, a partir destas serão estabelecidas as condições cromatográficas (RIBANI et al, 2005).

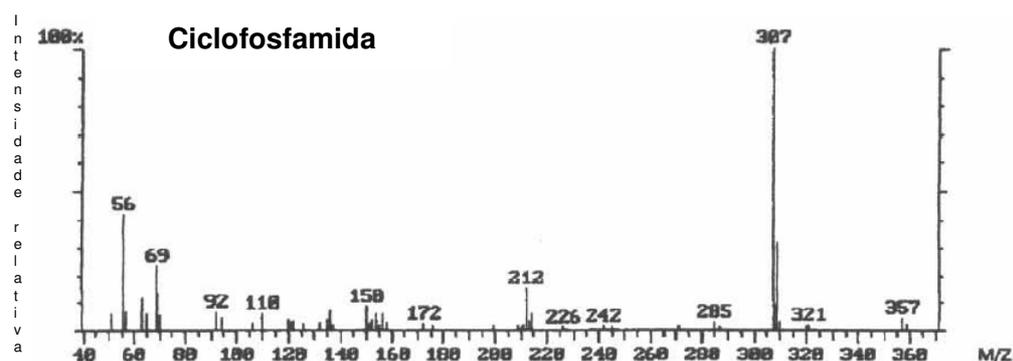


GRÁFICO 2: Representação cromatográfica da ciclofosfamida (HPLC)

CARDOSO (2002) utilizou essa metodologia para verificar a bioequivalência do antibiótico amoxicilina, buscando o desenvolvimento de novos medicamentos. PAULINO, 2005 avaliou a atividade antiinflamatória do extrato de própolis em amostras coletadas de modelos animais de inflamação. HELM (2004) quantificou por HPLC, o perfil dos aminoácidos que compõem a cevada nua, visando a caracterização química dos grãos.

GARG e ACKLAND (2000) relatam como técnica de identificação de CF em amostras de urina, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa-massa, com prévia extração líquido-líquido com acetato de etila, sem derivação. TURCI et al (2002) também usou HPLC acoplado a duplo espectrômetro de massa, para determinação de ciclofosfamida, ifosfamida e metrotrexato em urina de indivíduos expostos.

Tanto o HPLC quanto à cromatografia gasosa (CG) são fundamentais para a determinação de fármacos, em matrizes biológicas como sangue, urina e tecido, sendo que algumas modificações nestes métodos pode ser suficientes para amostras ambientais (BILA e DEZOTTI, 2003).

A cromatografia líquida tem várias vantagens para análise de compostos orgânicos em água. Uma delas é que os compostos voláteis representam uma pequena fração de compostos orgânicos contidos em água e esgotos. A maior parte do carbono está presente como compostos não voláteis, que podem ser diretamente analisados pela cromatografia líquida e não pela gasosa. Isto é especialmente verdadeiro para esgotos, os quais contêm muito material húmico e compostos orgânicos polares, tais como carboidratos (REIS FILHO et al, 2006).

O HPLC é uma ferramenta de análise para os estudos de controle de contaminações ambientais e ocupacionais realizados tanto no Brasil como no exterior, em virtude da sua capacidade de determinação multiresidual em baixos níveis de concentração em amostras ambientais.

BORTOLUZZI et al (2006) quantificou por HPLC-UV a presença de moléculas de agrotóxicos em águas superficiais de uma microbacia hidrográfica em Agudo no Rio Grande do Sul.

SACHER (2001) sugere que o método por cromatografia líquida de alta eficiência pode ser utilizado para a determinação de antineoplásicos em amostras *wipe test* (este teste visa determinar a presença de quimioterápicos sobre as superfícies ou materiais), pois no estudo realizado por estes autores, os resultados foram suficientes exatos e precisos nas áreas de manipulação destes fármacos em hospitais.

A literatura relata o uso do HPLC para a identificação do antineoplásico ciclofosfamida em matrizes ambientais (PYY et al, 1988; SORSA et al, 1988 e MCDEVITT et al, 1993).

Nos últimos anos, várias metodologias usando o HPLC foram desenvolvidas para a detecção de fármacos residuais na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} em ambiente aquático, como para: antineoplásicos (HANSEL et al, 1997; STEGER-HARTMANN et al, 1996; KÜMMERER e HELMERS, 1997), antiinflamatórios (TERNES, 2001); antibióticos (HIRSCH et al, 1999; STUMPF et al, 1999); estrogênios (REIS-FILHO et al, 2006).

Em virtude do aumento de consumo de medicamentos e da comprovada taxa de remoção incompleta dos fármacos pelas ETes (STUMPF et al, 1999), o desenvolvimento e utilização de métodos analíticos suficientemente sensíveis, entre eles o HPLC, na determinação e monitoração dos fármacos residuais em ambiente aquáticos, justifica sua utilização.

5.3. Ensaio Ecotoxicológicos e Mutagênicos

Os testes de toxicidade ambiental são procedimentos padronizados que consistem basicamente na exposição de organismos aquáticos representativos sob o ponto de vista ecológico, a concentrações conhecidas de uma ou mais substâncias-teste, ou a fatores ambientais, por um período de tempo determinado (CETESB, 1990). Representam uma importante ferramenta para avaliação da sensibilidade de organismos aquáticos a poluentes e medicamentos, sendo os teste de toxicidade aguda e crônica a base de estudos científicos nesta complexa área (FRELLO, 1998; FERREIRA, 2003).

Em geral, os testes de toxicidade são utilizados para se detectar e controlar poluentes tóxicos que estejam presentes nos efluentes industriais (CETESB, 1990). Os testes adotados devem ser bem definidos e padronizados, para que se possa realizar o mesmo nível de controle de toxicidade, em diferentes corpos receptores e em efluentes com os mais diversos poluentes (BERTOLETTI, 1989).

A magnitude da resposta desses organismos ao agente tóxico é avaliada através de algum efeito sobre os organismos que tenham também significado ecológico. Os efeitos tóxicos podem incluir tanto a letalidade (mortalidade) e efeitos sub-letais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais. Podendo ser expressos através de critérios mensuráveis como o número de organismos mortos, alterações no tamanho e peso, porcentagem de inibição de enzima, incidência de tumor, dentre outros (RAND e PETROCELLI, 1985).

Um variedade de protocolos de testes têm sido desenvolvidas para a geração e interpretação de dados na avaliação de risco, impacto e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas sobre a biota aquática e em efluentes (FERREIRA, 2003), desde que esses dados reúnam propriedades toxicológicas e estatísticas que lhe confirmam validade. A resolução do CONAMA 357/2005 que dispõe sobre a classificação de corpos de água preconiza a utilização de testes toxicológicos para classificação, avaliação e monitoramento dos corpos da água e efluentes.

5.3.1. Teste de Toxicidade Aguda e Crônica

As duas respostas mensuráveis associadas aos efeitos que os agentes químicos promovem nos organismos aquáticos são: as de natureza aguda e as de natureza crônica.

Para AZEVEDO e CHASIN (2003) os estudos de toxicidade aguda visam demonstrar a ocorrência de efeito adverso num curto período de tempo, de acordo com procedimentos protocolares. O objetivo deste teste é determinar a concentração do material (substância química ou efluente) que produz um efeito deletério na população exposta durante um curto período de tempo (24-48 h) sob condições controladas (RAND, 1995).

Geralmente, os efeitos agudos são severos, sendo que um dos mais comumente medidos é a mortalidade, perda de motilidade em invertebrados e inibição de crescimento em algas. Esses estudos frequentemente envolvem a determinação de uma dose letal média (DL₅₀) ou uma concentração letal média (CL₅₀) para o ambiente aquático.

O principal teste de ecotoxicidade aguda é a determinação da CL₅₀. Quando outros efeitos são medidos, e não a mortalidade, a expressão usada é a CE₅₀, que é definida como a concentração estimada do agente tóxico que produz um efeito específico (comportamental ou fisiológico) a 50% da população após um período de tempo pré-estabelecido (CETESB, 1992).

Usualmente, o teste inicial a ser aplicado é com *Daphnia similis* ou *Daphnia magna*, sendo este um organismo que apresenta grande sensibilidade a uma elevada diversidade de poluentes, este teste pode ser efetuado com rapidez e avalia a toxicidade aguda (CETESB, 1990).

A *Daphnia magna* tem sido amplamente utilizada como bioindicador nos testes de toxicidade, por ser de fácil manutenção em laboratórios e sensíveis a diferentes grupos de agentes químicos. A CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental utiliza, a *Daphnia similis* em testes de toxicidade. Já, o microcrustáceo utilizado pelo Instituto Ambiental do Paraná – IAP é a *Daphnia magna*. Para realização de testes agudos com *Daphnia magna*, dentre a normatização internacional, cita-se a existência de duas normas: a americana estabelecida pela "International Standard Organization" - ISO 6341 (ISO, 1996) e a alemã desenvolvida pelo "Deutsches Institut für Normung" - DIN 38412 (DIN, 1989). No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT normatizou o uso da espécie através da NBR 12.713 (ABNT, 2003).

No estado de Santa Catarina, os ensaios de toxicidade aguda são regulamentados pela Fundação do Meio Ambiente – FATMA, pela portaria nº 017/02, que estabelece os Limites Máximos de Toxicidade Aguda para Efluentes de Diferentes Origens.

O teste crônico é importante e complementar ao teste agudo, pois a ausência de efeito agudo não caracteriza ausência de efeito sobre a biota. Segundo TERRA e FEIDEN (2003) a expressão de muitos agressores ambientais somente torna-se visível quando estão presentes em altas doses. Entretanto, quando eles existem em porções menores seus efeitos na bagagem genética dos indivíduos, interferem nas suas funções fisiológicas, altera a frequência reprodutiva e/ou a qualidade e quantidade de organismos gerados.

Os efeitos crônicos podem surgir quando os organismos são submetidos, por um longo período, a baixas concentrações de poluentes tóxicos que se encontram em efluentes líquidos, sendo estes tratados ou não (ZAGATTO et al, 1988).

Os testes crônicos permitem avaliar os possíveis efeitos adversos de uma amostra sob condições de longo tempo de exposição a concentrações sub-letais (RAND, 1995). Em um teste de toxicidade crônica completo o organismo-teste é exposto à varias concentrações da solução-teste durante seu ciclo reprodutivo completo. Os teste em que estágios de vida iniciais são expostos à varias

concentrações do agente químico incluem a exposição de ovos, embriões, larvas ou alevinos de peixes durante 1-2 meses. O resultado é expresso em Concentração de Efeito Não Observado - CENO, sendo esta a mais alta concentração do agente testada que não provoca efeito quando comparada com o controle; e em Concentração de Efeito Observado - CEO, a mais baixa concentração que causa efeito significativo sobre a população quando comparada ao controle.

Apesar de que estes testes não proporcionam dados sobre o ciclo de vida total de exposição, os resultados têm sido utilizados para prever, os valores de parâmetros de segurança em estabelecimento de concentrações máximas permissíveis em corpos de água.

Segundo BRENTANO (2006), não existem protocolos definidos e publicados para a realização de testes crônicos com *Daphnia magna*. Atualmente, no Brasil, os testes crônicos são contemplados na Resolução CONAMA nº 357/2005 e exigidos para realização do enquadramento dos corpos hídricos. Para fins de interpretação da resolução, efeito tóxico crônico é definido como efeito deletério aos organismos vivos causados por agentes físicos ou químicos que afetam uma ou várias funções biológicas dos organismos, tais como a reprodução, o crescimento e o comportamento, em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele. A mesma resolução descreve em seu artigo 8º, inciso 4º que possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados na resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos.

5.3.2. Ensaio de Mutagenicidade

Já existem inúmeras evidências experimentais, sobre os efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos de muitas substâncias no meio ambiente, sob forma de poluentes industriais, fármacos, defensivos agrícolas, cosméticos, produtos de combustão, aditivos alimentares, entre outros (ZEIGER et al, 1992; MORENO e GALLEGOS, 2002).

Compostos orgânicos com atividade mutagênica podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que podem estar associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Em geral são capazes de produzir lesões nas moléculas de DNA, podendo acarretar em alterações genéticas e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (RIBEIRO et al, 2003). No entanto, a identificação destes compostos químicos com atividade genotóxica na água potável, no esgoto ou nos efluentes industriais é difícil uma vez que não estão presentes em altas concentrações (STAHL, 1991).

Segundo AMES e GOLD (2000), a proporção de câncer causada por agentes químicos ambientais é baixa quando comparada com a proporção dos cânceres associados ao estilo de vida

(cigarro, dieta), às infecções ou carcinógenos naturais. No entanto, apesar de ser uma fonte menor de mutagênese, esta exposição adicional representa um aumento na carga mutagênica, onde o risco em excesso necessita ser avaliado e, se possível, minimizado.

O desenvolvimento de ferramentas que permitam precisar quali-quantitativamente a avaliação dos riscos químicos, físicos e biológicos tornou-se prioridade internacional. A geração de riscos globais com multiefeitos, contaminação e poluição de vários meios (ar, água, solo) e a exposição de várias espécies da fauna e flora em diferentes escalas temporais e espaciais, conscientizou as Agencias Internacionais de pesquisa a promover discussões sobre a avaliação do risco ecológico e da saúde humana (WHO, 2002).

Em 1969, foi criada *E.M.S.* (Environmental Mutagen Society), junto com ela veio o Centro de Informações de Mutágenos Ambientais, o *E.M.I.C.* (Environmental Mutagen Information Center) para facilitar o acesso dos pesquisadores à dispersa informação bibliográfica. Mais tarde, outras Organizações propuseram normas para o controle das substâncias mutagênicas como: o *C.E.E.* (Comunidade Econômica Européia, 1979; Comunidade Econômica Européia, 1984), a *O.C.D.E.* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômicos 1981), a *I.C.P.E.M.C.* (International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens, 1982, 1983a e 1983b), a *I.A.R.C.* (International Agency for Research on Cancer, 1982) e o *I.P.C.S.* (International Programme on Chemical Safety, 1985) entre outros (MORENO e GALLEGO, 2002).

A Fundação Americana de Saúde, mediante o estudo de WEISBURGER (2001) realizou um percurso sobre a resposta antimutagênica e anticarcinogênica desde o passado até a atualidade, e concluíram que uma bateria de testes para detectar a reatividade no DNA de um organismo procariótico (como o Teste de Ames), e para ver a reparação no DNA de um sistema eucariótico (como o Teste do Cometa), juntas possuem uma sensibilidade acima do 90%.

RAAT et al (1985) defendem a importância do teste ecotoxicológicos para avaliar a descarga industrial no ambiente aquático, pois gera dados científicos que auxiliam as agências governamentais na tomada de decisões. Já STAHL (1991) reforça a necessidade de teste genotóxicos de rotina também para monitorar a qualidade das águas utilizadas para recreação e para consumo.

Hoje em dia, existem várias metodologias validadas para o monitoramento de mutagênese e a escolha depende das condições do laboratório e/ou dos objetivos do trabalho. Dentre estas metodologias, há os teste que utilizam microrganismos, entre eles podemos citar, *Teste de Ames*, *Cromoteste SOS* e *Induteste* e os testes com células de organismos eucariotos, como por exemplo o *Teste do Cometa*, *Teste SMART* e o *Teste do Micronúcleo*.

Teste de Ames: Também conhecido como teste de *Salmonella*/Microsoma mede a indução de mutação reversa em linhagens bacterianas de *Salmonella typhimurium* auxotróficas (*His-*) para o aminoácido histidina que revertem às mesmas a prototrofia (*His+*). O teste é realizado na

presença e ausência de um sistema de metabolização exógeno, o que permite determinar substâncias com ação direta sobre o material genético da célula, monitorar a atividade positiva ou negativa dos metabólitos gerados pela biotransformação. O teste tem sido utilizado rotineiramente no mundo todo. Existe um extenso banco de dados de substâncias químicas já testadas (AMES et al, 1973; RIBEIRO et al, 2003).

SOS Cromoteste: É um teste quantitativo/colorimétrico baseado na avaliação das funções SOS através do monitoramento dos níveis da enzima β -galactosidase, em linhagens da bactéria *Escherichia coli*. Este teste fornece uma estimativa do grau de indução SOS (caracteriza pela ativação de um grande número de genes em resposta a situações de estresse) provocada pela substância em estudo. O cromoteste SOS é um dos testes de mutagênese mais utilizados para detecção de genotoxinas (SILVA et al, 2003).

Induteste: O teste de indução lisogênica baseia-se na clivagem do repressor do profago em células lisogênicas de *E. coli* mediada pela protease RecA. O DNA de um fago temperado pode ser incorporar-se ao cromossomo bacteriano sob forma de profago, mantendo-se em equilíbrio pela atuação de um repressor de natureza protéica codificado pelo profago. Este equilíbrio pode ser rompido pela clivagem do repressor levando à indução lisogênica. O processo pode ser desencadeado por agentes físicos e químicos e, portanto, serve de indicador de lesões no DNA e inibição da replicação semiconservativa (SILVA et al, 2003).

Teste do Cometa: Ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis Assay) é uma técnica que se aplica para descobrir a genotoxicidade em animais experimentais ou plantas; a vantagem mais importante é que as lesões no DNA podem ser medidas em qualquer órgão. Pode ser usado em estudos de reparo do DNA, fornecendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada. Apresenta grande sensibilidade e rapidez de resultados em estudos de genotoxicidade e pode ser utilizado para avaliação de produtos químicos em larga escala (SILVA et al, 2003).

Teste SMART: O teste SMART (teste para detecção de mutação e recombinação somática) em asa de *Drosophila melanogaster*, fundamenta-se na premissa de que durante o desenvolvimento embrionário, grupos de células proliferam mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante a metamorfose, em estruturas que origina, as asas das moscas adultas. Este teste permite a detecção de genotoxinas de ação direta bem como daquelas que somente quando metabolizadas exercem sua atividade genotóxica (RIBEIRO et al, 2003). Cerca de 300 compostos químicos já foram avaliados no teste SMART de asa, tem sido aplicado para estudos

qualitativos e quantitativos ou para estabelecer relações entre estrutura e efeito de uma série de compostos químicos (SILVA et al, 2003). O SMART também foi utilizado por AMARAL (2001) para detecção da contaminação aquática por dejetos de origem urbana.

Teste do Micronúcleo: O teste é utilizado para avaliar os efeitos de agentes mutagênicos nos cromossomos. O efeito da substância a ser testada é verificado em esfregaços de células, onde o biomarcador é o micronúcleo. É considerado um ensaio tecnicamente simples, sendo usado rotineiramente, para uma avaliação toxicológica inicial (avaliação do perigo) no desenvolvimento de agentes químicos e medicamentos (FENECH, 1997; RIBEIRO et al, 2003). Maiores detalhes estão descritos a seguir.

Teste do Micronúcleo

O estudo de micronúcleos se constitui em um dos métodos para a medida de danos cromossômicos espontâneos ou induzidos, ou ainda de erros de segregação, uma vez que o micronúcleo resulta da produção de fragmentos acêntricos, ou de cromossomos inteiros que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula em anáfase. Quando a célula entra em telófase, tanto fragmentos acêntricos como cromossomos com quebras cromossômicas ou cromatídicas, ou ainda, cromossomos inteiros perdidos por problemas no fuso mitótico, são incluídas nas células filhas, podendo se fundir com o núcleo principal ou formar um ou mais núcleos secundários: os micronúcleos (HEDLLE et al, 1983; FENECH, 1997).

A presença de micronúcleos pode ser considerada como uma indicação de ocorrência prévia de aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas em algum momento do ciclo de vida das células (GRISOLIA e STARLING, 2001). Segundo HEDDLE et al (1983), este teste é potencialmente sensível para quantificar a frequência de anormalidades cromossômicas surgidas nos cromossomos humanos.

Os micronúcleos são facilmente detectados em células interfásicas como corpúsculo intracitoplasmáticos livres. Estes corpúsculos são pequenos, arredondados a ovais, encontrados no citoplasma normalmente ao lado do núcleo principal. A sua semelhança com o núcleo principal em forma, textura, coloração e conteúdo de DNA é que facilita sua detecção (GRISOLIA e CORDEIRO, 2000).

Uma vez que os teleósteos apresentam eritrócitos nucleados, a presença de micronúcleos pode ser usada como medida da atividade clastogênica ou aneugênica de uma substância em ambiente aquático (AL-SABTI e METCALFE, 1995). HOSE et al (1987) observaram a presença de anomalias adicionais, como a perda da forma elíptica de núcleos e o aparecimento de estruturas Feulgen-positivo

no citoplasma. Embora o aparecimento de fragmentos nucleares não se adapte à definição clássica de micronúcleos, são manifestações quantificáveis de genotoxicidade em vertebrados inferiores.

Como a formação dos micronúcleos só pode ser observada após a ocorrência da divisão celular, as frequências desses em um conjunto de células é dependente do tempo que a célula leva para entrar em divisão, do tipo de tecido, da espécie que está sendo usada para o teste e de condições ambientais (AL-SABTI e METCALFE, 1995). Em todos os ensaios com micronúcleos deve-se levar em consideração a sua ocorrência espontânea.

O teste do micronúcleo (MNs) constitui-se, então, em um teste de curto prazo, que pode ser realizado tanto em células nucleadas de mamíferos quanto de peixes, com boa sensibilidade para detectar danos nos cromossomos ou no aparelho mitótico originados por xenobióticos, além de ser bem aceito por várias autoridades regulamentatórias, incluindo o Guia de Substâncias Químicas Testadas para Mutagenicidade - Grã -Bretanha (1981) e é indicado pelos membros do Mercado Comum Europeu para a análise de substâncias químicas e controle de qualidade (DIRETIVA 92/69/CEE, MÉTODO B12).

PINTO-SILVA (2000) detectou a atividade genotóxica do ácido ocadáico, pelo teste do micronúcleo em hemócitos de mexilhões Perna-perna e concluiu que este organismo e este teste sejam utilizados para a detecção precoce desta toxina no ambiente marinho, principalmente em locais de cultivo de mexilhões.

O Teste do MNs Písceo é um ensaio muito utilizado para investigação de efeitos genotóxicos causados por poluentes ambientais, tanto em condições laboratoriais como no campo. Segundo SÁNCHEZ-GALÁN et al (1998), os peixes são considerados bons indicadores para a detecção de contaminação de recursos hídricos por substâncias genotóxicas.

São diversos os trabalhos utilizando a técnica do micronúcleo para avaliação de mutagenicidade e/ou antimutagenicidade de diversos compostos aos quais os seres humanos estão expostos.

GRISOLIA e CORDEIRO (2000) testaram diferenças de respostas entre três espécies de peixes (*Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*) a quatro compostos clastogênicos: bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluorouracil e mitomicina C e verificaram que, em geral, a CF apresentou maior potencial clastogênico que os demais compostos; a espécie *T.rendalli* foi a mais sensível e *C. carpio* a mais resistente.

GRISOLIA e STARLING (2001) adotaram o teste de MNs para avaliar dano genético em várias espécies de peixes causado pelo efluente de duas ETEs municipal que despejam seus efluentes no lago Paranoá (Brasil) em outro estudo GRISOLIA et al (2005) avaliaram a genotoxicidade do efluente final antes de ser liberado no lago Paranoá de uma ETE municipal.

DELMANTO et al (2001) relataram que o chá do cogumelo *Agaricus blazei*, conhecido como “cogumelo do sol” apresentou efeito protetor contra a mutagenicidade da CF em camundongos *Swiss*,

também através da análise de micronúcleos, tanto em eritrócitos policromáticos da medula óssea quanto em reticulócitos do sangue periférico.

PEREIRA et al (2005), avaliaram a capacidade do extrato alcoólico da *Punica granatum* como agente quimioprotetor e adjuvante no tratamento do câncer, em roedores em animais antes-tratados com CF na dose de 200 mg.Kg⁻¹, para indução de danos no DNA. FAGUNDES et al (2005), utilizaram a CF, como controle positivo para avaliar o efeito mutagênico da *amona coricea* em camundongos.

Os trabalhos acima exemplificam bem a potencialidade do teste do micronúcleo nos ensaios de avaliação de mutagenicidade, bem como, a utilidade do antineoplásico CF, como controle positivo do teste de genotoxicidade em função da sua propriedade mutagênica.

A complexibilidade natural do ambiente aquático impede de predizer exatamente o que ocorrerá com um agente químico quando este for liberado e se sua presença é um fator de risco para o ser humano e para o meio ambiente. Esta constatação tem instigado o aumento do interesse por parte dos pesquisadores e agências regulamentadoras em desenvolver e testar metodologias que permitam a detecção e a avaliação química, biológica e toxicológica de micropoluentes orgânicos em ambientes aquáticos e seus possíveis impactos ambientais.

Essas ferramentas metodológicas são fundamentais para o processo de gestão dos resíduos de saúde e permite a elaboração de ações com relação à descarga desses efluentes no meio ambiente.

6. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Neste capítulo, estão descritos os procedimentos metodológicos para a aquisição das metas dessa pesquisa, sendo dividido em cinco etapas:

Etapa preliminar: *Delimitação da Abrangência do Estudo*

Etapa 1: *Levantamento de Dados*

Etapa 2: *Biodegradabilidade da Ciclofosfamida por Processo Anaeróbio*

Etapa 3: *Avaliação Cromatográfica*

Etapa 4: *Testes de Toxicidade e Mutagenicidade*

6.1. Etapa Preliminar: *Delimitação da Abrangência do Estudo*

Este estudo abrange os estabelecimentos de saúde públicos e particulares, envolvidos diretamente com quimioterapia antineoplásica, atuantes no estado de Santa Catarina e na cidade de Florianópolis/SC. O estudo foi centralizado no fármaco antineoplásico mais utilizado nos tratamentos de câncer em Florianópolis.

Procedimento Metodológico

Coleta de informações, junto a Secretaria de Saúde do Governo do Estado de Santa Catarina, bem como a Cooperativa de Médicos de Santa Catarina – UNIMED/SC, sobre:

1. Os estabelecimentos públicos e privados cadastrados envolvidos com o tratamento antineoplásico no Estado de SC, no ano de 2002.
2. A localização geográfica dos mesmos, em Florianópolis e,
3. O destino dos efluentes gerados por esses estabelecimentos,

Esses resultados permitiram a realização da *Etapa 1* (Levantamento de Dados) sobre o consumo de antineoplásicos nos estabelecimentos de saúde em Florianópolis/SC.

6.2. Etapa 1: *Levantamento de Dados*

A importância do levantamento dos dados nos estabelecimentos de saúde (públicos e privados) atuantes na cidade de Florianópolis/SC consistiu no conhecimento dos antineoplásicos mais utilizados, como também a quantificação do uso mensal/anual dos mesmos. A avaliação destes dados permitiu:

- 1º A seleção do antineoplásico referência a ser utilizado no presente estudo;
- 2º A verificação da dose média administrada aos pacientes tratados com o antineoplásico selecionado.

Procedimento Metodológico

Por meio de ofícios (ANEXO 10.1), foi solicitado aos estabelecimentos de saúde de Florianópolis permissão para efetuar a compilação do “Livro de Registros de Preparo e Consumo de Quimioterápicos”. Dessa consulta foram extraídas informações quantitativas referentes aos antineoplásicos utilizados em cada um dos estabelecimentos. Os dados foram analisados mensalmente, com auxílio de uma planilha de cálculo (programa Microsoft Excel -XP).

Aspectos Bioéticos

A coleta de dados foi realizada respeitando-se o sigilo da informação e a confidencialidade dos indivíduos cadastrados. Todas as etapas foram realizadas com restrição de acesso e cuidados de segurança e armazenagem da informação, conforme normas para realização de Pesquisas em Seres Humanos preconizadas na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Esses resultados serviram de subsídios para *etapa 2*.

6.3. Etapa 2: *Biodegradabilidade da Ciclofosfamida por Processo Anaeróbio*

Nesta etapa verificou-se a degradação da CF por meio de um processo biológico anaeróbio, bem como a eventual interferência no referido processo. As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA) e os ensaios experimentais aconteceram no Laboratório Experimental de Resíduos Sólidos (LARESO) pertencente ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS) da UFSC.

Para avaliação do potencial de degradabilidade da CF, primeiramente foi selecionada a biomassa anaeróbia a ser utilizada como inóculo. Para tanto, foi realizado o ensaio para *Avaliação da Atividade de Metanogênica Específica* (AME), visando verificar a capacidade do lodo de transformar acetato, hidrogênio e gás carbônico em metano. Na sequência foi realizado o teste para *Avaliação da*

Biodegradabilidade da CF em diferentes concentrações, com intuito de estabelecer o grau de degradabilidade do fármaco e verificar a possibilidade de interferência do mesmo sobre o processo anaeróbio.

Inóculo (Lodo Anaeróbio)

Coleta e armazenamento

A biomassa utilizada como inóculo para os frascos reatores, foi proveniente de um reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) industrial, utilizado no tratamento de efluentes oriundo da fabricação de cerveja, por se tratar de um lodo potencialmente ativo. O lodo (FIG. 8) foi armazenado em bombonas de 20 litros e mantido em temperatura controlada em uma estufa de DBO a 35°C, (Marca DIST).

Análises físico-químicas – Caracterização

Os métodos adotados para a realização das análises de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), potencial hidrogeniônico (pH), demanda química de oxigênio (DQO) seguiram os padrões estabelecidos pelo Standard Methods (APHA-AWWA-WPCF, 2002).



FIGURA 8: Estufa DBO utilizada para armazenar o lodo anaeróbio a 35°C

Substância-teste (Ciclofosfamida)

A ciclofosfamida (Asta Medica Oncology) utilizada neste estudo, foi preparada a partir de um frasco ampola de 200,0 mg (pó), diluído em 10,0 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, perfazendo uma concentração final de 20,0 mg.mL⁻¹.

Soluções estoques

As soluções de nutrientes e de ácidos voláteis utilizadas nos ensaios de AME e Biodegradabilidade foram previamente preparadas e estocadas em geladeira a 5°C. A composição das mesmas está descrita na TAB 4.

TABELA 4: Composição das Soluções Estoques

Solução Estoque	Solução	Quantidade
<u>Solução 1</u> Macronutrientes	NH ₄ CL	170,0 g.L ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	37,0 g.L ⁻¹
	MgSO ₄ .7H ₂ O	11,5 g.L ⁻¹
	CaCl ₂ .2H ₂ O	8,0 g.L ⁻¹
<u>Solução 2</u> Micronutrientes	FeCl ₃ .6H ₂ O	2000,0 mg.L ⁻¹
	CoCl ₂ .6H ₂ O	1088,0 mg.L ⁻¹
	MnCl ₂ .4H ₂ O	500,0 mg.L ⁻¹
	CuSO ₄ .5H ₂ O	38,0 mg.L ⁻¹
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	106,0 mg.L ⁻¹
	H ₃ B ₃	50,0 mg.L ⁻¹
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ .4H ₂ O	90,0 mg.L ⁻¹
	Na ₂ SeO ₃	100,0 mg.L ⁻¹
	NiCl ₂ .6H ₂ O	50,0 mg.L ⁻¹
	EDTA	1000,0 mg.L ⁻¹
HCl concentrado	1,0 mL.L ⁻¹	
<u>Solução 3</u> Meio redutor	Na ₂ S.9H ₂ O	100,0 mg.L ⁻¹
<u>Solução 4</u> Ácidos Orgânicos (substrato)	Ácido Acético	28,0 g.L ⁻¹
	Ácido Propiônico	28,0 g.L ⁻¹
	Ácido Butírico	28,0 g.L ⁻¹

Metodologia analítica

A metodologia adotada para os ensaios de Atividade Metanogênica (AME) e Biodegradabilidade seguiram o protocolo desenvolvido por SOARES e HIRATA (1997) e adaptado

por PINTO, 2006. Trabalhou-se com uma relação de inóculo/substrato de 5,0 g SV/L de concentração celular para 5,0 g DQO.L⁻¹ de ácidos orgânicos, ou seja, uma relação 1:1.

A montagem do processo é descrita a seguir e a FIG 9, ilustra o sistema utilizado.

1. Determinar a quantidade de sólidos voláteis presentes no lodo (inóculo) a ser analisado (gSV/L);
2. Colocar a quantidade pré-estabelecida de inóculo em cada digestor anaeróbio (FRASCO I), a fim de se obter uma concentração final de inóculo correspondente a 5,0 gSV/L;
3. Adicionar aos FRASCOS I, quantidades determinadas da solução 1, solução 2, solução 3, solução 4, solução tampão (correção do pH) e completar com água destilada. O volume final da mistura deverá ocupar entre 70 e 90% do volume do frasco reator;
4. Fazer a purga do oxigênio presente nos FRASCOS I, através de borbulhamento com nitrogênio gasoso (pressão de 5 psi durante 5 minutos);
5. Fechar os FRASCOS I, com rolhas de silicone (adaptadas com orifícios para a saída do gás) e vedar com cola de silicone;
6. Conectar FRASCO I ao FRASCO II (frasco de segurança), para que permite o deslocamento do gás metano para o FRASCO III (o frasco invertido está preenchido com uma solução alcalina de NaOH 5%, que favorece a retenção de CO₂ produzido);
7. Incubar os FRASCOS I, em um banho-maria à temperatura controlada de 35 °C;
8. Registrar os volumes de gás metano produzido, em cada intervalo de tempo, ao longo do período do teste (mL/h). O volume de líquido expulso do FRASCO III, deve corresponder ao volume de gás produzido no frasco IV;
9. Corrigir o volume de gás metano para as condições normais de temperatura e pressão (CNTP) e,
10. Calcular atividade metanogênica máxima, considerando que 1g de DQO degradada produz 350 mL de gás metano.

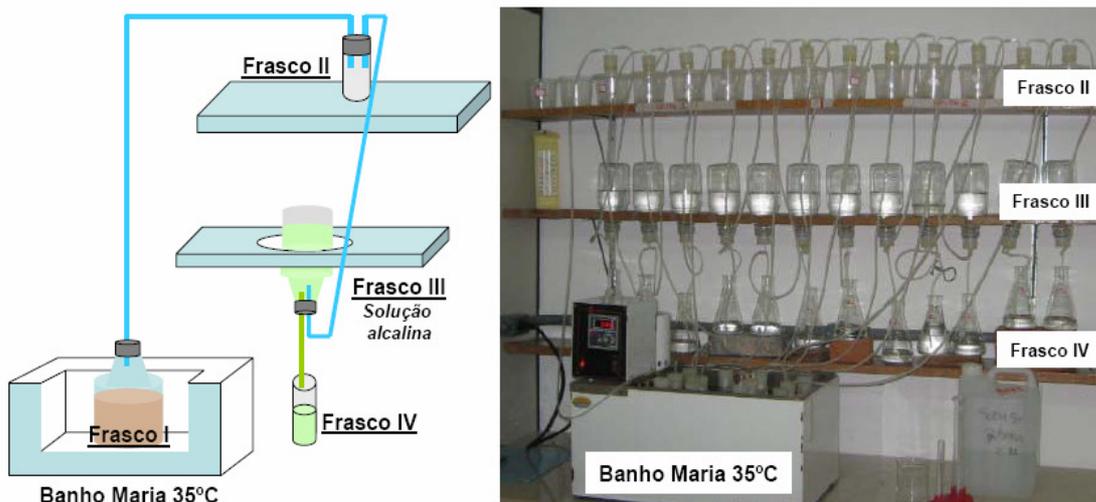


FIGURA 9: Sistema utilizado para nos teste de AME e Biodegradabilidade

Registro do gás metano

O volume de metano desprendido do gasômetro foi registrado na planilha apresentada no ANEXO 10. A medição foi realizada após 15 minutos do início do teste. Nas primeiras oito horas as leituras foram feitas a cada 2 horas, após esse período as leituras foram feitas somente uma vez ao dia, até o término do experimento.

1º experimento: Avaliação da Atividade de Metanogênica Específica (AME)

Objetivo: Avaliar a atividade metanogênica específica (AME) do lodo, em termos da quantidade de metano produzido por dia, por grama de SV, verificando assim as condições reais da atividade microbiana do referido lodo.

Inicialmente fez-se a caracterização do lodo selecionado como inóculo em termos de potencial hidrogeniônico (pH), Sólidos Totais (ST) e Sólidos Voláteis (SV) e Demanda Química de Oxigênio (DQO).

O ensaio de AME foi conduzido utilizando digestores de 200 mL, sendo 180 mL de volume útil para a mistura (inóculo + nutriente + substrato + água). A composição das soluções estoques encontra-se na TAB. 4.

O ensaio foi realizado em triplicata, a montagem do processo está descrita no item 6.3.1 (Metodologia analítica). Foram montados seis (6) digestores anaeróbios, subdivididos em dois grupos: o primeiro grupo foi denominado *controle* e o outro de *ácidos orgânicos*, a TAB 5. apresenta a composição de cada grupo.

O experimento teve a duração de dez dias (240 horas).

TABELA 5: Composição dos digestores anaeróbios (FRASCO I) - AME

Composição	Grupo (<i>controle</i>)	Grupo (<i>ác. Orgânicos</i>)
<i>Inóculo (lodo)</i>	15,8 g	15,8 g
<i>Solução 1</i>	2,4 mL	2,4 mL
<i>Solução 2</i>	0,4 mL	0,4 mL
<i>Solução 3</i>	2 gotas	2 gotas
<i>Solução 4</i>	--	7,3 mL
<i>Solução Tampão *</i>	--	20,0 mL
<i>Água destilada</i>	q.s.p 180,0 mL	q.s.p 180,0 mL

*: quando necessário

q.s.p.: quantidade suficiente para

2º experimento: Avaliação da biodegradabilidade da CF

Objetivo: Submeter diferentes concentrações de ciclofosfamida (CF) à degradação por uma biomassa conhecidamente ativa, e assim verificar o potencial de aplicabilidade do processo de digestão anaeróbia ao tratamento desse resíduo.

O inóculo previamente estabilizado e caracterizado pelo teste de AME, mais os nutrientes e substratos foram colocados nos digestores anaeróbios juntamente com diferentes doses de ciclofosfamida (2,0; 20,0; 200,0 e 500,0 mg.L⁻¹).

Uma vez adicionadas todas as soluções necessárias, lacrados os frascos e realizado a troca atmosférica por nitrogênio gasoso, os digestores anaeróbios foram levados ao banho-maria (35°C) e iniciou-se a contagem do tempo. A avaliação do processo se deu através do volume de biogás produzido. As leituras de volume de gás foram feitas após 15 minutos do início do teste. Nos primeiros dois dias foram feitas medidas do volume de biogás três (3) vezes ao dia. Após esse período as medidas foram tomadas uma vez ao dia, durante trinta dias. Os ensaios foram montados e acompanhados, seguindo o mesmo procedimento adotado para o teste de atividade metanogênica (AME). Ambos os ensaios foram realizados em triplicata.

Neste experimento, foram montadas duas baterias:

1ª bateria: Biodegradabilidade da (CF) nas concentrações (2,0; 20,0 e 200,0 mg.L⁻¹).

2ª bateria: Biodegradabilidade da (CF) nas concentrações (20,0; 200,0 e 500,0 mg.L⁻¹).

1ª bateria: Biodegradabilidade da (CF) nas concentrações (2,0; 20,0 e 200,0 mg.L⁻¹).

Os ensaios foram realizados em triplicata, a montagem do processo foi feita conforme já descrito. Ao todo foram montados quinze (15) digestores anaeróbios, subdivididos em cinco (5) grupos denominados: **amostra 1** (Branco - controle), **amostra 2** (ácidos orgânicos - controle), **amostra 3** (CF 2,0 mg.L⁻¹), **amostra 4** (CF 20,0 mg.L⁻¹) e **amostra 5** (CF 200,0 mg.L⁻¹). A TAB. 6 apresenta a composição dos digestores para cada grupo.

TABELA 6: Composição dos digestores anaeróbios (FRASCO I) - 1ª bateria

Composição	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Inóculo (lodo)	15,8 g	15,8 g	15,8 g	15,8 g	15,8 g
Solução 1	2,4 mL	2,4 mL	2,4 mL	2,4 mL	2,4 mL
Solução 2	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL
Solução 3	2 gotas	2 gotas	2 gotas	2 gotas	2 gotas
Solução 4	--	7,3 mL	7,3 mL	7,3 mL	7,3 mL
Ciclofosfamida	--	--	2,0 mg.L ⁻¹	20,0 mg.L ⁻¹	200,0 mg.L ⁻¹
Sol. Tampão *	--	20,0 mL	20,0 mL	20,0 mL	20,0 mL
Água destilada	q.s.p 0,18L	q.s.p 0,18L	q.s.p 0,18L	q.s.p 0,18L	q.s.p 0,18L

*: quando necessário

2ª bateria: Biodegradabilidade da (CF) nas concentrações (20,0; 200,0 e 500,0 mg.L⁻¹).

Os ensaios foram realizados em triplicata, a montagem do processo é idêntica à 1ª bateria, a exceção está na substituição do digestor *amostra 3* (CF 2,0 mg.L⁻¹ de) pelo digestor *amostra 6* (CF 500,0 mg.L⁻¹ de). Este ensaio consistiu de quinze (15) digestores anaeróbios, subdivididos em 5 grupos denominados: *amostra 1* (Branco - controle), *amostra 2* (ácidos orgânicos - controle), *amostra 4* (CF 20,0 mg.L⁻¹), *amostra 5* (CF 200,0 mg.L⁻¹) e *amostra 6* (CF 500,0 mg.L⁻¹). A TAB. 7 apresenta a composição dos digestores anaeróbios para cada grupo.

TABELA 7: Composição dos digestores anaeróbios (FRASCO I) - 2ª bateria

Composição	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
<i>Inóculo (lodo)</i>	15,8 g	15,8 g	15,8 g	15,8 g	15,8 g
<i>Solução 1</i>	2,4 mL	2,4 mL	2,4 mL	2,4 mL	2,4 mL
<i>Solução 2</i>	0,36 mL	0,36 mL	0,36 mL	0,36 mL	0,36 mL
<i>Solução 3</i>	2 gotas	2 gotas	2 gotas	2 gotas	2 gotas
<i>Solução 4</i>	--	7,3 mL	7,3 mL	7,3 mL	7,3 mL
<i>Ciclofosfamida</i>	--	--	20,0 mg.L ⁻¹	200,0 mg.L ⁻¹	500,0 mg.L ⁻¹
<i>Sol. Tampão *</i>	--	20,0 mL	20,0 mL	20,0 mL	20,0 mL
<i>Água destilada</i>	q.s.p 0,18L	q.s.p 0,18L	q.s.p 0,18L	q.s.p 0,18L	q.s.p 0,18L

*: quando necessário

Ao término de cada bateria foram feitas as análises de DQO, para o cálculo da taxa de biodegradabilidade. A biodegradabilidade é a porcentagem de DQO biodegradada calculada pela relação entre a DQO solúvel final (DQO_f) e a DQO solúvel inicial (DQO_i). A DQO biodegradada ($DQO-BD$) é a diferença entre a DQO solúvel inicial e final.

$$DQO_{BD} = \frac{(DQO_i - DQO_f)}{DQO_i} \times 100$$

onde:

DQO_{BD} = % de DQO biodegradada;

DQO_i = concentração de DQO no início do teste (mg.L⁻¹)

DQO_f = concentração de DQO no final do teste (mg.L⁻¹)

6.4. Etapa 3: Avaliação Cromatográfica

Visando confirmar a biodegradação anaeróbia da CF realizada na etapa anterior. Os efluentes dos digestores anaeróbios foram quantificados por cromatografia líquida de alta performance acoplada ao detector de ultravioleta (HPLC-UV). Para investigação de metabólitos formados da biodegradação da CF foram utilizados HPLC-PDA e o cromatógrafo gasoso (CG-MS).

As análises foram executadas no Laboratório Analítico Instrumental - Cromatografia do SENAI - CIC/SETSAM e no Instituto Ambiental do Paraná (IAP), ambos localizados em Curitiba.

Nesta etapa foram executados dois procedimentos e uma análise complementar:

- ✓ **1º procedimento:** Detecção e quantificação da concentração de CF por HPLC-UV, nas amostras dos efluentes *antes e após o tratamento*.
- ✓ **Análise complementar:** Análise por HPLC - Detector de PDA com varredura na faixa de 195 à 600nm, para a verificação de intermediários da CF.
- ✓ **2º procedimento:** Determinação de metabólitos da degradação da CF após o tratamento anaeróbio por meio de cromatografia gasosa (CG-MS).

1º procedimento: Detecção e quantificação da concentração de CF por HPLC-UV, nas amostras *antes e após o tratamento*. Este foi o principal procedimento, visto que foi empregado para determinar a eficiência do tratamento anaeróbio na biodegradação da CF.

Amostras: Efluentes dos reatores (**amostra 1; 2; 3; 4; 5 e 6**), *antes e após o tratamento*, oriunda da etapa-2 (*Biodegradabilidade da Ciclofosfamida por Processo Anaeróbio*), totalizando doze (12) amostras (06 *antes* e 06 *após o tratamento*).

Condições cromatográficas

- ✓ O equipamento utilizado foi um HPLC (Hitachi Lachrom Elite) com auto sampler, bomba quaternária, forno para colunas e detector de UV;
- ✓ Fase móvel: água / acetonitrila (60:40) com fluxo de 1,0 mL/min;
- ✓ Temperatura do forno: 35°C
- ✓ Detector UV: 205 nm;
- ✓ Injeção de 20 µL de amostra;
- ✓ Tempo de retenção (T_R) da ciclofosfamida: 2,09 min.
- ✓ Tempo total de análise: 5 min e 45 min.
- ✓ Coluna LiChrospher 100 – RP 18 (5 µL) com 125 mm de comprimento (Marca Merck).

Validação da metodologia

A metodologia adotada foi baseada no estudo de HANSEL et al (1997). Visando melhorar o sistema de detecção, foi feito um enriquecimento das amostras e dos padrões utilizando o método de extração de fase sólida (SPE) com cartuchos de C18. Abaixo o procedimento executado:

Inicialmente foi realizada a ativação das colunas C18 (300 mg). As colunas foram ativadas com 5 mL de metanol grau HPLC e lavadas com 5 mL de água ultrapura. Através da coluna, utilizando uma bomba peristáltica, foram passados 50 mL do padrão e da amostra (uma coluna para cada), onde a CF ficou retida na coluna. Após a passagem do padrão e das amostras, as colunas foram secas a vácuo com fluxo de nitrogênio para a retirada de umidade por aproximadamente 1 h. Ao término deste intervalo, foi realizada a eluição da CF com 2,0 mL de metanol e o extrato obtido foi injetado no equipamento HPLC-UV.

Curva-padrão de ciclofosfamida

A solução padrão foi injetada no cromatógrafo líquido impreterivelmente no dia da injeção das amostras, com o objetivo de estabelecer uma curva-padrão do antineoplásico CF e possibilitar a detecção deste nas amostras de efluente *antes* e *após-tratamento*.

Porcentagem de remoção de Ciclofosfamida no efluente após-tratamento

Depois de detectada a concentração de CF, presente no efluente (*antes* e *após-tratamento*) foi calculada a porcentagem de remoção de CF no efluente pelo processo anaeróbio, utilizando a fórmula abaixo.

$$\%redução = \left(\frac{CF_i - CF_f}{CF_i} \right) \times 100$$

CF_i: concentração de CF inicial (efluente antes-tratamento)

CF_f: concentração de CF final (efluente após-tratamento)

Análise complementar: Análise por HPLC - Detector de PDA com varredura na faixa de 195 à 600nm, para a verificação de intermediários da ciclofosfamida.

Amostra: Para realização desta análise, foi selecionada a amostra 5 (*após o tratamento*), que corresponde ao reator n°5 (CF: 200,0 mg.L⁻¹), cuja composição foi descrita na TAB. 7, do item 6.3.2.

Condições cromatográficas

- ✓ O equipamento utilizado foi um HPLC (Waters) com bomba quaternária, forno para colunas e detector de PDA (Diode Array Detector);
- ✓ Fase Móvel: Água/Acetonitrila (60:40) com fluxo de 1,0 mL/min;
- ✓ Temperatura do Forno: 35°C;
- ✓ Detector de PDA com varredura na faixa de 195 à 600nm;
- ✓ Injeção de 20 µL de amostra;
- ✓ Tempo de retenção da ciclofosfamida: 3,364 min.;
- ✓ Tempo Total de análise: 40 min;
- ✓ Coluna Gemini Phenomenex C18 (5µm) com 250mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro.

Validação da metodologia

A conduta adotada para validação da metodologia foi à mesma descrita para o *1º procedimento*.

2º procedimento: Determinação de metabólitos da degradação da CF após o tratamento anaeróbio por meio de cromatografia gasosa (CG-MS).

Amostra: Foi selecionada a amostra 5 (*após o tratamento*), que corresponde ao reator n°5 (CF: 200mg.L⁻¹), cuja composição foi descrita na TAB. 7.

Condições cromatográficas:

- ✓ Cromatógrafo Gasoso (Varian modelo CP3900) com detector de espectrometria de massas (Varian modelo Saturn 2100T) e injetor automático (Varian CP-8410);
- ✓ Fase Móvel: hélio com fluxo de 1,0 mL/min;
- ✓ Injetor: 280°C, modo de injeção split/splitless;

- ✓ Temperatura do Forno: 110°C por 1 min, aquecimento até 290°C a 10°C/min, permanecendo em 290°C por 7 min;
- ✓ Detector: Mass Range (EI) 120-400 u; Séc/Scan: 1; Multiplier Delay: 5,8min; RF Level: 79,4amu; Íon Trap Temp: 230°C; Target: 25000;
- ✓ Injeção de 2µL de extrato;
- ✓ Tempo de retenção da ciclofosfamida: 14,05min. Tempo Total de análise: 26min;
- ✓ Coluna: Coluna Capilar Factor Four Varian modelo VF-5MS (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano) (0,25µm de espessura de filme) com 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,25mm (Marca Varian).

Validação da metodologia

Para a análise por CG/MS, foi feita uma extração e uma derivatização da amostra e do padrão utilizando o método SPE com cartuchos C18, conforme descrito por TERNES (2001). Segue abaixo do procedimento adotado:

Inicialmente foi feita a ativação das colunas C18 (300mg). As colunas foram ativadas com 5mL de metanol grau HPLC e lavadas com 5mL de água ultrapura. Através da coluna, utilizando uma bomba peristáltica, passou-se 50 mL do padrão e da amostra (uma coluna para padrão e uma para cada amostra), a CF ficou retida na coluna. Após a passagem do padrão e da amostra, as colunas foram secas sob vácuo com fluxo de nitrogênio visando a retirada de umidade por aproximadamente 1h. Após este intervalo, foi realizada a eluição da CF com 2mL de metanol. O extrato obtido foi concentrado sob nitrogênio até aproximadamente 100µL, em seguida foi adicionado ao extrato 50µL de ácido trifluoracético (TFAA) para a derivatização. O extrato final foi analisado por CG/MS nas condições cromatográficas descritas acima.

6.5. Etapa 4: *Teste de Toxicidade e Mutagenicidade*

Nesta etapa foram avaliados os efeitos agudos e crônicos causados no microcrustáceo *Daphnia magna* e o potencial mutagênico “Ensaio de Micronúcleo” em peixes da espécie *Geophagus brasilienses* e *Oreochromis* sp, das amostras do efluente *antes* e *após-tratamento* anaeróbio.

As análises toxicológicas e mutagênicas foram realizadas no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – ENS/UFSC.

6.5.1 Teste de Toxicidade Aguda e Crônica com *Daphnia magna*.

De acordo com a ABNT (2004), os testes em laboratório são realizados utilizando amostras que, através de diluições, apresentam várias concentrações de poluentes onde os organismos são submetidos. Os testes de toxicidade com *Daphnia magna* Starus, 1820 foram realizados em amostras do lodo, na solução de ácidos orgânicos e de efluente *antes* e *após o tratamento* anaeróbio (*Etapa 2*).

Nesta etapa foram realizados dois experimentos:

- ✓ **1º Experimento:** *Avaliação da toxicidade aguda em amostra de efluente antes e após o tratamento anaeróbio, lodo e solução de ácidos orgânicos.*
- ✓ **2º Experimento:** *Avaliação da toxicidade crônica do efluente antes e após o tratamento anaeróbio*

Os procedimentos metodológicos adotados para cada experimento estão descritos a seguir:

Organismo-teste (*Daphnia magna*)

Os microcrustáceos, *Daphnia magna*, foram cultivados no Laboratório de Toxicologia (LABTOX)– ENS/UFSC, segundo normas ISO 6341 (1996) e DIN 38412 (1989).

Coleta das Amostras

Avaliação do lodo e da solução de ácidos orgânicos

Com intuito de determinar a toxicidade inicial do lodo e da solução de ácidos orgânicos, alíquotas de ambos foram coletadas e avaliadas pelo teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* Starus, 1820.

Amostragem do efluente

As amostras do efluente (*antes e após o tratamento*) foram coletadas e acondicionadas em frascos de polipropileno. Cada bateria de teste foi composta por amostras de efluente de cinco digestores anaeróbios (*amostra 1; 2; 3; 4 e 5*) totalizando 10 amostras (FIG 10). A composição de cada digestor está descrita na *Etapa 2* (TAB. 6).

Os frascos foram etiquetados e transportados protegidos de luz e sob refrigeração para o LABTOX/ENS/UFSC.



FIGURA 10: Amostra de efluente dos digestores (*amostra 1-5*)

Análises Físico-químicas

As amostras do efluente (*antes e após o tratamento*) foram analisadas quanto ao potencial hidrogeniônico (pH), utilizando o potenciômetro modelo Orion 250 A, e em relação ao oxigênio dissolvido (OD) foi usado um multianalisador modelo Orion 385. As metodologias foram baseadas no APHA-AWWA-WPCF, 2002. Estas informações serviram de subsídios para confirmar a validade do teste.

Metodologia de teste toxicidade aguda

A metodologia de teste agudo com *Daphnia magna* seguiu o descrito na NBR 12.713 (ABNT, 2003).

As amostras coletadas foram testadas baseando-se na exposição de neonatos de *Daphnia magna*, de 2 a 26 horas de idade, em diluições das amostras, por um período de 48 horas. Para o teste foram utilizadas nove concentrações, sendo feitas a partir da amostra (100%) de cada reator (100; 50; 25; 12,5; 8,33; 6,25; 4,16; 3,25 e 2,09 %) e um controle,.

O teste foi feito em béqueres de 25 mL, com uma réplica para cada concentração, além do controle com água de diluição ou também denominada de meio ISO, descrito na norma ISO 6341 (ISO, 1996). Foram testados 20 organismos-teste por diluição, sendo expostos 10 em cada béquer. Este esquema pode ser observado na FIG. 11. A FIG. 12, ilustra o Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* realizado no LABTOX .

Os organismos-teste foram adicionados aos béqueres, que em seguida foram cobertos com filme de PVC e levados para a germinadora de teste, mantidos a temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, sem alimentação ou iluminação, por um período de 48 horas (duração do teste de toxicidade aguda). Foram medidos o pH e o OD das diluições preparadas, antes e no final do teste.

Ao término do teste (48 horas) observou-se o número de indivíduos imóveis por concentração e a partir desses dados calculou-se a porcentagem de imobilidade para cada concentração.

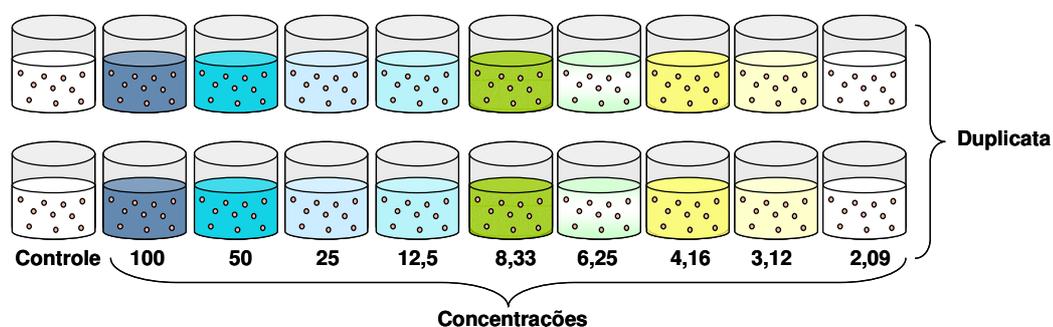


FIGURA 11: Esquema do teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*



FIGURA 12: Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* realizado no LABTOX

Tratamento dos Dados

Cálculo para CE₅₀

O resultado do teste é expresso em Concentração Efetiva Mediana (CE₅₀ 48h), que corresponde à concentração da amostra capaz de causar efeito agudo em 50% dos organismos expostos em 48 horas, nas condições de teste.

A CE₅₀ 48h foi calculada utilizando-se o métodos estatístico Trimmed Spearman-Kärber Method (HAMILTON et al, 1977) para dados não paramétricos.

Porcentagem de redução de toxicidade

Para os testes com os efluentes, depois de obtido os valores de CE₅₀ 48h, foi calculada a porcentagem de redução de toxicidade através da fórmula proposta por ISIDORI et al, 2003.

$$\%redução = \left(1 - \frac{CE_{50bruto}}{CE_{50tratado}} \right) \times 100$$

Metodologia de teste toxicidade crônica

Para a realização do teste crônico com *Daphnia magna*, foram utilizados organismos jovens, com 2 a 26 horas de idade, obtidos a partir da quarta postura de fêmeas cultivadas, expostos as várias diluições da amostra, por um período de 21 dias.

Cada ensaio foi realizado com duas diluições da amostra, e um controle negativo (somente água reconstituída – M4). Para a amostra A1 as diluições (soluções-teste) utilizadas foram 6,25 e 8,38%; as demais amostras A2, A3, A4 e A5 foram utilizadas as diluições 2,08 e 3,12 % de solução-teste, sendo todas preparadas com precisão volumétrica, em progressão geométrica da razão 1,33 e 1,50 respectivamente.

Para cada diluição, utilizou-se 10 réplicas, os organismos-teste foram dispostos individualmente em béqueres de 50 mL com aproximadamente 25 ml de solução-teste em cada e em seguida foram cobertos com filme de PVC com intuito de evitar a evaporação e contaminação do teste por possíveis resíduos suspensos no ar (FIG. 13).

O ensaio foi mantido a temperatura de 20±2°C, com alimentação (alga clorofícea *Scenedesmus subspicatus*) e iluminação (foto período de 16 horas de luz).

Os organismos foram acompanhados três vezes por semana, em dias intercalados, onde foi contado o número de jovens gerados por fêmea. Em seguida, era feita a substituição da solução-teste, caracterizando assim um teste semi-estático.

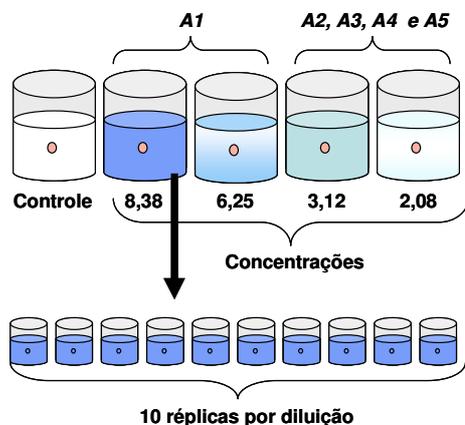


FIGURA 13: Esquema do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*.

6.5.2 Teste de mutagenicidade

O teste de mutagenicidade “ensaio de micronúcleo” foi realizado em amostras de água contendo ciclofosfamida e de efluentes provenientes da *Etapa 2*.

Organismo-teste (*Geophagus brasilienses* e *Oreochromis* sp)

O material biológico utilizado neste estudo foi o peixe *Geophagus brasilienses* (cará) proveniente de uma propriedade particular e o *Oreochromis* sp, conhecido como Tilápia vermelha ou Saint Peter, cultivado no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD) - Departamento de Aqüicultura – AQI/UFSC (FIG. 14 A e B).

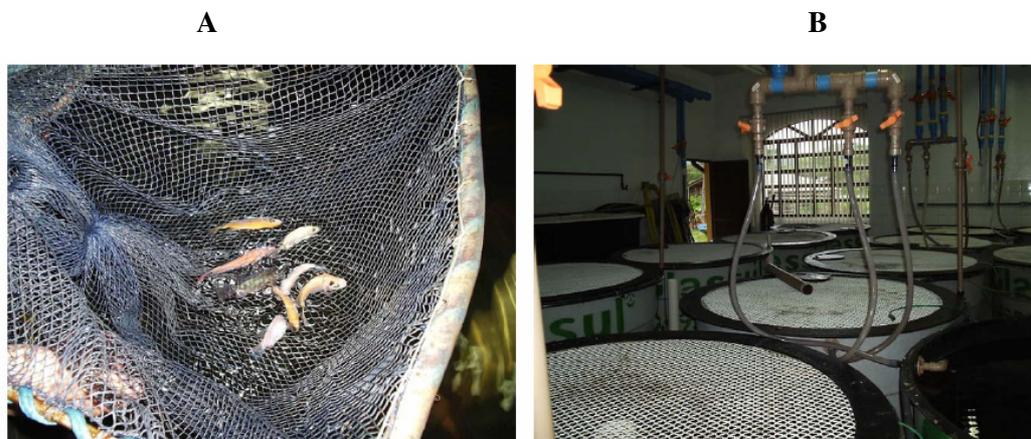


FIGURA 14: A e B - Coleta de peixes *Oreochromis* sp no LAPAD/AQI/UFSC

Amostragem do efluente

As amostras do efluente foram coletadas e acondicionadas em frascos de polipropileno. Cada bateria de teste foi composta por amostras de efluente dos cinco digestores anaeróbios (A-1, A-2, A-3, A-4 e A-5) e um controle, totalizando 6 amostras. A composição de cada reator está descrita na *Etapa 2*. Os frascos foram etiquetados encaminhados para o LABTOX/ENS/UFSC.

Metodologia do ensaio de micronúcleo

Os ensaios foram realizados em aquários com capacidade unitária de 2,0 L com aproximadamente 1,5 L de solução-teste, cada aquário recebeu um organismo-teste. Os aquários foram mantidos a uma temperatura controlada de $25\pm^{\circ}\text{C}$.

Os ensaios foram realizados durante um período de exposição de 48 horas. Para formar o grupo controle, foram utilizados os organismos testes submetidos às mesmas condições dos ensaios, porém sem a presença da solução teste. Os aquários foram mantidos com aeração por 48 horas e monitorados os parâmetros pH e OD nos intervalos de tempo 0:30, 24:00 e 48:00, após o início do teste.

A coleta do sangue foi realizada utilizando uma seringa de três mL, previamente heparinizada. A agulha foi inserida através da região anal até a região medular, a fim de perfurar uma veia ou artéria (FIG. 15 A e B).



FIGURA 15: A) Coleta de sangue para o Teste de Micronúcleo e B) Preparação da lâmina.

Em lâminas previamente limpas, utilizou-se uma gota de sangue total recém obtido, onde foram feitos três esfregaços por animal, que em seguida permaneceram secando a temperatura ambiente (FIG. 15B). As lâminas foram fixadas em metanol (p.a.) por 10 minutos e secas, novamente, em temperatura ambiente. Após 24 horas de secagem, foi realizada a coloração pelo método Feulgen-Fast-Green. Para a determinação da frequência de micronúcleos foram analisados, em teste cego, 2000 eritrócitos por animal.

Para este teste foram realizados dois experimentos, ambos seguiram o procedimento metodológico descrito para o ensaio de micronúcleo.

1ºExperimento: Avaliação da mutagenicidade em peixes expostos a CF (200 mg.L⁻¹)

2ºExperimento: Avaliação do potencial mutagênico das amostras da Etapa Biodegradabilidade

1ºExperimento: Avaliação da mutagenicidade em peixes expostos a CF (200 mg.L⁻¹)

Para realização do experimento, foram utilizados quatro aquários, em cada um foi adicionado 1,5 litro de água e colocado um peixe (Cará). Após o período de adaptação de cinco dias, os organismos foram divididos em dois grupos, o primeiro denominado de *controle* os demais de experimental: *Ciclo 1*, *Ciclo 2*, e *Ciclo 3* (FIG. 16). Cada aquário experimental recebeu 300 mg de ciclofosfamida, correspondendo a 200 mg.L⁻¹.



FIGURA 16: Teste de Micronúcleo -Aquários controle e *Ciclo 1*, *Ciclo 2*, e *Ciclo 3*.

2ºExperimento: Avaliação do potencial mutagênico das amostras da Etapa Biodegradabilidade

Para este experimento foram montados seis aquários denominados de controle, A-1, A-2, A-3, A-4 e A-5. O aquário controle do teste foi preenchido com 1,5L de água e os demais foram preenchido com 1,5L de efluente correspondente aos digestores avaliados na *Etapa 2* (FIG.17).



FIGURA 17: Teste de Micronúcleo realizado no LABTOX.

7. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, estão apresentados os resultados encontrados em cada uma das etapas metodológicas, definidas no capítulo anterior.

7.1. Etapa Preliminar: *Delimitação da Abrangência do Estudo*

Atualmente, o Estado de Santa Catarina conta com vinte e um (21) estabelecimentos públicos e privados credenciados para o tratamento antineoplásico distribuídos em cinco macrorregiões (TAB.8). A localização de cada um deles é mostrada na FIG.18. (Secretaria de Saúde/SC, 2007), sendo que a cidade de Florianópolis concentra 60% dos estabelecimentos públicos e 54,5% dos privados envolvidos diretamente com quimioterapia antineoplásica no estado de Santa Catarina.

TABELA 8: Estabelecimentos de Saúde envolvidos no tratamento do câncer em SC, por região.

Macrorregiões	Cidade	Caráter Público	Caráter Privado	Total
<i>Extremo Oeste</i>	Chapécó	01	01	02
<i>Grande Florianópolis</i>	Florianópolis	06	06	12
<i>Nordeste</i>	Joinville	01	01	02
<i>Sul</i>	Criciúma	01	01	02
<i>Vale do Itajaí</i>	Blumenau	01	02	03
Total		10	11	21



FIGURA 18: Localização geográfica dos prestadores de serviço oncológico em Santa Catarina.

No ano de 2002, em Florianópolis, período em que foi realizada esta etapa existiam seis hospitais públicos e três clínicas privadas envolvidos com o tratamento de pacientes oncológicos.

Com relação à rede pública de tratamento oncológico na região da Grande Florianópolis, em Fevereiro de 2005 foi inaugurado o Hospital Vilson Kleinübing para o tratamento do câncer que conta com o Complexo Oncológico do Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON). Construído no Bairro Itacorubi, em Florianópolis. É o primeiro hospital de Florianópolis a tratar os efluentes emitidos. Depois de passar pela estação de tratamento de efluentes, a água é reaproveitada para atividades como jardinagem e limpeza externa. Já no sistema privado, em Florianópolis, o número de clínicas especializadas em oncologia dobrou.

Os resultados encontrados evidenciaram que a capital de SC é a cidade que concentra o maior número de estabelecimentos de atendimento oncológico e em função disso, este estudo foi delimitado em Florianópolis. O estudo pretendeu ainda contemplar o fármaco antineoplásico mais utilizado nos tratamentos de câncer nesses estabelecimentos (público e privado).

7.2. Etapa 1: Levantamento de Dados

As informações coletadas na *Etapa preliminar* serviram de subsídios para a realização desta etapa. A coleta dos dados sobre o consumo de quimioterápicos antineoplásicos foi autorizada em seis dos nove estabelecimentos consultados em Florianópolis (SC), totalizando três hospitais (públicos) e três clínicas (privados).

Os estabelecimentos selecionados estão localizados na região central de Florianópolis, como ilustra a FIG. 19, todos possuem ligação com a rede coletora de esgotos da cidade e seus efluentes são direcionados para Estação de Tratamento de Esgoto Insular de Florianópolis, sem nenhum tratamento prévio.

A Resolução RDC ANVISA nº. 306/2004 permite que o descarte dos efluentes sanitários hospitalares seja feito através da rede de esgoto desde que haja ETE na região onde se encontra o serviço, mesmo que estes contenham excretas de pacientes tratados com quimioterápicos antineoplásicos.

De acordo com o Ministério da Saúde, 65% das internações hospitalares acontecem por causa da má qualidade ou inexistência dos serviços de saneamento e, hospitais e clínicas podem estar, paradoxalmente, contribuindo para o avanço do problema e comprometendo ainda o meio ambiente, quando esses efluentes vão para a rede de esgoto sem qualquer tratamento, uma vez que contêm materiais biológicos, radioativos e até bactérias resistentes aos tratamentos sanitários convencionais.

Em 1993 a Organização Pan Americana de Saúde (OPAS), já alertava para o perigo das águas residuárias de estabelecimentos hospitalares por conter compostos capazes de lesar o DNA, entre eles estão os desinfetantes, drogas antineoplásicas e alguns antibióticos com atividade genotóxica (OPAS, 1993).

Em contra partida, alguns estudos relatam que o esgoto dos hospitais e de outros estabelecimentos similares quando lançados em sistemas de rede de esgoto de elevada vazão, em redes que contribuam para estações de tratamento de esgotos ou para emissários submarinos, ou em qualquer corpo receptor de elevada capacidade de diluição, oferece os mesmos riscos de um efluente doméstico nas mesmas condições, ou seja, não é mais contaminado do que o restante do esgoto de uma cidade. E que, de modo geral, as doenças que se pode adquirir pelo contato com o esgoto hospitalar são as mesmas que se adquire em contato com o esgoto comum.

A diluição do esgoto hospitalar em grande volume de água, já que o consumo de água nas instituições de saúde é significativamente mais alto (mais de 500 L/hab. dia) e a presença de desinfetantes contribuem para explicar um nível de contaminação do esgoto hospitalar mais baixo do que no esgoto domiciliar. Justificando assim a não obrigatoriedade, por parte dos estabelecimentos de saúde, da instalação de um sistema de tratamento de esgoto hospitalar.

No entanto, o estudo de PAZ et al (2004) alertou que apesar dos efluentes hospitalares apresentarem características similares as encontradas usualmente nos efluentes domiciliares, se fazem necessários estudos criteriosos com relação à presença de compostos químicos, metais pesados e microrganismos resistentes a antibióticos e desinfetantes.

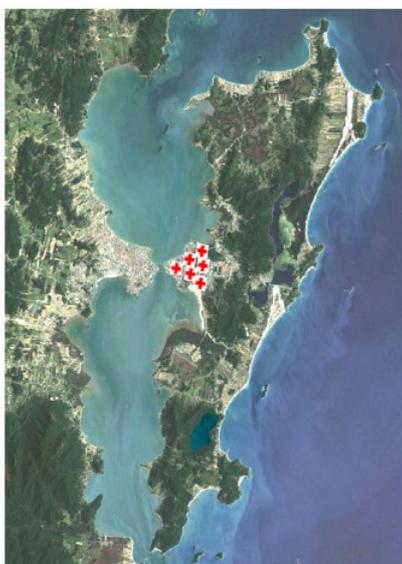


FIGURA 19: Localização dos Estabelecimentos de Saúde (+) utilizados nesta pesquisa.
Fonte: www.spg.sc.gov.br. Acesso em maio de 2007.

7.2.1. Seleção do antineoplásico adotado no estudo

Os resultados obtidos sobre o consumo de antineoplásicos durante o ano de 2002 nos estabelecimentos pesquisados estão apresentados na TAB. 9 (clínicas) e na TAB. 10 (hospitais). Atendendo a solicitação das clínicas privadas, quanto ao sigilo das informações, as clínicas foram denominadas de: *Clínica A, B e C* e os hospitais de *Hospital 1, 2 e 3*.

TABELA 9: Quantificação dos antineoplásicos mais prescritos nas Clínicas de Florianópolis (2002)

Antineoplásico	Clínica A		Clínica B		Clínica C	
	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%
Azatioprina	-	-	-	-	-	-
Carboplatina	-	-	75	21,3	23	10,1
Ciclofosfamida	60	12,4	95	27,0	38	16,7
Cisplatina	40	8,3	56	15,9	63	27,6
Docetaxel	43	9,0	-	-	-	-
Doxorrubicina	-	-	32	9,1	-	-
Etoposídeo	-	-	-	-	36	15,8
Fluoracilal	69	14,3	-	-	-	-
Metotrexato	-	-	-	-	-	-
Vincristina	-	-	-	-	-	-
Outros	271	56	95	26,9	68	29,8
Total	483	100%	353	100%	228	100%

A *Clínica A*, indicou em primeiro lugar o antineoplásico *Fluoracilal* (FL), com 69 preparações, e como segundo mais utilizado a *ciclofosfamida* (CF), com 60 preparações. O total de preparações durante o ano de 2002 foi de 483. Os resultados encontrados na farmácia da *Clínica B*, aonde foram preparadas 353 antineoplásicos, sendo que destes, 95 foram do antineoplásico *ciclofosfamida* (CF) e 75 do fármaco *carboplatina* (CB) foram os dois antineoplásicos mais utilizados. Os dados coletados na *Clínica C* revelaram que a *ciclofosfamida* (CF) e a *cisplatina* (CP) foram os mais prescritos neste ano.

TABELA 10: Quantificação dos antineoplásicos mais prescritos nos Hospitais em Florianópolis (2002)

Antineoplásico	Hospital 1		Hospital 2		Hospital 3	
	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%
Azatioprina	327	10,87	-	-	-	-
Carboplatina	-	-	35	15,56	54	11,27
Ciclofosfamida	813	27,02	39	17,33	67	13,90
Cisplatina	-	-	56	24,89	51	10,53
Docetaxel	-	-	-	-	-	-
Doxorrubicina	-	-	-	-	40	8,30
Etoposídeo	-	-	-	-	-	-
Fluoracilal	-	-	38	16,89	-	-
Metotrexato	808	26,85	-	-	-	-
Vincristina	261	8,67	-	-	-	-
Outros	800	26,59	57	25,33	271	56
Total	3.009	100%	225	100%	483	100%

O levantamento realizado sobre o consumo de quimioterápicos antineoplásicos no *Hospital 1* mostrou que a *ciclofosfamida* (CF) e *metotrexato* (MT) foram os mais empregados. No *Hospital 2* das 225 preparações quimioterápicas realizadas 56 (24,9%) destas, corresponderam ao antineoplásico *cisplatina* (CP) e 39 (17,3 %) a *ciclofosfamida* (CF). A farmácia do *Hospital 3* realizou 483 preparações, sendo que a *ciclofosfamida* (CF) e a *carboplatina* (CB) foram os fármacos mais administrados durante o ano de 2002.

Os dados coletados nos estabelecimentos de saúde estão dispostos na TAB. 11. Pode-se observar que dentre os mais empregados estão: *Carboplatina*, *Ciclofosfamida*, *Cisplatina*, *Doxorubicina*, *Epirubicina*, *Etoposido*, *Fluortacil*, *Ifosfamida*, *Metotrexato*, *Mitoxantrona*, *Sulfato de bleomicina*, *Vimblastina* e *Vincristina*. Dessa pesquisa, foi possível constatar que os quatro primeiros fármacos antineoplásicos mais prescritos em cada um dos estabelecimentos, representam entre 52% e 74 % do consumo anual. Com exceção do *Hospital 3* e da *Clínica A*, onde os quatro primeiros antineoplásicos utilizados somam 44%, do total utilizado em ambos estabelecimentos.

É importante ressaltar que a CF é o único agente classificado que está presente em todos os estabelecimentos pesquisados, além de ser comprovadamente carcinógeno para o ser humano, segundo o IARC, justificando assim, sua escolha para realização desta pesquisa.

TABELA 11: Antineoplásicos mais prescritos nos Estabelecimentos de Saúde pesquisados (2002)

Antineoplásico	Hosp. 1	Hosp. 2	Hosp. 3	Clin. A	Clin. B	Clin. C
Azatioprina	3°	-	-	-	-	-
Carboplatina	-	4°	2°	-	2°	4°
Ciclofosfamida	1°	2°	1°	2°	1°	2°
Cisplatina	-	1°	3°	4°	3°	1°
Docetaxel	-	-	-	3°	-	-
Doxorubicina	-	-	4°	-	4°	-
Etoposídeo	-	-	-	-	-	3°
Fluoracilal	-	3°	-	1°	-	-
Metotrexato	2°	-	-	-	-	-
Vincristina	4°	-	-	-	-	-

7.2.2. Dose média administrada de ciclofosfamida

Uma vez definido o antineoplásico referência para este estudo, foi quantificado o consumo de CF no hospital 3, considerando os anos de 2001, 2002 e 2003. Os resultados mostraram que a dose média administrada aos pacientes tratados com CF foi de $835,0 \pm 6,75$ mg/dia de tratamento.

Cerca de 25 % da dose de CF administrada é excretada na forma inalterada, sendo que 90 % da dose é eliminada nas primeiras 24 horas. Um estudo observatório realizado neste mesmo estabelecimento constatou que o volume de excreção urinária de um paciente tratado com CF foi em torno de 1,0 L/dia de tratamento. Para realização deste estudo, padronizou-se uma dose de 800,0 mg/dia de tratamento e $200,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (correspondendo a 25 % da dose excretada por litro). A dose de $200,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de CF foi adotada como dose referência para as demais etapas metodológicas.

7.3. Etapa 2: Biodegradabilidade da Ciclofosfamida por Processo Anaeróbio

1º experimento: Avaliação da Atividade de Metanogênica Específica (AME)

O inóculo (lodo) proveniente de um reator UASB que trata efluentes de uma indústria cervejeira, foi caracterizado conforme descrito no Capítulo 6, com relação à Demanda Química de Oxigênio (DQO), sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e potencial hidrogeniônico (pH), fatores esses, que podem comprometer a atividade metanogênica específica (AME) do lodo, em termos da quantidade de metano produzido por dia. A utilização de inóculo favorece a digestão anaeróbia de resíduos, entretanto, a baixa eficiência do inóculo pode influir negativamente na produção de biogás e no processo como um todo (CAMPOS, 1999).

O inóculo foi mantido em uma estufa DBO (35°C) e monitorado (pH e DQO) durante 160 dias (período em que foram realizados os experimentos referentes a esta etapa). Um controle periódico da atividade do lodo permite detectar antecipadamente a deterioração do mesmo devido à toxicidade, deficiência de nutrientes e acumulação de sólidos suspensos (ROCHA et al, 2003). O ANEXO 10.2 (GRAF. 19 e 20) apresenta os resultado deste monitoramento.

Na TAB. 12 se encontram os resultado da caracterização do inóculo. A análise DQO foi realizada visando quantificar a matéria orgânica presente na biomassa anaeróbia do lodo passível de degradação. O valor encontrado de 4,07 % de massa orgânica é compatível com o valor esperado para um lodo anaeróbio de cervejaria.

O valor de pH encontrado de 7,3 conferiu ao inóculo um caráter de neutro, sendo ideal a para o processo. Alterações de pH poderiam comprometer a viabilidade das bactérias anaeróbias.

O pH tem um significado muito importante no processo anaeróbio, sua queda revela um acúmulo de intermediários ácidos num nível superior ao tolerado pela capacidade tamponante do meio, ocasionado por um desequilíbrio entre a produção e o consumo dessas substâncias.

A avaliação da biomassa em termos de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV) foi realizada com intuito de determinar a composição gravimétrica do efluente nos digestores. A relação SV/ST de 0,67 é um indicativo de um inóculo com uma boa biomassa presente.

TABELA 12: Caracterização do inóculo (lodo)

<i>Parâmetros</i>	DQO (g.kg ⁻¹)	pH	ST (mg.g ⁻¹)	SV (mg.g ⁻¹)	SV/ST
<i>Inóculo</i>	40,74	7,3	85,00	57,00	0,67

Os parâmetros analisados viabilizaram caracterizar o inóculo e também fornecer dados essenciais (relação de inóculo/substrato de 5,0 g SV.L⁻¹ de concentração celular para 5,0 g DQO L⁻¹ de ácidos orgânicos) para o adequado funcionamento do ensaio AME e biodegradabilidade. Na TAB. 13 está apresentado o valor encontrado para AME do grupo (ác. orgânicos) expresso em mLCH₄/gSSV.dia e gDQOCH₄/gSSV.dia.

TABELA 13: Resultados do teste de AME para o grupo (ac. orgânicos)

mLCH₄/gSV.dia	14,77
gDQOCH₄/gSV. dia	0,04

Obs: 1 g DQO degradada equivale a 0,35 L de metano produzido

No GRAF. 3 é apresentada à curva de volume de metano produzido em CNTP em relação ao tempo (horas) do grupo *ác. Orgânicos*, já descontada a produção de metano endógena (grupo controle). Com base na curva obtida ao longo do experimento (teste de AME), pode se constatar que a velocidade de produção de metano esta associada com a disponibilidade e com o tipo de substrato presente. Considerando que a produção de metano pode ser facilmente determinada em um digestor anaeróbio, está constitui-se numa medida rápida e direta do grau de conversão do despejo e da eficiência do sistema no grau de conversão e da eficiência do sistema de tratamento (CHERNICHARO, 1997).

O referido teste teve a duração de 240 horas, sendo que o trecho de maior produção de metano ocorreu em até 200 horas. Os materiais de mais fácil biodegradação (presença de ácidos orgânicos) foram convertidos rapidamente nas primeiras horas, sendo consumidos pelas bactérias, demonstrando os maiores valores para este parâmetro nas primeiras horas, após isso ocorreu uma diminuição da velocidade de produção, pois os compostos foram sendo degradados ao longo do tempo, tornando, finalmente a biomassa quase inerte ao final do teste. O fator de produção de metano depende da quantidade total a ser degradada, independentemente de ser de fácil ou de difícil degradação.

Outra forma de se avaliar a produção de metano é a partir da estimativa de degradação de DQO no digestor. Nas condições normais de temperatura e pressão isso corresponde a 350,0 mL de CH₄ para cada grama de DQO degradada. Neste experimento, foi utilizada a relação 5gSV.L⁻¹ em um digestor com capacidade de 180,0 mL, ou seja o volume teórico de metano é de 315,0 mL (100% de eficiência na remoção de DQO). Os resultados revelaram que em 240 horas de teste foram acumulados 216,0 ml de metano, que correponde a cerca de 70% da capacidade teórica de conversão da matéria orgânica, sendo assim, o lodo anaeróbio oriundo da industria cervejeira foi considerado adequado para avaliação da biodegradabilidade da CF.

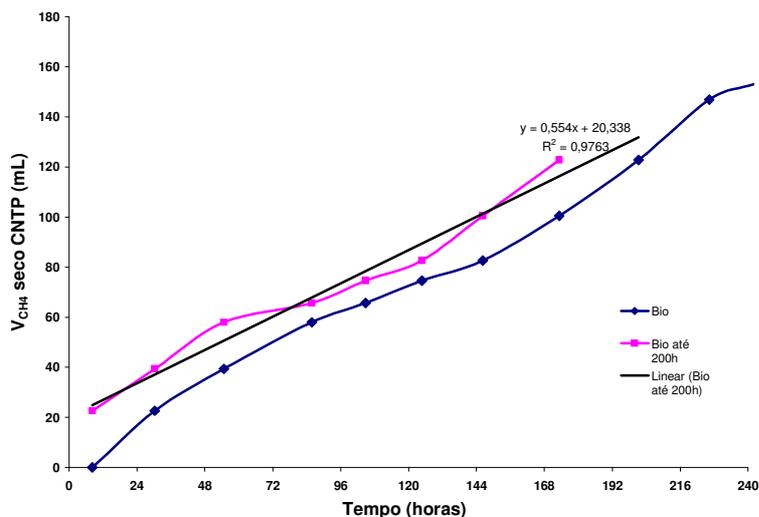


GRÁFICO 3: Volume de metano produzido em CNTP em relação ao tempo (horas)

Após a caracterização da biomassa e a realização do teste de AME, foi avaliado o potencial de biodegradação da CF em condições anaeróbias. O ensaio de biodegradabilidade do efluente permite avaliar que fração de DQO passível de ser degradada em condições anaeróbias e verificar o potencial de aplicabilidade do processo na redução desse compostos.

2º experimento: Avaliação da biodegradabilidade da CF

1ª bateria: Biodegradabilidade da (CF) nas concentrações (2,0; 20,0 e 200,0 mg/L).

O ensaio aqui apresentado teve a duração de 30 dias, onde foram realizadas as medições do volume de gás (mL) produzido diariamente pelos grupos avaliados (em triplicata): **amostra 1** (Branco - controle negativo); **amostra 2** (ácidos orgânicos - controle positivo); **amostra 3** (CF 2,0 mg.L⁻¹); **amostra 4** (CF 20,0 mg.L⁻¹) e **amostra 5** (CF 200,0 mg.L⁻¹). Os dados brutos se encontram no ANEXO 10.3 (TAB. 24).

No GRAF. 4 estão ilustradas as curvas médias da produção biogás diária (mL) de cada grupo. Todos os grupos apresentaram oscilações no volume de biogás produzido ao longo do experimento, variando de 0,0 até 56,33 mL. O grupo **amostra 1** (Branco), apresentou valores de produção de gás (mL) quase sempre abaixo dos demais grupos. Este grupo é considerado controle negativo e foi realizado para descontar eventuais interferências, pois permite conhecer a contribuição da produção de gás do próprio lodo (AQUINO et al, 2007). O maior registro de biogás ocorreu nos primeiros dias de experimento, principalmente pelo grupo **amostra 4** (CF 20,0 mg.L⁻¹).

Na TAB 14 estão registrados os volumes de biogás acumulados durante o processo de tratamento anaeróbio para cada grupo: **amostra 1** (Branco): $198,67 \pm 13,31$ mL, **amostra 2** (ácidos orgânicos): $376,00 \pm 7,54$ mL, **amostra 3** (CF $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$): $397,66 \pm 5,50$ mL, **amostra 4** (CF $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$): $401,00 \pm 9,53$ mL e **amostra 5** (CF $200,0 \text{ mg.L}^{-1}$): $403,00 \pm 12,76$ mL.

Estão apresentados no GRAF. 5, as curvas de produção de biogás acumulado. Nas primeiras 12 horas, a produção de gás foi muito pequena para todos os grupos. O grupo **amostra 1** (Branco), praticamente teve a sua produção cessada após 25 dias de experimento, ao passo que nos demais grupos se estenderam até 28 dias. Como era esperado o reator (branco) obteve uma curva de produção de gás metano abaixo dos demais, esta produção ocorreu em função da atividade metanogênica endógena e permite avaliar atividade dos microrganismos sintróficos, para boa operação dos digestores anaeróbios (AQUINO et al, 2007).

Não foram observadas diferenças significativas no volume de biogás acumulado entre os grupos que receberam adição de CF (**amostra 3; 4 e 5**) e nem em relação ao grupo **amostra 2** (ac. orgânicos). Este fato sugere que a CF presente, nas concentrações utilizadas, não foi capaz de inibir a atividade das bactérias anaeróbias. No estudo de STERGER-HARTMANN et al (1996), em uma ETE aeróbia (em escala laboratorial) a CF (160 mg.L^{-1}), mesmo sem ter sido degradada, não causou nenhum choque negativo na capacidade de degradação das bactérias no lodo ativado.

A avaliação da eficiência dos sistemas de tratamento de esgoto é normalmente feita com base no potencial de depleção de oxigênio causado pela matéria orgânica presente no efluente em análise. Esta avaliação fornecer informações práticas sobre a eficiência do tratamento em relação a compostos refratários (aqueles que apresentam lenta biodegradabilidade) e esse método permite conhecer, a carga orgânica que é lançada no ambiente, ou seja, de forma simplificada prevê o potencial poluidor do efluente (AQUINO, 2003). Estudos revelam que a CF é considerada refratária, ou seja, possui baixa biodegradabilidade no sistema de tratamento aeróbico (HANSEL, et al, 1997; KÜMMERER, 2004).

TABELA 14: Produção acumulada de metano (mL) - 1ª bateria

Grupo	Reator	N	Média	LC- 95%	LC+ 95 %	SD
amostra 1	Branco	3	198,7	165,6	231,7	13,3
amostra 2	Ac. orgânicos	3	376,0	357,2	394,7	7,5
amostra 3	CF $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$	3	397,6	383,9	411,3	5,5
amostra 4	CF $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$	3	401,0	377,3	424,7	9,5
amostra 5	CF $200,0 \text{ mg.L}^{-1}$	3	403,0	371,3	434,7	12,7

SD: Desvio Padrão

LC: Limite de confiança

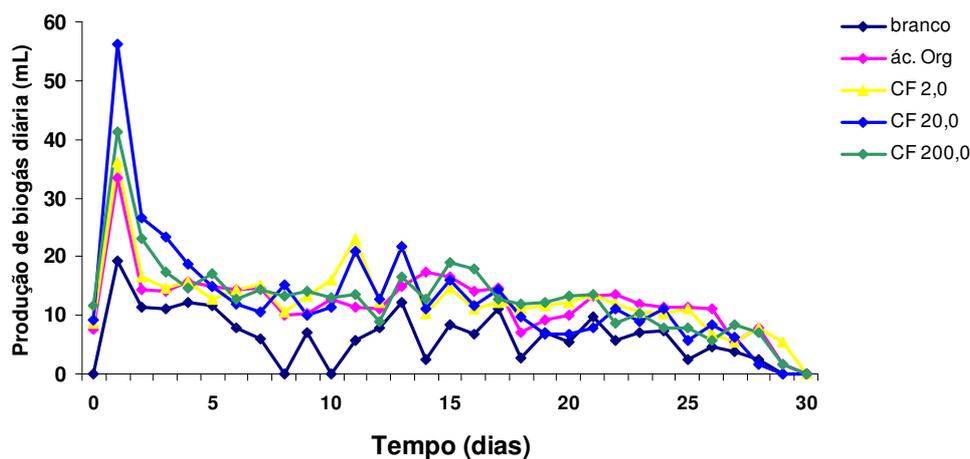


GRÁFICO 4: Produção diária de biogás nos digestores em função do tempo de teste (dias) - 1ª bateria.

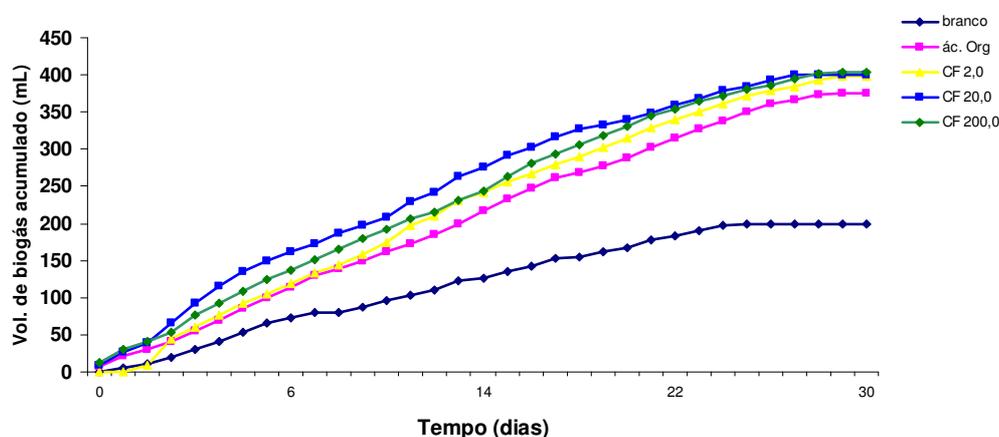


GRÁFICO 5: Produção acumulada de biogás nos digestores em função do tempo do teste (dias) - 1ª bateria.

Na TAB. 15 estão os resultados das análises de $DQO_{\text{solúvel}}$ para cada grupo (*antes e após o tratamento*). Não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos, com relação à % de $DQO_{\text{biodegradada}}$ após tratamento anaeróbio (eficiência de remoção). Estes resultados indicam que as diferentes concentrações de CF (2,0; 20,0 e 200,0 mg.L^{-1}) utilizadas, não foram capazes de interferir no processo de remoção biológica de DQO. O valor de $DQO_{\text{solúvel}}$ (mg.L^{-1}) de cada grupo *antes e após o tratamento*, está representado no GRAF.6.

TABELA 15: Eficiência de remoção DQO após tratamento anaeróbio (1ª bateria)

Grupo	Reator	$DQO_{\text{antes}} (\text{mg.L}^{-1})$	$DQO_{\text{após}} (\text{mg.L}^{-1})$	Eficiência %
amostra 1	Branco	1727,1	141,3	91,8 %
amostra 2	Ac. orgânicos	2720,5	422,7	84,4 %
amostra 3	CF 2,0 mg.L^{-1}	3001,6	395,6	86,8 %
amostra 4	CF 20,0 mg.L^{-1}	2893,3	375,7	87,0 %
amostra 5	CF 200,0 mg.L^{-1}	3153,5	497,1	84,2 %

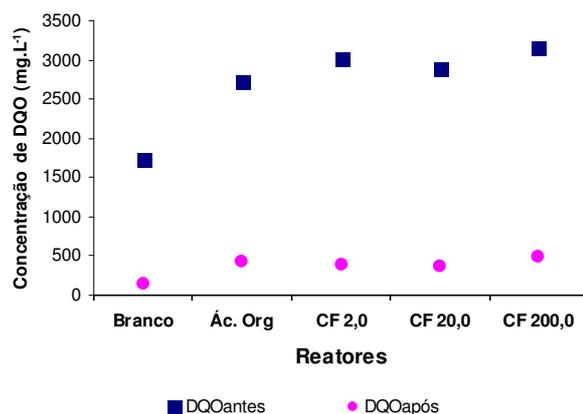


GRÁFICO 6: Variação da DQO solúvel *antes* e *após* o tratamento anaeróbio – 1ª bateria

2ª bateria: Biodegradabilidade da (CF) nas concentrações (20,0; 200,0 e 500,0 mg.L⁻¹).

Esta bateria teve como propósito verificar a possibilidade de reproduzir e comparar os resultados encontrados na 1ª bateria, para os grupos *amostra 1; 2; 4 e 5*, bem como testar a interferência da CF (500,0 mg.L⁻¹) este grupo foi denominado de *amostra 6*. No ANEXO 10.4 (TAB. 25), estão os dados brutos da medição do volume de gás produzido diariamente pelos digestores.

No GRAF. 7 estão ilustradas as curvas médias da produção biogás diária (mL) para cada grupo. Todos os grupos apresentaram oscilações no volume de biogás produzido ao longo do experimento, variando de 0,0 até 38,33 mL. A partir do 8º dia, o grupo *amostra 1* (Branco), apresentou valores de produção de gás (mL) sempre abaixo dos demais grupos, cessando a sua produção de biogás no 27º dia, este resultado foi semelhante ao encontrado na 1ª bateria. O maior registro de biogás ocorreu nos primeiros dias de experimento, principalmente pelo grupo *amostra 5* (CF 200,0 mg.L⁻¹).

O biogás acumulado (mL) foi: *amostra 1* (Branco): 228,00 ± 24,26 mL, *amostra 2* (ácidos orgânicos): 390,66 ± 8,08 mL, *amostra 4* (CF 20,0 mg.L⁻¹): 386,00 ± 56,66 mL, *amostra 5* (CF 200,0 mg.L⁻¹): 389,33 ± 7,09 mL e *amostra 6* (CF 500,0 mg.L⁻¹): 444,33 ± 22,05 mL (TAB. 16).

No GRAF. 8 é possível comparar a produção de biogás do grupo *amostra 1* (branco – controle negativo) com os demais grupos e verificar que a maior produção de biogás ocorreu nos grupos adicionados com a solução de ácidos orgânicos. Nesta bateria, também não foram constatadas diferenças significativas no volume de biogás acumulado dos grupos que receberam a adição de CF (*amostra 4; 5 e 6*) e nem em relação ao grupo *amostra 2* (ácidos orgânicos), confirmando os resultados anteriores que a CF, nas concentrações utilizadas, não foi capaz de inibir a atividade das bactérias anaeróbias.

TABELA 16: Produção acumulada de metano (mL) - 2ª bateria

Grupo	Reator	N	Média	LC - 95%	LC+ 95 %	SD
amostra 1	Branco	3	228,0	167,7	288,2	24,2
amostra 2	Ac. orgânicos	3	390,6	370,6	410,7	8,0
amostra 4	CF 20,0 mg.L ⁻¹	3	386,0	245,2	526,7	56,6
amostra 5	CF 200,0 mg.L ⁻¹	3	389,3	371,7	406,9	7,0
amostra 6	CF 500,0 mg.L ⁻¹	3	444,3	389,5	499,1	22,0

SD: Desvio Padrão

LC: Limite de confiança

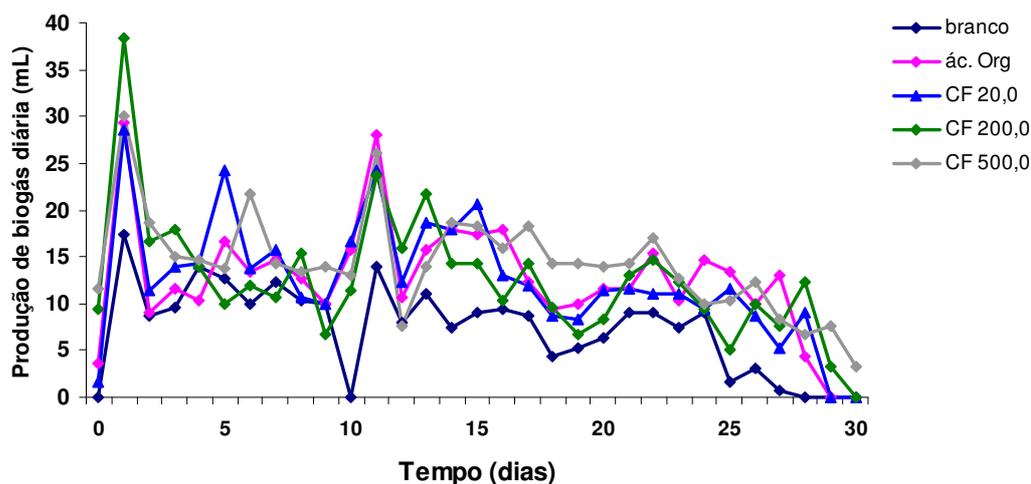


GRÁFICO 7: Produção diária de biogás nos digestores em função do tempo do teste (dias) - 2ª bateria.

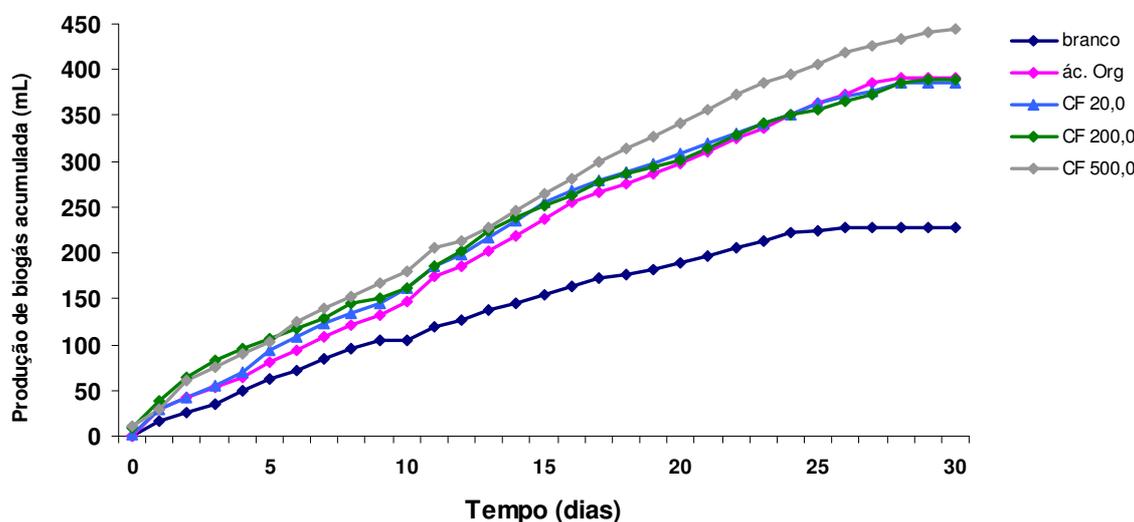


GRÁFICO 8: Produção acumulada de biogás nos digestores em função do tempo do teste (dias) - 2ª bateria.

Os resultados das análises de $DQO_{solúvel}$ desta bateria estão dispostos na TAB. 17. O percentual de remoção de DQO foi de acima de 86%. Não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos, com relação à % de $DQO_{biodegradada}$ (após o tratamento anaeróbio). As concentrações de CF (20,0; 200,0 e 500,0 mg.L⁻¹) não inibiram a capacidade das bactérias anaeróbias em degradar matéria

orgânica. No GRAF. 9 estão os valores de $DQO_{solúvel}$ ($mg.L^{-1}$) *antes e após o tratamento*, de cada grupo estudado.

Com relação à reprodutibilidade dos resultados, nesta bateria foram repetidas duas concentrações de CF (20,0 e 200,0 $mg.L^{-1}$), além do controle negativo (branco) e positivo (ac. orgânicos) utilizados na 1ª bateria. Os resultados da % de $DQO_{biodegradada}$ para cada um destes grupos foram considerados similares (GRAF. 10). Através destes resultados pode-se verificar que o percentual médio de remoção de DQO foi maior que 80% para todos os grupos (1ª e 2ª bateria), estes valores de remoção são semelhantes aos encontrados por ROCHA et al (2003) no lodo de cervejaria (75 a 86%).

TABELA 17: Eficiência de remoção DQO após tratamento anaeróbio (2ª bateria)

Grupo	Reator	DQO_{antes} ($mg.L^{-1}$)	$DQO_{após}$ ($mg.L^{-1}$)	Eficiência %
amostra 1	Branco	1510,74	182,47	87,9
amostra 2	Ac. orgânicos	2654,12	325,69	87,7
amostra 4	CF 20,0 $mg.L^{-1}$	2789,32	321,45	88,4
amostra 5	CF 200,0 $mg.L^{-1}$	2815,35	367,48	86,9
amostra 6	CF 500,0 $mg.L^{-1}$	2879,58	343,22	88,0

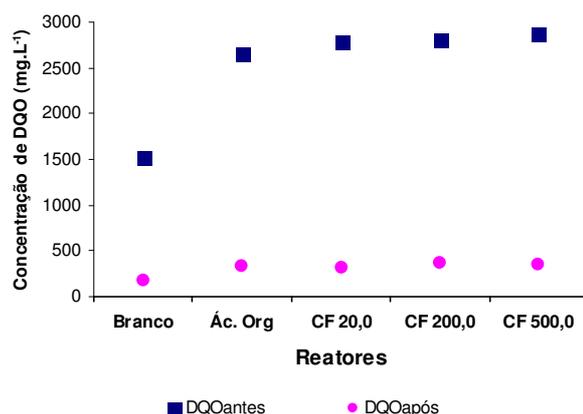


GRÁFICO 9: Concentração de DQO solúvel *antes e após o tratamento anaeróbio* – 2ª bateria

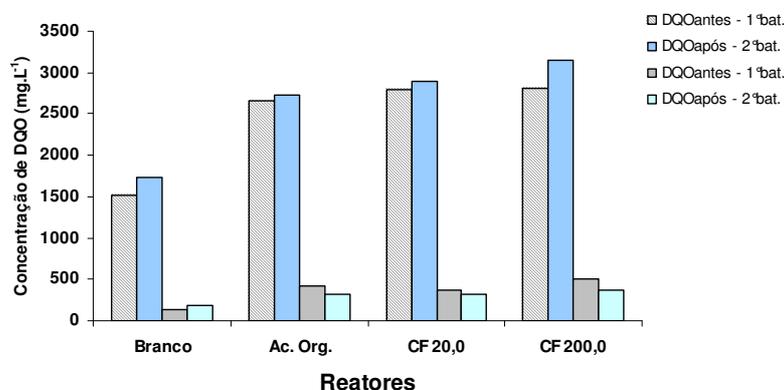


GRÁFICO 10: Variação da DQO solúvel *antes e após o tratamento anaeróbio* – 1ª e 2ª bateria.

7.4. Etapa 3: Avaliação Cromatográfica

Nesta etapa foram executados dois procedimentos experimentais e uma análise complementar visando detectar e quantificar a CF e seus possíveis metabólitos. Para tal, são usadas amostras de efluente oriundas dos digestores *antes* e *após o tratamento* anaeróbio, procedentes da etapa anterior. Os resultados encontrados em cada um deles são descritos a seguir:

1º procedimento: Detecção e quantificação da concentração de CF por HPLC-UV nas amostras dos efluentes *antes* e *após o tratamento* anaeróbio.

Para cada dia de análise, utilizando o equipamento de HPLC-UV foi determinada uma curva de calibração externa da CF (curva padrão), contendo sete níveis de concentração pré-determinados. Assim, essa curva permitiu a comparação da área da CF das amostras *antes e após o tratamento* com a área da curva padrão. A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou a concentração da espécie a ser quantificada, pode ser expressa como uma equação de reta denominada de curva analítica. Para traçar essa curva são necessários, no mínimo, de cinco pontos (sem considerar o ponto zero) para minimizar os erros associados (RIBANI et al, 2005). Na TAB. 18 são listados os dados da curva de calibração externa da CF.

TABELA 18: Dados da curva de calibração externa da ciclofosfamida – HPLC-UV

Nível	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6	Nível 7
Faixa linear (mg.L ⁻¹)	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0	50,0	100,0
Área	5625	8224	15957	43151	89370	484850	986075
RF	0,00000	0,00012	0,00012	0,00011	0,00011	0,00010	0,00010

RF: Fator de Resposta

As curvas de calibração obtidas apresentaram bons coeficientes de linearidade em torno do valor r^2 : 0,999891. Isso demonstra um alto grau de confiabilidade na preparação das concentrações e nas doses injetadas no equipamento (GRAF. 11). É importante colocar que a resolução da ANVISA 899/2003 recomenda um coeficiente de linearidade igual a 0,99. De outro modo, um erro metodológico não seria percebido.

O limite mínimo de quantificação da CF foi estipulado em 0,5 mg.L⁻¹, esse valor representa a concentração mínima necessária do composto para produzir um pico com razão sinal-ruído 3:1 (MAGDIC et al, 1996). Assim, baseado nesse limite, concentrações obtidas com valores menores que

0,5 mg.L⁻¹ não foram validadas para esta etapa (não apresentam uma resposta linear à curva de calibração externa).

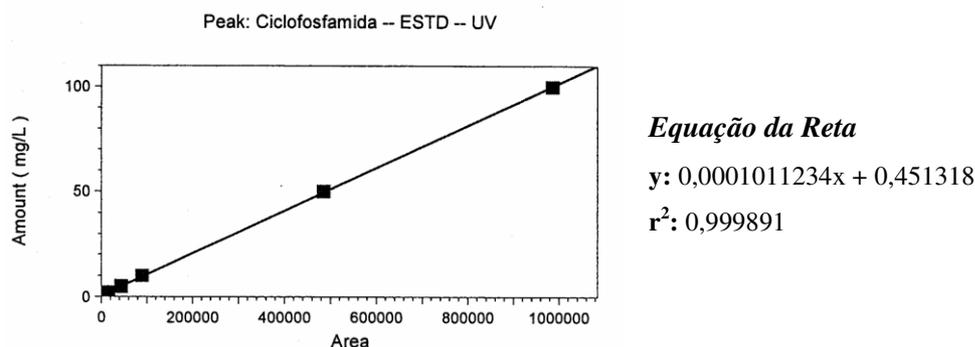


GRÁFICO 11: Curva de calibração externa da ciclofosfamida – HPLC-UV

Na realização da *Etapa Biodegradabilidade* (2ª etapa) foi adicionada CF em diferentes concentrações ao efluente dos digestores dos grupos: **amostra 3** (CF 2,0 mg.L⁻¹); **amostra 4** (CF 20,0 mg.L⁻¹); **amostra 5** (200,0 CF mg.L⁻¹) e **amostra 6** (CF 500,0 mg.L⁻¹).

Na TAB 19 são apresentados os valores de CF teóricos esperados, bem como aqueles quantificados através da análise cromatográfica (HPLC-UV) para cada amostra *antes e após o tratamento* anaeróbico. O ANEXO 10.5 apresenta os laudos das análises das amostras, realizadas pelo Laboratório Analítico Instrumental - Cromatografia do SENAI - CIC/SETSAM.

A CF foi quantificada nas amostras de efluente dos grupos **amostras 3; 5 e 6** (*antes do tratamento*), em concentrações semelhantes àquelas estabelecidas para cada grupo, já no grupo **amostras 4** foi quantificado uma concentração de CF (27,6 mg.L⁻¹) acima do valor teórico esperado (20,0 mg.L⁻¹) este resultado indica que houve falha na manipulação (preparação ou administração) da dose de CF a ser adicionada ao referido digestor (**amostra 4**).

A metodologia adotada permitiu detectar e quantificar a CF nos efluentes dos grupos **amostra 5 e 6** (*após o tratamento*). Não foi possível quantificar a CF nos grupos **amostra 3 e 4** (*após o tratamento*), pois os valores encontrados estavam abaixo do limite de quantificação pré-estabelecido (0,5 mg.L⁻¹). Como já era esperado, a CF não foi detectada nas amostras *antes e após-tratamento* dos grupos **amostra 1** (*branco*) e **amostra 2** (*ác. orgânicos*), pois não houve adição de CF nos digestores. Esses grupos correspondem aos grupos de controle negativo e positivo do processo de tratamento anaeróbico.

No GRAF. 12 estão os valores de CF quantificados para cada grupo (*antes e após o tratamento*), indicando que em todos os grupos (**amostras 3; 4; 5 e 6**) ocorreu redução da concentração da CF no efluente em virtude do tratamento anaeróbico durante 30 dias.

A partir da quantificação realizada, se observou que taxa de remoção da CF para cada grupo foi elevada. Assim, foram obtidos valores de 93,5% e 98,17% para os grupos **amostra 5 e 6**,

respectivamente. Para os grupos **amostra 3 e 4** (CF 2,0 e 20,0 mg.L⁻¹) não foi possível calcular a porcentagem de biodegradação da CF em virtude dos valores de concentração de CF estarem abaixo do limite de quantificação (TAB. 19). No entanto, com base nos resultados encontrados, pode-se afirmar que o processo de tratamento anaeróbico durante trinta dias foi capaz de biodegradar a CF presente no efluente em mais de 70%.

TABELA 19: Concentração de CF (mg.L⁻¹) das amostra dos digestores, *antes e após*-tratamento anaeróbico.

Reator	[CF] esperada*	Antes-tratamento**	Após-tratamento***	% Remoção CF
<i>Amostra 1</i>	--	< 0,5	< 0,5	0%
<i>Amostra 2</i>	--	< 0,5	< 0,5	0%
<i>Amostra 3</i>	2,0	1,7	< 0,5	nc
<i>Amostra 4</i>	20,0	27,6	< 0,5	nc
<i>Amostra 5</i>	200,0	198,6	12,9	93,50%
<i>Amostra 6</i>	500,0	486,4	8,9	98,17%

*: Concentração de CF teórica adicionada em cada reator

** : Concentração de CF quantificada por HPLC-UV *antes* do tratamento anaeróbico

***: Concentração de CF quantificada por HPLC-UV *após* o tratamento anaeróbico

nc: não calculado – valor abaixo do limite de quantificação.

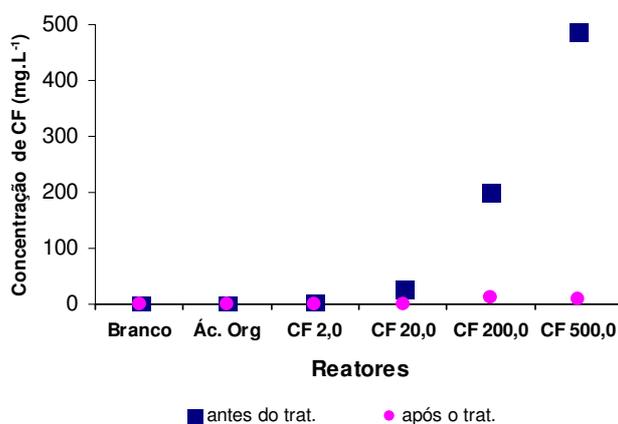


GRÁFICO 12: Quantificação da CF (mg.L⁻¹) nos digestores *antes e após* o tratamento anaeróbico.

Os cromatogramas das amostras de efluentes *antes e após o tratamento* (no tempo de retenção característico da CF) são apresentados nas FIGS. 20 e 21, respectivamente. A partir dos resultados ilustrados, se observa que o tratamento anaeróbico foi eficaz para biodegradar o antineoplásico CF nas concentrações adotadas; enquanto a literatura considera a CF com baixa biodegradabilidade em sistemas de tratamento aeróbico (KÜMMERER, 2004).

Outra questão a ser considerada é a possibilidade de que o antineoplásico CF gere intermediários tóxicos, que também possam comprometer o ambiente aquático (HUITEMA et al,

2000). Analisando os cromatogramas *após o tratamento* (FIG. 21), não se observou formação de metabólitos na faixa de detecção de 205 nm (UV) (para 5 minutos de corrida) para os grupos **amostra 3; 4; 5 e 6** (ver TAB. 19).

Também, foi realizada uma outra análise da **amostra 5** (CF 200,0 mg.L⁻¹), alterando agora o tempo de corrida no HPLC-UV de 5 para 45 minutos e sob as mesmas condições. Esta dose foi selecionada por ter sido definida como dose referência na *Etapa 1*. Dessa análise se observou o aparecimento de um outro pico mais largo em 6,0 min, além do pico oriundo da CF em 2,1min., sugerindo a existência de metabólitos (ver ANEXO 10.6). Para elucidar essa questão foi realizada uma análise complementar usando HPLC - Detector de PDA¹.

Análise complementar: Análise por HPLC - Detector de PDA com varredura na faixa de 195-600 nm, para verificar a existência de metabólitos da CF no efluente da **amostra 5**.

O resultado desta análise revelou a presença de um pico em 4,975 min., além daquele da CF em 3,364 min. (ANEXO 10.7). Em ambos os picos a máxima absorção ocorreu para 205 nm, confirmando a faixa de detecção da CF no efluente reportada nos estudos apresentados em HANSEL et al, 1997.

Ampliando a busca pelos possíveis metabólitos tóxicos da CF, foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrofotômetro de massa (CG/MS), os resultados obtidos são descritos na seguinte seção.

¹ Um dos detectores mais empregados para HPLC é o UV, sensível para moléculas orgânicas que absorvem luz dentro do espectro de comprimento de onda visível. O UV permite a realização da medida de apenas um comprimento de onda, selecionado em qualquer ponto do cromatograma. Já, o através do detector PDA se pode medir a absorbância através de um espectro largo de comprimentos de onda simultaneamente.

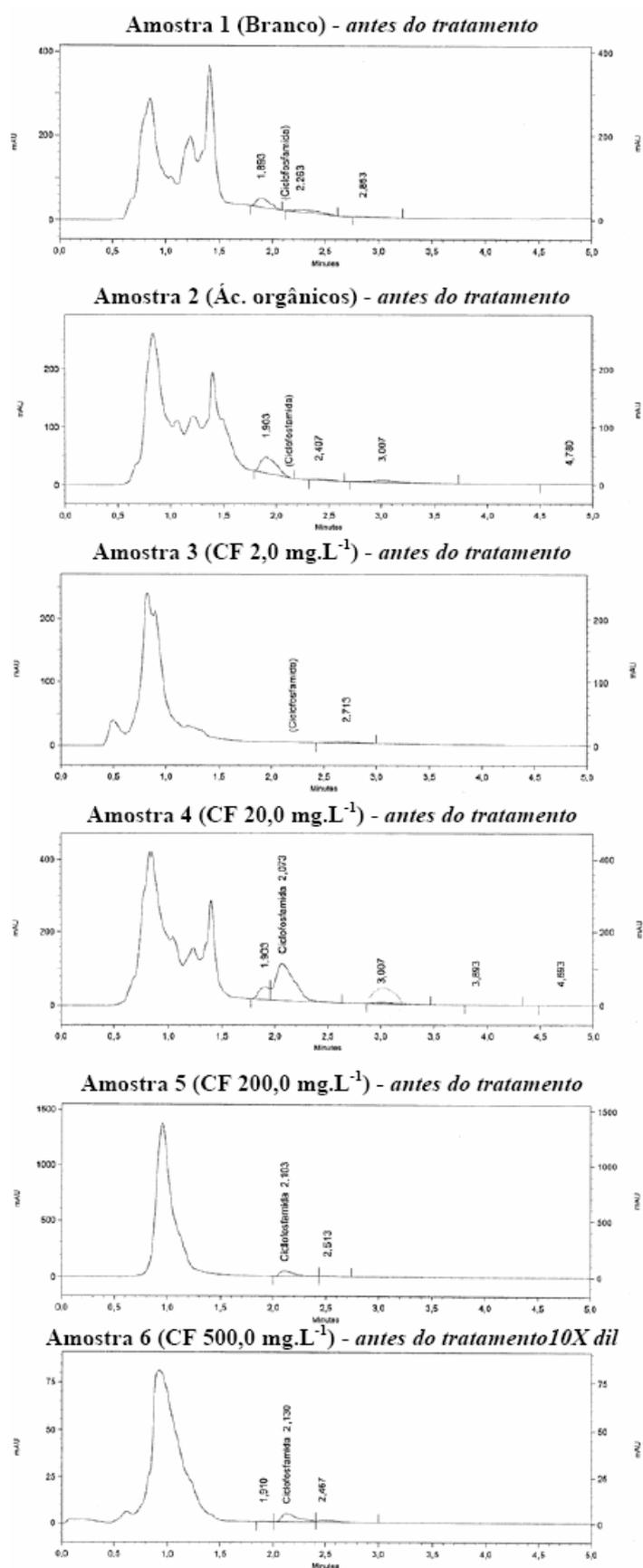


FIGURA 20: Cromatogramas dos digestores *antes do tratamento*, no tempo de retenção característico da CF.

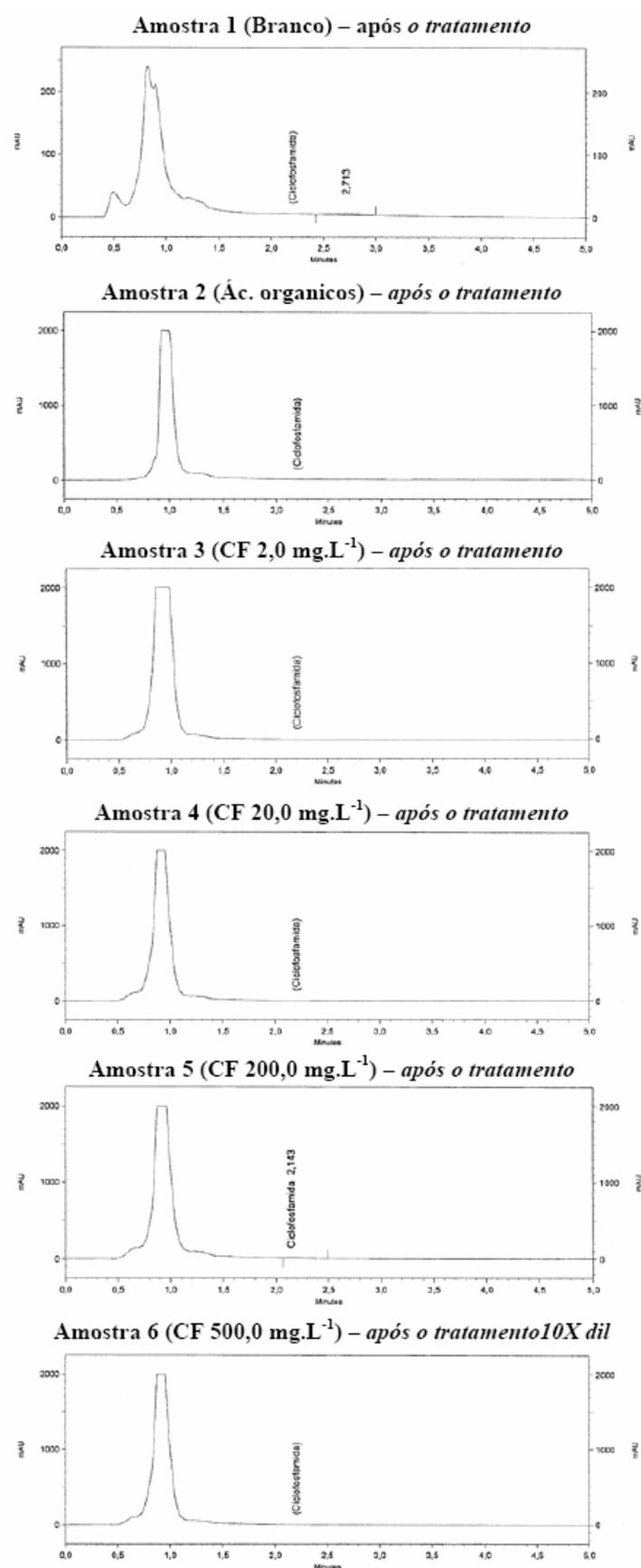


FIGURA 21: Cromatogramas dos digestores após o tratamento, no tempo de retenção característico da CF.

2º procedimento: Determinação de metabólitos da degradação da CF após o tratamento anaeróbio por meio de cromatografia gasosa (CG-MS).

A amostra do efluente gerado no grupo **amostra 5** (CF 200,0 mg.L⁻¹) foi avaliada no aparelho de CG-MS com intuito de rastrear e identificar os possíveis metabólitos formados da biodegradação da CF por processo anaeróbio, durante 30 dias.

No GRAF 13 apresenta um comparativo do cromatograma do padrão de CF (em vermelho) com o cromatograma da **amostra 5** (em verde). Observa-se que na amostra do efluente além do pico da CF aos 13,11 min, aparecem outros dois picos cromatográficos diferentes, sendo aqui denominados de pico A em 17,21 min [GRAF. 14(a)] e o outro de pico B em 18,33 min [GRAF. 15(a)].

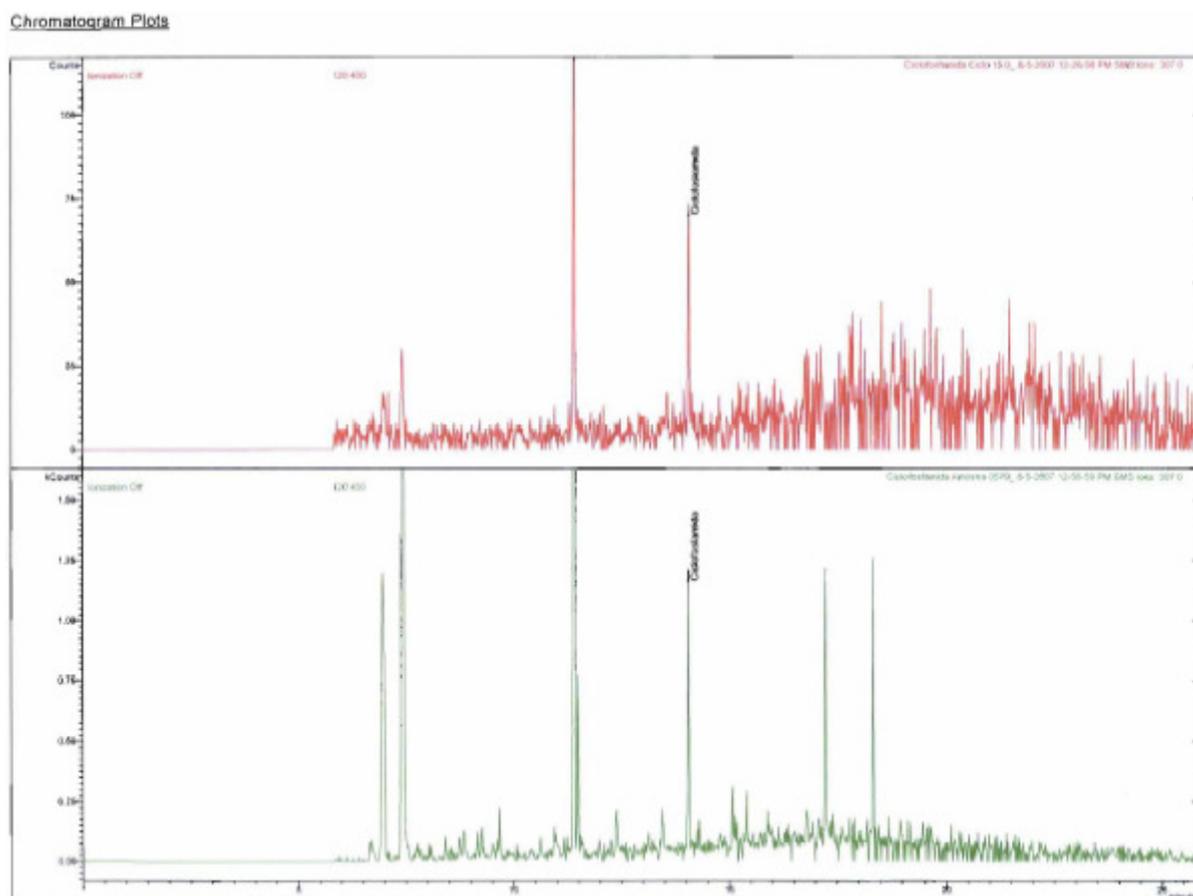
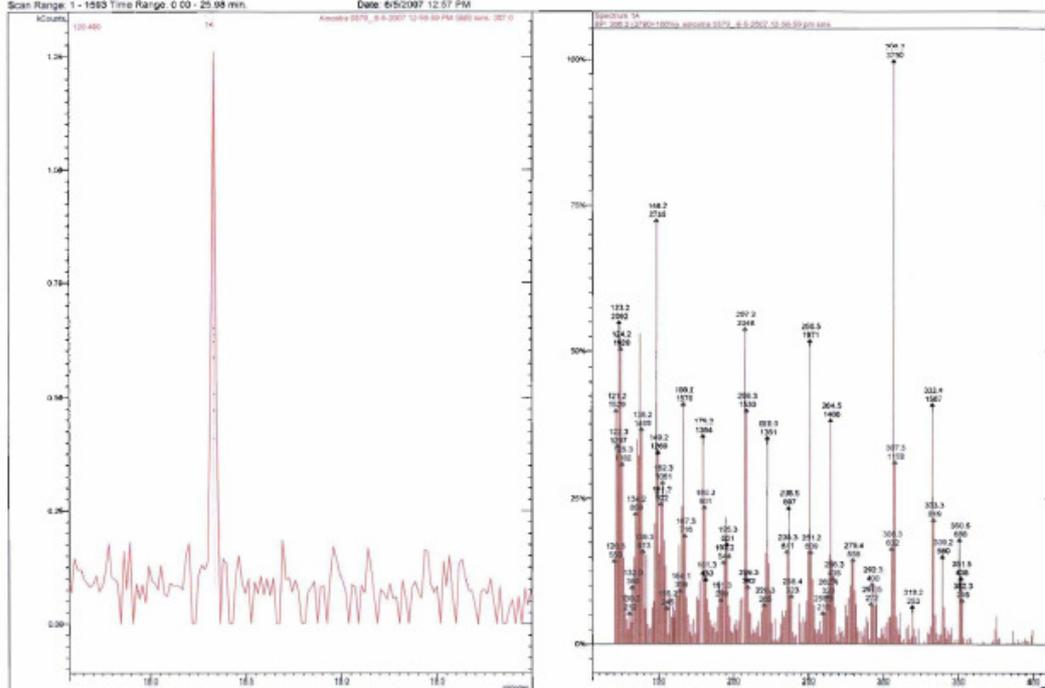


GRÁFICO 13: Cromatograma do padrão CF (vermelho) e do efluente do digester *amostra 5* (verde)

MS Data Review Active Chromatogram and Spectrum Plots - 6/19/2007 4:34 PM

File: c:\msdchem\0000000000\data.ms.ms 0579_6-5-2007 12:56:59 pm.ms
 Sample: Amostra 0079_ Operator: Alexandre
 Scan Range: 1 - 1593 Time Range: 0.00 - 25.98 min. Date: 6/5/2007 12:57 PM



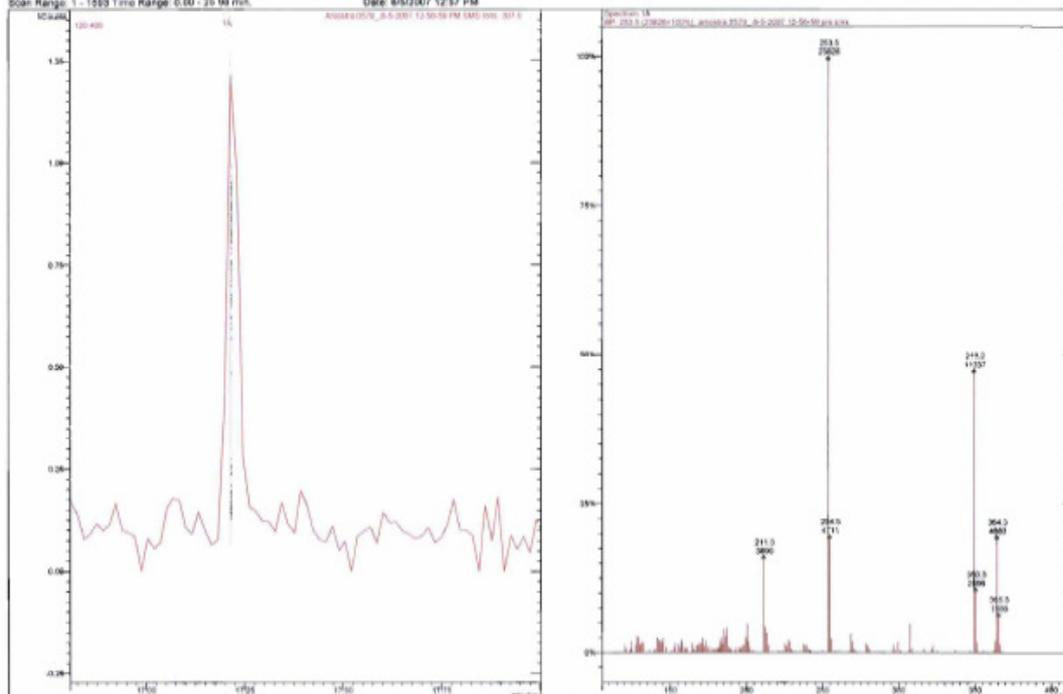
(a)

(b)

GRÁFICO 14: Espectro de massa CG-MS do pico A

MS Data Review All Plots - 6/19/2007 4:31 PM

File: c:\msdchem\0000000000\data.ms.ms 0579_6-5-2007 12:56:59 pm.ms
 Sample: Amostra 0079_ Operator: Alexandre
 Scan Range: 1 - 1593 Time Range: 0.00 - 25.98 min. Date: 6/5/2007 12:57 PM



(a)

(b)

GRÁFICO 15: Espectro de massa do pico B

No procedimento anterior, foi detectado e quantificado por HPLC-UV, a presença de CF no efluente do grupo *amostra 5* (CF 200,0 mg.L⁻¹) após o término do tratamento anaeróbio (duração de 30 dias) na concentração de 12,9 mg.L⁻¹, que pode ser confirmada pela detecção do pico de CF, na amostra do efluente, no mesmo tempo de retenção do cromatograma padrão de CF.

O GRAF. 14 ilustra o resultado do cromatograma do pico A. O GRAF. 14(a) apresenta esse pico, localizado a 17,21min, e o GRAF. 14(b) ilustra um detalhe dos compostos (com suas respectivas massas) localizados dentro do pico A. No ANEXO 10.8 estão listados os possíveis compostos (metabólitos da CF) contidos nesse pico, identificados a partir da pesquisa no banco de dados do software (NIST) do CG-MS.

O GRAF. 15 segue o mesmo padrão de apresentação do GRAF. 14, agora para o pico B. No ANEXO 10.9 são listados os possíveis compostos desse pico.

O espectro de massa de ambos os picos A e B diferem quando comparados com o espectro de massa da CF. Nenhum dos compostos propostos pelo banco de dados (NIST), estão descritos na literatura como metabólitos da CF, indicando que os picos detectados não foram indentificados como metabólitos da CF. A ausência (ou não detecção) de metabólitos ao longo do processo de biodegradação gera indícios que os mesmos tenham sido usados como fonte de energia pelas bactérias anaeróbias. Neste contexto, serão necessários novos e mais detalhados estudos no que diz respeito à estrutura dos metabólitos e suas possíveis rotas operacionais. Assim, esta etapa apresenta uma abordagem primária para futuras investigações a respeito da biodegradação da CF.

7.5. Etapa 4: Teste de Toxicidade e Mutagenicidade

7.5.2. Teste de Toxicidade

Nesta etapa foram realizados dois experimentos com o propósito principal de avaliar a qualidade das amostras de efluente geradas após o processo anaeróbio, para tanto foram coletadas amostras dos grupos *antes* e *após-tratamento* para realização do teste de toxicidade.

1º Experimento: Avaliação da toxicidade aguda em amostra de efluente antes e após-tratamento anaeróbio, lodo e solução de ácidos orgânicos.

As amostras do efluente foram testadas baseando-se na exposição do organismo-teste *Daphnia magna* a várias diluições do efluente, por um período de 48 horas. Foram utilizadas nove (9) concentrações, já descritas no capítulo 6.

No ANEXO 10.10 (TAB. 26 e 27) estão apresentados os dados brutos observados com relação ao número de indivíduos imóveis, para cada concentração de amostra do efluente. Na TAB. 20, os resultados foram dispostos com relação ao valor médio obtido da CE₅₀ 48h e o pH para a cada uma das amostras testadas. As amostras dos grupos **1; 2; 3; 4 e 5 (antes do tratamento)** apresentaram um elevado potencial tóxico, sendo que os valores de CE₅₀ 48h oscilaram entre 3,88 até 8,83. A toxicidade encontrada no grupo **amostra 1** (branco), pode ser atribuída a presença do lodo de cervejaria, utilizado como inóculo para a montagem dos reatores. Valores baixos de CE₅₀ 48h, também foram constatados nas amostras dos grupos (*após o tratamento*), variando entre 8,43 até 39,22.

TABELA 20: Resultados do teste de toxicidade aguda (*antes e após o tratamento*).

Grupos	Reator	CE ₅₀ 48 h (%)	pH
amostra 1 - (antes)	Branco*	8,83 ± 0,44	7,00
amostra 2 - (antes)	Ac. Orgânicos**	6,27 ± 0,31	7,13
amostra 3 - (antes)	CF 2,0 mg.L ⁻¹	7,21 ± 0,36	7,18
amostra 4 - (antes)	CF 20,0 mg.L ⁻¹	4,83 ± 0,24	6,80
amostra 5 - (antes)	CF 200,0 mg.L ⁻¹	3,88 ± 0,19	7,30
amostra 1 - (após)	Branco*	39,22 ± 1,96	6,95
amostra 2 - (após)	Ac. Orgânicos**	12,07 ± 0,60	7,19
amostra 3 - (após)	CF 2,0 mg.L ⁻¹	9,16 ± 0,45	7,43
amostra 4 - (após)	CF 20,0 mg.L ⁻¹	8,43 ± 0,42	6,62
amostra 5 - (após)	CF 200,0 mg.L ⁻¹	10,20 ± 0,51	7,29

*: controle negativo, composição: lodo, solução de nutrientes e água.

** : controle positivo, composição: lodo, solução de nutrientes, solução de ácidos orgânicos e água.

CE₅₀ 48 h (%): concentração efetiva média em 48 h de exposição.

pH: potencial hidrogeniônico

Estudos de toxicidade do efluente são úteis para se estimar o potencial de risco de introdução de compostos tóxicos no ambiente, ainda que as substâncias causadoras não tenham sido identificadas (AQUINO, 2003). O GRAF. 16 mostra que o teste de toxicidade aguda com *D. magna* foi capaz de diferenciar a toxicidade do efluente *antes* do *após-tratamento*. Dentre os efluentes avaliados, as amostras de *antes-tratamento*, apresentaram maior toxicidade.

Os resultados CE_{50} 48h (TAB. 20) encontrados para cada uma das amostras de *após-tratamento*, revelaram que os grupos **amostra 1** e **5** apresentaram uma melhora significativa na qualidade dos seus efluentes quando comparado aos seus respectivos *antes-tratamento*. Nos demais grupos **amostra 2; 3; e 4** foi possível observar uma discreta redução da toxicidade quando comparado aos seus efluentes antes do tratamento anaeróbico. Quanto menor o valor de CE_{50} , que exprime a toxicidade aguda, maior é a toxicidade do meio, sendo estes valores numéricos de toxicidade aguda e crônica expressos por uma relação inversa (CETESB, 1990).

Quando comparados os valores de CE_{50} 48h, nos efluentes gerados após o tratamento anaeróbico (GRAF. 16) foi possível constatar diferenças significativas com relação à redução de toxicidade entre os grupos **amostra 2; 3; 4 e 5** (ac orgânicos e CF) e o reator **amostra 1** (Branco).

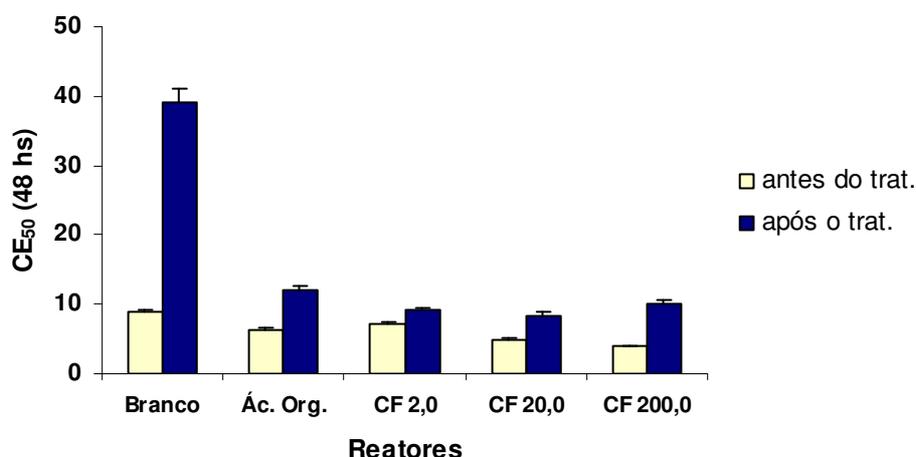


GRÁFICO 16: CE_{50} 48h dos digestores para o teste de toxicidade aguda (*antes e após-tratamento*)

O pH das amostras de efluentes não foi corrigido. A faixa de pH dos efluentes (*antes-tratamento*) variou de 6,80-7,30. Não foram constatadas alterações de pH significativas nos efluentes gerados após o tratamento, os valores encontrados variaram de 6,80 até 7,30. O valor de pH, dentro da faixa estabelecida pela norma adotada é um dos critérios de validade para os testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.

Para se conhecer a eficiência da remoção de toxicidade através de um sistema de tratamento de efluentes, é necessário ter os resultados da toxicidade *antes e após o tratamento* (METCALF e

EDDY, 2003). A porcentagem de redução de toxicidade pelo processo de tratamento anaeróbio realizado durante 30 dias, está apresentado na TAB. 21 e no GRAF. 16.

Para um tempo de exposição de 48 h, a % de remoção média de toxicidade dos efluentes variou de 21,28 até 77,5 %, sendo que, o grupo *amostra 1* (branco) apresentou a melhor taxa de remoção, seguido do grupo *amostra 5*; *2 e 4* e por último o grupo *amostra 3* (CF 2,0 mg.L⁻¹), com uma taxa de remoção bem abaixo dos demais. Os valores de redução de toxicidade obtidos neste trabalho estão abaixo do encontrado por NIETO (2000), que em seus experimentos, observou que indústrias que utilizam digestores anaeróbios como tratamento primário ou secundário conseguem reduzir de 92,7% a 97,6%.

TABELA 21: Porcentagem de remoção de toxicidade aguda obtida nos digestores em função do tratamento

Grupo	Reator	Redução da toxicidade (%)
<i>amostra 1</i>	Branco	77,50
<i>amostra 2</i>	Ác. orgânicos	48,05
<i>amostra 3</i>	2,0 mg.L ⁻¹	21,28
<i>amostra 4</i>	20,0 mg.L ⁻¹	42,70
<i>amostra 5</i>	200,0 mg.L ⁻¹	61,96

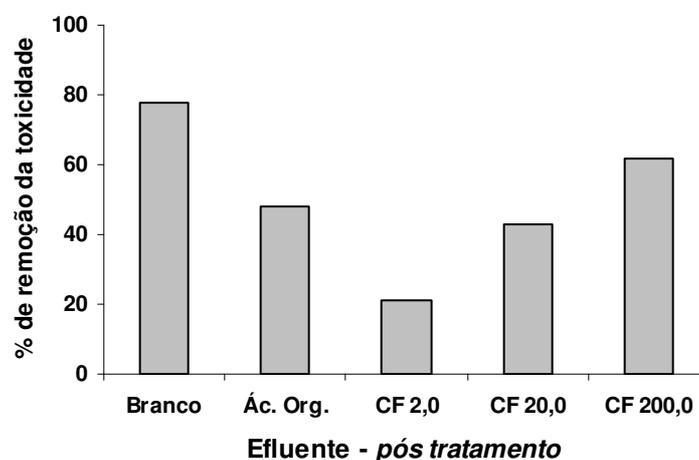


GRÁFICO 17: Porcentagem de remoção de toxicidade aguda obtida nos efluentes *após-tratamento*.

Constataram-se diferentes níveis de remoção de toxicidade durante o tratamento biológico, entretanto, em nenhuma amostra de efluente foi observado o aumento da toxicidade em virtude do tratamento ou da sua composição. A permanência de alta toxicidade em todas as amostras analisadas aparentemente não está atribuída à presença de CF no efluente, já que foi constatado através de análise

cromatográfica (HPLC) a biodegradação significativa do composto após o tratamento anaeróbio. Outro ponto relevante foi o fato do grupo **amostra 2** (*ac. orgânicos*) não receber CF e também apresentar uma redução da toxicidade inferior ao grupo **amostra 1** (*branco*). A presença do lodo anaeróbio e da solução de ácidos orgânicos, fundamentais para a realização do Teste de biodegradabilidade (*2ª Etapa*) provavelmente está interferindo negativamente na redução da toxicidade.

O trabalho realizado por CUNHA et al (2004) avaliou a toxicidade aguda (*D. magna*) da CF presente em amostras contendo urina e constatou que concentrações de CF acima de 50 mg.L^{-1} apresentaram toxicidade aguda. Esse resultado corrobora com a hipótese que os ácidos orgânicos ou a biomassa podem estar interferindo no processo. Em função disso foi avaliada a toxicidade desses compostos.

No ANEXO 10.11 (TAB. 28) estão apresentados os dados brutos observados com relação ao número de indivíduos imóveis, para cada concentração do lodo anaeróbio e da solução de ácidos orgânicos. Os valores médios obtidos CE_{50} 48h neste experimento revelaram que a CE_{50} 48h do lodo foi de 15,09 com limites de confiança (LC) entre 13,83 e 16,47 e o pH de 7,8.

A solução de ácidos orgânicos foi considerada com alta toxicidade aguda, não sendo possível calcular CE_{50} 48h. O baixo valor de pH da amostra (4,36) foi considerado um fator determinante para os efeitos de imobilidade observados (TAB. 28). O principal problema causado pelos ácidos parece estar relacionado, não com suas concentrações, mas sim na acidez causada por eles. Este fato foi verificado por McCARTY (1964) apud PINTO (2006) que mostrou que concentrações de ácidos voláteis de 6 a 8 g.L^{-1} não tem efeito tóxico sobre a digestão anaeróbia, desde que o pH seja mantido próximo da neutralidade.

A deficiente bibliografia disponível evidencia a necessidade de mais estudos com relação às técnicas utilizadas para avaliação da toxicidade por ácidos orgânicos, pois, a maior parte dos trabalhos é antiga e foram desenvolvidos com tecnologias que não refletem as atuais condições experimentais utilizadas em estudos visando o aproveitamento do lodo anaeróbio para agricultura.

Segundo BOHNEN et al (2005), durante a decomposição anaeróbia, formam-se produtos intermediários, resultantes principalmente da fermentação, dentre os quais destacam-se os ácidos orgânicos alifáticos de baixo peso molecular (acético, propiônico e butírico), que podem ser tóxicos para as plantas (KOPP et al, 2007).

A importância desse resultado é a indicação de que o processo anaeróbio realizado durante trinta dias, se mostrou efetivo em relação à redução da toxicidade do efluente se comparado ao seu efluente inicial, mesmo com a presença de CF, muito embora seja considerado que todos os digestores apresentaram toxicidade aguda alta.

2º Experimento: *Avaliação da toxicidade crônica do efluente antes e após-tratamento anaeróbio*

Este experimento, não foi possível concluir, em virtude da permanência da toxicidade aguda dos efluentes, que resultou na morte dos organismos-teste (*Daphnia magna*) a partir do 6º dia, após o início do teste.

O teste de toxicidade crônica depende diretamente dos resultados do teste de toxicidade aguda, uma vez que as concentrações sub-letais são calculadas a partir de CE_{50} 48h (BARROS e DAVINO, 1996), sendo recomendada à utilização de valores baixos de CE_{50} no maior tempo, pois a exposição de organismos (bioindicadores) a baixas concentrações de um determinado composto químico, por um longo período de tempo, pode resultar em um mesmo efeito da exposição da alta concentração, por um curto período de tempo (FERREIRA, 2003).

Os materiais tóxicos podem acumular-se chegando a concentrações inaceitáveis para peixes e outros organismos aquáticos. A legislação ambiental não é abrangente o suficiente para incorporar os milhares de agentes tóxicos e, para tal, é necessário se conhecer o efeito dos mesmos sobre os organismos aquáticos e sobre os ecossistemas, para se poder definir os padrões de qualidade, tanto para o corpo receptor quanto para os lançamentos.

7.5.2. Teste de Mutagenicidade

O Teste do Micronúcleo Písceo foi utilizado nesta etapa visando à investigação dos efeitos genotóxicos causados pela presença da CF na água (*1º Experimento*) e nas amostras de efluente oriundas da *Etapa Biodegradabilidade (2º Experimento)*.

1º Experimento: Avaliação da mutagenicidade em peixes expostos a CF (200 mg.L⁻¹)

Neste experimento, foi avaliada a frequência de eritrócitos micronucleados em *Geophagus brasilienses* expostos à CF. Como grupo controle negativo foram utilizados peixes mantidos em água desclorada.

A concentração de CF (200 mg.L⁻¹) utilizada nesta etapa foi baseada em pesquisa levantada na 1º etapa deste trabalho onde a dose média de CF administrada nos pacientes em tratamento do Hospital 3, foi de 835,0 ± 6,75 mg/dia. Segundo a literatura 25% da dose administrada de CF, é excretada na forma inalterada, sendo assim, o volume médio de excreção de CF corresponderia a 208,75 mg.L⁻¹.

O resultado deste teste está apresentado na TAB. 22 e ilustrado na FIG. 22.

TABELA 22: Resultados do teste de mutagenicidade em amostra de água contendo CF

Aquário (grupo)	Eritrócito Normal (nº células)	Eritrócito Micronucleado (nº células)	pH	O.D. (mgO ₂ .L ⁻¹)
Controle	2000	02 (SM)	6,95	6,2
Ciclofosfamida	2000	24,33 ± E.P.M.5,81	6,7	6,6

E.P.M. – Erro padrão da média

pH – potencial hidrogeniônico

O.D. – Oxigênio dissolvido

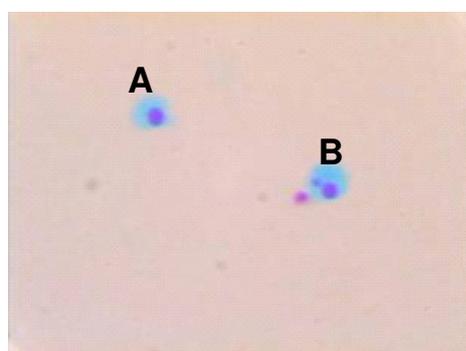


FIGURA 22: A) Hemócitos Normais e B) Hemócitos micronucleados (HMN)

Os resultados das análises microscópicas revelaram que o grupo controle apresentou 2 eritrócitos micronucleados num total de 2000 células analisadas, sendo assim, considerado normal para a validade do teste. Já a exposição a CF (200 mg.L⁻¹) provocou alta incidência de eritrócitos micronucleados, em todos os organismos testados (*Ciclo 1, 2 e 3*). A média de micronúcleos media foi de 24,33± E.P.M.5,92 a cada 2000 células contadas. Comentar mmais

Na análise de qualidade de água, os valores de pH e O.D. de ambos os aquários estão de acordo com as normas do CONAMA 357/2004. As variáveis de qualidade de água não foram limitantes para avaliação da mutagenicidade da CF.

O resultado apresentado para o Teste do MNs com *Geophagus brasilienses* em exposição a CF por 48 horas constatou um aumento na frequência de MNs, indicando a capacidade do teste do MNs em detectar a ação genotóxica da CF. Segundo CARRANO (1997), a presença de micronúcleos pode ser considerada como uma indicação de ocorrência prévia de aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas em algum momento do ciclo de vida das células.

A literatura revela que a CF tem sido bem utilizada como controle positivo para Teste MNs para amostras ambientais, produtos farmacêuticos e em seres humanos. ERGENE et al (2007), usaram 5 mg.L⁻¹ de CF como controle positivo para avaliar a genotoxicidade (teste MN – *Oreochromis niloticus*) de amostras de água coletadas ao longo do rio Berdan (Turquia) que recebe descargas de efluentes industriais e municipais.

2ºExperimento: Avaliação do potencial mutagênico das amostras dos efluentes antes do tratamento anaeróbio

Este teste foi utilizado neste experimento, como ferramenta de análise xenobiótica da CF, postulando uma avaliação da qualidade do efluente gerado após o tratamento anaeróbio através da utilização de peixes da espécie *Oreochromis* sp, como bioindicadores de efeito.

Os resultados constataram que todas as amostras dos grupos *antes do tratamento: amostra 1; 2; 3; 4 e 5* apresentaram alta toxicidade aguda, causando a morte dos peixes num período inferior a 24 horas (TAB. 23) o que impossibilitou a realização do ensaio do MNs, pois os organismos necessitam serem expostos por um período de 48 horas para passarem pelo menos por uma divisão mitótica. O referido ensaio, não foi realizado com as amostras de efluente *após-tratamento*, em virtude da permanência da toxicidade aguda confirmada no subitem 7.5.1. (*1ºexperimento*), inviabilizando assim estabelecer uma relação entre concentração de CF no efluente e a frequência de micronúcleos.

Soluções de CF na concentração de até 1g.L⁻¹ não causaram aumento da enzima β -galactosidase, indicando que apesar da ocorrência da CF ser confirmada analiticamente (CG) não houve constatação do seu efeito genotóxico pelo SOS cromoteste, ou seja, a CF não contribui para a genotoxicidade do efluente (STERGER-HARTMANN et al, 1997).

O estudo de MONARCA et al (2000) avaliou a influência de diferentes desinfetantes na mutagenicidade e toxicidade de esgotos domésticos usando o teste de AMES, constatou que presença da toxicidade pode interferir nos resultados da mutagenicidade por impedir o crescimento das bactérias usadas no teste de AMES.

Os valores de pH encontrados nos aquários, não foram limitantes para avaliação da mutagenicidade dos efluentes, pois estão de acordo com a norma do CONAMA 357/2004.

TABELA 23: Resultados do teste de mutagenicidade *do efluente antes do tratamento anaeróbio*

Grupo	Reator	Resultado	pH
<i>amostra 1</i>	Branco	0 (SM)	7,15
<i>amostra 2</i>	Ác. orgânicos	Tóxico (<i>Morreu em menos de 24 horas</i>)	7,00
<i>amostra 3</i>	2,0 mg.L ⁻¹	Tóxico (<i>Morreu em menos de 24 horas</i>)	7,13
<i>amostra 4</i>	20,0 mg.L ⁻¹	Tóxico (<i>Morreu em menos de 24 horas</i>)	7,18
<i>amostra 5</i>	200,0 mg.L ⁻¹	Tóxico (<i>Morreu em menos de 24 horas</i>)	6,80

SM – Sem efeito mutagênico para a espécie e período de tempo testado

pH – potencial hidrogeniônico

8. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O Capítulo 1 expôs quatro questionamentos que guiam o desenvolvimento deste trabalho. Assim, a partir dos resultados encontrados em cada uma das etapas, são elaboradas as seguintes conclusões:

1. Qual o antineoplásico mais utilizado no tratamento do câncer em Florianópolis (SC)?

- ✓ A cidade de Florianópolis concentra cerca 60% dos estabelecimentos públicos e privados do estado de Santa Catarina, envolvidos diretamente com quimioterapia antineoplásica.
- ✓ No ano de 2002, existiam seis hospitais públicos e três clínicas privadas envolvidos com o tratamento de pacientes oncológicos em Florianópolis. Esses estabelecimentos estão localizados na região central, verificando-se que até hoje despejam seus efluentes na rede coletora de esgotos da cidade sem nenhum tipo de tratamento prévio. Apenas a partir do ano de 2006, o novo hospital CEPON implantou um sistema de tratamento de efluentes.
- ✓ A CF foi selecionada como objeto de estudo, por estar presente em todos os estabelecimentos pesquisados e, principalmente, por apresentar características carcinógenas comprovadas.
- ✓ A partir das pesquisas realizadas no *hospital 3*, foi encontrado que a dose média administrada aos pacientes tratados com CF é de 835,00 mg/dia, com um E.P.M. de 6,75. Também, foi determinado um volume de aproximadamente 1 litro por dia de excreção urinária nos pacientes tratados com CF.

2. Qual é o efeito da ciclofosfamida sobre o processo anaeróbio?

Considerando o fato que o inóculo utilizado manteve suas características ativas ao longo dos experimentos, garantindo assim a reprodutibilidade dos resultados, conclui-se:

- ✓ Não foram constatadas alterações significativas no volume de biogás produzido pelos digestores adicionados com CF quando comparados ao volume de biogás produzido pelo controle positivo (*amostra 2* – ác. orgânicos).

- ✓ As concentrações de CF utilizadas neste estudo (2,0; 20,0; 200,0 e 500,0 mg.L⁻¹), não interferiram negativamente na atividade dos microrganismos anaeróbios, considerados essenciais para o sistema.

3. Como verificar a eficácia do tratamento anaeróbio na degradação da ciclofosfamida?

- ✓ A efetividade do processo anaeróbio foi avaliada pela quantificação da concentração de ciclofosfamida por HPLC em amostras do efluente *antes e após o tratamento*;
- ✓ A CF foi identificada por HPLC-UV nas amostras de efluente antes do tratamento, resultando em concentrações semelhantes daquelas definidas na composição de cada reator.
- ✓ A redução da concentração de CF nas amostras de efluente após o tratamento de todos os grupos indicou que a mesma pode ser biodegradada por processo anaeróbio em um tempo de trinta dias.
- ✓ A CG-MS não detectou a formação de metabólitos da CF como resultado do tratamento anaeróbio. Isso permite supor que os mesmos também tenham sido degradados.

4. Como avaliar a qualidade do efluente gerado pelo tratamento anaeróbio?

- ✓ A avaliação da toxicidade aguda das amostras de efluente *antes e após o tratamento anaeróbio*, utilizando *D. magna*, permitiu diferenciar a toxicidade entre os grupos analisados. O resultado do teste nas amostras dos digestores *antes do tratamento* indicou toxicidade. Contudo, após trinta dias de tratamento anaeróbio, conseguiu se reverter em parte essa toxicidade, quando comparado ao seu efluente *antes do tratamento* correspondente (variando de 21,28 até 77,5 %). No entanto, todos os grupos apresentaram uma toxicidade aguda elevada (valores baixos de CE₅₀ 48h) para as *D. magna*.
- ✓ Os digestores estão compostos por lodo e uma solução de ácidos orgânicos. Da análise individual desses componentes se determinou que eles apresentaram uma toxicidade aguda alta, interferindo na redução da toxicidade do efluente. A solução de ácidos orgânicos é a principal responsável pela toxicidade aguda alta, não permitindo determinar o valor de CE₅₀ 48h.

- ✓ A permanência da toxicidade no efluente *após-tratamento*, não está aparentemente atribuída à presença de CF, uma vez que foi constatada por análise cromatográfica (HPLC) a biodegradação do composto após o tratamento anaeróbio.
- ✓ O Teste do Micronúcleo com *Geophagus brasilienses* em exposição a CF (200 mg.L⁻¹) na água por 48 horas, constatou um aumento na frequência de MNs, indicando a capacidade do teste do MNs em detectar a ação genotóxica da CF.
- ✓ Alta toxicidade aguda das amostras dos efluentes (*antes e após-tratamento*) impediu a conclusão do teste toxicidade crônica, bem como inviabilizou estabelecer uma relação entre concentração de CF utilizada nas amostras de efluente e a frequência de aparecimento de micronúcleos.

Conclui-se que as várias ferramentas de análise utilizadas neste trabalho permitiram verificar a eficiência do tratamento anaeróbio na remoção da CF (> 70%) presente nas amostras avaliadas durante o período pré-determinado de trinta dias. Nas condições ambientais testadas, as concentrações de CF, 2,0 até 500 mg.L⁻¹ não interferiram na capacidade das bactérias anaeróbias em degradar o material orgânico presente no inoculo, visto que em todos os biodigestores a eficiência de remoção de DQO foi acima de 80%. Entretanto, mesmo com a constatação da redução da toxicidade nos grupos **amostra 3-5** (adicionados com CF), não se pode comprovar que esta redução esteja atribuída somente a biodegradação da CF, uma vez que a análise individual do lodo e da solução de ácidos orgânicos apontou que ambos também contribuíram para a toxicidade nas amostras (*antes do tratamento*).

Assim, este trabalho fornece uma base inicial para futuros estudos que acrescentem informações sobre outros fármacos antineoplásicos utilizados. Com um mais amplo conhecimento, novas metodologias que subsidiem modificações nas resoluções de proteção ambiental (como atualmente em vigor a CONAMA 357/2005, dispondo de condições e padrões para lançamento de efluentes) podem ser propostas.

Recomendações para trabalhos futuros:

- ✓ Estender o estudo realizado utilizando outros lodos anaeróbios para a biodegradação da CF;
- ✓ Incluir o teste de toxicidade aguda, além da caracterização tradicional do lodo anaeróbio (DQO, ST, SV, pH e AME), visando garantir a capacidade do lodo na degradação da matéria orgânica e na redução da toxicidade;
- ✓ Monitorar o processo de tratamento anaeróbio semanalmente, através de análises cromatográfica, buscando avaliar a cinética de biodegradação da CF e relacionando a influência dos metabólitos na degradação do composto;
- ✓ Efetuar um planejamento experimental variando a quantidade de lodo (inóculo) e a composição dos substratos nos digestores, de forma a formular um modelo cinético completo para a CF.

9. REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12.808/1993 – Resíduos Serviços de Saúde**. Rio de Janeiro, 1993.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 13.969/1997 – Tanques Sépticos**. Rio de Janeiro, 1997.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12.713/2003 – Resíduos Sólidos**. Rio de Janeiro, 2003.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10.004/2004 – Resíduos Sólidos**. Rio de Janeiro, 2004.

ALESSIO, L., APOSTOLI, P., DRAICCHIO, F., FORNI, A., LUCCHINI, R. e MERLU, E. **Prevenzione Dei Rischi Da Esposizione Professionale a chemioterapici antitumorali**. Documento di Consenso. Med. Lav., 87: 194-200, 1996.

AL-SABTI, K. e METCALFE, C. D. **Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water**. Mut. Res., 323: 121-135. 1995

ALVES, L.C., CAMMAROTA, M.C., e FRANÇA, F.P. **Inibição de lodo anaeróbio por constituintes de efluente de laboratório de controle de poluição**. ABES; 10: 236-242, 2005.

ALVES, L.C. **Pré-tratamento de efluente de laboratório de análises químicas para a redução da toxicidade sobre um consórcio microbiano anaeróbio**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

AMARAL, V.S. **Monitoramento do impacto de dejetos industriais em amostras de água do rio Caí através do teste SMART em Drosophila melanogaster** Dissertação (Mestrado em Genética E Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

AMES, B.N., LEE, F.D. e DURSTON, W.E. **Na improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens**. Proc. Natl. Sci. U.S.A., 70: 782-786, 1973

AMES, B.N e GOLD, L.S. **Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction** Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 447: 3-13, 2000.

ANDERSON, D., BISHOP, J.B. GARNER, R.C. OSTROSKY-WEGMAN, P., e SELBY, P.B. **Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potencial germ cell risk**. Mutat. Res., Amsterdam, 330:115-181, 1995.

ANDREOZZI, R., RAFFAELE, M. e NICKLAS, P. **Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment**. Chemosphere, 50: 1319-1330, 2003.

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução Diretoria Colegiada (RDC) nº. 307/2002** de 25 de fevereiro de 2002.

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução Diretoria Colegiada (RDC) nº. 220/2004** de 21 de Setembro de 2004.

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução Diretoria Colegiada (RDC) n. 306/2004** de 15 de dezembro de 2004.

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução Diretoria Colegiada (RDC) nº. 899/2003** de 29 de maio de 2003.

APHA, AWWA e WPCF. **Standart Methods for Examination of Water and Wastewater**. 20^{ed}: Join Editorial, 2002.

AQUINO, S. F. **Caracterização da DQO efluente de sistemas de tratamento biológico**. ABES; 8: 135-144, 2003.

AQUINO, S.F., CHERNICHARO, C.A.L., FORESTI, E. SANTOS, M.L.F. e MONTEGGIA, L.O. **Metodologias para a determinação da Atividade Metanogênica Específica em Lodos Anaeróbios**. ABES; 12: 192-201, 2007.

ARAUJO, J.C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo/São Carlos, 2006

ARLEO, S.T.R.A. **Gestão em Saúde Ambiental Hospitalar nos Centros de Diagnóstico por Imagem que utilizam Radiação Ionizante**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Universidade Estadual de Santa Cruz, 2004.

ASTA MÉDICA ONCOLOGY. **Safe Handling of Citotoxic Agents**, 2^oed. Frankfurt, Germany, 2001.

AUGUSTINHO, L.e FERREIRA, A R. **Impactos ambientais dos efluentes líquidos hospitalares no rio Paraguai**. Monografia de conclusão do curso de geografia. Mato Grosso: UMT, 2004.

AZEVEDO, F.A. e CHASIN, A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo. Editora Intertox, 2003.

BARBOSA, S.M.G. **Aspectos Jurídicos das Atividades de Manejo e Disposição Final dos Resíduos de Serviços de Saúde**. Dissertação (Mestrado em Direito) - Universidade Católica de Santos, 2004.

BARRELLA, K.M. **Avaliação de bactérias patogênicas em percolado de resíduo hospitalar infeccioso padrão**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

BARROS, S.B.M. e DAVINO, S.C. **Avaliação da toxicidade**. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu, 1996.

BASSO, M.D. e MORETTON, J. **Mutagenicity of antineoplastic drug residues treated in health care waste autoclave**. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71: 170-175, 2003.

BAUMANN, F. e PREISS, R. **Cyclophosphamide and related anticancer drugs – Review**. Journal of Chromatography B, 764: 173–192, 2001.

BAXTER ONCOLOGY, **Cyclophosphamide** Disponível em: www.baxter-oncology.com. Acessado em junho de 2005.

BELLI FILHO, P., SOARES, H., MATIAS, W. G., PINTO, R. O. e CASTILHO JUNIOR, A. B. **Digestão anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos e de lodo de tanque séptico**. In: VII Taller y Simposio Latino Americano sobre Digestion Anaerobia, 2002, Merida. Vii Taller y Simposio Latino Americano Sobre Digestion Anaerobia. Mexico: Iwa/Femisca. 266-269. 2002.

BERTOLETTI, E. **Tratabilidade e Toxicidade de Efluentes Industriais**. Eng. Sanitária, 28 (1), 1989.

BILA, D. e DEZOTTI, M. **Fármacos no meio ambiente**. Química. Nova, 26: 523-530, 2003.

BOHNEN, H., SILVA, L.S., MACEDO, V.R.M. e MARCOLIN, E. **Ácidos orgânicos na solução de um gleissolo sob diferentes sistemas de cultivo com arroz irrigado**. Revista Brasileira de Ciência do Solo 29(3): 475-480. 2005.

BONASSA, E. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. Atheneu, 2^oed. São Paulo, 2002.

BORTOLUZZI, E.C., RHEINHEIMER, D.S., GONÇALVES, C.S., PELLEGRINI, J.B.R., ZANELLA, R. e COPETTI, A.C.C. **Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 10(4): 881-887. Campina Grande, PB, DEAg/UFMG. 2006.

BRANDT, A.C.C. **Caracterização do Gerenciamento dos Resíduos Sólidos nos Estabelecimentos de Serviços de Saúde do Município De Blumenau.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Regional de Blumenau, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Saúde Ambiental e Gestão de Resíduos de Serviços de Saúde.** Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRENTANO, D.M. **Desenvolvimento e Aplicação do Teste de Toxicidade Crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de Efluentes Tratados de um Aterro Sanitário.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

BURG, G. **Proposta de um Modelo De Gestão Ambiental para os Serviços de Nefrologia.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

CALDERON, R.L. **The epidemiology of chemical contaminants of drinking water.** Food and Chemical Toxicology. 38:13-20, 2002.

CAMPOS, J.R. (Coordenador) **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbico e disposição controlada no solo.** Programa de Pesquisa em Saneamento Básico (PROSAB), Rio de Janeiro, 1999.

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Banco de Teses**) Disponível em: <http://www.capes.gov.br/servicos/bancoteses.html> Acesso em 20/06/2007

CARBALLA, M., OMIL, F., LEMA, J., LLOMPART, M., GARCÍA-JARES, C., RODRÍGUEZ, I., GÓMEZ, M. e TERNES, T. **Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant.** Water Research, 38: 2918-2926, 2004.

CARDOSO, C.R.F. **Desenvolvimento de metodologia analítica por extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS-MS) para aplicação em estudos de bioequivalência de amoxicilina.** Universidade Federal de Goiás – Química, 2002.

CARRANO, M.T. **Morphological indicators of foot posture in mammals: a statistical and biomechanical analysis.** Zoological Journal of the Linnean Society, 121: 77-10, 1997.

CARVALHO, S.M.L. **Gerenciamento de Resíduos Hospitalares e Avaliação da Secagem como Método de Redução de Volume e Grau de Periculosidade.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, 2003.

CASTRO, A.M.de **Avaliação do perfil dos resíduos de serviços de saúde de Belo Horizonte quanto à presença de rejeitos radioativos na destinação final** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2005.

CASTRO, V.L.F.de L. **Proposta de Modelo para Gerenciamento Interno de Resíduos de Serviços de Saúde - Centro Médico, Campinas, SP.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Estadual de Campinas, 1995.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL.- **Norma técnica L5.019- Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos.** São Paulo: CETESB, 17, 1990.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL.- **Norma técnica L5.017- Análise estatística de resultados de testes de toxicidade aguda: procedimento.** São Paulo: CETESB, 20, 1992.

CAS - CHEMICAL. AMERICAN SERVICE. **Cyclophosphamide**. American Chemical Society. Disponível em: www.cas.org/cgi-bin/regreport.pl. Acesso em 15/04/2003.

CHERNICHARO, C.A.L. **Digestores Anaeróbios - Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, Belo Horizonte. 5, 1997.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução nº. 01/1986**. Diário Oficial da União de 23 de janeiro de 1986.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução nº. 06/1991**. Diário Oficial da União de 19 de setembro de 1991.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução nº. 237/1997**. Diário Oficial da União de 19 de dezembro de 1997.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução nº. 357/2005**. Diário Oficial da União de 17 de março de 2005.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução nº. 358/2005**. Diário Oficial da União de 29 de abril de 2005

CONNOR, T.H. SHUKTS, M. e FRASER, M.P. **Determination of the vaporization of mutagenic antineoplastic agents at 23 and 37 °C using a desiccator technique**. *Mutant. Res.*, 470:82-92, 2000.

CRISTOFOLINI, C. e SCHULER SOBRINHO, O. **Segurança no trabalho manuseio de drogas citotóxicas**. Universidade Federal de Santa Catarina. Curso de Especialização em Gestão Hospitalar. Florianópolis, 1998.

CUNHA, A.A., PINTO, C.R.S.C., MACHADO, V.G., BARRETO, P.S., MOSER, M. C., HOINASKI, L. e MATIAS, W.G., **Avaliação da toxicidade de efluentes hospitalares: Estudo da toxicidade da ciclofosfamida utilizada no tratamento de pacientes de quimioterapia**. In: VIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2004, Florianópolis. VIII ECOTOX, 2004.

DAUGHTON, C. G. **Environmental stewardship and drugs as pollutants**. *The Lancet*, 360: 1035-1036, 2002.

DELLA ROSA, H. V., SIQUEIRA, M.E.P.B., COLACIOPPO, S. **Monitorização ambiental e biológica**. In: Oga, S. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo. Atheneu, 2003.

DELMANTO, R.D., LIMA, P.A., SUGUI, M.M., EIRA, A.F., SALVADORI, D.F., SPEIT, G. e RIBEIRO, L.R. **Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide** *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 496: 15-21, 2001.

DEMIREL, B. YENINGUN, O. e ONAY, T.T. **Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review**. *Process Biochemistry*, 40: 2583-2595, 2005.

DESBROW, C., ROUTLEDGE, E.J., BRIGHTY, G.C. SUMPTER, J.P. e WALDOCK M. **Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening**. 32: 1549 – 1558, 1998.

DIETRICH, D. SIMON F. WEB, S.F. and PETRY T. **Hot spot pollutants: pharmaceuticals in the environment**. *Toxicology Letters*, 131: 1-3, 2004.

DIN 38.412 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (**German standard methods for the examination of water waste water and sludge**), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1989.

DIRETIVA 92/69/CEE. **Método B12**. Disponível em < [http:// europa.eu.int/eur-lex/](http://europa.eu.int/eur-lex/) .Acesso em 01 de setembro de 2006.

EMMANUEL, E., PERRODIN, Y., KECK, G., BLANCHARD, J.-M. e VERMANDE, P. **Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network.** J. Hazardous Mat., 117: 1-11, 2005.

ENRIGHT, A., MCHUGH, S., COLLINS, G. e O'FLAHERTY, V. **Low-temperature anaerobic biological treatment of solvent-containing pharmaceutical wastewater.** Water Research; 39: 4587-4596, 2005.

ENSSLIN, A., STOLL, Y., PETHRAN, A., PFALLER, A., RÖMMELT H. e FRUHMANN, G., **Biological monitoring of cyclophosphamide and IF in urine of hospital personnel occupationally exposed to cytostatic drugs.** Occup. Environ. Med. **51**: 229-233. 1994.

ERGENE, S., ÇELIK, A., ÇAVAŞ T. e KAYA, F. **Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges.** Environment International, 33(7): 877-85, 2007.

FAHECE - Fundação de Apoio ao Hemosc e CEPON. **Relatório de Atividades - ano 2006.** – Disponível em: <http://fahece.org.br>. Acessado em agosto de 2007.

FAGUNDES F. A., OLIVEIRA, B., CUNHA, L. e VALADAREZ, C.M. **Annona Coriacea Induz Efeito Genotóxico Em Camundongos.** Revista Eletrônica de Farmácia, 2 (1), 24-29, 2005.

FATMA – FUNDAÇÃO DE AMPARO AO MEIO AMBIENTE - **Portaria nº 17 de 18 de abril de 2002 (17/02)** Disponível em www.fatma.sc.gov.br.

FARIAS, L.M.M. **Gerenciamento de Resíduos Sólidos nos Serviços de Saúde no Brasil: impasses e possibilidades.** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, 2005.

FENECH, M. **The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method.** Mutat. Res., 392: 11-18, 1997.

FERGUSON, L.R. e PERSON, A.E. **The clinical use of mutagenic anticancer drugs.** Mutat. Res. 335: 1-12, 1996.

FERNANDES, G.S.; AZEVEDO, A.C.P. e CARVALHO, A.C. **Modelo para Gerenciamento Ambiental de Efluentes de Serviços de Radiodiagnóstico.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005.

FERNICOLA, N.A.G.G. e OLIVEIRA, S. **Poluentes Orgânicos Persistentes: POPS.** Série Cadernos de Referência Ambiental. Salvador, 13, 2000.

FERRARO, M. V. M., **Avakualçai di efeito mutagênico do tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (PB II) em Hoplias malabaricus (Pisces) através dos ensaios: cometa, micronúcleos e de aberrações cromossômicas.** Dissertação (Mestrado em Genética)- Universidade Federal do Paraná, 2003.

FERREIRA, C.M. **Testes de toxicidade aquática para monitoramento ambiental.** Biológico, São Paulo, 65: 17-18, 2003.

FONSECA, A.L **Avaliação da Qualidade da Água na Bacia do Rio Piracicaba Através de Testes de Toxicidade com Invertebrados.** Tese (Doutorado Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo/São Carlos, 1997.

Frello, P.C.; **Avaliação da toxicidade aguda do agrotóxico carbofuran utilizando reativos biológicos: Poecilia reticulata e Daphnia magna.** Dissertação. (Mestrado). Curso de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina.

FURTADO, A.S., CASPER, P. e ESTEVES, F.A. **Methanogenesis in an impacted and two dystrophic coastal lagoons (Macaé, Brazil).** Braz. arch. biol. technol., 45: 195-202, 2002.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; SALAZAR, M. e HANSEN, P. D.; **Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 28 (2) 213-225, 2001.

GARCIA, M. CHATE, S., PORTO, A.C., FIGUEIRA, Y., DIEGUES, A., FERES, F. e MARTINS, M.F. **Diferentes doses de ciclofosfamida no sistema immune de bovinos.** *Ciencia Rural*, 34: 1885-1888, 2004.

GARG, M.B. e ACKLAND, S.P. **Simple and sensitive high-performance liquid chromatography method for the determination of docetaxel in human plasma or urine.** *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 748: 383-388, 2000.

GHISELLI, G. **Avaliação da Qualidade das Águas Destinadas ao Abastecimento Público na Região de Campinas: Ocorrência e Determinação dos Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP).** Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, 2006.

GOLDSTEIN, E. G. e ZAGATTO, P. A. **Toxicidade em águas do estado de São Paulo.** In: *Revista Ambiente*. 5(1) 13-20, 1991.

GOLONI-BERTOLLO, E.M., VARELLA-GARCIA, M. e MANZATO, A.J. **Risco ocupacional associado a manipulação de antineoplásicos.** *Acta Oncológica Brasileiro*. 10: 105-110, 1990.

GONZÁLEZ, Jaime D.C. **Evaluación Del Manejo De Resíduos Sólidos En Un Hospital De Asistencia De Salud Del Area Central De La Ciudad De Guatemala.** Disponível em www.cepis.org.pe, Acessado em 19/11/2004.

GORDON, A.J. **Effect of dexamethasone and cyclophosphamide on urinary hydroxyproline to creatinine ratios in sheep.** *Australian Journal of Biology Science*, 35: 153-161, 1982.

GRISOLIA, C.K., e CORDEIRO, C.M.T. **Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish.** *Genetic and Molecular Biology*. 23: 235-239, 2000.

GRISOLIA, C.K., e STARLING, F.L.R.M. **Micronucleus monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges.** *Mutation Res*. 491: 39-44, 2001.

GRISOLIA, C.K., OLIVEIRA, A.B.B. e BOLFIM, H. **Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant.** *Genetic and Molecular Biology* vol. 28 (2), 334-338, 2005. GUEDES, E.V.R. **Avaliação Comparativa entre Águas Residuárias de Serviços de Saúde e Águas Residuárias Urbanas: Um Estudo em Montes Claros – MG.** Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.

HADDAD, C.M.C. **Resíduos de serviços de saúde de um hospital de médio porte do município de Araraquara: subsídios para elaboração de um plano de gerenciamento.** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Centro Universitário de Araraquara, 2006.

HALLING-SORENSEN, B.; **Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming** *Chemosphere*, (40) 7: 731-739, 2000.

HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C. & THURSTON, R. V., **Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median let hal concentrations in toxicity bioassays.** *Environ. Sci. Technol.*, 11: 714-719. 1977.

HANSEL, S.; CASTEGNARO, M.; SPORTOUCH, M. H.; DE MÉO, M.; MILHAVET, J. C.; LAGET, M. e DUMÉNIL, G. **Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan.** *Int Arch Occup Environ Health*; 69: 109-114, 1997.

HARTIG, C.; STORM, T. e JEKEL, M.; **Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry** *Journal of Chromatography A*, 854: 163-173, 1999.

HEBERER, T. **Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data** Toxicology Letters, 131: 5-1, 2002a

HEBERER, T. **Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water.** Journal of Hydrology, 266: 175-18, 2002b.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURIN, K.; MACGREGOR, J.T.;NEWELL, G. W.; SALAMON, M. F. **The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity.** Mutation Research – Genetic Toxicology. 123: 61 – 118, 1983.

HENSCHER, K.-P. WENZEL, A. DIEDRICH, M. and FLIEDNER, A. **Environmental Hazard Assessment of Pharmaceuticals.** Regulatory Toxicology and Pharmacology. 25: 220-225, 1997.

HELM, C.V. **Caracterização química, proteínas de reserva e perfil de aminoácidos de variedades brasileiras de cevada nua.** Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina - Ciências Dos Alimentos, 2004.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K. e KRATZ, K. L. **Occurrence of antibiotics in the aquatic environment.** The Science of the Total Environment; 225: 109-118, 1999.

HIRST, M., TSE, S. MILLS, D.G., LEVIN, L. e WHITE, D.F. **Ocupacional exposure ti cyclophosphamide,** Lancet, 186-188, 1984.

HONGPING, D., JIANLIN, L., MEIBIAN, Z., WEI, W., LIFEN, J., SHIJIE, C., WEI, Z., BAOHONG, W. e JILIANG, H. **Detecting the cytogenetic effects in workers occupationally exposed to vincristine with four genetic test.** Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 599: 152-159, 2006.

HOSE, J. E., CROSS, J. N., SMITH, S. G. & DIEHL, D., **Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated of southern California.** Mar. Environ Res., 22: 167-176, 1987.

HUITEMA, A. D. R.; TIBBEN, M. M.; KERBUSCH, T.; BOSCH, J. K.; RODENHUIS, S.; BEIJNEN, J. H. **Simple and selective determination of the cyclophosphamide metabolite phosphoramidate mustard in human plasma using high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography B. 745: 345-355, 2000.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **Cyclophosphamide.** In IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man (International Agency for Reserach on Cancer, Ed.) IARC, Lyon, 1987.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **Cyclophosphamide,** IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals. In: International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 165–202. 1981. Revista em 2001.

IMOLENE, L.M. **Avaliação da macrófita *Typha domingensis* Pers. no pós-tratamento de efluentes do campus da UFMS e do Hospital Universitário, em banhados construídos de fluxo subsuperficial.** Dissertação (Mestrado em Tecnologias Ambientais) - Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2003.

INCA – Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Disponível em: www.inca.gov.br. Acessado em setembro de 2002, dezembro de 2004 e outubro 2006.

INTIMA, D.P. **Avaliação do risco a exposição ocupacional a metais em incineradores de resíduos de serviços de saúde** Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Paulo, 2004.

ISIDORI, M., LAVORGNA, M., NARDELLI, A. & PARRELLA, A., **Toxicity identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: a multispecies approach.** Chemosphere 52: 85-94. 2003.

ISO – INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 6341: water quality – determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna*.** USA, 1996.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A. e DI CORCIA, A. **Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent.** The Science of the Total Environment. 256: 163-173, 2000.

JØRGENSEN, S.E e HALLING-SØRENSEN, B. **Drugs in the environment** Chemosphere, 40: 691-699, 2000.

JOSS, A.; KELLER, E.; ALDER, A.C.; GÖBEL, A.; MCARDELL, C.S.; TERNES, T.; SIEGRIST, H. **Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment.** Water Research; 39: 3139-3152, 2005.

KOLPIN, D.W., FURLONG, E.T., MEYER, M.T., THURMAN, E.M., ZAUGG, S.D. BARBER, L.B. e BUXTON, H.T. **Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organics Wastewater Contaminants in U.S. Streams 1999-2000: A National Reconnaissance.** Environmental Science & Technology. 36 (6) 1202-1211, 2002.

KOPP, M., LUZ, V.K., COIMBRA1, J.M., SOUSA, R.O., CARVALHO, F.F. e OLIVEIRA, A.C. **Níveis críticos dos ácidos acético, propiônico e butírico para estudos de toxicidade em arroz em solução nutritiva.** Acta bot. bras. 21(1): 147-154, 2007.

KÜMMERER, K., STEGER-HARTMANN, T., BARANYAI, A. e BÜRHAUS, I. **Evaluation of the biological degradation of the antineoplastics cyclophosphamide and ifosfamide with the Closed Bottle Test (OECD 301 D).** Zbl Hyg., 215-225, 1996.

KÜMMERER, K e HELMERS, E. **Hospital effluents as a source for platinum in the environment.** The Science of the Total Environment, 193: 179-184, 1997.

KÜMMERER, K; ERBE, T.; GARTISER, S. e BRINKER, L. **AOX- Emissions From Hospitals into Municipal Waste Water.** Chemosphere, 36(11): 2437-2445, 1998.

KÜMMERER, K.; AL-AHMAD, A.; BERTRAM, B. e WIEßLER, M. **Biodegradability of antineoplastic compounds in screening tests: influence of glucosidation and of stereochemistry.** Chemosphere; 40: 767-773, 2000.

KÜMMERER, K. **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, 2001.

KÜMMERER, K. **Pharmaceuticals in the Environment.** 2nd ed. Alemanha: Springer, 2004

KUTLU, M., AYDOGAN, G., SUSUZ, F. e ÖZATA, A. **The salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk River in Turkey.** Envir. Toxicol. and Pharm. 17: 111-116, 2004.

LA ROSA, A.M.F.; TOLFO, A.M.; ALMEIDA, M.N.; ORTOLAN, M.G.S.; BINS, M.J.G.; BENDATI, M. M.A. e RODRIGUEZ, M.T.R. **Gestão de Efluentes de Serviços de Saúde em Porto Alegre.** In: Anais do XXVII Congresso Internamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre: ABES, 1999.

LÄNGE, R. e DIETRICH, D. **Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances—conceptual considerations.** Toxicology Letters, 131: 97-104, 2002.

LARSSON, D.G.J.; ADOLFSSON-ERICI, M.; PARKKONEN, J.; PETTERSSON, M.; BERG, A. H.; OLSSON P.-E. e FÖRLIN, L. **Ethinylestradiol - an undesired fish contraceptive?** Aquatic Toxicology, 45:2-3, 1999.

LEÃO, PHS. **Câncer nos cólons e no reto mesmos e outros aspectos.** Fortaleza, UFC, 1984

LEGLER, J., DENNEKAMP, M., VETHAAK, A.D., BROUWER, A., KOEMAN, J.H., BURG, A. e MURK, A. **Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays.** The Science of The Total Environment, 293: 69-83, 2002.

LEI nº 4320/64. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 1964.

LEI nº 6.938/81. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 1981.

LEITE, K.F.S. **A organização hospitalar e o gerenciamento de resíduos de uma instituição privada** Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade do Estado de São Paulo, 2006.

MACEDO, R.M.P. **Gestão Ambiental em Hospitais: Um estudo de caso de identificação de aspectos e impactos ambientais em um hospital universitário.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2002.

MACHADO, N.L. **Estudo Comparativo de Soluções Adotadas para o Tratamento e Destino Final de Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) Universidade Federal da Bahia, 2002.

MACKAY, D. (1996) apud KÜMMERER, K. **Pharmaceuticals in the Environment.** 2nd ed. Alemanha: Springer, 2004.

MAGDIC, S., BOYD-BOLAND, A., JINNO, K. e PAWLISZYN, J.B. **Analysis of organophosphorus insecticides from environmental samples using solid-phase microextraction.** Journal of Chromatography, 736: 219-228, 1996.

MAMANI, E.B **Sistema de manejo de resíduos sólidos em hospitais (SIMARSH). Metodologia de avaliação.** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade Federal de São Paulo, 1997.

MARTINS, I. e DELLA ROSA, H.V. **Considerações toxicológicas a exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos.** Revista Brasileira Medicina do Trabalho. 2(2), 118-125, 2004.

MARTINS, I. **Avaliação da Exposição dos Profissionais da Área da Saúde à Ciclofosfamida.** Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Universidade de São Paulo, 2003.

MASSE, D. I.; LU, D. MASSE, L. and DROSTE., R. L. **Effect of antibiotics on psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors.** Bioresource Technology, 75: 205-211, 2000.

MATALON, S.T., ORNOY, A. e LISHNER, M. **Review of the potential effects of three commonly used antineoplastic and immunosuppressive drugs (cyclophosphamide, azathioprine, doxorubicin on the embryo and placenta).** Reproductive Toxicology. 18: 219-230, 2004.

MATTOS, M.F.S.S. **Caracterização dos Rejeitos Radioativos de Baixa Atividade, Gerados nos Laboratórios de Pesquisa Biológica em Técnicas Radioativas que Utilizam os Radionuclídeos ³H e ³²P.** Dissertação (Mestrado em Medicina-Radiologia Clínica) - Universidade Federal de São Paulo, 2005.

MATTOSO, V.D.B. **Classificação, Quantificação e Análise Microbiológica dos Resíduos de Serviços de Saúde da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos** Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade do São Paulo/São Carlos, 1996.

McDEVITT JJ, LEES PSJ, McDIARMID MA. **Exposure of hospital pharmacists and nurses to antineoplastic agents.** Journal Occup. Med, 35: 57-60, 1993.

McEVOY, J. D. G. **Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control.** Analytica Chimica Acta, Volume 473: 3-26, 2002.

MENDES, A., CASTRO, H.F., PREREIRA, E.B. e FURIGO, A. **Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos.** Química Nova, 28: 296-305, 2005.

METCALF e EDDY. **Wastewater engineering: treatment and reuse.** 4 ed., New York: McGraw-Hill, 2003.

MINISTÉRIO DO INTERIOR (MI) DO BRASIL, **Portaria Ministerial nº 53** de 1º de março de 1979.

MINISTÉRIO DO INTERIOR (MI) DO BRASIL, **Portaria Ministerial nº 157** de 26º de outubro de 1982.

MINOIA, C. e PERBELLINI, L. editores. **Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici: chemoterapici antiblastici**. Milano: Morgan; 2000.

MIRANDA, C. D., e Castillo, G. **Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater** *The Science of The Total Environment*, 224:1-3, 167-176, 1998.

MONARCA, S., ZANARDINI, A., FERETI, D., DALMIGLIO, A., FALISTOCCO, E., MANICA, P. e NARDI, G. **Mutagenicity of extracts of lake drinking water treated with different disinfectants in bacterial and plant test**. *Water Research*, 32 (9): 2689-2695, 2000.

MONTEIRO, A.B.C. **Biossegurança no preparo, administração e descarte de agentes antineoplásicos injetáveis**. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto, 2001.

MORENO ABRIL, O. e CARRILO GALLEGO, E. **Técnicas de estudio de la mutagenicidad**. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 2: 26-32, 2002.

MUNÓZ, S.S. **Impacto ambiental na área do aterro sanitário e incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto, SP: avaliação dos níveis de metais pesados**. Tese (Doutorado em Enfermagem) - Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto, 2002.

MUTTI, A. **Biological monitoring in occupational and environmental toxicology**. *Toxicology Letters*. 108: 77-89, 1999.

NETO, O.F. **Influencia da ciclofosfamida sobre um meio aquático simulado**. Trabalho de Conclusão de Curso. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

NIETO, R. **Caracterização ecotoxicológica de efluentes líquidos industriais – ferramenta para ações de controle da poluição das águas**. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES. V I, 067, 2000.

OLIVEIRA, J.M. **Análise do Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde nos Hospitais de Porto Alegre**. Dissertação (Mestrado em Administração) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

OPAS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Nuestro planeta, nuestra salud**. Informe da Comisión de salud y medio ambiente de la OMS. Publicación científica n° 544, 1993.

OMS. **National Câncer control Programmes**. Genebra : OMS/WHO, 1999.

OROFINO, F.V.G. **Aplicação de um Sistema de Suporte Multicritério - Saaty For Windows - na Gestão de Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde - Caso do Hospital Celso Ramos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.

ORTOLAN, M.G.S.; CARDOSO, M.R.I. e AYUB, M.A.Z. **Perfil Microbiológico de Bactérias Mesofílicas do Efluente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

ORTOLAN, M.G.S. **Avaliação do Efluente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: citotoxicidade, genotoxicidade, perfil Microbiológico de Bactérias Mesofílicas e resistência a antibióticos**. In: Anais do XXVII Congresso Internamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre: ABES, 2000.

PANTER, G.H., THOMPSON, R.S. e SUMPTER, J.P. **Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone** *Aquatic Toxicology*, 42: 243-253, 1998.

PAULINO, N. **Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato padronizado de própolis P1 e de seu principal constituinte ativo, Artepillin C**. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

- PAZ, M., MUZIO, H. GEMINI, V., MAGDALENO, A., ROSSI, S., KOROL, S. e MORETTON, J. **Aguas residuais de un centro hospitalario de Buenos Aires, Argentina: Características químicas, biológicas y toxicológicas.** *Higiene y Sanidad Ambiental.* 4: 83-88, 2004.
- PAZ, M., MUZIO, H. MENDELSON, A., MAGDALENO, A., TORNELLO, C., BALDIN, N and MORETTON, J. **Evaluation of genotoxicity an toxicity of Buenos Aires city hospital wasterwater samples.** *J. Braz. Ecotoxicol.* 1(1) 1-6, 2006.
- PEREIRA, E.T.; PAULA, J.R.; e VALADAREZ, C.M. **Investigação do Potencial Quimioprotetor da *Punica Granatum*.** *Revista Eletrônica de Farmácia.* 2: 168-171, 2005.
- PINTO, D.M.C.L.; BALBOCHI, V.M.Z. e POVINELLI, J. **Procedimento para elaboração de resíduo sólido urbano domestico padrão.** *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental.* 5(1): 25-31, 2000.
- PINTO, R.O. **Avaliação da digestão anaeróbia na bioestabilização de resíduos sólidos orgânicos, lodos de tanque sépticos, dejetos suínos e lixiviado.** Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- PINTO-SILVA, C.R.C.; CREPPY, E. e MATIAS, W.G. . **Micronucleus test in mussels *Perna perna* fed with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*.** *Archives of Toxicology,* Alemanha, 79: 422-426, 2005.
- PINTO-SILVA, C.R.C. **Estudo da frequência de hemócitos micronucleados, induzidos pelo ácido ocadáico, em mexilhões *perna perna*.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
- PRASAD, G. **Effect of cyclophosphamide on immune response of sheep against attenuated sheep pox virus.** *Australian Journal of Biology Science,* 24: 692-695, 1986.
- PRUESS, K. **On water seepage and fast preferential flow in heterogeneous, unsaturated rock fractures.** *Journal of Contaminant Hydrology.* 30: 333-362, 1998.
- PYY, L., SORSA, M. e HAKALA, E. **Ambient monitoring of cyclophosphamide in manufacture and hospitals.** *Am Ind Hyg Assoc J.* 49:314-7, 1988.
- RAAT, W.K., HANSTVEIT, A.O. e KREUK, J.F. **The role mutagenicity testing in the ecotoxicological evaluate of industrial discharges into the aquatic environment.** *Food Chemical Toxicology.* 23: 33-41, 1985.
- RAND, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental, fate, and risk assessment.** 2nd North Palm Beach, Flórida: Taylor e Francis, 1995.
- RAND, G.M. e PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology.** Washington, 1985.
- RANG, H.P., DALE, M.M. e RITTER, J.M. **Farmacologia.** Guanabara Koogan, 4^o Ed. Rio de Janeiro, 2001.
- REBELATTO, M.F. **Avaliação de métodos de desinfecção de resíduos infecciosos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- REIS FILHO, R., ARAUJO, J.C. e VIEIRA, E.M. **Hormônios sexuais estrógenos: Contaminantes bioativos.** *Química Nova,* 29(4): 817-822, 2006.
- RIBANI, M., BOTTOLI, C.B.G., COLLINS, C.H., JARDIN, I.C.S.F. e MELO, L.F.C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** *Química Nova,* 27(5): 771-780, 2005.
- RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F. e MARQUES, E.K. (Coordenadores) **Mutagênese Ambiental,** Ulbra, Porto Alegre, 2003.
- RICHARDSON e BOWRON, 1985. **The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment.** *J. Pharm. Pharmacol.* 37: 1-12. 1985.

ROCHA, M.A.G., FLORENCIO, L. e KATO, M.T. **Aplicação de Teste de Biodegradabilidade Anaeróbia para Efluentes de Indústrias de Bebidas.** In: 22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Joinville, SC 14 a 19 de setembro de 2003.

RODGERS-GRAY, T.P., JOBLING, S. KELLY, C. MORRIS, S. BRIGHTY, G. WALDOCK, M.J., SUMPTER, J.P. e TYLER, C.R. **Exposure of Juvenile Roach (*Rutilus rutilus*) to Treated Sewage Effluent Induces Dose-Dependent and Persistent Disruption in Gonadal Duct Development.** Environ. Sci. Technol., 35 (3): 462-470, 2001.

SACHER, F., THOMAS LANGE, F., HEINZ-JÜRGEN BRAUCH, H-J. e BLANKENHORN, I. **Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany.** Journal of Chromatography A, 938: 199-210, 2001.

SALOMÃO, I.S. **Gerenciamento interno de resíduos sólidos de centros cirúrgicos** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Universidade Estadual de Santa Cruz, 2003.

SACHER, F., LANGE, F.T., BRAUCH, H-J e BLANKENHORN, I. **Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany** Journal of Chromatography A. 938(14), 2001.

SANCHEZ-GALAN S.; LINDE A. R.; AYLON F. e GARCIA-VAZQUEZ E. **Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 49: 139-143, 2001.

SANTOS, J. L.; APARICIO, I. e ALONSO, E. **Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain).** Environment International; 2006.

SANTOS, L.U.; BONATTI, T.R.; CANTUSIO NETO, R. e FRANCO, R.M.B., **Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts activated sludge samples in Campinas, SP, Brazil.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 46(6): 309-313, 2004.

SAPIA, P.M.A. e MORITA, D.M. **Crerios de recebimento de efluentes no domsticos em sistemas pblicos de esgotos: uma anlise crtica.** Engenharia Sanitria e Ambiental. 8(3): 145-156, 2003.

SECRETARIA DE SAUDE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – GOVERNO DO ESTADO DE SANTA CATARINA. Disponvel em: www.saude.sc.gov.br. Acessado em maio de 2002, maro 2004 e junho 2007.

SERRANO, A. I. (Org.). **Uma Ferramenta Epidemiolgica para Diagnstico, Planejamento e Gestao em Saude: Registro de Cncer de Base Populacional da Grande Florianpolis.** 1. ed. Florianpolis: Insular, 2006.

SESSINK, P.J.M., BOER, K.A., SCHEEFHALS, A.P.H., ANZION, R.B.M. e BOS, R.P. **Detection of contamination with antineoplastic agents in a hospital pharmacy department.** Archives of Occupational Environmental Health. 64, 1992.

SESSINK, P.J.M., SCHOLTES, M.M., ANZION, R.B.M. and BOS, R.P. **Determination of cyclophosphamide in urine by gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography. 616: 333-337, 1993.

SESSINK, P.J.M. **Environmental contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians: is skin absorption an important exposure route?** Archives of Environmental Health, 49(3): 165-171. 1994a.

SESSINK, P.J.M. **Urinary cyclophosphamide excretion and chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes after occupational exposure to antineoplastic agents.** Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 309: 193-199, 1994b.

SILVA, F.I.M. **Resíduos de serviços de saúde: gerenciamento no centro cirúrgico, central de material e centro de recuperação anestésica de um hospital do interior paulista.** Tese (Doutorado em Enfermagem) - Universidade de São Paulo, 2004.

SILVA, J., ERDTMANN, B. e HENRIQUES, J.A.P. (Coordenadores) **Genética Toxicológica.** Porto Alegre. Editora Alcance, 2003.

SILVA, M.M.A. **Avaliação do crescimento microbiológico em resíduos hospitalares infecciosos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

SILVEIRA, I.C.T. **Cloro e Ozônio aplicados à desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em *Daphnia similis*.** Tese (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

SIMONELLI, S.B.J. **Resíduos Sólidos Infectantes de Serviços de Saúde: Gerenciamento do Campus da USP/Bauru** Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho/Bauru, 2003.

SKOV, T., BIRGIT, E.L. OLSEN, M. e WINTHEREIK, H. **Risks for physicians handling antineoplastic drugs.** The Lancet, 336: 1446, 1990.

SOARES, H.M. e HIRATA, T.S. **Práticas de Laboratório. In: Curso de Tratamento Biológico de Resíduos,** Florianópolis: CBAB, MCT/CNPq, CPGEQ/UFSC, CDB, 1999.

SOARES, S.R. **Diagnóstico da produção de resíduos de serviços da saúde. Estudo de caso: hospital universitário, Florianópolis, SC.** In: 19 Congresso Eng Sanitária E Ambiental, Foz do Iguaçu, 1997.

SORSA, M., PYY, L., SALOMA, S., NYLUND, L. e YAGER, J.W. **Biological and environmental monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide in industry and hospitals.** Mut. Res. 204: 465-479, 1988.

SOUTO, V.S. **Influencia da Ciclofosfamida sobre as bactérias presente na estação de tratamento de esgoto de Florianópolis/SC.** Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, P.S., 2004.

SOUZA, E.L. **Medidas para Prevenção e Minimização da Contaminação Humana e Ambiental Causada pelos Resíduos de Serviços de Saúde Gerados em Estabelecimento Hospitalar - Estudo de Caso.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade de São Paulo/São Carlos, 2005.

SPEECE, R.E. **Anaerobic Biotechnology for industrial wastewater.** Tennessee: Vanderlity University, 1996.

SPINA, M.I.A.O. **Análise do gerenciamento dos resíduos sólidos dos serviços de saúde em Curitiba, com ênfase no tratamento e destino final, e implicações sócio-ambientais** Dissertação (Mestrado em Geografia) - Universidade Federal do Paraná, 2003.

STAHL, R.G. **The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters.** Ecotoxicology and Environmental Safety. 22: 94-125, 1991.

STEGER-HARTMANN, T., KÜMMERER, K. e SCHECKER, J. **Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two step solid phase extraction and GC/MS.** Journal of Chromatography. A726: 179-184, 1996.

STEGER-HARTMANN, T., KÜMMERER, K. e HARTMANN, A. **Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water.** Ecotoxicology and Environmental Safety. 36: 174-179, 1997.

- STUMPF, M. TERNES, T.A., WILKEN, R. RODRIGUES, S.V. e BAUMANN, W. **Polar drug residues in sewage and natural waters in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** The Science of the Total Environment. 225: 135-141, 1999.
- TERRA, N.R. e FEIDEN, I.R. **Reproduction and survival of *Daphnia magna* under different hardness conditions.** Acta Limnologica Brasiliis 15(2): 51-55, 2003.
- TERNES T. **Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers.** Water Research. 32(11): 3245-3260, 1998.
- TERNES, T.A.; KRECKEL, P. e MUELLER, J. **Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge.** The Science of the Total Environment, 225: 91-99, 1999.
- TERNES T. **Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples.** Trends Analytical Chemistry. 20: 419-434, 2001.
- TERNES, T.A.; HERRMANN, N.; BONERZ, M.; KNACKEN, T.; SIEGRIST, H. e JOSS, A. **A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge.** Water Research, .38: 4075-4084, 2004.
- TIXIER, N., GUIBAUD, G. e BAUDU, M. **Determination of some rheological parameters for the characterization of activated sludge** Bioresource Technology, 90: 215-220, 2003.
- TSAI, C.T.; LAI, J.S. e LIN, S.T. **Quantification of pathogenic microorganisms in the sludge from treated hospital wastewater** J. Appl. Microbiol. 85: 171-176, 1998.
- TURCI, R., SOTTANO, C., RONCHI, A. e MINOIA, C. **Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agents.** Toxicology Letters. 134: 57- 64, 2002.
- Van HAANDEL. A.C. e LETTINGA,G. **Tratamento Anaeróbio de Esgotos. Manual para Regiões de Clima Quente.** Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 1994.
- VASCONCELOS, T.G. **Antimicrobial ciprofloxacina em efluente hospitalar: exposição ambiental, avaliação de risco e degradação através de processos avançados de oxidação** Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, 2006.
- VASOLLER, R.F. **Microbiologia e saneamento ambiental.** São Paulo, CETESB, 1989.
- VIANA, L.M.C. **Resíduos de Serviços de Saúde no Município de Manaus: Responsabilidade Civil da Administração Pública e dos Estabelecimentos Geradores.** Dissertação (Mestrado em Direito Ambiental) - Universidade do Estado do Amazonas, 2004.
- VIGANO, L., CAMIRANO, A., IZZOTI, A., D'AGOSTINI, F., POLESSELLO, S., FRANCISCI, C. e DE FLORA, S. **Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas.** Mutation Research. 515: 125-134, 2002.
- Von SPERLING, M. **Princípios básicos do tratamento de esgotos.** DESA-UFMG, v.2, 211 p., 1996.
- WEBB, S., TERNES, T., GIBERT, M. e OLEJNICZAK, K. **Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water.** Toxicology Letters. 142: 157-167, 2003.
- WEISBURGER, J.H. **Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future.** Mutation Research. 480: 23-35, 2001.
- WINKLER, M., LAWRENCE, J. e NEU, T. **Selective degradation of ibuprofen and clofibrac acid in two model river biofilm systems.** Water Research, 35: 3197-3205, 2001.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Biological monitoring in the workplace.** Geneva, v1. 1996.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Decision-making environmental health**. 1999.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Biomarkers and risk assessment: validity and validation**. Geneva, 2002.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SORENSEN, B. e KUSK, K.O.; **Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna***, Chemosphere, 40(7): 723-730, 2000.

ZAGATTO, P.A. GOLDSTEIN, E.G. e BERTOLETI, E. **Toxicidade dos Efluentes Industriais na Bacia de Piracicaba**. Revista CETESB de Tecnologia - Ambiente, São Paulo, 2(1): 39-42, 1988.

ZEIGER, E., ANDERSOM, B., HAWOTH, S., LAWOR, T. e MORTLMANS, K. **Salmonella Mutagenicity Tests: V**. Results from the testing of 311 Chemicals. Environmental and Molecular Mutagenesis. 19 (21) 2-141, 1992.

ZERULLA, M., LÄNGE, R., STEGER-HARTMANN, T., PANTER, G., HUTCHINSON, T. e DIETRICH, D. R. **Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*)**. Toxicology Letters 131: 51-63, 2002.

ZUCATTO, E., CASTIGLIONI, S., FANELLI, R., BAGNATI, R e CALAMARI, D. **Changes in the presence and concentrations of pharmaceuticals for human use in Italy**. KÜMMERER, K. (Ed) **Pharmaceuticals in the Environment**. 2nd ed. Alemanha: Springer, 2004.

ZWIENER, C. e FRIMMEL, F.H. **Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibrac acid, ibuprofen and diclofenac**. 309: 201-211, 2003.

10. ANEXOS

10.1. Solicitação para coleta de dados

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental-ENS
Laboratório de Pesquisas em Resíduos Sólidos - LARESO



Florianópolis, de fevereiro de 2003.

Para :
Diretor do

De : Patrícia Sobierajski Barreto
Doutoranda do Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental

Referente: Autorização para consulta de material

Prezado Diretor,

Solicito autorização para consulta e compilação dados do “Livro de Registro de Preparos de Quimioterápicos”, da farmácia desta instituição.

Estas informações auxiliarão na seleção dos quimioterápicos mais utilizados na terapia antineoplásica para avaliação futura do risco de contaminação dos recursos hídricos (Tema da Tese de Doutorado).

Atenciosamente,

Patrícia Sobierajski Barreto

Campus Universitário – Bairro Trindade CP 476 CEP 88.040-970 Florianópolis SC
Fone (48) 331 9717 ramal 222 e-mail patricia@ens.ufsc.br

10.2. Monitoramento do lodo anaeróbio (pH e DQO)

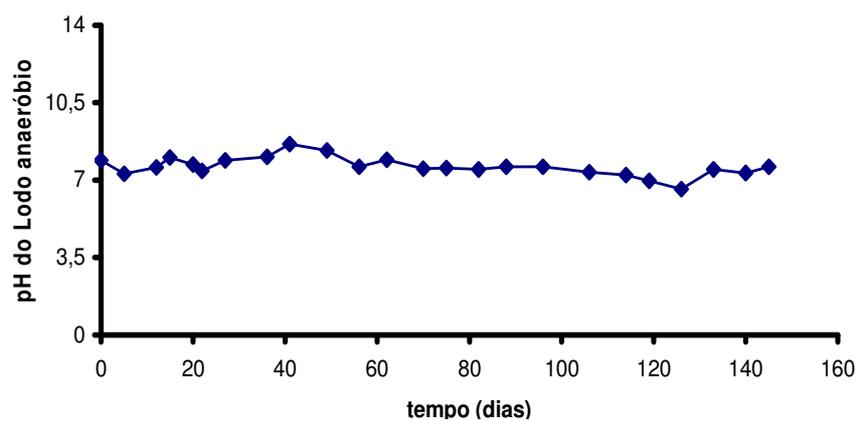


GRÁFICO 18: Variação da pH do lodo anaeróbio ao longo do tempo

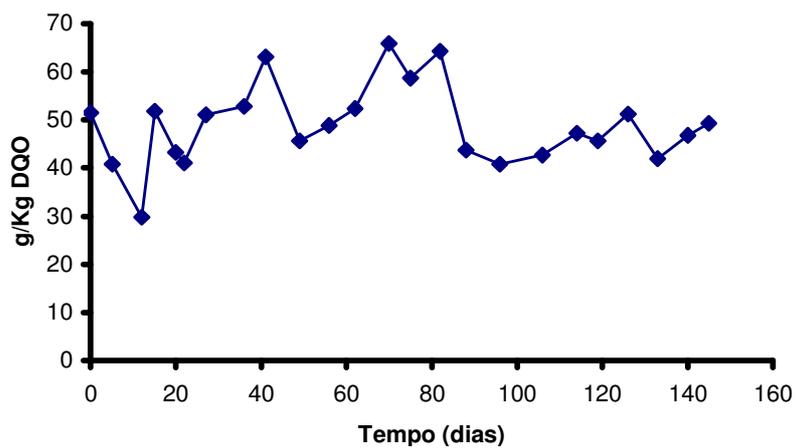


GRÁFICO 19: Variação da DQO (g/Kg) do lodo anaeróbio ao longo do tempo

10.3. Dados brutos do teste de biodegradabilidade - 1ª bateria

TABELA 24: Dados brutos do Teste de Biodegradabilidade - 1ª bateria													
Dia	(°C)	Branco				Ác. orgânicos				Ciclo 2,0 mg			
		B1	B2	B3	X	A1	A2	A3	X	C1	C2	C3	X
0	23	0	0	0	0,0	4	10	9	7,67	10	5	11	8,67
1	22	20	19	19	19,3	34	29	37	33,33	40	36	32	36,00
2	27	14	8	12	11,3	19	10	14	14,33	19	21	10	16,67
3	20	9	12	12	11,0	15	14	13	14,00	14	17	13	14,67
4	21	10	13	14	12,3	16	14	17	15,67	15	14	18	15,67
5	20	10	13	12	11,6	14	16	15	15,00	12	10	16	12,67
6	25	10	7	7	8,0	17	10	16	14,33	15	12	16	14,33
7	25	2	10	6	6,0	13	16	15	14,67	15	15	16	15,33
8	26	0	0	0	0,0	10	9	11	10,00	10	8	14	10,67
9	22	5	8	8	7,0	10	8	13	10,33	10	15	15	13,33
10	21	8	10	12	10,0	15	13	10	12,67	14	18	16	16,00
11	24	5	8	4	5,6	14	10	10	11,33	25	20	24	23,00
12	23	5	10	9	8,0	10	12	11	11,00	14	10	13	12,33
13	22	15	9	13	12,3	12	18	15	15,00	25	20	21	22,00
14	22	5	0	7	4,0	15	18	19	17,33	16	8	7	10,33
15	22	5	12	8	8,3	20	15	15	16,67	18	15	11	14,67
16	22	7	6	7	6,6	17	15	10	14,00	10	12	11	11,00
17	20	9	10	14	11,0	12	17	15	14,67	9	12	16	12,33
18	22	0	3	5	2,6	10	5	6	7,00	10	15	8	11,00
19	26	10	5	6	7,0	8	10	10	9,33	16	9	10	11,67
20	22	7	0	9	5,3	10	10	10	10,00	12	10	15	12,33
21	21	11	13	5	9,6	10	14	16	13,33	12	15	14	13,67
22	23	10	7	2	6,3	11	15	15	13,67	15	12	9	12,00
23	22	8	8	5	7,0	11	15	10	12,00	10	12	10	10,67
24	23	8	5	9	7,3	15	11	8	11,33	9	10	12	10,33
25	22	0	2	0	0,6	8	11	15	11,33	8	10	15	11,00
26	23	0	0	0	0,0	13	10	10	11,00	5	10	5	6,67
27	24	0	0	0	0,0	0	6	10	5,33	0	10	6	5,33
28	22	0	0	0	0,0	7	8	9	8,00	10	5	9	8,00
29	25	0	0	0	0,0	5	0	0	1,67	0	6	10	5,33
30	23	0	0	0	0,0	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
TOTAL		192	190	214	198,67	375	369	384	376,00	398	392	403	397,67
MÉDIA		6,22	6,38	6,61	6,40	12,09	11,90	12,38	12,12	12,83	12,64	13,0	12,87
D. padrão		5,23	5,24	5,25	4,85	6,30	5,50	6,29	5,60	7,76	6,40	6,23	6,22
Dia	(°C)	Ciclo 20,0 mg				Ciclo 200,0 mg							
		D1	D2	D3	X	E1	E2	E3	X				
0	23	10	8	10	9,33	10	12	13	11,67				
1	22	40	72	57	56,33	41	43	40	41,33				
2	27	20	35	25	26,67	20	28	21	23,00				
3	20	28	18	24	23,33	14	20	18	17,33				
4	21	21	16	19	18,67	19	10	15	14,67				
5	20	15	18	12	15,00	18	19	14	17,00				
6	25	16	10	10	12,00	10	15	13	12,67				
7	25	12	10	10	10,67	10	17	16	14,33				
8	26	10	19	17	15,33	7	19	14	13,33				
9	22	10	7	13	10,00	13	15	14	14,00				
10	21	12	12	10	11,33	14	10	15	13,00				
11	24	22	23	18	21,00	14	14	13	13,67				
12	23	16	8	14	12,67	10	8	9	9,00				
13	22	24	20	21	21,67	18	15	17	16,67				
14	22	17	0	16	11,00	13	10	15	12,67				
15	22	18	10	20	16,00	23	14	20	19,00				
16	22	9	16	10	11,67	22	20	12	18,00				
17	20	10	15	18	14,33	18	10	10	12,67				
18	22	7	10	12	9,67	16	10	10	12,00				
19	26	10	0	10	6,67	10	10	17	12,33				
20	22	10	0	10	6,67	10	17	13	13,33				
21	21	14	10	0	8,00	15	11	15	13,67				
22	23	10	10	13	11,00	4	12	10	8,67				
23	22	10	10	7	9,00	7	13	11	10,33				
24	23	9	14	10	11,00	12	12	0	8,00				
25	22	5	5	7	5,67	9	5	10	8,00				
26	23	10	10	5	8,33	5	8	4	5,67				
27	24	0	10	9	6,33	5	10	10	8,33				
28	22	0	0	5	1,67	5	5	11	7,00				
29	25	0	0	0	0,00	0	5	0	1,67				
30	23	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00				
TOTAL		395	396	412	401,00	392	417	400	403,00				
MÉDIA		12,74	12,77	13,30	12,93	12,64	13,45	12,96	13,0				
D. padrão		8,60	13,50	10,36	10,20	7,93	7,78	7,27	7,12				

10.4. Dados brutos do Teste de Biodegradabilidade - 2º bateria

TABELA 25: Dados brutos do Teste de Biodegradabilidade - 2º bateria													
Dia	(°C)	Branco				Ác. orgânicos				Ciclo 2,0 mg			
		B1	B2	B3	X	A1	A2	A3	X	C1	C2	C3	X
0	25	0	0	0	0,00	5	6	0	3,67	0	0	5	1,67
1	25	15	20	17	17,33	25	30	33	29,33	24	29	33	28,67
2	27	10	8	8	8,67	10	10	7	9,00	10	10	14	11,33
3	20	9	10	10	9,67	15	10	10	11,67	15	14	13	14,00
4	21	15	12	15	14,00	14	6	11	10,33	10	16	17	14,33
5	20	15	11	12	12,67	12	20	18	16,67	20	25	28	24,33
6	25	12	8	10	10,00	14	10	16	13,33	15	10	16	13,67
7	25	12	10	15	12,33	15	15	14	14,67	13	16	18	15,67
8	26	7	14	10	10,33	17	9	12	12,67	11	9	12	10,67
9	28	12	8	10	10,00	10	9	11	10,00	10	9	11	10,00
10	21	0	0	0	0,00	15	15	17	15,67	15	15	20	16,67
11	24	17	12	13	14,00	30	25	29	28,00	25	20	28	24,33
12	23	5	10	9	8,00	12	10	10	10,67	14	12	11	12,33
13	22	9	9	15	11,00	14	13	20	15,67	12	23	21	18,67
14	22	4	11	7	7,33	18	16	20	18,00	17	18	19	18,00
15	22	5	12	10	9,00	11	21	20	17,33	20	22	20	20,67
16	22	13	6	9	9,33	14	20	20	18,00	10	15	14	13,00
17	20	11	10	5	8,67	10	17	10	12,33	5	17	14	12,00
18	22	5	3	5	4,33	10	8	10	9,33	10	7	9	8,67
19	26	5	5	6	5,33	10	10	10	10,00	5	10	10	8,33
20	22	0	10	9	6,33	10	15	10	11,67	10	14	10	11,33
21	21	0	13	14	9,00	10	10	15	11,67	10	11	14	11,67
22	23	5	15	7	9,00	11	19	16	15,33	11	15	7	11,00
23	22	6	10	6	7,33	10	10	11	10,33	11	10	12	11,00
24	23	8	10	9	9,00	15	14	15	14,67	0	11	17	9,33
25	22	0	2	3	1,67	10	20	10	13,33	9	12	14	11,67
26	23	0	2	7	3,00	10	10	10	10,00	5	11	10	8,67
27	24	0	2	0	0,67	19	13	7	13,00	0	5	11	5,33
28	22	0	0	0	0,00	6	7	0	4,33	8	10	9	9,00
29	25	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
30	23	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
TOTAL		200	243	241	228,00	382	398	392	390,67	325	396	437	386,00
MÉDIA		5,71	6,94	6,88	6,51	10,91	11,37	11,20	11,16	9,28	11,31	12,48	11,02
D. padrão		5,41	4,87	4,96	4,63	5,95	6,18	6,84	5,80	6,37	6,45	6,80	6,14
Dia	(°C)	Ciclo 20,0 mg				Ciclo 200,0 mg							
		D1	D2	D3	X	E1	E2	E3	X				
0	23	10	8	10	9,33	10	12	13	11,67				
1	22	30	47	38	38,33	27	35	28	30,00				
2	27	16	15	19	16,67	20	15	21	18,67				
3	20	20	19	15	18,00	14	20	11	15,00				
4	21	16	16	10	14,00	19	10	15	14,67				
5	20	10	8	12	10,00	18	9	14	13,67				
6	25	16	10	10	12,00	19	22	24	21,67				
7	25	12	10	10	10,67	10	17	16	14,33				
8	26	10	19	17	15,33	7	19	14	13,33				
9	22	10	7	3	6,67	13	15	14	14,00				
10	20	12	12	10	11,33	14	10	15	13,00				
11	24	23	20	28	23,67	27	22	29	26,00				
12	23	16	18	14	16,00	6	8	9	7,67				
13	22	24	20	21	21,67	13	17	12	14,00				
14	26	17	10	16	14,33	21	20	15	18,67				
15	22	18	10	15	14,33	15	22	18	18,33				
16	22	9	12	10	10,33	15	17	16	16,00				
17	20	10	15	18	14,33	15	20	20	18,33				
18	22	7	10	12	9,67	15	18	10	14,33				
19	26	10	0	10	6,67	10	16	17	14,33				
20	22	10	5	10	8,33	10	17	15	14,00				
21	21	14	11	14	13,00	15	10	18	14,33				
22	23	10	21	13	14,67	14	17	20	17,00				
23	22	10	10	17	12,33	10	12	16	12,67				
24	23	9	14	5	9,33	10	10	10	10,00				
25	22	8	0	7	5,00	10	13	8	10,33				
26	23	10	10	10	10,00	10	15	12	12,33				
27	24	10	10	3	7,67	5	10	10	8,33				
28	25	6	11	20	12,33	10	5	5	6,67				
29	25	5	5	0	3,33	8	10	5	7,67				
30	25	0	0	0	0,00	10	0	0	3,33				
TOTAL		388	383	397	389,33	420	463	450	444,33				
MÉDIA		11,08	10,94	11,34	11,12	12	13,22	12,85	12,69				
D. padrão		5,60	6,60	6,82	5,63	5,60	6,01	6,23	5,35				

10.5. Laudos do Laboratório de Análises Ambientais – SENAI/CETSAM-PR

Grupo - Reator	Amostra	Laudos
<i>amostra 1</i> (Branco)	<i>antes do tratamento</i>	n° 4711
	<i>após o tratamento</i>	n° 5493
<i>amostra 2</i> (Ac. orgânicos)	<i>antes do tratamento</i>	n° 4712
	<i>após o tratamento</i>	n° 5494
<i>amostra 3</i> (CF 2,0 mg.L ⁻¹)	<i>antes do tratamento</i>	n° 4713
	<i>após o tratamento</i>	n° 5495
<i>amostra 4</i> (CF 20,0 mg.L ⁻¹)	<i>antes do tratamento</i>	n° 4714
	<i>após o tratamento</i>	n° 5496
<i>amostra 5</i> (CF 200,0 mg.L ⁻¹)	<i>antes do tratamento</i>	n° 0077
	<i>após o tratamento</i>	n° 5497
<i>amostra 6</i> (CF 500,0 mg.L ⁻¹)	<i>antes do tratamento</i>	n° 0078
	<i>após o tratamento</i>	n° 0580



SENAI - CENTRO INTEGRADO DE TECNOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROFISSIONAL DA CIDADE INDUSTRIAL DE CURITIBA
CETSAM – Centro de Tecnologia em Saneamento e Meio Ambiente
Laboratórios de Análises Ambientais

PÁG. 1/1

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 4711/2006

Requisitante: **Patricia Sobierajski Barreto**

Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**

Identificação da amostra: **Amostra 1**

Tipo de amostra: **Efluente Industrial**

Coleta: tipo **Simplex** responsável **Requisitante** data **30/10/06** hora **15h00min**

Entrada no laboratório: data **31/10/06** hora **10h13min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Metodologia
--------	-----------	---------	-------------

Ensaio Instrumentais – Orgânicos			
Ciclofosfamida	< 2,0	mg/L	Cromatografia Líquida - HPLC

Referências
1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações
1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente.

Equipe Técnica
Alexandre Emmel CRQ IX-09200788

.../ae Curitiba 10/11/06



SENAI - CENTRO INTEGRADO DE TECNOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROFISSIONAL DA CIDADE INDUSTRIAL DE CURITIBA
CETSAM - Centro de Tecnologia em Saneamento e Meio Ambiente
Laboratórios de Análises Ambientais

PAG. 1/1

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 5493/2006

Requisitante: **Patricia Sobierajski Barreto**

Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**

Identificação da amostra: **Amostra 1 - Pós**

Tipo de amostra: **Efluente Industrial**

Coleta: tipo **Simplex** responsável **Requisitante** data **12/12/06** hora **12h00min**

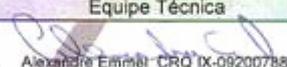
Entrada no laboratório: data **13/12/06** hora **15h19min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Metodologia
--------	-----------	---------	-------------

Ensaio Instrumentais - Orgânicos			
Ciclofosfamida	< 0,5	mg/L	Cromatografia Líquida - HPLC

Referências
1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphaan", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações
1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente.

Equipe Técnica
 Alexandre Emmel - CRQ IX-09200788

...Jae Curitiba 15/12/06



SENAI - CENTRO INTEGRADO DE TECNOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROFISSIONAL DA CIDADE INDUSTRIAL DE CURITIBA
CETSAM – Centro de Tecnologia em Saneamento e Meio Ambiente
Laboratórios de Análises Ambientais

PÁG. 1/1

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 4712/2006

Requisitante: **Patrícia Sobierajski Barreto**

Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**

Identificação da amostra: **Amostra 2**

Tipo de amostra: **Efluente Industrial**

Coleta: tipo **Simplex** responsável **Requisitante** data **30/10/06** hora **15h00min**

Entrada no laboratório: data **31/10/06** hora **10h13min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Metodologia
--------	-----------	---------	-------------

Ensaio Instrumentais – Orgânicos

Ciclofosfamida	< 2,0	mg/L	Cromatografia Líquida - HPLC
----------------	-------	------	------------------------------

Referências

1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações

1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente.

Equipe Técnica

Alexandre Emmel CRQ IX-09200788

.../ae Curitiba 10/11/06



SENAI - CENTRO INTEGRADO DE TECNOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROFISSIONAL DA CIDADE INDUSTRIAL DE CURITIBA

CETSAM - Centro de Tecnologia em Saneamento e Meio Ambiente

Laboratórios de Análises Ambientais

PÁG. 1/1

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 5494/2006

Requisitante: **Patrícia Sobierajski Barreto**

Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**

Identificação da amostra: **Amostra 2 - Pós**

Tipo de amostra: **Efluente Industrial**

Coleta: tipo **Simplex** responsável **Requisitante** data **12/12/06** hora **12h00min**

Entrada no laboratório: data **13/12/06** hora **15h19min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Metodologia
--------	-----------	---------	-------------

Ensaio Instrumentais - Orgânicos

Ciclofosfamida	< 0,5	mg/L	Cromatografia Líquida - HPLC
----------------	-------	------	------------------------------

Referências

1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações

1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente.

Equipe Técnica

Alexandre Emmel CRQ IX-09200788

.../ae Curitiba 15/12/06



SENAI - CENTRO INTEGRADO DE TECNOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROFISSIONAL DA CIDADE INDUSTRIAL DE CURITIBA
CETSAM - Centro de Tecnologia em Saneamento e Meio Ambiente
Laboratórios de Análises Ambientais

PÁG. 1/1

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 4713 - A/2006

Requisitante: **Patrícia Sobierajski Barreto**

Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**

Identificação da amostra: **Amostra 3**

Tipo de amostra: **Efluente Industrial**

Coleta: tipo **Simplex** responsável **Requisitante** data **30/10/06** hora **15h00min**

Entrada no laboratório: data **31/10/06** hora **10h13min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Metodologia
--------	-----------	---------	-------------

Ensaio Instrumentais - Orgânicos

Ciclofosfamida	1,7	mg/L	Cromatografia Líquida - HPLC
----------------	-----	------	------------------------------

Referências

1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações

1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente.
2. O relatório de ensaio **4713-A/2006** substitui completamente o relatório de ensaio **4713/2006**.

Equipe Técnica

Alexandre Emmel CRQ IX-09200788

.../ae Curitiba 15/12/06



SENAI - CENTRO INTEGRADO DE TECNOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROFISSIONAL DA CIDADE INDUSTRIAL DE CURITIBA
CETSAM - Centro de Tecnologia em Saneamento e Meio Ambiente
Laboratórios de Análises Ambientais

PÁG. 1/1

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 5495/2006

Requisitante: **Patricia Sobierajski Barreto**

Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**

Identificação da amostra: **Amostra 3 - Pós**

Tipo de amostra: **Efluente Industrial**

Coleta: tipo **Simplex** responsável **Requisitante** data **12/12/06** hora **12h00min**

Entrada no laboratório: data **13/12/06** hora **15h19min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Metodologia
--------	-----------	---------	-------------

Ensaio Instrumentais - Orgânicos			
Ciclofosfamida	< 0,5	mg/L	Cromatografia Líquida - HPLC

Referências
1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações
1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente.

Equipe Técnica
Alexandre Emmel CRO IX-09200788

.../Jae Curitiba 15/12/06



SENAI - CENTRO INTEGRADO DE TECNOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROFISSIONAL DA CIDADE INDUSTRIAL DE CURITIBA
CETSAM - Centro de Tecnologia em Saneamento e Meio Ambiente
Laboratórios de Análises Ambientais

PÁG. 1/1

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 4714/2006

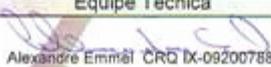
Requisitante: **Patrícia Sobierajski Barreto**
Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**
Identificação da amostra: **Amostra 4**
Tipo de amostra: **Efluente Industrial**
Coleta: tipo **Simplex** responsável **Requisitante** data **30/10/06** hora **15h00min**
Entrada no laboratório: data **31/10/06** hora **10h13min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Metodologia
--------	-----------	---------	-------------

Ensaio Instrumentais - Orgânicos			
Ciclofosfamida	27,6	mg/L	Cromatografia Líquida - HPLC

Referências
1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações
1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente.

Equipe Técnica
 Alexandre Emméli CRQ IX-09200788

...Jae Curitiba 10/11/06



SENAI - CENTRO INTEGRADO DE TECNOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROFISSIONAL DA CIDADE INDUSTRIAL DE CURITIBA
CETSAM - Centro de Tecnologia em Saneamento e Meio Ambiente
Laboratórios de Análises Ambientais

PÁG. 1/1

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 5496/2006

Requisitante: **Patrícia Sobierajski Barreto**

Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**

Identificação da amostra: **Amostra 4 - Pós**

Tipo de amostra: **Efluente Industrial**

Coleta: tipo **Simplex** responsável **Requisitante** data **12/12/06** hora **12h00min**

Entrada no laboratório: data **13/12/06** hora **15h19min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Metodologia
--------	-----------	---------	-------------

Ensaio Instrumentais - Orgânicos

Ciclofosfamida	< 0,5	mg/L	Cromatografia Líquida - HPLC
----------------	-------	------	------------------------------

Referências

1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações

1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente.

Equipe Técnica

Alexandre Enríkel CRO IX-09200788

.../ae Curitiba 15/12/06

	<h1>SENAI</h1>	SENAI – CIC / CETSAM Área de Laboratórios
		Rua Nossa Senhora da Cabeça 1371/1441 CIC CEP 81310-010 Curitiba PR Tel. (0-xx-41) 3271-7000 FAX (0-xx-41) 3271-5156 http://www.pr.senai.br

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 0077/2007

PÁG. 1/1

Requisitante: **Patrícia Sobierajski Barreto**
 Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**
 Identificação da amostra: **Amostra 5 - Pré**
 Tipo de amostra: **Efluente Industrial**
 Coleta: tipo **Simplex** responsável **Requisitante** data **09/01/07** hora **15h00min**
 Entrada no laboratório: data **11/01/07** hora **11h50min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Data realização	Metodologia
--------	-----------	---------	-----------------	-------------

Ensaio Instrumentais - Cromatografia				
Ciclofosfamida	198,6	mg/L	12/01/07	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Referências
1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações
1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente;
2. A amostra foi diluída em 10 vezes antes de realizar a leitura por HPLC.

Equipe Técnica
 Tec II Alexandre Emmel CRQ IX-09200788

.../ae Curitiba 15/01/07



SENAI - CENTRO INTEGRADO DE TECNOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROFISSIONAL DA CIDADE INDUSTRIAL DE CURITIBA
CETSAM - Centro de Tecnologia em Saneamento e Meio Ambiente
Laboratórios de Análises Ambientais

PÁG. 1/1

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 5497/2006

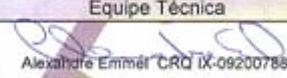
Requisitante: **Patricia Sobierajski Barreto**
Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**
Identificação da amostra: **Amostra 5 - Pós**
Tipo de amostra: **Efluente Industrial**
Coleta: tipo **Simplex** responsável **Requisitante** data **12/12/06** hora **12h00min**
Entrada no laboratório: data **13/12/06** hora **15h19min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Metodologia
--------	-----------	---------	-------------

Ensaio Instrumentais - Orgânicos			
Ciclofosfamida	12,9	mg/L	Cromatografia Líquida - HPLC

Referências
1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphaian", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações
1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente.

Equipe Técnica
 Alexandre Emmel CRQ IX-09200788

.../ae Curitiba 15/12/06

 SENAI	SENAI – CIC / CETSAM Área de Laboratórios Rua Nossa Senhora da Cabeça 1371/1441 CIC CEP 81310-010 Curitiba PR Tel. (0-xx-41) 3271-7000 FAX (0-xx-41) 3271-5156 http://www.pr.senai.br
---	--

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 0078/2007

PÁG. 1/1

Requisitante: **Patrícia Sobierajski Barreto**
 Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**
 Identificação da amostra: **Amostra 6 - Pré**
 Tipo de amostra: **Efluente Industrial**
 Coleta: tipo **Simples** responsável **Requisitante** data **09/01/07** hora **15h00min**
 Entrada no laboratório: data **11/01/07** hora **11h50min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Data realização	Metodologia
--------	-----------	---------	-----------------	-------------

Ensaio Instrumentais - Cromatografia

Ciclofosfamida	486,4	mg/L	12/01/07	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
----------------	-------	------	----------	--

Referências

1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações

1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente;
2. A amostra foi diluída em 10 vezes antes de realizar a leitura por HPLC.

Equipe Técnica

Téc II Alexandre Emmel CRQ IX-09200788

.../ae Curitiba 15/01/07



SENAI

SENAI – CIC / CETSAM
Área de Laboratórios

Rua Nossa Senhora da Cabeça 1371/1441 CIC CEP 81310-010 Curitiba PR
Tel. (0-xx-41) 3271-7000 FAX (0-xx-41) 3271-7156 <http://www.pr.senai.br>

RELATÓRIO DE ENSAIOS ANALÍTICOS 0580/2007

PÁG. 1/1

Requisitante: **Patrícia Sobierajski Barreto**

Endereço: **Rua João Meirelles, 884 - Bloco E - Apto. 103 - Abrão - Florianópolis / SC**

Identificação da amostra: **Amostra 6 - Pós**

Tipo de amostra: **Efluente Industrial**

Coleta: tipo **Simplex** responsável **Requisitante** data **12/02/07** hora **10h00min**

Entrada no laboratório: data **15/02/07** hora **13h24min**

Ensaio	Resultado	Unidade	Data realização	Metodologia
--------	-----------	---------	-----------------	-------------

Ensaio Instrumentais - Cromatografia

Ciclofosfamida	8,75	mg/L	05/03/07	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
----------------	------	------	----------	--

Referências

1. Análise de Ciclofosfamida baseada no artigo "Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan", Int Arch Occup Environ Health (1997) 69:109-114.

Observações

1. A metodologia para a determinação de Ciclofosfamida por HPLC foi fornecida pelo cliente.

Equipe Técnica

Tec II-Alexandre Emmal - CRQ IX-09200788

...Jae Curitiba 06/03/07

10.8. Compostos do pico A (CG-MS)

Print Date: 19 Jun 2007 16:33:18

Top Ten Summary of Search NIST Libraries for Spectrum

Search NIST Libraries for Spectrum Results

Hits Found: 15

Search NIST Libraries for Spectrum Parameters

Search Mode: Normal (Forward)

m/z Range: 1 - 2000

Min Intensity: 30

Constraints: --

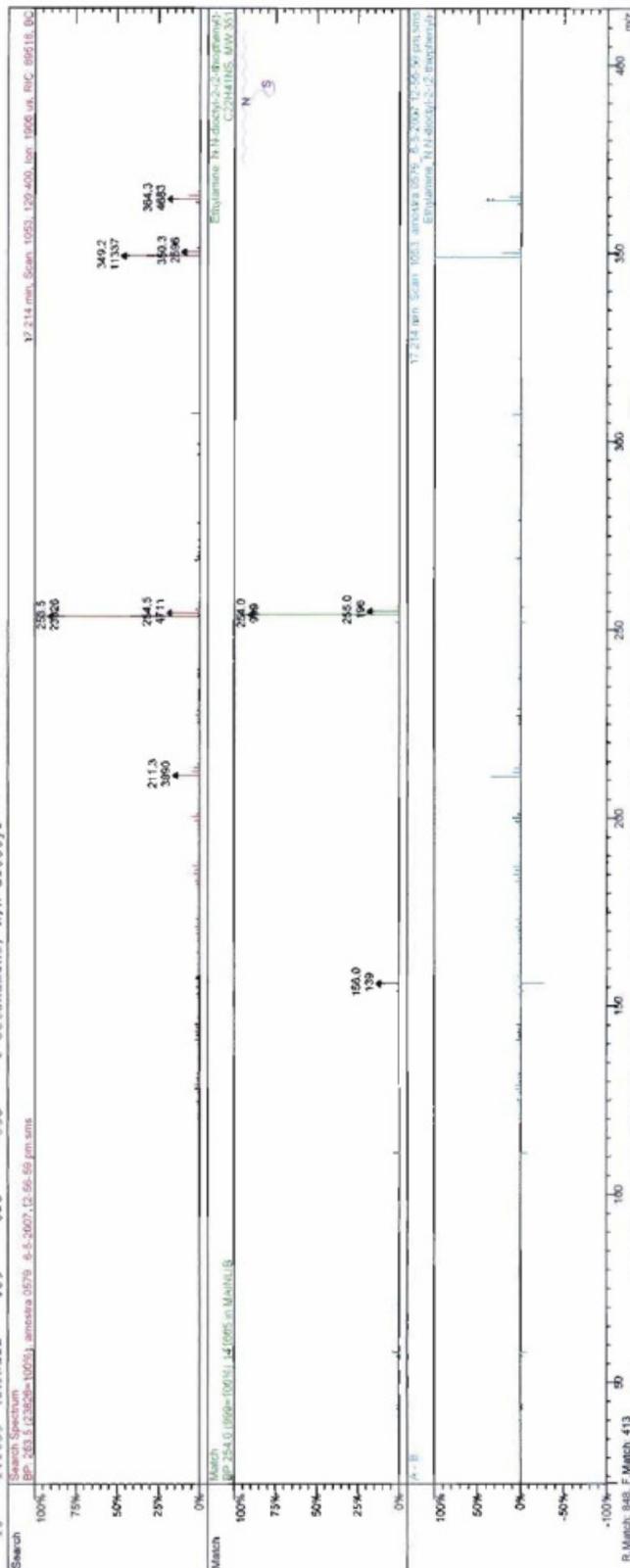
Requested Pre-Search: 6000

Requested Final Search: 15

Search 2 Libraries: A. mainlib

B. rep.lib

Rank	Entry	Library	R. Match	F. Match	Mol. Wt.	Name
1	141665	MAINLIB	942	600	351	Ethylamine, N,N-dioctyl-2-(2-thiophenyl)-
2	141664	MAINLIB	944	598	377	Ethylamine, N,N-dioctyl-2-phenylthio
3	141668	MAINLIB	890	563	345	2-Phenylethylamine, N,N-dioctyl-
4	141676	MAINLIB	782	543	299	10-Formamido-10,11-dihydro-2,3-dimethoxydibenz(b,f)oxepin
5	141677	MAINLIB	810	542	351	Ethylamine, N,N-bis(2-ethylhexyl)-2-(2-thiophenyl)
6	141500	MAINLIB	677	542	433	Phosphonic acid, [1-amino-2-[4-(trimethylsilyloxy)phenyl]ethyl
7	141596	MAINLIB	826	556	297	Diocetylsebutylamine
8	141507	MAINLIB	710	529	365	Benzo(c)pyrazol-4(1H)-one, 4,5,6,7-tetrahydro-5,7-dimethyl-2-(2-
9	25952	REFLIB	867	526	353	1-Octanamine, N,N-dioctyl-
10	141659	MAINLIB	859	523	353	1-Octanamine, N,N-dioctyl-



10.10. Dados brutos do Teste de Toxicidade Aguda - 1º experimento

TABELA 26: N° de organismos imóveis, pH e a CE_{50%} 48 hs das amostras de efluentes *antes-tratamento*

Concentração	controle	A1 - antes	A2 - antes	A3 - antes	A4 - antes	A5 - antes
100,00	0	20	20	20	20	20
50,00	0	20	20	20	20	20
25,00	0	20	20	20	20	20
12,50	0	20	20	20	20	20
8,33	0	20	20	20	20	20
6,25	0	0	5	0	13	12
4,16	0	0	2	0	9	12
3,12	0	0	1	0	1	9
2,00	0	0	0	0	0	6
pH	7,20	7,85	7,86	7,37	7,13	7,30
CE50%	100	8,33	6,27	7,21	4,83	3,88

TABELA 27: N° de organismos imóveis, pH e a CE_{50%} 48 hs das amostras de efluentes *após-tratamento*

Concentração	controle	A1 - após	A2 - após	A3 - após	A4 - após	A5 - após
100,00	0	20	20	20	20	20
50,00	0	14	20	20	20	20
25,00	0	3	17	20	20	20
12,50	0	0	10	20	13	20
8,33	0	0	6	3	5	5
6,25	0	0	4	3	2	2
4,16	0	0	1	2	1	1
3,12	0	0	0	1	0	1
2,00	0	0	0	1	0	0
pH	7,10	6,95	7,19	7,43	7,86	7,95
CE50%	100	39,22	12,07	9,16	8,43	10,20

10.11. Dados brutos do Teste de Toxicidade Aguda - 2º experimento

TABELA 28: N° de organismos imóveis, pH e a CE_{50%} 48 hs das amostras de lodo e sol. de ácidos orgânicos

Concentração	controle	Lodo	Sol. Ac. Org.
100,00	0	20	20
50,00	0	20	20
25,00	0	19	20
12,50	0	0	20
8,33	0	0	20
6,25	0	0	20
4,16	0	0	20
3,12	0	0	20
2,00	0	0	20
pH	7,10	7,80	4,36
CE50%	100	15,09	n.c.