

## Validação da espécie *Dendrocephalus brasiliensis* como organismo teste de água doce em estudos ecotoxicológicos para avaliação de fármacos utilizados no tratamento da COVID-19

### Validation of the species *Dendrocephalus brasiliensis* as a freshwater test organism in ecotoxicological studies for evaluation of pharmaceuticals used in the treatment of COVID-19

de Andrade Barbosa, Andreza Miranda<sup>1\*</sup>; da Silva, José Custódio<sup>2</sup>; dos Santos Mendonça Oliveira, Jaísa Marília<sup>2</sup>; Alejandro Navoni, Julio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente – PRODEMA, Curso de Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Associação Plena em Rede. Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Av. Sen. Salgado Filho 3000 - Lagoa Nova, CEP 59078-900, Contato: 55 84 32119209, Natal, estado Rio Grande do Norte, Brasil.

<sup>2</sup>Diretoria Acadêmica de Recursos Naturais (DIAREN), Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN), Av. Sen. Salgado Filho, 1559 – Tirol, CEP 59015-000, Contato: 55 84 4005-9949, Natal, estado Rio Grande do Norte, Brasil.

\*mab.andreza@hotmail.com

Recibido 24/01/2022

Aceptado 22/06/2022

Editores: Susana García y Laura Lanari

**Resumo.** Os contaminantes emergentes (CE), são substâncias químicas (fármacos, produtos de higiene pessoal, drogas ilícitas entre outros) que estão presentes no ambiente como consequência da atividade antrópica e a falta de adequação dos processos convencionais de tratamento de água e esgoto que não logram removê-los eficientemente. Na atualidade o uso disseminado e desmedido de fármacos no tratamento da pandemia de COVID 19 tem aumentado a preocupação dos impactos decorrentes da contaminação por fármacos em ambientes aquáticos, consequência da liberação no ambiente de grandes quantidades destes compostos. Assim, estudos de ecotoxicidade aquática são fundamentais para avaliar o efeito de substâncias químicas tóxicas nas análises de impactos ambientais, sobretudo quando utilizado organismos representativos da biota aquática local, garantindo assim, maior confiabilidade e representatividade dos resultados obtidos. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi validar a utilidade do *Dendrocephalus brasiliensis* (Branchoneta) espécie autóctone do nordeste brasileiro como organismo teste para estudos de ecotoxicidade de fármacos utilizados no tratamento da COVID 19. Testes ecotoxicológicos utilizando *D. brasiliensis* foram realizados utilizando soluções dos fármacos paracetamol, hidroxycloquina, ivermectina e ibuprofeno, em concentrações de 0,0025 até 600,0 mg/L seguindo os protocolos descritos pela Associação Brasileira para Normas Técnicas (ABNT) para toxicidade aguda, protocolo padronizado para a realização do ensaio ecotoxicológicos utilizando como organismo teste a *Daphnia magna*, o qual foi empregada como referência para comparar o padrão de resposta. Com os resultados obtidos foi realizado o cálculo da  $CL_{50-48h}$  considerando como desfecho a morte dos organismos, ivermectina (< 0,0025 - < 0,0025), hidroxycloquina (3,70 - 14,09), ibuprofeno (12,25 - 107,52), paracetamol (8,53 - 9,61), resultados  $CL_{50-48h}$  mg/l *D. magna* e *D. brasiliensis* respectivamente. Os resultados obtidos mostraram um padrão diferenciado dependente da espécie e do fármaco analisado observando-se uma menor sensibilidade frente a exposição da *D. brasiliensis* em comparação a *D. magna* demonstrando a valia da *D. brasiliensis* como organismo teste. Pesquisas futuras dirigidas a analisar as potenciais interações destes fármacos em concentrações ambientais reais são necessárias para completar a validação e ter uma aproximação dos eventos acometidos em ambientes impactados por estes fármacos.

**Palavras-chave:** Ecotoxicologia; Farmacocontaminação; *Branchoneta*; Pandemia sars-COV 19.

**Abstract.** Emerging contaminants (EC) are chemical substances (pharmaceuticals, personal hygiene products, illicit drugs, among others) that are present in the environment because of human activity and the lack of adequacy of conventional water and sewage treatment processes that do not manage to remove them efficiently. Currently, the widespread and excessive use of drugs in the treatment of the COVID 19 pandemic has increased concern about the impacts resulting from contamination by drugs in aquatic environments, because of the release into the environment of large amounts of these compounds. Thus, aquatic ecotoxicity studies are essential to evaluate the effect of toxic chemical substances in the analysis of environmental impacts, especially when using representative organisms of the local aquatic biota, thus ensuring greater reliability and representativeness of the results obtained. In view of this, the objective of this work was to validate the usefulness of *Dendrocephalus brasiliensis* (Branchoneta), an autochthonous species from northeastern Brazil as a test organism for ecotoxicity studies of drugs used in the treatment of COVID 19. Ecotoxicological tests using *D. brasiliensis* were performed using drug solutions paracetamol, hydroxychloroquine, ivermectin and ibuprofen, in concentrations from 0.0025 to 600.0 mg/L following the protocols described by the Brazilian Association for Technical

Norms (ABNT) for acute toxicity, standardized protocol for carrying out the ecotoxicological assay using as a test organism *Daphnia magna*, which was used as a reference to compare the response pattern. Based on the results obtained, the  $LC_{50-48h}$  was calculated considering the death of organisms, ivermectin ( $< 0.0025 - < 0.0025$ ), hydroxychloroquine (3.70 - 14.09), ibuprofen (12.25 - 107.52), paracetamol (8.53 - 9.61), results  $LC_{50-48h}$  mg/l *D. magna* and *D. brasiliensis* respectively. The results obtained showed a differentiated pattern depending on the species and the analyzed drug, observing a lower sensitivity to exposure of *D. brasiliensis* compared to *D. magna*, demonstrating the value of *D. brasiliensis* as a test organism. Future research aimed at analyzing the potential interactions of these drugs at real environmental concentrations is necessary to complete the validation and to have an approximation of the events affected in environments impacted by these drugs.

**Keywords:** Ecotoxicology; Pharmacocontamination; Branchoneta; Sars-COV pandemic 19.

## Introdução

Substâncias químicas empregadas na indústria, agricultura e medicina (ou seus metabolitos) podem, durante o processo de fabricação, uso, ou descarte, resultar na eliminação de rejeitos para o meio ambiente, com potenciais consequências tóxicas para a biota e os seres humanos. Essas substâncias ocorrem em descargas de diferentes tipos, incluindo esgoto, escoamento de águas pluviais, descargas industriais e descargas rurais (Omotola *et al.* 2022).

Atualmente o termo contaminante emergente tem se destacado, graças a seu potencial tóxico e capacidade de estar presente no solo, água e ar. Apesar do risco que apresentam ao ecossistema, a maior parte desses contaminantes não são regulados pela legislação (Montagner *et al.* 2017). Os fármacos são especificamente criados para serem substâncias biologicamente ativas, em seu princípio esses medicamentos buscam serem eficazes em baixas concentrações. O alto consumo desses compostos nos últimos anos foram seguidos pela introdução contínua dessas moléculas biologicamente ativas nos ambientes naturais. Sua atividade biológica tem potencial de interferir nos processos bioquímicos e fisiológicos, podendo causar efeitos adversos e prejudicar a saúde. A capacidade dos ingredientes farmacêuticos de serem absorvidos e de interagir com organismos vivos os torna um perigo potencial para toda biota. Atualmente os produtos farmacêuticos já são reconhecidos como uma ameaça aos ecossistemas aquáticos (Sangion e Gramatica 2016; Mezzelani *et al.* 2018).

Com a chegada da pandemia de Covid-19, novos desafios surgiram. Dentre eles uma incessante busca por um tratamento, e fármacos não comprovados cientificamente para tratamento de Covid-19 foram rapidamente adotados como potencial tratamento para esta doença. Essa sistemática acarretou no excesso de automedicação e de tratamento secundário, com graves

riscos à saúde humana e ampliando os riscos sanitários e os danos ambientais relacionados ao descarte/lançamento desses fármacos no ambiente (Falavigna *et al.* 2020).

Como consequência, fármacos massivamente utilizados em distintos países, incluindo o Brasil, tais como Hidroxicloroquina, Ivermectina, Paracetamol e Ibuprofeno, que estão presentes em efluentes de ETE são lançados em corpos hídricos sem o uso de tecnologias de remoção adequadas (Feng *et al.* 2013).

Para compreender os impactos ambientais destas substâncias, os ensaios ecotoxicológicos tem grande relevância, pois buscam garantir a representatividade das consequências que estas substâncias podem acarretar nos corpos hídricos e contribuem para estabelecer níveis guia para a proteção da biota aquática (Quadra *et al.* 2016; Lopes *et al.* 2018).

Os testes de ecotoxicidade são instrumentos importantes para ponderar a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes. Esses testes consistem em ensaios laboratoriais, realizados sob perspectivas experimentais específicas e controladas, visando estabelecer a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais (águas ou sedimentos), por meio da exposição de organismos-testes a diferentes concentrações de amostra, os efeitos tóxicos produzidos sobre esses organismos são observados e quantificados (Omotola *et al.* 2022; Jacob *et al.* 2021).

O uso de testes ecotoxicológicos para análise da qualidade de águas e efluentes já é regulamentado oficialmente no Brasil, através da Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 2005). Essa resolução aponta que toxicidade é qualquer efeito desconforme ocasionado a organismos testes, podendo ser alterações genéticas, imobilidade, e até letalidade.

Sendo assim, estudos de ecotoxicidade que ava-

liem o potencial de bioacumulação de fármacos e suas concentrações no ambiente, por meio da avaliação do seu destino e quantidade em que são lançados é fundamental para conhecer os riscos associados à exposição de novos compostos que ainda não estão contemplados nas legislações vigentes, permitindo antecipar e mitigar os danos para as gerações futuras (Montagner *et al.* 2017).

Nesse contexto, a *D. magna* é considerada um dos principais organismos de ensaios ecotoxicológicos padrão. Entretanto, é importante considerar a utilização de espécies autóctones, como a *D. brasiliensis*, em pesquisas realizadas em regiões tropicais, pois é uma espécie adaptada às especificidades do ecossistema local e fornecem resultados realísticos (Santos *et al.* 2018).

A *D. brasiliensis*, conhecida popularmente como branchoneta, é um micro crustáceo de água doce da família *Thamnocephalidae*, tipicamente encontrado em lagoas temporárias no bioma Caatinga e em área costeira (Santos *et al.* 2019). Esse organismo vive em poças temporárias, onde os ovos são colocados em repouso no fundo da poça. Esses ovos possibilitam a sobrevivência da espécie na estação de seca, e são responsáveis pela disseminação da mesma. Esse micro crustáceo já foi encontrado em piscinas naturais e artificiais da Caatinga do norte de Minas Gerais, ao norte do Rio Grande do Norte e também em piscinas no Gran Chaco, no centro-norte da Argentina (Barros-Alves *et al.* 2016).

Sendo assim, devido as recentes preocupações com a presença de produtos farmacêuticos no meio ambiente em particular decorrente do consumo e utilização massiva de fármacos empregados no tratamento da COVID 19, o objetivo deste trabalho foi validar o organismo *D. brasiliensis* como organismo teste para estudos de ecotoxicidade e comparar os resultados com a espécie *D. magna* como organismo teste de referência frente a exposição aos compostos Hidroxicloroquina, Ivermectina, Paracetamol e Ibuprofeno.

## Materiais e Métodos

### Métodos de ensaio

Os testes de ecotoxicidade foram realizados utilizando quatro formulações farmacológicas de medicações utilizadas corriqueiramente no tratamento da COVID-19. Soluções aquosas destes fármacos foram preparadas por diluição em água destilada ultra pura com auxílio de agitador magnético a partir das suas concentrações comerciais: hidroxicloroquina (400mg – EMS S/A, São Paulo, Brasil), ivermectina (6 mg – VITAME-

DIC, Goiás, Brasil), paracetamol (200mg/L – Airela, Santa Catarina, Brasil) e ibuprofeno (600mg - Prati-donaduzzi, Paraná, Brasil). Informação adicional sobre a formulação dos fármacos utilizados nesta pesquisa estão disponíveis em <https://consultaremedios.com.br/>.

Posteriormente a partir da solução padrão foram realizadas as outras diluições com água do cultivo com mesmos padrões dos testes, para obter as concentrações de testagem utilizadas no experimento: Hidroxicloroquina (0,00 mg/L, 2,5 mg/L, 5,0 mg/L, 10,0 mg/L, 15,0 mg/L, 100,0 mg/L e 400,0 mg/L), ivermectina (0,00 mg/L, 0,0025 mg/L, 0,005 mg/L, 0,01 mg/L e 1,0 mg/L), paracetamol (0,00 mg/L, 1,0 mg/L, 2,5 mg/L, 5,0 mg/L, 10,0 mg/L, 15,0 mg/L) e ibuprofeno (0,00 mg/L, 1,0 mg/L, 2,5 mg/L, 5,0 mg/L, 10,0 mg/L, 15,0 mg/L, 60,0 mg/L, 100,0 mg/L, 200,0 mg/L, 300,0 mg/L e 600,0 mg/L). Para o controle de qualidade do processo, soluções de Cloreto de potássio (KCl) (marca NEON), foram utilizadas nas concentrações (0,0 mg/L, 10,0 mg/L, 30,0 mg/L, 50,0 mg/L, 90,0 mg/L, 110,0 mg/L, 130,0 mg/L, 160,0 mg/L, 190,0 mg/L e 210,0 mg/L).

### Organismos e manutenção do cultivo

O cultivo dos organismos-testes foi realizado no laboratório de ecotoxicologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN), com a *Daphnia magna* de acordo com a metodologia determinada pela ABNT (2017) e com a *Dendrocephalus brasiliensis* baseado no método utilizado por Veiga e Vital (2002).

Os cistos de *D. brasiliensis* foram adquiridos da empresa *Fishfood*, localizada em São Paulo - SP. A produção foi realizada no IFRN, campus Natal Central, localizado na cidade de Natal - RN, de acordo com a metodologia apresentado por Santos *et al.* (2019). Inicialmente, 5 g de cistos incubáveis foram mantidos na proporção de 1 g/L de água em garrafas PET de 2 L. Após 24 h, os náuplios nascidos foram aclimatados em tanques de água parada com aeração até atingirem a formação de ovisac. A alimentação da *D. brasiliensis* consistiu em fitoplâncton. As microalgas foram cultivadas em condições de laboratório em fotobiorreatores com ar borbulhando continuamente para criar um fluxo. As trocas de água e a limpeza dos tanques foram realizadas semanalmente. Os parâmetros da água foram monitorados constantemente e mantidos a  $28 \pm 1$  °C, pH  $8 \pm 0,5$ .

O Cultivo de *D. magna* foi mantido no Laboratório de Ecotoxicologia do IFRN. Uma grande popula-

ção de clones mistos de *D. magna* foi propagada com culturas iniciais adquiridas externamente. A população foi mantida em água doce com aeração, preparada e regulada com temperatura  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  e luz 8h:16h fotoperíodo claro/escuro. As culturas foram alimentadas diariamente com fitoplâncton. Todos os procedimentos para manutenção e condução do teste de toxicidade foram realizados seguindo adaptação da norma NBR 13373 da ABNT (2017). Os tanques de cultivo foram limpos semanalmente, e a água de manutenção do cultivo foi renovada duas vezes por semana (Maggio *et al.* 2021).

### Teste de ecotoxicidade

Inicialmente foi realizado um estudo preliminar que envolveu levantamento dos resultados dos testes por 8 horas, sendo realizada a leitura a cada uma hora, posteriormente nas primeiras 12 horas e depois a cada 24 horas. Sendo decidido trabalhar com a leitura após 24 e 48 horas de acordo com o levantamento das informações, e visando a resposta observada em ambos os organismos utilizados nos testes.

Esse estudo preliminar também foi realizado para definir as concentrações a serem utilizadas nos testes para cada composto, seja ele fármaco, ou substância controle (KCl), ficando definido as concentrações apresentadas anteriormente nos materiais e métodos.

A bateria de testes de ecotoxicidade, foi realizada buscando a análise e validação da *D. brasiliensis*, avaliando quatro fármacos (Hidroxiclороquina, Ivermectina, Paracetamol e Ibuprofeno), e a solução padrão KCl como referência. Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando 10 indivíduos em um volume de 300 ml em cada réplica

nas diferentes concentrações, além do branco para o controle, e tiveram duração de 48 horas. O controle de qualidade foi mantido por meio do pH que ficou em média  $7,5 \pm 0,1$ ; dureza  $44 \pm 3$  mg/L CaCO<sub>3</sub>; temperatura de conforto de  $28^{\circ}\text{C}$ , suportando até  $34^{\circ}/36^{\circ}\text{C}$ .

Ao fim do período de exposição, foi realizada a contagem do número de organismos mortos a fim de se estabelecer a concentração letal média. O CL<sub>50-48h</sub> foi calculado usando o método estatístico *Trimmed Spearman-Kärber* (Hamilton *et al.* 1977), através do programa TOXSTAT 5.3. A validação dos resultados analisados foi realizado utilizando como substância de referência cloreto de potássio.

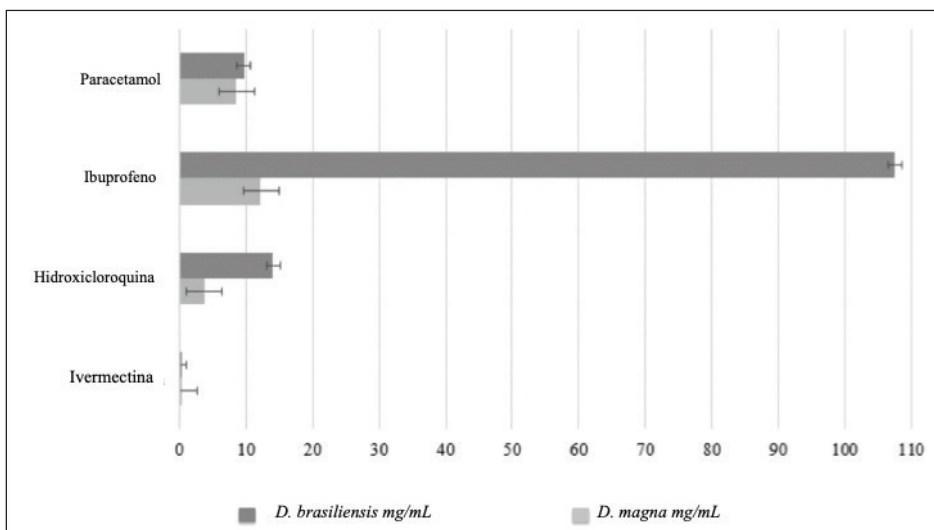
### Resultados e Discussão

Em relação aos fármacos testados a ivermectina, como já era esperado devido a sua característica antiparasitária, tanto para a *D. magna* como para a *D. brasiliensis* não possibilitou o cálculo do CL<sub>50-48h</sub>, uma vez que, os organismos tiveram mortalidade superior a 50% para a menor concentração utilizada, de 0,0025 mg/L. Em razão das suas características a ivermectina, mostra alta complexidade ambiental, pois dificulta a avaliação da mortalidade dos organismos testes, além de, ser um problema ecológico quando presente no ambiente, já que essa medicação é fabricada para eliminar vermes e parasitas, o que por consequência acarreta na mortalidade dos crustáceos aquáticos.

Para a hidroxiclороquina e ibuprofeno a *D. brasiliensis* se mostrou menos sensível do que a *D. magna*. No caso de Ivermectina e Paracetamol a resposta ecotoxicológica observada foi comparável (Tabela 1 e Figura 1).

**Tabela 1.** Descrição dos resultados obtidos mediante ensaios de toxicidade aguda dos fármacos Ivermectina, hidroxiclороquina, ibuprofeno e paracetamol além da resposta observada utilizando a substância padrão KCl utilizando *D. magna* e *D. brasiliensis*. Resultados expressados como CL<sub>50-48h</sub> com limite de confiança de 95%.

		<i>D. magna</i> mg/L	<i>D. brasiliensis</i> mg/L
Ivermectina	CL <sub>50-48h</sub>	< 0,0025	< 0,0025
Hidroxiclороquina	CL <sub>50-48h</sub> (95% LC)	3,70 (3,22 - 4,25)	14,09 (12,20 - 16,28)
Ibuprofeno	CL <sub>50-48h</sub> (95% LC)	12,25 (5,60 - 26,81)	107,52 (90,54 - 127,68)
Paracetamol	CL <sub>50-48h</sub> (95% LC)	8,53 (3,96 - 18,41)	9,61(6,78 - 13,62)
KCl	CL <sub>50-48h</sub> (95% LC)	120,35 (74,86 - 177,40)	35,59 (17,79 - 71,10)



**Figura 1.** Gráfico comparativo do efeito ecotoxicológico observado mediante ensaios realizados utilizando *D. magna* e *D. brasiliensis*. Resultados expressados como CL<sub>50-48h</sub> e erro padrão expresso em porcentagem.

Em relação ao teste realizado com KCl, os valores obtidos foram semelhantes aos reportados na bibliografia. Por exemplo, num estudo realizado por Santos *et al.* (2018) utilizando *D. brasiliensis* foi reportado um valor de EC<sub>50-48h</sub> (95% LC) = 47,1 (25,3 – 70,7), ratificando a reprodutibilidade experimental dos resultados e validando a *D. brasiliensis* como organismo teste para estudos de ecotoxicidade. Além disso, os resultados obtidos com *D. magna*, também apresentou valores de resposta comparáveis com os reportados na bibliográfica. Por exemplo, considerando o mencionado autor, os valores reportados frente a exposição com KCl para *D. magna* foram: EC<sub>50-48h</sub> (95% LC) 100,9 (74,1–120,8), ratificando a validade experimental obtida nesta experiência. A critério de comparação não foi encontrado na literatura artigos que avaliassem o CL<sub>50-48h</sub> com a *D. brasiliensis* para nenhum dos fármacos aqui testados, sendo assim, este é um estudo pioneiro utilizando essa espécie para avaliação ecotoxicológica desses fármacos. Vale ressaltar que, além da

representatividade da região semiárida que essa espécie possui, comparativamente a utilização desta espécie é facilitada pelo baixo investimento requerido já que para cada grama de cisto são gerados na ordem de 380.000 náuplios, e por ser um organismo filtrador é facilmente alimentada por emulsão de algas, outrossim, devido as suas maiores proporções em relação a outros micros crustáceos, facilitando a realização e incorporação de testes de ecotoxicidade em atividades de monitoramento ambiental (Lopes *et al.* 2007; Santos *et al.* 2019).

Em relação a *D. magna* estudos que avaliassem o CL<sub>50-48h</sub> para hidroxicloroquina também não foi identificado. Pesquisas que avaliam CL<sub>50-48h</sub> com a *D. magna*, para os fármacos ibuprofeno, paracetamol e ivermectina, apontaram diferentes faixas de concentração, como pode ser visto na Tabela 2. Os valores reportados no presente estudo ficaram próximos dos apresentados por Feng *et al.* (2013), para o ibuprofeno e paracetamol e Garric *et al.* (2007) para ivermectina.

**Tabela 2.** Resultados ecotoxicológicos da exposição a fármacos (ibuprofeno, paracetamol e ivermectina) em testes ecotoxicológicos descritos na literatura utilizando *D. magna* - CL<sub>50-48h</sub>.

	Mínimo	Máximo	Autor
CL <sub>50-48h</sub> ibuprofeno	9,10 mg/L	175,0 mg/L	(Iannacone e Alvarinho 2009); (Feng <i>et al.</i> 2013)
CL <sub>50-48h</sub> paracetamol	9,20 mg/L	62,3 mg/L	(Iannacone e Alvarinho 2009); (Feng <i>et al.</i> 2013)
CL <sub>50-48h</sub> ivermectina	1,2x10 <sup>-6</sup> mg/L mg/L	1,7x10 <sup>-6</sup> mg/L	(Garric <i>et al.</i> 2007)

## Conclusão

Os resíduos de compostos emergentes, mais especificamente relacionados à comercialização e consumo de fármacos, vêm se tornando um problema de escala mundial nas últimas décadas. O incremento do consumo prescrito e a automedicação proporcionou um impacto consequente no quantitativo desses resíduos (princípios ativos) no meio ambiente. Diante disso, estudos que avaliem o impacto destas substâncias na biota aquática são de grande importância, principalmente quando utilizados espécies nativas representativas do cenário ambiental estudado. Baseado no que foi exposto ao longo deste artigo, foi verificado a utilidade como organismo teste para ensaios ecotoxicológicos da espécie nativa da região semiárida *D. brasiliensis*, em relação a sua sensibilidade aos fármacos hidroxycloquina, ivermectina, paracetamol e ibuprofeno, com boa reprodutibilidade dos resultados (validade interna dos resultados), características essenciais para sua validação como organismos teste candidata para monitoramentos ambientais. Comparativamente com a *D. magna* a *D. brasiliensis* se mostrou menos sensível o que possibilita a sua implementação como espécie complementar para a representação mais abrangente dos potenciais impactos possíveis sobre a biota da área estudada. Estudos futuros direcionados a avaliar as possíveis interações dos fármacos testados em concentrações ambientais reais são necessárias para completar a validação e ter uma aproximação dos eventos acometidos em ambientes impactados por estes fármacos.

## Bibliografia

[ABNT] Associação Brasileira de Normas Técnicas 2017. NBR 13373: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: Abnt, 20 p.

Barros-Alves SP, Alves DFR, Bolla Junior EA, Rabet N, Hirose GL. 2016. Morphological review of the freshwater fairy shrimp *Dendrocephalus brasiliensis* Pesta, 1921 (Anostraca: thamocephalidae). Nauplius. 24(0):1-10. <http://dx.doi.org/10.1590/2358-2936e2016008>.

[CONAMA] Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. Resolução CONAMA nº 357 [Internet]. [Acesso em: 03 jan. 2022]. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res\\_conama\\_357\\_2005](https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005)

[classificacao\\_corpos\\_agua\\_rtfcd\\_a\\_ltrd\\_re\\_s\\_393\\_2007\\_397\\_2008\\_410\\_2009\\_430\\_2011.pdf](http://classificacao_corpos_agua_rtfcd_a_ltrd_re_s_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf)

Connell DW. 2014. Ecotoxicology. Reference Module In Biomedical Sciences. 3(0):1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.00213-0>.

Costa CR, Olivi P, Botta CMR, Espindola ELG. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Quim. Nova. 31(7):1820-1830.

Dana E. 2017. Adsorption of heavy metals on functionalized-mesoporous silica: a review. Microporous and Mesoporous Materials. 247(0):145-157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.03.050>.

Falavigna M, Colpani V, Stein C, Azevedo LCP, Bagattini AM, Brito Gabriela V, Chatkin JM, Cimerman S, Corradi MFB, Cunha CA. 2020. Guidelines for the pharmacological treatment of COVID-19. The task force/consensus guideline of the Brazilian Association of Intensive Care Medicine, the Brazilian Society of Infectious Diseases and the Brazilian Society of Pulmonology and Tisiology. Revista Brasileira de Terapia Intensiva. 32(2):1-31. <http://dx.doi.org/10.5935/0103-507x.20200039>.

Feng L, Van H, Eric D, Rodrigo MA, Esposito G, Oturan MA. 2013. Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review. Chemical Engineering Journal. 228(0):944-964. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.061>.

Garric J, Bernard V, Duis K, Pery A, Junker T, Ramil M, Fink G, Ternes TA. 2007. Effects of the parasiticide ivermectin on the cladoceran *Daphnia magna* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Chemosphere. 69(0):903-910.

Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. Environmental Science & Technology. 11(7):714-719.

Iannacone J, Alvaríño L. 2009. Evaluación del riesgo acuático de siete productos farmacéuticos sobre *Daphnia magna*. Ecología aplicada. 2(8):1-10.

Lopes JP, Gurgel HCB, Gálvez AO, Pontes CS 2007. Produção de cistos de “branchoneta” *Dendrocephalus brasiliensis* (Crustacea: Anostraca). Biotemas. 2(20):33-39.

Lopes RB, Souza RF, Silva-Nicodemo SCT, Cruz JVF, Medeiros GF. 2018. Ecotoxicology of sediment in the estuary of the Jundiaí and Potengi Rivers in Natal-RN, Brazil, by using *Leptocheirus plumulosus* as test-organism. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 13(2):77-84.

Maggio SA, Janney PK, Jenkins JJ. 2021. Neurotoxicity of chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon to *Daphnia magna*. *Chemosphere.* 276(0):130120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130120>.

Maselli BS, Luna LAV, Palmeira JO, Barbosa S, Beijo LA, Umbuzeiro GA, Kummrow F. 2013. Ecotoxicidade de efluentes brutos e tratados gerados por uma fábrica de medicamentos veterinários. *Revista Ambiente & Água.* 8(2):1-12.

Mezzelani M, Gorbi S, Regoli F. 2018. Pharmaceuticals in the aquatic environments: evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Marine Environmental Research.* 140(0):41-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.001>.

Montagner CC, Vidal C, Acayaba R. 2017. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Química Nova.* 40(9):1094-1110. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170091>.

Quadra GR, Souza HO, Costa RS, Fernandez MAS. 2016. Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country. *Environ Sci Pollut Res.* 24(2):1200-1218.

Sangion A, Gramática P. 2016. PBT assessment and prioritization of contaminants of emerging concern: pharmaceuticals. *Environmental Research.* 147:297-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.02.021>.

Santos LLS, Cahõ TB, Teixeira DIA, Ribeiro K, Brayner FA, Alves LC, Feitosa APS, Câmara FRA, Bezerra RS. 2019. A new process for nauplius production of the freshwater fairy-shrimp *Dendrocephalus brasiliensis* (Pesta 1921) and the effect of enzymatic and chemical treatment on hatching. *Aquaculture.* 512:734350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734350>.

Santos VSV, Campos CF, Campos Júnior EO, Pereira BB. 2018. Acute ecotoxicity bioassay using *Dendrocephalus brasiliensis*: alternative test species for monitoring of contaminants in tropical and subtropical freshwaters. *Ecotoxicology.* 27(6):635-640. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-018-1951-3>.

Veiga LF, Vital N. 2002. Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia sp.* In: IA Nascimento, ECPM, Sousa, M Nipper (ed.), Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil. Artes Gráficas e Indústria, São Paulo.p.111-122.

Verlicchi P, Aukidy MAI, Zambello E. 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment.:a review. *Science of the total Environment.* 429(0):123-155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>.