



## VI-113 - ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DO HIDROCLORIDRATO DE FLUOXETINA, UTILIZANDO ENSAIOS DE RESPIROMETRIA E TOXICIDADE

**Suzete Maria Lenzi Caminada<sup>(1)</sup>**

Graduação em Farmácia e Bioquímica Universidade São Francisco-Campus Bragança Paulista, SP, 1993 – Especialização em Administração de Empresas, Fundação Escola e Comércio Álvares Penteado, FAAP –SP, 1995 - Mestrado em Engenharia Civil, Departamento de Saneamento e Ambiente FEC/UNICAMP, 2008.

**Alexandre Nunes Ponezi<sup>(1)</sup>**

Bacharelado em Ciências Biológicas, UNIARARAS. Mestre em Engenharia de Alimentos FEA/UNICAMP; Doutorado em Engenharia Civil – Departamento de Saneamento e Ambiente FEC/UNICAMP.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas CPQBA Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. R. Alexanndre Caselatto, 999, Vila Betel, Paulínia, SP. CEP: 13140-000. e-mail: [slcaminada@gmail.com](mailto:slcaminada@gmail.com). [ponezi@cpqba.unicamp.br](mailto:ponezi@cpqba.unicamp.br)

### RESUMO

A Comissão da União Européia e o comitê científico de toxicologia, ecotoxicologia e ambiente, identificaram, a necessidade da obtenção de dados sobre os efeitos dos fármacos no ambiente. Estes compostos e seus metabólitos são introduzidos no ambiente, pelo esgoto em quantidades que superam 100 toneladas/ano. A literatura científica comenta que a presença de fármacos no ambiente é, geralmente, pequena quando comparada a outros produtos químicos. No entanto, a alta persistência de vários destes compostos e sua contínua reposição aumentam o risco de exposição crônica para os organismos aquáticos, como também para os humanos. Um destes compostos, o Hidrocloridrato de Fluoxetina, medicamento bastante utilizado no tratamento da ansiedade, distúrbios de comportamento, obesidade e bulimia nervosa, tem sido reportado como causador de distúrbios em organismos aquáticos. Os resultados obtidos demonstraram que o fármaco em estudo foi parcialmente degradado pelos organismos no sistema teste com uma remoção aproximada de 27%. Os ensaios toxicológicos indicaram que os fármacos apresentam toxicidades diferentes entre as formulações estudadas. A avaliação da toxicidade das amostras geradas pelo sistema de respirometria apresentaram uma redução na toxicidade, a medida que a biodegradação se processa. Os ensaios indicam uma possível acumulação ambiental com conseqüências prejudiciais aos organismos aquáticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biodegradação, Fluoxetina, Toxicidade-testes, Respirometria-testes, Drogas.

### INTRODUÇÃO

A Comissão da União Européia e o comitê científico de toxicologia, ecotoxicologia e ambiente em 1990, identificaram, a necessidade da obtenção de dados sobre os efeitos dos fármacos no ambiente. Foi demonstrado que alguns fármacos são comercializados em grandes quantidades no mundo em proporções maiores que 100 toneladas/ano sendo que em muitos casos estes são utilizados de forma indiscriminada.

Pesquisas foram realizadas tendo como objetivo avaliar a presença destes compostos no ambiente e os resultados mostram mais de 100 diferentes compostos farmacêuticos em águas superficiais, em diferentes partes do mundo, tendo sido detectados em concentrações de ppb e ppt (SANDERSON et al.; 2003).

Estes compostos e seus metabólitos são, predominantemente, introduzidos no ambiente, através do efluente proveniente de esgoto sanitário, agravado pelo fato que, na prática, a maioria das pessoas dispõe os fármacos não utilizados nos sistemas domiciliares de esgoto (JONES et al., 2001).

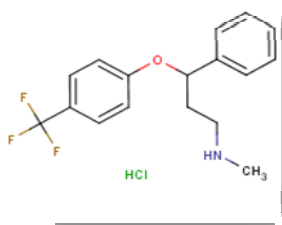
A literatura científica comenta que a presença de fármacos no ambiente é, geralmente, pequena quando comparada a outros produtos químicos. No entanto a alta persistência de vários destes compostos e sua contínua reposição aumentam o risco de exposição crônica para os organismos aquáticos como também para os humanos (DAUGHTON, 1999 e TERNES, 2001). Um destes compostos, Hidrocloridrato de Fluoxetina, medicamento bastante utilizado no tratamento da ansiedade, distúrbios de comportamento, obesidade e bulimia nervosa, tem sido reportado como um causador de distúrbios em organismos aquáticos (BROOKS et al., 2002).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina por meio de ensaio de respirometria em sistema fechado e realizar ensaios de toxicidade aguda em organismos teste.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Químico

Para a realização dos experimentos foram utilizados o Hidrocloridrato de Fluoxetina puro CAS 56296-78-7 adquirido através da Sigma com grau de pureza de >90% utilizado como padrão para as análises cromatográficas e toxicidade, e nas formulações comerciais: cápsula de 20mg (cx.c/28 comprimidos). Cada cápsula contém: cloridrato de fluoxetina 22,36 mg, equivalente a 20mg de fluoxetina. Excipientes: amido em pó e amido em pó com 5% de silicone q.s.p.(quantidade suficiente para) e medicamento genérico contendo cloridrato de Fluoxetina 22,85mg equivalente a 20mg de fluoxetina. Excipientes: amido de milho e óleo vegetal hidrogenado q.s.p. utilizados nos ensaios de respirometria e toxicidade. A Figura 1 apresenta a fórmula estrutural do Hidrocloridrato de Fluoxetina.



**Figura 1** Hidrocloridrato de fluoxetina.(Fonte:Internet- [www.scielo.br](http://www.scielo.br))

Todos os reagentes utilizados para a realização dos ensaios foram adquiridos no mercado local.

### Avaliação do potencial de biodegradação do fármaco por meio do modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade (Q'SARS).

O potencial de biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina foi avaliado pelo programa de modelagem Q'SARS utilizado pela U.S. Environmental Protection Agency (USEPA).

### Dosagem do Hidrocloridrato de Fluoxetina

O Hidrocloridrato de Fluoxetina, aplicado nos testes de respirometria e toxicidade, foram dosados respeitando o coeficiente de solubilidade ( $C_s=5\text{mg/L}$ ). As concentrações utilizadas para a realização dos ensaios foram de 250 a  $15\mu\text{g/mL}$ , onde foi avaliada a capacidade de remoção do composto pelo sistema teste. A melhor condição em relação dose do fármaco e crescimento microbiano foi determinada através de microdiluições seriadas em placa de Elisa, incubadas por 48 horas a  $28^\circ\text{C}$ .

### Biodegradação do Hidrocloridrato de fluoxetina, por ensaio de respirometria

Os ensaios de respirometria foram realizados baseado no Teste Gledhill-modificado,1988-(IBAMA) onde o fármaco foi dissolvido em meio mínimo Tabela 1, e transferido para frascos de 50 mL e incubados a  $28^\circ\text{C}$  sob agitação 110 RPM durante um período de 28 dias.

A análise quantitativa, do processo de biodegradação foi realizada pelo método HPLC/UV (USP, Ed.29, p.940, 2006) por Cromatografia líquida de alta eficiência em sistema cromatográfico LC-DAD Alliance Waters em coluna NovaPak C-8, fase móvel Acetonitrila/Trietilamina 0,07M (pH = 6, com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) detecção 230 nm. A avaliação do processo de biodegradação foi feita contra uma curva de calibração nas concentrações de 2 a  $200\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 1** – Composição do meio mínimo

Reagentes	Quantidade
Nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ )	3,0g
Fosfato diácido de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,0g
Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ )	0,5g
Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ )	0,01g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

**Avaliação do desenvolvimento microbiano durante o ensaio de respirometria.**

A avaliação do desenvolvimento microbiano durante os ensaios de respirometria foi realizada por plaqueamento das amostras geradas durante o processo em meio PCA por um período de incubação de 24 horas a 28°C.

**Avaliação da toxicidade do Hidrocloridrato de fluoxetina, por organismos-teste.**

Os testes de toxicidade aguda foram realizados com a bactéria marinha *Vibrio fischeri*, método NBR 15411-2, ABNT, 2006. Tendo como parâmetros de avaliação a perda da bioluminescência EC50 em um período de 15 minutos. As soluções do fármaco foram preparadas dissolvendo o fármaco em um volume especificado de água milliQ. Para a realização dos ensaios foram utilizados o fármaco na forma pura, comercial e formulação genérica contendo 20 mg do princípio ativo/cápsula.

**Local de realização dos experimentos**

As etapas da pesquisa proposta foram desenvolvidas na Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP, Laboratório de Saneamento e Ambiente (FEC/UNICAMP) e IPEN/USP) onde foram conduzidos os ensaios de toxicidade aguda

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****Avaliação do potencial de biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina através do modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade (Q SARS).**

O potencial de biodegradação do Hidrocloridrato de Fluoxetina foi avaliado pelo programa de modelagem Q-SARS utilizado pela U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). Segundo este modelo, o fator de bioacumulação ( $\text{FBC} = 2,4$ ) do Hidrocloridrato de Fluoxetina em organismos aquáticos é baixo. O comportamento deste fármaco em estações de tratamento de efluentes apresenta uma remoção total de 32,4% sendo que 67,6% podem ser encontrados no efluente do tratamento e apenas 0,34% do total é degradado pelo processo. Uma pequena parcela 13,3% pode ser encontrada aderida ao lodo. O modelo de fugacidade previsto pelo programa aponta que cerca de 11% desta molécula pode ser encontrada dispersa na água e 84% no solo com uma meia-vida de 2 meses. Este programa tem sido extensivamente utilizado e validado por diversos pesquisadores em seus trabalhos (MOORE et al., 2003; SANDERSON et al., 2004).

**Avaliação da biodegradação do Hidrocloridrato de fluoxetina, por ensaio de respirometria e quantificação através de CLAE(Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).**

Através da análise quantitativa utilizando a cromatografia (CLAE), foi possível avaliar a evolução do consumo do fármaco, pelos microrganismos durante o período de ensaio (28 dias), conforme demonstrado na Tabela 2.



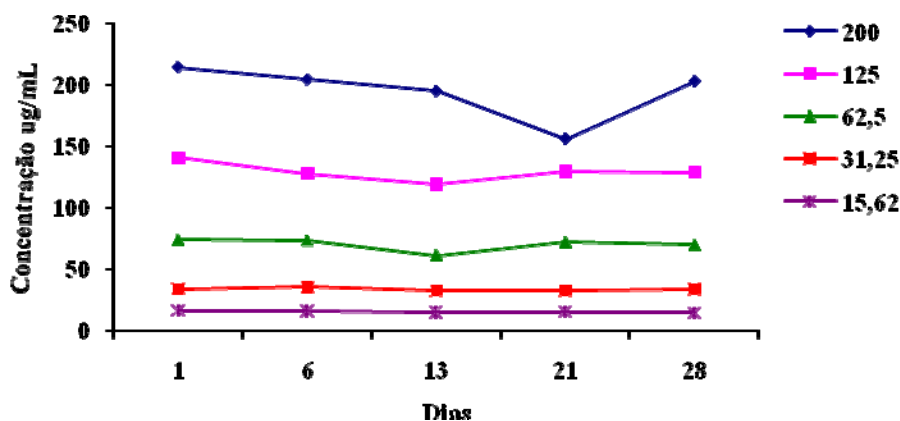
**Tabela 2** - Consumo do Hidrocloridrato de Fluoxetina, pelos microrganismos durante o ensaio de respirometria. Concentração  $\mu\text{g/mL}$ .

Amostra	Concentração inicial ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração $\mu\text{g/mL/dias}$					% remoção
		1	6	13	21	28	
1	200	214,49	204,55	195,00	155,83	203,02	27,35
2	125	140,55	127,87	119,22	129,70	129,01	7,72
3	62,5	74,07	73,63	61,28	72,20	69,82	2,52
4	31,25	33,93	35,33	32,52	32,47	33,69	4,30
5	15,62	16,33	15,96	15,05	15,27	14,63	6,49

Pode-se observar pelos resultados apresentados na Tabela 2 que o fármaco em estudo apresentou uma degradação variável dependendo da concentração inicial utilizada. Os melhores resultados foram observados em concentrações de 200  $\mu\text{g/mL}$  com redução aproximada de 27%. Concentrações mais baixas demonstram uma pequena utilização do composto com remoção média de 4,2%. Os resultados estão de acordo com o que foi predito pelo modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade (Q'SARS), onde se prevê uma degradação em torno de 32%.

Os valores iniciais observados na Tabela 2, no primeiro dia do ensaio, são decorrentes da formulação comercial utilizada na realização dos ensaios. Estas análises foram realizadas para confirmação da quantidade do princípio-ativo presentes nas formulações comerciais.

Com os dados da Tabela 2 foram obtidas as curvas da Figura 2, onde pode ser observado o processo de biodegradação. Nota-se que a partir do 21º dia de ensaio as concentrações do fármaco não sofrem alterações significativas até o 28º dia, o que demonstra que o processo de biodegradação pode ter atingido o equilíbrio. O ensaio não foi submetido a um período mais prolongado devido ao embasamento do método utilizado que prevê o ensaio por um período máximo de 28 dias para a avaliação da biodegradação.



**Figura 2** – Avaliação da biodegradação do hidrocloridrato de fluoxetina durante o período de 28 dias do ensaio respirométrico.

#### Avaliação do desenvolvimento microbiano durante o ensaio de respirometria.

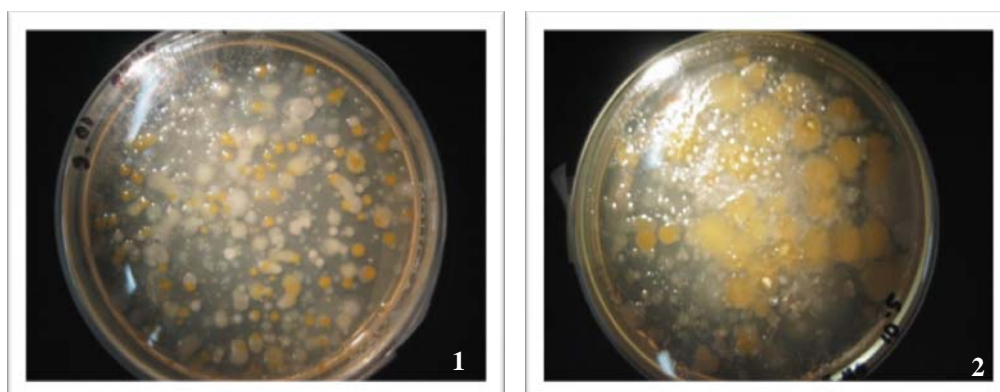
A avaliação do processo de biodegradação do fármaco indicou que durante o ensaio ocorreu uma diminuição gradativa dos microrganismos do meio medidos por plaqueamento em meio sólido, expressos em UFC (Unidade formadora de colônias). Durante este processo pode ser observado uma variação na sucessão de colônias microbianas. Os resultados indicam uma possível toxicidade do composto utilizado nos microrganismos ou estes não foram capazes de utilizar o fármaco como fonte de carbono e energia durante o processo.



Os resultados da contagem das colônias (UFC) estão colocados nos dados da Tabela 3 e na Figuras 3 que ilustra as observações realizadas na variedade de colônias durante o período experimental.

**Tabela 3** – Desenvolvimento microbiano durante o ensaio de respirometria. UFC/dia

Concentração inicial (µg/L)	Unidades formadoras de colônia (UFC)/Dias				
	1	6	13	21	28
200	$6,6 \times 10^9$	$4,6 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
125	$5,7 \times 10^9$	$3,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$0,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
62,5	$4,8 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$0,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
31,25	$7,6 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$	$0,4 \times 10^8$	$0,4 \times 10^8$
15,62	$3,1 \times 10^9$	$7,7 \times 10^9$	$0,4 \times 10^9$	$0,1 \times 10^8$	$0,1 \times 10^8$



**Figura 3** – Ilustração da diversidade microbiana observada durante o período do ensaio de respirometria. 1 = 125 µg/L, diluição:  $10^{-6}$ , leitura em 21/07/08; 2 = 125 µg/L, diluição:  $10^{-5}$ , leitura em 21/07/08.

#### Avaliação da toxicidade do Hidrocloridrato de fluoxetina.

Foi realizado teste preliminar para a avaliação da toxicidade do fármaco Hidrocloridrato de fluoxetina, utilizando-se amostras na forma comercial e medicamento genérico, na concentração de 200µg/ml, cada amostra e constituem os ensaios 01 e 02, respectivamente. Os resultados destes ensaios podem ser visualizados nas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4** – Ensaio 01 - Teste de toxicidade utilizando *Vibrio fischeri* – amostra: forma comercial

Diluições	Controle	10,23%	20,47%	40,95%	81,90%
Concentrações mg/l	Zero	20,47	40,95	81,90	163,8
I <sub>0</sub>	95	99	93	89	89
I <sub>15</sub>	95	82	60	24	05

Resultado: CE50 – 47,74% (35,13 – 64,87) – 95,48 ppm (70,26 – 129,74ppm)

**Tabela 5** – Ensaio 02 - Teste de toxicidade utilizando *Vibrio fischeri* – amostra: Medicamento genérico.

Diluições	Controle	10,23%	20,47%	40,95%	81,90%
Concentrações mg/l	Zero	20,47	40,95	81,90	163,8
I <sub>0</sub>	96	99	99	94	96
I <sub>15</sub>	94	75	60	20	0,1*

Resultado: CE50 – 37,76% (6,50 – 219,41) – 75,52 ppm (13,00 – n.d. ppm)

O valor mais adequado seria  $40,95 < CE50 < 81,90$ .

Assumindo uma luminescência na última concentração igual 0,1. Os resultados obtidos indicam que os fármacos analisados apresentam toxicidade aos organismos teste nas concentrações utilizadas, sendo que o fármaco na forma de apresentação “genérica” demonstrou ser mais tóxico.

Através da consulta no bulário, de cada uma das formas farmacêuticas, constatou-se diferença na formulação quanto à composição dos excipientes, sendo a forma comercial constituída por amido em pó e amido em pó



com 5% de silicone q.s.p e a forma genérica constituída de amido de milho e óleo vegetal hidrogenado q.s.p. As diferenças apresentadas quanto à toxicidade pode estar baseada nesta variedade de excipientes apresentada pelas formas farmacêuticas distintas. CARLSOON et al, 2005 e CARLSOON et al, 2005a, avaliaram em seus trabalhos os riscos associados aos excipientes contidos nos fármacos e que os mesmos podem apresentar efeitos tóxicos em vários organismos.

Posteriormente o ensaio foi realizado utilizando amostras geradas pelo sistema de respirometria, As soluções foram preparadas dissolvendo uma quantidade conhecida do composto, conforme resultados obtidos nas análises de CLAE e amostra do hidrocloreto de fluoxetina, com grau de pureza > 90%, na concentração inicial 200 µg/mL, solução-estoque, e procedendo as diluições conforme NBR 15411-2, ABNT, 2006a. Esses testes correspondem aos ensaios 03 a 07 apresentados nas Tabelas 6 a 10 respectivamente.

**Tabela 6** - Ensaio 03 - Fármaco comercial - 214,49µg/ml – amostra 16/07/2008.

Diluições	Controle	5,11%	10,23%	20,47%	40,95%
Concentrações µg/ml	Zero	10,96	21,94	43,91	87,83
I <sub>0</sub>	97	75	87	85	84
I <sub>15</sub>	84	54	46	27	08

Resultado: CE50 – 28,50% (23,81 - 34,11) – 61,13 ppm (51,07 – 73,16 ppm)

**Tabela 7** - Ensaio 04 - Fármaco comercial - 204,55µg/ml – amostra 21/07/2008.

Diluições	Controle	5,11%	10,23%	20,47%	40,95%
Concentrações µg/ml	Zero	10,45	20,92	41,87	83,76
I <sub>0</sub>	81	78	82	76	72
I <sub>15</sub>	55	45	42	26	08

Resultado: CE50 – 35,84% (24,83 – 51,74) – 73,31 ppm (50,79 – 105,83 ppm)

**Tabela 8** - Ensaio 05 - Fármaco comercial - 195µg/ml – amostra 28/07/2008.

Diluições	Controle	5,11%	10,23%	20,47%	40,95%
Concentrações µg/ml	Zero	9,96	19,95	39,92	79,85
I <sub>0</sub>	89	84	79	84	82
I <sub>15</sub>	58	49	42	35	16

Resultado: CE50 – 50,79% (38,59 – 66,84) – 99,04 ppm (75,25 – 130,34 ppm)

**Tabela 9** - Ensaio 06 - Fármaco comercial - 155,83µg/ml – amostra 05/08/2008.

Diluições	Controle	5,11%	10,23%	20,47%	40,95%
Concentrações µg/ml	Zero	7,96	15,94	31,90	63,81
I <sub>0</sub>	109	98	97	77	74
I <sub>15</sub>	110	98	89	56	23

Resultado: CE50 – 40,92% (30,08 – 55,67) – 63,77 ppm (46,87 – 86,75 ppm)

**Tabela 10**- Ensaio 07 - Hidrocloreto de Fluoxetina CAS 56296-78-7 adquirido através da Sigma com grau de pureza de >90% - 200µg/mL.

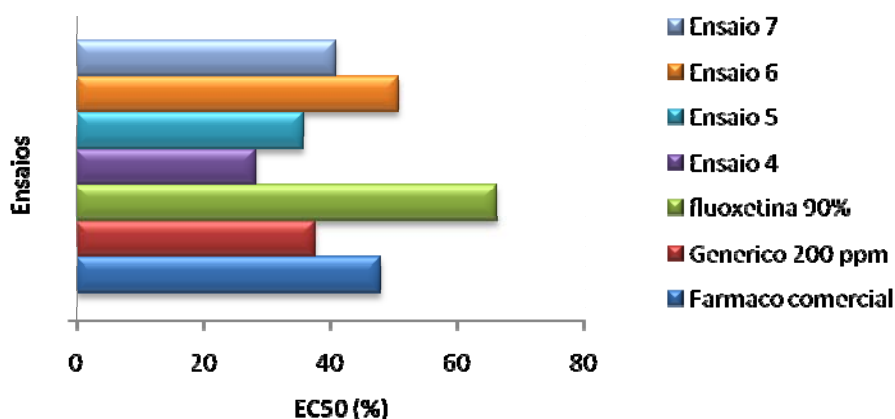
Diluições	Controle	5,11%	10,23%	20,47%	40,95%
Concentrações µg/ml	Zero	10,22	20,46	40,94	81,90
I <sub>0</sub>	101	93	96	99	99
I <sub>15</sub>	112	100	101	85	35

Resultado: CE50 – 66,24% (39,05 – 112,37) – 132,48 ppm (78,10 – 224,74 ppm)

O teste de toxicidade com a bactéria *Vibrio fischeri*, evidenciou não apenas a toxicidade do hidrocloreto de fluoxetina e a diminuição desta frente ao processo de biodegradação (ensaio de respirometria), mas também, o problema inerente ao tipo de excipiente utilizado nas várias formas farmacêuticas.

Os compostos analisados apresentaram toxicidades diferentes, sendo o medicamento genérico mais tóxico que a forma comercial e o fármaco puro (teor < 90%) que apresentou a menor toxicidade, visualizados nas Tabelas 06 a 10 e ilustrado na Figura 4.





**Figura 4** – Ensaio de toxicidade aguda (*Vibrio fischeri*) avaliando o hidrocloreto de fluoxetina puro, formulação comercial e amostras provenientes da respirometria.

## CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

O sistema de respirometria demonstrou que o fármaco em estudo foi parcialmente degradado pelos organismos no sistema teste com uma remoção aproximada de 27%.

Os ensaios toxicológicos preliminares indicaram que os fármacos apresentam toxicidades diferentes entre as formulações estudadas, sugerindo que a forte interferência na formulação do composto responsável pela toxicidade apresentada é quanto ao excipiente utilizado.

A avaliação da toxicidade das amostras geradas pelo sistema de respirometria indica uma diminuição da toxicidade à medida que a biodegradação se processa, no entanto o residual ainda apresenta valores significativos quanto aos possíveis efeitos deletérios aos organismos aquáticos.

O presente estudo procurou, com os dados obtidos, demonstrar a necessidade de novas pesquisas quanto ao desenvolvimento de processos visando minimizar a presença destes compostos ou diminuir os efeitos tóxicos que estes apresentam ao ambiente.

Deste modo, reconhece-se que um procedimento padrão para a avaliação do risco ambiental dos fármacos necessita ser desenvolvido e, deve seguir o esquema geral para os produtos químicos, onde o uso de relações matemáticas entre a estrutura química da substância e sua bioatividade sendo definido de uma maneira quantitativa (QSAR – Quantitative structure-activity relationships) associado a ensaios de toxicidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR-15411-2**: Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente) Parte 2: Método utilizando bactérias desidratadas. Rio de Janeiro, 2006.
2. BRASIL, LEIS, DECRETOS, ETC. 1996. PORTARIA NORMATIVA IBAMA Nº 84, DE 15/12/1996, DISPÕE SOBRE PROCEDIMENTOS PARA REGISTRO E AVALIAÇÃO DO PPA. PUBLICADA NO D.O.U. EM 18/10/96 E 23/10/96.
3. BROOKS, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.W., Huggett, D.B.. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. Chemosphere (in press). 2002
4. CARSLON, Carina, JOHANSSON, Anna-Karin, ALVAN, Gunnar, BERGMAN, Kerstin, KUHLE, Thomas. Are Pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. Science of the Total environment 364: 67-87. 2006a.



5. CARSLON, Carina, JOHANSSON, Anna-Karin, ALVAN, Gunnar, BERGMAN, Kerstin, KUHNER, Thomas. Are Pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part II: Environmental risk assessments of selected pharmaceutical excipients. *Science of the Total environment* 364: 88-95.2006b.
6. DAUGHTON, C.G. and Ternes, T.A.,. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environ. Health Perspect.* 107 6, pp. 907–938. 1999.
7. HENRY TB, Kwon J-W, Armbrust KL, Black MC.. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ Toxicol Chem* 23:2229–2233, 2005.
8. JONES-LEPP, T.L., Alvarez, D.A., Petty, J.D., Osemwengie, L.I., Daughton, C.G.,. Analytical chemistry for mapping trends of pharmaceutical and personal care product pollution from personal use: some current research and future needs. 10th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography, Mainz/Wiesbaden, Germany. 2001.
9. SANDERSON H.; JOHNSON D.; REITSMA J.; BRAIN R.A.; WILSON C.J.; SOLOMON K.R. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* ,39, 158–183; 2004.
10. SANDERSON H.; JOHNSON D.; WILSON C.; BRAIN, R.; SOLOMON K.R. Probabilistic hazard ASSESSMENT of environmentally ccurring pharmaceuticals acute toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicol. Lett.* 144, 383–395; 2003.
11. TERNES T. Occurrence of pharmaceuticals in surface waters (Vorkommen von Pharmaka in Gew.assern). *Wasser und Boden*; 53(4):9–14; 2001.
12. U.S. PHARMACOPHEIA. The United States Pharmacopeia, USP 29/The National Formulary, NF 22; Rockville, MD: U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., p940,2006.