INSTITUTO DE PEQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada a Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO FÁRMACO CLORIDRATO DE
FLUOXETINA E DO SURFACTANTE DODECIL SULFATO DE SÓDIO
QUANDO SUBMETIDOS A TRATAMENTO POR RADIAÇÃO IONIZANTE**

DYMES RAFAEL ALVES DOS SANTOS

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientadora:
Profa. Dra. Sueli Ivone Borrelly

SÃO PAULO

2011

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada a Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO FÁRMACO CLORIDRATO DE
FLUOXETINA E DO SURFACTANTE DODECIL SULFATO DE SÓDIO
QUANDO SUBMETIDOS A TRATAMENTO POR RADIAÇÃO IONIZANTE**

DYMES RAFAEL ALVES DOS SANTOS

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientadora:
Dra. Sueli Ivone Borrely

SÃO PAULO

2011

*Dedico este trabalho à minha mãe Maria,
meu maior exemplo de perseverança,
integridade, honestidade e amor.*

*Bendito sejas, ó Deus Criador, pela água, criatura vossa,
fonte de vida para a Terra e os seres que a povoam.
Bendito sejas, ó Pai Providente, pelos rios e mares imensos,
pela bênção das chuvas, pelas fontes refrescantes
e pelas águas secretas do seio da terra.*

*Bendito sejas, ó Deus Salvador,
pela água feita vinho em Caná,
pela bacia do lava-pés e pela fonte regeneradora do Batismo.*

*Perdoai-nos, Senhor Misericordioso,
pela contaminação das águas, pelo desperdício e pelo egoísmo
que privam os irmãos desse bem tão necessário à vida.*

*Dai-nos, ó Espírito de Deus, um coração fraterno e solidário,
para usarmos a água com sabedoria e prudência
e para não deixar que ela falte a nenhuma de vossas criaturas.*

*Ó Cristo, Vós que também tivestes sede,
ensinai-nos a dar de beber a quem tem sede.
E concedei-nos com fartura a água viva
que brota de Vosso coração e jorra para a vida eterna.*

Amém.

Oração da Campanha da Fraternidade - 2004

Agradecimentos

Agradeço à Deus, pelas pessoas e por todas oportunidades que me concedeu até este momento da minha vida.

Meus agradecimentos às duas mulheres mais importantes da minha vida, minha mãe Maria por me gerar, me criar, me educar e me amar e à minha amiga, companheira e namorada Caroline por existir e estar sempre ao meu lado nos momentos mais felizes e nos mais difíceis também. O amor que sinto por vocês duas vai além deste mundo e desta vida!

À minha orientadora Dra. Sueli Ivone Borrely, pela oportunidade que me foi dada e por todo aprendizado e amadurecimento que obtive durante os últimos anos ao seu lado.

Aos meus companheiros de laboratório, “de salinha de mestrado/doutorado e de CTR”: Van, Lê, Gabriel, Neto, Renata, Anna, Alê, Régis, Japa, Robison, Dú, Diego, Rê, Carlita, João, Bia, Mara, Cristian, Clécia, Marcelo, Renato, Amanda, Gustavo, Márcia, Michel. Ao pessoal do CQMA: Gorfo, Kim, Binho, Vanessinha, Gi, Carina, Flávia, Gisela e Gus. Vocês estão guardados dentro do meu coração, pra sempre!!

Um muitíssimo obrigado ao pessoal do acelerador de elétrons do CTR, pois sem eles não haveria a possibilidade de realizar este trabalho.

Um obrigado especial à Dra. Celina Lopes Duarte e à Doutoranda Márcia, por me ajudarem com as análises espectrofotométricas.

A todos os técnicos e funcionários do CTR que ajudaram de alguma forma para a realização deste trabalho.

A todos os meus familiares e amigos que são as pessoas mais importantes da minha vida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares por subsidiar toda esta pesquisa realizada.

Avaliação ecotoxicológica do fármaco cloridrato de fluoxetina e do surfactante dodecil sulfato de sódio quando submetidos a tratamento por radiação ionizante

Dymes Rafael Alves dos Santos

Resumo

O uso acentuado de fármacos e de produtos de higiene e cuidados pessoais por grande parcela da população e a conseqüente e contínua entrada dos mesmos no ambiente gera uma necessidade cada vez maior de se investigar a presença, o comportamento e os efeitos causados à biota aquática, bem como novas formas de tratamento para efluentes contendo tais substâncias. O cloridrato de fluoxetina é um princípio ativo utilizado em tratamentos de distúrbios depressivos e de ansiedade. Enquanto o surfactante dodecilsulfato de sódio está presente em diversos produtos de limpeza e de cuidados pessoais. O presente estudo teve como enfoque avaliar a toxicidade aguda do cloridrato de fluoxetina, dodecil sulfato de sódio bem como a mistura de ambos frente aos organismos aquáticos *Hyalella azteca*, *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*. A redução da toxicidade do cloridrato de fluoxetina e da mistura após tratamento com radiação ionizante, proveniente de acelerador industrial de elétrons, também foi objeto de estudo. Para *Daphnia similis* os valores médios de CE50_{48h} encontrados para o fármaco, o surfactante e a mistura não irradiados foram de 14,4 %, 9,62% e 13,8%, respectivamente. Após irradiação das substâncias, a dose de 5 kGy se mostrou a mais efetiva, resultando em valores médios de CE50_{48h} de 84,60% e >90 %, para o fármaco e para a mistura respectivamente. Para *Hyalella azteca* foram realizados ensaios de toxicidade aguda para coluna d'água com duração de 96 horas, cujas médias dos valores de CE50_{96h} encontradas para o fármaco, o surfactante e a mistura não irradiados foram de 5,63 %, 19,29 %, 6,27 %, respectivamente. Para o fármaco e mistura irradiados com a dose de 5 kGy, foram de 69,57% e 77,7 %, respectivamente. Para *Vibrio fischeri* os ensaios de toxicidade aguda para o fármaco não tratado e para o fármaco irradiado com 5 kGy geraram valores de CE50_{15min} de 6,9 % e 32,88 %, respectivamente. Tais resultados evidenciaram a redução da toxicidade das substâncias - teste após irradiação.

Palavras-chave: cloridrato de fluoxetina; dodecil sulfato de sódio; toxicidade; radiação ionizante.

Ecotoxicological assessment of the pharmaceutical fluoxetine hydrochloride and the surfactant dodecyl sodium sulfate after their submission to ionizing radiation treatment

Dymes Rafael Alves dos Santos

Abstract

The use of pharmaceuticals and personal care products and the consequent and continuous input of these substances in the environment generates an increasing need to investigate the presence, behavior and the effects on aquatic biota, as well as new ways to treat effluents containing such substances. Fluoxetine hydrochloride is an active ingredient used in the treatment of depressive disorders and anxiety. As the surfactant sodium dodecyl sulfate is present in many cleaning and personal care products. The present study aimed on assessing the acute toxicity of fluoxetine hydrochloride, sodium dodecyl sulfate and the mixture of both to the aquatic organisms *Hyalella azteca*, *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. Reducing the toxicity of fluoxetine and the mixture after treatment with ionizing radiation from industrial electron beam accelerator has also been the focus of this study. For *Daphnia similis* the average values of CE50_{48h} found for the non-irradiated drug, surfactant and mixture were 14.4 %, 9.62 % and 13.8 %, respectively. After irradiation of the substances, the dose 5 kGy proved itself to be the most effective dose for the treatment of the drug and the mixture as it was obtained the mean values for CE50_{48h} 84.60 % and > 90 %, respectively. For *Hyalella azteca* the acute toxicity tests were performed for water column with duration of 96 hours, the mean values for CE50_{96h} found for the drug, the surfactant and the mixture non-irradiated were 5.63 %, 19.29 %, 6.27 %, respectively. For the drug fluoxetine and the mixture irradiated with 5 kGy, it was obtained 69.57 % and 77.7 %, respectively. For *Vibrio fischeri* the acute toxicity tests for the untreated drug and the drug irradiated with 5 kGy it was obtained CE50_{15min} of 6.9 % and 32.88 % respectively. These results presented a reduction of the acute toxicity of the test-substances after irradiation.

Keywords: fluoxetine hydrochloride; sodium dodecyl sulfate; toxicity; ionizing radiation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Aspectos Gerais da Poluição Aquática	5
3.1.1. Principais Fontes de FPHCPs no Ambiente Aquático	6
3.1.2. Conceitos e aplicações da Ecotoxicologia	9
3.2. Cloridrato de fluoxetina	10
3.2.1. Ocorrência no ambiente aquático	12
3.3. Dodecil sulfato de sódio	12
3.3.1. Ocorrência no ambiente aquático	13
3.4. Efeitos de misturas	14
3.5. Principais processos para tratamento de efluentes	15
3.4.1 Tratamento por Processos Oxidativos Avançados (POAs)	16
3.4.1.1. Ozonização	18
3.4.1.2. Fotólise (UV)	19
3.4.1.3. Processo Fenton e Foto-Fenton	19
3.4.1.4. Radiação Ionizante	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Cultivo dos organismos-teste em laboratório	24
4.1.1. Água de diluição e de cultivo	24
4.1.2. Ensaio de viabilidade	25
4.1.3. Alimento	25
4.1.4. <i>Daphnia similis</i>	26
4.1.5. <i>Hyalella azteca</i>	27
4.1.6. <i>Vibrio fischeri</i>	29
4.2. Substâncias químicas analisadas	29
4.3. Análise espectrofotométrica (UV - visível)	29
4.4. Preparação das soluções-teste	30
4.4.1. Cloridrato de fluoxetina	30
4.4.2. Dodecil sulfato de sódio	30
4.4.3. Mistura do cloridrato de fluoxetina com dodecil sulfato de sódio	30
4.4.4. Irradiação das soluções-teste	31

4.5.	Ensaio de toxicidade	32
4.5.1.	Ensaio com <i>Hyalella azteca</i>	32
4.5.2.	Ensaio com <i>Daphnia similis</i>	33
4.5.3.	Ensaio com <i>Vibrio fischeri</i>	34
4.5.4.	Ensaio de sensibilidade	35
4.5.5.	Análise estatística	36
4.5.6.	Descarte de substâncias químicas e organismos-teste	36
4.6.	Avaliação da eficiência do processo por irradiação	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1.	Parâmetros físico-químicos	38
5.1.1.	pH	38
5.1.2.	Condutividade	40
5.1.3.	Oxigênio dissolvido em água	42
5.2.	Ensaio preliminar de toxicidade aguda	42
5.3.	Ensaio de toxicidade aguda	43
5.3.1.	Ensaio de toxicidade aguda com <i>Hyalella azteca</i>	44
5.3.2.	Ensaio de toxicidade aguda para <i>Daphnia similis</i>	53
5.4.	Ensaio de toxicidade aguda para <i>Vibrio fischeri</i>	61
5.5.	Ensaio de sensibilidade e carta-controle	66
5.6.	Análise espectrofotométrica	68
5.7.	Avaliação da eficiência do tratamento por radiação ionizante	70
5.8.	Cloridrato de fluoxetina e regulamentação	72
6.	CONCLUSÕES	73
7.	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
	APÊNDICES	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

Lista de Tabelas

TABELA 1. Ocorrência e concentração de fármacos detectados em diferentes países.	8
TABELA 2. pH das soluções de cloridrato de fluoxetina (10 mg.L ⁻¹) antes e após irradiação.	39
TABELA 3. pH das soluções de CF+DSS (10 mg.L ⁻¹ - 1:1) antes e após irradiação.	39
TABELA 4. Condutividade das soluções de cloridrato de fluoxetina antes e após irradiação.	41
TABELA 5. Condutividade das soluções de CF+DSS (1:1) antes e após irradiação.	41
TABELA 6. Valores de CE50 obtidos com os ensaios preliminares de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> e <i>Hyaella azteca</i>	43
TABELA 7. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina para o organismo <i>H. azteca</i>	44
TABELA 8. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda do cloridrato de fluoxetina irradiado com 5,0 kGy para o organismo <i>H. azteca</i>	44
TABELA 9. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 10,0 kGy para o organismo <i>H. azteca</i>	45
TABELA 10. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com dodecil sulfato de sódio para o organismo <i>H. azteca</i>	45
TABELA 11. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com CF+DSS (1:1) para o organismo <i>H. azteca</i>	45
TABELA 12. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com CF+DSS (1:1) irradiado com 5,0 kGy para o organismo <i>H. azteca</i>	45
TABELA 13. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina para o organismo <i>D. similis</i>	53
TABELA 14. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 5,0 kGy para o organismo <i>D. similis</i>	53
TABELA 15. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 10,0 kGy para o organismo <i>D. similis</i>	54
TABELA 16. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com dodecil sulfato de sódio para o organismo <i>D. similis</i>	54
TABELA 17. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS para o organismo <i>D. similis</i>	54
TABELA 18. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS irradiada com 5,0 kGy para o organismo <i>D. similis</i>	54
TABELA 19. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina para o organismo <i>V. fischeri</i>	61
TABELA 20. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 1,0 kGy para o organismo <i>V. fischeri</i>	62
TABELA 21. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 2,5 kGy para o organismo <i>V. fischeri</i>	62
TABELA 22. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 5,0 kGy para o organismo <i>V. fischeri</i>	62
TABELA 23. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 7,5 kGy para o organismo <i>V. fischeri</i>	63
TABELA 24. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 10 kGy para o organismo <i>V. fischeri</i>	63
TABELA 25. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com dodecil sulfato de sódio para o organismo <i>V. fischeri</i>	63

TABELA 26. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS (1:1) para o organismo <i>V. fischeri</i> .	64
TABELA 27. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS (1:1) irradiada com 5,0 kGy para o organismo <i>V. fischeri</i> .	64
TABELA 28. Redução (%) da toxicidade aguda para <i>H. azteca</i> em função da dose (kGy) aplicada.	71
TABELA 29. Redução (%) da toxicidade aguda para <i>D. similis</i> em função da dose (kGy) aplicada.	71
TABELA 30. Redução (%) da toxicidade aguda para <i>V. fischeri</i> em função da dose (kGy) aplicada.	71
TABELA 31. Classificação do CF e do DSS, para os organismos aquáticos <i>Hyaella azteca</i> , <i>Daphnia similis</i> e <i>Vibrio fischeri</i> , com base na diretiva europeia 93/67/EEC de 1993 e segundo os resultados de CE50 encontrados no presente estudo.	72

Lista de Figuras

FIGURA 1. Principais vias de inserção de FPHCPs no ambiente (modificado USEPA, 2006).	7
FIGURA 2. Estrutura molecular do fármaco cloridrato de fluoxetina.	11
FIGURA 3. Estrutura molecular do surfactante dodecil sulfato de sódio.	13
FIGURA 4. Interação direta e indireta da radiação ionizante, por feixe de elétrons (Romanelli, 2004).	22
FIGURA 5. Processo de radiólise da água e formação de radicais livres (CNEN).	23
FIGURA 6. Local de coleta da água de cultivo e de diluição, localizado no município de Salto/SP.	24
FIGURA 7. Cultivo de microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> sob aeração e iluminação constantes.	26
FIGURA 8. Cladóceros <i>Daphnia similis</i> (Fonte: www.ipen.br).	26
FIGURA 9. Cristalizador contendo organismos <i>Daphnia similis</i> .	26
FIGURA 10. Câmara de germinação com temperatura e fotoperíodo controlados.	27
FIGURA 11. Anfípoda <i>Hyalella azteca</i> (Fonte: http://cgb.indiana.edu).	28
FIGURA 12. Cristalizador contendo organismos <i>Hyalella azteca</i> .	28
FIGURA 13. Bactéria luminescente <i>Vibrio fischeri</i> . Fontes: (PNAS); (WIKI).	29
FIGURA 14. Acelerador de elétrons com esteiras automatizadas. Fonte: (IPEN).	31
FIGURA 15. Recipiente de vidro (Pyrex®) contendo solução-teste para ser irradiada.	32
FIGURA 16. Sistema utilizado para incubação de amostras durante os ensaios com <i>Hyalella azteca</i> .	33
FIGURA 17. Sistema utilizado para incubação de amostras durante os ensaios com <i>Daphnia similis</i> .	34
FIGURA 18. Reagente que contém bactéria <i>Vibrio fischeri</i> (produto liofilizado).	35
FIGURA 19. Equipamento Microtox®, utilizado para determinação de bioluminescência em <i>Vibrio fischeri</i> .	35
FIGURA 20. Bombona de 20 L contendo substâncias químicas para descarte.	36
FIGURA 21. Média dos valores de pH das soluções de cloridrato de fluoxetina (10 mg.L^{-1}), irradiadas com diferentes doses.	40
FIGURA 22. Média dos valores de condutividade das soluções de CF (10 mg.L^{-1}), irradiadas com diferentes doses.	42
FIGURA 23. Percentual de sobrevivência do organismo <i>Hyalella azteca</i> nos ensaios de toxicidade aguda com o fármaco cloridrato de fluoxetina não irradiado.	46
FIGURA 24. Percentual de sobrevivência do organismo <i>Hyalella azteca</i> nos ensaios de toxicidade aguda com o fármaco cloridrato de fluoxetina irradiado com 5 kGy.	46
FIGURA 25. Percentual de sobrevivência do organismo <i>Hyalella azteca</i> nos ensaios de toxicidade aguda com o fármaco cloridrato de fluoxetina irradiado com 10 kGy.	47
FIGURA 26. Variação da $CE_{50\%h}$ do cloridrato de fluoxetina para <i>H. azteca</i> em função da dose aplicada (kGy).	47
FIGURA 27. Percentual de sobrevivência do organismo <i>Hyalella azteca</i> nos ensaios de toxicidade aguda com dodecil sulfato de sódio não irradiado.	48
FIGURA 28. Percentual de sobrevivência do organismo <i>Hyalella azteca</i> nos ensaios de toxicidade aguda com a mistura (CF + DSS) (1:1) não irradiada.	49
FIGURA 29. Percentual de sobrevivência do organismo <i>Hyalella azteca</i> nos ensaios de toxicidade aguda com a mistura (CF + DSS) (1:1) irradiada com 5,0 kGy.	49
FIGURA 30. Variação da $CE_{50\%h}$ do CF, do DSS e da mistura CF+DSS para <i>H. azteca</i> .	50
FIGURA 31. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com	

o fármaco cloridrato de fluoxetina não irradiado para <i>Daphnia similis</i>	55
FIGURA 32. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com o fármaco cloridrato de fluoxetina irradiado com 5,0 kGy para <i>Daphnia similis</i>	55
FIGURA 33. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com o fármaco cloridrato de fluoxetina irradiado com 10 kGy para <i>Daphnia similis</i>	56
FIGURA 34. Variação da CE50 _{48h} do CF para <i>D. similis</i> em função da dose aplicada (kGy).	56
FIGURA 35. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com o surfactante dodecil sulfato de sódio para <i>Daphnia similis</i>	57
FIGURA 36. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS (1:1) para <i>Daphnia similis</i>	57
FIGURA 37. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS (1:1) irradiada com 5,0 kGy para <i>Daphnia similis</i>	58
FIGURA 38. Variação da CE50 _{48h} do cloridrato de fluoxetina, do dodecil sulfato de sódio e da mistura CF+DSS para <i>D. similis</i>	59
FIGURA 39. Variação da CE50 _{15min} do cloridrato de fluoxetina para <i>V. fischeri</i> em função da dose aplicada (kGy).	65
FIGURA 40. Variação da CE50 _{15min} do CF, do DSS e da mistura CF+DSS, irradiada e não irradiada para <i>V. fischeri</i>	66
FIGURA 41. Carta controle dos ensaios de sensibilidade com KCl para <i>Daphnia similis</i>	67
FIGURA 42. Carta controle dos ensaios de sensibilidade com KCl para <i>Hyalella azteca</i>	67
FIGURA 43. Carta controle dos ensaios de sensibilidade com fenol para <i>Vibrio fischeri</i>	67
FIGURA 44. Espectro de absorção (UV – visível) das soluções de cloridrato de fluoxetina, irradiadas e não irradiadas.	68
FIGURA 45. Espectro das soluções de dodecil sulfato de sódio e da mistura (CF +DSS) irradiada e não irradiada.	69

1. INTRODUÇÃO

Enquanto maior representante do ambiente aquático, o mar tem sido considerado um “cemitério natural” de lixo e resíduos contaminados, pelo menos até o fim da década de 1950, principalmente em função de sua própria vastidão, a qual sobrepujaria a capacidade humana de alterá-lo e despojá-lo. Porém, há algum tempo o homem, gerenciador dos recursos naturais da Terra, tem demonstrado através de suas próprias ações que esta concepção é ingênua, se não equivocada (Carson, 2010).

O ambiente aquático tem sido ao longo dos tempos um dispersor de substâncias com potencial tóxico a saúde humana. Porém, seu poder de autodepuração tem se mostrado cada vez menor, frente a quantidade de poluentes produzidos pelas diversas atividades antrópicas desenvolvidas.

Por outro lado, a farmacologia, enquanto ciência responsável por estudar os fármacos sob todos os seus aspectos se tornou ao longo do tempo uma prática imprescindível à humanidade. Apesar de ser um termo relativamente novo, há registros no Egito datados de 1500 anos a.C., de preparações de drogas com finalidades curativas, época a que também corresponde o *Papyrus Ebers*, uma das mais antigas compilações de receitas farmacêuticas (Benton, 1967).

Nos últimos 50 anos, o crescimento populacional decorreu em um ritmo sem precedentes, com a população mundial atualmente totalizando sete bilhões de pessoas. Tal crescimento ocasionou um grande impacto na saúde pública, o que torna as implicações para o futuro também preocupantes. Considerando o forte impacto da população sobre a disponibilidade de serviço e recursos naturais, o crescimento populacional permanecerá como um fator crítico para a saúde pública global (Haddock *et al.*, 2008).

O aumento das preocupações na área da saúde ocorre simultaneamente ao crescimento constante da produção industrial de produtos de cuidados pessoais e também de produtos farmacêuticos, destinados a reduzir riscos e combater as diversas enfermidades que assolam a humanidade.

Ao final do século XIX a indústria farmacêutica já se encontrava bem estabelecida e com grandes perspectivas de crescimento. A produção em larga escala e a facilidade de obtenção deu origem ao uso indiscriminado de fármacos e de produtos de higiene e cuidado pessoal (FPHCPs). Tal atividade passou a ser um costume amplamente difundido na sociedade urbana.

Em virtude da oferta, uso e descarte, ocorreu também ao longo dos anos um aumento da quantidade de efluentes contendo FPHCPs, bem como um aumento significativo dessas substâncias em corpos hídricos (Mittal & Garg, 1994).

Dentre as diversas substâncias químicas desenvolvidas, o grupo dos fármacos e dos surfactantes merece destaque em função de sua ampla comercialização, dos efeitos que geram a organismos aquáticos e da presença em vários compartimentos ambientais.

O fármaco cloridrato de fluoxetina (CF), mundialmente conhecido pelo nome comercial Prozac[®] foi o primeiro medicamento desenvolvido e comercializado da categoria de fármacos destinados ao tratamento de enfermidades mentais (Eli Lilly & CO., 2011). O CF geralmente é adotado como droga psicotrópica em tratamentos de transtornos depressivos e de ansiedade em geral, modificando alguns mecanismos do Sistema Nervoso Central (Andrade *et al.*, 2004).

Dentre os inúmeros surfactantes aniônicos existentes, o dodecil sulfato de sódio (DSS) se destaca por ser amplamente utilizado como emulsificante em produtos domésticos, tais como cosméticos, produtos para a higiene pessoal (xampus e sabonetes) e produtos de limpeza (detergentes) (Piveli & Kato, 2006).

Sabe-se que muitos grupos de substâncias químicas quando presentes na água, mesmo em concentrações baixas, são potencialmente tóxicos, tanto ao bem estar dos diversos ecossistemas aquáticos e terrestres quanto à saúde humana.

A crescente presença de FPHCPs no ambiente aquático ocorre por meio de efluentes domésticos, sob a forma de esgoto não tratado ou até mesmo após passar por estações de tratamento de esgoto (ETEs) (Daughthon, 2004). Segundo Bila & Dezotti (2003) os fármacos atingem as águas após excreção pelo organismo humano, por meio da urina e fezes, dependendo das características físico-químicas da substância administrada. No entanto, efluentes industriais contendo estas substâncias também são fontes que tem de ser consideradas, bem como o descarte de medicamentos em lixo comum.

Admitindo-se a necessidade de aprimorar tratamentos para efluentes críticos, novos processos de oxidação são desenvolvidos continuamente, tais como Foto-Fenton (FeSO_4), fotocatalítico (Energia solar + TiO_2), dentre outros (Romanelli, 2004).

Atualmente, uma promissora tecnologia para tratamento de efluentes tem sido o emprego da radiação ionizante durante o pré-tratamento de efluentes muito tóxicos a fim de aumentar a biodegradabilidade do mesmo (Borrely *et al.*, 2000), pois considera-se que efluentes muito tóxicos podem afetar todo o sistema de tratamento por lodos ativados de

uma ETE.

A ecotoxicologia aquática, bem como os diferentes campos da ecotoxicologia, envolve conhecimentos de diversas áreas da ciência, como análises químicas e estatísticas, aliadas a resposta biológica obtida por ensaios com organismos vivos, caracterizando assim, uma multidisciplinaridade e funcionalidade para avaliar e caracterizar a ocorrência de possíveis efeitos biológicos em diferentes condições ambientais (Rand *et al.*, 1995).

Uma das principais ferramentas da Ecotoxicologia, a toxicidade, baseia-se em resultados obtidos a partir de ensaios biológicos com organismos-teste expostos a determinadas substâncias químicas ou a amostras ambientais. A toxicidade é a resposta de um organismo a uma dose de determinada toxina, que é mantida acima de uma concentração limiar por um período de exposição pré-determinado. A resposta biológica é a soma de todos os estresses a que o organismo é submetido, bem como a capacidade de compensação desse organismo. Os ensaios de toxicidade podem ser realizados na forma estática, semi-estática, em fluxo contínuo ou em campo. Na forma estática não há renovação da solução-teste durante o ensaio. A forma semi-estática é caracterizada pela renovação periódica da solução-teste enquanto que a forma de fluxo contínuo emprega o fluxo contínuo das diluições do efluente para os frascos-teste, durante todo o experimento (Borrely, 2001; Romanelli, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Estudar o potencial da radiação para a redução da toxicidade do fármaco cloridrato de fluoxetina e do mesmo na presença de dodecil sulfato de sódio a organismos aquáticos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade aguda do cloridrato de fluoxetina, do dodecil sulfato de sódio e da mistura CF+DSS (1:1) para *Hyalella azteca*, *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*.
- Observar a redução da toxicidade aguda do cloridrato de fluoxetina e da mistura CF+DSS (1:1), após exposição a radiação ionizante, proveniente do acelerador industrial de elétrons, com definição de doses e condições de irradiação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos Gerais da Poluição Aquática

A água é um elemento essencial à vida e representa o principal constituinte de todos os organismos vivos da Terra. Tais características a tornam um bem de extrema importância, se não o mais importante, para a manutenção do equilíbrio ecológico e ambiental de todo o planeta e consequentemente para a sobrevivência da humanidade.

Diversas atividades desenvolvidas pelo homem são realizadas no ambiente aquático ou dependem diretamente dele para seu desenvolvimento tais como o abastecimento público de água, geração de energia, irrigação, navegação e aquicultura (Sperling, 1993).

Alguns especialistas indicam o mau gerenciamento como o principal motivo para uma possível crise da água em um futuro próximo, deixando em segundo plano a escassez e estresse do ambiente aquático como fatores principais para tal (Rogers *et al.*, 2006). Outros estudos apontam tal crise como um resultado do agravamento de diversos problemas ambientais ligados diretamente ao desenvolvimento social mundial (Gleick, 2000).

O crescimento demográfico global exacerbado é uma das principais causas do aumento dos níveis de poluição ambiental, seja ela relacionada ao ar, solo ou água. Com o aumento do número de pessoas que habitam o planeta, é cada vez mais notável a pressão que as atividades antropogênicas geram sobre o ambiente, principalmente as que estão diretamente ligadas à produção em larga escala, utilizada para suprir as diversas necessidades do homem moderno.

As atitudes comportamentais do homem geralmente têm uma tendência em sentido contrário à manutenção do equilíbrio ambiental, pois o consumo desenfreado de energia e de recursos naturais bem como as altas taxas de emissão de poluentes desestabiliza as condições de equilíbrio ecológico, muito além da capacidade de autodepuração da natureza (Moraes & Jordão, 2002).

Neste contexto há um número crescente de áreas contaminadas pela introdução de substâncias ou resíduos químicos nos diferentes compartimentos ambientais (ar, solo, água, sedimentos, entres outros) (CETESB, 2011a).

Além disso, os poluentes ou contaminantes podem ser transportados, propagando-se por diferentes vias, como o ar e águas subterrâneas e superficiais, alterando suas características naturais de qualidade e determinando impactos negativos e/ou riscos

sobre os bens a proteger.

Segundo a Política Nacional do Meio Ambiente (Lei 6.938/81), são considerados bens a proteger: 1) a saúde e o bem-estar da população; 2) a fauna e a flora; 3) a qualidade do solo, das águas e do ar; 4) os interesses de proteção à natureza/paisagem; 5) a ordenação territorial e planejamento regional e urbano; 6) a segurança e ordem pública (CETESB, 2011).

Geralmente os resíduos que adentram o ambiente aquático possuem características físico-químicas que lhes conferem o título de substâncias tóxicas, como exemplo tem-se que o lançamento de esgotos domésticos, com ou sem tratamento prévio, em ambientes aquáticos afeta a qualidade da água do sistema receptor, provocando a redução do oxigênio dissolvido, aumento da turbidez, mudanças do pH, entre outros efeitos, com reflexos sobre a manutenção das condições ideais para a sobrevivência dos organismos bem como para a saúde humana (Carreira *et al.*, 2001).

Os problemas mais graves ligados à perda da qualidade de corpos hídricos ocorrem principalmente em função de: esgotos domésticos tratados de forma inadequada ou lançados sem prévio tratamento; de controles inadequados de efluentes industriais; da poluição e perda de nascentes e bacias de captação de água para consumo; da escolha de localização inadequada para instalações industriais; disposição inadequada de resíduos sólidos; da mineração; do desmatamento; da agricultura migratória sem controle e/ou planejamento e de práticas agrícolas deficientes entre outros (Borrely, 2001; Moraes & Jordão, 2002).

3.1.1. Principais Fontes de FPHCPs no Ambiente Aquático

A produção intensa de poluentes acentua a necessidade de separação e classificação dos diversos contaminantes quanto à sua fonte produtora, sua persistência ambiental e seu destino final.

O constante monitoramento de ambientes aquáticos aliado ao desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis possibilita a detecção de micropoluentes tais como os fármacos e produtos de higiene e cuidados pessoais (FPHCPs), mesmo que encontrados em baixas concentrações (ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$).

Esses micropoluentes, também chamados de poluentes emergentes, passaram a ser abordados em uma categoria separada, que recebeu recentemente o nome de FPHCPs, apesar de encontrar-se no ambiente há décadas (USEPA, 2010). Uma vez que as implicações de sua presença principalmente no ambiente aquático não são completamente

conhecidas, os FPHCPs vem despertando o interesse da comunidade científica do mundo todo (Kümmerer, 2004).

Levando-se em consideração a falta de tratamento adequado das águas residuárias ou até mesmo a inexistência do mesmo em grande parcela dos centros urbanizados, constatou-se que quanto mais água for utilizada, maior será a quantidade de água residuária devolvida aos mananciais de superfície, e consequentemente, maior e mais rápida será a sua deterioração (Archela *et al.*, 2003).

De acordo com a USEPA (2006), dentre as diversas atividades desenvolvidas pelo homem, as principais responsáveis pela geração de resíduos farmacêuticos e de produtos de higiene e cuidados pessoais são aquelas ligadas à produção industrial, ao ambiente domiciliar e aos ambientes hospitalares (FIGURA 1).

FIGURA 1. Principais vias de inserção de FPHCPs no ambiente (modificado USEPA, 2006).

Atualmente já é possível encontrar no endereço eletrônico da USEPA uma ampla gama de referências da literatura científica com diversas informações sobre resíduos, fontes em potencial, ocorrência no ambiente, efeitos a biota e degradação de FPHCPs (USEPA, 2010). Diversos fármacos de diferentes classes terapêuticas já foram

detectados em concentrações muito baixas (ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$), em regiões distintas (TABELA 1).

TABELA 1. Ocorrência e concentração de fármacos detectados em diferentes países.

Fármaco	Concentração média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Matriz/País	Referência
Ácido Acetilsalicílico ⁸	0,22	Efluente ETE/Alemanha	Ternes, 1998
Amoxicilina ¹	0,013	Esgoto bruto/Itália	Castiglioni et al., 2006
Atenolol ²	0,30	Esgoto bruto/Suécia	Bendz et al., 2005
Betaxolol ²	0,057	Efluente ETE/Alemanha	Ternes, 1998
Bezafibrato ³	1,2	Esgoto bruto/Brasil	Stumpf et al., 1999
Bisoprolol ²	0,057	Efluente ETE/Alemanha	Ternes, 1998
	1,0	Efluente ETE/Grécia	Andreozzi et al., 2003
	2,1	Efluente ETE/Alemanha	Ternes, 1998
Carbamazepina ⁴	0,25	Água superficial/Alemanha	
	0,03 – 0,25	Água superficial/Suíça	Mol et al., 2000
	0,1 – 0,8	Efluente ETE/Suíça	
	0,20	Efluente ETE/Alemanha	Ternes, 1998
	1,62	Efluente ETE/França	Andreozzi et al., 2003b
Cetoprofeno ⁵	0,02 – 0,3	Água superficial/Espanha	Farré et al., 2001
	0,02 – 0,87	Efluente ETE/Espanha	
	0,35	Esgoto bruto/Finlândia	Lindqvist et al., 2005
	0,02 – 0,06	Água superficial/Brasil	Stumpf et al., 1999
	0,15	Água superficial/Alemanha	Ternes, 1998
Diclofenaco ⁵	0,47 – 5,45	Efluente ETE/Itália	Andreozzi et al., 2003b
	0,81	Efluente ETE/Alemanha	Ternes, 1998
	0,053	Efluente ETE/Alemanha	Ternes et al., 2001
Diazepam ⁴	0,13 – 2,13	Água natural/Itália	Calamari et al., 2003
	0,033	Efluente ETE/Alemanha	Ternes et al., 2001
17 α -etinilestradiol ⁶	0,073	Água superficial/EUA	Kolpin et al., 2002
	0,1	Água natural/EUA	Kolpin et al., 2002
Eritromicina ¹	0,15	Água superficial/Alemanha	
	2,5	Efluente ETE/Alemanha	Hirsch et al., 1999
	0,013 – 0,018	Água superficial/Espanha	
	0,022	Água superficial/Espanha	Alonso et al., 2010
Fluoxetina ⁷	0,008 – 0,044	Água superficial/Espanha	
	0,79	Efluente ETE/Canadá	Gagné et al., 2006
	0,01	Água superficial/Brasil	Stumpf et al., 1999
Ibuprofeno ⁵	2 – 81	Efluente ETE/Suíça	Buser et al., 1999
	0,087	Água superficial/Canadá	Winkler et al., 2001
Lincomicina ¹	0,013	Efluente ETE/Taiwan	Lin et al., 2008
	0,030	Efluente ETE/Suécia	Bendz et al., 2005
Propranolol ²	0,17	Água superficial/Alemanha	
	0,012	Efluente ETE/Alemanha	Ternes, 1998
Naproxeno ⁵	4,7	Esgoto bruto/Espanha	Santos et al., 2005
Sulfametoxazol ¹	0,05	Água superficial/EUA	Stackelberg et al., 2004
	0,010	Água superficial/Itália	Calamari et al., 2003
Tetraciclina ¹	1,2 – 4,2	Água superficial/Alemanha	Mulroy, 2001

1-antibiótico; 2- β -bloqueador; 3-antipênico; 4-anticonvulsivante; 5-antiinflamatório; 6-hormônio contraceptivo; 7-antidepressivo; 8-analgésico (Bila, 2005; Bautitz, 2010).

Estes resíduos farmacêuticos já foram detectados nos diferentes compartimentos ambientais como águas superficiais, efluentes de ETE e esgoto bruto. No entanto, já existem trabalhos na literatura científica sobre a ocorrência de fármacos residuais também em águas subterrâneas (Dougherty *et al.*, 2010; Fram & Belitz, 2011; Vulliet & Olivé, 2011), em sólidos em suspensão, lodos ativados e sedimentos (Sarmah *et al.*, 2006; Nieto *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011) e em água potável (Ternes *et al.*, 2001; Dougherty *et al.*, 2010; Shen & Andrews, 2011; Fram & Belitz, 2011). Fármacos residuais foram encontrados também no ártico (Kallenborn *et al.*, 2008 *apud* Bautitz, 2010).

3.1.2. Conceitos e aplicações da Ecotoxicologia

Para se entender o significado de Ecotoxicologia, é necessário que se tenha previamente claro o significado e objetivos da Ecologia e da Toxicologia.

A Ecologia é a disciplina que se ocupa das relações entre os seres vivos e o ambiente. Pode ser também conceituada como o estudo do aproveitamento e da distribuição da energia no sistema. Já a Toxicologia estuda os efeitos adversos de determinada substância num dado organismo e procura clarear o mecanismo de ação tóxica no mesmo. Embora sejam duas ciências com estruturas e direcionamentos distintos, ambas estão ligadas aos problemas de poluição ambiental (Zagatto & Bertoletti, 2008).

A Ecotoxicologia começou a ser desenvolvida na década de 70, por toxicologistas que tinham grande interesse no meio ambiente (Truhaut, 1977), que adotaram a aplicação dos princípios básicos desta ciência como análise de testes experimentais, de relações dose-efeito e estimativa de concentrações que causam efeito, tais como a concentração efetiva que gera efeito a 50% dos organismos expostos dentro de um determinado período (EC50).

Em 1976, a definição de Ecotoxicologia foi publicada em monografia pelo Comitê Científico do ICSU sobre problemas ambientais (SCOPE) e ficou definida como a “ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado” (Plaa, 1982; Cairns & Niederlehner, 1995 *apud* Zagatto & Bertoletti, 2008).

Na década de 90, muitas tentativas foram feitas para integrar mais as questões ecológicas junto à Ecotoxicologia, mas ao mesmo tempo mantendo-se a força dos ensaios experimentais, seja usando uma única espécie, seja usando comunidades ou microcosmos.

Normas ambientais para substâncias tóxicas continuam a se basear em valores totais, ao invés de valores referentes à biodisponibilidade. A análise da interferência causada nas diversas cadeias alimentares nunca foi realmente utilizada para o desenvolvimento de regulamentações e testes de toxicidade de ciclo de vida são raramente utilizados para o estabelecimento de padrões. Porém, algumas mudanças já se fazem visíveis resgatando mais a Ecologia dentro da Ecotoxicologia, tais como a aceitação de ensaios de várias espécies como válidos instrumentos de regulamentação e o uso de “endpoints” funcionais (produção primária, decomposição), além de sobrevivência, crescimento e reprodução (Straalen, 2003).

Muitos trabalhos e manuais já documentaram os diversos tipos de ensaios que tem sido desenvolvidos ao longo dos anos, porém a importância e o papel da Ecotoxicologia vão muito além da simples coleta de dados experimentais (Straalen, 2003).

Ainda há muito trabalho a ser feito, uma vez que o monitoramento de locais poluídos, avaliação dos riscos gerados aos diversos ecossistemas por novas substâncias químicas e a redução de cenários de contaminação ainda exigem um esforço considerável e também o desenvolvimento de novas tecnologias.

3.2. Cloridrato de fluoxetina

A descoberta no final da década de 50 de drogas antidepressivas e sua utilização na prática clínica trouxeram um avanço importante no tratamento e no entendimento de possíveis mecanismos subjacentes aos transtornos depressivos. Tornou a depressão um problema médico passível de tratamento, semelhante a outras doenças como o diabetes e a hipertensão arterial (Moreno *et al.*, 1999).

O cloridrato de fluoxetina (cloridrato de N-metil- γ -[4-(trifluorometil) fenoxi]-benzenopropanamina) de fórmula molecular $C_{17}H_{18}F_3NOHCl$ (FIGURA 2), é uma substância utilizada em fármacos psicotrópicos para tratamento de enfermidades mentais, modificando alguns mecanismos do Sistema Nervoso Central (SNC) (Andrade *et al.*, 2004).

FIGURA 2. Estrutura molecular do fármaco cloridrato de fluoxetina.

Mundialmente, o cloridrato de fluoxetina (CF) é conhecido pelo nome comercial Prozac[®], por ter sido o primeiro desta categoria a ser desenvolvido e comercializado (Wong *et al.*, 1995).

Em 1974, o CF foi descrito pela primeira vez na literatura científica como um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) na fenda sináptica e posteriormente, em 1987, reconhecido pela United States Food and Drug Administration (USFDA) como um método adequado para tratamento, em adultos, de Transtorno Depressivo Maior (TDM), Transtorno Obsessivo Compulsivo (TOC), Bulimia Nervosa e Transtorno do Pânico. Este fármaco também é aprovado pela USFDA para uso pediátrico no tratamento de TDM (8 a 18 anos de idade) e TOC (7 a 17 anos de idade) (Eli Lilly & CO., 2011).

Os diferentes fármacos antidepressivos atuam geralmente produzindo um aumento na concentração de neurotransmissores na fenda sináptica através da inibição do metabolismo, bloqueio de recaptura neuronal ou atuação em autoreceptores pré-sinápticos (Butler, & Jeffries, 1999). Os ISRSs possuem grande afinidade pelo bloqueio das proteínas de recaptação da serotonina, resultando em potencialização da neurotransmissão serotoninérgica (Aguilar *et al.*, 2011). Esta classe de fármacos também permite que ocorra uma permanência da atividade da serotonina em alguns receptores pós-sinápticos, facilitando a elevação do humor (Wong *et al.*, 2005; Baldessarini, 2003).

O CF difere dos outros fármacos de sua classe por possuir a norfluoxetina, um metabólito de ação prolongada, farmacologicamente ativo e que apresenta atividade clínica significativa (inibição da recaptação de serotonina e inibição de isoenzimas do citocromo P

450). A norfluoxetina é reportada na literatura como mais potente e mais persistente do que sua molécula progenitora, a fluoxetina (Fong & Molnar, 2008). A meia-vida prolongada da fluoxetina e da norfluoxetina e o tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio, apresentam como significado clínico a maior latência para o início da ação antidepressiva (Goodnick & Goldstein, 1998).

3.2.1. Ocorrência no ambiente aquático

Há algum tempo os resíduos de fármacos e produtos de higiene e cuidados pessoais (FPHCPs) são destinados às ETEs e liberados em corpos hídricos receptores como rios, lagos e oceanos (Ternes *et al.*, 1999; Kolpin *et al.*, 2002; Billa & Dezotti, 2003; Daughton, 2004; Alonso *et al.*, 2010).

Um número crescente de trabalhos na literatura científica tem identificado cada vez mais FPHCPs lançados em águas residuais (Kolpin *et al.* 2002), e em biossólidos (Lepp & Stevens, 2007). Dentre eles, o fármaco fluoxetina foi detectado em águas de córregos em concentrações de $0,012 \mu\text{g.L}^{-1}$ nos Estados Unidos (Kolpin *et al.* 2002) e em efluentes de esgoto no Canadá na concentração $0,099 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Metcalf *et al.*, 2003), bem como nos tecidos de peixes que habitam rios (Brooks *et al.*, 2005; Ramirez *et al.*, 2007).

Na Espanha, Alonso *et al.* (2010) detectaram alguns fármacos psicotrópicos e seus metabólitos, dentre eles a fluoxetina, na água de rios importantes da região metropolitana de Madri, à montante e à jusante de ETEs, demonstrando não somente a presença destes fármacos, como também uma deficiência na remoção completa dos mesmos do ambiente aquático. No entanto, hoje ainda há uma carência, mesmo nos países desenvolvidos, quanto à legislações que identifiquem e pontuem quantidades e níveis “seguros” de fármacos no ambiente aquático.

3.3. Dodecil sulfato de sódio

Os surfactantes constituem uma classe importante de substâncias químicas amplamente utilizadas, em diversos setores industriais e domiciliares, como detergentes, emulsificantes, lubrificantes, solubilizantes e dispersantes (Nitschke & Pastore, 2002).

Surfactantes são compostos orgânicos que possuem comportamento anfifílico, isto é, possuem duas regiões, hidrofóbica e hidrofílica. A parte hidrofóbica do surfactante geralmente é composta de cadeias alquílicas ou alquilfenílicas, contendo de 10 a 18 átomos de carbono (Penteado *et al.*, 2006). A região hidrofílica é constituída por grupos iônicos ou não-iônicos ligados à cadeia carbônica. Entre as consequências importantes da referida

estrutura anfifílica, podem-se destacar a adsorção nas interfaces, por ex., solução/ar, e a formação de diferentes estruturas coloidais, micelas, cristais líquidos liotrópicos, vesículas, entre outras (Singer & Tjerdema, 1993). Tais propriedades são à base de uma gama de aplicações importantes, por exemplo, na formulação de agroquímicos, fármacos e produtos de consumo (xampus e condicionadores), no combate de vazamento de petróleo e, ainda, em alguns usos específicos (Mulqueen, 2003; Ramachandran *et al.*, 2004 *apud* Penteado *et al.*, 2006).

O dodecil sulfato de sódio (DSS) (FIGURA 3), de fórmula molecular $C_{12}H_{25}SO_4Na$, é um surfactante aniônico, geralmente uma mistura entre sulfatos de sódio alquilados, principalmente o lauril, que reduz a tensão superficial de soluções aquosas e é amplamente utilizado como emulsificante de gorduras e também utilizado em produtos de uso doméstico, tais como cosméticos e produtos para a higiene pessoal, como pastas de dente, xampus, cremes de barbear, algumas aspirinas solúveis, espumas de banho e produtos de limpeza. Este surfactante também pode ser encontrado como excipiente em produtos farmacêuticos e também é utilizado como ferramenta de pesquisa em bioquímica de proteínas (Piveli & Kato, 2006).

FIGURA 3. Estrutura molecular do surfactante dodecil sulfato de sódio.

3.3.1. Ocorrência no ambiente aquático

O principal surfactante aniônico sintético surgiu na década de 40, o alquilbenzeno sulfonato (ABS), a partir de precursores derivados do petróleo (benzeno e tetramero de propileno). O ABS teve grande aceitação no mercado de detergentes devido ao melhor desempenho quando comparado ao do sabão, sendo consumido mundialmente em larga escala. Contudo, o uso indiscriminado deste produto e a falta de tratamento de esgoto doméstico nas regiões urbanas, provocam a formação de espumas nas águas dos rios. Nas ETEs, camadas densas destas espumas também dificultam os processos de aeração nos tanques de tratamento de efluentes, e são capazes de transportar inúmeros poluentes e bactérias a longas distâncias (Penteado *et al.*, 2006).

O rio Tietê, um dos principais rios situados em uma zona econômica

importante do estado de São Paulo, Brasil, possui grande extensão e por isso recebe o aporte de grande descarga indiscriminada de esgotos, ao longo de praticamente todo seu curso, sofrendo um forte impacto antropogênico. Parte da extensão desse rio tem apresentado uma quantidade elevada de espumas provenientes de produtos de limpeza (Theraulaz, *et al.*, 2001 *apud* Penteado *et al.*, 2006).

Além da questão estética, as espumas formadas têm acarretado problemas ambientais graves, tais como a dispersão de poluentes pelos ventos espalhando produtos tóxicos a grandes distâncias, a aeração pobre do lodo ativado impedindo a floculação do material particulado mais pesado e o processo normal de decantação (Theraulaz, *et al.*, 2001 *apud* Penteado *et al.*, 2006).

Em 1984, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) deu início à investigação das possíveis causas sobre a formação de espumas no rio Tietê e em virtude deste contexto, a presença de detergentes com baixa biodegradabilidade tem sido apontada como a principal fonte poluidora.

A legislação brasileira apresenta o decreto nº 79094 de 1977, que proíbe a fabricação, comercialização ou importação de tensoativos aniônicos não biodegradáveis (Penteado *et al.*, 2006). Enquanto a portaria 112 de 14 de maio de 1982 do Ministério da Saúde determinava que "as substâncias tensoativas aniônicas, utilizadas na composição de saneantes de qualquer natureza deveriam ser biodegradáveis (Brasil, 1982; Mastroti *et al.*, 1998). Porém, a esta altura ainda não haviam sido estabelecidos os critérios precisos que definissem o termo "biodegradáveis". Mais recentemente, o Ministério da Saúde publicou a Portaria 120 de 24 de novembro de 1995 que estabelece uma "metodologia a ser adotada para determinação da biodegradabilidade de tensoativos aniônicos utilizados na composição de saneantes ou tensoativos puros" (Brasil, 1995; Mastroti *et al.*, 1998).

Por outro lado, a comunidade econômica européia tem uma regulamentação mais completa para detergentes (EC nº 648/2002 de março de 2004), listando tensoativos e detergentes com especificação de biodegradabilidade, rotulagem do produto, informações de segurança e descrição dos testes realizados no produto (Penteado *et al.*, 2006).

3.4. Efeitos de misturas

Via de regra, os efeitos gerados por uma substância química isolada, geralmente, são diferentes daqueles encontrados para misturas de duas ou mais substâncias (Bila, 2005).

Há algum tempo, pesquisadores tentam desenvolver e padronizar metodologias

para que os efeitos de diferentes misturas possam ser estimados. Essa avaliação pode depender de alguns fatores, tais como, potência dos componentes da mistura, a relação resposta-concentração (razão de mistura) de uma substância em uma mistura, como também de efeitos como sinergismo e antagonismo que podem desviar os efeitos esperados (Rajapakse *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002; Jonsson & Aoyama, 2007). Efeitos das misturas sinérgicas mostram-se maior e nas misturas antagônicas menor, do que os realmente esperados (Bila, 2005).

Backhaus *et al.* (2011) avaliaram a toxicidade individual e da mistura de cinco fármacos e de produtos de cuidados pessoais (fluoxetina, propranolol, triclosan, zinco-piritiona e clotrimazol) para comunidades marinhas de microalgas (perifíton). Todos os compostos mostraram-se tóxicos e os efeitos da mistura foram evidentes mesmo quando utilizadas apenas concentrações de efeito não observado (CENO) de todos os cinco componentes.

Outro tipo de abordagem para avaliação da toxicidade de misturas químicas é realizada ao longo de várias gerações do ciclo de vida de um organismo. Dietrich *et al.* (2010), avaliaram variações na morfologia e no ciclo de vida, ao longo de seis gerações do cladócer *Daphnia magna* causadas pelos fármacos carbamazepina, diclofenaco, 17 α -etinilestradiol e metoprolol, como substâncias individuais e como mistura. Os efeitos detectados ocorreram logo na primeira geração, seguido por um período de aclimação e uma recorrência dos efeitos nas gerações posteriores.

Resultados como estes mostram que, mesmo no que diz respeito a misturas de compostos quimicamente e funcionalmente diferentes, legislações e normas ambientais devem levar em consideração possíveis efeitos de diferentes misturas.

3.5. Principais processos para tratamento de efluentes

O fato de aproximadamente 97% da água do planeta ser salgada e levando em consideração que o percentual de água doce disponível para as diversas atividades humanas seja de apenas 0,01%, pois o restante está sob a forma de geleiras, é compreensível que os compartimentos aquáticos tenham recebido grande atenção nas últimas décadas em relação à sua preservação. Por isso uma crescente preocupação quanto a manutenção da qualidade das águas vem impulsionando ao longo do tempo o desenvolvimento de novas tecnologias e diversos processos destinados ao tratamento de efluentes.

Em esgotos predominantemente domésticos, 75% dos sólidos em suspensão e

40% dos sólidos dissolvidos são de natureza orgânica. Estes compostos são constituídos principalmente de carbono, hidrogênio e oxigênio, além de outros elementos como nitrogênio, flúor, fósforo, enxofre, ferro, entre outros. Os principais grupos de substâncias orgânicas encontradas nos esgotos são proteínas, carboidratos, óleos e graxas. Outros compostos orgânicos sintéticos são encontrados em menor quantidade como detergentes, pesticidas, fenóis e fármacos (Metcalf & Eddy, 1991; Piveli & Kato, 2006).

Naturalmente os corpos d'água possuem um poder depurador que foi definido como a "capacidade de consumir as formas poluentes", uma capacidade essencialmente natural de recuperação após o lançamento de efluente (Sperling, 1993). De acordo com Battlha *et al.* (1986), as águas residuárias domésticas, quando lançadas num curso de d'água sofrem um processo natural de purificação que se realiza por meio de processos físicos, químicos e biológicos.

Os processos mais adequados para a remoção de matéria orgânica das águas residuárias, esgotos sanitários e efluentes industriais são os de natureza biológica. Os processos aeróbios são aqueles em que os microrganismos usam o oxigênio dissolvido na água como acceptor de elétrons em seus processos respiratórios, por exemplo, processo de lodos ativados e filtros biológicos aeróbios. Os processos anaeróbios recorrem ao uso de microrganismo que apresentam o mecanismo da respiração intra-molecular, usando o hidrogênio como acceptor de elétrons na ausência de oxigênio dissolvido nas águas como por exemplo as fossas sépticas, lagoas anaeróbias e filtros anaeróbios (Piveli & Kato, 2006).

A presença de compostos tóxicos numa mistura pode modificar seletivamente a composição da comunidade biológica que a degradaria, alterando as atividades da biodegradação (Borrely, 2001). Com isso, alguns tipos de efluentes necessitam serem pré-tratados por processos físico-químicos para a remoção de componentes tóxicos (metais pesados, óleos e graxas, solventes orgânicos, etc) antes de serem submetidos ao tratamento biológico (Piveli & Kato, 2006).

3.4.1 Tratamento por Processos Oxidativos Avançados (POAs)

O tratamento de águas por oxidantes é uma prática empregada já há algum tempo com registros sobre a utilização de ozônio (O_3) para a desinfecção de águas por De Meritens em 1886. Porém, apenas a partir de 1973 a terminologia “Processos de Oxidativos Avançados (POAs)” passou a ser empregada.

Desde então muitos trabalhos foram publicados na literatura científica sobre

este tipo de tratamento, podendo ser destacados quatro períodos cronológicos distintos: 1) De 1976 à 1985 poucos trabalhos científicos publicados e praticamente nenhuma aplicação concreta; 2) De 1985 à 1990 devido ao aumento da preocupação com temas relacionados à contaminação ambiental houve um aumento no número de trabalhos publicados referentes à degradação de contaminantes; 3) Até o final da década de 90 houve muitas discussões sobre as vantagens e desvantagens deste tipo de tratamento, pois o aumento do número de trabalhos levou a uma disseminação de resultados contraditórios; 4) Hoje já é adotada uma visão mais realista e conservadora da possibilidade dessa tecnologia, bem como a aplicação dos POAs de forma viável e competitiva comparado aos processos convencionais de tratamentos de águas e efluentes (Gálvez *et al.*, 2001; Teixeira & Jardim, 2004; Bautitz, 2010;).

Muitos trabalhos de revisão sobre a degradação de diferentes tipos de contaminantes como pesticidas, corantes e também de efluentes industriais e domésticos por POAs podem ser encontrados na literatura científica (Borrely, 2001; Romanelli, 2004; Pignatello *et al.*, 2006; Gogate & Pandit, 2004; Nogueira *et al.*, 2007), inclusive sobre a degradação de resíduos de fármacos (Melo *et al.*, 2009; Klavarioti *et al.*, 2009).

Os POAs são processos que se baseiam na geração do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), um agente extremamente oxidante, capaz de oxidar uma vasta gama de compostos orgânicos e inorgânicos. O radical hidroxila apresenta um alto potencial padrão de redução ($E^\circ = +2,73 \text{ V}$ versus eletrodo normal de hidrogênio (ENH)), comparado à maioria dos oxidantes comuns e dessa forma é capaz de promover a oxidação de compostos a CO_2 , H_2O e ácidos inorgânicos provenientes dos héteroátomos da molécula (Bautitz, 2010; Borrely, 2001; Haag & Yao, 1992; Buxton *et al.*, 1988).

A geração de radical hidroxila se dá pela combinação de oxidantes como peróxido de hidrogênio ou ozônio com irradiação ultravioleta (UV) ou visível (Vis) na presença de catalisadores como íons metálicos ou semicondutores.

A oxidação dos compostos orgânicos pelo radical hidroxila é promovida basicamente por três mecanismos (Legrini *et al.*, 1993):

- Abstração de átomo de hidrogênio: ocorre geralmente com hidrocarbonetos alifáticos e promove a formação de radicais orgânicos (Equação. 1).

(Eq. 1)

- Adição eletrofílica: adição de $\bullet\text{OH}$ a ligações π formando radicais orgânicos, ocorre

geralmente com hidrocarbonetos insaturados ou aromáticos (Equação. 2).

(Eq. 2)

- Transferência eletrônica: ocorre normalmente com hidrocarbonetos halogenados (Equação. 3).

(Eq. 3)

Reações radicalares, como por exemplo, a recombinação de radicais hidroxila regenerando o H_2O_2 , também pode ocorrer, porém são indesejáveis, pois diminuem a eficiência do processo de degradação. Além disso, a eficiência do processo de degradação de contaminantes pode ser diminuída também pelo consumo de hidroxilas pelo próprio H_2O_2 (Pignatello *et al.*, 2006).

3.4.1.1. Ozonização

A Ozonização é um processo baseado na decomposição do O_3 em soluções aquosas e formação de radicais hidroxila. Neste processo os íons OH^- têm o papel de iniciadores da reação (Equação. 4) (Romanelli, 2004).

(Eq. 4)

A adição de H_2O_2 (Equação 5) na solução aquosa resulta em maiores concentrações de radicais OH (sistema ozônio/ H_2O_2):

(Eq. 5)

A eficiência da ozonização também pode ser ampliada com a adição da radiação ultravioleta; neste caso, o radical OH é gerado a partir da irradiação UV (254nm) de um sistema aquoso, saturado com O_3 . Existe ainda a combinação $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, considerado o mais efetivo para o tratamento de efluentes muito poluídos (Andreozzi *et al.*, 1999 *apud* Romanelli, 2004).

3.4.1.2. Fotólise (UV)

A Fotólise em combinação com o H_2O_2 , consiste na irradiação com luz UV (<280nm) de uma solução que contém o poluente e H_2O_2 , causando a quebra homolítica do H_2O_2 (Andreozzi et al., 1999), como mostra a Equação 6.

(Eq. 6)

3.4.1.3. Processo Fenton e Foto-Fenton

A reação de Fenton é conhecida desde 1894 quando Henry J. Fenton observou a oxidação do ácido tartárico na presença de H_2O_2 e íons ferrosos (Fenton, 1894 *apud* Bautitz, 2010).

O reagente Fenton tem se demonstrado capaz de destruir compostos tóxicos em efluentes tais como fenóis e herbicidas, sendo o controle de pH muito importante (Romanelli, 2004). O mecanismo de geração de radicais hidroxila que ocorre por meio da decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio em meio ácido, é mostrado a seguir na Equação 7 (Haber & Weiss, 1934 *apud* Bautitz, 2010).

(Eq. 7)

No processo foto-Fenton a velocidade das reações de oxidação pode ser aumentada com a incidência de radiação na amostra. A irradiação das espécies hidroxiladas de Fe(III) promove a transferência de um elétron do ligante para o metal, conhecida como transferência de carga ligante-metal, proporcionando assim, a formação do radical hidroxila e a regeneração de Fe(II) (Equação. 8) (Faust & Hoigné, 1990; Bautitz, 2010)

No processo foto – Fenton, a taxa de degradação de poluentes orgânicos é fortemente acelerada pela luz UV/visível, em comprimentos de onda maiores que 300nm.

Por isso, é indicado por muitos autores para aplicações industriais (Andreozzi *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1999).

(Eq. 8)

A radiação ionizante também faz parte do grupo de POAs e será abordada no próximo item. O potencial oferecido pelos POAs pode ser explorado pela integração com o

tratamento biológico para a degradação de uma substância tóxica ou refratária que entra ou que sai do sistema de tratamento biológico (Romanelli, 2004).

3.4.1.4. Radiação Ionizante

As radiações ionizantes, corpusculares e eletromagnéticas, são assim conhecidas por apresentarem a capacidade de ionizar átomos e moléculas presentes no meio irradiado, como por exemplo, os raios alfa (α), partículas beta (β), os raios X, os raios gama (γ) e o feixe de elétrons (Spinks & Woods, 1990 *apud* Romanelli 2004).

As radiações ionizantes têm sido utilizadas em diferentes áreas, como a irradiação de alimentos para sua preservação e desinfestação, a irradiação de materiais médicos para a radioesterilização, beneficiamento de pedras preciosas, processamento e modificação de polímeros, cura de tintas e vernizes, radioesterilização em bancos de tecidos, desenvolvimento e produção de fontes radioativas para radioterapia, na medicina nuclear, desenvolvimento de radiotraçadores para uso industrial e ambiental, tratamento de efluentes gasosos e líquidos, domésticos e industriais, entre outras. Para estes propósitos são comumente utilizados fontes de raios gama e o acelerador de elétrons (Romanelli, 2004).

Os aceleradores de partículas começaram a ser desenvolvidos em 1927, com base nas pesquisas do físico Ernest Lawrence. O primeiro acelerador de partículas foi construído na Universidade de Cambridge, Inglaterra, pelos físicos Cockroft e Walton (Harvey, 1969).

Os aceleradores de elétrons fazem parte da categoria dos aceleradores de partículas, que são dispositivos capazes de acelerar partículas subatômicas de valores muito baixos até valores entre alguns milhões e vários bilhões de elétrons-Volt (eV) e altas energias cinéticas, pela combinação entre campos elétricos e magnéticos. A unidade elétron-Volt corresponde à variação da energia de um elétron que atravessa uma diferença de potencial de 1 Volt, no vácuo (Harvey, 1969).

Um potencial de alta voltagem é estabelecido entre o cátodo e o ânodo, no vácuo, sendo que essa diferença de potencial é responsável pela aceleração das partículas, como os elétrons. Alterando-se a variação do potencial aplicado à aceleração dos elétrons, é possível variar a energia cinética e, conseqüentemente, seu poder de penetração. No acelerador de elétrons, uma fonte de alta tensão fornece os elétrons que serão acelerados (Harvey, 1969).

De acordo com a disposição geométrica dos campos eletromagnéticos

responsáveis pela aceleração das partículas, os aceleradores são classificados em lineares ou cíclicos.

Os principais componentes de um acelerador são fonte de alta tensão, tubo acelerador em vácuo, canhão de elétrons, câmara de irradiação, painel de controle e sistema de segurança. Esses componentes devem ser blindados para barrar a passagem dos raios X gerados pelo freamento dos elétrons ao penetrarem na matéria.

As radiações eletromagnéticas, por serem formadas por ondas eletromagnéticas, possuem grande poder de penetração na matéria. Já as radiações corpusculares, por serem constituídas de partículas com massa e carga, apresentam poder de penetração limitado, tendo em vista a perda de energia cinética que ocorre durante a interação com o material que é irradiado.

A dose de radiação absorvida, de acordo com o Sistema Internacional, é representada pela unidade Joule por quilograma (J/kg) e recebe um nome especial, o Gray (Gy), que substitui o rad, utilizado até 1985. A relação entre essas unidades é definida por: $100 \text{ rad} = 1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ (Harvey, 1969). A taxa de dose é definida pela dose absorvida por unidade de tempo (Gy/s).

Para o feixe de elétrons, a profundidade de penetração (e) é aquela na qual a dose é igual à dose recebida na superfície do material e depende da energia do elétron (E) e da densidade (p) média do material absorvedor, em g.cm^{-3} . Para elétrons com energia entre 1 MeV e 10 MeV, a profundidade de penetração é dada pela Equação 9.

$$\text{—————} \quad (\text{Eq. 9})$$

Algumas vantagens podem ser citadas quanto à aplicação de aceleradores de elétrons: 1) tempos de irradiação curtos; 2) a intensidade de radiação alta; 3) a facilidade de condução do material a ser exposto; 4) licenciamento similar aos equipamentos de raios-X; 5) fato da emissão de radiação ser interrompida quando o equipamento é desligado e de não haver geração de rejeitos radioativos. As desvantagens são a baixa penetração no material irradiado, que limita a sua aplicação, e a necessidade de operadores especializados (Romanelli, 2004). Os aceleradores de elétrons são utilizados preferencialmente como fonte de radiação para aplicações ambientais (Duarte, 1999), como o tratamento de efluentes industriais, de lodo residual e de gases tóxicos (Borrely, 2001).

A radiação ionizante interage com a matéria e transfere sua energia para

átomos e moléculas presentes. Os átomos são ionizados e excitados e as moléculas sofrem ruptura em suas ligações, gerando radicais livres. A radiação pode interagir diretamente com a molécula em questão, ou pode agir de forma indireta, gerando espécies químicas muito reativas que reagem com a molécula do material (FIGURA 4).

FIGURA 4. Interação direta e indireta da radiação ionizante, por feixe de elétrons (Romanelli, 2004).

A ação direta da radiação é insignificante, mesmo em altas concentrações aos compostos orgânicos (Duarte, 1999). Na ação indireta, pela radiólise da água (FIGURA 5), são produzidas moléculas ionizadas e excitadas além de elétrons livres. As moléculas ionizadas formam rapidamente radicais hidroxila fortemente oxidantes e os elétrons tornam-se hidratados (Equações 10 e 11). Em comparação aos outros POAs, a radiação ionizante é a tecnologia mais eficiente na geração de radicais OH⁻ (Duarte, 1999), além de dispensar a adição de produtos químicos.

(Eq. 10)

(Eq. 11)

FIGURA 5. Processo de radiólise da água e formação de radicais livres (CNEN).

A radiação ionizante demonstrou-se eficaz para a decomposição de substâncias orgânicas e poluentes ambientais de esgotos, lodos e de águas residuais, podendo ser considerada uma tecnologia para pré-tratamento de efluentes contendo FPHCPs (Borrely, 2001; Romanelli, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para todos os ensaios de toxicidade aguda, bem como para o cultivo dos organismos-teste em laboratório foram utilizadas metodologias normatizadas, seguindo as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT-NBR).

Quando pertinente foram adotadas metodologias descritas em trabalhos prévios (Othman & Pascoe, 2001; Péry *et al.*, 2005).

4.1. Cultivo dos organismos-teste em laboratório

4.1.1. Água de diluição e de cultivo

A água utilizada para manutenção dos cultivos em laboratório de *Hyaella azteca* e *Daphnia similis* foi coletada trimestralmente no reservatório de Ribeirão do Piraí, Bacia do Rio Jundiaí, localizado no município de Salto/SP, Brasil (FIGURA 6). A água coletada foi armazenada em bombonas (polietileno) de 20 L e depois estocada em laboratório.

FIGURA 6. Local de coleta da água de cultivo e de diluição, localizado no município de Salto/SP.

Após a chegada da água ao laboratório, foram verificadas as medidas dos valores de oxigênio dissolvido (O.D.) em água, pH, condutividade elétrica e dureza e, posteriormente, realização de ensaios de viabilidade da mesma.

Os valores de O.D. e de condutividade elétrica foram obtidos com auxílio de equipamento eletrônico da marca HACH. Os valores de pH também foram obtidos com auxílio de medidor eletrônico de marca Micronal. Já os valores de dureza foram obtidos por titulação volumétrica.

Previamente à utilização da água nos cultivos e nos ensaios de toxicidade, primeiramente, foi realizada a filtração desta água em rede de malha de 68µm, para separação de possíveis materiais em suspensão (detritos e organismos zooplancônicos).

Em seguida, a dureza da mesma foi corrigida para um valor pré-estabelecido entre 45 e 48 mg.L⁻¹ de CaCO₃ e mantida sob aeração constante, por período mínimo de 24 horas, garantindo assim a saturação de seus níveis de oxigênio dissolvido e completa solubilização dos sais.

Por fim, foram realizados ensaios de viabilidade para cada lote novo de água natural coletado. Após estas etapas de preparação de água coletada, a mesma foi utilizada na diluição das substâncias-teste (água de diluição) ou para renovação dos cultivos (água de cultivo).

4.1.2. Ensaio de viabilidade

Ensaios de viabilidade da água de cultivo fazem parte da rotina do Laboratório de Ensaio Biológicos e Ambientais (LEBA), situado no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

Estes ensaios foram realizados a cada novo lote de água natural coletado. O ensaio consistiu em expor 10 organismos neonatos à água a ser testada, sem alimento e sem aeração, e mantido em incubadora com temperatura controlada por um período de 48 horas. O lote de água foi aceitável para uso nos ensaios de toxicidade e nos cultivos caso a imobilidade dos organismos expostos não excedesse 10% (ABNT - NBR 12713, 2004).

4.1.3. Alimento

Foram utilizados para alimentação do organismo *Daphnia similis* (CLADOCERA: CRUSTACEA) a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, cultivada em meio L.C. Oligo, sob aeração e iluminação constantes (FIGURA 7).

Para os cultivos do organismo *Hyaella azteca* (AMPHIPODA: CRUSTACEA), foi utilizado como alimento ração em flocos para peixes ornamentais da marca Alcon Basic® *MEP 200 Complex*.

Para ambos os cultivos de organismos citados acima também foi utilizada, como complemento alimentar, ração líquida (R.L.) composta por ração de peixe, combinada com fermento biológico (leveduras).

FIGURA 7. Cultivo de microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* sob aeração e iluminação constantes.

4.1.4. *Daphnia similis*

Para a manutenção dos cultivos de *Daphnia similis* (FIGURAS 8 e 9), diariamente foram transferidos os neonatos, dos cristalizadores de vidro que também continham os indivíduos adultos, com auxílio de pipeta Pasteur de vidro, para um béquer contendo água de cultivo.

FIGURA 8. Cladócero *Daphnia similis* (Fonte: www.ipen.br).

FIGURA 9. Cristalizador contendo organismos *Daphnia similis*.

Quando necessário esses neonatos foram utilizados para iniciar novos cultivos, em ensaios de toxicidade ou descartados. Em seguida, foram retiradas as carapaças, originadas a partir da “muda”, e realizada alimentação dos cultivos.

Semanalmente, foi realizada a troca de água total dos cristalizadores onde o mesmo procedimento acima citado foi adotado, com exceção de que os organismos adultos foram transferidos para cristalizadores contendo água de cultivo recém processada.

Os cultivos com baixa reprodução, mortalidade acentuada ou que tivessem ultrapassado a idade máxima recomendada pela norma ABNT - NBR 12713 (2004) e também os neonatos não utilizados, foram descartados em um béquer contendo água de cultivo. Esta prática é utilizada para que em hipótese alguma os organismos exóticos cultivados em laboratório adentrem o ambiente aquático natural.

Todos os cristalizadores foram cobertos por tampa de vidro com espaçamento suficiente para garantir a contínua troca gasosa pela interface ar/água dos cultivos.

A manutenção em laboratório dos cultivos foi realizada diariamente, exceto sábados e domingos e também semanalmente para a renovação total da água de cultivo.

Os cultivos e ensaios de toxicidade com *Daphnia similis* foram mantidos em câmara de germinação (FIGURA 10) com temperatura ($20^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (16h claro).

FIGURA 10. Câmara de germinação com temperatura e fotoperíodo controlados.

4.1.5. *Hyaella azteca*

A manutenção dos cultivos em laboratório de *Hyaella azteca* (FIGURAS 11 e 12) foi realizada semanalmente. Esta atividade incluía a troca total ou parcial de água de

cultivo e a transferência dos neonatos dos cristalizadores contendo os organismos adultos para cristalizadores contendo apenas água de cultivo e malha sintética (substrato artificial).

FIGURA 11. Anfípoda *Hyalella azteca* (Fonte: <http://cgb.indiana.edu>).

FIGURA 12. Cristalizador contendo organismos *Hyalella azteca*.

Para a troca de água total foram utilizados 3 litros de água natural presente em um cristalizador para o qual os adultos foram transferidos com auxílio de pipeta Pasteur de vidro. O pH desta água sempre foi ajustado para aproximadamente 7,0 (ABNT NBR – 15470).

Para a troca de água parcial, primeiramente foi retirado 1/3 da água do cultivo, com auxílio de mangueira de polietileno, que atuava como um sifão, com rede de malha de 68µm em uma das extremidades a fim de evitar que organismos jovens fossem carregados junto com a água a ser descartada. Em seguida, foi realizada a renovação parcial da água do cultivo, com um volume de 2 litros de água natural.

Os organismos *Hyalella azteca* foram alimentados duas vezes por semana, logo após a troca de água de cultivo e 72 horas após este procedimento.

Todos os cristalizadores foram cobertos por tampa de vidro com espaçamento suficiente para garantir a contínua troca gasosa pela interface ar/água dos cultivos.

Os cultivos e ensaios de toxicidade com *Hyalella azteca* foram mantidos em câmara de germinação com temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (16h claro) controlados.

4.1.6. *Vibrio fischeri*

As culturas da bactéria marinha *Vibrio fischeri* (FIGURA 13) foram sempre obtidas sob o estado liofilizado, não sendo cultivadas em laboratório.

O armazenamento da bactéria se deu em congelador com temperatura a -80°C , até minutos antes do início dos ensaios de toxicidade com estes organismos.

FIGURA 13. Bactéria luminescente *Vibrio fischeri*. Fontes: (PNAS); (WIKI).

4.2. Substâncias químicas analisadas

Ao longo do trabalho, foram utilizados nos ensaios de toxicidade o fármaco cloridrato de fluoxetina (CAS 54910-89-3) em sua fórmula manipulada na forma de pó encapsulado e o surfactante dodecil sulfato de sódio (CAS 151-21-3) na forma de pó, mantido em frasco de polietileno preto.

O fármaco foi adquirido de farmácia de manipulação, situada no município de São Paulo/SP. Já o surfactante foi adquirido de um fornecedor de produtos químicos, situado no município de Diadema/SP.

Para a validação dos ensaios de toxicidade foram utilizadas como substâncias de referência o cloreto de potássio (KCl), para os crustáceos, e fenol, para a bactéria.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e deionizada, obtida por meio de sistema de purificação Milli-Q (Millipore[®], Bedford, MA).

4.3. Análise espectrofotométrica (UV - visível)

Foi utilizado um espectrofotômetro UV - Visível da marca Shimadzu, modelo 160-A de duplo feixe, detector de 190 a 1100 nm e cubetas de quartzo de caminho

óptico de 1 cm. Para o método espectrofotométrico foi utilizada água Mili-Q como solvente para todas as soluções-teste empregadas neste estudo. O aparelho foi calibrado com o respectivo solvente e a leitura das absorbâncias foi realizada entre 190 e 300 nm.

A concentração utilizada para todas as soluções-teste, irradiadas e não irradiadas, foi de 10 mg.L⁻¹.

4.4. Preparação das soluções-teste

4.4.1. Cloridrato de fluoxetina

Previamente à realização dos ensaios de toxicidade e à irradiação da solução contendo o fármaco CF, foi preparada uma solução estoque de concentração 10 mg.L⁻¹.

Cada cápsula continha em sua formulação 20 mg de cloridrato de fluoxetina, além dos compostos excipientes (aerosil, lauril sulfato de sódio, celulose micro-cristalina e amido de milho). O CF possui solubilidade em água de 14 mg.mL⁻¹ (Eli Lilly & CO., 2009).

Para tanto, foi solubilizado todo o conteúdo de uma cápsula em 2 litros de água Mili-Q e em seguida a solução foi agitada durante 48h, aproximadamente, com auxílio de agitador magnético, a fim de garantir a máxima solubilização da substância (Stanley *et al.*, 2007). Durante todo este processo de solubilização, o béquer que continha a solução aquosa do fármaco, foi recoberto por plástico preto, a fim de evitar a fotodegradação do CF.

4.4.2. Dodecil sulfato de sódio

Previamente à realização dos ensaios de toxicidade com o surfactante DSS, foi preparada uma solução estoque de concentração 100 mg.L⁻¹. Foram pesados em balança analítica 10 mg de DSS e em seguida solubilizado em 100 mL de água mili-Q, com auxílio de balão volumétrico de 100 mL. As diluições empregadas nos ensaios foram feitas com água natural com dureza de 45 mg.L⁻¹ de CaCO₃, mesma utilizada nos cultivos em laboratório.

4.4.3. Mistura do cloridrato de fluoxetina com dodecil sulfato de sódio

A fim de verificar a toxicidade da fluoxetina na presença do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio foi preparada uma solução-estoque de 10 mg.L⁻¹ (1:1).

Todos os ensaios de toxicidade aguda com a mistura de CF e DSS foram

realizados na proporção de 1:1. A preparação da solução-teste da mistura foi feita a partir das soluções-estoque previamente preparadas, citadas anteriormente.

4.4.4. Irradiação das soluções-teste

O fármaco CF e a mistura (CF + DSS), em solução aquosa e com concentração de 10 mg.L^{-1} , foram irradiados no acelerador de elétrons (FIGURA 14), do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR). A energia do acelerador foi fixada em 1,4 MeV durante as irradiações realizadas neste estudo.

FIGURA 14. Acelerador de elétrons com esteiras automatizadas. Fonte: (IPEN)

No acondicionamento das amostras para o processo de irradiação, uma alíquota de 246 mL da solução-estoque foi transferida para um recipiente de vidro (Pyrex[®]) e este foi recoberto com papel filme (FIGURA 15).

O processo de irradiação da amostra consistiu na passagem dos recipientes de vidro, contendo a solução-teste, embaixo da fonte geradora de elétrons, fazendo com que estes interagissem com as moléculas de água e, em menor grau, com as moléculas das substâncias-teste. Esta passagem do recipiente pela fonte geradora de elétrons foi realizada com auxílio de uma esteira automatizada e foi dividida em duas etapas, primeira passagem pelo fluxo de elétrons e segunda passagem pelo fluxo de elétrons. Por isso, a solução irradiada recebeu metade da dose estabelecida durante a primeira passagem e depois a outra metade durante a segunda passagem.

Ao longo do trabalho foram utilizadas as seguintes doses de radiação: 1,0 kGy, 2,5 kGy, 5,0 kGy, 7,5 kGy e 10 kGy.

FIGURA 15. Recipiente de vidro (Pyrex®) contendo solução-teste para ser irradiada.

4.5. Ensaios de toxicidade

Todos os ensaios de toxicidade aguda foram realizados de forma estática, ou seja, não houve renovação da solução-teste ao longo do período de realização dos ensaios.

Com exceção de *Vibrio fischeri*, todos os organismos-teste empregados foram cultivados no Laboratório de Ensaios Biológicos e Ambientais (LEBA), em água natural.

4.5.1. Ensaios com *Hyalella azteca*

Foi realizada uma separação prévia dos organismos, a fim de atender o critério de idade para os ensaios de toxicidade aguda. Com uma semana de antecedência aos ensaios de toxicidade indivíduos jovens foram transferidos dos cristalizadores do cultivo para um cristalizador de vidro contendo 500 mL de água natural com as mesmas características físico-químicas (condutividade, oxigênio dissolvido, pH e dureza) da água utilizada para o cultivo em laboratório dos organismos.

Estes neonatos foram mantidos sob as mesmas condições de cultivo, a fim de assegurar que os mesmos estivessem dentro da faixa de idade exigida pela norma ABNT - NBR 15470 (2007), a qual recomenda idade entre sete e quatorze dias para a exposição de *Hyalella azteca* em ensaios de toxicidade.

Durantes os ensaios de toxicidade aguda os organismos-teste foram dispostos em frascos plásticos de poliestireno de 50 mL (Stanley *et al.*, 2007), contendo 20 mL da solução-teste, além de malha sintética de área aproximada de 1 cm², cuja finalidade é simular o sedimento. Cada ensaio teve duração de 96h, e consistiu na exposição de 1 indivíduo jovem por replicata, sendo cada concentração-teste composta por 10 replicatas, totalizando 10 organismos-teste por concentração-teste (FIGURA 16). Cada réplica, contendo um organismo-teste, recebeu 100 µL de ração (R.L.) diariamente ao longo do

período de exposição. Todos os ensaios realizados foram mantidos na câmara de cultivo com temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (16 h claro) controlados, sob as mesmas condições de cultivo.

FIGURA 16. Sistema utilizado para incubação de amostras durante os ensaios com *Hyaella azteca*.

4.5.2. Ensaios com *Daphnia similis*

Para os ensaios de toxicidade aguda, organismos jovens foram transferidos do cultivo para um béquer de vidro de 500 mL, contendo água natural com as mesmas características físico-químicas da água utilizada para o cultivo dos organismos em laboratório (condutividade, oxigênio dissolvido, pH e dureza).

Os organismos-teste foram separados com seis horas de antecedência aos ensaios, a fim de assegurar que os mesmos estivessem dentro da faixa de idade exigida pela norma ABNT-NBR 12713 (2004), a qual recomenda que a faixa-etária seja de 6 a 24 horas para estes organismos, e mantidos sob as mesmas condições do cultivo.

Durante os ensaios de toxicidade, os organismos-teste foram expostos em 10 mL da solução-teste contida em tubos de ensaio de vidro, dispostos em grade metálica e cobertos por plástico escuro, a fim de evitar exposição à luz.

Cada ensaio de toxicidade aguda teve duração de 48h e consistiu na exposição de 5 indivíduos jovens por replicata, sendo que cada concentração-teste possuía 4 replicatas totalizando 20 organismos-teste expostos por concentração-teste (FIGURA 17).

Todos os ensaios realizados foram mantidos dentro de câmara de cultivo com temperatura ($20^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (16h claro) controlados, sob as mesmas condições de cultivo.

FIGURA 17. Sistema utilizado para incubação de amostras durante os ensaios com *Daphnia similis*.

4.5.3. Ensaios com *Vibrio fischeri*

Os ensaios de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* foram realizados conforme recomendações da norma ABNT – NBR 15411/2 (2006). Primeiramente, foi realizada a solubilização das culturas de bactérias, que são adquiridas sob a forma liofilizada (FIGURA 18). Após abrir o frasco contendo a bactéria, todo seu conteúdo foi passado para uma cubeta de vidro e adicionado 1000 μL de solução tampão de diluição.

Após a bactéria ser reativada, um volume de 100 μL da mesma foi transferido para outra cubeta de vidro e adicionado a essa 1000 μL de Solução Biolux. Em seguida, foi realizada a preparação da amostra-teste, incluindo o grupo controle composto por 1000 μL de solução diluente apenas.

As concentrações utilizadas para os ensaios de toxicidade aguda foram equivalentes a 81,9 %, 40,95 %, 20,47 % e 10,23 % da concentração da solução-estoque utilizada, seguindo o fator de diluição 2.

Após preparar a amostra, foi feita a preparação das cubetas contendo os organismos-teste, onde foi disposto um volume de 100 μL da bactéria já reativada em solução Biolux e sua respectiva concentração-teste e o controle. Em seguida, foi realizada no equipamento Microtox® (FIGURA 19) a leitura de três das cinco cubetas, por escolha aleatória, que continham o organismo-teste e selecionada a que possuía um valor intermediário para realizar a calibração do equipamento. Realizada então a leitura inicial da quantidade de luz (I_0) emitida pelo organismo-teste em cada cubeta, foi iniciada a exposição das bactérias às concentrações-teste.

Em seguida, foram adicionados 900 μL de cada concentração - teste para as

respectivas cubetas já contendo a bactéria. Para o grupo controle foi adicionado um volume de 900 µL de solução diluente apenas à cubeta contendo o organismo-teste. Após iniciar a exposição dos organismos-teste do grupo controle foi acionado o cronômetro e transcorridos 15 minutos foi realizada novamente a leitura (I_{15}) da taxa de emissão de luminescência dos organismos-teste contidos em cada concentração-teste, além do grupo controle.

FIGURA 18. Reagente que contém bactéria *Vibrio fischeri* (produto liofilizado).

FIGURA 19. Equipamento Microtox®, utilizado para determinação de bioluminescência em *Vibrio fischeri*.

4.5.4. Ensaios de sensibilidade

Para os organismos *Daphnia similis* e *Hyaella azteca*, foi utilizado cloreto de potássio (KCl) como substância de referência, com exposição por 48 horas e 96 horas, respectivamente.

O fenol foi utilizado como substância de referência para a bactéria *Vibrio fischeri*, com exposição de 15 minutos.

Todos os ensaios de sensibilidade foram realizados seguindo os procedimentos citados anteriormente.

A partir dos resultados obtidos com os ensaios de sensibilidade foram criadas três cartas-controle, uma para cada organismo-teste utilizado nos ensaios de toxicidade. Os resultados obtidos nos testes de sensibilidade devem se encontrar dentro dos limites da

carta-controle estabelecida para o laboratório, num determinado período.

4.5.5. Análises estatísticas

Para os dados de sobrevivência obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Hyaella azteca*, foi adotado o método Trimmed Spearman-Kärber, realizado com auxílio de programa computacional.

Já as análises estatísticas para os ensaios de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*, foram realizadas com base no valor do efeito gama (quociente entre a luz perdida e a luz remanescente) e a concentração da amostra, com a Versão 7.82 do programa desenvolvido pela Microbs Corp. O programa traça uma curva que determina o valor da CE50 pela concentração da amostra onde o valor de gama é igual a 1, utilizando a regressão linear (CETESB, 1987).

4.5.6. Descarte de substâncias químicas e organismos-teste

Todas as substâncias químicas e organismos-teste, utilizados em ensaios de toxicidade, foram descartados em bombonas de polietileno de 20 L (FIGURA 20) e estas, em seguida, estocadas em laboratório, para serem devidamente encaminhadas para descarte apropriado. Substâncias orgânicas com potencial de contaminação, ambiental ou humana, são geralmente encaminhadas para incineração.

FIGURA 20. Bombona de 20 L contendo substâncias químicas para descarte.

4.6. Avaliação da eficiência do processo por irradiação

A avaliação da eficiência da irradiação na redução da toxicidade aguda do fármaco CF e da mistura CF+DSS foi realizada por meio da transformação dos valores de CE50 obtidos nos ensaios de toxicidade aguda em Unidades Tóxicas (UT) (Equação 12). Os valores das UTs são diretamente proporcionais à toxicidade e são obtidos pelas Equações 12 e 13 (Borrely, 2001; Romanelli, 2004):

$$\text{---} \quad (\text{Eq. 12})$$

A partir dos valores de UTs obtidos para soluções não-irradiadas e irradiadas foram calculados os percentuais de redução (% Red) da toxicidade aguda para cada dose aplicada (Equação 13) (Borrely, 2001; Romanelli, 2004).

$$\text{-----} \quad (\text{Eq. 13})$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados do estudo da toxicidade do fármaco cloridrato de fluoxetina, do surfactante dodecil sulfato de sódio e da mistura entre estes dois compostos orgânicos, bem como o tratamento destas substâncias em solução aquosa por radiação ionizante, proveniente de um acelerador de elétrons. Levando-se em consideração os valores de toxicidade aguda obtidos, para discussão da eficiência deste processo oxidativo avançado.

Assim, foram utilizados três ensaios de toxicidade aguda padronizados, sendo estes: os ensaios com os microcrustáceos *Daphnia similis* e *Hyaella azteca* e com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*. Também foram determinados os parâmetros físico-químicos tanto para acompanhamento dos efeitos da radiação ionizante sobre a solução aquosa contendo cloridrato de fluoxetina e dodecil sulfato de sódio (CF + DSS), quanto para o controle da qualidade dos ensaios de toxicidade.

5.1. Parâmetros físico-químicos

Juntamente com os ensaios de toxicidade foram determinados os parâmetros físico-químicos pH, oxigênio dissolvido em água (O.D.) e condutividade, uma vez que estes fatores podem interferir diretamente nas taxas de sobrevivência de organismos aquáticos.

Estes parâmetros foram determinados antes e após a exposição das soluções-teste à irradiação por feixe de elétrons e também no início e ao término dos ensaios de toxicidade.

5.1.1. pH

O potencial hidrogênionico (pH) é o parâmetro físico-químico que confere a característica de acidez (0 à 6,9), neutralidade (7,0) ou alcalinidade (7,1 à 14) para uma determinada solução.

Geralmente organismos aquáticos tem seu desenvolvimento otimizado quando em condições de neutralidade. Por isso, é fundamental que o pH e suas possíveis variações sejam acompanhados durante a realização de ensaios ecotoxicológicos, uma vez que podem ser parcialmente responsáveis pela toxicidade encontrada em uma amostra.

Os valores de pH obtidos para o cloridrato de fluoxetina (CF) e para a mistura (CF + DSS) antes e após a irradiação, em função da dose aplicada, são apresentados nas

TABELAS 2 e 3.

TABELA 2. pH das soluções de cloridrato de fluoxetina (10 mg.L⁻¹) antes e após irradiação.

pH						
Dose (kGy)						
Ensaio	0	1,0	2,5	5,0	7,5	10
1	5,85	4,29	4,08	6,75	3,86	6,80
2	6,02	4,35	4,22	4,89	4,34	4,03
3	5,90	4,70	4,35	4,97	3,66	4,22
X ± S	5,92 ± 0,08	4,44 ± 0,22	4,21 ± 0,13	5,54 ± 1,05	3,95 ± 0,34	5,01 ± 1,54

X ± S: média ± desvio padrão

TABELA 3. pH das soluções de CF+DSS (10 mg.L⁻¹ - 1:1) antes e após irradiação.

pH		
Dose (kGy)		
Ensaio	0	5,0
1	6,45	5,01
2	6,22	4,79
3	6,01	4,93
X ± S	6,22 ± 0,22	4,91 ± 0,11

Para ambas as soluções-teste (CF e CF+DSS), utilizadas nos ensaios de toxicidade, como solução-estoque, houve uma redução do pH como resposta ao aumento da dose de radiação aplicada.

Segundo Duarte (1999), a irradiação de substâncias orgânicas gera como principais produtos de degradação diversos compostos orgânicos, dentre os principais estão os ácidos orgânicos. Com isso, a redução de pH após a irradiação pode estar relacionada com a formação de substâncias ácidas decorrentes dos compostos expostos à irradiação por feixe de elétrons.

Romanelli (2004) demonstrou em seu trabalho uma redução significativa de pH de surfactantes, em solução, após serem irradiados com feixe de elétrons. Quando comparadas as médias dos valores de pH (FIGURA 21) obtidos para as soluções de CF antes e após serem irradiadas, pode-se observar que estiveram na faixa de pH próxima à 6,0 antes de serem irradiadas e entre 4 e 6, após serem submetidas à radiação ionizante.

Provavelmente essa semelhança se deva a formação de subprodutos com características de pH semelhantes entre si.

FIGURA 21. Média dos valores de pH das soluções de cloridrato de fluoxetina (10 mg.L^{-1}), irradiadas com diferentes doses.

Para a realização dos ensaios de toxicidade as soluções-estoque, contendo apenas a substância-teste (CF, DSS ou CF+DSS), serviram como ponto de partida para o preparo das diferentes concentrações-teste de cada ensaio.

Com a utilização de água natural (pH próximo à 7,0) para diluição dessas soluções-estoque, foi possível obter valores de pH aceitáveis (acima de 6,0), para a realização destes ensaios. Quando necessário, as soluções-estoque irradiadas tiveram seu pH corrigido para próximo de 7,0 com auxílio de solução de hidróxido de sódio (NaOH) de concentração 1 M.

5.1.2. Condutividade

Outro fator estudado foi a condutividade, que pode ser definida como a expressão numérica da capacidade da água em conduzir corrente elétrica, dando indícios da quantidade de sais existentes na coluna d'água e, portanto, representando uma medida indireta da concentração de poluentes (CETESB, 2011b).

A condutividade foi medida para as soluções-estoque CF e CF+DSS irradiadas, antes e após a irradiação (TABELAS 4 e 5).

TABELA 4. Condutividade das soluções de cloridrato de fluoxetina antes e após irradiação.

Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)						
Dose (kGy)						
Ensaio	0	1,0	2,5	5,0	7,5	10
1	6,04	40,1	49,4	62,5	60,8	89,0
2	5,96	42,9	51,0	59,2	68,8	67,8
3	6,17	37,8	46,8	64,6	68,5	70,3
X $\pm$ S	6,06 $\pm$ 0,11	40,27 $\pm$ 2,55	49,07 $\pm$ 2,12	62,10 $\pm$ 2,72	66,03 $\pm$ 4,53	75,70 $\pm$ 11,59

TABELA 5. Condutividade das soluções de CF+DSS (1:1) antes e após irradiação.

Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)		
Dose (kGy)		
Ensaio	0	5,0
1	14,6	56,7
2	18,9	36,5
3	17,2	59,4
X $\pm$ S	16,90 $\pm$ 2,17	50,87 $\pm$ 12,51

NA FIGURA 22 estão descritas as médias dos valores de condutividades obtidos para as soluções de CF irradiada com diferentes doses. Observando-as é possível notar que há uma tendência de aumento dos valores de condutividade em função do aumento das doses de radiação ionizante aplicadas. Esse fato pode ser explicado pelo aumento do número de moléculas ionizadas formadas a partir da irradiação das soluções de CF e CF+DSS, pois quanto maior for a dose de radiação aplicada maior será o número de moléculas ionizadas e consequentemente maior será a condutividade de uma solução (Romanelli, 2004).

FIGURA 22. Média dos valores de condutividade das soluções de CF (10 mg.L^{-1}), irradiadas com diferentes doses.

5.1.3. Oxigênio dissolvido em água

No meio aquático o oxigênio utilizado pelos organismos aeróbios, nos diversos processos de respiração celular, encontra-se dissolvido nas moléculas de água. Valores inferiores à $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido podem interferir nos resultados obtidos dos ensaios de toxicidade com organismos aquáticos (ABNT - NBR 12713, 2004). As concentrações de O.D. medidas no início e ao término dos ensaios de toxicidade aguda variaram entre $8,41 \text{ mg.L}^{-1}$ e $6,58 \text{ mg.L}^{-1}$.

5.2. Ensaios preliminares de toxicidade aguda

Estão descritos na TABELA 6, os valores de CE50 obtidos com os ensaios preliminares de toxicidade aguda. Estes serviram como base para a determinação das concentrações-teste dos ensaios definitivos de toxicidade aguda.

Sendo que os valores de CE50 (mg.L^{-1}) obtidos para *Daphnia similis* e para *Hyalella azteca* expostos ao cloridrato de fluoxetina foram os que se encontraram mais próximos aos valores mais altos de concentrações ambientais deste fármaco, encontrados em efluente de uma estação de tratamento de esgoto localizada no Canadá (Gagné *et al.*, 2006).

TABELA 6. Valores de CE50 obtidos com os ensaios preliminares de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Hyalella azteca*.

Substância-teste	Organismo - teste	Tempo de exposição (h)	CE50 (mg.L ⁻¹)
DSS	<i>Daphnia similis</i>	48	8,78 (7,75 – 9,96)
CF	<i>Daphnia similis</i>	48	1,33 (1,16 – 1,52)
CF+DSS (1:1)	<i>Daphnia similis</i>	48	0,97 (0,84 – 1,11)
DSS	<i>Hyalella azteca</i>	96	21,5 (16,6 – 27,68)
CF	<i>Hyalella azteca</i>	96	0,61 (0,39 – 0,93)
CF+DSS (1:1)	<i>Hyalella azteca</i>	96	0,78 (0,65 – 0,93)
CF – 5,0 kGy	<i>Hyalella azteca</i>	96	>4,0

5.3. Ensaios de toxicidade aguda

Nos APÊNDICES A, B e C encontram-se as fichas de controle dos ensaios de toxicidade, as quais apresentam os valores das análises físico-químicas de pH, O.D. e condutividade, obtidos no início e ao término dos ensaios de toxicidade.

Para fins de comparação entre os resultados de CE50 obtidos para as soluções não irradiadas e irradiadas por feixe de elétrons, todos os valores de concentração foram trabalhados em porcentagem.

Para todos os ensaios de toxicidade aguda realizados neste estudo, foram adotadas soluções – estoque de concentração 10 mg.L⁻¹, com excessão dos ensaios com *Hyalella azteca* e *Daphnia similis* expostos ao dodecil sulfato de sódio que tiveram solução-estoque com concentração inicial igual à 100 mg.L⁻¹. Portanto para fins de comparação das soluções-teste não irradiadas com as soluções-teste irradiadas, as soluções-estoques foram tratadas como equivalentes a 100% da amostra, pois após a aplicação da radiação ionizante sobre a solução-teste não mais era possível afirmar qual a concentração da mesma, uma vez que novos produtos podem ter sido gerados ou a molécula irradiada pode ter sido degradada e consequentemente ter perdido sua função, não sendo mais tratada como igual à molécula não irradiada.

Embora a CE50 tenha sido expressa em porcentagem, como as soluções de cloridrato de fluoxetina e a mistura (CF + DSS) foram preparadas a 10 mg.L⁻¹, a média de CE50_{96h} para *Hyalella azteca* exposta ao CF por exemplo, foi igual a 5,63%, corresponde a 5,63 % de 10 mg.L⁻¹, ou seja, a CE50 é aproximadamente igual à 0,56 mg.L⁻¹.

Portanto, tomando-se como exemplo a média de CE50_{96h}, para *Hyalella azteca*

exposta ao DSS, igual a 19,29%, corresponde a 19,29 % de 100 mg.L⁻¹, ou seja a CE50 é aproximadamente igual à 19,29 mg.L⁻¹.

5.3.1. Ensaios de toxicidade aguda com *Hyalella azteca*

Os ensaios de toxicidade aguda com *Hyalella azteca*, com 96 horas de exposição, foram realizados com o surfactante DSS, o fármaco CF e a mistura CF+DSS (1:1), estas duas últimas soluções foram também irradiadas com doses de 5 kGy e 10 kGy.

Como os valores de CE50_{96h} (Concentração Efetiva que gera efeito deletério à 50% dos organismos expostos durante 96 horas) são indiretamente proporcionais à toxicidade, com os valores obtidos para as soluções não irradiadas e irradiadas, foi possível observar uma redução da toxicidade aguda.

Os valores de CE50_{96h} obtidos para o organismo *Hyalella azteca*, com as respectivas médias e desvios-padrão para cada solução-teste estudada, são apresentados nas TABELAS 7-12. Também são apresentados os valores de Unidade Tóxica (UT) são diretamente proporcionais à toxicidade e a partir deles foram calculados os percentuais de redução (% Red) da toxicidade aguda para cada dose aplicada.

TABELA 7. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina para o organismo *H. azteca*.

Cloridrato de Fluoxetina		
Ensaio	CE50 _{96h} (%)	UT
1	6,4 (4,5 – 9)	15,62
2	5,6 (3,8 – 8,2)	17,85
3	4,9 (3,5 – 6,9)	20,40
X ± S	5,63±0,75	17,96±2,39

TABELA 8. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda do cloridrato de fluoxetina irradiado com 5,0 kGy para o organismo *H. azteca*.

Cloridrato de Fluoxetina – 5,0 kGy		
Ensaio	CE50 _{96h} (%)	UT
1	70,2 (54,5 – 90,6)	1,42
2	70,7 (60,8 – 82,4)	1,41
3	67,8 (61,2 – 75,1)	1,47
X ± S	69,57±1,55	1,43±0,03

TABELA 9. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 10,0 kGy para o organismo *H. azteca*.

Cloridrato de Fluoxetina – 10,0 kGy		
Ensaio	CE50_{96h} (%)	UT
1	70,6 (65,3 – 76,2)	1,41
2	71,8 (-)	1,39
3	65,1 (57,9 – 73,2)	1,53
X ± S	69,17±3,57	1,44±0,08

TABELA 10. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com dodecil sulfato de sódio para o organismo *H. azteca*.

Dodecil Sulfato de Sódio		
Ensaio	CE50_{96h} (%)	UT
1	19,49 (18,03 – 21,07)	5,13
2	18,02 (16,87 – 19,25)	5,55
3	20,35 (17,93 – 23,09)	4,91
X ± S	19,29 ± 1,18	5,20±0,33

TABELA 11. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com CF+DSS (1:1) para o organismo *H. azteca*.

Cloridrato de fluoxetina + Dodecil Sulfato de Sódio (1:1)		
Ensaio	CE50_{96h} (%)	UT
1	5,9 (5,1 – 6,8)	16,94
2	6,2 (5,3 – 7,2)	16,12
3	6,7(5,2 – 8,5)	14,92
X ± S	6,27±0,40	15,99±1,02

TABELA 12. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com CF+DSS (1:1) irradiado com 5,0 kGy para o organismo *H. azteca*.

Cloridrato de fluoxetina + Dodecil Sulfato de Sódio (1:1) – 5,0 kGy		
Ensaio	CE50_{96h} (%)	UT
1	75,2 (71,7 – 78,8)	1,33
2	80,2 (71,1 – 90,4)	1,24
X ± S	77,70±3,54	1,29±0,06

As FIGURAS 23 - 25 ilustram, respectivamente, as taxas de sobrevivência dos organismos-teste expostos às diferentes concentrações-teste do fármaco CF não irradiado, CF irradiado com 5,0 kGy e CF irradiado com 10,0 kGy. O grupo controle contendo apenas água de diluição também está ilustrado em cada figura.

O asterisco caracteriza a presença de efeito à pelo menos 50% dos organismos expostos (CE50).

FIGURA 23. Percentual de sobrevivência do organismo *Hyalella azteca* nos ensaios de toxicidade aguda com o fármaco cloridrato de fluoxetina não irradiado.

FIGURA 24. Percentual de sobrevivência do organismo *Hyalella azteca* nos ensaios de toxicidade aguda com o fármaco cloridrato de fluoxetina irradiado com 5 kGy.

FIGURA 25. Percentual de sobrevivência do organismo *Hyalella azteca* nos ensaios de toxicidade aguda com o fármaco cloridrato de fluoxetina irradiado com 10 kGy.

Na FIGURA 26 está ilustrada a variação dos valores médios de $CE50_{96h}$ e os desvios-padrão obtidos para o organismo *Hyalella azteca* exposto ao fármaco CF, em função da dose de radiação aplicada à solução-teste.

Quando comparados os valores médios de $CE50_{96h}$ do CF não irradiado e do CF irradiado para *Hyalella azteca* é possível verificar que a solução-teste não irradiada apresentou maior grau de toxicidade. Tal fato caracteriza uma redução evidente da toxicidade do fármaco CF em solução-aquosa, após ser submetido à radiação por feixe de elétrons. A dose de 5 kGy se mostrou mais eficaz, em relação à dose de 10 kGy, quando comparados os valores médios de $CE50_{96h}$ e de Unidade Tóxica (UT). Porém é importante notar que os valores obtidos se encontram próximos entre si.

FIGURA 26. Variação da $CE50_{96h}$ do cloridrato de fluoxetina para *H. azteca* em função da dose aplicada (kGy).

Brooks *et al.* (2003), verificou que a mortalidade de *Hyaella azteca* exposta à sedimento marcado com cloridrato de fluoxetina, foi acentuada na faixa de 43 mg/kg, enquanto o crescimento deste organismo foi afetado na concentração de 5,6 mg/kg. Péry *et al.* (2008), também verificou efeito significativo sobre o crescimento de *Hyaella azteca* em função da exposição deste organismo à fluoxetina, na faixa de 33 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Tais efeitos, sobre crescimento e reprodução, são tratados como efeitos crônicos e não efeitos agudos.

Nas FIGURAS 27-29 estão ilustradas, respectivamente, as taxas de sobrevivência dos organismos-teste expostos às diferentes concentrações-teste do surfactante DSS, da mistura CF+DSS não irradiada e irradiada com 5,0 kGy, respectivamente. O grupo controle contendo apenas água de diluição também está ilustrado em cada figura.

O asterisco caracteriza a presença de efeito à pelo menos 50% dos organismos expostos (CE50).

FIGURA 27. Percentual de sobrevivência do organismo *Hyalella azteca* nos ensaios de toxicidade aguda com dodecil sulfato de sódio não irradiado.

FIGURA 28. Percentual de sobrevivência do organismo *Hyalella azteca* nos ensaios de toxicidade aguda com a mistura (CF + DSS) (1:1) não irradiada.

Observando as taxas de sobrevivência dos organismos-teste expostos à mistura CF+DSS (1:1) irradiada com 5,0 kGy (FIGURA 29), pode-se observar que, assim como o CF irradiado, houve uma redução da toxicidade em função do aumento da sobrevivência dos organismos expostos.

FIGURA 29. Percentual de sobrevivência do organismo *Hyalella azteca* nos ensaios de toxicidade aguda com a mistura (CF + DSS) (1:1) irradiada com 5,0 kGy.

Na FIGURA 30 está ilustrada a variação dos valores médios de $CE50_{96h}$ e os desvios-padrão obtidos para o organismo *Hyaella azteca* expostos ao surfactante DSS, o fármaco CF e à mistura CF+DSS.

Quando comparados os valores médios de $CE50_{96h}$ do CF e da mistura CF+DSS para *Hyaella azteca* é possível verificar que há uma semelhança do grau de toxicidade gerado. Estes resultados indicam que aparentemente não ocorreu potencialização dos efeitos destas substâncias, quando presentes em mesma solução, para o organismo *Hyaella azteca*.

É possível observar que o valor da média das $CE50_{96h}$ obtidas com DSS é maior, demonstrando menor toxicidade desta substância quando comparada ao fármaco (CF) e à mistura (CF + DSS) para o organismo-teste em questão. Tais resultados também indicam que não houve uma interação significativa entre o fármaco e o surfactante, evidenciando que a mistura na proporção de 1:1 entre o fármaco e o surfactante seguiu praticamente a mesma tendência de toxicidade gerada pelo fármaco sozinho em solução aquosa.

FIGURA 30. Variação da $CE50_{96h}$ do CF, do DSS e da mistura CF+DSS para *H. azteca*.

Diversos estudos prévios têm demonstrado efeitos ecotoxicológicos para organismos aquáticos devido à exposição à fluoxetina (Brooks *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 2004; Flaherty & Dodson, 2005; Christensen *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2007; Nentwig,

2007). Levantando a questão sobre os possíveis efeitos gerados que podem interferir nos diversos mecanismos do sistema nervoso destes organismos.

A fluoxetina é um inibidor seletivo da recaptação da serotonina e o uso desta substância aumenta a concentração de serotonina a qual está envolvida em uma grande variedade de funções fisiológicas, como a reprodução nos moluscos, comportamento e reflexos nos moluscos, e a produção de neuro-hormônios em crustáceos (Daughton & Ternes, 1999).

Como a serotonina modula uma ampla variedade de processos fisiológicos nos vertebrados e invertebrados aquáticos (Fong, 2001), alguns estudos com peixes teleósteos demonstraram alterações da resposta imunológica (Ferriere *et al.*, 1996), da reprodução (Khan & Thomas, 1992), da aclimação térmica (Tsai & Wang, 1997), da atividade de natação (Fingerman, 1976), da alimentação (Pedro *et al.*, 1998), e da agressividade (Adams *et al.*, 1996; Perreault *et al.*, 2003), destes organismos expostos à fluoxetina.

A redução de atividades comportamentais como taxa de alimentação revelaram conexões claras entre substâncias químicas bioativas e os níveis de organização biológica (Weis *et al.*, 2001). O aumento dos níveis de serotonina no cérebro têm sido demonstrado como fator de inibição do comportamento alimentar em peixes (Pedro *et al.*, 1998) e mamíferos (Blundell & Halford, 1998).

No entanto, além de induzir a hipofagia pelo aumento das concentrações de serotonina no cérebro, a fluoxetina é também relacionada com a indução da hipofagia via redução de concentrações do neuropeptídeo Y (NPY) (Dryden *et al.*, 1996). O NPY é um potente estimulante do apetite, causando hiperfagia carbolipídica-seletiva em seres humanos (Dryden *et al.*, 1996) e também é um dos neuropeptídeos cerebrais mais abundantes no hipotálamo de mamíferos (Dryden *et al.*, 1996), inclusive mostrando-se amplamente distribuídos no sistema nervoso central de várias espécies de peixes (Aldegunde & Manceboe, 2006).

Em invertebrados a serotonina desempenha um papel importante na fisiologia e comportamento, como agressividade em crustáceos (Huber *et al.*, 1997), a indução da desova em bivalves (Ram *et al.*, 1993) e natação em anelídeos (Brodfohrer *et al.*, 1995).

Ainda referente à inibição comportamental, Lange *et al.* (2006) observaram uma redução significativa da atividade de anfípodas *Gammarus pulex* expostos à concentração de 100 ng.L⁻¹ de fluoxetina, relacionando os efeitos encontrados com uma possível interferência deste fármaco sobre os reflexos musculares deste organismo.

Com relação aos surfactantes, Lange *et al.* (2006), também observaram um

aumento da inatividade de anfípodas *Gammarus pulex* e efeito agudo que causou imobilidade em concentrações de 10 mg.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹ do surfactante catiônico CTAB (do inglês *Cetyltrimethylammonium Bromide*). A diminuição da locomoção como resposta à exposição de *Gammarus pulex* ao CTAB foi explicado pelo efeito biocida dos surfactantes sobre os organismos aquáticos, pois são substâncias usadas como agentes desinfetantes, dentre outras várias aplicações.

Comparando os valores obtidos para o anfípoda *Gammarus pulex* quando expostos ao surfactante CTAB e ao fármaco fluoxetina (Lange *et al.*, 2006), pode-se observar uma maior toxicidade deste fármaco comparado ao surfactante CTAB. No presente estudo, os valores da média de CE50 obtidos para os organismos *Hyalella azteca* expostos ao DSS e ao CF, mostraram uma maior toxicidade aguda do fármaco CF em relação ao surfactante DSS, bem como não foi observado um aumento da toxicidade aguda quando analisada a mistura CF+DSS (1:1) para estes organismos.

No presente estudo foi observado que dentre os três organismos-teste empregados, *Hyalella azteca*, foi o que apresentou menor valor médio de CE50, isto pode estar relacionado ao maior tempo de exposição do ensaio (96 h), às diferenças fisiológicas específicas inerentes à cada espécie e também às vias metabólicas diferentes em cada organismo que possam ter sido alteradas pelo CF.

Em relação à alimentação de organismos-teste em ensaios de toxicidade, Sterner & Elser (2002); Hansen *et al.* (2008), observaram que a utilização de alimento rico em nutrientes (R.L.) nos ensaios de toxicidade aguda com *Hyalella azteca*, pode ter aumentado a toxicidade do CF em função de uma maior produção de serotonina. Outra possibilidade pode estar relacionada à mudança da via de exposição, pois o alimento pode ter agido como adsorvente para o fármaco, acumulando e sedimentando uma fração do mesmo (Arriaga, 2011).

Em outros estudos realizados com o bactericida Triclosan, Lameira (2008) e Pusceddu (2009) verificaram que ensaios com crustáceos da espécie *Ceriodaphnia dubia* alimentados com microalgas e composto de ração de peixe apresentaram maior sensibilidade a esta substância química do que quando empregadas apenas microalgas como alimento nos ensaios de toxicidade para esta espécie. Hansen *et al.* (2008) também observaram um aumento da toxicidade da fluoxetina para *Daphnia magna*, conforme maior quantidade de alimento rico em nutrientes era fornecido para este organismo.

5.3.2. Ensaios de toxicidade aguda para *Daphnia similis*

Os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, em 48 horas de exposição, foram realizados com o surfactante DSS, o fármaco CF, a mistura CF+DSS (1:1), estas duas últimas soluções foram também irradiadas com doses de 5 kGy e 10 kGy.

Os valores de CE50_{48h} obtidos para o organismo *Daphnia similis*, com as respectivas médias e desvios-padrão, para cada solução-teste estudada são apresentados nas TABELAS 13 – 18.

Os valores de CE50_{48h} apresentados com os símbolos < ou > e sem o intervalo de confiança indicam que as concentrações utilizadas no ensaio em questão não foram capazes de fornecer dados suficientes para o cálculo estatístico que estabelece o valor de CE50.

TABELA 13. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina para o organismo *D. similis*.

Cloridrato de Fluoxetina		
Ensaio	CE50 _{48h} (%)	UT
1	17,9 (15,7 – 20,4)	5,59
2	13,1 (11,8 – 14,4)	7,63
3	12,2 (10,9 – 13,7)	8,20
X ± S	14,40±3,06	7,14±1,37

TABELA 14. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 5,0 kGy para o organismo *D. similis*.

Cloridrato de Fluoxetina – 5,0 kGy		
Ensaio	CE50 _{48h} (%)	UT
1	82,2 (70,3 – 96,2)	1,21
2	85,6 (70,2 – 104,3)	1,16
3	86 (72,0 – 102,9)	1,16
X ± S	84,60±2,09	1,18±0,03

TABELA 15. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 10,0 kGy para o organismo *D.similis*.

Cloridrato de Fluoxetina – 10,0 kGy		
Ensaio	CE50_{48h} (%)	UT
1	69,5 (65,2 – 74)	1,43
2	66,5 (60,7 – 72,7)	1,50
3	84,0 (74,1 – 95,2)	1,19
4	83,4 (70 – 99,4)	1,19
X ± S	75,85±9,15	1,33±0,16

TABELA 16. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com dodecil sulfato de sódio para o organismo *D.similis*.

Dodecil Sulfato de Sódio		
Ensaio	CE50_{48h} (%)	UT
1	10,06 (8,86 – 11,44)	9,94
2	9,18 (8,21 – 10,26)	10,89
X ± S	9,62±0,62	10,42±0,67

TABELA 17. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS para o organismo *D. similis*.

Cloridrato de Fluoxetina + Dodecil Sulfato de Sódio (1:1)		
Ensaio	CE50_{48h} (%)	UT
1	14,8 (12,6 – 17,3)	6,76
2	12,8 (10,2 – 16,2)	7,81
X ± S	13,80±1,41	7,28±0,75

TABELA 18. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS irradiada com 5,0 kGy para o organismo *D. similis*.

Cloridrato de Fluoxetina + Dodecil Sulfato de Sódio (1:1) – 5,0 kGy		
Ensaio	CE50_{48h} (%)	UT
1	>90	<1,11
2	>90	<1,11
X ± S	-	-

Nas FIGURAS 31-33 estão ilustradas, respectivamente, as taxas de imobilidade dos organismos-teste expostos às diferentes concentrações-teste do fármaco CF não irradiado, CF irradiado com 5,0 kGy e CF irradiado com 10,0 kGy.

O grupo controle contendo apenas água de diluição também está ilustrado em cada figura. O asterisco caracteriza a presença de efeito à pelo menos 50% dos organismos expostos (CE50).

FIGURA 31. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com o fármaco cloridrato de fluoxetina não irradiado para *Daphnia similis*.

FIGURA 32. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com o fármaco cloridrato de fluoxetina irradiado com 5,0 kGy para *Daphnia similis*.

FIGURA 33. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com o fármaco cloridrato de fluoxetina irradiado com 10 kGy para *Daphnia similis*.

Na FIGURA 34 está ilustrada a variação dos valores médios de $CE50_{48h}$ e os desvios-padrão obtidos para o organismo *Daphnia similis* exposto ao fármaco CF, em função da dose de radiação aplicada à solução-teste.

FIGURA 34. Variação da $CE50_{48h}$ do CF para *D. similis* em função da dose aplicada (kGy).

Quando comparados os valores médios de $CE50_{48h}$ do CF não irradiado e do CF irradiado para *Daphnia similis* é possível verificar que a solução-teste não irradiada, assim como foi constatado para o organismo *Hyalella azteca*, apresentou maior grau de toxicidade. Tal fato caracteriza uma redução visível da toxicidade do fármaco CF em

solução-aquosa, após ser submetido à radiação por feixe de elétrons.

A dose de 5,0 kGy para *Daphnia similis*, também se mostrou mais eficaz, em relação à dose de 10,0 kGy, quando comparados os valores médios de CE50_{48h} e de Unidade Tóxica (UT).

Nas FIGURAS 35-37 estão ilustradas as taxas de imobilidade dos organismos-teste expostos às diferentes concentrações-teste do surfactante DSS, da mistura CF+DSS não irradiado e irradiado com 5,0 kGy, respectivamente. O grupo controle contendo apenas água de diluição também está ilustrado em cada FIGURA. O asterisco caracteriza a CE50, onde pelo menos 50% dos organismos expostos sofreram efeito agudo.

FIGURA 35. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com o surfactante dodecil sulfato de sódio para *Daphnia similis*.

FIGURA 36. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS (1:1) para *Daphnia similis*.

Os resultados de CE50 encontrados em trabalhos prévios para *Daphnia magna* expostos ao DSS variaram entre 14,5 mg.L⁻¹ e 28,8 mg.L⁻¹ (Villegas - Navarro *et al.*, 1999; Sandbacka *et al.*, 2000). A média dos valores de CE50_{48h} obtida no presente trabalho esteve próxima dos valores observados por estes autores, apesar de terem sido utilizados organismos de espécies diferentes e tempos de exposição diferentes.

Romanelli *et al.* (2004), encontrou CE50 média de 5,21 mg.L⁻¹ do DSS para *Daphnia similis* expostos por 48 horas, enquanto que a média dos valores de CE50_{48h} obtida no presente estudo foi de 9,62 mg.L⁻¹.

De forma geral, o organismo *Daphnia similis* foi mais sensível ao DSS em relação aos organismos utilizados em outros trabalhos, porém quando comparados os valores obtidos com os valores do estudo de Romanelli (2004) nota-se que há uma redução da sensibilidade deste organismo (*Daphnia similis*), que pode ter ocorrido em função da mudança da água de diluição ou de diferenças entre as substâncias químicas utilizadas.

FIGURA 37. Porcentagem de imobilidade obtida com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS (1:1) irradiada com 5,0 kGy para *Daphnia similis*.

Observando as taxas de sobrevivência dos organismos-teste expostos à mistura CF+DSS irradiada com 5,0 kGy (FIGURA 37), pode-se afirmar que, assim como aconteceu no CF irradiado, houve uma redução da toxicidade em função do aumento da sobrevivência dos organismos expostos. Não foi possível encontrar a faixa de concentração-teste que gerasse efeito à 50% dos organismos expostos, apenas pode-se observar que há indício de efeito agudo em função do início de uma mortalidade na concentração de 9,0 mg.L⁻¹.

Na FIGURA 38 está ilustrada a variação dos valores médios de $CE50_{48h}$ e os desvios-padrão obtidos com o organismo *Daphnia similis* para o surfactante DSS, o fármaco CF e a mistura CF+DSS.

FIGURA 38. Variação da $CE50_{48h}$ do cloridrato de fluoxetina, do dodecil sulfato de sódio e da mistura CF+DSS para *D. similis*.

Quando comparados os valores médios de $CE50_{48h}$ do CF e da mistura CF+DSS para este organismo é possível verificar que toxicidade aguda gerada encontra-se na faixa compreendida entre 1 mg.L^{-1} e 2 mg.L^{-1} , não ocorrendo portanto uma potencialização significativa dos efeitos destas substâncias, quando presentes na mesma solução.

É possível observar que o valor da média das $CE50_{48h}$ obtidas do DSS é maior mostrando como esta substância é menos tóxica para o organismo-teste em questão. Ficou claro que a mistura na proporção de 1:1 entre o fármaco e o surfactante seguiu praticamente a mesma tendência de toxicidade gerada pelo fármaco sozinho em solução aquosa, assim como ocorrido para o organismo *Hyalella azteca*.

Stanley *et al.* (2007) encontrou a concentração de efeito observado (CEO) em $0,44 \text{ mg.L}^{-1}$ para *Daphnia magna* exposta à fluoxetina, por um período de 21 dias, avaliando a mortalidade e imobilidade desta espécie. Tal resultado encontra-se abaixo dos valores médios encontrados neste estudo para *Daphnia similis* exposta ao CF, porém cabe lembrar que o tempo de exposição à este fármaco também foi muito menor (48h), quando comparado aos ensaios realizados por Stanley *et al.* (2007) durante 21 dias.

Outros resultados com *Daphnia magna* expostas à fluoxetina demonstraram que a taxa reprodutiva foi três vezes maior na concentração de $36 \mu\text{g.L}^{-1}$ do que o grupo controle, após um período de exposição de 30 dias, indicando a ocorrência do fenômeno conhecido como hormese. A hormese é uma resposta adaptativa a níveis baixos de estresse que resultam na melhoria da capacidade fisiológicas do organismo durante um período curto e finito (Calabrese & Baldwin, 2002; Flaherty & Dodson, 2005).

Stanley *et al.* (2007) também obteve resultados de toxicidade aguda, para o teleosteo *Pimephales promelas* expostos durante 48h à fluoxetina, que variaram entre $0,19 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,21 \text{ mg.L}^{-1}$ quando observada a taxa de mortalidade para este organismo.

Outros estudos demonstraram que a exposição ao fármaco cloridrato de fluoxetina pode gerar diversos efeitos subletais a cladóceros expostos por longo períodos.

Flaherty & Dodson (2005) observaram um aumento da taxa de reprodução de *Daphnia magna*, exposta à fluoxetina durante 30 dias, bem como sugeriram que a exposição a este fármaco pode gerar um aumento na quantidade mínima de alimento disponível necessária para a sobrevivência deste organismo. Enquanto Brooks *et al.* (2003), observaram um aumento da fecundidade de *Ceriodaphnia dubia* exposta à fluoxetina durante 7 dias.

O fato da Serotonina, estimular ecdisteróides, ecdisona e outros hormônios, bem como regular a ovogênese e a muda em invertebrados, faz com que a exposição de organismos aquáticos à fluoxetina se torne de extrema preocupação uma vez que esta age no aumento dos níveis de serotonina (Nation, 2002 *apud* Flaherty & Dodson, 2005).

Flaherty & Dodson (2005), também demonstraram que a mistura de concentrações baixas de fluoxetina ($36 \mu\text{g.L}^{-1}$) e ácido clofibríco ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$), que aparentemente não apresentaram efeitos agudos quando testados individualmente para *Daphnia magna*, geraram mortalidade significativa após seis dias de exposição. Com isso, concluíram que uma possibilidade é que a fluoxetina e o ácido clofibríco atingem vias metabólicas similares ou talvez ocorra uma inibição da biotransformação do ácido clofibríco em função da fluoxetina (ou vice-versa).

Seguindo a mesma linha de raciocínio destes autores é possível dizer que a mistura (CF+DSS) utilizada no presente estudo, tanto para *Hyaella azteca* quanto para *Daphnia similis*, não apresentou toxicidade aparentemente maior em relação aos compostos individualmente, quando comparados os valores das médias de CE50, pois as vias metabólicas afetadas pelo DSS e pelo CF podem ser diferentes, não ocorrendo sinergismo.

A sensibilidade é outro fator importante que pode explicar as diferenças entre os muitos resultados encontrados na literatura, uma vez que ela diverge de espécie para espécie, inclusive valores diferentes podem ser encontrados para uma mesma espécie, caracterizando a importância da carta controle e dos resultados obtidos com os ensaios de sensibilidade.

5.4. Ensaios de toxicidade aguda para *Vibrio fischeri*

Os ensaios de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*, com 15 minutos de exposição, foram realizados com o surfactante DSS, o fármaco CF, a mistura CF+DSS (1:1), onde estas duas últimas soluções foram também irradiadas com doses de 1,0 kGy, 2,5 kGy, 5 kGy, 7,5 kGy e 10 kGy.

Como os valores de $CE50_{15min}$ são indiretamente proporcionais à toxicidade, com os valores obtidos para as soluções não irradiadas e irradiadas, foi possível observar uma redução da toxicidade aguda.

Os resultados obtidos (TABELAS 19-27) mostram os valores de $CE50_{15min}$ para o organismo *Vibrio fischeri*, com as respectivas médias e desvios-padrão para cada solução-teste estudada.

TABELA 19. Valores de $CE50$ e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina para o organismo *V. fischeri*.

Cloridrato de Fluoxetina		
Ensaio	$CE50_{15min}$ (%)	UT
1	7,6 (1,8 – 30,6)	13,16
2	9,2 (3,8 – 22,5)	10,87
3	3,9 (1,5 – 9,7)	25,64
$\bar{X} \pm S$	$6,90 \pm 2,72$	$16,56 \pm 7,95$

TABELA 20. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 1,0 kGy para o organismo *V. fischeri*.

Cloridrato de Fluoxetina – 1,0 kGy		
Ensaio	CE50 _{15min} (%)	UT
1	16,9 (7,1 – 40,3)	5,92
2	15,8 (4,5 – 55,0)	6,33
3	29,3 (5,0 – 171,8)	3,41
4	49,9 (38,4 – 64,8)	2,00
X ± S	27,98±15,85	4,42±2,06

TABELA 21. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 2,5 kGy para o organismo *V. fischeri*.

Cloridrato de Fluoxetina – 2,5 kGy		
Ensaio	CE50 _{15min} (%)	UT
1	25,6 (10,8 – 60,6)	3,91
2	21,3 (6,6 – 68,3)	4,69
3	24,4 (5,8 – 101,9)	4,10
4	51,3 (32,4 – 81,1)	1,95
X ± S	30,65±13,89	3,66±1,19

TABELA 22. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 5,0 kGy para o organismo *V. fischeri*.

Cloridrato de Fluoxetina – 5,0 kGy		
Ensaio	CE50 _{15min} (%)	UT
1	25,1 (5,0 – 124,7)	3,98
2	23,8 (4,4 – 126,7)	4,20
3	26,9 (7,1 – 101,6)	3,72
4	55,7 (30,1 – 103,0)	1,80
X ± S	32,88±15,27	3,42±1,10

TABELA 23. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 7,5 kGy para o organismo *V. fischeri*.

Cloridrato de Fluoxetina – 7,5 kGy		
Ensaio	CE50_{15min} (%)	UT
1	30,8 (2,7 – 340,1)	3,25
2	16,2 (4,6 – 57,0)	6,17
3	32,2 (12,0 – 86,2)	3,11
4	47,8 (29,9 – 76,4)	2,09
X ± S	26,40±12,92	4,18±1,76

TABELA 24. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com cloridrato de fluoxetina irradiado com 10 kGy para o organismo *V. fischeri*.

Cloridrato de Fluoxetina – 10,0 kGy		
Ensaio	CE50_{15min} (%)	UT
1	17,1 (5,5 – 53,1)	5,85
2	19,0 (6,9 – 52,7)	5,26
3	22,5 (7,9 – 63,9)	4,44
4	51,7 (28,3 – 94,5)	1,93
X ± S	27,58±16,24	4,37±1,72

TABELA 25. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com dodecil sulfato de sódio para o organismo *V. fischeri*.

Dodecil Sulfato de Sódio		
Ensaio	CE50_{15min} (%)	UT
1	16,7 (12,3 – 22,6)	6,37
2	6,0 (5,5 – 6,5)	16,67
3	6,5 (5,8 – 7,4)	15,38
X ± S	9,40±4,46	12,81±4,58

TABELA 26. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS (1:1) para o organismo *V. fischeri*.

Cloridrato de Fluoxetina + Dodecil Sulfato de Sódio (1:1)		
Ensaio	CE50_{15min} (%)	UT
1	2,9 (0,6 – 13,4)	34,48
2	3,0 (0,8 – 11,8)	32,33
3	3,0(0,7 – 12,4)	33,33
X ± S	2,97±0,05	33,72±0,54

TABELA 27. Valores de CE50 e UT obtidos com os ensaios de toxicidade aguda com a mistura CF+DSS (1:1) irradiada com 5,0 kGy para o organismo *V. fischeri*.

Cloridrato de Fluoxetina + Dodecil Sulfato de Sódio (1:1) – 5,0 kGy		
Ensaio	CE50_{15min} (%)	UT
1	21,9 (4,0 – 114,5)	4,57
2	25,7 (5,4 – 121,1)	3,89
3	26,2 (5,2 – 131,7)	3,82
4	44,1 (32,5 – 59,9)	2,27
X ± S	29,48±9,94	3,64±3,64

Na FIGURA 39 está ilustrada a variação dos valores médios de CE50_{15min} e os desvios-padrão obtidos para o organismo *Vibrio fischeri* exposto ao fármaco CF, em função da dose de radiação aplicada à solução-teste.

Quando comparados os valores médios de CE50_{15min} do CF não irradiado e do CF irradiado para *Vibrio fischeri* é possível verificar que a solução-teste não irradiada, assim como foi constatado para os organismos *Hyalella azteca* e *Daphnia similis*, apresentou maior grau de toxicidade. Tal fato caracteriza uma redução visível da toxicidade do fármaco CF presente em solução-aquosa, após ser submetido à radiação por feixe de elétrons.

A dose de 5,0 kGy para *Vibrio fischeri*, também se mostrou mais eficaz, em relação às outras doses aplicadas, quando comparados os valores médios de CE50_{15min} e de Unidade Tóxica (UT).

FIGURA 39. Variação da CE50_{15min} do cloridrato de fluoxetina para *V. fischeri* em função da dose aplicada (kGy).

O valor da média de CE50_{15min} obtida no presente estudo para *Vibrio fischeri* expostos ao DSS foi de 0,94 mg.L⁻¹, enquanto Romanelli, (2004) obteve CE50 (15min) de 1,92 mg.L⁻¹, para *Vibrio fischeri* expostos ao DSS.

Para este organismo exposto ao fármaco CF foi obtido valor médio de CE50_{15min} de 0,69 mg.L⁻¹, caracterizando o fármaco como mais tóxico quando comparado ao DSS (FIGURA 40).

Dos três organismos-teste utilizados nos ensaios de toxicidade aguda do presente estudo, a bactéria marinha *Vibrio fischeri* foi o único organismo que apresentou um aumento aparente da toxicidade aguda, aproximadamente 2 vezes maior, para a mistura CF+DSS (FIGURA 40). Tal resultado pode ser explicado pelo fato da fluoxetina ser uma molécula hidrofóbica capaz de alterar as membranas celulares (Curti *et al.*, 1999), uma vez que as bactérias são organismos unicelulares e a mistura de fármacos tem-se mostrado mais tóxicas para este organismo em função de sua elevada sensibilidade aos diversos compostos bioativos (Backhaus *et al.*, 2000; Cleuvers, 2003, 2004; Christensen *et al.*, 2006; Escher *et al.*, 2010).

O mecanismo de toxicidade do DSS também é relacionado com a destruição de estruturas membranosas das células. Tem sido sugerido que o DSS causa peroxidação lipídica, aumento da produção de glutathione e alterações no metabolismo do carbono (Romanelli, 2004; Sirisattha *et al.*, 2004).

FIGURA 40. Variação da CE50_{15min} do CF, do DSS e da mistura CF+DSS, irradiada e não irradiada para *V. fischeri*.

5.5. Ensaios de sensibilidade e carta-controle

Os ensaios de sensibilidade foram realizados com a substância KCl para os crustáceos, *Daphnia similis* e *Hyalella azteca*, e com fenol para a bactéria marinha *Vibrio fischeri*.

O ensaio de sensibilidade tem como objetivo verificar se os organismos estão em condições para serem utilizados em ensaios de toxicidade. Neste tipo de ensaio é feito o controle das condições fisiológicas da espécie frente a uma substância de referência, verificando-se a imobilidade ou a mortalidade (Jaconetti, 2005).

Nas FIGURAS 41 - 43 estão apresentadas as cartas-controle, feitas a partir dos resultados de CE50 obtidos para *Daphnia similis* e *Hyalella azteca* e *Vibrio fischeri*, respectivamente.

Pode ser observado que nenhum dos ensaios realizados apresentou valores abaixo ou acima da faixa de sensibilidade.

FIGURA 41. Carta controle dos ensaios de sensibilidade com KCl para *Daphnia similis*.

FIGURA 42. Carta controle dos ensaios de sensibilidade com KCl para *Hyalella azteca*.

FIGURA 43. Carta controle dos ensaios de sensibilidade com fenol para *Vibrio fischeri*.

5.6. Análise espectrofotométrica

Com intuito de relacionar a redução da toxicidade do fármaco cloridrato de fluoxetina, com a degradação de sua molécula após a irradiação, foi realizada a análise por espectrofotometria na faixa do UV – visível da solução inicial e após exposição.

De acordo com a literatura, as bandas de absorbância de uma substância na faixa de comprimento de onda de 190 a 300 nm representam as ligações duplas e triplas conjugadas da molécula (Holler, *et al.*, 2009).

No presente estudo, bem como observado previamente por Nery *et al.* (2008), a molécula de CF apresentou a banda de absorbância em comprimento de onda de 227 nm (FIGURA 44). Contudo, não foi registrado pelo espectrofotômetro nenhum pico de absorbância referente ao DSS (FIGURA 44), pois o mesmo não apresenta em sua estrutura grupos cromóforos capazes de absorver radiação ultravioleta. Para a mistura CF+DSS, observou-se redução do pico de absorbância (FIGURA 44) relacionado à absorção do CF.

Após irradiação das soluções aquosas mencionadas acima, exceto para o DSS, observou-se alterações nos espectros de absorção tanto para o CF quanto para a mistura CF+DSS (FIGURA 44).

FIGURA 44. Espectro de absorção (UV – visível) das soluções de cloridrato de fluoxetina, irradiadas e não irradiadas.

Para o CF irradiado, quanto maior a dose de radiação aplicada menor a absorbância na faixa de 227 nm. Tal fato pode estar associado a quebra das ligações duplas

presentes nos dois anéis aromáticos da molécula em questão, indicando que a radiação ionizante ou os agentes oxidantes (radicais livres), obtidos pela radiólise da água, podem agir sobre essas ligações duplas, modificando a molécula precursora (Melo *et al.*, 2009; Homlok *et al.*, 2011).

Segundo Varshney & Patel (1994), várias modificações estruturais foram observadas quando comparados os cromatogramas obtidos pela técnica de HPLC do fármaco cloranfenicol não irradiado e irradiado por feixe de elétrons. Tais modificações foram justificadas, pois o fármaco em questão após irradiação foi fragmentado em espécies com pesos moleculares menores, portanto menos polares e com tempos de eluição diferentes ao observado para a molécula precursora.

Homlok *et al.*, 2011 verificaram uma modificação da faixa de absorbância para o fármaco diclofenaco, após este ser irradiado em solução aquosa, associando esta mudança à uma possível modificação estrutural da molécula precursora.

Já para o DSS não foi possível observar a formação de nenhum pico pela análise espectrofotométrica (UV – visível) (FIGURA 45), provavelmente por essa substância não apresentar insaturações em sua molécula.

FIGURA 45. Espectro das soluções de dodecil sulfato de sódio e da mistura (CF +DSS) irradiada e não irradiada.

5.7. Avaliação da eficiência do tratamento por radiação ionizante

A avaliação da eficácia do tratamento por radiação ionizante foi feita com base nas médias dos valores de unidade tóxica (UT) obtidas antes e depois da irradiação das soluções-teste analisadas (TABELAS 28 - 30). Observando estas tabelas pode-se notar que a radiação ionizante se mostrou eficiente na redução da toxicidade aguda do fármaco CF e da mistura CF+DSS, obtida para os organismos utilizados.

Para os três organismos-teste empregados nos ensaios de toxicidade com o CF, a dose de 5,0 kGy foi a que apresentou maior eficiência, gerando os seguintes valores de redução de toxicidade aguda, 91,95 %, 82,97 % e 79,21 %, para *Hyalella azteca*, *Daphnia similis* e *Virbio fischeri*, respectivamente.

Para a mistura CF+DSS foi utilizada apenas a dose de 5,0 kGy, com base nos resultados apresentados acima e pode-se observar que os valores de redução de toxicidade aguda obtidos, 91,89 %, 87,57 e 89,10, para *Hyalella azteca*, *Daphnia similis* e *Virbio fischeri*, respectivamente, estiveram próximos dos valores de redução de toxicidade do fármaco CF individualmente.

Em trabalho prévio de Romanelli *et al.* (2004), que avaliou a redução da toxicidade aguda de surfactantes (DSS e LAS) para *Daphnia similis* expostas por 48 horas, foi observada a maior eficiência da redução da toxicidade do DSS e do LAS, irradiados com feixe de elétrons, nas doses de 6,0 kGy e 3,0 kGy e 6,0 kGy, respectivamente.

Estes resultados mostram que a dose ótima de radiação com feixe de elétrons para substâncias orgânicas em solução aquosa provavelmente está entre 3,0 kGy e 6,0 kGy, comprovando que o resultados obtidos no presente trabalho com a dose 5,0 kGy corroboram com os resultados acima citados.

Borrely (2001), observou a redução gradual da toxicidade aguda pela irradiação por feixe de elétrons, entre 75% e 95%, em função do aumento das doses aplicadas, entre 5kGy e 50kGy, sobre efluentes de ETE para *Daphnia similis*, *Vibrio fischeri* e *Poecilia reticulata*. O mesmo não foi observado para o fármaco CF e a mistura CF+DSS, já que com o aumento da dose de radiação e a eficiência de redução da toxicidade aguda seguiu uma tendência decrescente conforme se aumentou a dose aplicada.

Tal fato pode ter ocorrido, em função de misturas muito complexas, como é o caso de efluentes de ETEs, talvez exigirem maior quantidade de energia, maiores doses (kGy), para redução de toxicidade em função da degradação de contaminantes orgânicos.

TABELA 28. Redução (%) da toxicidade aguda para *H. azteca* em função da dose (kGy) aplicada.

Solução-teste	UT (média)	% Redução
CF	17,96	-
CF - 5 kGy	1,43	91,95
CF - 10 kGy	1,44	91,90
DSS	5,20	-
CF+DSS	15,99	-
CF+DSS - 5,0 kGy	1,29	91,89

TABELA 29. Redução (%) da toxicidade aguda para *D. similis* em função da dose (kGy) aplicada.

Solução-teste	UT (média)	% Redução
CF	7,14	-
CF - 5 kGy	1,18	82,97
CF - 10 kGy	1,33	81,03
DSS	10,42	-
CF+DSS	7,28	-
CF+DSS - 5,0 kGy	<1,11	> 87,57

TABELA 30. Redução (%) da toxicidade aguda para *V. fischeri* em função da dose (kGy) aplicada.

Solução-teste	UT (média)	% Redução
CF	16,56	-
CF - 1,0 kGy	4,42	73,20
CF - 2,5 kGy	3,66	78,24
CF - 5 kGy	3,42	79,21
CF - 7,5 kGy	4,18	74,66
CF - 10 kGy	4,37	73,49
DSS	12,81	-
CF+DSS	33,72	-
CF+DSS - 5,0kGy	3,64	89,10

Romanelli (2004), observou também que de uma forma geral a eficiência da redução da toxicidade crônica dos surfactantes, para *Ceriodaphnia dubia* expostas durante 7 dias, foi inferior à eficiência de redução da toxicidade aguda, para *Daphnia similis*. Relacionando estes resultados ao fato de os subprodutos formados na degradação dos surfactantes pela radiação ionizante poderem ter sido mais nocivos em tempos de exposição mais prolongados.

Com isso pode-se concluir que a redução da toxicidade aguda, para os organismos-teste empregados neste estudo, está relacionada à degradação das moléculas de CF e das moléculas da mistura CF+DSS após serem expostas à radiação ionizante.

Este fato pode ser explicado por duas hipóteses, a primeira refere-se à

formação de subprodutos com menor grau de toxicidade quando comparados ao CF não irradiado. A segunda hipótese sugere a formação de subprodutos com maior toxicidade, porém em concentrações abaixo das que poderiam gerar efeito agudo maior ou igual ao observado para o CF não irradiado.

5.8. Cloridrato de fluoxetina e regulamentação

O cloridrato de fluoxetina tem sido comercializado por mais de 35 anos, e seu uso e prescrição tem aumentado ao longo do tempo. Além disso, diversos fármacos genéricos de formulação semelhantes também tem sido cada vez mais comercializados.

No sentido de garantir um nível elevado de proteção a saúde humana e ao meio ambiente, a União Européia colocou em prática o sistema REACH (“Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances”), um sistema integrado único de registro, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas, e criou a Agência Européia de Substâncias Químicas. Esta política (REACH) obriga as empresas que fabricam (quando o volume produzido ultrapassa o valor de 1 tonelada por ano) e importam substâncias químicas, a avaliar os riscos decorrentes da utilização das mesmas e a tomar medidas necessárias para gerir todos os riscos que identificarem (Cortez, 2011).

Aliada a esta política está a diretiva européia 93/67/EEC de 1993, que classifica as substâncias de acordo com resultados de toxicidade (CE50, CI50) para organismos aquáticos.

Esta diretiva classifica as diferentes substâncias químicas como “extremamente tóxicas” quando se obtém $CE50 < 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, “muito tóxicas” se $0,1 \leq CE50 \leq 1 \text{ mg.L}^{-1}$, “tóxicas” quando $1 \leq CE50 \leq 10 \text{ mg.L}^{-1}$, “perigosas” $10 \leq CE50 \leq 100 \text{ mg.L}^{-1}$ e quando obtidos valores de CE50 acima de 100 mg.L^{-1} são consideradas “não tóxicas” (CEC, 1996; Cleuvers, 2004). Assim, na TABELA 31 é apresentada a classificação do cloridrato de fluoxetina e do dodecil sulfato de sódio, quando tomada como referência a diretiva européia 93/67/EEC de 1993.

TABELA 31. Classificação do CF e do DSS, para os organismos aquáticos *Hyalella azteca*, *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*, com base na diretiva européia 93/67/EEC de 1993 e segundo os resultados de CE50 encontrados no presente estudo.

	<i>Hyalella azteca</i>	<i>Daphnia similis</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
DSS	perigosa	tóxica	tóxica
CF	muito tóxica	tóxica	muito tóxica

6. CONCLUSÕES

- O cloridrato de fluoxetina apresentou toxicidade mais elevada que o surfactante dodecil sulfato de sódio (DSS) para os três organismos - teste. A mistura de ambas substâncias resultou em valores muito próximos àqueles obtidos para o cloridrato de fluoxetina (CF).
- O anfípoda *Hyalomma azteca* foi o organismo-teste que se mostrou mais sensível ao CF para efeito de toxicidade aguda. Enquanto o organismo *Vibrio fischeri* demonstrou maior sensibilidade ao DSS e à mistura CF+DSS (1:1).
- Não foi observado sinergismo entre a mistura CF+DSS (1:1), quando comparados os valores de CE50 obtidos para cada organismo-teste empregado neste estudo. Apenas o organismo *Vibrio fischeri* apresentou maior sensibilidade à mistura CF+DSS (1:1), quando comparado ao fármaco cloridrato de fluoxetina.
- Houve redução da toxicidade aguda do CF, em todas as doses de radiação ionizante empregadas para as três espécies de organismos-teste utilizados.
- A dose 5 kGy reduziu a toxicidade do cloridrato de fluoxetina em 92%, para *Hyalomma azteca*; praticamente o mesmo percentual de redução foi obtido para a mistura irradiada com 5 kGy.
- As análises espectrofotométricas na faixa do UV – visível indicaram uma modificação estrutural da molécula de cloridrato de fluoxetina, quando em solução aquosa, após ser exposta à radiação por feixe de elétrons.

7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os baixos valores de CE50 obtidos neste estudo para o fármaco cloridrato de fluoxetina, para os três organismos empregados, fortalecem a crescente preocupação com a presença desta substância química no ambiente aquático. Não apenas por poderem causar efeitos deletérios à da biota aquática mesmo que em quantidades pequenas, mas pela capacidade de interferir nos processos de tratamento biológico de efluentes que utilizam principalmente bactérias.

Com isso, o emprego de radiação ionizante como pré-tratamento de efluentes contaminados por substâncias orgânicas se mostra uma alternativa potencialmente vantajosa, visto que as doses aplicadas para tanto são relativamente baixas, auxiliando por tanto não apenas na redução da toxicidade destes afluentes para organismos aquáticos, mas também auxiliando na redução da toxicidade destas substâncias para organismos que atuam nos processos de tratamento biológico de ETEs.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Fichas-controle para os ensaio de toxicidade aguda com *Hyalella Azteca*.

		ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA																
Início				Término				Água de diluição										
Data: 11/05/10		Hora: 16:00		Data: 15/05/10		Hora: 16:00		pH: 7,16		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto – SP						
Organismo – teste: <i>Hyalella Azteca</i>				Método: CF – Ensaio Agudo 96h				Operador: Dymes										
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Dia da leitura	Réplicas										Total de Adultas Vivas	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10							
Controle	1º 13/05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10	7,16	7,98	7,60	7,12	195,0	215,0
	2º 15/05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
	3º																	
	4º																	
0,15	1º 13/05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10	7,96	7,92	7,70	7,21	182,0	200,0
	2º 15/05	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	9						
	3º																	
	4º																	
0,30	1º 13/05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10	7,93	7,88	7,80	7,21	168,0	188,0
	2º 15/05	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	8						
	3º																	
	4º																	
0,60	1º 13/05	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10	7,91	7,82	7,84	7,19	166,0	184,2
	2º 15/05	.	+	+	.	.	.	+	.	.	.	7						
	3º																	
	4º																	
1,25	1º 13/05	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	9	7,86	7,78	7,69	6,86	145,0	158,0
	2º 15/05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0						
	3º																	
	4º																	
2,5	1º 13/05	+	.	.	.	.	.	.	+	.	+	7	7,70	7,58	7,68	7,18	85,0	108,1
	2º 15/05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0						
	3º																	
	4º																	

Observações: 1) CE50 → 0,64 (0,45 – 0,90)
2) TRIM: 10%

		ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA																	
Início						Término						Água de diluição							
Data: 14/12/10		Hora:11:00				Data: 18/12/10		Hora: 11:00				pH: 7,53		Dureza: 45 mg CaCo ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto – SP			
Organismo – teste: <i>Hyalella Azteca</i>						Método: CF – 10 mg.L ⁻¹ 5kGy - 96h						Operador: Dymes							
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Dia da leitura	Réplicas										Total de Adultas Vivas	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10								
Controle	1º 15/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,53	7,86	7,44	6,98	170,2	205,2	
	2º 16/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	3º 17/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	4º 18/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
1,7	1º 15/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,83	7,82	7,44	7,08	148,8	188,0	
	2º 16/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	3º 17/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	4º 18/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
2,6	1º 15/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,78	7,79	7,49	7,06	132,9	176,5	
	2º 16/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	3º 17/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	4º 18/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
4,0	1º 15/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,63	7,66	7,60	7,12	102,7	117,5	
	2º 16/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	3º 17/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	4º 18/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
6,0	1º 15/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,33	7,15	7,61	7,13	58,8	90,7	
	2º 16/12	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	9							
	3º 17/12	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	8							
	4º 18/12	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	8							
9,0	1º 15/12	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	6	7,09	7,37	7,57	7,09	50,2	69,3	
	2º 16/12	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	3							
	3º 17/12	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	3							
	4º 18/12	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	3							
Observações: 1) CE50 → 7,02 (5,45 – 9,06) 2) TRIM: 20%																			

		ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA																
Início				Término								Água de diluição						
Data: 30/03/11		Hora: 17:00		Data: 03/04/11		Hora: 17:00		pH: 8,0		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto – SP						
Organismo – teste: <i>Hyalella Azteca</i>				Método: CF – 10 mg.L ⁻¹ 5kGy - 96h								Operador: Dymes						
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Dia da leitura	Réplicas										Total de Adultas Vivas	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10							
Controle	1º 31/03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	8,00	8,04	7,40	7,04	172,0	199,5
	2º 01/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
	3º 02/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
	4º 03/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
1,7	1º 31/03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	7,79	7,82	7,25	6,98	132,3	168,9
	2º 01/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
	3º 02/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
	4º 03/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
2,6	1º 31/03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	7,73	7,82	7,23	6,97	128,6	172,3
	2º 01/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
	3º 02/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
	4º 03/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
4,0	1º 31/03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	7,67	7,70	7,28	6,91	107,0	150,0
	2º 01/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
	3º 02/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
	4º 03/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
6,0	1º 31/03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	7,29	7,63	7,45	7,12	75,4	119,7
	2º 01/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10						
	3º 02/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9						
	4º 03/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8						
9,0	1º 31/03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	7,28	7,59	7,49	7,16	45,1	66,4
	2º 01/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1						
	3º 02/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1						
	4º 03/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0						
Observações: 1) CE50 → 6,78 (6,12 – 7,51) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 0%																		

		ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA																	
Início				Término								Água de diluição							
Data: 08/02/11		Hora:11:00		Data: 12/02/11		Hora: 11:00		pH: 7,97		Dureza: 45 mg CaCo ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto – SP							
Organismo – teste: <i>Hyalella Azteca</i>				Método: CF – 10 mg.L ⁻¹ 10kGy - 96h								Operador: Dymes							
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Dia da leitura	Réplicas										Total de Adultas Vivas	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10								
Controle	1º 09/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,97	8,04	7,40	7,09	175,0	200,1	
	2º 10/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	3º 11/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	4º 12/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
1,7	1º 09/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,68	7,81	7,27	7,01	131,8	165,9	
	2º 10/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	3º 11/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	4º 12/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
2,6	1º 09/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,62	7,83	7,25	6,99	128,0	164,5	
	2º 10/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	3º 11/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	4º 12/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
4,0	1º 09/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,63	7,71	7,25	6,98	106,6	149,5	
	2º 10/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	3º 11/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	4º 12/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
6,0	1º 09/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,39	7,60	7,30	7,09	75,06	120,1	
	2º 10/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	3º 11/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	4º 12/02	+	*	*	*	*	+	*	*	*	*	*							8
9,0	1º 09/02	*	+	+	+	+	*	+	+	+	+	*	7	7,31	7,56	7,28	7,11	45,9	70,1
	2º 10/02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0						
	3º 11/02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0						
	4º 12/02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0						
Observações: 1) CE50 → 7,06 (6,53 – 7,62) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 0%																			

		ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA																	
Início				Término								Água de diluição							
Data: 15/03/11		Hora: 17:00		Data: 19/03/11		Hora: 17:00		pH: 7,97		Dureza: 45 mg CaCo ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP							
Organismo – teste: <i>Hyalella Azteca</i>				Método: CF – 10 mg.L ⁻¹ 10kGy - 96h								Operador: Dymes							
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Dia da leitura	Réplicas										Total de Adultas Vivas	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10								
Controle	1º 09/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,97	7,87	7,40	7,21	175,0	184,8	
	2º 10/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	3º 11/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	4º 12/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
1,7	1º 09/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,68	7,23	7,27	7,23	131,8	163,3	
	2º 10/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	3º 11/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	4º 12/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
2,6	1º 09/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,62	7,23	7,25	7,23	128,0	147,6	
	2º 10/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	3º 11/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	4º 12/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
4,0	1º 09/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,63	7,25	7,25	7,25	106,6	114,3	
	2º 10/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	3º 11/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	4º 12/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	+							9
6,0	1º 09/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,39	7,29	7,30	7,29	75,06	91,1	
	2º 10/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	3º 11/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10							
	4º 12/02	*	*	+	*	*	*	*	*	*	*	*							9
9,0	1º 09/02	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,31	7,43	7,28	7,43	45,9	35,9	
	2º 10/02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							0
	3º 11/02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							0
	4º 12/02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							0
Observações: 1) CE50 → 7,18 mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 10% Limite de confiança 95% não é confiável																			

		ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA																	
Início						Término						Água de diluição							
Data: 12/04/11		Hora:13:00				Data: 16/04/11		Hora: 13:00				pH: 7,52		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP			
Organismo – teste: <i>Hyalella Azteca</i>						Método: CF – 10 mg.L ⁻¹ 10kGy - 96h						Operador: Dymes							
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Dia da leitura	Réplicas										Total de Adultas Vivas	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10								
Controle	1º 13/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,52	8,02	7,55	7,13	176,9	203,8	
	2º 14/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	3º 15/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	4º 16/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
1,7	1º 13/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,33	7,96	7,53	7,15	133,8	159,7	
	2º 14/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	3º 15/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	4º 16/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
2,6	1º 13/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,27	7,88	7,56	7,08	130,1	157,9	
	2º 14/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	3º 15/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	4º 16/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
4,0	1º 13/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,23	7,92	7,59	7,21	110,5	131,7	
	2º 14/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	3º 15/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	4º 16/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
6,0	1º 13/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,12	7,66	7,48	7,02	78,7	100,9	
	2º 14/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	3º 15/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10							
	4º 16/04	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	7							
9,0	1º 13/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,02	7,69	7,47	6,97	48,9	89,3	
	2º 14/04	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	6							
	3º 15/04	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	2							
	4º 16/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0							
Observações: 1) CE50 → 6,51 (5,79 – 7,32) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 0%																			

		ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA																
Início						Término						Água de diluição						
Data: 13/04/11		Hora:13:00				Data: 17/04/11		Hora: 13:00				pH: 8,00		Dureza: 45 mg CaCo ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP		
Organismo – teste: <i>Hyalella Azteca</i>						Método: CF + DSS – Ensaio Agudo 96h						Operador: Dymes						
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Dia da leitura	Réplicas										Total de Adultas Vivas	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10							
Controle	1º 14/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	8,00	8,02	7,40	7,23	240,0	260,2
	2º 15/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	3º 17/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	4º																	
0,12	1º 14/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,98	8,04	7,38	7,09	181,7	208,0
	2º 15/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	3º 17/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	4º																	
0,36	1º 14/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,91	8,00	7,42	7,21	172,0	191,9
	2º 15/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	3º 17/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	4º																	
0,72	1º 14/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,94	8,06	7,42	7,18	166,7	197,5
	2º 15/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	3º 17/04	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	4						
	4º																	
0,96	1º 14/04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,95	8,01	7,50	7,23	160,5	183,4
	2º 15/04	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	9						
	3º 17/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0						
	4º																	
1,44	1º 14/04	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	7	7,83	8,13	7,48	7,01	124,3	147,6
	2º 15/04	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	6						
	3º 17/04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0						
	4º																	
Observações: 1) CE50 → 0,62 (0,53 – 0,72) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 0%																		

		ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA																
Início				Término								Água de diluição						
Data: 14/07/11		Hora:12:00		Data: 17/07/11		Hora: 12:00		pH: 7,98		Dureza: 45 mg CaCo ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP						
Organismo – teste: <i>Hyalella Azteca</i>				Método: CF + DSS – 5kGy - Ensaio Agudo 96h								Operador: Dymes						
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Dia da leitura	Réplicas										Total de Adultas Vivas	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10							
Controle	1º 15/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,98	8,38	8,00	7,43	170,5	393,0
	2º 16/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10						
	3º 18/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10						
	4º																	
1,7	1º 15/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,85	8,32	8,28	7,45	158,3	319,0
	2º 16/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10						
	3º 18/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10						
	4º																	
2,6	1º 15/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,79	8,16	8,40	7,51	137,9	206,2
	2º 16/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10						
	3º 18/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10						
	4º																	
4,0	1º 15/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,70	8,04	8,35	7,58	103,7	161,4
	2º 16/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10						
	3º 18/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10						
	4º																	
6,0	1º 15/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,50	7,84	8,32	7,40	65,7	122,8
	2º 16/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10						
	3º 18/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10						
	4º																	
9,00	1º 15/07	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	10	7,20	7,27	8,15	7,23	40,7	58,4
	2º 16/07	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3						
	3º 18/07	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1						
	4º																	
Observações: 1) CE50 → 7,52 (7,17 – 7,88) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 10%																		

		ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA																
Início				Término								Água de diluição						
Data: 14/07/11		Hora:12:50		Data: 17/07/11		Hora: 12:50		pH: 8,01		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP						
Organismo – teste: <i>Hyaella Azteca</i>				Método: CF + DSS – 5kGy - Ensaio Agudo 96h								Operador: Dymes						
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Dia da leitura	Réplicas										Total de Adultas Vivas	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond _i (µS.cm ⁻¹)	Cond _f (µS.cm ⁻¹)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10							
Controle	1º 15/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	8,01	8,16	8,28	7,59	185,9	206,0
	2º 16/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	3º 18/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	4º																	
1,7	1º 15/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,87	8,05	8,27	7,58	160,0	175,7
	2º 16/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	3º 18/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	4º																	
2,6	1º 15/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,82	8,04	8,41	7,52	147,1	159,0
	2º 16/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	3º 18/07	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9						
	4º																	
4,0	1º 15/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,68	7,99	8,32	7,49	127,5	134,6
	2º 16/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	3º 18/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	4º																	
6,0	1º 15/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,54	7,95	8,27	7,40	93,4	122,8
	2º 16/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	3º 18/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10						
	4º																	
9,00	1º 15/07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	7,15	7,42	8,18	7,33	47,5	51,4
	2º 16/07	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	4						
	3º 18/07	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	3						
	4º																	
Observações: 1) CE50 → 8,02 (7,11 – 9,04) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 30%																		

APÊNDICE B. Fichas-controlê para os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis*.

										ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>						
Início										Término		Água de diluição				
Data: 19/03/11				Hora:18:00						Data:	Hora:	pH:7,33	Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP	
Organismo – teste: <i>D.similis</i>										Método: CF - Ensaio Agudo 48h		Operador: Dymes				
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹)	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond _i (µS.cm ⁻¹)	Cond _f (µS.cm ⁻¹)	
	1	2	3	4												
0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,97	8,06	7,40	7,23	148,2	155,4	
0,8	2	2	0	0	0	0	1	1	5	7,89	8,06	7,45	7,22	145,3	151,8	
1,3	3	3	2	2	2	2	2	2	45	7,96	8,01	7,42	7,25	138,5	148,1	
1,6	4	4	0	1	2	3	4	5	65	7,93	8,03	7,49	7,38	134,3	141,5	
2,0	5	5	3	5	3	5	4	5	100	7,90	8,09	7,48	7,29	128,4	135,7	
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,87	8,08	7,33	7,25	156,0	162,1	
Observações: 1) CE50: 1,31 (1,18 – 1,44) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 0%																

											ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>					
Início											Término		Água de diluição			
Data: 19/03/11				Hora: 18:00							Data:	Hora:	pH: 7,33	Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP
Organismo – teste: <i>D.similis</i>											Método: CF - Ensaio Agudo 48h		Operador: Dymes			
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹)	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)	
	1		2		3		4									
0,6	0	0	0	1	0	1	0	1	15	7,97	8,04	7,40	6,84	148,2	153,5	
0,8	0	0	0	1	1	1	0	1	15	7,89	8,10	7,45	6,83	145,3	151,8	
1,3	2	3	1	2	2	3	3	3	55	7,96	8,07	7,42	6,86	138,5	144,3	
1,6	3	4	3	3	4	5	4	4	80	7,93	7,96	7,49	6,79	134,3	140,2	
2,0	5	5	5	5	5	5	5	5	100	7,90	7,97	7,48	6,78	128,4	135,7	
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	5	7,87	7,81	7,33	6,72	156,0	162,6	
Observações: 1) CE50:1,22 (1,09 – 1,37) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 10.53%																

										ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>								
Início										Término			Água de diluição					
Data: 03/03/11				Hora: 17:00						Data: 05/03/11		Hora: 17:00		pH: 7,50		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP
Organismo – teste: <i>D.similis</i>										Método: CF - Ensaio Agudo 48h			Operador: Dymes					
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _e	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _e (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _e (µS.cm ⁻¹)			
	1		2		3		4											
0,6	0	0	0	1	0	0	0	0	5	7,98	7,99	7,49	7,42	151,4	150,4			
0,8	0	0	0	1	0	0	0	1	10	8,01	7,96	7,59	7,60	149,0	147,8			
1,3	0	2	0	0	1	2	0	1	25	7,97	7,94	7,60	7,62	141,2	140,9			
1,6	2	3	0	2	0	1	0	2	40	7,93	7,91	7,60	7,59	136,8	136,5			
2,0	3	5	0	0	2	4	2	4	65	7,68	7,90	7,69	7,54	131,5	132,3			
Controle	0	1	0	0	0	0	0	0	5	8,02	8,06	7,50	7,42	158,6	162,4			
Observações: 1) CE50: 1,79 (1,57 – 2,04) mg.L ⁻¹ 2) TRIM:																		

										ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>								
Início										Término		Água de diluição						
Data: 03/03/11				Hora: 17:00						Data: 05/03/11		Hora: 17:00		pH: 7,50		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP
Organismo – teste: <i>D.similis</i>										Método: CF - irradi. 5kGy		Operador: Dymes						
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _e	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _e (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _e (µS.cm ⁻¹)			
	1	2	3	4														
1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,88	7,94	7,39	7,35	135,9	134,7			
2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,73	7,81	7,30	7,24	122,2	121,5			
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,61	7,61	7,38	7,30	101,4	103,5			
6,0	0	0	0	1	0	0	0	0	5	7,24	7,33	7,00	6,96	70,8	73,8			
9,0	0	0	0	4	0	2	0	2	40	7,00	6,99	7,04	7,00	27,6	33,8			
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,02	8,04	7,50	7,45	158,6	163,1			
Observações: 1) CE ₅₀ >9,0 mg.L ⁻¹ 2) TRIM: Muir, amoço 60/não calculável																		

											ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>								
Início											Término			Água de diluição					
Data: 16/04/11				Hora: 16:00							Data: 18/04/11		Hora: 16:00		pH: 7,45		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP
Organismo – teste: <i>D.similis</i>											Método: CF - irrad. 5kGy			Operador: Dymes					
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _e	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _e (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _e (µS.cm ⁻¹)				
	1		2		3		4												
1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,82	7,96	7,40	7,34	135,1	140,2			
2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,67	7,80	7,42	7,20	123,2	125,7			
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,60	7,71	7,42	7,30	100,1	103,3			
6,0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	15	7,39	7,59	7,39	7,18	77,3	80,1			
9,0	1	4	2	3	1	2	0	2	55	7,22	7,38	7,22	7,02	23,1	27,7				
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,84	7,99	7,45	7,37	160,9	170,1			
Observações: 1) CE50: 8,56 (7,02 – 10,43) mg.L ⁻¹																			

										ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>									
Início										Término				Água de diluição					
Data: 20/04/11				Hora: 16:30						Data: 20/04/11		Hora: 16:30		pH:7,51		Dureza: 45 mg CaCo ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP	
Organismo – teste: <i>D.similis</i>										Método: CF - irrad. 5kGy				Operador: Dymes					
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _e	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _e (mg.L ⁻¹)	Cond _i (µS.cm ⁻¹)	Cond _e (µS.cm ⁻¹)				
	1		2		3		4												
1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,81	7,95	7,42	7,31	137,2	140,4				
2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,70	7,84	7,37	7,28	125,7	127,7				
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,61	7,65	7,50	7,42	100,9	102,1				
6,0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	10	7,30	7,31	7,42	7,35	73,0	73,9			
9,0	1	3	3	4	0	3	0	1	55	7,10	7,21	7,15	7,05	25,0	28,3				
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,96	8,05	7,51	7,46	160,3	162,1				
Observações: 1)CE50: 8,60 (7,20 – 10,29) mg.L ⁻¹																			

										ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>									
Início										Término				Água de diluição					
Data: 20/04/11				Hora: 16:30						Data: 20/04/11		Hora: 16:30		pH: 7,09		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP	
Organismo – teste: <i>D.similis</i>										Método: CF - irradi. 5kGy				Operador: Dymes					
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _e	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _e (mg.L ⁻¹)	Cond _i (µS.cm ⁻¹)	Cond _e (µS.cm ⁻¹)				
	1		2		3		4												
1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,83	7,91	7,09	7,00	137,6	142,1				
2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,71	7,86	7,04	6,96	122,0	126,4				
4,0	1	1	0	0	0	0	0	0	5	7,64	7,72	7,12	7,01	103,0	105,8				
6,0	0	1	0	0	1	1	1	1	15	7,32	7,35	7,06	6,93	71,8	74,0				
9,0	2	3	1	2	2	2	3	5	60	7,09	7,15	7,10	6,92	29,0	31,8				
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,92	7,96	7,09	7,04	162,3	165,0				
Observações: 1) 8,22 (7,03 – 9,62) mg.L ⁻¹																			

											ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>									
Início											Término				Água de diluição					
Data: 04/01/11				Hora: 18:30							Data: 06/01/11		Hora: 18:30		pH: 7,37		Dureza: 45 mg CaCo ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP	
Organismo – teste: <i>D.similis</i>											Método: CF - irradi. 10kGy Prel.				Operador: Dymes					
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond _i (µS.cm ⁻¹)	Cond _f (µS.cm ⁻¹)					
	1		2		3		4													
3,2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	10	7,74	7,54	7,27	7,07	117,7	137,0				
4,6	0	1	0	0	0	0	1	0	1	15	7,59	7,58	7,28	7,02	99,0	112,0				
6,4	2	2	3	0	1	1	4	1		70	7,00	7,01	7,28	6,99	67,7	101,0				
9,0	3	2	4	0	3	1	4	1		90	7,11	7,00	7,18	6,96	87,7	102,3				
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,07	8,08	7,37	7,01	168,3	186,0				
Observações: 1) CE50: 5,77 (5,13 – 6,50) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 10%																				

											ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>								
Início											Término			Água de diluição					
Data: 03/03/11				Hora: 17:00							Data: 05/03/11		Hora: 17:00		pH: 7,50		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP
Organismo – teste: <i>D.similis</i>											Método: CF - irradi. 10kGy def.			Operador: Dymes					
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond _i (µS.cm ⁻¹)	Cond _f (µS.cm ⁻¹)				
	1		2		3		4												
1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,74	7,76	7,19	7,11	135,3	133,0				
2,6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7,68	7,70	7,19	7,13	122,3	122,1				
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,57	7,58	7,18	7,11	100,6	102,6				
6,0	0	1	0	0	0	1	0	1	15	7,06	7,25	6,86	6,82	70,1	72,4				
9,0	5	5	5	5	5	5	5	5	100	6,91	7,01	7,13	7,09	34,0	36,8				
Controle	0	1	0	0	0	0	0	0	0	8,02	8,06	7,50	7,42	158,6	161,2				
Observações: 1)CE50: 6,95 (6,52 – 7,40) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 0%																			

											ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>									
Início											Término			Água de diluição						
Data: 15/03/11				Hora: 18:00							Data: 17/03/11		Hora: 18:00		pH: 7,33		Dureza: 45 mg CaCo ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP	
Organismo – teste: <i>D.similis</i>											Método: CF - irr.ad. 10kGy			Operador: Dymes						
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond _i (µS.cm ⁻¹)	Cond _f (µS.cm ⁻¹)					
	1		2		3		4													
1,7	0	0	0	0	0	1	0	0	5	7,74	7,79	7,35	7,68	133,4	138,7					
2,6	0	1	0	0	0	0	1	1	10	7,68	7,66	7,38	7,65	120,1	125,2					
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,57	7,49	7,45	7,60	100,3	105,5					
6,0	1	1	1	1	1	2	1	1	25	7,06	7,25	7,47	7,56	71,7	81,7					
9,0	5	5	5	5	5	5	5	5	100	6,91	6,90	7,59	7,42	45,3	35,8					
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,02	7,80	7,33	7,76	156,0	164,1					
Observações: 1) CE50: 6,65 (6,07 – 7,27) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 5%																				

										ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>								
Início										Término			Água de diluição					
Data: 19/03/11			Hora:17:00							Data: 21/03/11		Hora: 17:00		pH:7,33		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP
Organismo – teste: <i>D.similis</i>										Método: CF - irradi. 10kGy			Operador: Dymes					
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond _i (µS.cm ⁻¹)	Cond _f (µS.cm ⁻¹)			
	1		2		3		4											
1,7	0	0	0	1	0	1	0	1	15	7,80	7,98	7,35	6,75	133,4	139,1			
2,6	0	2	0	1	0	1	0	0	20	7,74	7,92	7,38	6,75	120,1	125,2			
4,0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	7,49	7,79	7,45	6,58	100,3	105,0			
6,0	0	0	0	2	0	1	0	1	20	7,13	7,64	7,47	6,63	71,7	76,7			
9,0	2	2	1	3	2	3	1	4	60	7,00	7,61	7,59	6,82	45,3	49,3			
Controle	0	0	0	0	0	0	1	1	5	7,87	7,83	7,33	6,74	156,0	160,9			
Observações: 1)CE50: 8,34 (7 – 9,94) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 42,11%																		

										ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>									
Início										Término			Água de diluição						
Data: 19/03/11			Hora: 17:00							Data: 21/03/11		Hora: 17:00		pH: 7,33		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP	
Organismo – teste: <i>D.similis</i>										Método: CF - irradi. 10kGy			Operador: Dymes						
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)				
	1	2	3	4	5	6	7	8											
1,7	0	0	0	0	0	1	0	0	5	7,80	7,86	7,35	7,30	133,4	136,4				
2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,74	7,90	7,38	7,32	120,1	123,5				
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,49	7,80	7,45	7,40	100,3	107,3				
6,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,13	7,59	7,47	7,40	71,7	162,1				
9,0	1	3	2	2	0	4	0	3	60	7,00	7,73	7,59	7,23	45,3	52,1				
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,87	8,03	7,33	7,29	156,0	159,7				
Observações: 1) CE50: 8,40 (7,41 – 9,52) mg.L ⁻¹ 2) TRIM: 40%																			

										ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>								
Início										Término			Água de diluição					
Data: 20/07/11				Hora: 16:00						Data: 22/07/11		Hora: 16:00		pH: 7,71		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP
Organismo – teste: <i>D.similis</i>										Método: CF + DSS (1:1) 5KGy			Operador: Dymes					
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _t	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _t (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _t (µS.cm ⁻¹)			
	1	2	3	4	5	6	7	8										
1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,87	8,02	8,28	7,70	160,0	186,9			
2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,82	7,99	8,41	7,96	147,1	169,4			
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,68	7,89	8,32	7,78	127,5	140,0			
6,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,54	7,70	8,27	7,51	93,4	125,9			
9,0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7,15	7,31	8,18	7,42	47,5	100,8			
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,01	8,19	7,71	7,60	185,9	209,3			
Observações: 1) CE50>9,0																		

										ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA - <i>Daphnia similis</i>								
Início										Término			Água de diluição					
Data: 20/07/11				Hora: 16:00						Data: 22/07/11		Hora: 16:00		pH: 7,71		Dureza: 45 mg CaCO ₃ .L ⁻¹		Manancial: Salto - SP
Organismo – teste: <i>D.similis</i>										Método: CF + DSS (1:1) 5KGy			Operador: Dymes					
Concentração Nominal (mg.L ⁻¹) %	Org. imóveis por Réplica								% de imobilidade	pH _i	pH _t	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _t (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _t (µS.cm ⁻¹)			
	1		2		3		4											
1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,87	7,85	8,28	7,59	160,0	200,0			
2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,82	7,84	8,41	7,47	147,1	169,0			
4,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,68	7,79	8,32	7,42	127,5	145,0			
6,0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	7,54	7,75	8,27	7,50	93,4	137,9			
9,0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	7,15	7,22	8,18	7,39	47,5	130,3			
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,01	7,96	7,71	7,61	185,9	210,3			
Observações: 1) CE50>9,0																		

APÊNDICE C. Fichas-controle para os ensaios de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*.

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – DSS – 1º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	98	100	93	93	93	7,97	8,06	7,40	7,23	148,2	155,4
I ₁₅	77	59	29	09	00						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – DSS 2º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	92	90	93	93	87	7,89	8,06	7,45	7,22	145,3	151,8
I ₁₅	94	27	10	03	00						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – DSS – 3º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	92	82	92	88	92	7,96	8,01	7,42	7,25	138,5	148,1
I ₁₅	94	26	11	04	00						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF não irradiado 1º ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	112	99	99	86	91	7,93	8,03	7,49	7,38	134,3	141,5
I ₁₅	81	74	67	48	01						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF não irradiado 2º ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	95	92	93	95	90	7,90	8,09	7,48	7,29	128,4	135,7
I ₁₅	72	66	60	56	09						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF não irradiado											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (µS.cm ⁻¹)	Cond. _f (µS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	93	109	118	110	112	7,87	8,08	7,33	7,25	156,0	162,1
I ₁₅	83	72	68	56	08						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 1,0Kgy – 1º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	103	105	120	93	102	7,07	7,85	8,28	7,59	160,0	200,0
I ₁₅	81	64	64	49	11						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 2,5Kgy - 1º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	101	100	100	998	93	7,12	7,84	8,41	7,47	147,1	169,0
I ₁₅	70	56	53	52	15						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 7,5Kgy - 1º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	104	108	96	90	100	7,28	7,79	8,32	7,42	127,5	145,0
I ₁₅	70	62	67	50	09						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 10Kgy - 1º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	93	82	88	84	83	7,24	7,75	8,27	7,50	93,4	137,9
I ₁₅	69	53	52	43	04						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado de 1,0Kgy – 2º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	93	81	95	98	108	7,15	7,22	8,18	7,39	47,5	130,3
I ₁₅	70	54	58	48	03						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 2,5Kgy - 2º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	84	79	85	70	79	7,01	7,96	7,71	7,61	185,9	210,3
I ₁₅	59	46	52	36	07						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 7,5KGy - 2º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	94	83	86	79	84	7,27	8,02	8,28	7,70	160,0	186,9
I ₁₅	75	54	56	42	04						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 10KGy - 2º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	93	90	82	89	97	7,32	7,99	8,41	7,96	147,1	169,4
I ₁₅	66	57	49	44	06						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 10KGy - 2º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	93	90	82	89	97	7,08	7,89	8,32	7,78	127,5	140,0
I ₁₅	66	57	49	44	06						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 1KGy											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	93	83	69	82	79	7,24	7,70	8,27	7,51	93,4	125,9
I ₁₅	100	79	69	44	00						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 2,5KGy											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	93	92	90	88	79	7,01	8,19	7,71	7,60	185,9	209,3
I ₁₅	105	88	71	51	00						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 5KGy - 1º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	96	92	95	92	93	7,00	7,72	7,29	7,18	142,1	150,0
I ₁₅	106	86	79	56	00						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 5KGy – 2º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	91	99	92	98	93	7,06	7,71	7,29	7,25	156,8	166,0
I ₁₅	103	87	83	53	0						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 5KGy – 3º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	97	89	88	90	95	7,01	7,85	7,31	7,15	167,9	177,2
I ₁₅	101	85	72	47	0						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 7,5KGy											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	95	82	98	98	94	7,15	7,83	7,28	7,15	165,3	170,3
I ₁₅	112	96	95	61	00						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 10 KGy											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	94	81	91	88	90	7,12	7,88	7,32	7,26	170,3	183,5
I ₁₅	109	80	71	32	00						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF + Dss (1:1) não irradiado 1º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	121	83	113	114	111	7,10	7,72	7,29	7,18	142,1	150,0
I ₁₅	142	72	71	59	0						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF + DSS (1:1) não irradiado - 2º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	121	91	113	117	109	7,17	7,85	7,31	7,15	167,9	177,2
I ₁₅	143	84	83	51	0						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF + DSS (1:1) não irradiado- 3º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	121	109	115	109	112	7,01	7,85	7,31	7,15	167,9	177,2
I ₁₅	140	95	80	49	0						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF + Dss (1:1) irradiado – 5 KGy 1º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	89	110	106	102	100	7,00	7,72	7,29	7,18	142,1	150,0
I ₁₅	103	96	81	62	0						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF + DSS (1:1) irradiado – 5 KGy - 2º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	89	92	85	92	96	7,11	7,85	7,31	7,15	167,9	177,2
I ₁₅	104	94	77	57	0						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF + DSS (1:1) irradiado – 5 KGy - 3º Ensaio											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		10,23	20,47	40,95	81,90						
I ₀	89	91	85	92	89	7,21	7,85	7,31	7,15	167,9	177,2
I ₁₅	104	92	81	58	0						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 1KGy											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		20,7	31,6	46,66	70						
I ₀	112	92	87	90	92	7,10	7,72	7,29	7,18	142,1	150,0
I ₁₅	102	85	70	48	14						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 2,5KGy											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		20,7	31,6	46,66	70						
I ₀	113	92	85	91	90	7,01	8,19	7,71	7,60	185,9	209,3
I ₁₅	103	84	67	58	14						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 5 KGy											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		20,7	31,6	46,66	70						
I ₀	113	91	87	89	89	7,60	7,72	7,29	7,18	142,1	150,0
I ₁₅	104	84	68	57	26						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 7,5KGy											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		20,7	31,6	46,66	70						
I ₀	94	92	92	89	92	7,55	7,83	7,28	7,15	165,3	170,3
I ₁₅	96	86	73	59	17						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF irradiado 10KGy											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		20,7	31,6	46,66	70						
I ₀	94	88	92	91	89	7,68	7,89	8,32	7,78	127,5	140,0
I ₁₅	97	91	79	60	21						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA – <i>Vibrio fischeri</i> – CF + DSS (1:1) irradiado – 5 KGy											
Bioluminescência Emitida pela bactéria	Controle	% Concentração				pH _i	pH _f	OD _i (mg.L ⁻¹)	OD _f (mg.L ⁻¹)	Cond. _i (μS.cm ⁻¹)	Cond. _f (μS.cm ⁻¹)
		20,7	31,6	46,66	70						
I ₀	95	94	97	89	93	7,21	7,85	7,31	7,15	167,9	177,2
I ₁₅	96	80	67	50	20						

I₀: Leitura inicialI₁₅: Leitura após 15 minutos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT NBR-15411-2. **Ecotoxicologia aquática – 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. Brasil. 2006.
- ABNT NBR-15470. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade em sedimento – Método de ensaio com *Hyalella* spp (Amphipoda)**. Rio de Janeiro. Brasil. 2007.
- ABNT-NBR – 12713. **Ecotoxicologia aquática- Toxicidade Aguda - Método em ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro. Brasil. 2004.
- ADAMS, C.F.; LILEY, N.R.; GORZALKA, B.B. PCPA increases aggression in male firemouth cichlids. *Pharmacology*. v. 53, p. 328 – 330, 1996.
- AGUIAR, C.C.; CASTRO, T.R.; CARVALHO, A.F.; VALE, O.C.; SOUSA, F.C.; VASCONCELOS, S.M. Drogas antidepressivas. *Acta Medica Portuguesa*. v. 24, p. 91 – 98, 2011.
- ALDEGUNDE, M.; MANCEBOE, M. Effects of neuropeptide Y on food intake and brain biogenic amines in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Peptides*. v. 27, p. 719 – 727, 2006.
- ALONSO, S.G.; CATALÁ, M.; MAROTO, R.R.; GIL, J.R.L.; MIGUEL, A.G.; VALCÁRCEL, Y. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environment International*. v. 36, p. 195 – 201, 2010.
- ANDRADE, M.F.; ANDRADE, R.C.G.; SANTOS, V. Prescrição de psicotrópicos: avaliação das informações contidas em receitas e notificações. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 40, n. 4, 2004.
- ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; INSOLA, A.; MAROTTA, R. Advanced oxidation process (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*. v. 53, p. 51-59, 1999.
- ARCHELA, E.; CARRARO, A.; FERNANDES, F.; BARROS, O.N.F.; ARCHELA, R. S. Considerações sobre a geração de efluentes líquidos em centros urbanos. *Geografia*. v. 12, n. 1, 2003.
- ARRIAGA, F.M.; OTSU, T.; OYAMA, T.; GIMENEZ, J.; ESPLUGAS, S.; HIDAKA, H.; SERPONE, N. Photooxidation of the antidepressant drug Fluoxetine (Prozac) in aqueous media by hybrid catalytic/ozonation processes. *Water research*. v. 45, p. 2782 – 2794, 2011.
- BACKHAUS T, PORSBRING T, ARRHENIUS A, BROSCHE S, JOHANSSON P, BLANCK H. Single-substance and mixture toxicity of five pharmaceuticals and personal care products to marine periphyton communities. *Environmental Toxicology & Chemistry*. v. 30, n. 9, p. 2030 - 2040, 2011.

BALDESSARINI, R.J. *Depressão e distúrbios de ansiedade*. In: Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica. 10ª ed. Rio de Janeiro/RJ. 2003. Cap.19, p.339 – 364.

BAUTITZ, I. R.. Degradação de fármacos por processo foto-fenton e ferro metálico. 2010. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

BENTON, W. *Enciclopedia Barsa*. São Paulo, SP: Encyclopaedia Britanica Editôres Ltda, 1967. cap 13, terapêutica.. p. 216 – 222

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. W. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v. 24, n. 4, p. 523 - 530, 2003.

BILA, D.M. Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo processo de ozonização. 2005. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

BLUNDELL, J.E.; HALFORD, J.C.G. Serotonin and appetite regulation, implications for the pharmacological treatment of obesity. *CNS Drugs*. v. 9, p. 473–495, 1998.

BORRELY, S.I. Avaliação da redução da toxicidade de efluentes tratados por irradiação com feixe de elétrons, por meio de testes de toxicidade aguda. 2001. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo.

BORRELY, S.I.; SAMPA, M.H.O.; PEDROSO, C.B.; OIKAWA, H.; SILVEIRA, C.G.; CHERBAKIAN, E.H.; SANTOS, M.C.F. Radiation processing of wastewater evaluated by toxicity assays. *Radiation Physics and Chemistry*. v. 57, Issues 3-6, p. 507- 511, 2000.

Brasil. Ministério da Saúde. 1982. Portaria, nº 112. Referente substâncias tensoativas aniônicas, utilizadas na composição de saneantes de qualquer natureza, devem ser biodegradáveis. Brasília, Diário Oficial da República Federativa do Brasil. p.10904, Seção 1, pU.

Brasil. Ministério da Saúde. 1995. Portaria, nº 120. Estabelece o "Método para determinação da biodegradabilidade de tensoativos aniônicos", com validade em todo o Território Nacional. Brasília, Diário Oficial da República Federativa do Brasil. p.19323, Seção 1, pU.

BRODFUEHRER, P.D.; DEBSKI, E.A.; O’GARA, B.A.; FRIESEN, W.O. Neuronal control of leech swimming. *Journal of Neurobiology*. v. 27, p. 403 – 418, 1995.

BROOKS, B.W.; CHAMBLISS, C.K.; STANLEY, J.K.; RAMIREZ, A.; BANKS, K.E.; JOHNSON, R.D.; LEWIS, R.J. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology & Chemistry*. v. 24, p. 464–469, 2005.

BROOKS, B.W.; TURNER, P.K.; STANLEY, J.K.; WESTON, J.J.; GLIDEWELL, E.A.; FORAN, C.M.; SLATTERY, M.; POINT, T.W.; HUGGETT, D.B. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere*. v.52, p.135-14, 2003.

BUTLER, K.Z.B, JEFFRIES, J.J. *Clinical handbook of psychotropic drugs*. 9th ed. Seattle: Hogrefe & Huber. 1999.

BUXTON, G. U.; GREENSTOCK, C. L.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B. Critical review of rate constants for reaction of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}/\text{O}\bullet$) in aqueous solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, v. 17, n. 2, p. 513 - 886, 1988.

CAIRNS, J.JR.; NIEDERLEHNER, B.R. *Ecological Toxicity Testing*. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. 1995.

CALABRESE, E.J., BALDWIN, L.A. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*. v.21, p.91 – 97, 2002.

CARREIRA, R.; WAGENER, A.L.R.; FILEMAN, T.; READMAN, J.W. Distribuição de coprostanol (5b(H)-coleston-3b-ol) em sedimentos superficiais da Baía de Guanabara: indicador da poluição recente por esgotos domésticos. *Química Nova*. v.24, p. 37 – 42, 2001.

CARSON, R. *O mar que nos cerca*. São Paulo, SP.: Gaia LTDA, 2010.

CETESB L5.227. São Paulo. **Bioensaio de toxicidade aguda com *Photobacterium phosphoreum***. Sistema Microtox. 1987. (Método de Ensaio).

CETESB, 2011. **Áreas contaminadas**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas>. Acessado 01/08/2011 às 12:30.

CETESB, 2011a. **Áreas contaminadas**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas>. Acessado 01/08/2011 às 12:30.

CETESB, 2011b. **Água**. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/agua/aguas-superficiais/aguas-interiores/variaveis/aguas/variaveis_quimicas/conductividade.pdf

CHRISTENSEN, A. M.; S. F. ANDERSEN; F. INGERSLEV; A. BAUN. Mixture and single-substance toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors toward algae and crustaceans. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 26, n. 1, p. 85 – 91, 2007.

CHRISTENSEN, A.M.; INGERSLEV, F.; BAUN, A. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v.25, p. 2208 – 2215, 2006.

CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. v.142, p.185-194, 2003.

CLEUVERS, M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 59, n. 3, p. 309 - 315, 2004.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (CEC). **Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) No.1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. Part II: Environmental Risk Assessment**. Office for Official Publications of the European Communities , Luxembourg. 1996.

CORTEZ, F.S. Avaliação da toxicidade do fármaco triclosan através de ensaios ecotoxicológicos empregando organismos marinhos em água e sedimento marcado (spiked). 2011. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

CURTI, C.; MINGATTAO, F.E.; POLIZELLO, A.C.M.; GALASTRI, L.O.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A.C. Fluoxetine interacts with the lipid bilayer of the inner membrane in isolated rat brain mitochondria, inhibiting electron transport and F1F0-ATPase activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.199, p.103 – 109, 1999.

DAUGHTON, C.G. PPCPs in the environment: future research beginning with the end always in mind. In: Kummerer K. **Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks**, 2nd ed. Heidelberg: Springer, 2004. p. 463 – 495.

DAUGHTON, C.G., TERNES, T.A. Pharmaceutical and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**. v. 107, p. 906–938, 1999.

DIETRICH, S.; PLOESSL, F.; BRACHER, F., LAFORSCH C. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study. **Chemosphere**. v. 79, p. 60-66, 2010.

DOUGHERTY, J.A.; SWARZENSKI, P.W.; DINICOLA, R.S.; REINHARD, M. Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface water and groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. **Journal of Environmental Quality**. v. 39, n. 4, p. 1173 - 1180, 2010.

DRYDEN, S., FRANKISH, H.M., WANG, Q., PICKAVANCE, L., WILLIAMS, G. The serotonergic agent fluoxetine reduces neuropeptide Y levels and the neuropeptide Y secretion in the hypothalamus of lean and obese rats. **Neuroscience**. v. 72, p. 557 – 566, 1996.

DUARTE, C. L. Aplicação do Processo Avançado de Oxidação por feixe de elétrons na degradação de compostos orgânicos presentes em efluentes industriais. 1999. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

ELI LILLY & COMPANY. **Highlights of prescribing information**. Disponível em: <http://pi.lilly.com/prozac.pdf>. Acessado em 19/11/2009. 2009.

ELI LILLY & COMPANY. **Prozac makes history**. Disponível em: <http://www.prozac.com/Pages/index.aspx>. Acesso em: 16 ago. 2011.

ESCHER, B. I.; BRAMAZB, N.; LIENERTB, J.; NEUWOEHNERB, J.; STRAUB, J.O. Mixture toxicity of the antiviral drug Tamiflu® (oseltamivir ethylester) and its active metabolite oseltamivir acid. **Aquatic Toxicology**. v. 96, p. 194 - 202, 2010.

FAUST, B. C.; HOIGNÉ, J. Photolysis of Fe(III)-hidroxy complexes as sources of OH radicals in clouds, fog and rain. **Atmospheric Environment**, v. 24, n. 1, p. 79-89, 1990.

FENTON, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. **Journal of Chemical Society**. v. 65, p. 899 - 910, 1894.

FERRIERE, F.; KHAN, N.A.; TROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. Serotonin modulation of lymphocyte proliferation via 5-HT_{1A} receptors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Developmental & Comparative Immunology**. v. 20, p. 273 – 283, 1996.

FINGERMAN, S.W. Circadian rhythms of brain 5-hydroxytryptamine and swimming activity in the teleost, *Fundulus grandis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 54, p. 49 – 53, 1976.

FLAHERTY, C.M.; DODSON, S.I. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. **Chemosphere**. v. 61, p. 200 – 207, 2005.

FONG, P.P., 2001. *Antidepressants in aquatic organisms: A wide range of effects*. In: Daughton, C.G., Jones-Lepp, T.L. (Eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*. American Chemical Society, Washington, DC.

FONG, P.P.; MOLNAR, N. Norfluoxetine Induces Spawning and Parturition in Estuarine and Freshwater Bivalves. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 81, p. 535 - 538, 2008.

FRAM, M.S.; BELITZ, K. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. **Science of the Total Environment**. v. 409, n. 18, p. 3409 - 3417, 2011.

GALVÉZ, J. B.; RODRÍGUEZ, S. M.; GASCA, C. A. E.; BANDALA, E. R.; GELOVER, S.;

GLEICK, P.H. *The world's water 2000 - 2001*. Report on Freshwater Resources. Island Press, Washington D.C. and Covelo California. p. 315, 2000.

GLEICK, P.H. *The world's water 2000 - 2001*. Report on Freshwater Resources. Island Press, Washington D.C. and Covelo CALifornia. p.315, 2000.

GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. **Advances in Environmental Research**, v. 8, n. 3 - 4, p. 553 - 597, 2004.

GOODNICK, PJ; GOLDSTEIN BJ. **Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders – I: Basic pharmacology**. *Journal of Psychopharmacology*. v.12, S3-S20, 1998.

HAAG, W. R.; YAO, C. D. Rate constant for reaction of hydroxyl radicals with several drinking water contaminants. **Environmental Science and Technology**, v. 26, n. 5, p. 1005 - 1013, 1992.

HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proceedings of the Royal Society of London: Part A**. v. 134, p. 332 - 351, 1934.

HADDOCK, S.; LEAHY, E; ENGELMAN, R. Population growth. **International Encyclopedia of Public Health**. p. 181 – 190, 2008.

HANSEN, L. K.; FROST, P.C.; LARSON, J.H.; METCALFE, C.D. Poor elemental food quality reduces the toxicity of fluoxetine on *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**. v. 86, p. 99 – 103, 2008.

HARVEY, B. G. *Introduction to Nuclear Physics and Chemistry*. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice-Hall, 1969.

HENRY, T.B.; KWON, J.W.; ARMBRUST, K.L.; BLACK, M.C. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology & Chemistry*. v. 23, p. 2229 – 2233, 2004.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. *Princípios de análise instrumental*. Ed. Bookman - Grupo A. 6ª Edição. 2009.

Homlok, R.; Takács, E.; Wojnárovits, L. Elimination of diclofenac from water using irradiation technology. *Chemosphere*. v. 85, p.603–608, 2011.

HUBER, R., SMITH, K., DELAGO, A., ISAKKSON, K., KRAVITZ, E.A. Serotonin and aggressive motivation in crustaceans: altering the decision to retreat. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. v. 94, p. 5939 – 5942, 1997.

JACONETTI, P. C. M. Validação de ensaios ecotoxicológicos com organismos autóctones *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii*. 2005. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

JOHNSON, D.J., SANDERSON, H., BRAIN, R.A., WILSON, C.J., SOLOMON, K.R. Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 67, p. 128 – 139, 2007.

JONSSON, C. M.; AOYAMA, H. In vitro effect of agriculture pollutants and their joint action on *Pseudokirchneriella subcapitata* acid phosphatase. *Chemosphere*. v. 69, p. 849 – 855, 2007

KALLENBORN, R.; FICK, J.; LINDBERG, R.; MOE, M.; NIELSEN, K. M.; TYSKLIND, M.; VASSKOG, T. *Pharmaceutical Residues in Northern European Environments: Consequences and Perspectives in: Pharmaceuticals in the Environment Part II*. Ed. Springerlink. p. 61 - 74, 2008.

KHAN, I.A., THOMAS, P. Stimulatory effects of serotonin on maturational gonadotropin release in the Atlantic croaker, *Micropogonias undulates*. *General and Comparative Endocrinology*. v. 88, p. 288 – 396, 1992.

KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International*. v. 35, n. 2, p. 402 - 417, 2009.

KOLPIN, D. W.; FURLOG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*. v. 36, p. 1202 – 1211, 2002.

KUMMERER, K. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. v. 54, p. 311 – 320, 2004.

LAMEIRA, V. **Estudo dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco Triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestrii* (CLADOCERA, CRUSTACEA).** 2008. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

LANGE, H.J; NOORDOVEN W.; MURK, A.J.; L'URLING, M.; PEETERS, E.T.H.M. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**. v. 78, p. 209 – 216, 2006.

LEAL, T. **Purificación de águas por fotocátálisis heterogénea: estado del arte.** In: BLES, M. A. Eliminación de contaminantes por fotocátálisis heterogénea. La Plata: Cytel, 2001. Cap. 3, p.51 - 75.

LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. Photochemical processes for water treatment. **Chemical Reviews**. v. 93, n. 2, p. 671 - 698, 1993.

LIN, S. H.; LIN, C. M.; LEU, H. G. Operating characteristics and kinetic studies of surfactant of wastewater treatment by Fenton Oxidation. **Water Research**. v 33, n. 7, p. 1735 - 1741, 1999.

MASTROTI, R.R.; SOUSA, E.C.P.M.; ABESSA, D.M.S; SASS, V. Avaliação preliminar da biodegradabilidade de tensoativos aniônicos em água do mar. **Revista Brasileira de Oceanografia**. v. 46, n.2, p. 187 - 193, 1998.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**. v. 32, n. 1, p. 188 - 197, 2009.

METCALFE, C.D.; MIAO, X.S.; KOENIG, B.G.; STRUGER, J.. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower great lakes, Canada. **Environmental Toxicology & Chemistry**. v. 22, p. 2881 – 2889, 2003.

METCALFE, C.D.; EDDY, F. **Wastewater engineering: treatment, disposal, reuse.** MC Graw-Hill International editions, 3rd ed, NEW YORK, 1991.

MITTAL, A.K; GARG, T.K. Effect of an anionic detergent – sodium dodecyl sulphate exposure on club cells in the epidermis of *Clarias batrachus*. **Journal of Fish Biology**. v. 44, p. 857 - 875, 1994.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**. v. 36, n.3, p. 370 – 374, 2002.

MORENO, R.A.; MORENO, D.H.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v. 21, p. 24 – 40, 1999.

MULQUEEN, P. Recent advances in agrochemical formulation. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 106, p. 83 – 107, 2003.

NATION, E.P. **Insect Physiology and Biochemistry**. CRC Press, FL, Estados Unidos 2002.

NENTWIG, G. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: The antidepressant drug fluoxetine. **Archives of Environmental Contamination and**

Toxicology. v. 52, p. 163 – 170, 2007.

NERY, M.M.F.; BARACAT, M.M.; CASAGRANDE, R.; MACHADO, H.T.; MIGLIORANZA, B.; GIANOTTO, E.A.S.; DALMAS, J.C. Validação de métodos para determinação de fluoxetina em cápsulas. *Química Nova*. v. 31, p. 1665 - 1669, 2008.

NIETO A, BORRULL F, POCURULL E, MARCÉ RM. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. *Environmental Toxicology & Chemistry*. v. 29, n. 7, p. 1484 - 1489, 2010.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*. v. 25, p. 772 - 776, 2002.

NOGUEIRA, R.F.P.; TROVÓ, A.G.; SILVA, M.R.A.; VILLA, R.D.; OLIVEIRA, M.C.; OTHMAN, M.S.; PASCOE, D. Growth, development and reproduction of *Hyaella azteca* (Saussure, 1858) in laboratory culture. *Crustaceana*. v. 74, p. 171 - 181, 2001.

PEDRO, N.; PINILLOS, M.L.; VALENCIANO, A.I.; ALONSO-BEDATE, M.; DELGADO, M.J. Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: involvement of CRF. *Peptides*. v. 19, p. 505 – 511, 1998.

PENTEADO, J.C.P.; SEOUD, O.A.E.; CARVALHO, L.R.F. Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. *Química nova*. v. 29, n. 5, p. 1038-1046, 2006.

PERREAULT, H.A.N.; SEMSAR, K.; GODWIN, J. Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiology & Behavior*. v. 79, p. 719 – 724, 2003.

PÉRY, A.R.R.; GUST, M.; VOLLAT, B.; MONS, R.; RAMIL, M.; FINK, G.; TERNES, T.; GARRICA, J. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere*. v.73, p.300 - 304, 2008.

PÉRY, A.R.R.; S. DARGELOS; H. QUÉAU; J. GARRIC. Preparatory Work to Propose Water-Only Tests with the Amphipod *Hyaella azteca*: Comparison with Sediment Toxicity Tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 75, p. 617 – 622, 2005.

PIGNATELLO, J. J.; OLIVEROS, E.; MACKAY, A. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 36, n. 6, p. 1 - 84, 2006.

PIVELI, R.P.; KATO, M.T. Problemas especiais de qualidade das águas: óleos e graxas, detergentes e fenóis. In: PIVELI, R.P. & KATO, M.T. *Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos*. São Paulo: AIDIS, 2006. p. 247 – 256.

PLAA, G.L. Present status: toxic substances in the environment. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. v. 60, p. 1010 - 1016, 1982.

PUSCEDDU, F.H. Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados de água doce com ênfase em ensaios com sedimento marcado (“spiked sediment”). 2009. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

RAJAPAKSE, N.; ONG, D.; KOPRTENKAMP, A. "Defining the Impact of Weakly Estrogenic Chemicals on the Action of Steroidal Estrogens" . *Toxicological Sciences*. v. 60, p. 296 - 304, 2001.

RAM, J.L., CRAWFORD, G.W., WALKER, J.U., MOJARES, J.J., PATEL, N., FONG, P.P., KYOZUKA, K. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. *Journal of Experimental Zoology*. v. 265, p. 587 – 598, 1993.

RAMACHANDRAN, S.D.; HODSON, P.V.; KHAN, C.W.; LEE, K. Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 59, Issue 3, p. 300 - 308, 2004.

RAMIREZ, A.J.; MOTTALEB, M.A.; BROOKS, B.W.; CHAMBLISS, C.K. Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. v. 79, 3155 – 3163, 2007.

RAND, G. M. *Fundamental of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. 2ª Ed. Taylor & Francis, 1995.

ROGERS, P.P.; LLAMAS, M.R.; CORTINA, L.M. *Water crisis: myth or reality?* London Taylor & Francis. 2006.

ROMANELLI, M.F. *Avaliação da toxicidade aguda e crônica dos surfactantes DSS e LAS submetidos à irradiação com feixes de elétrons*. 2004. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANDBACKA, M.; CHRISTIANSON, I.; ISOMAA, B. The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish - A comparative study. *Toxicology in Vitro*, v. 14, p. 61 - 68, 2000.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, v. 65, n. 5, p. 725 - 759, 2006.

SHEN, R.; ANDREWS, S.A. NDMA formation kinetics from three pharmaceuticals in four water matrices. *Water Research*. [Epub ahead of print]. 2011.

SILVA BF, JELIC A, LÓPEZ-SERNA R, MOZETO AA, PETROVIC M, BARCELÓ D. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere*. 2011. [Epub ahead of print].

SILVA, E.; KARAJAPAKSE, N.; KORTENKAMP, A. "Something from "Nothing" – Eight Weak Estrogenic Chemicals Combined at Concentrations below NOECs Produce Significant Mixture Effects". *Environmental Science Technology*. v. 36, p. 1751 - 1756, 2002.

SINGER, M. M.; TJERDEMA, R. S. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*. p. 133 – 185, 1993.

SIRISATTHA, S.; MOMOSE, Y.; KITAGAWA, E.; IWAHASHI, H. Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Research*.

v. 38, p. 61-70, 2004.

SPERLING, E.V. *Considerações sobre a saúde de ambientes aquáticos*. Bio Engenharia Sanitária Ambiental, São Paulo: ABES, Maio/Junho, Ano II (3), p.53-56, 1993.

SPINKS, J. W. T.; WOODS, R. J. *Introduction to Radiation Chemistry*. New York: Wiley, 1990.

STANLEY, J. K.; RAMIREZ, A. J.; CHAMBLISS, C. K.; BROOKS, B. W. Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere*. v. 69, p. 9 – 16, 2007.

STERNER, R.W.; ELSER, J.J. *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*. Princeton University Press, Nova Jersey, Estados Unidos. 2002.

STRAALEN, N. M. V. Ecotoxicology becomes stress Ecology. *Environmental Science & Technology*. p.324A - 330A, 2003.

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. Processos oxidativos avançados: conceitos teóricos. Caderno Temático, v. 3. Disponível em: <<http://lqa.iqm.unicamp.br>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.-D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment*. v. 225, p. 81 - 90, 1999.

TERNES, T.; BONERZ, M.; SCHMIDT, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. v. 938, n. 1-2, p. 175 - 185, 2001.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 1, p. 151 – 173, 1977.

TSAI, C.L., WANG, L.H. Effects of thermal acclimation on the neurotransmitters serotonin and norepinephrine in the discrete brain of male and female tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Neuroscience Letters*. v.233, 77 – 80, 1997.

US EPA – UNITED STATES PROTECTION AGENCY. *Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) - Basic Information*. Disponível em: <http://www.epa.gov/ppcp/basic2.html>. Acesso em: 28 nov. 2010.

VARSHNEY, L.; PATEL K.M. Effects of ionizing radiations on a pharmaceutical compound, chloramphenicol. *Radiation Physics Chemistry*. v. 43, n. 5, p. 471-480, 1994.

VILLEGAS-NAVARRO, A.; GONZALEZ, M. C. R.; LOPEZ, E. R. Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewaters. *Environment International*. v. 25, n. 5, p. 619-624, 1999.

VULLIET, E.; OLIVÉ, C.C. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental*

Pollution. v.159, n.10, p.2929-2934, 2011.

WEIS, J.S.; SMITH, G.; ZHOU, T.; SANTIAGO-BASS, C.; WEIS, P. Effects of contaminants on behavior: biochemical mechanisms and ecological consequences. *BioScience*. v. 51, p. 209 – 217, 2001.

WONG, D.T.; BYMASTER, F.P.; ENGLEMAN, E.A. Prozac (Fluoxetine Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sciences*. v. 57, n. 5, p. 411 – 441, 1995.

WONG, D.T.; PERRY K.W.; BYMASTER, F.P. The discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nature Publishing group*. v. 4, p. 764 – 774, 2005.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações*. 2008. Edta Rima, 2ª ed, São Carlos, SP.