INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados marinhos

FERNANDO SANZI CORTEZ

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

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Beatriz Bohrer-Morel

São Paulo

2011

Dedico este trabalho ao meu pai, à minha mãe, à minha avó Beti, ao meu avô Kiko (in memorian) e aos meus amados filhos Gabriel e Gustavo.

Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos os meus caminhos, diz o SENHOR.

Porque assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos mais altos do que os vossos pensamentos.

Porque, assim como desce a chuva e a neve dos céus, e para lá não tornam, mas regam a terra, e a fazem produzir, e brotar, e dar semente ao semeador, e pão ao que come.

Assim será a minha palavra, que sair da minha boca; ela não voltará para mim vazia, antes fará o que me apraz, e prosperará naquilo para que a enviei.

Porque com alegria saireis, e em paz sereis guiados; os montes e os outeiros romperão em cântico diante de vós, e todas as árvores do campo baterão palmas.

Em lugar do espinheiro crescerá a faia, e em lugar da sarça crescerá a murta; o que será para o SENHOR por nome, e por sinal eterno, que nunca se apagará.

Isaías 55: 8-13

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, no nome de Jesus Cristo em quem deposito a minha fé.

Meus agradecimentos a todos os meus familiares, especialmente à minha amada mãe que sempre me apoiou e sonhou comigo os meus sonhos, amo todos vocês!!!!!!

Aos meus filhos Gabriel e Gustavo, que me fazem sentir o amor incondicional! Vocês são lindos!!!

À minha orientadora Dra. Maria Beatriz Bohrer-Morel pela oportunidade que me foi dada, pela confiança, pela amizade, e que apesar da distância, sempre esteve muito perto nos momentos mais importantes!

À minha noiva, amiga e futura esposa Renata pelo apoio, carinho, compreensão, paciência (quanta paciência pra me agüentar!!) e amor, sentimentos que me ajudaram a superar os desafios. Obrigado!! Te amo !!

Aos meus amigos irmãos, os quais tenho a honra e a felicidade de conviver no dia a dia do ambiente de trabalho e fora dele também. Aldo, Augusto, Camilo, Lia e Drigão, eu agradeço a Deus por vocês fazerem parte da minha vida, amo muito vocês!

À toda direção da Universidade Santa Cecília – UNISANTA, especialmente ao Dr. Antonio Penteado, pelo apoio irrestrito para execução deste trabalho. Muitíssimo Obrigado!!!!!

À Dra. Ceci do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha do IO – USP, por ter me recebido sempre com muita atenção e carinho, pela realização dos ensaios com copépodo e por toda contribuição para execução deste trabalho! Obrigado Ceci de todo coração!

À toda equipe do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha do IO – USP: Márcia, Aline, Gustavo e todos que se dedicaram na realização dos ensaios com copépodo. Sou extremamente grato!!!

Aos amigos do Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambiente – CQMA – IPEN: Vanessa, Caio e Kim, apesar do pouco convívio, muito obrigado pela força!!!!

Ao grande parceiro e amigo Fábio Pusceddu, pelo excelente convívio, ajuda e real parceria!! Obrigado por tudo Binho!

À Dra. Maria Aparecida Faustino Pires do Centro de Química e Meio Ambiente – CQMA – IPEN, por todo apoio.

Ao Dr. Bauer Rachid (FUNDESPA) por todo apoio concedido no inicio deste trabalho.

À todos os estagiários do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecilia que contribuíram com a execução deste trabalho e que partilharam todos os momentos desta caminhada. Obrigado por todo apoio!!

Ao amigo e irmão Fábio Alonso, grande parceiro de ondas, pelas dicas importantíssimas que muito acresceram a este trabalho.

Aos colegas e professores da Universidade Santa Cecilia: Roberto Borges, Fábio Giordano, João Alberto, Jorge, Ligia, Matheus, Miragaia e todos que participaram e participam da minha formação.

Meus agradecimentos ao Prof. Orlando Couto Jr. Pelo empréstimo dos aquários. Valeu Junião!

Ao meu irmão Daniel, exemplo de persistência e estilo no surf, minha cunhada Paula e a Julinha, sobrinha linda que eu amo!!!!

À minha irmã Carolina e meu cunhado Patrick, por todo apoio e por terem me dado três sobrinhas lindas que eu amo!!!!

Ao meu grande amigo Doty, exemplo de iniciativa e idealismo, obrigado por todos os momentos que passamos, principalmente na Amazônia. Valeu irmão!

À todos que cruzaram em meu caminho e que de alguma forma contribuíram com minha formação, professores, colegas, amigos, até desconhecidos que deram bons exemplos, enfim, ficam aqui os meus sinceros agradecimentos. MUITO OBRIGADO!!

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO FÁRMACO TRICLOSAN PARA INVERTEBRADOS MARINHOS

Fernando Sanzi Cortez

RESUMO

Triclosan é um composto orgânico de baixa solubilidade que vem sendo utilizado em formulações de cremes dentais e faciais, xampu, sabonetes, embalagens de gêneros alimentícios e diversos tipos de materiais, tais como, adesivos, brinquedos, sapatos, selantes, tintas, colchão, roupas, pisos, toldos e rejuntes. O amplo uso deste composto deve-se à grande eficácia contra bactérias Gram negativas e Gram positivas. Por seu extenso uso, evidências da presença de Triclosan têm sido frequentemente relatadas em efluentes urbanos e industriais, águas superficiais e sedimentos de ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos, como também em organismos aquáticos como algas, peixes e mamíferos. Neste contexto, o presente estudo avaliou a toxicidade aguda e crônica de Triclosan para diferentes invertebrados marinhos de águas tropicais. Para tanto, ensaios de toxicidade aguda foram realizados com o copépodo *Nitokra sp* (mortalidade) e com o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (taxa de fertilização). Para a avaliação do efeito crônico, ensaios de toxicidade de curta duração (desenvolvimento embriolarval) foram realizados com o ouriço-do-mar *L. variegatus* e *Perna perna*. Além desses métodos, o ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro foi empregado com a finalidade de se avaliar os efeitos do Triclosan sobre a estabilidade da membrana lisossômica de hemócitos de *P. perna*. Na avaliação do efeito agudo, o valor médio da CL(I)50;96h encontrada para o copépodo foi de 0,20 $mg.L^{-1}$ enquanto que o valor médio da CI(I)50;1h para ouriço-do-mar foi de 0,28 $mg.L^{-1}$. Já na avaliação do efeito crônico, o valor médio da CI(I)50;24h para ouriço-do-mar foi de 0,14 $mg.L^{-1}$ e para o molusco bivalve a média da CI(I)50;48h, foi de 0,13 $mg.L^{-1}$. O efeito na estabilidade da membrana lisossômica de hemócitos de *P. perna* ocorreu em concentrações a partir de 12 $ng.L^{-1}$. Estes resultados evidenciam o risco ecológico da introdução contínua desse composto em ambientes marinhos, e devem ser considerados para identificação de concentrações seguras e futura regulação do bactericida Triclosan na legislação ambiental nacional e internacional.

Palavras-chave: Fármacos, Triclosan, Toxicidade, Citotoxicidade, Invertebrados Marinhos.

ECOTOXICOLOGICAL ASSESSSMENT OF THE PHARMACEUTICAL TRICLOSAN FOR MARINE INVERTEBRATES

Fernando Sanzi Cortez

ABSTRACT

Triclosan is a low solubility organic compound that has been used in toothpastes, face cream, shampoos, soaps, food packages, and a variety of other materials such as stickers, toys, shoes, paints, clothes, tiles, awnings and grout. The reason for its intense use as biocide is its great efficacy against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Evidences of Triclosan presence in urban and industrial effluents, superficial waters and sediments from freshwater, estuarine, and marine environments, as well as aquatic organisms (algae, fishes, mammals) have been reported in the literature. In this context, the present study assessed the acute and chronic toxicity of Triclosan to different tropical marine invertebrates. Acute toxicity bioassays using the copepod *Nitokra sp* (mortality) and the sea-urchin *Lytechinus variegatus* (fertilization rate) were performed. Short-term chronic toxicity bioassays with *Lytechinus variegatus* and the bivalve mussel *Perna perna* were carried out in order to assess Triclosan chronic effects. Besides, the Neutral Red Retention Time assay was employed to evaluate the effect of Triclosan on the stability of lysosomal membrane of hemocytes of *Perna perna*. In the acute toxicity assays, the mean value of LC(I)50;96h obtained for the copepod was 0.20 mg L^{-1}, whereas the mean value of IC(I)50;1h for the sea-urchin was 0.28 mg L^{-1}. In the chronic toxicity assays, the mean value of IC(I)50;24h recorded for the sea-urchin was 0.14 mg L^{-1}, whilst for the bivalve mollusk the mean value of IC(I)50;48h was 0.13 mg L^{-1}. The effect on the lysosomal membrane stability of *Perna perna* hemocytes started to occur from 12 ng L^{-1}. The results evidence the ecological risk associated to the continuous introduction of Triclosan into marine aquatic environments and must be considered in the identification of safety concentrations and future regulation of this bactericide compound in national and international environmental legislation.

Key words: Pharmaceuticals, Triclosan, Toxicity, Cytotoxicity, Marine invertebrates.

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 3

2.1. Objetivo geral 3

2.2. Objetivos específicos 3

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

3.1. Aspectos Gerais da Poluição Aquática 4

3.2. Ecotoxicologia aquática 6

3.2.1. Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito agudo 10

3.2.2. Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico 10

3.2.3. Organismos-teste 11

3.2.4. Ensaios de toxicidade com organismos marinhos 12

3.2.5. Biomarcadores 12

3.2.6. Fármacos no ambiente aquático 13

3.2.7. Aspectos legais 18

3.2.8. Triclosan – Ocorrência no ambiente aquático e suas implicações 21

4 MATERIAIS E MÉTODOS 25

4.1. Coleta e preparo da água de diluição 25

4.2. Coleta, manutenção e cultivo de organismos-teste 26

4.3. Triclosan: Substância - Teste 30

4.3.1. Preparo das soluções-teste 31

4.4. Ensaios de toxicidade 31

4.4.1. Parâmetros Físicos e Químicos 31

4.4.2. Ensaios de sensibilidade 33

4.4.3. Controle positivo com o solvente Dimetilsufóxido (DMSO) 34

4.4.4. Ensaios Preliminares 34

4.4.5. Ensaios Definitivos 34

4.5. Métodos de ensaios de toxicidade e citotoxicidade 35

4.5.1. Ensaio para avaliação de efeito agudo (Mortalidade) com *Nitokra sp* (Crustacea : Harpacticoida). 35

4.5.2. Ensaio para avaliação de efeito agudo (Fertilização) com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). 36

4.5.3. Ensaio para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) de curta duração com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata:Echinoidea). 41

4.5.4. Ensaio para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) com *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). 46

4.5.5. Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro para avaliação de estresse celular no molusco bivalve *Perna perna* (Bivalvia:Mytilidae). 50

4.5.5.1. Preparo das Lâminas 51

4.5.5.2. Preparo da Solução Fisiológica 52

4.5.5.3. Preparo do Vermelho Neutro 53

4.5.5.4. Extração e Manuseio da Hemolinfa 53

4.5.5.5. Incubação e Leitura do Ensaio 54

4.6. Análises dos resultados dos ensaios de toxicidade e sensibilidade 58

4.6.1 Toxicidade aguda 58

4.6.2 Toxicidade crônica 60

5 RESULTADOS 63

5.1. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo 63

5.1.1. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo (Mortalidade) com o *Nitocra sp* (Crustacea, Copepoda) 63

5.1.1.1. Ensaios de sensibilidade 63

5.1.1.2. Controle positivo do solvente DMSO 64

5.1.1.3. Toxicidade aguda (Mortalidade) 65

5.1.1.4. Análises físicas e químicas 67

5.1.2. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo (Fertilização) com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea) 67

5.1.2.1. Ensaios de sensibilidade 67

5.1.2.2. Controle positivo do solvente DMSO 68

5.1.2.3. Toxicidade aguda (Fertilização) 69

5.1.2.4. Análises físicas e químicas 71

5.2. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito crônico 71

5.2.1. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) de curta duração com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea) 71

5.2.1.1. Ensaios de sensibilidade 71

5.2.1.2. Controle positivo do solvente DMSO 72

5.2.1.3. Toxicidade crônica (Embriolarval) 73

5.2.1.4. Análises físicas e químicas 79

5.2.2. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) com *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia) 78

5.2.2.1. Ensaios de sensibilidade 78

5.2.2.2. Controle positivo do solvente DMSO 79

5.2.2.3. Toxicidade crônica (Embriolarval) 80

5.2.2.4. Análises físicas e químicas 86

5.3. Ensaios de citotoxicidade com *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia) 86

5.3.1. Análises Físicas e Químicas 91

6 DISCUSSÃO 92

6.1. Toxicidade aguda do Triclosan 92

6.2. Toxicidade crônica do Triclosan 96

6.3. Citotoxicidade do Triclosan 99

6.4. Triclosan – Regulamentação e perspectivas 102

7 CONCLUSÕES 105

8 RECOMENDAÇÕES 106

APÊNDICES 107

ANEXOS 171

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 190

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1 – Características físicas e químicas do Triclosan..... 30
TABELA 2 – Organismos- teste, substâncias de referências e *end-points*..... 34
TABELA 3 – Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *Nitokra sp* (mortalidade)..... 36
TABELA 4 – Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *Lytechinus variegatus* (fertilização)..... 41
TABELA 5 – Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *Lytechinus variegatus* (embriolarval)..... 45
TABELA 6 – Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *Perna perna* (embriolarval)..... 50
TABELA 7 – Critérios para diferenciação de células saudáveis e células estressadas..... 56
TABELA 8 – Sensibilidade de *Nitokra sp* ao Dicromato de Potássio..... 64
TABELA 9 – Sumário estatístico para o teste Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$), com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade aguda de Triclosan com *Nitokra sp*..... 65
TABELA 10 - Percentual de mortalidade (médio e desvio-padrão) dos ensaios de toxicidade aguda de Triclosan com *Nitokra sp*..... 66
TABELA 11 - Toxicidade aguda (CL(I)50;96h) de Triclosan para *Nitokra sp*..... 67
TABELA 12 - Sumário estatístico para o teste Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* (Ensaio 1)..... 68
TABELA 13 - Sumário estatístico para o teste Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* (Ensaio 2)..... 68
TABELA 14 - Sumário estatístico para o teste Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* (Ensaio 4)..... 69
TABELA 15 - Percentual de fertilização (médio e desvio-padrão) dos ensaios de toxicidade aguda de Triclosan com *Lytechinus variegatus*..... 70
TABELA 16 - Toxicidade aguda (CI(I)50;1h) de Triclosan para *Lytechinus variegatus*..... 71
TABELA 17 - Sumário estatístico para o teste Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$), com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade crônica com *Lytechinus variegatus* (Ensaio 1)..... 72
TABELA 18 - Sumário estatístico para o teste Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$), com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* (Ensaio 4)..... 73
TABELA 19 - Percentual de desenvolvimento embriolarval (médio e desvio-padrão) dos ensaios de toxicidade crônica de Triclosan com *Lytechinus variegatus*.. 74
TABELA 20 - Toxicidade crônica de Triclosan (CENO(I), CEO(I), CI(I)50;24h) para *Lytechinus variegatus*..... 75
TABELA 21 - Sensibilidade (CI(I)50;48h) de *Perna perna* ao Dodecil Sulfato de Sódio (DSS)..... 79

TABELA 22 - Sumário estatístico para o teste Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade crônica com *Perna perna* (Ensaio 1)..... 80
TABELA 23 - Sumário estatístico para o teste Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade crônica com *Perna perna* (Ensaio 2)..... 80
TABELA 24 - Percentual de desenvolvimento embriolarval (médio e desvio-padrão) do primeiro ensaio de toxicidade crônica de Triclosan com *Perna perna*... 81
TABELA 25 - Percentual de desenvolvimento embriolarval (médio e desvio-padrão) das réplicas do segundo, terceiro e quarto ensaios com *Perna perna*..... 82
TABELA 26 - Toxicidade crônica de Triclosan (CENO(I), CEO(I), CI(I)50;48h) para *Perna perna*..... 83
TABELA 27 - Toxicidade aguda de Triclosan com organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos..... 93
TABELA 28 - Toxicidade crônica de Triclosan com organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos..... 98
TABELA 29 - Concentrações de Triclosan em efluentes de ETE`s, em água superficial e sedimentos..... 101
TABELA 30 - Classificação do Triclosan baseada na diretiva 93/67/EEC da União Européia e nos resultados do presente estudo..... 104

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1 - Ecotoxicologia – Ciência multidisciplinar..... 7
FIGURA 2 - Níveis de organização biológica e respostas a poluentes..... 8
FIGURA 3 - Origens e rotas dos FPHCP`s..... 15
FIGURA 4 - Estudos de toxicidade aguda x Estudos de toxicidade crônica..... 18
FIGURA 5 - Informações quanto aos riscos para saúde humana e ao meio ambiente 19
FIGURA 6 - Suporte de filtração utilizado para filtrar água com membrana de celulose..... 25
FIGURA 7 - *Lytechinus variegatus*..... 26
FIGURA 8 - Tanque com *Lytechinus variegatus*..... 27
FIGURA 9 - Banco natural de mexilhões *Perna perna*, SP..... 27
FIGURA 10 - Fêmea adulta de *Nitokra sp*..... 28
FIGURA 11 - Cultivos de *Nitokra sp*..... 29
FIGURA 12 - Estrutura química do Triclosan..... 30
FIGURA 13 - Equipamento Micronal para análise de pH..... 32
FIGURA 14 - Oxímetro WTW 315 – i..... 32
FIGURA 15 - Refratômetro utilizado para as medidas de salinidade..... 33
FIGURA 16 - Ovos de *Lytechinus variegatus* 40
FIGURA 17 - Fêmeas de *Lytechinus variegatus* liberando os óvulos..... 42
FIGURA 18 - Coleta de espermatozóides de *Lytechinus variegatus*..... 43
FIGURA 19 - Espermatozóides de *Lytechinus variegatus* acondicionados em béquer envolto com gelo..... 44
FIGURA 20 - Coleta de óvulos de *P. perna*..... 47
FIGURA 21 - Coleta de espermatozóides de *P. perna*..... 48
FIGURA 22 - Larvas - D normais de *P. perna*..... 49
FIGURA 23 - Aquários com mexilhões expostos às diferentes concentrações de Triclosan e aos controles de água e do solvente (DMSO)..... 51
FIGURA 24 - Preparo e secagem das lâminas com Poly-L-lisina..... 52
FIGURA 25 - Solução de trabalho de vermelho neutro sobre a camada de hemócitos de cada lâmina, dentro da câmara úmida e à prova de luz..... 55
FIGURA 26 - Leitura sistemática das lâminas em microscópio óptico..... 55
FIGURA 27 - Células saudáveis..... 57
FIGURA 28 - Células estressadas..... 57
FIGURA 29 - Fluxograma com as etapas para o cálculo da CE e/ou CL50..... 59
FIGURA 30 - Fluxograma com as etapas para o cálculo de CENO e CI50..... 61
FIGURA 31 - Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *L.variegatus* (Ensaio 1)..... 76
FIGURA 32 - Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *L.variegatus* (Ensaio 2)..... 76
FIGURA 33 - Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *L.variegatus* (Ensaio 3)..... 77
FIGURA 34 - Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *L.variegatus* (Ensaio 4)..... 77
FIGURA 35 - Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *L.variegatus* (Ensaio 5)..... 78

FIGURA 36 - Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *P.perna* (Ensaio 1)..... 84
FIGURA 37 - Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *P.perna* (Ensaio 2)..... 84
FIGURA 38 - Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *P.perna* (Ensaio 3)..... 85
FIGURA 39 - Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *P.perna* (Ensaio 4)..... 85
FIGURA 40 - Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (preliminar)..... 86
FIGURA 41 - Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (Ensaio 1 – 24 horas)..... 87
FIGURA 42 - Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (Ensaio 1 – 48 horas)..... 88
FIGURA 43 - Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (Ensaio 1 – 72 horas)..... 88
FIGURA 44 - Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (Ensaio 2 – 24 horas)..... 89
FIGURA 45 - Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (Ensaio 2 – 48 horas)..... 90
FIGURA 46 - Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (Ensaio 2 – 72 horas)..... 90

1. INTRODUÇÃO

As modificações na natureza, em todas as suas formas, geradas pela atividade humana, ameaçam a qualidade de vida do próprio ser humano (PORTO, 2000).

Atualmente tem se discutido muito sobre poluição e suas consequências ao meio ambiente devido às alterações ambientais que o mundo tem sofrido como, por exemplo, o aquecimento global. Uma dessas preocupações recentes tem sido também a contaminação do meio ambiente por medicamentos.

Fármacos e Produtos de Higiene e Cuidados Pessoais (FPHCP) compreendem um grupo diversificado de produtos químicos utilizados na medicina veterinária, na saúde humana, em práticas agrícolas e em cosméticos (DAUGHTON, 2007).

Após a administração, uma parte significativa dos fármacos é excretada e levada para as Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) ou despejados no ambiente aquático por esgotos sem tratamento. Alguns produtos farmacêuticos não são totalmente eliminados nas ETE, já que a tecnologia convencional de tratamento utilizada, quando existente, é insuficiente para remover completamente estes compostos. Como conseqüência, diferentes classes e quantidades de produtos farmacêuticos atingem as águas superficiais, águas subterrâneas (FÁRRE *et al*., 2001) e sedimentos (AGUERA *et al.*, 2003).

Uma vez que os produtos farmacêuticos são sintetizados com a finalidade de produzir um efeito biológico (HENSCHEL *et al*., 1997), os efeitos para os organismos não-alvo no ambiente podem ocorrer, mesmo quando expostos a baixas concentrações. Portanto, a probabilidade do risco ambiental destes compostos não pode ser descartada.

O crescimento populacional e o consequente aumento no consumo de FPHCP`s, geram a necessidade de estudos ecotoxicológicos que dêem suporte para avaliação de risco ecológico destes compostos. Neste contexto, nos últimos anos estes estudos têm sido realizados com o objetivo de se conhecer os efeitos biológicos dos fármacos e seus metabólitos em diferentes espécies de organismos aquáticos (LANGE *et al*., 2006; FLAHERTY & DODSON, 2005; BORGMANN *et al.*, 2007).

Da mesma forma, os estudos de identificação e quantificação de fármacos se iniciaram em águas superficiais, e agora, incluem sedimentos (partículas em suspensão), lodo de ETE`s, ar (como por exemplo, FPHCP sorvidos a partículas em suspensão) e a biota (DAUGHTON, 2007).

Das diversas classes de fármacos, os antibióticos são os mais estudados em função da capacidade de promoverem resistência em bactérias (SANTOS *et al*., 2010). Este problema também está associado aos bactericidas utilizados em produtos de higiene e cuidados pessoais, como por exemplo, o Triclosan. A segurança deste bactericida tem sido questionada em relação à saúde ambiental e humana em função de alguns fatores, tais como a toxicidade, a conversão pela fotodegradação e metilação biológica em compostos mais tóxicos e por sua capacidade de bioacumular.

Em diferentes países da Europa, Ásia e América do Norte, estudos publicados têm demonstrado a ocorrência do Triclosan em ambientes aquáticos dulcícolas, estuarinos e marinhos. No Brasil, publicações que reportem a ocorrência de Triclosan em matrizes ambientais são inexistentes e são poucos os estudos ecotoxicológicos com compostos emergentes, incluso o Triclosan, principalmente com organismos tropicais marinhos.

Diante deste contexto, no presente estudo foram empregados ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo e crônico do Triclosan, com diferentes grupos de invertebrados marinhos (Equinodermata, Mollusca e Crustacea). Ensaios de citotoxicidade para avaliação de efeito subletal por meio do método do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro foram realizados de modo a complementar a abordagem.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a toxicidade do fármaco Triclosan para invertebrados marinhos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade aguda do Triclosan usando o copépodo *Nitokra sp* e gametas de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*;
- Avaliar a toxicidade crônica do Triclosan usando embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e do molusco bivalve *Perna perna*;
- Avaliar a citotoxicidade do Triclosan utilizando hemócitos do molusco bivalve *Perna perna*;
- Classificar o fármaco Triclosan quanto à toxicidade de acordo com a diretiva 93/67/EEC da União Européia;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos Gerais da Poluição Aquática

A água é o elemento fundamental da vida e representa, sobretudo, o principal constituinte de todos os organismos vivos. Seus múltiplos usos são indispensáveis a um largo espectro das atividades humanas, onde se destacam, entre outros, o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica e as atividades de lazer e recreação, bem como a preservação da vida aquática (CETESB, 2009).

Nas ultimas décadas, no entanto, os ecossistemas aquáticos têm sofrido alterações significativas em função de diversos fatores antropogênicos tais como mineração, urbanização, construção de represas e barragens, interferência no curso natural dos rios, desmatamento e uso inadequado do solo, intensa atividade agrícola e lançamentos de efluentes domésticos e industriais.

A história da poluição ambiental aquática remonta ao início da história da civilização humana. Entretanto, a poluição aquática não recebeu muita atenção até que fosse atingido um limite a partir do qual foi possível perceber conseqüências adversas nestes ecossistemas e em sua biota (FREIRE *et al.*, 2008)

A crescente expansão demográfica e industrial, desordenada e sem levar em consideração a proteção dos ecossistemas, vem comprometendo a qualidade ambiental e da saúde humana. Os ecossistemas costeiros, os quais resultam da interação de ambientes marinhos e terrestres caracterizados por recortes litorâneos, pela diversidade biológica e fragilidade ambiental, vêm sofrendo influência tanto de processos naturais quanto antrópicos (BRASIL, 2000).

O homem está cada vez mais se estabelecendo em direção ao litoral. Cerca de uma em cada três pessoas no planeta vive hoje a 100 quilômetros do mar e 44 por cento da população mundial - mais do que habitavam o mundo inteiro em 1950 - estão a 150 km dele. Dois terços de todas as cidades com mais de 2,5 milhões de habitantes estão situadas na região costeira (GESAMP, 2001).

Historicamente, os mares foram considerados um verdadeiro depósito de grande variedade de resíduos provenientes das atividades humanas. A humanidade sempre acreditou na idéia de que a capacidade de diluição deste ambiente seria a solução para a poluição. Com o avanço da ciência, foi comprovado que os oceanos não possuem esta capacidade infinita de absorver e diluir o progressivo aumento de resíduos que são

introduzidos de forma intencional ou acidental no ambiente marinho (NYBAKKEN, 2001).

Uma gama extremamente diversa de atividades humanas compromete os ecossistemas costeiros. Estas incluem a exploração petrolífera, a pesca, as operações de maricultura, transporte marítimo, dragagem, a descarga de esgotos e produtos químicos industriais, bem como os impactos associados às fontes difusas de poluição marinha (BOWEN & DEPLEDGE, 2006).

Dentre as principais fontes de poluição dos ecossistemas aquáticos encontram-se os lançamentos de efluentes líquidos domésticos e industriais sem o devido tratamento. Aliados a esses fatos, a quantidade, a diversidade e o consumo crescente de produtos químicos aumentam a probabilidade dos riscos nesses ambientes (ZAGATTO, 2006).

A introdução no ambiente aquático de substâncias químicas produzidas pelo homem engloba potencialmente um enorme número de substâncias diferentes. Além disso, novas substâncias químicas são sintetizadas a cada ano, sendo que a maior parte destas alcança, direta ou indiretamente, os ecossistemas marinhos (WARD, 1995; SOUSA, 2002).

Produtos químicos representam 14% das importações e exportações dos países da OECD (*Organisation for Co-operation and Development*) e a década atual tem sido caracterizada pela expansão da produção e utilização nos países em desenvolvimento (UNEP, 2003). Na União Européia são registradas cerca de 100.000 substâncias químicas diferentes, dos quais 30.000 destes produtos são comercializados em quantidades maiores que 1 tonelada. Estes números preocupam pelo fato destas substâncias possuírem pouca ou nenhuma informação quanto aos riscos à saúde humana e meio ambiente (BEAUSSE, 2004).

De acordo com a Sociedade Americana de Química, há cerca de 10 milhões de substâncias químicas mencionadas na literatura cientifica. Estima-se que cerca de 70 mil são de uso cotidiano, sendo que de mil a duas mil novas substâncias são adicionadas a esta lista anualmente (MOZETO & ZAGATTO, 2006).

Diante deste contexto, o conhecimento a respeito das diferentes características das mais variadas substâncias químicas e as estratégias de controle e monitoramento ambiental são fundamentais para minimizar os riscos ecológicos. De acordo com CHAPMAN (2007), poluição é a contaminação que resulta em efeitos adversos biológicos para as comunidades residentes e, a diferenciação dos conceitos de poluição e contaminação não pode ser realizada apenas com base em análises químicas, pois estas não fornecem informações sobre a biodisponibilidade e toxicidade.

Os últimos avanços nos critérios de qualidade da água assumiram os efeitos ecológicos como uma base de controle ao invés de focalizar somente os agentes químicos ou físicos, com potencial de causar efeitos adversos. Portanto, a avaliação da qualidade da água é definida diretamente em termos de "estrutura e funcionamento dos sistemas ecológicos" em vez de ser feita apenas com base na contaminação química. Neste contexto, um corpo d'água é um bem ambiental a ser protegido, e não um recurso a ser explorado e as qualidades biológica e ecológica assumem um papel dominante (VIGHI *et al.*, 2006).

Diante destes conceitos, a Ecotoxicologia ganha destaque como uma abordagem complementar às análises químicas, possibilitando o entendimento do comportamento dos compostos químicos no ambiente bem como os possíveis efeitos causados em diferentes níveis de organização biológica.

3.2. Ecotoxicologia aquática

O termo Ecotoxicologia ou Toxicologia Ambiental foi sugerido pela primeira vez em 1969, durante uma reunião do *Committe of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista francês René Truhaut em 1969 (TRUHAUT, 1977 apud RAND 1995). De acordo com este autor, a Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais e 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 (CAIRNS & NIEDERLEHNER, 1995). Mais recentemente, NEWMAN *et al.* (2002) definiram a Ecotoxicologia como a ciência dos contaminantes e seus efeitos sobre os constituintes da biosfera, incluindo o homem.

A Ecotoxicologia Aquática, como os demais campos de estudo da Ecotoxicologia, envolve o conhecimento de outras áreas da ciência, o que caracteriza a sua multidisciplinaridade (FIG. 1). Análises estatísticas e modelagens matemáticas, por exemplo, têm sido utilizadas como ferramentas importantes para quantificar e prever os efeitos biológicos, bem como para determinar sua probabilidade ocorrência em diferentes condições ambientais (RAND *et al.*, 1995).

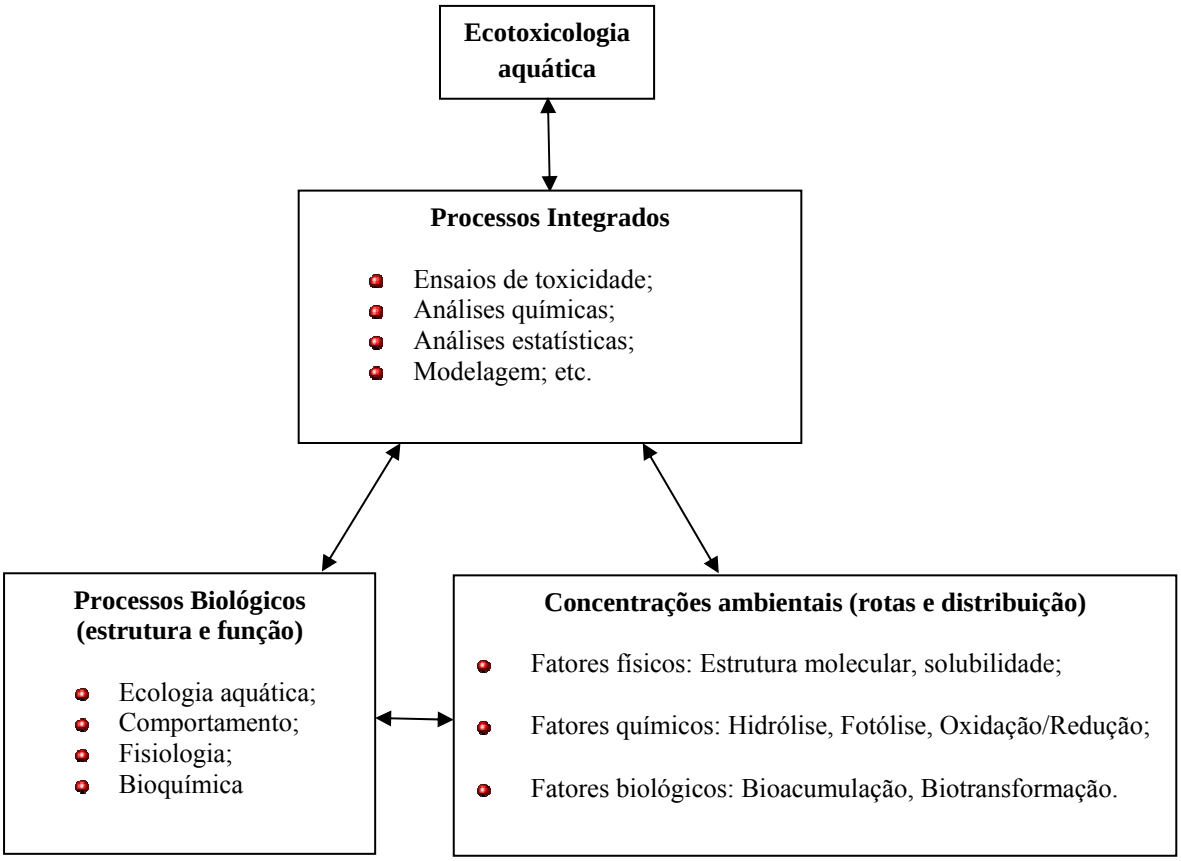


FIGURA 1 - Ecotoxicologia – Ciência multidisciplinar (RAND *et al.,* 1995).

Estudos ecotoxicológicos podem ser utilizados para determinar efeitos biológicos em diferentes níveis de organização biológica, desde moleculares e bioquímicos até comunidades e ecossistemas (FIG.2) (WALKER *et al.*, 1996) e têm sido empregados com a finalidade de se avaliar os efeitos da introdução de xenobióticos no ambiente aquático, sendo que alguns parâmetros como toxicidade aguda e crônica já são previstos na Legislação Brasileira, como por exemplo na Resolução CONAMA 357/2005 (PEREIRA, 2008).

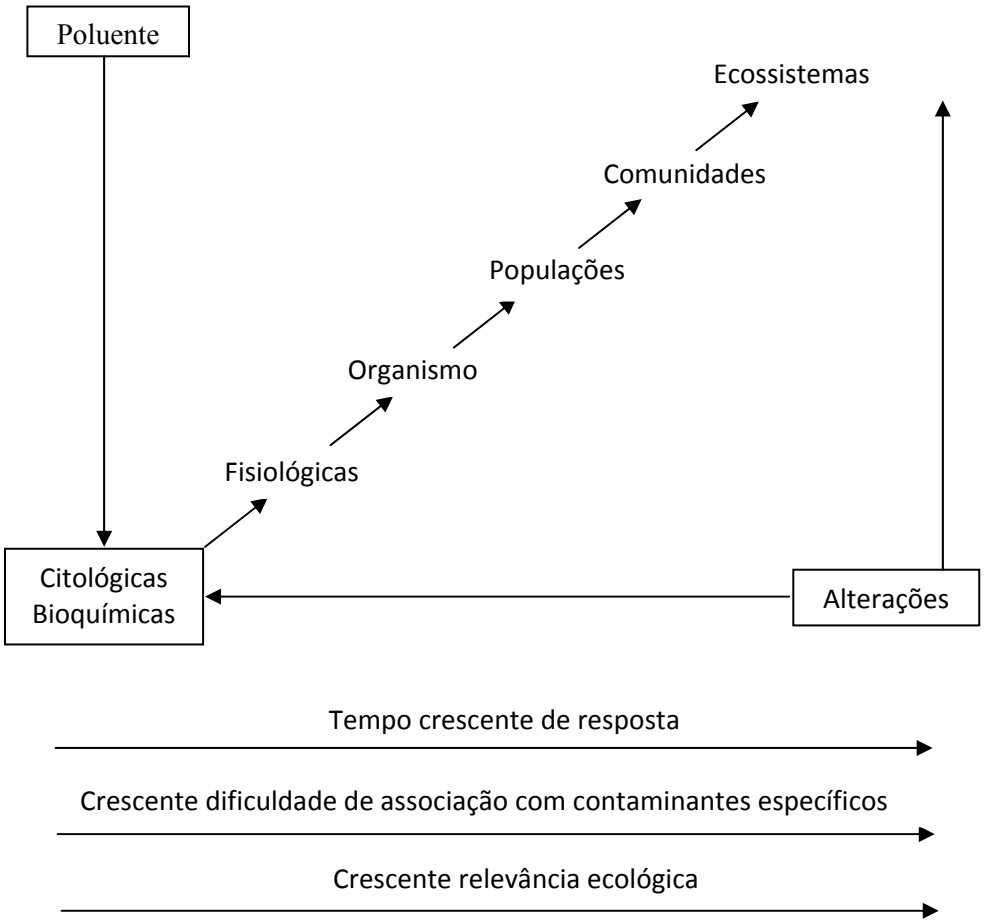


FIGURA 2. Níveis de organização biológica e respostas a poluentes (Nascimento *et al*, 2006).

Dentre os estudos ecotoxicológicos, os ensaios de toxicidade são utilizados para uma variedade de aplicações, tais como: regulação sobre o desenvolvimento, manufatura e comercialização de produtos químicos, registro de produtos para atender as exigências legais, controle de descargas municipais e industriais, avaliação de risco ambiental, subsidiar o estabelecimento de valores para os critérios de qualidade de água e sedimento, regulação de limites máximos permissíveis para efluentes e substâncias químicas, como abordagem integrante de programas de monitoramento ambiental, avaliar a eficiência de sistemas de tratamento de efluentes, entre outras (ABESSA, 2002).

Ensaios de toxicidade são definidos como procedimentos nos quais as respostas de organismos vivos são utilizadas para avaliar a capacidade de substâncias químicas (isoladas ou em combinação) e/ou amostras ambientais, causarem efeitos deletérios nos organismos expostos (RAND *et al.*, 1995).

Diferentes métodos de ensaios com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais e/ou de campo, têm sido utilizados para identificar os efeitos de xenobióticos no ambiente. São consagrados como um importante instrumento de controle ambiental, que fornece dados qualitativos e quantitativos sobre os efeitos adversos de estressores ambientais (COONEY, 1995), proporcionando uma evidência direta das conseqüências da contaminação, podendo ser utilizados para estimar a toxicidade de misturas complexas de contaminantes tanto em fase líquida, como na fase sólida do sedimento (CESAR *et al*., 2002). Os ensaios de toxicidade possuem uma série de vantagens como baixo custo, obtenção de respostas rápidas, simplicidade da maior parte dos métodos e fácil interpretação dos resultados.

De acordo com RAND *et al.* (1995) os primeiros ensaios de toxicidade (aguda) com organismos aquáticos foram implementados a partir de 1930, com objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias químicas e despejos líquidos.

A partir de 1960 é que foram estabelecidos, nos Estados Unidos (*Water Quality Act*), os primeiros padrões de qualidade das águas para proteção da vida aquática baseados em resultados de ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo com organismos mais sensíveis (ZAGATTO, 2006).

Em âmbito nacional, as primeiras iniciativas em termos metodológicos na área de Ecotoxicologia ocorreram em 1975 com a participação da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) em um programa internacional de padronização de ensaios de toxicidade aguda com peixes, organizado pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *International Organization Standardization* (ISO). A partir de 1975, houve um grande avanço no conhecimento da Ecotoxicologia nas universidades brasileiras e órgãos ambientais, no que diz respeito a programas de monitoramento ambiental e capacitação técnica de recursos humanos nessa área. Como conseqüência disso foram desenvolvidos e adaptados vários métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica, de curta duração, utilizando diferentes espécies e grupos de organismos para avaliação da poluição hídrica (ZAGATTO, 2006).

Atualmente, diversos métodos de ensaios de toxicidade já estão bem estabelecidos, sendo alguns padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normalização, como por exemplo, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), American Society for Testing and Materials (ASTM), American Water Work Association (AWWA), International Organization Standardization (ISO), Organization for

Economic Co-Operation and Development (OECD), *Association Française de Normalisation* (AFNOR) e Deutsches Institut fur Normung (DIN).

3.2.1. Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito agudo

O ensaio de toxicidade aguda pode ser definido como o procedimento que avalia os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico em um curto período de tempo, em geral num intervalo de 0 a 96 horas. Usualmente os critérios de avaliação são a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006; MAGALHÃES & FILHO, 2008) e consideram uma fase do ciclo de vida.

As avaliações de efeito agudo são importantes para evidenciar os efeitos letais em curtos intervalos de tempo, fornecendo dados fundamentais para o desenvolvimento e adoção de critérios para melhoria da qualidade ambiental (FONSECA, 1991).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios para avaliação de efeito agudo, pode-se empregar diferentes métodos estatísticos, com o propósito de calcular a concentração mediana que causa efeito adverso em 50% dos organismos expostos durante o período de ensaio. Os valores de toxicidade aguda podem ser expressos em CE50 (concentração mediana efetiva que causa imobilidade em 50% dos organismos expostos) ou CL50 (concentração mediana letal a 50% dos organismos expostos).

3.2.2. Ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico

Os ensaios de toxicidade para avaliação de efeito crônico são empregados para mensurar os efeitos de substâncias químicas que ocorrem durante uma parte significativa (mais de uma fase) do ciclo de vida do organismo, normalmente um décimo ou mais do tempo de vida.

Os estudos crônicos avaliam os efeitos subletais de agentes tóxicos no desenvolvimento, reprodução e comportamento, devido a perturbações fisiológicas e bioquímicas (ADAMS & ROWLAND, 2002). De acordo com estes autores, normalmente são empregados nos estudos para avaliação de efeitos crônicos, fases mais sensíveis do ciclo de vida dos organismos-teste, tais como embrionária e larval.

De modo geral, os efeitos são subletais e observados em situações em que as concentrações do agente tóxico, permitem a sobrevivência dos organismos-teste, mas afetam uma ou mais funções biológicas (MAGALHÃES & FILHO, 2008).

Os resultados dos ensaios de toxicidade crônica podem ser utilizados para estimar a maior concentração que não causa efeitos aos organismos-teste (CENO) e a menor concentração que causa efeito estatisticamente significativo aos organismos-teste (CEO). Um valor pontual de toxicidade pode ser estimado para determinar a concentração do agente tóxico que causa uma determinada porcentagem de redução no desenvolvimento dos organismos exposto (CI – concentração de inibição) (ABNT, 2006).

3.2.3. Organismos-teste

De acordo com RAND *et al.* (1995), a fim de extrapolar resultados relevantes e ecologicamente significativos a partir de ensaios de toxicidade aquática, não apenas os ensaios devem ser adequados, mas também os organismos que serão empregados no estudo. Vários critérios devem ser considerados na seleção de organismos para ensaios de toxicidade, tais como:

a) Em função da variação da sensibilidade entre as espécies, um grupo de espécies, representando um amplo leque de sensibilidades deve ser utilizado sempre que possível;

b) Espécies amplamente disponíveis e abundantes devem ser consideradas;

c) Sempre que possível, as espécies devem ser estudadas para que sejam indígenas ou representantes do ecossistema que pode receber o impacto;

d) Espécies de importância comercial e relevância ecológica devem ser incluídas nos estudos;

e) Espécies devem ser passíveis de manutenção e cultivo em laboratório de modo a facilitar a realização dos ensaios de toxicidade aguda e crônica;

f) Conhecimento da biologia e ecologia das espécies, o que facilita a interpretação dos resultados dos ensaios.

A realização dos ensaios de toxicidade com organismos aquáticos depende da disponibilidade dos mesmos. Há três modos de se dispor de organismos: a coleta em ambientes naturais, a aquisição através de produtores especializados e o cultivo em laboratório (DOMINGUES & BERTOLETTI, 2006).

Uma ampla gama de organismos é utilizada em ensaios laboratoriais sendo que os principais grupos são as bactérias, as microalgas, os microcrustáceos, os equinóides, os moluscos e os peixes.

3.2.4. Ensaios de toxicidade com organismos marinhos

Os oceanos contêm uma grande variedade de espécies que são exploradas para consumo humano. Estima-se que mais de 2 bilhões de pessoas em todo o mundo dependem da proteína dos mares e dos ambientes costeiros; no entanto, é neste ambiente que os resíduos antropogênicos muito frequentemente se acumulam (BOWEN & DEPLEDGE, 2006).

Com os oceanos cobrindo 70% da superfície da terra e contendo uma vasta diversidade de plantas e animais nas regiões costeiras, tornam-se essenciais para a humanidade e para a preservação da vida aquática, avaliações ecotoxicológicas dos agentes químicos em organismos marinhos visando o controle das fontes poluidoras (WARD, 1995). De acordo com este mesmo autor, a utilização de diferentes grupos de organismos marinhos em ensaios ecotoxicológicos permite a identificação das espécies mais sensíveis.

Segundo SOUSA (2002), a aplicação de ensaios de toxicidade para avaliação de efluentes e de diferentes poluentes sobre a biota marinha teve início, no Brasil, no final da década de 1980. Atualmente, há diversos métodos de ensaios de toxicidade com organismos marinhos padronizados, com diferentes espécies de algas, peixes, crustáceos, anelídeos, moluscos, equinóides que possibilitam uma avaliação em diferentes matrizes ambientais (água, sedimento, água intersticial), conforme descrito em NASCIMENTO *et al.* (2002).

3.2.5. Biomarcadores

Do ponto de vista ecológico, os métodos mais relevantes para avaliação da toxicidade de contaminantes são aqueles que determinam alterações na estrutura e funcionamento dos ecossistemas (KELLY & HARWELL, 1989). Entretanto, quando uma alteração neste nível é detectada, o ecossistema já pode estar severamente danificado. Além disso, devido ao grande número de variáveis ambientais naturais e antropogênicas, é geralmente impossível estabelecer uma relação do grau de alteração em ecossistemas a concentrações de poluentes (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

O uso de marcadores biológicos ou biomarcadores em nível molecular ou celular tem sido proposto como uma ferramenta mais sensível para detecção dos primeiros sinais de efeitos biológicos (*early-warning*) na avaliação da qualidade ambiental (CAJARAVILLE *et al*., 2000), proporcionando uma proteção mais eficaz aos ecossistemas (PAYNE et al, 1996).

Biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou efeito de um xenobiótico (LAM & GRAY, 2003). Como a célula é o local onde a acumulação de contaminantes, metabolismo e toxicidade ocorrem, certas respostas celulares têm sido usadas como biomarcadores de exposição e efeitos de contaminantes em programas de monitoramento ambiental (MOORE, 1985) e especial atenção tem sido dada a técnicas de avaliação de danos em membranas (PEREIRA 2008).

O sistema lisossomal foi identificado como um biomarcador de estresse celular que responde a diferentes classes de contaminantes, inclusive os fármacos (MOORE, 1990; MOORE *et al.*, 2007). Dentre os diversos métodos para avaliação da estabilidade e integridade lisossomal, o método de ensaio do tempo de retenção do corante Vermelho Neutro (LOWE *et al.*, 1995) têm sido amplamente empregado em programas de monitoramento ambiental (MOORE, 1990; LOWE *et al.*, 1995; WEDDERBURN *et al.*, 2000) bem como para avaliar os efeitos de substâncias químicas isoladas (LOWE & PIPE, 1994; NICHOLSON, 2001; CANESI *et al.*, 2007; BINELLI *et al.*, 2009).

De acordo com este método, o corante é seqüestrado pelo lisossomo quando as células vivas são pré-incubadas com vermelho neutro (NR). Através da visualização por microscópio pode ser avaliado o momento que o corante extravasa para o citosol da célula, e uma diminuição do tempo de retenção do corante em relação à organismos saudáveis ou não expostos caracteriza dano nas membranas lisossomais (FREIRE *et al.*, 2008). O tempo que o corante leva para atingir o citosol está relacionado com o grau de dano nas membranas (LOWE & PIPE, 1994). De forma geral, as conseqüências dos danos nas membranas lisossômicas são a autofagia e a consequente degeneração celular (PEREIRA, 2008).

3.2.6. Fármacos no ambiente aquático

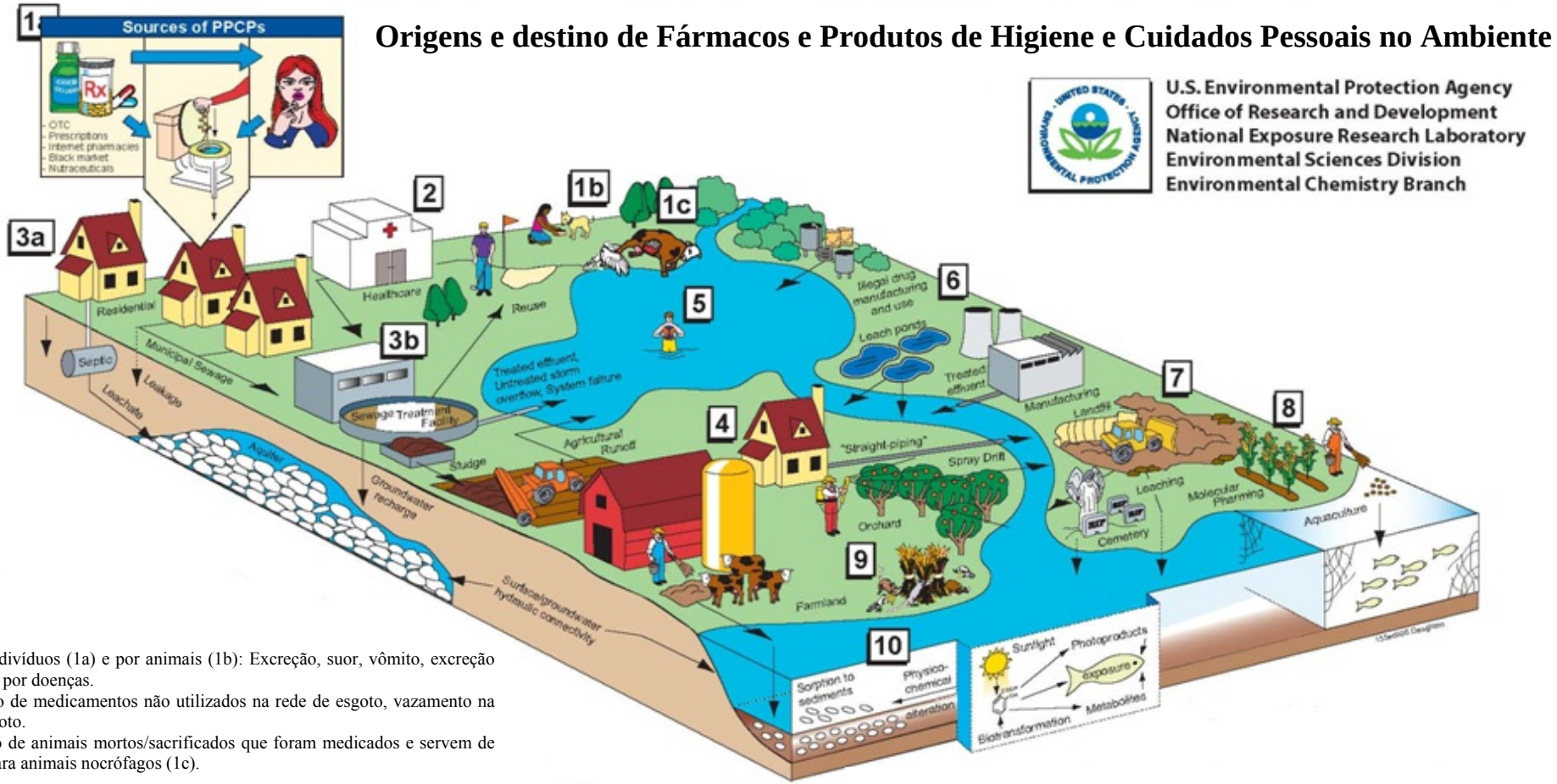
Os estudos sobre poluentes ambientais estiveram focados nas últimas décadas nos poluentes prioritários, conhecidos como poluentes orgânicos persistentes (POP) (ELLIS, 2006). Estão inseridos nesta classe de compostos químicos o pesticida DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), os PCB (Bifenilas Policloradas), as dioxinas e furanos, entre outros (JONES & VOOGT, 1999).

No entanto, a rápida evolução da química analítica possibilitou a detecção de fármacos e produtos de higiene e cuidados pessoais (FPHCP) em vários compartimentos ambientais. Estes compreendem um conjunto completamente novo de contaminantes denominados micropoluentes ou compostos químicos emergentes (TERNES, 2010).

Os fármacos abrangem um grupo diversificado de produtos químicos utilizados na medicina veterinária, nas práticas agrícolas, na saúde humana e nos cosméticos (produtos de higiene e cuidados pessoais). Muitos são altamente bioativos, a maioria é polar e todos, quando presentes no ambiente, ocorrem geralmente em concentrações traço. Esta classe de compostos tem suscitado grande preocupação nos últimos anos devido à introdução contínua no ambiente aquático (BARCELÓ & PETROVIC, 2007).

De acordo com DAUGHTON (2007) os efluentes de Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) têm sido reconhecidos como as principais vias potenciais de liberação de poluentes. Vale ressaltar que em âmbito nacional, as ETE são preparadas para diminuição da carga orgânica dos efluentes e, em muitas localidades, os mesmos são lançados sem nenhum tratamento. Uma vez liberados no meio ambiente, os fármacos (como outros poluentes) podem ter a sua “residência” em reservatórios de armazenamento que podem ser vistas como fontes secundárias de disponibilização; exemplos são os resíduos que são concentrados nos sedimentos, em partículas orgânicas, ou na biota, portanto as fontes são diversas (FIG. 3).

Origens e destino de Fármacos e Produtos de Higiene e Cuidados Pessoais no Ambiente



Legenda

1) Uso por indivíduos (1a) e por animais (1b): Excreção, suor, vômito, excreção exacerbada por doenças.
- Eliminação de medicamentos não utilizados na rede de esgoto, vazamento na rede de esgoto.
- Disposição de animais mortos/sacrificados que foram medicados e servem de alimento para animais nocrófagos (1c).

2) Lançamento de resíduos hospitalares tratados e não tratados na rede coletora de esgoto doméstico.

3) Lançamentos de resíduos em fossas (3a). Lançamentos de efluentes tratados em águas superficiais, reuso (agricultura ou doméstico), transbordamento de esgoto não tratado em função de intempéries ou por falhas no sistema (3b).

4) Utilização de esterco e de resíduos sólidos de ETE.

5) Introdução de resíduos através do contato primário.

6) Lançamentos indústrias via efluentes controlados e ilícitos.

7) Disposição em aterros de resíduos domésticos, hospitalares e de substâncias perigosas e lixiviação de aterros e cemitérios com problemas estruturais.

8) Utilização de ração com medicamentos na aqüicultura, excretas dos animais cultivados.

9) Lançamento de medicamentos com dupla função, por exemplo no controle de pragas (ex: warfarin – anticoagulante usado no controle de roedores.

10) Fototransformação, alterações físico-químicas, volatilização, degradação, mineralização, absorção pelas plantas.

FIGURA 3. Origens e rotas dos FPHCP (modificado). Fonte: http: //epa.gov/nerlesd1/chemistry/pharma/images/drawing.pdf

A ocorrência de substâncias farmacêuticas no ambiente aquático serve como um alerta oportuno de que não somente as substâncias que ocorrem em listas de prioridades para programas de monitoramento contaminam o ambiente aquático (THOMAS & LANGFORD, 2007). De acordo com MULROY (2001), uma vez que são persistentes e mantêm suas propriedades químicas tempo o bastante para servir a um propósito terapêutico, os fármacos merecem atenção quanto aos possíveis impactos no ambiente. Este mesmo autor afirma que 50% a 90% de uma dosagem de fármaco são excretadas inalteradas e persistem no meio ambiente.

A identificação e ocorrência de diferentes classes de fármacos em ETE e em água superficial foi primeiramente relatada por TERNES (1998) e posteriormente por DAUGHTON e TERNES (1999). Nos últimos anos diversos autores têm reportado a ocorrência de FPHCP em matrizes ambientais (água superficial e sedimentos) e em efluentes de ETE (TERNES *et al.*, 1999; STUMPF *et al.*, 1999; AGUERA *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2006; ELLIS, 2006; LARSSON *et al.*, 2007; NISHI *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2008; KUSTER *et al.*, 2008; FAIR *et al.*, 2009).

De acordo com estes autores, bactericidas, antiinflamatórios, analgésicos, antidepressivos, hormônios, antibióticos, anticonvulsivos, estimulantes, entre outras classes de fármacos já foram encontrados nos efluentes de ETE, em água superficial e sedimentos.

BLAISE *et al.* (2006), identificaram e quantificaram diferentes classes de fármacos em amostras de efluentes de uma estação de tratamento de esgoto em Montreal, Canadá. Substâncias como ibuprofeno, naproxen (antiinflamatórios), carbamazepan (anticonvulsivo), sulfapiridina, novobiocin (antibióticos) e cafeína (estimulante) foram detectados em concentrações que variaram de 33 $ng.L^{-1}$ a 22187 $ng.L^{-1}$.

Em âmbito nacional, no estudo realizado por GHISELLI (2006) na região metropolitana de Campinas, foram identificados e quantificados em amostras de efluentes bruto e tratado os fármacos ibuprofeno (54,2 e 48,4 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente) e paracetamol (18,1 e 5,9 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente). Já em água superficial foram detectados os compostos cafeína (1,1 $\mu g.L^{-1}$ – 106 $\mu g.L^{-1}$) e diclofenaco (2,0 $\mu g.L^{-1}$ e 6,0 $\mu g.L^{-1}$).

Devido à introdução contínua em águas superficiais de produtos farmacêuticos, é possível que o ambiente aquático esteja exposto ao risco de poluição. Embora diversos autores que identificaram e quantificaram esses poluentes não tenham detectado concentrações elevadas o suficiente para ocorrência de efeito agudo no ambiente, há evidências de que estes compostos podem estar presentes em concentrações suficientes para causar efeitos crônicos (CRANE *et al.*, 2006).

De acordo com JONES *et al.* (2007), a poluição por produtos farmacêuticos pode ocorrer em concentrações de partes por bilhão (ppb) ou partes por trilhão (ppt) e, embora estas concentrações sejam realmente muito baixas, é provável que alguns produtos farmacêuticos tenham potencial de causar efeitos prejudiciais no ambiente. Uma vez que estes compostos são sintetizados para provocar um efeito biológico há preocupações justificáveis sobre seus potenciais efeitos na flora e na fauna.

A questão da ocorrência de fármacos no ambiente aquático tem atraído significativa atenção da mídia e está intimamente relacionada ao estilo de vida da sociedade moderna, aos padrões de consumo e ao envelhecimento da população. Estes fatores exigem, em níveis mais elevados, o uso de medicamentos e produtos para cuidados pessoais (ELLIS, 2006).

Nesse sentido, para se conhecer os efeitos biológicos e realizar avaliações de risco ambiental, estudos ecotoxicológicos para avaliação de efeitos agudo e crônico de fármacos tem sido realizado com as diferentes classes de fármacos e com distintos organismos-teste (HALLARE *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2005; GAGNÉ *et al.*, 2006; GAGNÉ *et al.*, 2006; JJEMBA, 2006; KIM *et al.*, 2007; CANESI *et al.*, 2007; QUINN *et al.*, 2008).

Um levantamento dos ensaios de toxicidade realizados com diferentes classes de fármacos, baseado em estudos publicados no período de 1996 a 2009, foi realizado por SANTOS *et al* (2010) (FIG. 4). Os dados de toxicidade aguda, no período citado, foram mais empregados e são úteis para estimar os efeitos, por exemplo, quando uma descarga acidental de drogas ocorre, uma vez que as concentrações ambientais geralmente relatadas para estes compostos são baixas. Já os dados de toxicidade crônica são escassos, bem como estudos de toxicidade de fármacos com organismos marinhos.

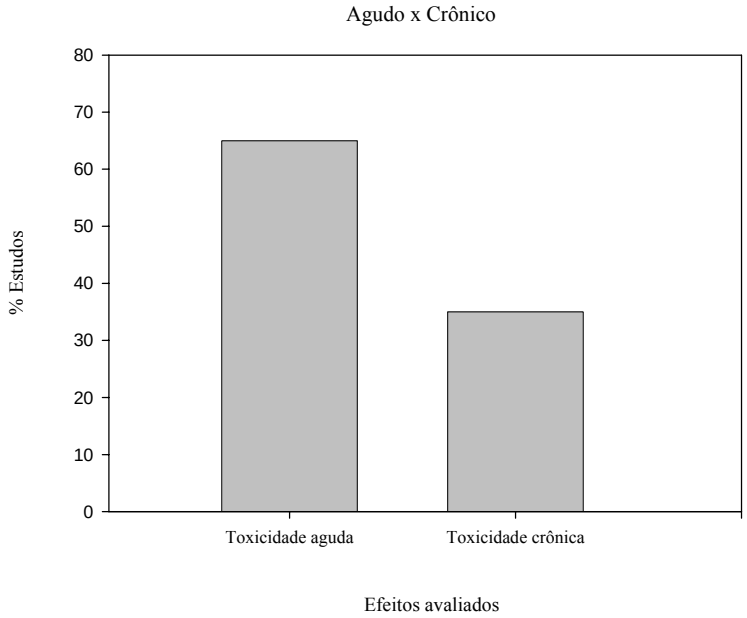


FIGURA 4. Estudos agudos x Estudos crônicos (modificado). Fonte: SANTOS *et al.* (2010).

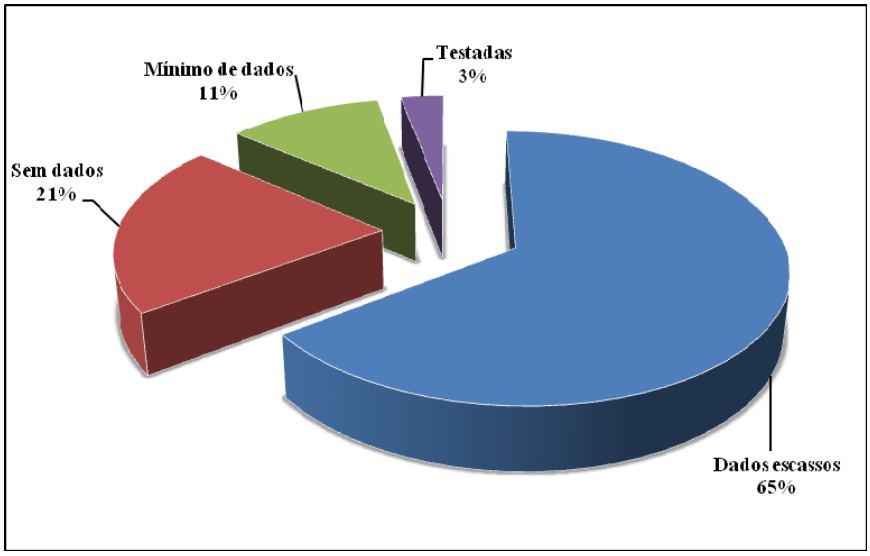
Atualmente, estudos ecotoxicológicos têm sido realizados no Brasil para se identificar fármacos potencialmente perigosos para o meio ambiente (LAMEIRA, 2008; PUSCEDDU, 2009), porém, os dados disponíveis na literatura são insuficientes. A ocorrência desses fármacos residuais em águas superficiais e subterrâneas, bem como em sedimentos, demonstra a necessidade de estudos que determinem os efeitos tóxicos dessas substâncias no ambiente (BILA & DEZOTTI, 2003).

3.2.7. Aspectos legais

A produção mundial da indústria química passou de 1 milhão de toneladas no ano de 1930 para 400 milhões de toneladas em 1999, com faturamento de aproximadamente 1,5 trilhão de dólares, o que representa cerca de 7% dos rendimentos globais e 9% do comércio internacional. A projeção para o ano 2020 é de que a produção seja 85% maior, e que existam multinacionais maiores, mas em menor número (OECD 2001b).

Neste montante está inserida a produção de fármacos (*Life science products*) e de produtos de higiene e cuidados pessoais (*Consumer care products*).

Dentre as substâncias químicas que estão inseridas no mercado, têm-se pouca ou nenhuma informação quanto aos riscos à saúde humana e ao meio ambiente (FIG. 5).



Fonte: http://ec.europa.eu/environment/pubs/pdf/factsheets/reach.pdf

FIGURA 5. Informações quanto aos riscos para saúde humana e ao meio ambiente.

A cada dia um número crescente de produtos farmacêuticos é inserido no ambiente em todo o mundo. No entanto, existe uma lacuna na legislação no que diz respeito à contaminação ambiental por produtos farmacêuticos.

Diante deste contexto, no ano de 2006 foi aprovada pelo Parlamento Europeu e pelo Conselho da Comunidade Européia uma nova legislação relativa ao registro, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas – REACH (BLAYNE *et al.*, 2010) . Os princípios que nortearam a elaboração desta política foram: a) precaução e prevenção; b) substituição de produtos perigosos por outros mais seguros; c) maior responsabilidade da indústria no que se refere à geração e à disseminação da informação; d) transparência da informação (ABIQUIM, 2007).

Com base nesta nova política, o fabricante deverá ser o responsável pelas informações sobre os seus produtos, o que inclui a realização de uma gama de análises para demonstrar o nível de segurança da substância antes de inserí-la no mercado. Vale ressaltar que, em princípio, todas as substâncias produzidas acima de 1 tonelada deverão ser registradas, o que leva a um aumento das exigências com relação aos riscos ambientais.

No que concerne à avaliação de risco ambiental, a Comissão Européia publicou a diretiva 2001/83/CE, que foi posteriormente alterada pela diretiva 2004/27/CE. Estas diretrizes estabelecem que as autorizações de comercialização de novos medicamentos

para uso humano devem ser acompanhadas por uma avaliação de risco ambiental (*Public Health*, 2010).

Nos Estados Unidos (EUA), os problemas relativos a produtos farmacêuticos no ambiente são regulados pela *Food and Drug Administration* (FDA). Esta instituição exige avaliações ambientais para obtenção de autorizações de comercialização. No entanto, a avaliação ambiental será necessária somente se a concentração ambiental estimada do fármaco no momento do descarte for superior a 1 $\mu g. L^{-1}$ (FDA, 1998).

Os dados provenientes das análises laboratoriais (ecotoxicológica, físico-química, cinética do composto, bioacumulação, entre outros) possibilitam o gerenciamento mais eficaz dos riscos, além de gerar subsídios para avaliações de risco ambiental de substâncias químicas (fármacos e produtos de higiene e cuidados pessoais).

No estudo realizado por QUINN *et al.* (2008) por exemplo, os fármacos Gemfibrozil, Ibuprofeno, Naproxen, Carbamazepan, Bezafibrato, Sulfapyridina, Oxytetraciclina, Novobiocin, Sulfamethoxazole, Trimethoprim e Cafeína foram enquadrados em níveis de toxicidade (Extremamente tóxico, Muito tóxico, Tóxico, Perigoso, Não tóxico) de acordo com a diretiva da EU 93/67/EEC (REACH), baseado em resultados de ensaios de toxicidade com *Hydra attenuata*.

No Brasil, o Programa Nacional de Segurança Química (PRONASQ) implementado pela Comissão Nacional de Segurança Química (CONASQ), vem ao encontro da preocupação mundial crescente relativa aos riscos potenciais de substâncias químicas para a saúde humana e o meio ambiente. Este programa tem como princípio promover a gestão integrada e participativa de substâncias químicas com vistas à proteção do meio ambiente e da saúde humana, e contribuir para o desenvolvimento sustentável. No entanto, não existe em nível nacional, um banco de dados com informações sobre os produtos químicos em uso (BERTOLETTI & ZAGATTO, 2006).

Ainda em âmbito federal, a Resolução CONAMA 358/2005 e a Resolução RDC 306/2004, dispõe sobre o descarte dos resíduos dos serviços de saúde incluindo a destinação adequada dos produtos farmacêuticos.

É importante destacar os estudos ecotoxicológicos no contexto legal, já que quase todos os padrões de qualidade de águas estabelecidos para proteção de organismos aquáticos, são oriundos destes estudos, em especial dos ensaios de toxicidade (BERTOLETTI & ZAGATTO, 2006).

A utilização de ensaios de toxicidade para o controle de emissões está inserida na Resolução da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo - SMA 03 de 2000

(SÃO PAULO, 2000), que dispõe sobre as relações que fixam a toxicidade permissível aos organismos aquáticos. Considerando eventuais interações entre substâncias no efluente, este não deverá causar efeitos adversos aos organismos aquáticos no corpo receptor.

Com relação ao controle de emissões, a Resolução CONAMA 357/2005 estabelece limites de concentrações para diversas substâncias químicas além de classificar os corpos d`água (continentais, estuarinas e marinhas) para seu enquadramento em classes de acordo com o uso. Ensaios ecotoxicológicos estão contemplados nesta resolução como forma de monitorar e garantir a proteção da vida aquática.

Cabe ressaltar que limites de concentrações para os compostos químicos emergentes ainda não estão inseridos nesta resolução apesar da comprovada ocorrência destes em matrizes ambientais. Estudos ecotoxicológicos com esta classe de contaminantes poderão contribuir, em futuras revisões da resolução, com a inserção de valores orientadores para fármacos.

3.2.8. Triclosan – Ocorrência no ambiente aquático e suas implicações

O Triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy) fenol), é um composto bactericida amplamente utilizado em formulações de creme dental, creme facial, xampu, sabonetes, desodorantes, e em diversos tipos de materiais como embalagens de gêneros alimentícios, adesivos, brinquedos, polietileno, sapatos, selantes, tintas, colchão, roupas, cortinas de chuveiro, pisos, toldos e rejuntes (USEPA, 2008).

Este bactericida é um composto clorado aromático com representantes funcionais do grupo dos fenóis e apresenta forma de finos cristais brancos. Triclosan é denominado também como Irgasan, Irgasan DP 300, Irgacare MP, Lexol 300, Aquasept, Gamophen, sendo que um total de 2.385 patentes que contém a palavra “triclosan” foram emitidas nos EUA entre 1976 e 2008 (USEPA, 2008).

Diversos estudos têm reportado a ocorrência de Triclosan em matrizes ambientais (água superficial e sedimentos) e em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ZHAO *et a.l,* 2010; XIE *et al.*, 2008; NISHI *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2006; COOGAN *et al.*, 2007; McAVOY *et al.*, 2001; AGUERA *et al.*, 2003).

No estudo realizado por AGUERA *et al.* (2003) em Almeria - Espanha, foi encontrado Triclosan na concentração de 22 $\mu g.L^{-1}$ em amostras de efluente tratado, e em concentrações acima de 130,7 $\mu g.Kg^{-1}$ em sedimentos. Estes dados demonstraram que Triclosan é inserido continuamente no ambiente marinho via Estação de Tratamento de Esgotos podendo acumular-se nos sedimentos.

Em 2008, NISHI *et al*. monitoraram a ocorrência de Triclosan em água superficial do Canal Tone no Japão. As concentrações de Triclosan nos diferentes pontos de amostragem variaram de 55 $ng.L^{-1}$ a 134 $ng.L^{-1}$.

A distribuição espacial do Triclosan foi estudada por XIE *et al.* (2008) em águas superficiais marinhas da Baia Bight na Alemanha. As maiores concentrações de Triclosan foram encontradas em amostras coletadas próximas ao estuário, com uma variação de 1,21 $ng.L^{-1}$ a 6,87 $ng.L^{-1}$, decaindo em direção a Baia Bight para concentrações entre 10 $pg.L^{-1}$ a 110 $pg.L^{-1}$.

Em um recente estudo realizado com amostras de água superficial e sedimentos de três rios da China, e com amostras de efluentes de ETE, ZHAO *et al.* (2010) detectaram concentrações de Triclosan em água superficial que variaram de 90,2 $ng.L^{-1}$ a 478 $ng.L^{-1}$. As concentrações encontradas nas amostras de sedimento variaram de 345 ng/g^{-1} a 1329 ng/g^{-1}, estes dados corroboram com o estudo realizado por AGUERA *et al.* (2003) que também encontraram maiores concentrações de Triclosan em amostras de sedimento, sendo este compartimento ambiental propício para acumular este composto, bem como uma fonte de libertação de volta para água superficial.

Em âmbito nacional, no estudo realizado por LAMARDO (2009, Comunicação Pessoal)[1], foi identificado e quantificado Triclosan em amostras de sedimento do estuário de Santos, SP. A maior concentração encontrada foi de 31,7 $ng.g^{-1}$ em um local que, segundo LAMPARELLI *et al.* (2001), está sob a influência de água de drenagem contaminada com esgotos domésticos. Neste mesmo estudo, concentrações de Triclosan também foram determinadas em amostras de sedimento coletadas na área de influência do emissário submarino, que lança efluentes domésticos na parte central da Baía de Santos.

Este composto tem atraído muita atenção da comunidade acadêmica de diferentes países em função de sua estrutura química ser muito similar a de compostos extremamente tóxicos e persistentes, como por exemplo, dioxinas.

---

[1] Dra. Eliete Zanardi Lamardo, Universidade Federal de Pernambuco (Comunicação Pessoal).

Além disso, diversos estudos demonstraram a conversão do Triclosan em dioxinas e furanos, através da fotodegradação (KANETOSHI *et al.*, 1987; LATCH *et al.*, 2003; LORES *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-PRADO *et al.*, 2006; ARANAMI *et al.*, 2007).

Alguns fatores podem influenciar na cinética e conseqüentemente na toxicidade do Triclosan no ambiente aquático. De acordo com LINDSTROM *et al.* (2002) as reações de transformação podem gerar subprodutos mais lipofílicos e, portanto, mais bioacumuláveis, como é o caso do metil-triclosan, proveniente da reação de metilação biológica.

A fotodegradação com luz artificial e ou com radiação U.V. (ultravioleta) promove a conversão de Triclosan em dioxinas. Segundo ARANAMI et al. (2007), a formação de dioxinas a partir de amostras preparadas com Triclosan, ocorre com 3 (três) dias de exposição à luz artificial (lâmpada fluorescente), tanto em água doce como em água do mar.

No estudo realizado por SÁNCHEZ-PRADO *et al.*, (2006), foi detectada uma rápida fotodegradação de amostras marcadas com Triclosan (87% degradado em 5 minutos) expostas à irradiação U.V. Neste mesmo estudo, foi discutido a influência do pH na fotodegradação do Triclosan. Através de uma série de experimentos com amostras de água marcadas com Triclosan e com diferentes valores de pH (3,1; 6,9 e 8,9) expostas à irradiação U.V, foi possível monitorar a conversão para dioxinas nos diferentes meios. A formação de dioxinas ocorreu em todos os experimentos independente do valor de pH, embora mais lentamente no meio ácido.

O pH pode interferir também na toxicidade do Triclosan conforme demonstrado no estudo realizado por ORVOS *et al.* (2002), isso ocorre pelo fato do Triclosan estar predominantemente no estado iônico quando em um meio com pH 8,5, tendo nestas condições, menor capacidade de atravessar membranas lipídicas. Neste estudo, o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* apresentou menor sensibilidade ao Triclosan em ensaios realizados com pH de 8,5.

Outro aspecto importante que alguns estudos têm demonstrado é o fato do Triclosan e seu subproduto metil-triclosan, por sua característica lipofílica, bioacumularem nos tecidos de organismos.

No estudo realizado por ADOLFSSON-ERICI *et al.* (2002), foi detectado Triclosan no leite materno de amostras adquiridas em um banco de leite da cidade de Estocolmo, na Suécia. Segundo a autora, altas concentrações de Triclosan foram encontradas em 3 (três) amostras de leite das 5 (cinco) analisadas, sendo que a concentração mais alta foi de 300 $\mu g.kg^{-1}$ de lipídio.

A bioacumulação do Triclosan foi demonstrada em alguns estudos com organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos. COOGAN *et al.* (2007), determinaram fatores de bioacumulação (BAF) baseado no peso fresco de algas (*Cladophora sp*) coletadas a jusante e a montante de uma ETE do norte do Texas – USA. Os resultados dos fatores de bioacumulação variaram de 900 a 2100, já a concentração de Triclosan encontrada nas algas variaram de 100 $ng.g^{-1}$ a 150 $ng.g^{-1}$.

Em estudos mais recentes, FAIR *et al.* (2009), detectaram Triclosan no plasma sanguíneo de golfinho nariz de garrafa (*Tursiops truncatus*) em animais capturados em dois estuários da Flórida, USA, e também em amostras de água coletadas próximas a ETE desta mesma localidade. As concentrações de Triclosan no plasma sanguíneo dos golfinhos variaram de 0, 025 $ng.g^{-1}$ a 0,270 $ng.g^{-1}$ (peso úmido). Nas amostras de água, a concentração média foi de 7,5 $ng.L^{-1}$.

A bioacumulação de Triclosan foi demonstrada também em um estudo realizado por PALENSKE *et al.* (2010) com larvas de anfíbio com diferentes estágios de desenvolvimento. O maior range de absorção de Triclosan ocorreu no estágio 49 do desenvolvimento larval do anfíbio *Xenopus laevis* com concentrações que variaram de 2600 $ng.g^{-1}$ a 270,000 $ng.g^{-1}$, dependendo da concentração de exposição.

Diante deste contexto, é imprescindível a realização de estudos ecotoxicológicos que possibilitem um melhor entendimento da toxicidade e dos mecanismos de ação do composto, além da geração de um banco de dados que forneça suporte para avaliações de risco ambiental e estabelecimento de limites de concentrações seguras.

Estudos ecotoxicológicos com diferentes organismos aquáticos e níveis de organização biológica têm investigado os efeitos biológicos do Triclosan (ORVOS *et al.*, 2002; ISHIBASHI *et al.*, 2004, LAMEIRA, 2008; COOGAN *et al.*, 2007; CANESI *et al.*, 2007; CORTEZ *et al.,* 2008; PUSCEDDU, 2009). No entanto, observa-se uma grande carência de trabalhos com ensaios que avaliem a toxicidade aguda e crônica do Triclosan para organismos marinhos. É de suma importância a realização destes estudos, pois a ocorrência do Triclosan em matrizes ambientais marinhas e estuarinas tem sido reportada na literatura (AGUERA *et al.*, 2003; FAIR *et al.*, 2009; LAMARDO, 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta e preparo da água de diluição

A água utilizada nos ensaios de toxicidade com ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e com o mexilhão *Perna perna*, bem como na manutenção destes organismos no laboratório, foi coletada na Ilha da Palmas, localizada no município do Guarujá, SP.

A fim de manter os parâmetros físico-químicos do aquário em condições adequadas para manutenção dos organismos, análises de pH, oxigênio dissolvido (OD), temperatura e salinidade foram verificados diariamente e ajustados (salinidade) quando necessário com a troca parcial da água do aquário.

De acordo com a ABNT NBR 15350 (2006), a água natural utilizada na diluição do Triclosan e como controle nos ensaios para avaliação de efeito agudo e crônico realizados com ouriço-do-mar foi filtrada em membrana de celulose com porosidade máxima de 1 µm com auxílio de um suporte de filtração.

Nos ensaios para avaliação de efeito crônico com o mexilhão *Perna perna*, a água natural utilizada na diluição de Triclosan e como controle, foi filtrada com auxílio de um suporte de filtração, em membrana de celulose Millipore® de 0,22 µm (ZARONI, 2005) (FIG. 6).

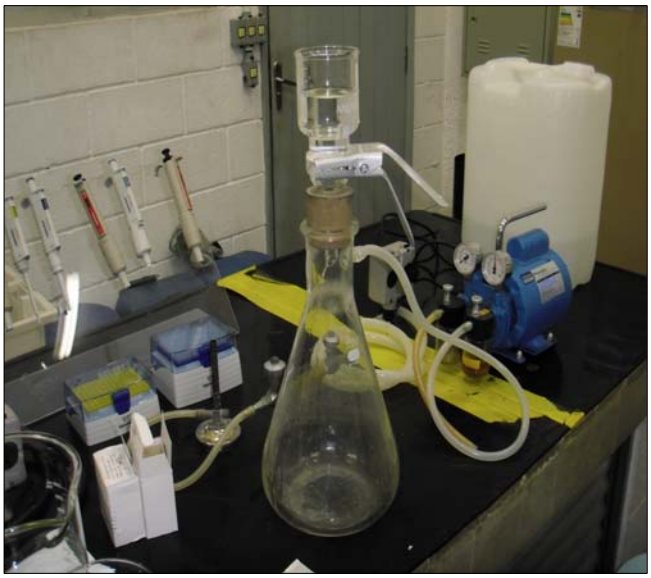


FIGURA 6 - Suporte de filtração utilizado para filtrar água com membrana de celulose.

Nos ensaios para avaliação de efeito agudo com o copépodo *Nitokra sp*, a água de diluição e cultivo foi reconstituída conforme descrito abaixo no item 4.2.

A água utilizada no ensaio de Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro com mexilhão *Perna perna* foi coletada na praia da Cocanha, localizada no município de Caraguatatuba, SP, e filtrada em rede de zooplâncton com malha de 150 µm.

4.2. Coleta, Manutenção e Cultivo de Organismos-Teste

Os exemplares de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (FIG. 7) empregados nos ensaios para avaliação de efeito agudo e crônico foram coletados através de mergulho livre na Ilha das Palmas, localizada no município do Guarujá, SP.

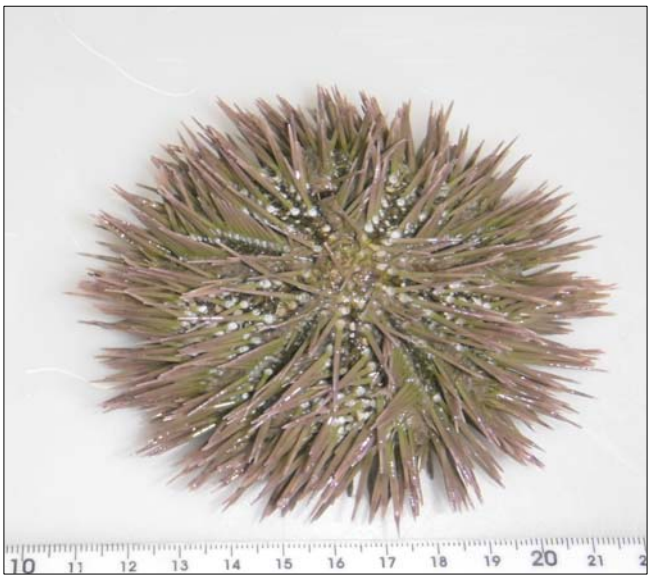


FIGURA 7 - *Lytechinus variegatus.*

Os organismos foram transportados em caixa térmica, recobertos com algas do gênero *Ulva sp* até a chegada ao laboratório onde foram mantidos em tanque/aquário com água do mar e forte aeração até o momento da realização dos ensaios (FIG. 8).

FIGURA 8 - Tanque com *Lytechinus variegatus.*

Os exemplares do molusco bivalve (mexilhão) *Perna perna* empregados nos ensaios para avaliação de efeito crônico, também foram coletados em bancos naturais (FIG.9) através de mergulho livre na Ilha das Palmas, Guarujá, SP, e na Ilha Monte Pascoal em Bertioga, SP. Já os organismos utilizados no ensaio do Tempo de Retenção do corante Vermelho Neutro foram adquiridos de cultivos na praia da Cocanha. Os organismos foram transportados em caixa térmica até o laboratório, onde foram mantidos em aquário com água do mar até o momento da realização dos ensaios.

FIGURA 9 - Banco natural de mexilhões *Perna perna.* Guarujá, SP.

Os exemplares dos copépodos *Nitokra sp* (FIG. 10) empregados nos ensaios para avaliação de efeito agudo em água foram cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha e Microfitobentos do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP). O cultivo foi iniciado neste laboratório a partir de espécimes coletados em sedimentos lodosos da região entre-marés de Cananéia, SP.

FIGURA 10 – Fêmea adulta de *Nitokra sp* (Foto: Laboratório de Ecotoxicologia, IO-USP.).

No laboratório os copépodos foram cultivados em Erlenmeyers com capacidade para 1 litro (FIG.11), contendo cerca de 750 mL de água do mar reconstituída com salinidade entre 20 e 25 UPS e pH entre 6 e 7. Os frascos foram fechados com tampão de algodão e gaze para permitir as trocas gasosas e ao mesmo tempo evitar a evaporação da água, o que pode levar ao aumento da salinidade do meio de cultivo (LOTUFO & ABESSA, 2002).

FIGURA 11 - Cultivos de *Nitokra sp* no Laboratório de Ecotoxicologia, IO-USP. (Foto: Laboratório de Ecotoxicologia IO – USP).

Os cultivos são mantidos em sala climatizada em temperatura de aproximadamente 25±1° C e fotoperíodo natural. A manutenção dos cultivos é feita uma vez por mês através da troca parcial da água.

O conteúdo do frasco de cultivo é peneirado em malha de 0,045 mm para a retenção dos organismos. A porção retida é então transferida para uma placa de Petri e observada sob estereomicroscópio. As condições de cada cultivo como a quantidade de fêmeas ovadas e de indivíduos adultos é anotada na ficha de manutenção.

A salinidade inicial (antes da troca de água) é verificada e, se necessário, ajustada através da adição de água do mar reconstituída de modo que corresponda a faixa ótima de tolerância dos organismos (5 a 30 UPS). A salinidade inicial e final é anotada na ficha de manutenção do cultivo.

Os organismos em cultivo são alimentados três vezes por semana. O alimento consiste em composto alimentar a base de ração de peixe e microalgas (LOTUFO & ABESSA, 2002).

A solução de microalgas continha a espécie *Tetraselmis gracilis* e cultura mista com os gêneros *Chaetoceros, Chlorophyceae, Dunaniela, Hillea, Isochrysis, Nannochloropsis, Odontela, Pavlova, Pyrocystis, Thalassiosira, Prorocentrum, Synecococcus e Thalassiosera*. As culturas de microalgas foram fornecidas pelo banco de algas do Laboratório de Microorganismos Marinhos do IO-USP.

4.3. Triclosan – Substância-teste

Triclosan (TCS–2.4.4.– tricloro–2 hidroxi difenil éter) é um composto de baixa volatilidade, baixa solubilidade, lipofílico e sua estrutura química esta representada na FIG. 12. O produto utilizado no presente estudo foi adquirido pela MERCK® (ANEXO A).

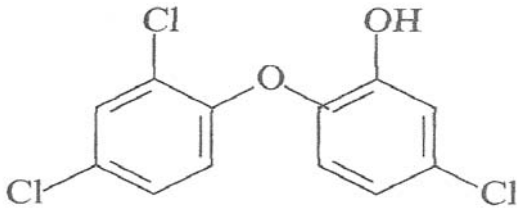


FIGURA 12 – Estrutura química do Triclosan.

As principais características físicas e químicas do composto estão apresentadas na TAB. 1.

TABELA 1 – Características físicas e químicas de Triclosan.

Fórmula Molecular	$C_{12}H_7C_{13}O_2$
Peso molecular	289,5 g/mol
Cor	Cristais brancos
Gravidade Específica	1,55x10 kg/m a 22° C
Constante de Dissociação (pK_a)	8,14 a 20° C
Estabilidade	Estável em condições normais
Ponto de fusão	56,5° C
Solubilidade em água	0,012 g/L a 20° C
Constante de partição (LogKow)	4,8 a 25° C
Pressão de vapor	5,2E-6 mm Hg a 25° C 2,2E-6 mm Hg a 20° C

Fonte: Reregistration Eligibility Decision for Triclosan (EPA, 2008).

4.3.1. Preparo das soluções-teste

Por possuir baixa solubilidade em água, Triclosan foi diluído em Dimetilsufóxido (DMSO) MERCK®, para posteriormente ser diluído em água do mar no preparo das soluções-teste.

Para todos os ensaios realizados neste estudo, foram preparadas soluções, tendo como ponto de partida a concentração de 1:1000, ou seja, 1g de Triclosan em 1 litro de DMSO. Mantendo a proporção indicada, pesou-se 0,01g de Triclosan, sendo dissolvido em 10 mL de DMSO. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, foram coletados 5 (cinco) mL da solução de Triclosan e DMSO, que corresponde a 5 (cinco) mg de Triclosan, e avolumados para 1000 mL com água do mar, obtendo-se assim, uma solução-estoque com a concentração de 5 mg.L-1. A partir desta solução estoque, foram preparadas as soluções-teste de todos os ensaios realizados no presente estudo.

4.4. Ensaios de toxicidade

Com o objetivo de conhecer as concentrações de Triclosan que causam efeitos adversos aos diferentes organismos-teste empregados neste estudo, foram realizados ensaios de toxicidade para avaliação de efeitos agudos e crônicos.

Os ensaios para avaliação de efeito agudo com o copépodo *Nitokra sp* foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia Marinha do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, IO – USP.

Os ensaios para avaliação de efeito agudo e crônico com ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*, para avaliação de efeito crônico e de citotoxicidade com o molusco bivalve *Perna perna* foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília – UNISANTA, o qual possui acreditação pelo INMETRO na norma ISO/IEC 17025 (ANEXO B) para o ensaio de avaliação de efeito crônico com *Lytechinus variegatus* (Embriolarval).

4.4.1. Parâmetros Físicos e Químicos

Medidas de pH, oxigênio dissolvido (OD) e salinidade foram realizadas na água de diluição, em todas as concentrações iniciais e finais de Triclosan e nos controles de DMSO de todos os ensaios.

As análises de pH foram realizadas com o equipamento da marca Micronal, modelo B-474 (FIG.13).

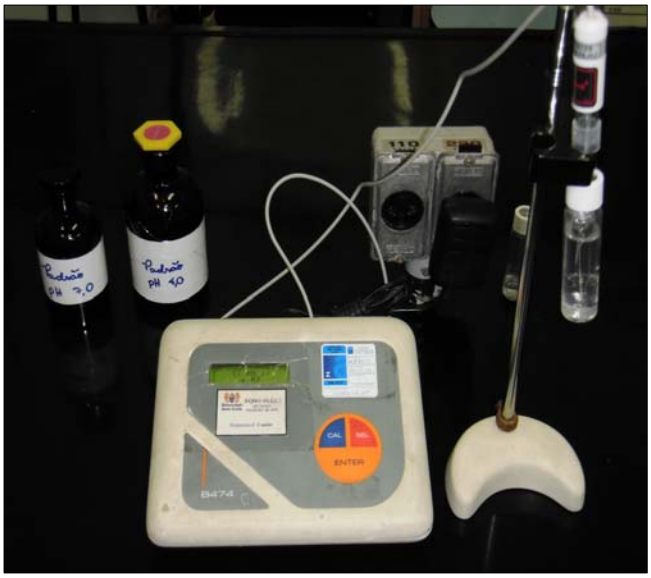


FIGURA 13 – Equipamento Micronal para análise de pH.

O teor de oxigênio dissolvido foi medido com um oxímetro da marca WTW, modelo Oxi - 315i (FIG. 14).

FIGURA 14 – Oxímetro WTW 315 – i.

As medidas de salinidade foram realizadas com o uso de um refratômetro da marca Unity, modelo 512 – ATC (FIG. 15).

FIGURA 15 – Refratômetro utilizado para as medidas de salinidade.

4.4.2. Ensaios de sensibilidade

Ensaios de sensibilidade foram realizados com os diferentes organismos empregados neste estudo. Estes procedimentos, que seguiram os mesmos moldes dos ensaios definitivos, foram executados a fim de avaliar a saúde dos organismos, bem como permitir maior precisão e confiabilidade nos resultados obtidos. As substâncias de referência utilizadas nos ensaios de sensibilidade propiciam a avaliação das condições de sensibilidade dos organismos-teste, sejam oriundos do campo ou cultivados em laboratório (ZAGATTO, 2008). A TAB. 2 apresenta os organismos-teste utilizados nos ensaios, as substâncias de referência e os respectivos *end-points*.

Chama-se atenção que os ensaios de sensibilidade com ouriço-do-mar, foram realizados com organismos representantes de dois lotes coletados em 19/12/07 e 19/03/08, conforme descrito na carta-controle do laboratório (APÊNDICE A). Com estes lotes de organismos, foram realizados os 5 (cinco) ensaios definitivos.

TABELA 2 – Organismos-teste, substâncias de referência e *end-points*.

Organismo-teste	Substância de referência	*End-point*
Lytechinus variegatus	Sulfato de Zinco	Desenvolvimento embriolarval (CI50; 24h em $mg.L^{-1}$)
Perna perna	Dodecil sulfato de Sódio	Desenvolvimento embriolarval (CI50; 48h em $mg.L^{-1}$)
Nitokra sp	Dicromato de Potássio	Mortalidade (CL50; 96h em $mg.L^{-1}$)

4.4.3. Controle positivo com o solvente Dimetilsufóxido (DMSO)

A fim de avaliar possíveis efeitos nos organismos-teste relacionados ao solvente (DMSO) utilizado na diluição de Triclosan, foi realizado nos ensaios de toxicidade um controle positivo do solvente com a maior concentração testada de cada ensaio. O solvente Dimetilsufoxido (DMSO) utilizado neste trabalho foi adquirido pela MERCK® (ANEXO C).

4.4.4. Ensaios Preliminares

De modo a se obter uma faixa de concentrações de Triclosan para realização dos ensaios definitivos com os diferentes organismos-teste, foram realizados ensaios preliminares. Estes ensaios seguiram os mesmos procedimentos dos ensaios definitivos e possibilitaram um conhecimento prévio dos gradientes de concentrações a serem empregados nos mesmos.

4.4.5. Ensaios definitivos

Com o estabelecimento do gradiente de concentrações a ser trabalhado, foi empregado para o cálculo das concentrações-teste definitivas, uma razão de diluição que variou entre 1,2 a 2.

4.5. Métodos de ensaios de toxicidade e citotoxicidade

4.5.1. Ensaio para avaliação de efeito agudo (Mortalidade) com *Nitokra sp* (Crustacea, Harpacticoida)

Segundo RUPPERT e BARNES (2005), os harpaticóidas, que incluem mais de 50% das espécies de copépodos, são predominantemente bentônicos, sendo que alguns deles vivem entre os grãos de areia, como é o caso de *Nitokra* sp, estando constantemente em contato com sedimento e a água intersticial. Alimentam-se de microrganismos e detritos presos aos grãos de areia, além de algas e fanerógamas marinhas, representando uma parte importante da dieta de muitos animais marinhos.

O ensaio para avaliação de efeito agudo com a fração líquida seguiu o método descrito por LOTUFO e ABESSA (2002) que consiste na exposição de fêmeas adultas por 96 horas e observação de efeitos letais (mortalidade).

O ensaio foi realizado em tubos de ensaio com 4 (quatro) réplicas por concentração. Cada tubo recebeu 10 ml das soluções-teste (0,14; 0,17; 0,20; 0,24; 0,29; 0,35; 0,42 e 0,50 $mg.L^{-1}$ de Triclosan). O ensaio foi realizado em câmara incubadora Marca FANEM à temperatura de 25±1º C. Medidas de oxigênio dissolvido, pH e salinidade da água foram realizadas no início e final dos ensaios. A salinidade das soluções-teste foi mantida entre 5 e 30 UPS para corresponder à faixa ótima de tolerância de *Nitokra sp*.

Para a realização dos ensaios, o conteúdo de alguns frascos de cultivo foi peneirado em malha de 0,045 mm para a retenção dos organismos. A porção retida foi então transferida para placas de Petri e a condição dos organismos (movimentação espontânea) observada com a utilização de um estereomicroscópio. Em seguida foram separadas em pequenas placas de Petri, 5 (cinco) fêmeas em quantidade suficiente para suprir as réplicas de todas as concentrações-teste do ensaio. Após a separação dos organismos, foram transferidas 5 (cinco) fêmeas adultas para cada tubo de ensaio (KIRSCHBAUM *et al.,* 2008). As mesmas foram colocadas com auxílio de uma pipeta Pasteur com o mínimo de água possível acompanhando os organismos. Os organismos expostos foram alimentados com uma solução de micro-algas planctônicas no início do teste e após este procedimento, os recipientes-teste foram mantidos a 25±1º C por 96 horas em sala climatizada.

Ao final do ensaio, as fêmeas adultas vivas, ou seja, aquelas que apresentam movimento espontâneo ou reagem ao toque com um estilete fino, foram observadas e contadas com auxílio de um estereomicroscópio marca Zeiss – Stemi 2000 em todas as réplicas das diferentes concentrações, a fim de determinar a concentração letal que causou mortalidade em 50% dos organismos expostos. O critério de aceitação do método

determina a inviabilização do procedimento de ensaio, caso a mortalidade no controle for superior a 70%, critério adotado também para o controle de DMSO. A TAB. 3 apresenta um resumo da metodologia do ensaio.

TABELA 3 – Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *Nitokra sp* (Mortalidade).

Parâmetros	**Condições**
Temperatura	25±1° C
Salinidade	5 a 30 unidades
Fotoperíodo	Natural
Água de diluição	Água marinha reconstituída (água de cultivo)
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	96 h
Recipiente-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15 ml
Volume das soluções-teste	10 ml
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	5
Idade do organismo-teste	Fêmeas adultas
Efeito observado	Letalidade (CL50)
Validade do ensaio	Mínimo de 70% de sobrevivência no controle
Alimentação	0,1 ml de solução de algas no início do ensaio

4.5.2. Ensaio para avaliação de efeito agudo (Fertilização) com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)

Este método de ensaio seguiu o protocolo da USEPA (1991), desenvolvido para avaliação da toxicidade aguda e crônica em efluentes e corpos receptores marinhos e estuarinos com diferentes organismos representantes destes ecossistemas. No presente estudo este método foi adaptado para a espécie de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

O método consiste na exposição de espermatozóides de ouriço-do-mar, por um período de 1 hora, a diferentes concentrações de uma substância química e/ou amostras ambientais. Após este período, a solução contendo óvulos é adicionada aos frascos-teste. Vinte minutos após a adição dos óvulos, o ensaio é encerrado com a adição de 0,5 mL de formol tamponado com bórax em todas as réplicas.

A técnica de indução de liberação dos gametas utilizada neste ensaio seguiu o método descrito na norma técnica ABNT/NBR 15350 (2006). No entanto, neste método é importante estabelecer uma proporção espermatozóide/óvulo que propicie uma taxa adequada de fertilização (70 % - 90 %) no controle do ensaio.

Para isso, após a liberação dos gametas, foram seguidos os procedimentos descritos no protocolo USEPA (1991). No caso dos espermatozóides, o volume liberado por 3 (três) machos foi acondicionado em um béquer seco envolto com gelo; a partir deste volume foram preparadas diferentes soluções (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) diluídas em água do mar filtrada em membrana de 0,45 μm de modo a se obter uma concentração de $5x10^7$ espermatozóides/mL, ideal para realização do ensaio.

O preparo das soluções seguiu as etapas descritas abaixo:

a) 400 μL de espermatozóide foram diluídos em 20 mL de água do mar filtrada no frasco A. Posteriormente a solução foi levemente agitada para eliminação de grumos;
b) 10 mL da solução do frasco A foram misturadas com 10 mL de água do mar filtrada no frasco B. A solução foi levemente agitada para eliminação de grumos;
c) 10 mL da solução do frasco B foram misturadas com 10 mL de água do mar filtrada no frasco C. A solução foi levemente agitada para eliminação de grumos;
d) 10 mL da solução do frasco C foram misturadas com 10 mL de água do mar filtrada no frasco D. A solução foi levemente agitada para eliminação de grumos.

Após o preparo das diferentes soluções, foi feita uma solução de espermatozóides mortos para contagem em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico da marca Meiji. Para tal, preparou-se uma solução na proporção de 1:2000 seguindo as etapas descritas abaixo:

a) 10 mL de solução de ácido acético a 10% preparada em água do mar foram adicionados no frasco C e agitados para proporcionar uma boa mistura;
b) 1 mL da solução de espermatozóides mortos do frasco C foi misturado com 4 mL de água do mar filtrada no frasco E;

c) a solução do frasco E, após homogeneização, foi colocada nos dois lados da câmara de Neubauer. Após 15 minutos, tempo para que os espermatozóides mortos se depositassem nos campos da câmara, realizou-se a contagem.

d) com o uso de um microscópio óptico foram contados os espermatozóides nos 400 quadrados dos dois campos da câmara. Após a contagem foi estabelecida a média de espermatozóides entre os dois campos;

e) A concentração de espermatozóides no frasco E = 10^4 x média de espermatozóides.

A concentração de espermatozóides em todas as soluções preparadas foi calculada utilizando as seguintes fórmulas:

1. Concentração do frasco A = 40 x Concentração do frasco E.
2. Concentração no frasco B = 20 x Concentração no frasco E.
3. Concentração no frasco D = 5 x Concentração no frasco E.
4. Concentração original de espermatozóide = 2000 x Concentração do frasco E.

Após o cálculo das concentrações, foi realizada a diluição da solução de espermatozóide com concentração maior que 5 x 10^7 espermatozóide/mL para a concentração de 5 x 10^7 espermatozóide/mL utilizando as seguintes fórmulas:

1. Concentração atual/5 x 10^7 = fator de diluição (FD);
2. [(FD) x 10] – 10 = volume (ml) de água do mar filtrada que deve ser adicionada no frasco para atingir a concentração de 5 x 10^7 espermatozóide/mL, sendo FD o Fator de Diluição.

A solução de óvulos empregada neste ensaio deve ter a concentração de 2000 óvulos/mL. Para isso, os óvulos de 3 (três) fêmeas foram acondicionados em diferentes frascos e, após sua decantação, foram lavados por 3 (três) vezes com a água do mar filtrada. Após avaliação da viabilidade dos óvulos (devem ser redondos, lisos e de tamanho homogêneo), os mesmo foram filtrados em malha de 350 µm para um mesmo béquer e avolumado para 200 mL.

Com uso de um bastão de vidro, o volume contido no béquer (solução-estoque) foi homogeneizado. Com o objetivo de facilitar a contagem dos óvulos, uma alíquota de 1 (um) ml foi retirada e transferida para um béquer contendo 9 (nove) mL de água do mar filtrada, constituindo assim uma solução mais diluída de óvulos na proporção de 1:10. Desta solução foi retirada uma alíquota de 1 mL e transferida para uma câmara de Sedgwick-Rafter e com o uso de um microscópio óptico da marca Meiji, foi realizada a contagem do número de óvulos.

O cálculo da concentração de óvulos na solução estoque foi realizado com o uso da seguinte fórmula: Óvulos/mL = Número de óvulos contados x 10.

Para atingir a concentração de 2000 óvulos/mL na solução estoque, seguiu-se a fórmula descrita abaixo:

1. Do número de óvulos contados subtrai-se 200 para obter o volume (mL) de água do mar filtrada a ser adicionado à solução estoque de óvulos, de forma a obter 2000 óvulos/mL.

No caso de o número de óvulos contados serem menor que 200, deixar a solução sem agitação para que os óvulos decantem. Após este procedimento, retirar parte do sobrenadante e realizar nova contagem para verificar se o número de óvulos está maior que 200. Sendo assim, deve-se empregar o cálculo descrito acima.

Para determinação da concentração de efeito de Triclosan sobre a fertilização dos gametas de ouriço-do-mar, foi preparado um ensaio preliminar com 4 (quatro) réplicas para as seguintes concentrações: 0,1; 0,14; 0,19; 0,26; 0,36 e 0,50 mg. L^{-1} e, posteriormente, ensaios definitivos com as concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mg.L^{-1} foram realizados . Os gametas foram expostos também ao controle (água do mar utilizada na diluição do triclosan) e ao controle do solvente DMSO (utilizado na diluição de Triclosan). Análises físicas e químicas iniciais (oxigênio dissolvido, pH e salinidade) de todas as concentrações, controle e controle de DMSO foram realizadas.

Assim que preparada a solução com a concentração estimada de 5 x 10^7 espermatozóides/mL, um volume de 100 (cem) µL desta solução de espermatozóide foi colocada em todas as réplicas dos ensaios e expostos durante 1 (uma) hora a 25±2° C em uma incubadora marca FANEM. Durante o período de exposição dos espermatozóides foi preparada a solução de óvulos na concentração de 2000 óvulos/mL, conforme já descrito acima.

Após o período de exposição dos espermatozóides, a solução de óvulos foi homogeneizada e uma alíquota de 1 mL foi adicionada em todas as réplicas do ensaio. Em seguida foram aguardados 20 (vinte) minutos a 25±2° C quando o ensaio foi encerrado com a adição de 0,5 mL de formol tamponado com bórax.

Para realização da leitura do ensaio, foi utilizado um microscópio óptico da marca Meiji e, com o auxilio de uma câmara de Sedgwick-Rafter, foram contados os 100 (cem) primeiros ovos. Em uma planilha foram anotados os números de óvulos fertilizados (identificados pela membrana de fecundação) (FIG. 16) e de óvulos não fertilizados.

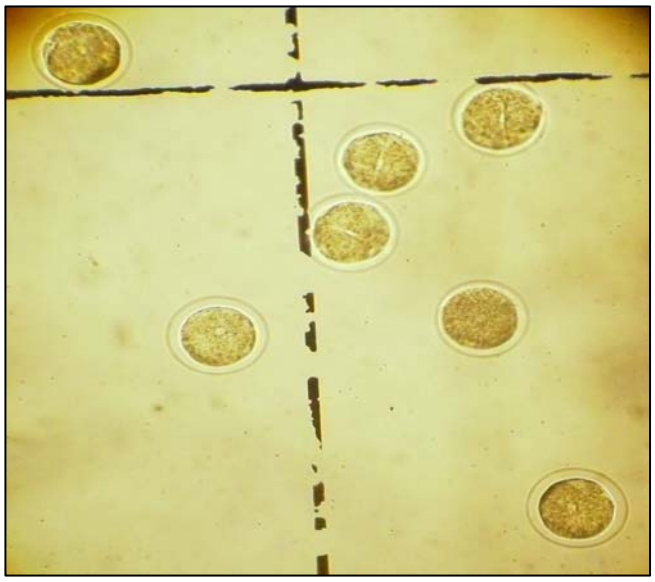


FIGURA 16. Ovos de *Lytechinus variegatus* (400X).

A TAB. 4 apresenta um resumo da metodologia do ensaio.

TABELA 4 – Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *L. variegatus* (Fertilização)

Parâmetros	Condições
Temperatura	25±2° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Fotoperíodo	-
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	1 h e 20 minutos
Recipiente-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15 ml
Volume das soluções-teste	10 ml
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	Aproximadamente $5x10^7$ células espermáticas e 2.000 óvulos por frasco-teste.
Idade do organismo-teste	Gametas de ouriço-do-mar recém liberados
Efeito observado	Taxa de fertilização
Validade do ensaio	De 70% a 90% de fertilização no controle
Alimentação	Sem

4.5.3. Ensaio para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) de curta duração com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)

Lytechinus variegatus pertencente à família Toxopneustidae. Possui carapaça esverdeada e achatada inferiormente e espinhos de cor variando desde verde até púrpura arroxeada. Esta espécie alimenta-se de macroalgas, vive em locais onde estas são abundantes e possui o hábito de se recobrir com detritos vegetais e pequenas conchas.

Os organismos podem ser encontrados desde a zona entre-marés até cerca de 20 m de profundidade. É bastante comum na região do Caribe e na costa atlântica da América do

Sul, ocorrendo desde a Carolina do norte (EUA) até a costa sudeste do Brasil (ABNT, 2006).

O método de ensaio seguiu a norma técnica ABNT/NBR 15350:2006, que consiste na exposição de ovos de ouriço-do-mar a diferentes concentrações da substância química a ser testada e/ou amostras ambientais durante o período de desenvolvimento embriolarval, ou seja, de 24h à 28h para *Lytechinus variegatus* (ABNT, 2006).

Água marinha natural filtrada em membrana de celulose com porosidade de 0,45 µm foi utilizada para diluição do Triclosan e manuseio dos gametas. Antes da utilização da água foram medidos os teores de oxigênio dissolvido, pH e salinidade.

Através de uma injeção de KCl 0,5 mol, foi induzida a liberação dos gametas. Para coleta dos óvulos, identificados por sua coloração amarelo-alaranjados, as fêmeas foram apoiadas com a superfície aboral voltada para baixo em um recipiente menor que o seu diâmetro, com água de diluição à temperatura do ensaio (FIG. 17).

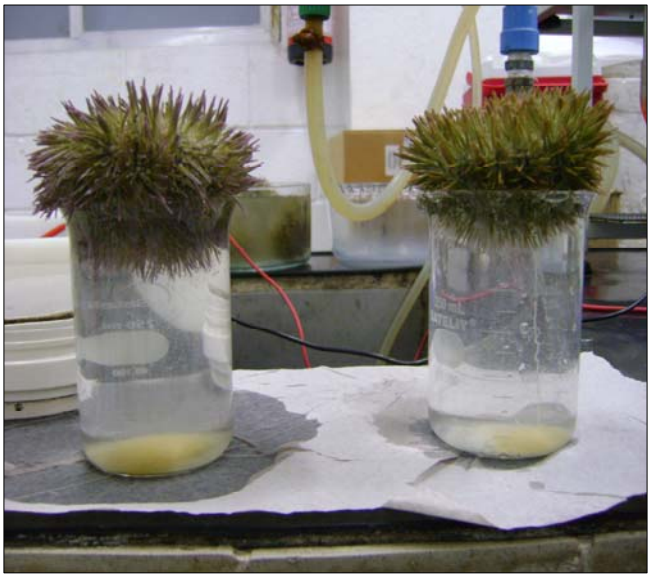


FIGURA 17 – Fêmeas de *Lytechinus variegatus* liberando os óvulos.

Com a utilização de uma pipeta Pasteur de ponta fina, foi retirada uma sub-amostra de óvulos de cada fêmea (3 fêmeas utilizadas em cada ensaio) para verificar a viabilidade dos mesmos.

Para utilização nos ensaios, os óvulos devem ser redondos, lisos e de tamanho homogêneo. Sendo assim, após a sedimentação dos óvulos nos três recipientes, foi

descartado o sobrenadante e as soluções filtradas em malha de 350 µm para um mesmo béquer com o objetivo de reter espinhos e fezes que podem ser liberados juntamente com os gametas. Após este procedimento foi acrescentada à solução de óvulos, água de diluição elevando o volume para 600 mL.

Os espermatozóides, identificados pela sua cor branca, foram coletados com auxilio de uma pipeta automática de ponta fina diretamente dos gonopóros (FIG. 18) e acondicionados em um béquer seco envolto com gelo (FIG. 19), sem que os espermatozóides entrassem em contato com água de diluição até o início dos experimentos.

FIGURA 18 – Coleta de espermatozóides de *Lytechinus variegatus* (Foto: Augusto Cesar).

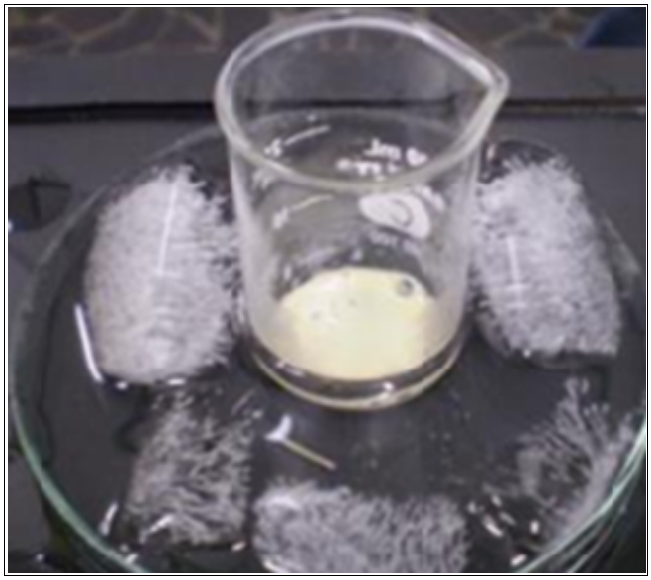


FIGURA 19 – Espermatozóides de *Lytechinus variegatus* acondicionados em um béquer envolto com gelo.

No momento da fecundação foi preparada uma solução na proporção de 0,5 mL de espermatozóide para 25 mL de água de diluição. Esta solução foi misturada de modo a proporcionar a dissolução de possíveis grumos. Em seguida foi acrescentado um volume de 1 mL a 2 mL da solução de esperma ao recipiente contendo os óvulos e aguardado 10 minutos com leve agitação.

Após este período, três sub-amostras de 10 µL da solução foram colocadas em câmara de Sedgwick-Rafter para contagem e cálculo da porcentagem de fecundação (mínimo de 80% de óvulos fecundados para utilização no ensaio). O procedimento de contagem dos ovos nas três sub-amostras possibilitou a obtenção da média do número de ovos e o cálculo do volume da solução a ser adicionado nas concentrações-teste contendo 300 ovos. Vale ressaltar que o volume adicionado nos recipientes-teste não ultrapassou 1% do volume da solução teste, critério a ser respeitado.

Após a diluição do Triclosan em DMSO, foram preparadas as seguintes concentrações-teste para um ensaio preliminar: 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 e 0,64 $mg.L^{-1}$ de Triclosan, além do controle de água e controle com DMSO. As concentrações definitivas de 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16; 0,18 e 0,20 $mg.L^{-1}$ de Triclosan foram elaboradas baseada no resultado do ensaio preliminar e o mesmo procedimento repetido para os ensaios definitivos realizados posteriormente.

Após o período de 24 horas em câmara com temperatura entre 24±2º C, foi retirada uma alíquota do controle para verificar se pelo menos 80% das larvas atingiram o estágio

de *pluteus* (critério de aceitabilidade do ensaio). Sendo assim, o ensaio foi encerrado adicionando em todas as réplicas 0,5 mL de formol tamponado com bórax.

A leitura do ensaio foi realizada em câmara de Sedgwick-Rafter e o estágio de desenvolvimento, bem como a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos de cada réplica foram tabulados. Análises físicas e químicas iniciais e finais (oxigênio dissolvido, pH e salinidade) foram realizadas. A TAB. 5 apresenta um resumo da metodologia do ensaio.

TABELA 5 - Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *L. variegatus* (Embriolarval).

Parâmetros	**Condições**
Temperatura	24±2° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Fotoperíodo	12 a 16 horas de luz
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	24 a 28 h
Recipiente-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15 ml
Volume das soluções-teste	10 ml
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	30 organismos por mililitro
Idade do organismo-teste	Ovos recém fecundados
Efeito observado	Atraso ou anormalidade no desenvolvimento embriolarval
Validade do ensaio	Mínimo de 80% de larvas pluteus normais nos controles
Alimentação	Sem

4.5.4. Ensaio para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) com *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia)

O mexilhão *Perna perna* é encontrado em bancos naturais entre a região do entre-marés ao infralitoral onde habita em áreas de incidência direta de ondas e de alto hidrodinamismo. São organismos filtradores e sua alimentação consiste de fitoplâncton e matéria orgânica particulada em suspensão. Esta espécie vem sendo utilizada em testes de toxicidade de efeito crônico de curta duração, pois seus gametas são facilmente obtidos e o desenvolvimento embrio-larval ocorre em curto período de tempo, originando uma larva de fácil identificação (ZARONI, 2005).

O método de ensaio no presente trabalho consistiu em expor ovos recém fertilizados a diferentes concentrações de Triclosan (0,05; 0,065; 0,08; 0,10; 0,14 e 0,18 $mg.L^{-1}$ de Triclosan por um período de 48 horas, em temperatura de 25 ± 1º C e salinidade de 35 UPS. Após o período de incubação foi determinada a porcentagem de embriões normais (valvas simétricas fechadas e massa visceral presente na porção interna da concha) e/ou anormais (organismos que não se desenvolveram até larva "D", que tenham atingido este estágio porém com extravasamento de massa visceral e/ou com a concha aberta) nas diferentes concentrações testadas, em relação ao controle. O ensaio foi desenvolvido seguindo a adequação do método realizada por ZARONI (2005).

Cerca de 100 mexilhões adultos foram coletados manualmente, com auxílio de uma espátula em costões rochosos da Ilha das Palmas, Guarujá, SP, e Ilha Monte Pascoal, Bertioga, SP. Os exemplares da espécie foram transportados ao laboratório em caixa térmica e assim que chegaram foram mantidos por um dia em tanque com água do mar até o momento dos ensaios.

A preparação dos organismos-teste para o início dos ensaios consistiu na limpeza, através de raspagem dos organismos incrustantes. Após a limpeza, os mexilhões foram lavados com água doce e mantidos fora da água, para que não ocorresse a liberação dos gametas antes da separação dos indivíduos. A água do mar utilizada na diluição de Triclosan, bem como no controle e na fecundação dos ovos, foi filtrada em membrana Milipore 0,22 µm de porosidade. Após a filtração a água foi mantida sob aeração por aproximadamente 4 horas antes da montagem do teste.

A liberação dos gametas foi induzida por um estímulo físico (indução termal), técnica considerada adequada no trabalho realizado por ZARONI (2005). Para isso, cerca de 50 mexilhões foram colocados individualmente dentro de placas de Petri e o conjunto de placas dentro de uma bandeja plástica rasa, cheia de água do mar. Este conjunto foi

mantido em geladeira por aproximadamente 30 minutos. Após este procedimento, os animais foram mantidos por vinte minutos sem água, antes de serem novamente imersos em água do mar em temperatura ambiente (24±2° C) sob fluxo contínuo. Este fluxo de água contínuo foi proporcionado pelo próprio sistema de filtração do tanque simulando uma cascata. Geralmente após duas ou três horas após o início do fluxo de água ocorre à liberação dos gametas que poderá ser detectada visualmente. Vale ressaltar que o período para liberação dos gametas pode se estender por mais tempo.

Os óvulos liberados foram coletados do fundo da placa de Petri com auxílio de uma pipeta (FIG. 20) e transferidos para béqueres contendo água do mar filtrada. Em seguida, os óvulos foram lavados com auxílio de uma peneira com 75 µm de malha e recolocados em um béquer de capacidade maior com água do mar filtrada.

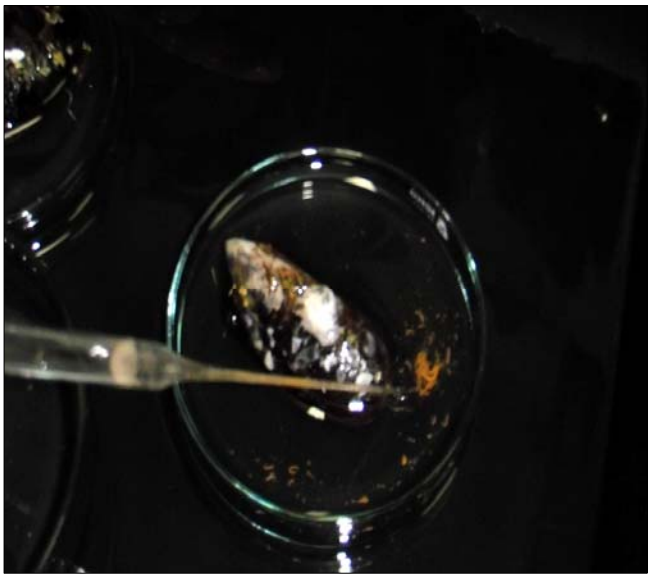


FIGURA 20 - Coleta de óvulos de *P. perna*.

O líquido espermático foi coletado com o mínimo de água possível (FIG. 21) e mantido separado em um béquer, imerso em um recipiente com gelo.

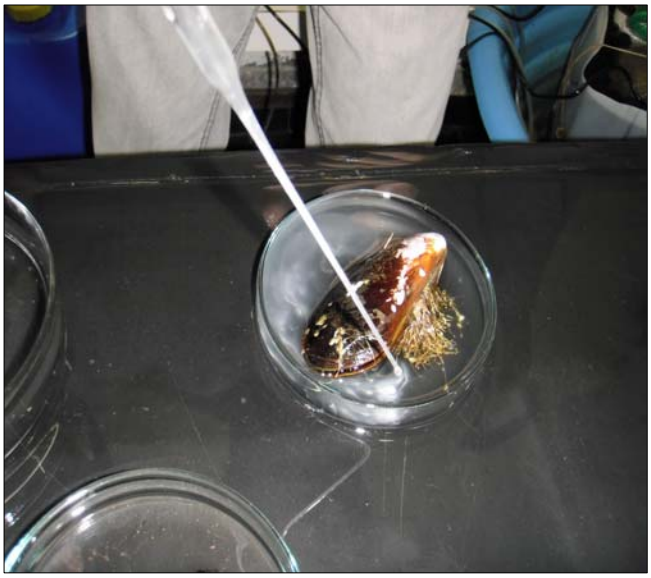


FIGURA 21 – Coleta de espermatozóides de *P. perna*.

A fecundação deve ser feita pela adição gradual de 1 mL ou mais da suspensão espermática total, até que mais de 90% dos óvulos estejam fecundados. Para tanto, deve-se acrescentar pouco a pouco a solução de esperma com observação sob microscópio após cada adição. Os óvulos fecundados foram identificados após o início da divisão celular.

Com auxílio de uma câmara de Sedgwick-Rafter, foi estimada a densidade dos ovos e, cerca de 500 embriões foram colocados em cada frasco-teste, iniciando-se então o período de incubação (48 horas).

O ensaio foi encerrado quando constatado que mais de 70% dos embriões atingiram o estágio de larva-D no controle. A fixação foi feita com 0,5 mL de formol tamponado com bórax para posterior contagem, onde os 100 primeiros organismos encontrados foram avaliados.

Foram considerados normais somente os organismos que se desenvolverem até o estágio de larva-D (FIG. 22), com valvas simétricas fechadas e massa visceral presente na porção interna da concha.

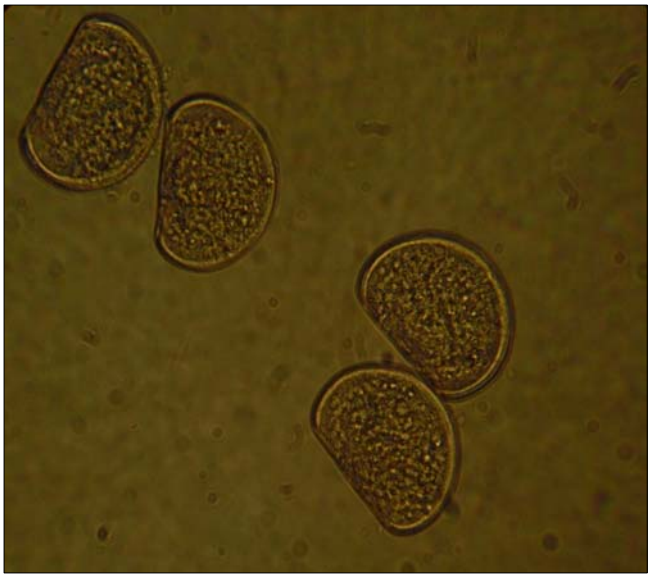


FIGURA 22 – Larvas - D normais de *P. perna*.

A TAB. 6 apresenta um resumo da metodologia do ensaio.

TABELA 6 - Condições para realização dos ensaios de toxicidade com *P. perna* (Embriolarval).

Parâmetros	**Condições**
Temperatura	25±1° C
Salinidade	30 a 36 unidades
Fotoperíodo	12 a 16 horas de luz
Água de diluição	Água marinha natural ou reconstituída
Sistema do ensaio	Estático
Duração do ensaio	48 h
Recipiente-teste	Tubo de ensaio com capacidade para 15 ml
Volume das soluções-teste	10 ml
Número de réplicas por diluição	4
Número de organismos por réplicas	50 organismos (ovos) por mililitro
Idade do organismo-teste	Ovos recém fecundados
Efeito observado	Atraso ou anormalidade no desenvolvimento embriolarval
Validade do ensaio	Mínimo de 70% de larvas normais nos controles
Alimentação	Sem

4.5.5. Ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro para avaliação de estresse celular no molusco bivalve *Perna perna* (Bivalvia, Mytilidae)

O procedimento utilizado para análise do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro em lisossomos de hemócitos de mexilhão *Perna perna*, foi realizado de acordo com o método descrito por LOWE et al. (1995).

A integridade da membrana lisossomal e sua estabilidade costumam ser afetadas por substâncias estressoras sendo a estabilidade considerada um indicador de “bem estar” celular (MOORE, 1990) e um importante biomarcador inespecífico de estresse celular.

Para realização deste ensaio, exemplares de mexilhões adultos (n=15) foram expostos em aquários a 3 (três) diferentes concentrações de Triclosan, 1 (um) aquário com água do mar utilizada para diluição do composto (controle) e 1 (um) aquário com o controle de DMSO (FIG. 23). As concentrações de Triclosan foram definidas baseadas em estudos que identificaram e quantificaram o composto em amostras ambientais (ver item 3.2.8) e preparadas conforme descrito no item 4.3.1. A cada 24 horas, as soluções-teste foram trocadas em todos os aquários.

FIGURA 23. Aquários com mexilhões expostos às diferentes concentrações de Triclosan e aos controles de água e do solvente (DMSO).

4.5.5.1. Preparo das Lâminas

As lâminas foram preparadas imediatamente antes do experimento. Lâminas lavadas e enxaguadas com água deionizada foram pré-tratadas com a solução de Poly-L-lisina para facilitar a adesão dos hemócitos no vidro. A solução de Poly-L-lisina foi preparada em água destilada na proporção de 1:10 e, com o auxílio de uma micropipeta, foi adicionado 10 µL da solução sobre cada lâmina.

Em seguida, o volume foi espalhado sobre toda superfície da lâmina com o uso de uma lamínula e as mesmas foram deixadas para secar (FIG. 24).

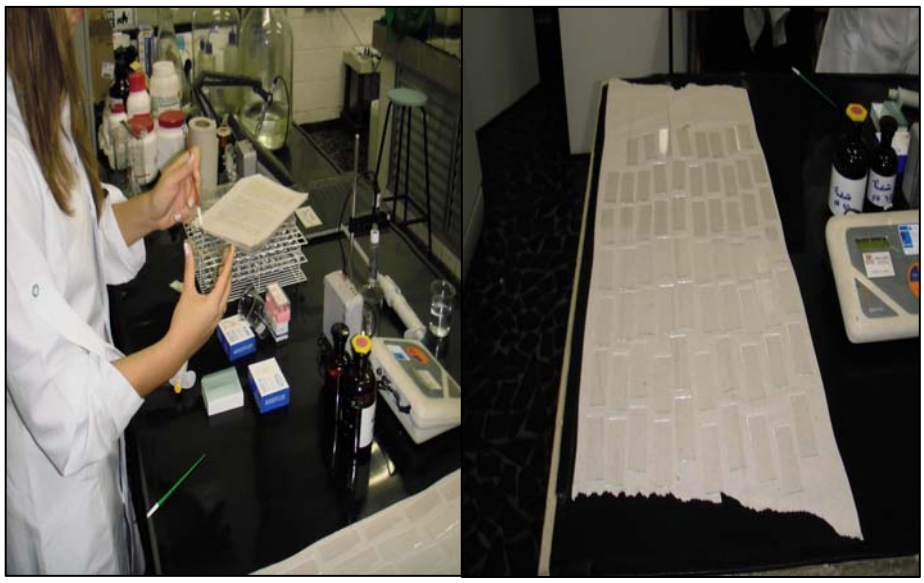


FIGURA 24. Preparo e secagem das lâminas com Poly-L-lisina.

4.5.5.2. Preparo da Solução Fisiológica

Esta solução salina é utilizada para diluir a hemolinfa e pode ser preparada até 1 (um) dia antes do experimento.

Em uma balança analítica pesou-se 4,77 g de HEPES; 25,48 g de cloreto de sódio; 13,06 g de sulfato de magnésio; 0,75 g de cloreto de potássio; 1,47g de cloreto de cálcio. Em seguida todos os reagentes foram diluídos em 1 (um) litro de água destilada em um frasco de vidro volumétrico. Após diluição total dos reagentes, foi verificado se o pH estava no valor adequado (7,36) para solução. Vale ressaltar que caso o valor do pH não estivesse adequado, seria necessário ajustá-lo com o uso de HCl ou NaOH. O procedimento de ajuste do pH foi realizado sempre antes do uso da solução, pois pode ocorrer uma variação do mesmo.

A solução fisiológica foi estocada em refrigerador, mas usada no ensaio em temperatura ambiente. Isto é extremamente importante, pois um choque térmico induzido pelo uso de uma solução muito fria (ou muito quente) pode estressar os hemócitos que estavam saudáveis.

4.5.5.3. Preparo do Vermelho Neutro

A solução estoque de vermelho neutro foi preparada durante o período (15 minutos de incubação) em que as células estavam se aderindo nas lâminas preparadas com Poly-L-lisina®.

Esta solução foi preparada com a diluição do corante em solvente universal DMSO. Para tal, pesaram-se 28,8 mg do corante vermelho neutro (mantido em refrigerador) e colocado em um frasco de vidro âmbar. Em seguida, com auxílio de uma pipeta, foi adicionado 1 mL de DMSO. O corante vermelho neutro foi dissolvido no DMSO com uma suave agitação. A solução estoque foi estocada em refrigerador dentro de um recipiente à prova de luz, pois o corante é fotossensível.

Para preparar a solução de trabalho, o estoque foi retirado da geladeira e deixado em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Para se assegurar de que nenhum cristal do corante vermelho neutro estivesse presente no estoque antes da diluição em solução de trabalho, a solução estoque foi agitada por 1 a 2 minutos para total homogeneização.

Com auxílio de uma micropipeta, 5 (cinco) mL de solução fisiológica foram colocados em frasco âmbar. Tomando cuidado de inserir a ponteira de micropipeta logo abaixo do menisco da solução estoque dentro do frasco, foi pipetado 10 μL do estoque, sendo este volume adicionado na solução fisiológica previamente pipetada.

4.5.5.4. Extração e Manuseio da Hemolinfa

Para extração da hemolinfa, os mexilhões foram retirados dos aquários e cuidadosamente, inserindo a lâmina de um bisturi ao longo da superfície ventral (o lado de onde partem os fios do bisso, que possui uma depressão natural que facilita este procedimento), as valvas foram separadas por alguns milímetros. O bisturi foi mantido em uma posição que possibilitou que as valvas ficassem abertas.

A água de dentro das conchas foi drenada, para assegurar que todo o líquido extraído fosse hemolinfa e não água do mar. Com o uso de uma seringa hipodérmica de 2 mL com uma agulha padrão 21 e contendo 0,5mL de solução fisiológica, foi coletado 0,5mL de hemolinfa do músculo adutor posterior. O padrão da agulha é importante, pois uma agulha mais fina poderá causar destruição nos hemócitos e aumentar a probabilidade de formação de coágulos.

A localização do músculo adutor posterior foi identificada inserindo suavemente a agulha entre a ponta das valvas, nos primeiros centímetros, e cuidadosamente movendo-a horizontalmente até encontrar certa resistência, dada pelo toque com o músculo. Então, a

agulha foi posicionada e cuidadosamente inserida no músculo, do qual a hemolinfa foi coletada. A extração é considerada adequada quando ao colocar a seringa contra a luz um líquido levemente leitoso (comparado com a solução salina transparente) for observado.

Após obter uma amostra de hemolinfa, a agulha foi removida da seringa e o conteúdo transferido para tubos de microcentrífuga com volume de 2 mL. O conteúdo dos tubos foi misturado suavemente (invertendo-se os tubos de modo suave) antes de aplicá-lo sobre a superfície das lâminas. Pelo fato dos hemócitos rapidamente se precipitarem, a aplicação da solução de células foi imediata após esta inversão.

Cerca de 40 μL desta solução de células (hemolinfa + solução fisiológica) foi pipetada sobre a superfície de uma lâmina previamente tratada com poly-L-lisina, utilizando uma ponteira de pipeta limpa para cada amostra. As lâminas foram colocadas em uma câmara úmida à prova de luz e deixadas incubar por 15 minutos, para permitir que as células aderissem nas lâminas.

Após a incubação, retirou-se o excesso de suspensão e foi realizada uma limpeza na área ao redor de onde estão as células para remover o excesso de fluido. Este procedimento é necessário para que os hemócitos aderidos na lâmina sejam totalmente expostos ao vermelho neutro no próximo estágio, e também para eliminar o efeito de flutuar que eventualmente ocorre com a lamínula quando há excesso de líquido. Uma monocamada de hemócitos pode ser observada como pequenos pontos na lâmina quando esta é colocada contra a luz.

4.5.5.5. Incubação e Leitura do Ensaio

Com auxílio de uma micropipeta, 40 μL de solução de trabalho de vermelho neutro foi colocada sobre a camada de hemócitos de cada lâmina (15 lâminas por concentração-teste), dentro da câmara úmida e à prova de luz (FIG 25). Após aguardar 15 minutos de incubação na câmara, para permitir que o corante penetre nas células, a lâmina foi coberta com uma lamínula.

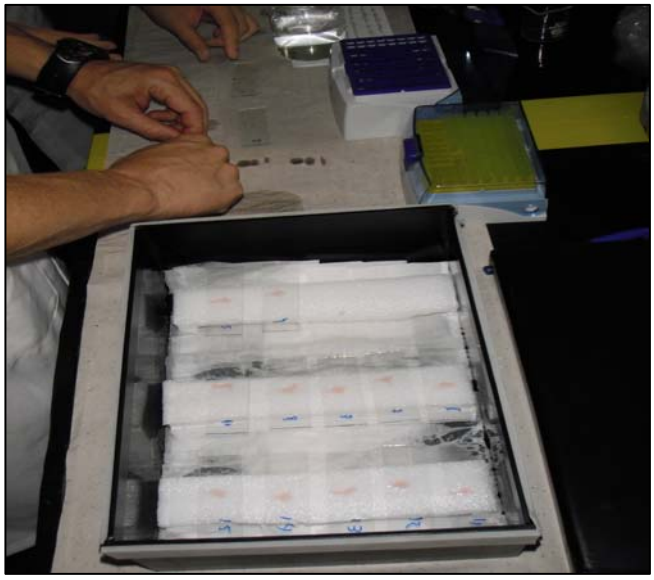


FIGURA 25. Solução de trabalho de vermelho neutro sobre a camada de hemócitos de cada lâmina, dentro da câmara úmida e à prova de luz.

Sistematicamente, as lâminas foram examinadas em microscópio a cada 15 minutos até todas as células se apresentarem estressadas (FIG. 26). Inicialmente as células foram localizadas com o menor aumento, e após localizá-las, foram examinadas com aumento de 400X.

FIGURA 26. Leitura sistemática das lâminas em microscópio óptico.

Um “timer” com alarme sonoro foi utilizado para manter as contagens dentro dos intervalos de tempo estipulados, mantendo a acurácia. Vale ressaltar que cada lâmina deve ser examinada e reposta em 1 minuto. Como o vermelho neutro é muito sensível à luz, é recomendável que todas as lâminas recebam a mesma exposição à luz durante os exames.

A luz do microscópio foi mantida a mais baixa possível para permitir uma boa visualização das células e as mesmas foram examinadas tanto para anormalidades estruturais como para o tempo de retenção do vermelho neutro. O tempo de retenção do corante vermelho neutro pelos lisossomos foi obtido pela estimativa da proporção de células exibindo “vazamento” dos lisossomos para o citosol e/ou exibindo anormalidades no tamanho e cor dos lisossomos.

A cada contagem as condições foram anotadas em uma planilha. A TAB. 7 apresenta os critérios seguidos para análise das células.

TABELA 7 - Critérios para diferenciação de células saudáveis e células estressadas (KING, 2000).

Critério	**Células saudáveis**	**Células estressadas**
Formato das células	Irregular	Arredondado
Tamanho das células	Aumentado	Diminuído
Número de lisossomos	Aumentado	Diminuído
Tamanho dos lisossomos	Menores	Alargados/Aumentados
Cor dos lisossomos	Vermelho pálido/rosado	Vermelho ou rosa escuro
Pseudópodes	Não visíveis	Visíveis
Corante extravasado no citosol	Não visíveis	Visíveis

Para a avaliação das células foi utilizada uma tabela de registro dos dados onde, para mais que 50% das células observadas sem sinais de stress (FIG. 27), usou-se o sinal + (positivo) para o animal examinado. O “end-point” foi determinado quando 50% ou mais das células exibiram anomalias estruturais ou vazamento do corante para o citosol (FIG. 28) e o sinal – (negativo) foi marcado na tabela (KING, 2000). O estado de integridade da membrana lisossômica pode ser refletido pelo tempo necessário para que ocorra o

extravasamento do corante Vermelho Neutro para o citosol, o tempo de retenção médio para cada concentração foi calculado pelo tempo em minutos de cada animal analisado.

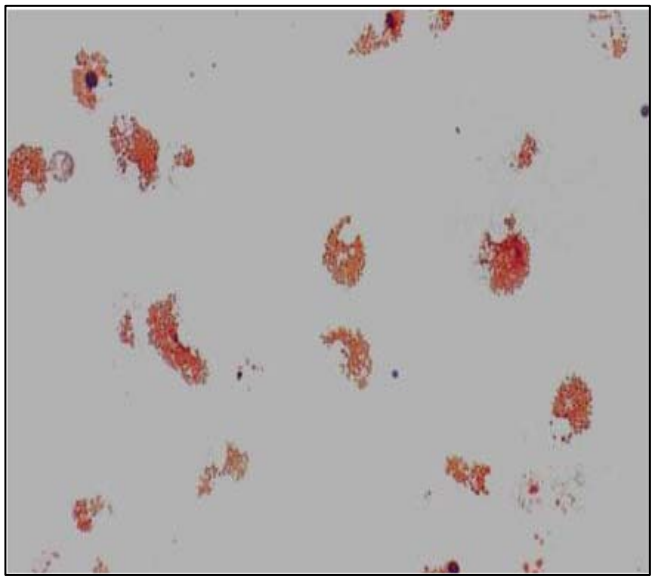


FIGURA 27. Células saudáveis (KING, 2000).

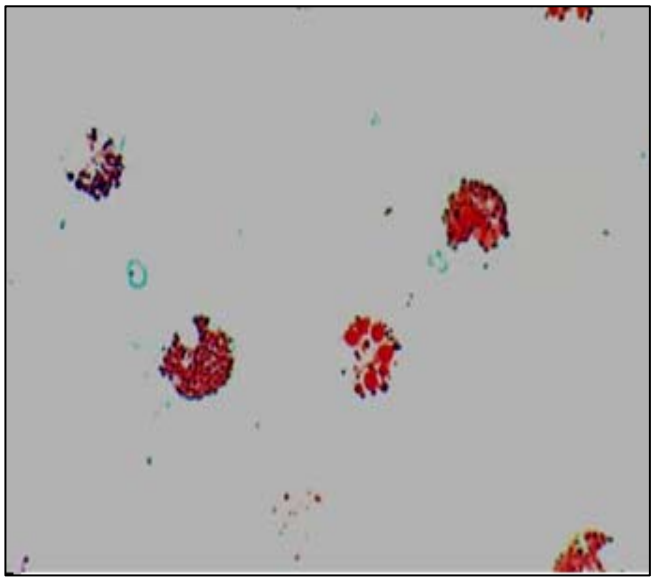


FIGURA 28. Células estressadas (KING, 2000).

4.6. Análises dos resultados dos ensaios de toxicidade e sensibilidade

As análises dos resultados dos ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo e para avaliação de efeito crônico seguiram o protocolo da USEPA (2002).

4.6.1. Toxicidade aguda

Nos resultados de efeito agudo que apresentaram dados normais (Chi-quadrado – $\chi 2$), foi estabelecida a concentração letal que causou a mortalidade em 50% dos organismos expostos (CL50) para *Nitokra sp* e a concentração que causou a inibição da fertilização em 50% das células expostas para *Lytechinus variegatus*, através do método de Próbitos. Nos ensaios para avaliação de efeito agudo que não apresentaram dados normais, a CL50 e a CE50 foram estimadas através do método Trimmed Spearman-Karber (HAMILTON, 1977). O fluxograma abaixo demonstra as etapas para determinação da CL50 ou CE50, segundo USEPA (2002). (FIG. 29).

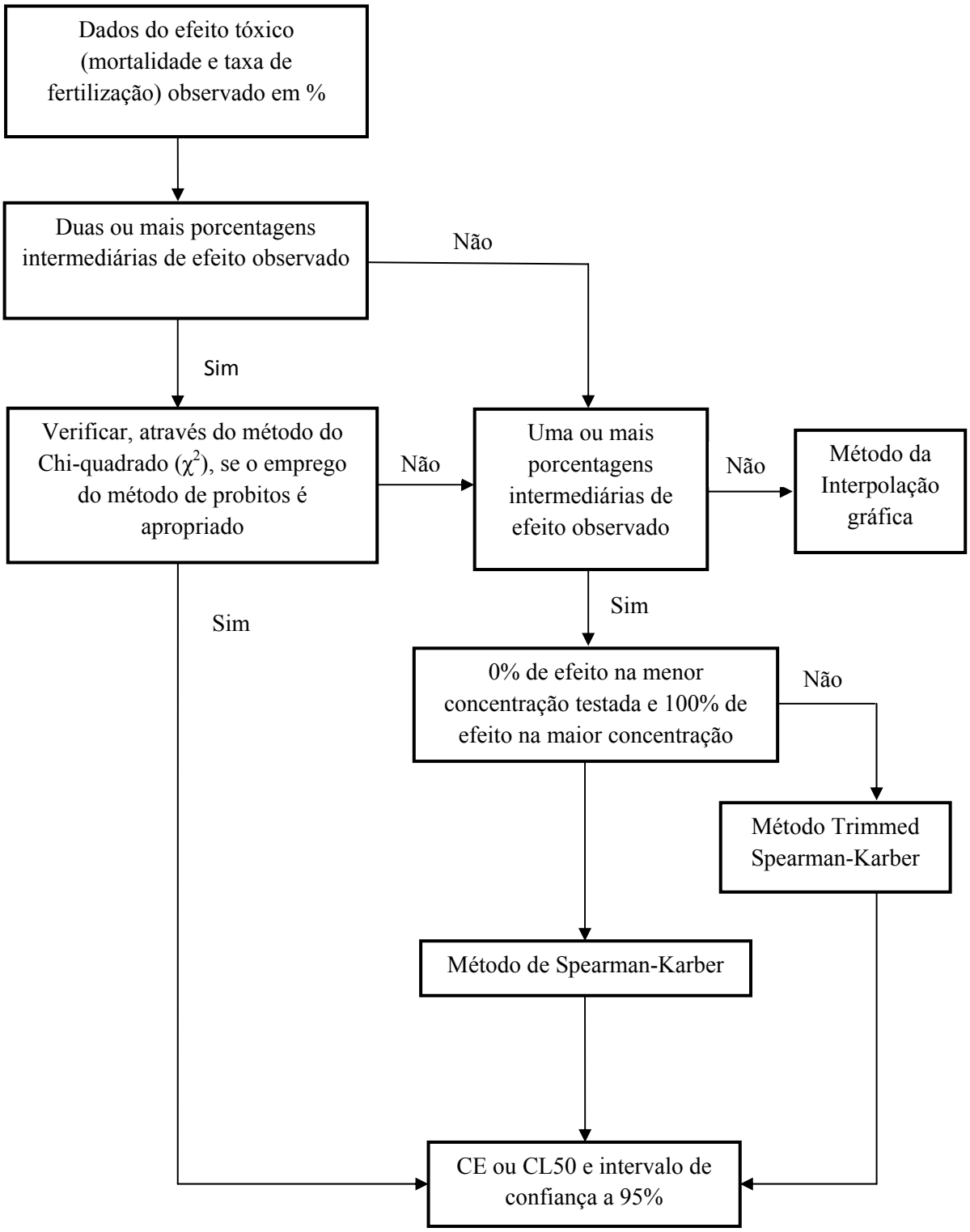


FIGURA 29 – Fluxograma com as etapas para o cálculo da CE e/ou CL50 (USEPA, 2002).

4.6.2 Toxicidade crônica.

Nos resultados de efeito crônico com *Lytechinus variegatus* e *Perna perna*, foram estabelecidas as concentrações onde não foram detectados efeitos de importância biológica (CENO – Concentração de Efeito Não Observado) e, as concentrações pontuais que causaram uma porcentagem específica de redução da resposta (CI 50 – Concentração de Inibição) através do teste de hipóteses e do método de estimativa pontual, respectivamente.

Para o estabelecimento da CENO, os dados foram analisados quanto à normalidade através do método do Chi-quadrado (χ^2) e também analisados quanto à homocedasticidade através do teste de *Bartlett*. Após passarem nestes pré-requisitos para aplicação da análise de variância (ANOVA), foi empregado o teste de *Dunnett*, a fim de identificar as concentrações que apresentaram diferença estatística significativa com o controle. Para todas as análises diferenças significativas foram determinadas quando $p < 0,05$.

A determinação das concentrações pontuais (relação dose/resposta) que causaram inibição do desenvolvimento embriolarval em 50% dos organismos expostos foi calculada através do método de interpolação linear (NORBERG-KING, 1988).

O fluxograma abaixo apresenta as etapas para determinação da CENO e da CI50 em ensaios de toxicidade crônica segundo USEPA (2002) (FIG. 30).

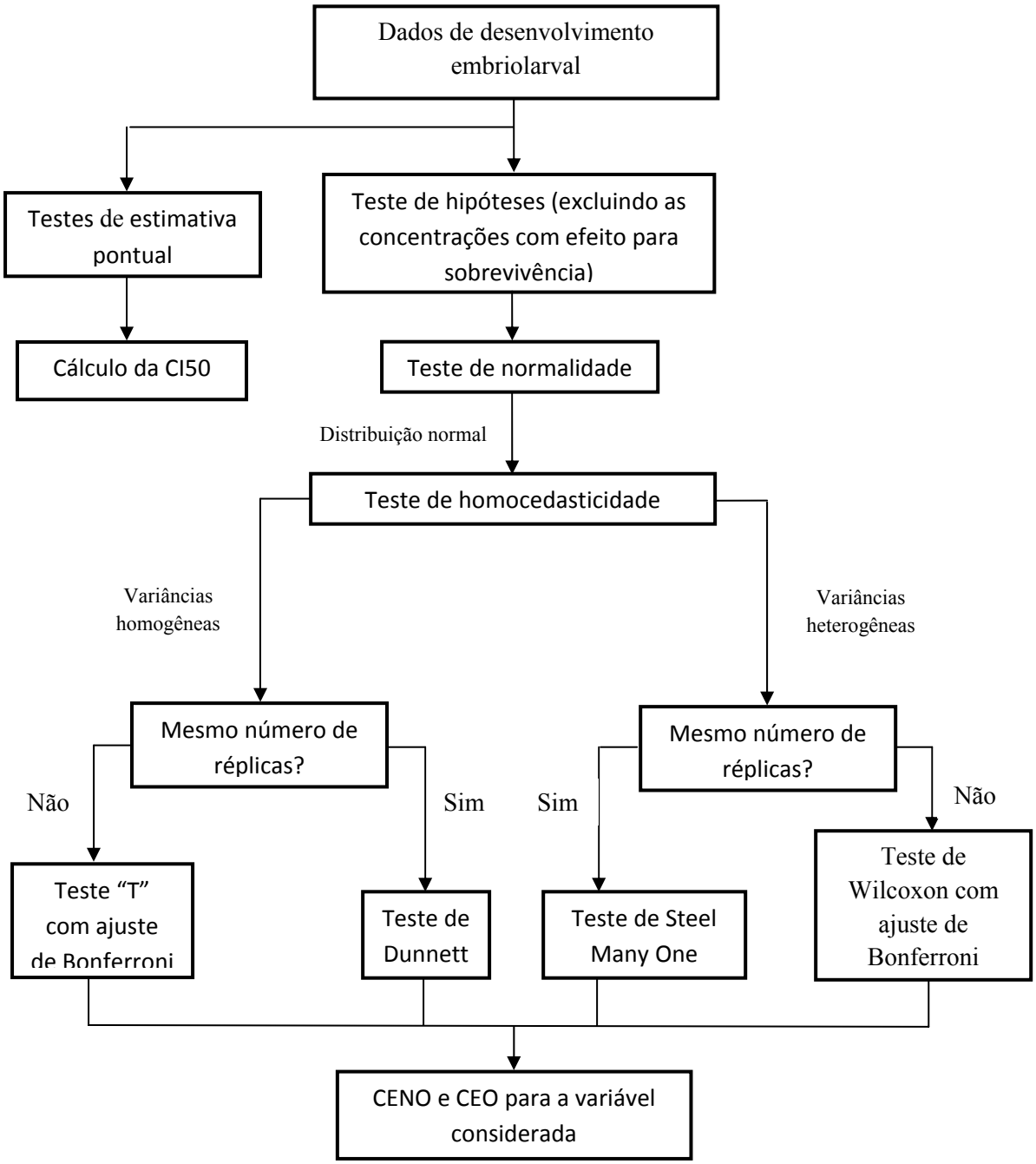


FIGURA 30 – Fluxograma com as etapas para o cálculo de CENO e CI50 (USEPA, 2002).

Os dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade (Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro) foram analisados quanto à normalidade com o uso dos métodos Chi-quadrado (χ^2) e Kolmogorov, e quanto à homogeneidade de variância através dos testes de *Bartlett* e *Hartley*. Posteriormente foi empregada a análise de variância (ANOVA) com *post hoc* de *Dunnet* e *Bonferroni t-test*. Para todas as análises, diferenças significativas foram determinadas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do programa TOXSTAT 3.5.

5. RESULTADOS

Os resultados são apresentados a partir dos pré-requisitos, ensaio de sensibilidade e controle positivo do solvente DMSO, que validam os resultados dos ensaios definitivos com todas as espécies empregadas neste estudo.

A apresentação dos resultados inicia-se com os ensaios para avaliação de efeito agudo (mortalidade de *Nitokra sp* e taxa de fertilização de *Lytechinus variegatus*). Em seguida são apresentados os resultados dos ensaios para avaliação de efeito crônico (inibição do desenvolvimento embriolarval de *Lytechinus variegatus e Perna perna*) e, posteriormente, são apresentados os resultados do ensaio de citotoxicidade (estabilidade da membrana lisossômica) com o molusco bivalve *Perna perna*. As informações referentes às análises físico-químicas são apresentadas ao final dos resultados dos ensaios definitivos e as tabelas encontram-se nos apêndices.

5.1. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo

5.1.1. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo (Mortalidade) com *Nitokra sp* (Crustacea, Copepoda)

5.1.1.1. Ensaios de sensibilidade

Os resultados da CL(I)50;96h dos ensaios de sensibilidade realizados com *Nitokra sp* variaram de 17,67 $mg.L^{-1}$ a 20,88 $mg.L^{-1}$ de Dicromato de Potássio (TAB. 8). Estes valores se encontram dentro dos limites (10,93 $mg.L^{-1}$ - 30,02 $mg.L^{-1}$) estabelecidos para a espécie de acordo com a carta-controle (ANEXO D) do Laboratório de Ecotoxicologia Marinha do Instituto Oceanográfico – USP.

TABELA 8 - Sensibilidade (CL(I)50; 96h) de *Nitokra sp* ao Dicromato de Potássio.

Ensaio	CL(I)50;96h ($mg.L^{-1}$)
1	19,98 (16,65 – 23,98)
2	17,68 (14,75 – 21,14)
3	20,88 (17,68 – 24,25)
Média	19,51
DP	1,66
CV (%)	8,48

( ) - Intervalo de Confiança.

5.1.1.2. Controle positivo do solvente DMSO

A fim de avaliar possíveis efeitos no copépodo *Nitokra sp* relacionados ao solvente (DMSO) utilizado na diluição de Triclosan, foram realizados nos ensaios 1 e 3 um controle positivo do solvente com a maior concentração testada. Foi empregado o Teste *t – Student* somente no ensaio 3 pois no ensaio 1 o número de organismos mortos foi igual no controle de água e no controle de DMSO.

O resultado mostra que não houve diferença estatística significativa (Teste *t - Student*) entre o controle de água e a maior concentração (0,50 $mg.L^{-1}$) do solvente DMSO no ensaio 3, conforme apresentado na TAB. 9.

TABELA 9 – Sumário estatístico para o teste (Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$)) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade aguda de Triclosan com *Nitokra sp.*

Tratamentos	**Média de sobrevivência**	**Desvio padrão**	***p***
Controle de água	5,00	0,00	-
Controle de DMSO (0,50 mg.L^{-1})	4,75	0,50	0, 355

5.1.1.3. Toxicidade aguda – Mortalidade

Os valores de CL(I)50;96h de Triclosan para os ensaios com *Nitokra sp* (n = 3) estiveram compreendidos entre 0,18 mg.L^{-1} a 0,21 mg.L^{-1}. A TAB. 10 apresenta o percentual médio e os desvios-padrão (DP) de todas as réplicas dos três ensaios realizados.

TABELA 10 – Percentual de mortalidade (médio e desvio-padrão) dos ensaios de toxicidade aguda de Triclosan com *Nitokra sp*.

Concentrações ($mg.L^{-1}$)	**Ensaio 1**		**Ensaio 2**		**Ensaio 3**	
	Média	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**
Controle	5,00	0,50	0,00	-	0,00	-
Controle DMSO	5,00	0,50	-	-	5,00	0,50
0,14	10,00	1,00	10,00	0,60	15,00	1,00
0,17	25,00	1,30	35,00	1,00	25,00	1,30
0,20	60,00	0,80	75,00	1,50	60,00	0,80
0,24	75,00	0,50	100,00	-	60,00	-
0,29	75,00	0,50	100,00	-	95,00	0,50
0,35	100,00	-	100,00	-	100,00	-
0,42	100,00	-	100,00	-	100,00	-
0,50	100,00	-	100,00	-	100,00	-

A TAB. 11 apresenta os resultados expressos em CL(I)50;96h, a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) dos três ensaios.

TABELA 11 – Toxicidade aguda (CL(I)50;96h) de Triclosan para *Nitokra sp*.

Ensaio	CL(I)50;96h ($mg.L^{-1}$)
1	0,21 (0,18 – 0,23)
2	0,18 (0,17 – 0,19)
3	0,20 (0,18 – 0,21)
Média	0,20
DP	0,02
CV (%)	10,00

( ) – Intervalo de confiança.

Informações adicionais sobre os resultados encontram-se no APÊNDICE B.

5.1.1.4. Análises físicas e químicas

Os resultados das análises físicas e químicas de pH, oxigênio dissolvido e salinidade estiveram dentro dos limites de tolerância para espécie, ou seja, salinidade entre 5 e 30 UPS e concentração de oxigênio dissolvido acima de 5,0 $mg.L^{-1}$ (APÊNDICE C).

5.1.2. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo (Fertilização) com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)

5.1.2.1. Ensaios de sensibilidade

Os resultados da CI(I)50;24h, dos ensaios de sensibilidade (n=2) com os lotes de ouriço-do-mar foram de 0,16 $mg.L^{-1}$ (0,14 $mg.L^{-1}$ – 0,17 $mg.L^{-1}$) e 0,16 $mg.L^{-1}$ (0,15 – 0,17) de Sulfato de Zinco, respectivamente. Estes valores encontram-se dentro dos limites estabelecidos para espécie, de acordo com a carta-controle do Laboratório de Ecotoxicologia Prof. Caetano Belliboni – Universidade Santa Cecília.

5.1.2.2. Controle positivo do solvente DMSO

A fim de avaliar possíveis efeitos na taxa de fertilização de *Lytechinus variegatus* relacionados ao solvente (DMSO) utilizado na diluição de Triclosan, foram realizados nos ensaios 1, 2 e 4 um controle positivo do solvente com a maior concentração testada.

Os resultados mostram que não houve diferença estatística significativa (Teste *t* - *Student*, $p \leq 0,05$) entre o controle de água e a maior concentração (0,60 $mg.L^{-1}$) do solvente DMSO conforme demonstrado nas TAB. 12, 13,14.

TABELA 12 – Sumário estatístico para o teste (Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$)) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* (Ensaio 1).

Tratamentos	**Taxa de fertilização (Média)**	**Desvio padrão**	***p***
Controle de água	90,75	4,35	-
Controle de DMSO (0,5 $mg.L^{-1}$)	85,25	4,57	0,131

TABELA 13 – Sumário estatístico para o teste (Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$)) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* (Ensaio 2).

Tratamentos	**Média da taxa de fertilização**	**Desvio padrão**	***p***
Controle de água	85,00	3,56	-
Controle de DMSO (0,6 $mg.L^{-1}$)	86,50	3,11	0,548

TABELA 14 – Sumário estatístico para o teste (Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$)) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* (Ensaio 4).

Tratamentos	**Média da taxa de fertilização**	**Desvio padrão**	***p***
Controle de água	97,00	1,63	-
Controle de DMSO (0,6 mg.L^{-1})	95,25	1,26	0,140

5.1.2.3. Toxicidade aguda – Fertilização

Os valores de CI(I)50;1h de Triclosan para os ensaios com *Lytechinus variegatus* (n = 5) estiveram compreendidos entre 0,239 mg.L^{-1} a 0,250 mg.L^{-1}.

A TAB. 15 apresenta o percentual médio da quantidade de óvulos fertilizados e os desvios-padrão (DP) de todas as réplicas nos cinco ensaios realizados.

TABELA 15 – Percentual de fertilização (médio e desvio-padrão) dos ensaios de toxicidade aguda de Triclosan com *Lytechinus variegatus*.

Concentrações ($mg.L^{-1}$)	**Ensaio 1**		**Ensaio 2**		**Ensaio 3**		**Ensaio 4**		**Ensaio 5**	
	Média	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**
Controle	90,75	4,30	85,00	3,60	85,00	3,60	97,00	1,60	96,25	1,70
Controle DMSO	85,25	4,60	86,50	3,10	-	-	95,25	1,30	-	-
0,1	91,25	1,70	80,25	5,10	89,75	3,10	77,75	3,90	85,75	5,10
0,2	92,00	3,70	82,00	5,90	77,50	5,90	77,25	1,50	90,50	1,90
0,3	86,75	3,80	60,25	7,50	7,00	3,70	4,25	2,20	8,75	6,20
0,4	88,00	8,10	10,50	2,90	2,00	2,70	1,50	0,60	3,50	3,80
0,5	31,50	4,40	1,25	1,30	2,25	2,20	0,25	0,50	0,25	0,50
0,6	13,50	6,60	2,25	1,00	0,00	-	0,00	-	0,00	-

A TAB. 16 apresenta os resultados expressos em CI(I)50;1h, a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) dos cinco ensaios.

TABELA 16 - Toxicidade aguda (CI(I)50;1h) de Triclosan para *Lytechinus variegatus*.

Ensaio	CI(I)50;1h (mg.L^{-1})
1	0,335 (0,329 – 0,340)
2	0,336 (0,328 – 0,343)
3	0,248 (0,244 – 0,252)
4	0,239 (0,237 – 0,241)
5	0,250 (0,247 – 0,255)
Média	0,282
DP	0,049
CV (%)	17,37

( ) - Intervalo de confiança

Informações adicionais sobre os resultados encontram-se no APÊNDICE D.

5.1.2.4. Análises físicas e químicas

Os resultados das análises físicas e químicas (pH, Oxigênio dissolvido e Salinidade) estiveram dentro dos limites de tolerância para espécie, ou seja, salinidade entre 30 e 36 UPS e oxigênio dissolvido acima de 5,0 mg.L-1 (APÊNDICE E).

5.2. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito crônico

5.2.1. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) de curta duração com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata, Echinoidea)

5.2.1.1. Ensaios de sensibilidade

Os resultados da CI(I)50;24h, dos ensaios de sensibilidade (n=2) com os lotes de ouriço-do-mar foram de 0,11 mg.L^{-1} (0,11 mg.L^{-1} – 0,12 mg.L^{-1}) e 0,17 mg.L^{-1} (0,16 mg.L^{-1} – 0,17 mg.L^{-1}) de Sulfato de Zinco, respectivamente. Estes valores encontram-se dentro dos limites estabelecidos para espécie, de acordo com a carta controle do Laboratório de Ecotoxicologia Prof. Caetano Belliboni – Universidade Santa Cecília.

5.2.1.2. Controle positivo do solvente DMSO

A fim de avaliar possíveis efeitos no desenvolvimento embriolarval de *Lytechinus variegatus* relacionados ao solvente (DMSO) utilizado na diluição de Triclosan, foram realizados controles positivo do solvente com a maior concentração testada nos ensaios 1 e 4.

A diferença estatística significativa observada (Teste *t* - *Student*, $p \leq 0,05$) entre o controle de água e a maior concentração (0,20 $mg.L^{-1}$) do solvente DMSO no ensaio 1, deve-se ao fato, de o controle do solvente ter apresentado um desenvolvimento embriolarval normal superior ao controle de água, o que não indica efeito adverso (TAB. 17).

TABELA 17 – Sumário estatístico para o teste (Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$)) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade crônica com *Lytechinus variegatus* (Ensaio 1).

Tratamentos	**Desenvolvimento embriolarval normal médio (%)**	**Desvio padrão**	***p***
Controle de água	91,75	4,03	-
Controle de DMSO (0,20 $mg.L^{-1}$)	98,50	1,91	0,023

No ensaio 4, o resultado mostra que não houve diferença estatística significativa (Teste *t* - *Student*, $p \leq 0,05$) entre o controle de água e a maior concentração (0,20 $mg.L^{-1}$) do solvente DMSO conforme demonstrado na TAB. 18.

TABELA 18 – Sumário estatístico para o teste (Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$)) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus* (Ensaio 4).

Tratamentos	**Desenvolvimento embriolarval normal médio (%)**	**Desvio padrão**	***p***
Controle de água	92,75	2,22	-
Controle de DMSO (0,20 mg.L^{-1})	95,50	1,29	0,075

5.2.1.3. Toxicidade crônica (Embriolarval)

Os valores das concentrações de efeito não observado (CENO(I)) e as concentrações de efeito observado (CEO(I)) variaram de 0,04 mg.L^{-1} a 0,10 mg.L^{-1} e 0,06 mg.L^{-1} a 0,12 mg.L^{-1}, respectivamente.

Os valores das concentrações de Triclosan que inibiram o desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar (CI(I)50;24h) variaram de 0,130 mg.L^{-1} a 0,151 mg.L^{-1} e anomalias esporádicas foram encontradas nas concentrações de 0,16 mg.L^{-1} e 0,18 mg.L^{-1}.

A TAB. 19 apresenta o percentual médio do desenvolvimento embriolarval e os desvios-padrão (DP) de todas as réplicas dos ensaios realizados (n=5).

TABELA 19 – Percentual de desenvolvimento embriolarval (médio e desvio-padrão) dos ensaios de toxicidade crônica de Triclosan com *Lytechinus variegatus*.

Concentrações ($mg.L^{-1}$)	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4		Ensaio 5	
	Média	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**
Controle	91,75	4,03	93,50	1,30	95,25	1,50	92,75	2,22	92,75	2,22
Controle DMSO (0,2)	98,50	1,91	-	-	-	-	95,50	1,29	-	-
0,04	91,50	3,00	92,25	2,20	95,75	1,70	95,75	2,60	94,25	2,20
0,06	80,75	5,60	91,50	3,50	93,75	2,20	93,75	1,30	94,50	2,50
0,08	68,00	3,70	87,50	4,00	93,25	2,20	95,25	2,90	93,75	1,50
0,10	62,25	4,00	80,00	0,80	91,00	1,20	93,5	2,60	87,25	1,70
0,12	50,50	3,90	76,50	5,00	84,75	2,90	84,25	4,30	83,00	2,80
0,14	40,25	9,90	41,00	2,20	72,25	9,20	71,25	5,90	74,00	5,20
0,16	41,25	5,40	30,75	1,00	28,50	10,70	18,75	9,50	16,00	5,40
0,18	21,50	1,30	1,75	1,00	5,00	9,30	0,25	0,50	0,25	0,50
0,20	0,25	0,50	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-

Os resultados dos ensaios expressos em CENO(I), CEO(I) e CI(I)50;24h e as respectivas médias, desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) estão representados na TAB. 20.

TABELA 20 – Toxicidade crônica de Triclosan (CENO(I), CEO(I), CI(I)50;24h) para *Lytechinus variegatus.*

Ensaio	**CENO(I)** mg.L^{-1}	**CEO(I)** mg.L^{-1}	**CI(I)50;24h** mg.L^{-1}
1	0,04	0,06	0,130 (0,123 – 0,144)
2	0,06	0,08	0,137 (0,136 – 0,138)
3	0,10	0,12	0,151 (0,149 – 0,155)
4	0,10	0,12	0,149 (0,148 – 0,151)
5	0,10	0,12	0,149 (0,148 – 0,150)
Média	0,08	0,10	0,143
DP	0,03	0,03	0,010
CV (%)	35,36	28,28	6,993

( ) – Intervalo de confiança

As FIG. de 31 a 35 apresentam o desenvolvimento embriolarval normal (%) e as concentrações testes dos ensaios para avaliação de efeito crônico com *L.variegatus*.

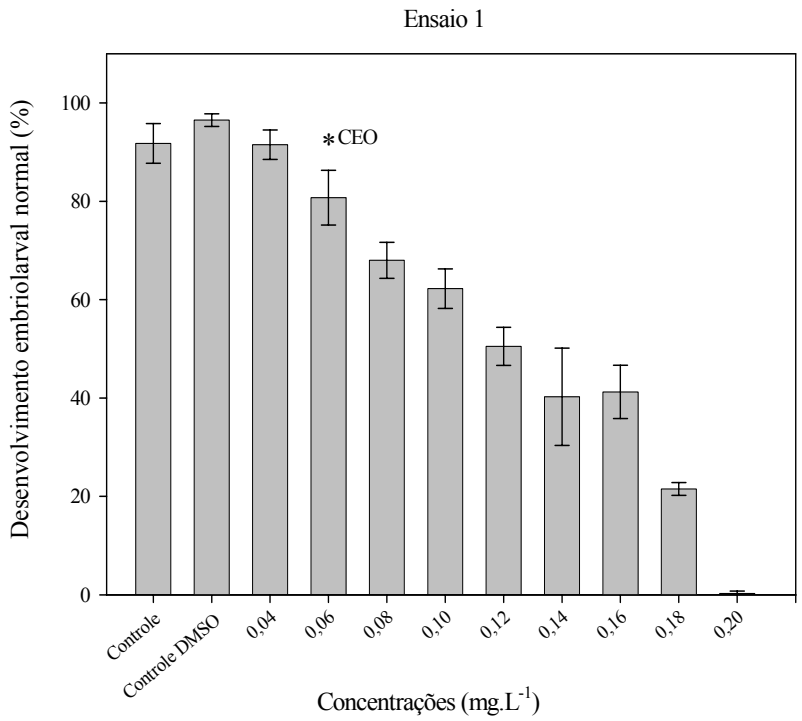


FIGURA 31 – Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *L.variegatus*.

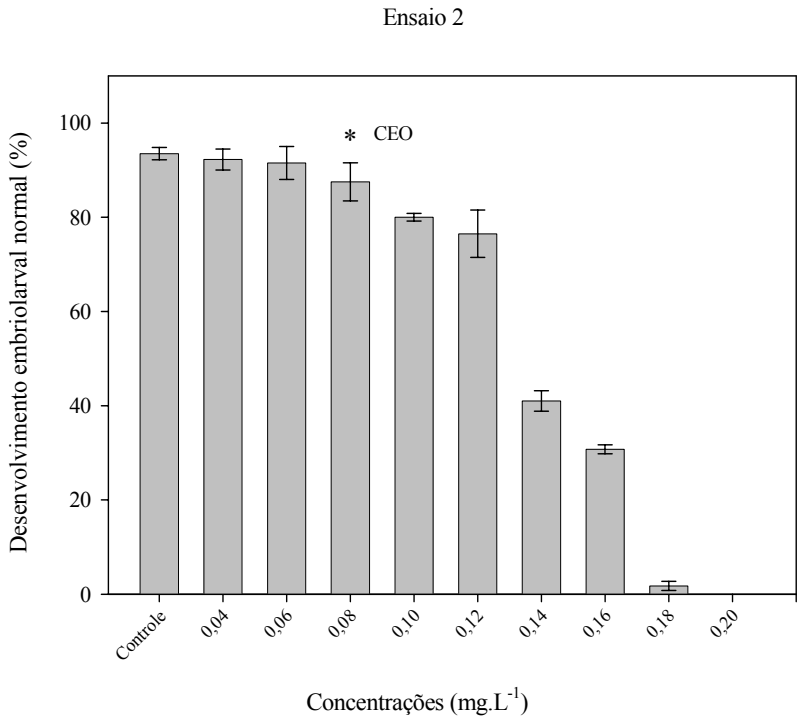


FIGURA 32 – Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *L.variegatus*.

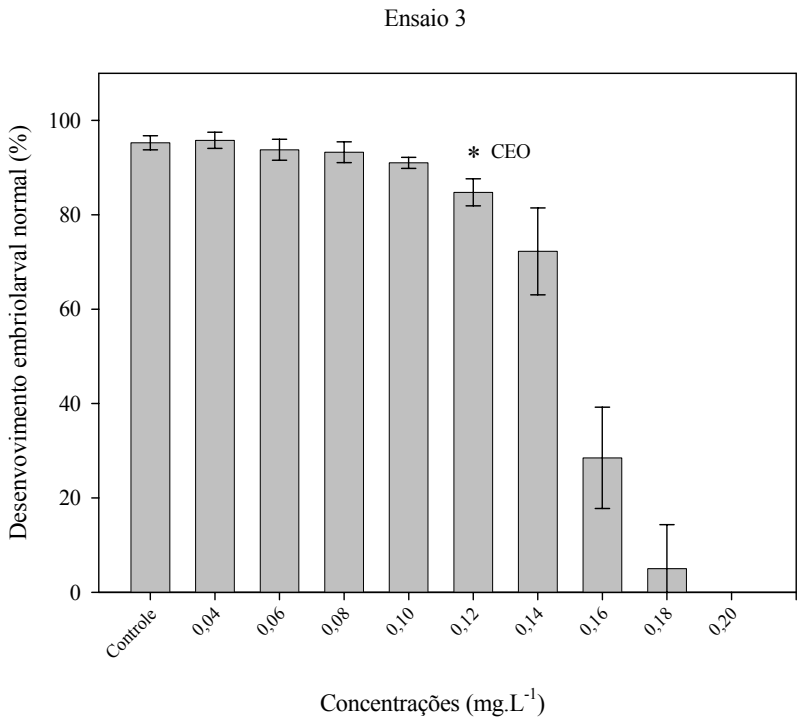


FIGURA 33 – Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *L.variegatus*.

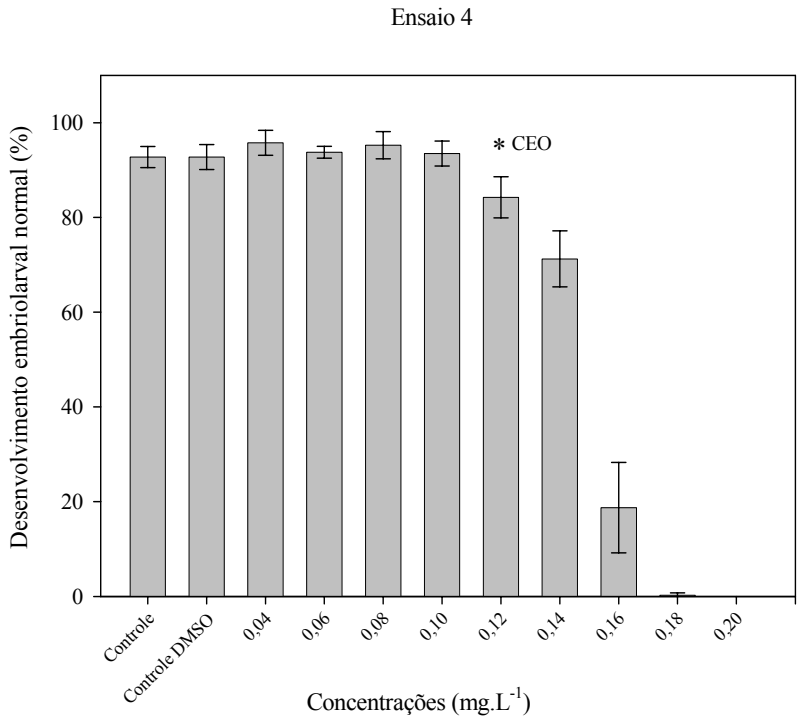


FIGURA 34 – Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *L.variegatus*.

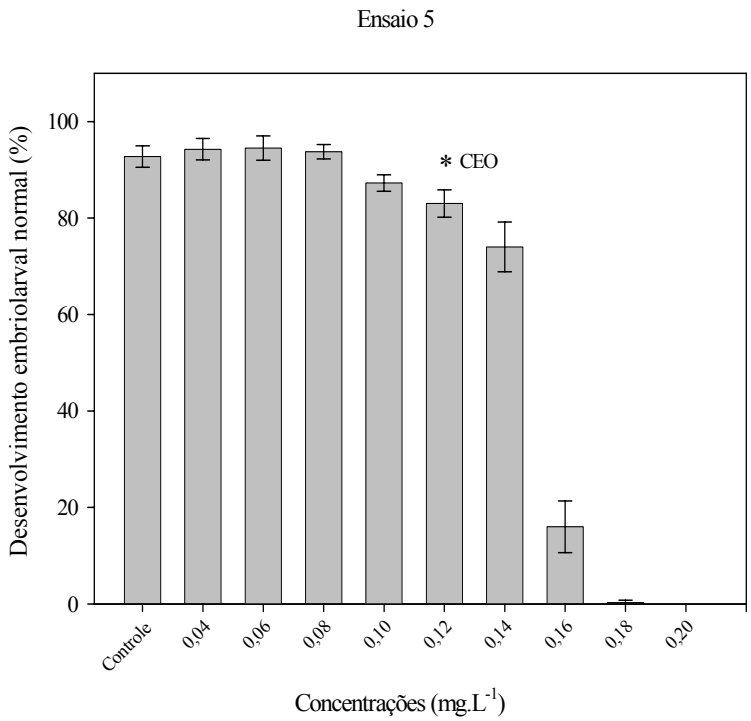


FIGURA 35 – Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *L.variegatus*.

Informações adicionais sobre os resultados encontram-se no APÊNDICE F.

5.2.1.4. Análises físicas e químicas

Os resultados das análises físicas e químicas de pH, oxigênio dissolvido e salinidade estiveram dentro dos limites de tolerância para espécie, ou seja, salinidade entre 30 e 36 UPS e oxigênio dissolvido acima de 5 $mg.L^{-1}$ (APÊNDICE G).

5.2.2. Ensaios de toxicidade para avaliação de efeito crônico (Embriolarval) com *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia)

5.2.2.1. Ensaios de sensibilidade

Os resultados da CI(I)50;48h, dos ensaios de sensibilidade (n=5) com os lotes de mexilhão variaram de 0,790 $mg.L^{-1}$ (0,620 $mg.L^{-1}$ – 0, 890 $mg.L^{-1}$) a 1,014 $mg.L^{-1}$ (0,967 $mg.L^{-1}$ – 1,074 $mg.L^{-1}$) de Dodecil Sulfato de Sódio (DSS).

Os resultados encontrados nos ensaios de sensibilidade ao DSS realizados no presente estudo estão dentro dos intervalos de concentrações reportados na literatura (ZARONI, 2005; SIMM, 2009).

A TAB. 21 expressa os resultados obtidos (CI(I)50;48h) nos ensaios de sensibilidade (n=5) com mexilhão *Perna perna*, a média, o desvio-padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV).

TABELA 21 - Sensibilidade (CI(I)50;48h) de *Perna perna* ao Dodecil Sulfato de Sódio (DSS).

Ensaio	**CI(I)50;48h (mg.L^{-1})**
1	0,957 (0,934 – 0, 975)
2	0,790 (0,620 – 0, 890)
3	1,014 (0,967 – 1,074)
4	0,910 (0,890 – 0,926)
5	0,865 (0,858 – 0,873)
Média	0,907
DP	0,086
CV (%)	9,481

( ) – Intervalo de confiança

5.2.2.2. Controle positivo do solvente DMSO

A fim de avaliar possíveis efeitos no desenvolvimento embriolarval de *Perna perna* relacionados ao solvente (DMSO) utilizado na diluição de Triclosan, foram realizados controles positivo do solvente com as maiores concentrações testadas nos ensaios 1 e 2.

Não houve diferença estatística significativa (Teste *t* - *Student*, $p \leq 0,05$) entre o controle de água e a maior concentração (0,32 mg.L^{-1}) do solvente DMSO no ensaio 1 (TAB. 22), bem como entre o controle de água e a maior concentração do solvente DMSO (0,18 mg.L^{-1}) no ensaio 2 (TAB. 23).

TABELA 22 – Sumário estatístico para o teste (Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$)) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade crônica com *Perna perna* (Ensaio 1).

Tratamentos	**Desenvolvimento embriolarval normal médio (%)**	**Desvio padrão**	***p***
Controle de água	78,25	5,44	-
Controle DMSO (0,32 mg.L^{-1})	77,75	5,74	0,903

TABELA 23 – Sumário estatístico para o teste (Teste *t* de *Student* ($p \leq 0,05$)) com o solvente DMSO no ensaio de toxicidade crônica com *Perna perna* (Ensaio 2).

Tratamentos	**Desenvolvimento embriolarval normal médio (%)**	**Desvio padrão**	***p***
Controle de água	94,00	4,73	-
Controle DMSO (0,18 mg.L^{-1})	96,00	0,96	0,324

5.2.2.3. Toxicidade crônica (Embriolarval)

Os valores das concentrações de efeito não observado (CENO) e as concentrações de efeito observado (CEO) variaram de 0,03 mg.L-1 a 0,08 mg.L-1 e 0,06 mg.L-1 a 0,10 mg.L-1, respectivamente.

Os valores das concentrações de Triclosan que inibiram o desenvolvimento embriolarval do mexilhão (CI(I)50;48h) variaram de 0,101 $mg.L^{-1}$ (0,097 $mg.L^{-1}$ – 0,105 $mg.L^{-1}$) a 0,170 $mg.L^{-1}$ (0,167 $mg.L^{-1}$ – 0,174 $mg.L^{-1}$).

As TAB. 24 e 25 apresentam os percentuais de desenvolvimento embriolarval (médio e desvios-padrão (DP)) de todas as réplicas dos ensaios realizados (n=4).

TABELA 24 – Percentual de desenvolvimento embriolarval (médio e desvio-padrão) do primeiro ensaio de toxicidade crônica de Triclosan com *Perna perna*.

Concentrações ($mg.L^{-1}$)	**Ensaio 1**	
	Média	**DP**
Controle	78,25	5,44
Controle DMSO (0,32)	77,75	5,74
0,010	79,75	1,70
0, 018	80,00	1,40
0,030	75,25	2,10
0,060	73,50	1,30
0,100	60,00	2,20
0,190	0,00	-
0,320	0,00	-

TABELA 25 - Percentual de desenvolvimento embriolarval (médio e desvio-padrão) do segundo, terceiro e quarto ensaio de toxicidade crônica de Triclosan com *Perna perna*.

Concentrações (mg.L^{-1})	**Ensaio 2**		**Ensaio 3**		**Ensaio 4**	
	Média	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**
Controle	94,00	4,73	96,25	0,96	90,75	2,90
Controle DMSO (0,180)	96,00	0,96	-	-	-	-
0,050	84,50	3,50	86,25	2,50	82,25	1,30
0,065	84,75	10,30	88,00	2,70	78,50	3,70
0,080	79,75	9,50	85,25	3,30	60,50	4,70
0,100	64,50	8,30	83,00	2,20	46,50	4,00
0,140	45,75	5,00	73,00	5,50	11,00	14,70
0,180	0,25	0,50	40,25	3,50	0,25	0,50

Os resultados dos ensaios expressos em CENO(I), CEO(I) e CI(I)50;48h e as respectivas médias, desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) estão representados na TAB. 26.

TABELA 26 – Toxicidade crônica de Triclosan (CENO(I), CEO(I), CI(I)50;48h) para *Perna perna.*

Ensaio	CENO(I) mg.L^{-1}	CEO(I) mg. L^{-1}	CI50(I);48h mg.L^{-1}
1	0,030	0,060	0,131 (0,127 – 0,132)
2	0,065	0,080	0,137 (0,130 – 0, 142)
3	0,080	0,100	0,170 (0,167 – 0,174)
4	0,050	0,065	0,101 (0,097 – 0,105)
Média	0,056	0,076	0,135
DP	0,021	0,018	0,028
CV (%)	37,500	23,684	20,740

( ) – Intervalo de confiança

As FIG. de 36 a 39 apresentam o desenvolvimento embriolarval normal (%) e as concentrações testes dos ensaios para avaliação de efeito crônico com *P. perna*.

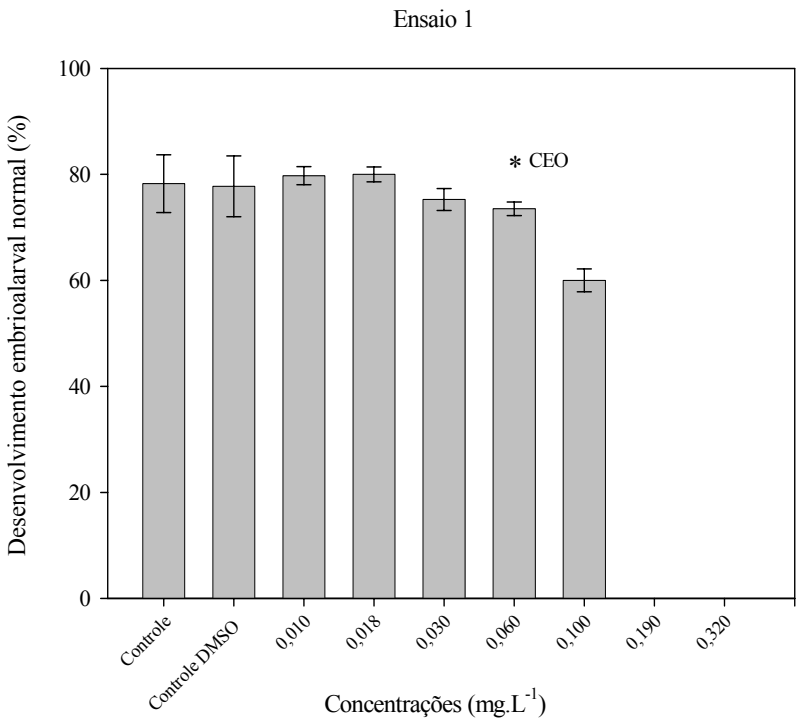


FIGURA 36 – Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *P.perna*.

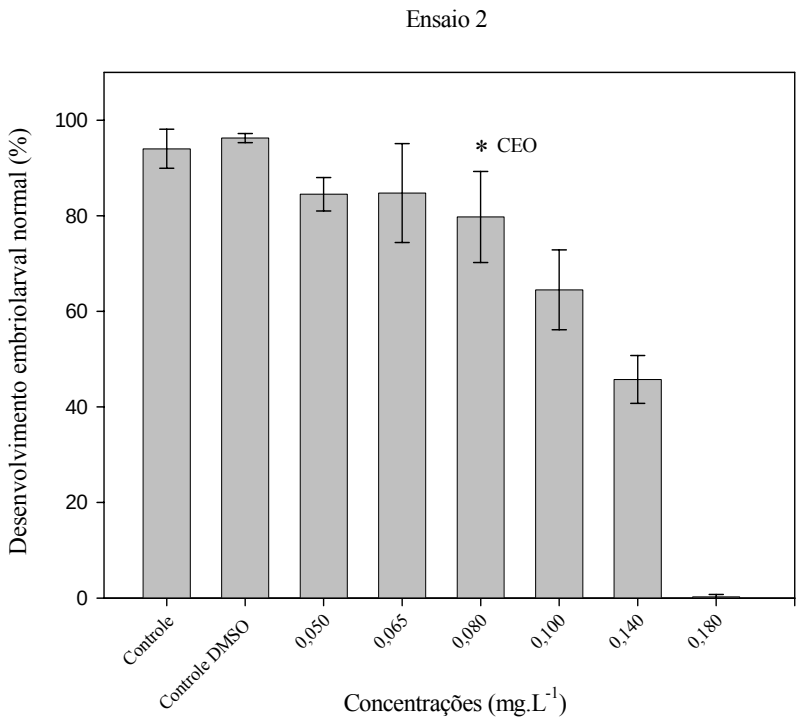


FIGURA 37 – Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *P.perna*.

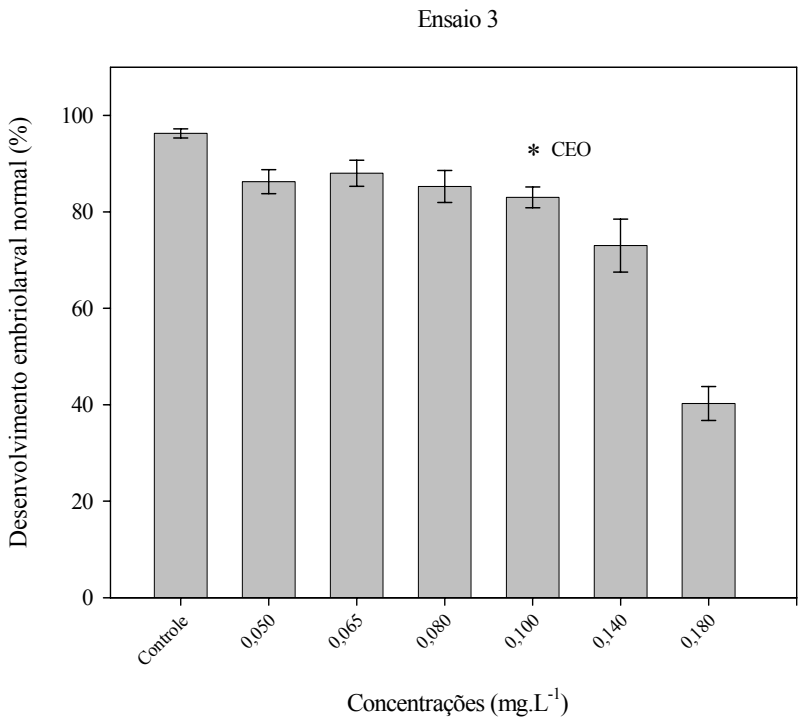


FIGURA 38 – Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *P.perna*.

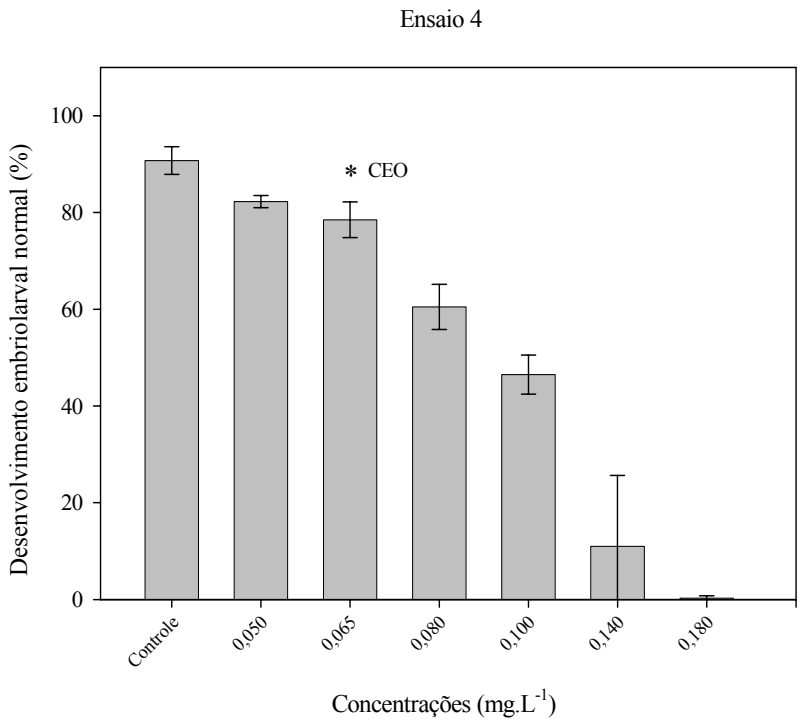


FIGURA 39 – Toxicidade crônica de Triclosan no desenvolvimento embriolarval de *P.perna*.

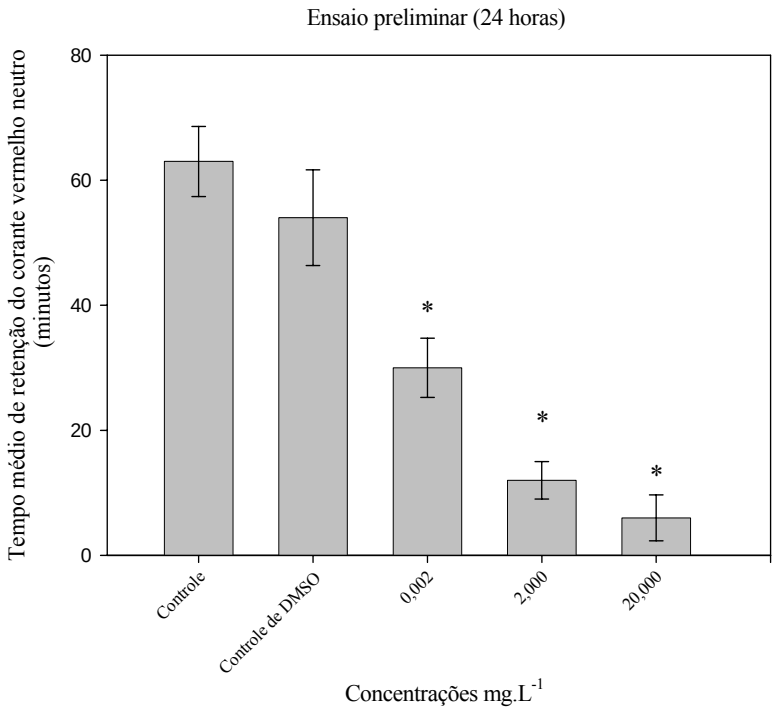
Informações adicionais sobre os resultados encontram-se no APÊNDICE H.

5.2.2.4. Análises físicas e químicas

Os resultados das análises físicas e químicas de pH, oxigênio dissolvido e salinidade estiveram dentro dos limites de tolerância para espécie, ou seja, salinidade entre 30 e 36 UPS e oxigênio dissolvido acima de 5 mg.L-1 (APÊNDICE I).

5.3. Ensaios de citotoxicidade com *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia)

O ensaio preliminar foi realizado com as concentrações de 0,002 $mg.L^{-1}$; 2,0 $mg.L^{-1}$ e 20,0 $mg.L^{-1}$ em 24 horas de exposição. Todas as concentrações apresentaram diferença estatística significativa com relação ao controle (FIG. 40).

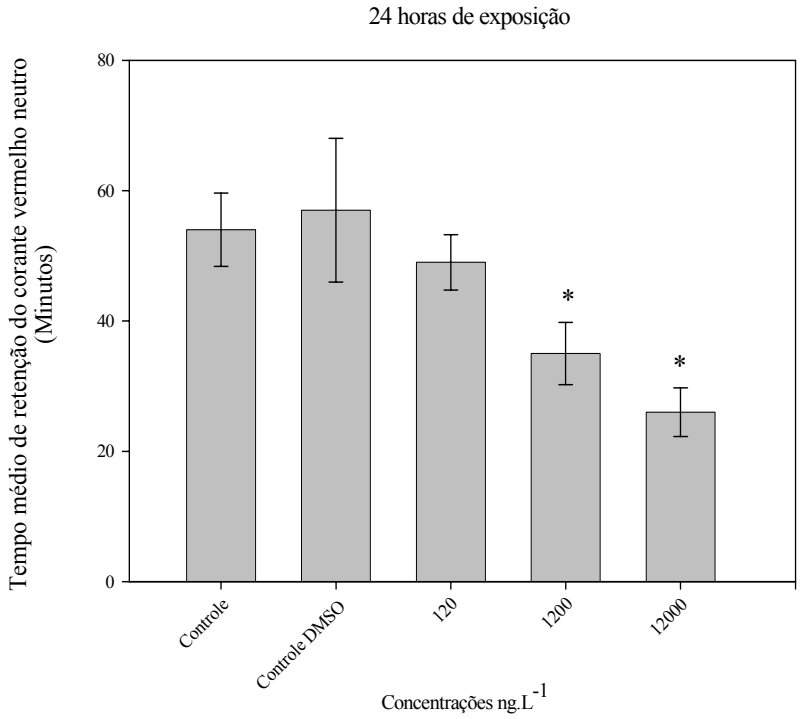


* - Diferença significativa em relação ao controle de água.

FIGURA 40. Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna*.

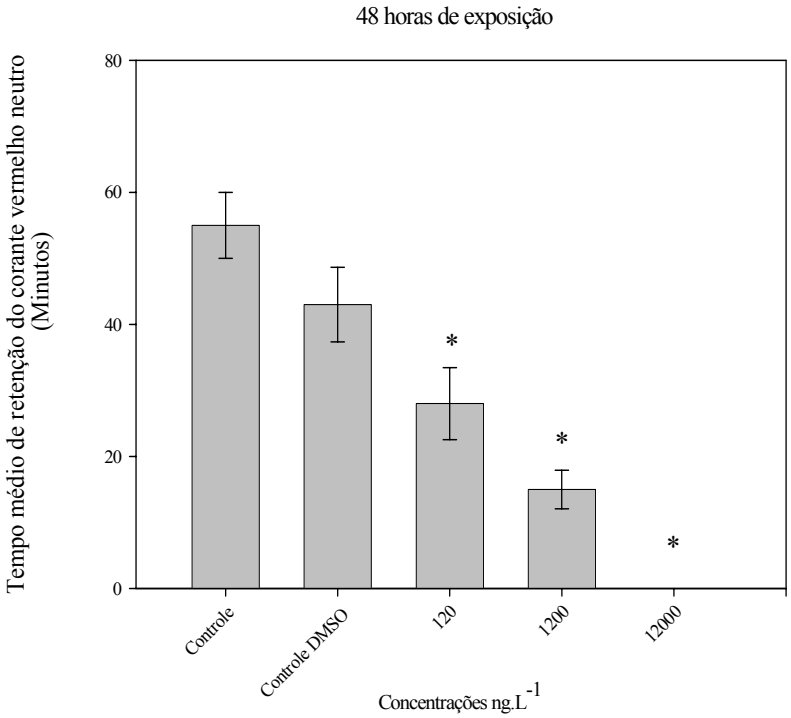
Os resultados do primeiro ensaio de citotoxicidade (Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro) definitivo estão demonstrados nas FIG. 41, 42 e 43. Nas primeiras 24 horas, o tempo de retenção do corante vermelho neutro nos lisossomos diminuiu significativamente nas concentrações de 1200 $ng.L^{-1}$ e 12000 $ng.L^{-1}$ quando comparado ao controle.

A partir de 48 horas, os organismos expostos a todas as concentrações (120 ng.L^{-1}, 1200 ng.L^{-1} e 12000 ng.L^{-1}) apresentaram significativa diminuição do tempo de retenção do corante em relação ao controle. O controle de DMSO não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle de água.



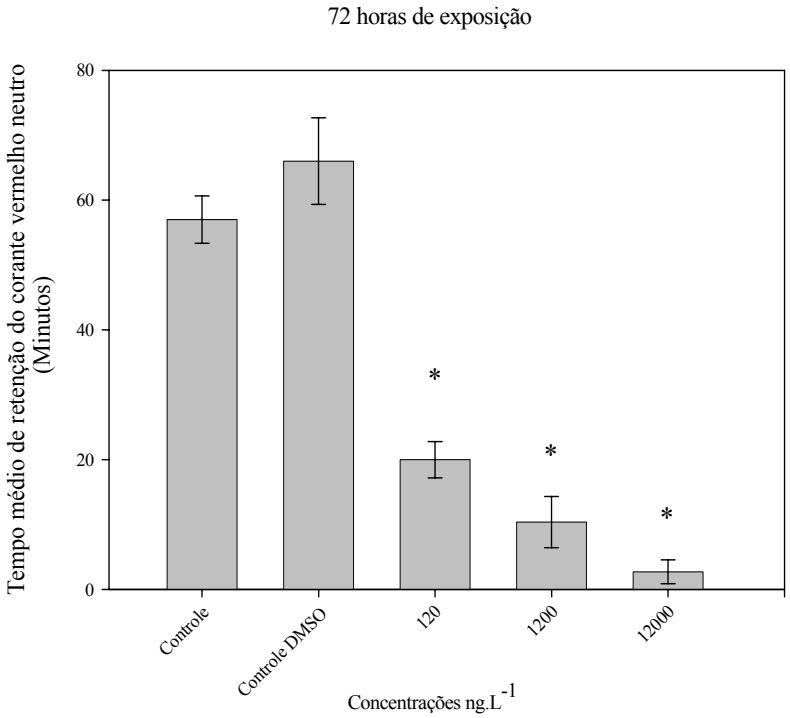
* - Diferença significativa em relação ao controle de água.

FIGURA 41 – Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (1° ensaio).



* - Diferença significativa em relação ao controle de água.

FIGURA 42 – Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (1° ensaio).

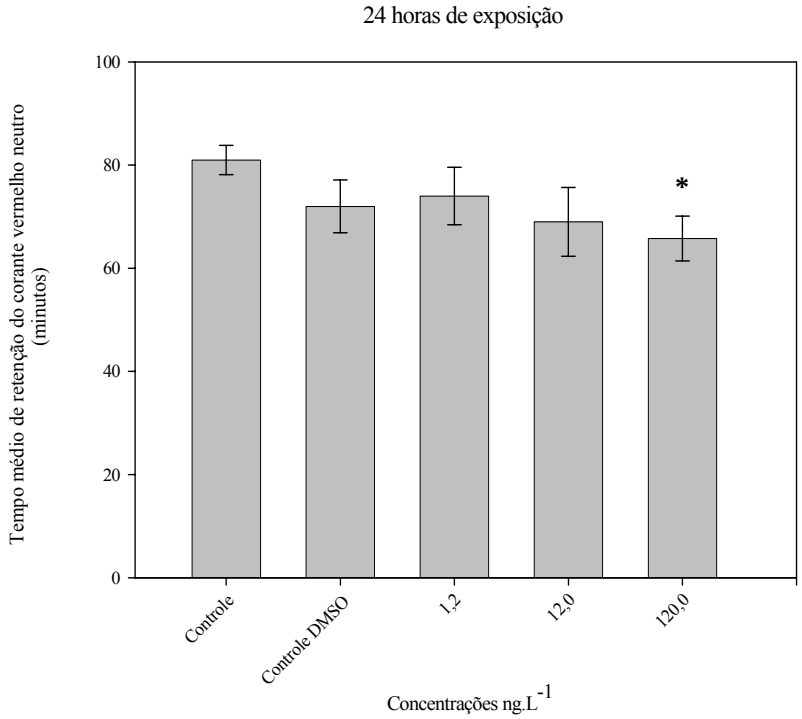


* - Diferença significativa em relação ao controle de água.

FIGURA 43 – Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (1° ensaio).

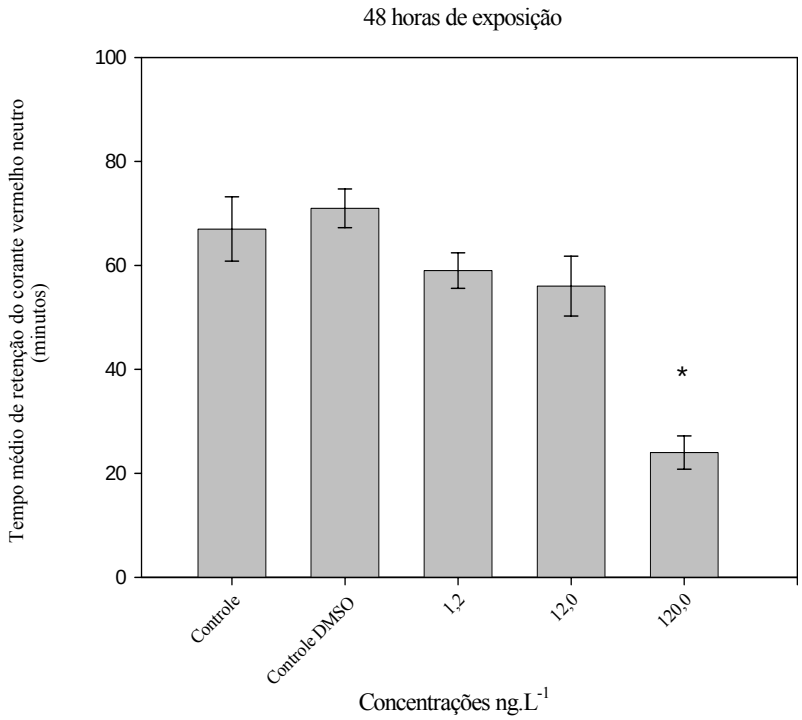
No segundo ensaio definitivo as concentrações-teste foram de 1,2 ng.L^{-1}; 12 ng.L^{-1} e 120 ng.L^{-1}. Nas primeiras 24 e 48 horas o tempo de retenção do corante vermelho neutro nos lisossomos diminuiu significativamente na concentração de 120 ng.L^{-1} quando comparado ao controle (FIG. 44 e 45).

A partir de 72 horas de exposição, o tempo de retenção do corante vermelho neutro nos lisossomos diminuiu significativamente nas concentrações de 12 ng.L^{-1} e 120 ng.L^{-1} e não apresentou diminuição significativa no tempo de retenção do corante vermelho neutro nos lisossomos na concentração de 1,2 ng.L^{-1} (FIG. 46).



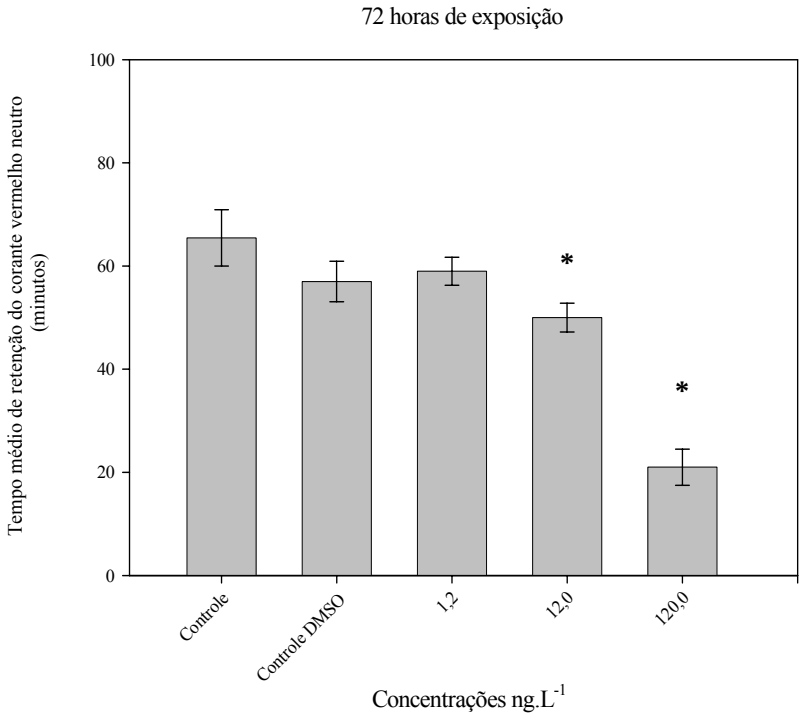
* - Diferença significativa em relação ao controle de água.

FIGURA 44 – Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (2° ensaio).



* - Diferença significativa em relação ao controle de água.

FIGURA 45 – Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (2° ensaio).



* - Diferença significativa em relação ao controle de água.

FIGURA 46 – Toxicidade de Triclosan em hemócitos do molusco bivalve *Perna perna* (2° ensaio) .

5.3.1. Análises Físicas e Químicas

Os resultados das análises físicas e químicas de pH, oxigênio dissolvido e salinidade estiveram dentro dos limites de tolerância para espécie, ou seja, salinidade entre 30 e 36 UPS e oxigênio dissolvido acima de 5 mg.L-1 (APÊNDICE J).

6. DISCUSSÃO

Considerando os diferentes métodos ecotoxicológicos empregados neste estudo, a discussão será delineada de acordo com os efeitos avaliados. Para tanto, inicialmente serão abordados os estudos de avaliação de efeito agudo (mortalidade e taxa de fecundação), posteriormente os estudos de avaliação de efeito crônico (desenvolvimento embriolarval), em seguida o estudo de efeitos citotóxicos (estabilidade da membrana lisossômica) e, por fim, serão discutidos os aspectos legais relacionados ao Triclosan.

6.1. Toxicidade aguda do Triclosan

O avanço na química analítica tem impulsionado a pesquisa com fármacos e produtos de higiene e cuidados pessoais, pois tem propiciado a detecção destes micropoluentes em matrizes ambientais em baixas concentrações, fato que até 15 anos atrás não era possível realizar, portanto, estes compostos não eram considerados uma ameaça.

Produtos de higiene e cuidados pessoais têm sido cada vez mais utilizados e, na maioria das formulações contém substâncias químicas tóxicas que acabam constituindo um risco potencial para os ecossistemas e para saúde pública. Muitas destas substâncias não são eliminadas por completo nas ETE e, conseqüentemente, são encontradas em efluentes e matrizes ambientais. Com isso, uma compreensão dos potenciais efeitos sobre organismos aquáticos se faz cada vez mais necessária.

De acordo com YANG *et al*. (2008), estudos de toxicidade com diferentes classes de agentes antibacterianos, bem como suas misturas, são urgentemente necessários para avaliar o seu potencial impacto sobre os ecossistemas aquáticos.

A importância da utilização de espécies marinhas costeiras para avaliação dos efeitos do Triclosan vem ao encontro de algumas questões que devem ser destacadas. Em primeiro lugar, as regiões costeiras recebem um grande aporte de contaminantes provenientes dos lançamentos de esgoto urbano e industrial. Embora o Triclosan tenha sua ocorrência comprovada em água superficial e sedimentos de ambientes marinhos e estuarinos, há na literatura uma carência de estudos dos efeitos deste composto com organismos destes ambientes. A TAB. 27 apresenta uma recopilação dos estudos que avaliaram a toxicidade aguda para diferentes organismos aquáticos na fração aquosa.

TABELA 27 – Toxicidade aguda de Triclosan com organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos.

Taxonomia	*End-point*	Tempo de exposição	Resultados	Referência
Bactéria				
Vibrio fischeri	**Inibição de bioluminescência (CE50)**	**30 minutos**	**280 µg.L^{-1}**	**Farré *et al.*, (2008)**
Vibrio fischeri	**Inibição de bioluminescência (CE50)**	**30 minutos**	**150 µg.L^{-1}**	**Tatarazako *et al.*, (2004)**
Algas				
Scenedesmus subspicatus	Crescimento (CE50)	72 horas	2,8 µg.L^{-1}	Orvos *et al.*, (2002)
Selenastrum capricornutum	Crescimento (CE50)	96 horas	4,46 µg.L^{-1}	Orvos *et al.*, (2002)
Tetraselmis chuii	**Crescimento (CE50)**	**96 horas**	**> 500 µg.L^{-1}**	**McHenry *et al.*, (2008)**
Nannochloropsis oculata	**Crescimento (CE50)**	**96 horas**	**360 µg.L^{-1}**	**McHenry *et al.*, (2008)**
Chaetocerus gracilis	**Crescimento (CE50)**	**96 horas**	**162 µg.L^{-1}**	**McHenry *et al.*, (2008)**
Isochrysis galbana	**Crescimento (CE50)**	**96 horas**	**122,6 µg.L^{-1}**	**McHenry *et al.*, (2008)**
Rhodomonas salina	**Crescimento (CE50)**	**96 horas**	**128 µg.L^{-1}**	**McHenry *et al.*, (2008)**
Dunaliella tertiolecta	**Densidade de células**	**96 horas**	**3,55 µg.L^{-1}**	**DeLorenzo *et al.*, (2008)**
Equinodermo				
Lytechinus variegatus	**Taxa de fertilização (CI50)**	**1 hora**	**282 µg.L^{-1}**	**PRESENTE ESTUDO**
Crustáceos				
Daphnia magna	Imobilidade (CE50)	48 horas	390 µg.L^{-1}	Orvos *et al.*, (2002)
Daphnia similis	Imobilidade (CE50)	48 horas	230 µg.L^{-1}	Lameira (2008)
Ceriodaphnia silvestrii	Imobilidade (CE50)	48 horas	100 µg.L^{-1}	Lameira (2008)
Nitokra sp	**Mortalidade (CL50)**	**96 horas**	**200 µg.L^{-1}**	**PRESENTE ESTUDO**
Peixes				
Pimephales promelas	Imobilidade (CE50)	48 horas	270 µg.L^{-1}	Orvos *et al.*, (2002)
Pimephales promelas	Imobilidade (CE50)	96 horas	260 µg.L^{-1}	Orvos *et al.*, (2002)
Lepomis macrochirus	Mortalidade (CL50)	48 horas	410 µg.L^{-1}	Orvos *et al.*, (2002)
Lepomis macrochirus	Mortalidade (CL50)	96 horas	370 µg.L^{-1}	Orvos *et al.*, (2002)

TABELA 27 – Toxicidade aguda de Triclosan com organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos.

Oryzias latipes	Velocidade da natação	6 e 8 dias	170 µg.L^{-1}	Nassef *et al*., (2010)
Danio rerio (embriões)	Mortalidade (CL50)	96 horas	420 µg.L^{-1}	Oliveira *et al*., (2009)
Oryzias latipes (estágio inicial de vida)	Mortalidade (CL50)	96 horas	602 µg.L^{-1}	Ishibashi *et al*., (2004)
Anfíbios				
Xenopus laevis (diferentes estágios larvais)	Mortalidade (CL50)	96 horas	259 – 664 µg.L^{-1}	Palenske *et al*., (2010)
Acris crepitans (estágios30)	Mortalidade (CL50)	96 horas	367 µg.L^{-1}	Palenske *et al*., (2010)
Bufo woodhousii (estágios30)	Mortalidade (CL50)	96 horas	152 µg.L^{-1}	Palenske *et al*., (2010)
Rana sphenocephala (estágios30)	Mortalidade (CL50)	96 horas	562 µg.L^{-1}	Palenske *et al*., (2010)

Em negrito espécies marinhas

De acordo com os estudos reportados na TAB. 27 nota-se que a maioria foi realizado com espécies aquáticas dulcícolas.

No presente estudo, a avaliação de efeito agudo do Triclosan foi baseada em duas respostas (*end-point*), mortalidade de *Nitokra sp* e taxa de fertilização de *Lytechinus variegatus*. Observa-se que o copépodo foi mais sensível ao composto quando comparado com os valores obtidos com *L. variegatus*, apesar de serem avaliadas duas respostas diferentes.

Uma outra via de exposição pode ter contribuído para a toxicidade de Triclosan para *Nitokra sp*, pois no ensaio com esta espécie foi adicionado como alimento uma solução de microalgas que podem bioacumular Triclosan em razão de sua lipofilicidade.

No estudo realizado por COOGAN *et al*., (2007) foi demonstrado a bioacumulação de Triclosan e seu metabólito, metil-Triclosan, na microalga *Cladophora sp*., com ordem de grandeza três vezes maior do que as concentrações ambientais detectadas neste mesmo estudo.

LAMEIRA (2008) e PUSCEDDU (2009) compararam os efeitos de Triclosan empregando ensaios com *Ceriodaphnia dubia* alimentadas somente com microalgas e ensaios que receberam como alimento além da solução de microalgas, um composto à base de ração de peixe. Em ambos os estudos, uma resposta mais sensível ao Triclosan ocorreu nos ensaios alimentados com microalgas e com o composto, fato que pode estar relacionado também à tendência deste bactericida ser adsorvido em partículas orgânicas em função do coeficiente de partição octanol-água (K_{ow} 4,8) ser relativamente alto (ZHAO *et al*., 2010).

Além disso, a biodegradação de Triclosan por bactérias existentes nas soluções de alimento utilizadas nos ensaios pode ter levado a formação de subprodutos como metil-Triclosan, uma forma mais tóxica e mais propensa à bioacumulação (LINDSTROM *et al*., 2002; BALMER et al., 2003).

A sensibilidade de *Nitokra sp* ao Triclosan pode estar associada também à fotodegradação do composto durante o experimento e sua conversão para dioxinas, compostos altamente tóxicos e bioacumulativos. Este processo foi demonstrado em diversos estudos (LATCH *et al*., 2003; LORES *et al*., 2005; SÁNCHEZ-PRADO *et al*., 2006; ARANAMI & READMAN, 2007). No estudo realizado por ARANAMI *et al*. (2007), a conversão de Triclosan para dioxinas ocorreu em água doce e em água do mar com 3 dias de irradiação sob luz branca (lâmpada fluorescente). Já no estudo realizado por SANCHES-PRADO *et al.* (2006), a conversão de Triclosan para dioxinas ocorreu em cinco minutos de exposição à luz ultravioleta (UV).

No ensaio de fertilização com *L. variegatus* realizado no presente estudo, foi avaliado o efeito de Triclosan na taxa de fertilização, obtendo-se o valor de CI50 de 282 $\mu g.L^{-1}$.

O único dado disponível na literatura sobre taxa de fertilização dos ovos refere-se ao estudo realizado por ISHIBASHI et al. (2004) com adultos maduros de *Oryzias latipes*, espécie de agua doce, expostos ao Triclosan nas concentrações de 20 µg.L-1, 100 µg.L-1 e 200 $\mu g.L^{-1}$, onde não foi observado nenhum efeito. É importante notar a proximidade da maior concentração de efeito para *L. variegatus* com a maior concentração testada para *O. latipes.* Neste caso, o emprego de invertebrados para avaliação da taxa de fertilização com a exposição direta dos gametas, além de proporcionar uma resposta mais rápida, se mostra mais adequado quanto à sensibilidade, para detecção de efeitos baseado nesta resposta.

Comparando os resultados com todos os estudos reportados na TAB. 27, observa-se também que o copépodo *Nitokra sp* apresentou valores de CL50 menores que algumas

espécies de microalgas e também do que outros ensaios que empregaram fases mais sensíveis de desenvolvimento (fases larvais).

No que se refere ao grupo dos crustáceos apenas *Ceriodaphnia silvestrii* (organismo de água doce) apresentou maior sensibilidade ao composto com relação ao copépodo.

Ainda com relação aos estudos para avaliação de efeito agudo do Triclosan (TAB. 27), nota-se que dentre os organismos utilizados as microalgas foram as mais sensíveis. As concentrações de efeito encontradas (CE50 - crescimento) são próximas das concentrações de ocorrência de Triclosan em água superficial (TAB. 29). No entanto, nota-se que há uma grande variação nos resultados destes ensaios entre as diferentes espécies, o que pode acarretar em implicações significativas para a avaliação de risco ambiental (FRANZ *et al*., 2008).

Dados laboratoriais, gerados sobre a toxicidade aguda de compostos farmacêuticos, durante o desenvolvimento de produtos, geram informações úteis, juntamente com outras análises, para um melhor conhecimento e gerenciamento dos riscos ambientais.

De acordo com os resultados de efeito agudo apresentados, é improvável que estes ocorram no ambiente aquático na medida em que as concentrações ambientais de Triclosan em água superficial ocorrem de três ($ng.L^{-1}$) a seis ($pg.L^{-1}$) ordens de grandeza menor que as concentrações de efeito ($\mu g.L^{-1}$).

Por outro lado, efeitos sinérgicos de misturas no ambiente possam potencializar a toxicidade do composto. Além disso, efeitos agudos podem ocorrer com a exposição dos organismos a concentrações mais elevadas do composto em caso de vazamento em plantas de produção ou acidentes com o transporte e, de forma indireta, já que o composto tem a capacidade de bioacumular e ser transferido pelos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar.

6.2. Toxicidade crônica do Triclosan

As baixas concentrações dos fármacos aliadas à sua capacidade de persistência no ambiente aumentam a possibilidade de ocorrência de efeitos crônicos uma vez que muitas espécies aquáticas são continuamente expostas a estes poluentes durante longos períodos de tempo ou durante todo o ciclo de vida (JONES *et al*., 2007). Vale ressaltar que estes efeitos podem não tornar-se aparentes por muito tempo, por isso, a importância da avaliação de efeito crônico.

No presente estudo, a avaliação de efeito crônico de Triclosan foi baseada na inibição do desenvolvimento embriolarval com do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e do molusco bivalve *Perna perna.* Estes organismos têm sido utilizados em ensaios de toxicidade crônica com base na verificação de que o desenvolvimento embriolarval é uma fase crítica para o crescimento normal do indivíduo e este fato está relacionado ao sucesso reprodutivo das espécies.

A concentração de Triclosan que inibiu o desenvolvimento embriolarval de *Lytechinus variegatus* (CI(I)50;24h - 0,143 $mg.L^{-1}$) foi bem próxima da concentração de efeito para o mexilhão *Perna perna* (CI(I)50;48h – 0,135 $mg.L^{-1}$). Deve-se destacar que os valores das concentrações de efeito observado (CEO) também foram próximos para estes organismos (0,10 $mg.L^{-1}$ para *L.variegatus* e 0,076 $mg.L^{-1}$ para *P. perna*) e indicam o início de efeitos biológicos.

Concentrações ambientais de Triclosan em água superficial estão abaixo das concentrações de efeito crônico para ambas as espécies, bem como dos valores de CENO (Concentração de Efeito Não Observado) para *Lytechinus variegatus* (0,08 $mg.L^{-1}$) e para *Perna perna* (0,056 $mg.L^{-1}$).

Em determinados locais, com alto adensamento populacional fixo ou flutuante, as concentrações ambientais de Triclosan na matriz sedimento podem atingir níveis com possibilidades de causar efeitos crônicos. No estudo realizado por AGUERA *et al*. (2003), foi detectado Triclosan em sedimentos marinhos com concentrações acima de 130,7 $\mu g.kg^{-1}$. Já no estudo realizado por ZHAO *et al*. (2010), as concentrações de Triclosan encontradas em sedimentos variaram em um range de 12,2 $ng.g^{-1}$ a 1329 $ng.g^{-1}$. Neste mesmo trabalho, foi realizado uma avaliação de risco ambiental e o maior quociente de risco (QR) estabelecido foi baseado nas concentrações de Triclosan em sedimentos.

No estudo de HALDEN & PAULL (2005), a meia vida do Triclosan em sedimentos estuarinos foi estimada em 540 dias, embora informações sobre o seu destino em longo prazo sejam limitadas. Cabe destacar que este compartimento ambiental pode ser considerado como uma fonte secundária de Triclosan e outros poluentes, pela possibilidade de processos naturais ou antropogênicos redisponibilizarem os compostos químicos para coluna d`água.

A TAB. 28 apresenta uma recopilação dos estudos que avaliaram a toxicidade crônica do Triclosan para diferentes organismos aquáticos na fração aquosa e em sedimento marcado. Nota-se que a maioria dos estudos para avaliação do efeito crônico também foram realizados com organismos de água doce, como já observado para os efeitos

agudos. É importante destacar que dados ecotoxicológicos de Triclosan referentes a espécies de vertebrados (peixes) e invertebrados (desenvolvimento embriolarval de equinodermos, moluscos) marinhos, não existem na literatura.

TABELA 28 – Toxicidade crônica de Triclosan com organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos.

Taxonomia	*End-point*	Tempo de exposição	Resultados	Referência
Algas				
Scenedesmus subspicatus	Biomassa (CENO)	96 horas	0,6 $\mu g.L^{-1}$	Orvos *et al*., (2002)
Pseudokirchneriella subcapitata	Inibição do crescimento (CI50 / CENO)	72 horas	0,53 / 0,20 $\mu g.L^{-1}$	Yang *et al*., (2008)
Equinodermo				
Lytechinus variegatus	**Desenvolvimento embriolarval (CI50 / CENO)**	**24 horas**	**143 / 80 $\mu g.L^{-1}$**	**PRESENTE ESTUDO**
Molusco				
***Perna perna* (marinho)**	**Desenvolvimento embriolarval (CI50 / CENO)**	**48 horas**	**135 / 56 $\mu g.L^{-1}$**	**PRESENTE ESTUDO**
Crustáceos				
Daphnia magna	Reprodução (CENO)	21 dias	200 $\mu g.L^{-1}$	Orvos *et al*., (2002)
Daphnia similis	Reprodução (CENO)	14 dias	50 $\mu g.L^{-1}$	Lameira (2008)
Ceriodaphnia silvestrii	Reprodução (CENO)	7 dias	100 $\mu g.L^{-1}$	Lameira (2008)
Ceriodaphnia dubia	Reprodução (CENO)	7 dias	6 $\mu g.L^{-1}$	Orvos *et al*., (2002)
Ceriodaphnia dubia	Reprodução (CENO)	7 dias	40 $\mu g.L^{-1}$	Pusceddu (2009)
Ceriodaphnia dubia (sedimento)	Reprodução (CENO)	7 dias	5780 $\mu g.L^{-1}$	Pusceddu (2009)
Peixes				
Oncorhynchus mykiss	Eclosão de ovos (CENO)	61 dias	34,1 $\mu g.L^{-1}$	Orvos *et al*., (2002)
Danio rerio	Eclosão de ovos (CENO)	48 horas	500 $\mu g.L^{-1}$	Oliveira et al., (2009)

Em negrito espécies marinhas.

De acordo com os estudos apresentados na TAB. 28, nos ensaios para avaliação de efeito crônico, as microalgas de água doce foram o grupo mais sensível com concentrações de efeito na mesma ordem de grandeza das concentrações ambientais de Triclosan em água superficial (TAB. 29).

Ensaios empregando organismos em estágios iniciais de vida são considerados essenciais para detecção de efeitos nocivos. No estudo realizado por ISHIBASHI *et al*. (2004), a eclosão de ovos fertilizados expostos ao Triclosan por 14 dias diminuiu significativamente em relação ao controle com concentrações acima de 313 $\mu g.L^{-1}$. Neste mesmo estudo, as concentrações de Triclosan que causaram a mortalidade em larvas e embriões (menos de 24 horas de vida) do peixe *Oryzias latipes* em 96 horas de exposição foram de 602 $\mu g.L^{-1}$ e 399 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente.

Já no estudo realizado por OLIVEIRA *et al*. (2009), a concentração de efeito do Triclosan para larvas e embriões de peixe da espécie *Danio rerio* expostos pelo período de 96 horas foi de 420 $\mu g.L^{-1}$. No entanto, o autor relata que o ensaio com a utilização do embrião possibilitou a detecção de efeitos na formação do otólito, dos olhos, bem como na coluna.

Os resultados de ensaios de toxicidade com espécies e níveis tróficos distintos podem ser utilizados aliados aos dados de concentrações ambientais de um determinado composto para avaliação de risco ambiental. Nesse sentido, CAPDEVIELLE *et al*. (2007), realizaram uma avaliação de risco do Triclosan para ambientes de água doce com o emprego de modelos probabilísticos utilizados na Europa (GREAT-ER) e nos Estados Unidos (P*h*ATE ™) para estimar a concentração ambiental do composto (PEC - (*Predict Environmental Concentration*). Neste mesmo estudo, os autores estimaram uma concentração segura de 1550 $ng.L^{-1}$ (PNEC - *Predict No Effects Concentration*) baseada em dados de toxicidade de 14 diferentes espécies aquáticas. A razão entre as concentrações ambientais e os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade com organismos mais sensíveis ao composto, gerou subsídios para que os autores concluíssem que Triclosan não oferece risco a espécies pelágicas, nem mesmo à jusante de lançamentos de ETE`s das regiões contempladas no estudo.

No entanto, os dados gerados em estudos de toxicidade baseados em respostas tais como mortalidade, reprodução, desenvolvimento e crescimento, muitas vezes não detectam os mecanismos de ação de substâncias bioativas como os fármacos e este fato pode mascarar uma avaliação do risco potencial para biota aquática.

6.3. Citotoxicidade do Triclosan

Na literatura, também são poucos os estudos sobre os efeitos subletais deste composto, baseado em seu mecanismo de ação, com invertebrados aquáticos. Destaca-se

que estes representam mais de 90% das espécies existentes e desempenham papel importante nos ecossistemas (BINELLI *et al*., 2009).

Esta abordagem permite a identificação dos primeiros sinais de efeito biológico e possibilita prever e mitigar as conseqüências adversas em níveis de organização biológica superiores.

Quanto ao mecanismo de ação de Triclosan, o estudo realizado por HEATH *et al*. (2001) demonstrou a capacidade do composto de inibir a síntese de ácidos graxos, além de poder interagir com os fosfolipídios da membrana e prejudicar a função mitocondrial (CANESI *et al*., 2007) de forma a desestabilizar membranas lisossômicas.

O método do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro empregado neste estudo com hemócitos do mexilhão *Perna perna*, possibilitou avaliar os efeitos do Triclosan baseado no seu mecanismo de ação em um organismo não alvo.

No presente estudo, os resultados dos ensaios de citotoxicidade com hemócitos do mexilhão *Perna perna* demonstraram a ocorrência de efeitos adversos significativos em concentrações de Triclosan na ordem de grandeza de $ng.L^{-1}$ (12 $ng.L^{-1}$ – 72 horas de exposição e 120 $ng.L^{-1}$ – 48 horas de exposição). A menor concentração testada foi de 1,2 $ng.L^{-1}$ e em 72 horas de exposição não apresentou diminuição significativa no tempo de retenção do corante. O estabelecimento de concentrações que não causam efeitos biológicos adversos é extremamente importante, pois podem contribuir com futuras regulamentações que contemplem concentrações de Triclosan ambientalmente seguras.

Com relação ao tempo de retenção do corante vermelho neutro no controle de água dos experimentos, a média obtida (62 minutos) foi próxima do tempo de retenção encontrado nos estudos de ABESSA *et al*.(2005) e PEREIRA (2008) com mexilhões *Perna perna* de áreas consideradas referência ambiental.

As concentrações de efeito na estabilidade e integridade da membrana lisossômica encontradas para o mexilhão *Perna perna* corroboram com o estudo realizado por BINELLI et al. (2009), o qual detectou efeitos adversos do Triclosan no molusco bivalve *Dreissena polymorpha* em concentrações com a mesma ordem de grandeza (289,5 $ng.L^{-1}$ em 48 horas de exposição) da utilizada neste estudo, a partir de 48 horas de exposição.

É importante inferir que estas concentrações de efeito enquadram-se dentro de um limite de concentrações encontradas no ambiente aquático, portanto estas podem ser consideradas ambientalmente relevantes, conforme apresentado na TAB. 29.

TABELA 29 – Concentrações de Triclosan em efluentes de ETE, em água superficial e sedimentos.

Matriz ambiental / Localidade	Concentrações	Referência
Efluente tratado / EUA	3,4 a 8,0 $\mu g.L^{-1}$	McAvoy *et al.,* (2002)
Efluente não tratado / Espanha	1,3 a 37,8 $\mu g.L^{-1}$	Aguera *et al.*,(2003)
Efluente tratado / Espanha	0,4 a 22,1 $\mu g.L^{-1}$	Aguera *et al.*,(2003)
Efluente não tratado / EUA	800 $ng.L^{-1}$	Yu *et al*., (2006)
Efluente tratado / EUA	250 $ng.L^{-1}$	Yu *et al*., (2006)
Efluente tratado / EUA	50 a 200 $ng.L^{-1}$	Coogan *et al*., (2007)
Efluente tratado / Espanha	0,08 a 0,40 $\mu g.L^{-1}$	Gómez *et al*., (2007)
Efluente não tratado / Espanha	0,39 a 4,2 $\mu g.L^{-1}$	Gómez *et al*., (2007)
Efluente e água superficial / Espanha	45 $ng.L^{-1}$	Kuster *et al*., (2008)
Água superficial / Austrália	21 a 75 $ng.L^{-1}$	Ying *et al*., (2007)
Água superficial / Alemanha	12 a 6870 $pg.L^{-1}$	Xie *et al*., (2008)
Água superficial / Japão	11 a 134 $ng.L^{-1}$	Nishi *et al*., (2008)
Água superficial / China	6,5 a 478 $ng.L^{-1}$	Zhao *et al*., (2010)
Água subterrânea / Europa	7 a 9 $ng.L^{-1}$	Loos *et al*., (2010)
Sedimento marinho / Espanha	> 130 $\mu g.kg^{-1}$	Aguera *et al.*,(2003)
Sedimento / Brasil – Santos -SP	9,3 a 31,7 $ng.g^{-1}$	Lamardo (2009) [1]
Sedimento / China	12,2 a 1329 $ng.L^{-1}$	Zhao *et al*., (2010)

Os dados dos estudos apresentados na TAB. 29 sugerem que a exposição do mexilhão *Perna perna* a concentrações ambientais do Triclosan pode ocorrer em situações ambientalmente realistas de forma a apontar um possível risco para toda comunidade aquática. Como conseqüência da desestabilização da membrana lisossômica em bivalves, pode-se inferir a deficiência na imunidade do organismo, redução do crescimento, do potencial reprodutivo e degeneração dos tecidos por processos autofágicos.

[1] Dra. Eliete Zanardi Lamardo, Universidade Federal de Pernambuco (Comunicação Pessoal, 2009).

As perturbações nas membranas lisossomais têm sido amplamente utilizadas como indicadores precoces de efeitos adversos a vários fatores, dentre eles a exposição a substâncias químicas como os fármacos. A integridade e a estabilidade desta membrana são consideradas um indicador de "bem estar" celular e um importante biomarcador inespecífico de estresse celular (MOORE *et al*., 2007).

A maior sensibilidade para detecção de feitos biológicos do bactericida Triclosan demonstrada pelo ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro, comparado com os outros métodos utilizados neste estudo, pode contribuir para realização de avaliações de riscos ambientais mais precisas já que estes estudos baseiam-se em concentrações que causam efeitos em ordens de grandeza de $mg.L^{-1}$ e $\mu g.L^{-1}$. Este fato pode levar a uma avaliação de risco que não contempla uma real proteção à vida aquática.

6.4. Triclosan - Regulamentação e Perspectivas

Triclosan tem sido comercializado por mais de 30 anos, e seu uso tem aumentado ao longo do tempo. Em um levantamento realizado pela Agência Ambiental Européia, foi estimado que cerca de 350 toneladas deste produto químico são utilizadas anualmente na União Européia (ENVIRONMENT AGENCY, 2004).

Nos Estados Unidos, a USEPA (*Environmental Protection Agency*) e a USFDA (*Food and Drug Administration*) compartilham a responsabilidade de regular produtos antimicrobianos. Em geral, a USEPA regula todos os usos do Triclosan como conservante, fungicida, ou biocida, como por exemplo, o Microban® utilizado em plásticos. A FDA regula a utilização do Triclosan em produtos de higiene e cuidados pessoais, como por exemplo, sabonetes, desodorantes, cremes e medicamentos para acne (GLASER, 2004).

Em setembro de 2008 foi publicado pela USEPA (*Environmental Protection Agency*) um documento relacionado à aprovação da continuidade do uso do bactericida Triclosan. O resultado, baseado em avaliações de risco ambiental e em diversos outros estudos, foi a aprovação da continuidade do uso deste composto (USEPA, 2008).

No entanto, o rápido desenvolvimento de um banco de dados científicos relacionados aos riscos ambientais e para saúde humana do Triclosan fez com que a USEPA acelerasse o cronograma para o processo de revisão de registro deste produto químico para o ano de 2013. Os resultados de estudos recentes publicados darão suporte para tomada de decisão sobre esta questão.

Embora o Triclosan ainda seja utilizado, diversos países estão estabelecendo restrições de uso para este bactericida baseado no peso dos estudos científicos que demonstram os riscos inerentes a este composto.

No Canadá, por exemplo, foi divulgada uma lista que proíbe e restringe o uso de alguns ingredientes ativos utilizados em cosméticos, dentre eles o Triclosan. As restrições impostas são: a) Concentrações iguais ou inferiores a 0,03% em produtos para bochechos; b) Concentrações iguais ou inferiores a 0,3% em outros produtos cosméticos; c) os rótulos dos produtos de uso oral devem conter declarações que proíbam o uso por crianças com idade inferior a 12 anos além de um aviso para evitar engolir; d) os fabricantes devem garantir que dibenzo-p-dioxina (PCDD) e dibenzofuranos policlorados (PCDF) não devem estar presentes em quantidades que excedam: (1) 0,1 $ng.g^{-1}$ de 2,3,7,8-tetra-clorodibenzo-p-dioxina e 2,3,7,8-tetra-clorodibenzofurano (COSMETIC INGREDIENT HOTLIST, 2010).

Ainda 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, 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 1 tonelada ou mais por ano) e importam substâncias químicas a avaliar os riscos decorrentes da utilização das mesmas e a tomar as medidas necessárias para gerir todos os riscos que identificarem.

No âmbito desta política que está em vigor desde 2006, a diretiva 93/67/EEC classifica as substâncias de acordo com os resultados pontuais de toxicidade (valores de CE50, CI50), ou seja, substâncias com valores de CE50 < 0,1 $mg.L^{-1}$ são classificadas como “extremamente tóxicas”; entre 0,1 e 1 $mg.L^{-1}$ são classificadas como “muito tóxicas”; com valores entre 1 e 10 $mg.L^{-1}$ são classificadas como “tóxicas”; valores entre 10 e 100 $mg.L^{-1}$ são classificadas como “perigosas” e acima de 100 $mg.L^{-1}$ “não tóxica” (CEC, 1996).

Nesse sentido, a fim de contribuir com informações sobre a toxicidade do Triclosan para invertebrados marinhos de águas tropicais, o composto foi classificado quanto à toxicidade de acordo com a diretiva 93/67/EEC da União Européia com os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade realizados neste estudo e, se enquadrou como uma substância “Muito Tóxica”. Por outro lado, baseando-se nos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, o Triclosan pode ser classificado na referida diretiva como uma substância “Extremamente tóxica”, conforme apresentado na TAB. 30.

TABELA 30 – Classificação do Triclosan baseada na diretiva 93/67/EEC da União Européia e nos resultados do presente estudo.

Não tóxico	**Nocivo**	**Tóxico**	**Muito tóxico**	**Extremamente tóxico**
CE50 > 100 $mg.L^{-1}$	CE50 entre 10 e 100 $mg.L^{-1}$	CE50 entre 1,0 e 10 $mg.L^{-1}$	CE50 entre 0,1 e 1,0 $mg.L^{-1}$	CE50 < 0,1 $mg.L^{-1}$

Estes resultados também demonstram que estudos ecotoxicológicos orientados pelo modo de ação dos fármacos proporcionam informações relevantes para avaliação de efeitos adversos, uma vez que contemplam os órgãos alvos e os efeitos biológicos precoces ("early warning"), o que possibilita uma melhor avaliação da toxicidade em concentrações ambientalmente relevantes. Além disso, a determinação das concentrações que causam efeitos precoces em um organismo não alvo pode embasar avaliações de risco ambiental e tomadas de decisões mais protectivas, a partir da previsão de efeitos em níveis superiores de organização biológica (população, comunidade).

Ainda considerando o princípio da prevenção, futuras regulamentações e limites de concentrações ambientais do Triclosan devem ser embasados de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade.

7. CONCLUSÕES

✓ Triclosan causou efeito agudo (mortalidade) no copépodo *Nitokra sp* na concentração média de 0,20 $mg.L^{-1}$.

✓ Triclosan causou efeito agudo na fertilização de gametas de *Lytechinus variegatus* na concentração média de 0,282 $mg.L^{-1}$.

✓ Triclosan causou inibição do desenvolvimento embriolarval de *Lytechinus variegatus* na concentração média de 0,143 $mg.L^{-1}$.

✓ Triclosan causou inibição do desenvolvimento embriolarval de *Perna perna* na concentração média de 0,135 $mg.L^{-1}$.

✓ As concentrações de efeito determinadas nos ensaios para avaliação de efeito crônico são próximas de concentrações encontradas em sedimento marinho.

✓ Triclosan causou a desestabilização da membrana lisossômica de hemócitos de *Perna perna* nas concentrações de 12 $ng.L^{-1}$ em 72 horas de exposição e de 120 $ng.L^{-1}$ em 48 horas de exposição, respectivamente. Não foi observado efeitos adversos significativos na concentração de 1,2 $ng.L^{-1}$ em 72 horas de exposição.

✓ O ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro com hemócitos de *Perna perna* possibilitou a identificação de efeitos adversos e em concentrações ambientalmente relevantes (na ordem de $ng.L^{-1}$.) baseado no mecanismo de ação do composto.

✓ Triclosan pode ser enquadrado de acordo com o que rege a diretiva 93/67/EEC da União Européia como uma substância “Muito Tóxica”, com base nos resultados dos ensaios de ecotoxicidade (mortalidade, taxa de fertilização e desenvolvimento embriolarval). Considerando o resultado do ensaio de citotoxicidade, o Triclosan pode ser enquadrado nesta mesma diretiva como uma substância “Extremamente Tóxica”.

8. RECOMENDAÇÕES

De forma a minimizar os riscos ambientais dos fármacos no ambiente aquático são listadas algumas recomendações e sugestões de estudos.

- A implantação de coleta e tratamento de esgoto com processos avançados de depuração e retenção de todas as classes de poluentes incluso os emergentes;
- Priorizar o monitoramento ambiental das classes de fármacos mais comumente utilizados;
- Ensaios de toxicidade, com ênfase em avaliação de efeito crônico, com organismos de diferentes níveis tróficos para se conhecer as concentrações seguras que não causam efeitos adversos além de estudos de bioacumulação;
- Ensaios com diferentes níveis de organização biológica como biomarcadores para a identificação de possíveis efeitos em baixas concentrações;
- Estudos embasados nos mecanismos de ação de compostos bioativos (fármacos);
- Estudos dos efeitos de misturas de fármacos para identificar possíveis efeitos sinérgicos;
- Elaboração de uma regulamentação que, baseada em dados de concentrações ambientais e de toxicidade, contemple valores orientadores para os compostos emergentes no ambiente aquático inclusive em sedimentos;
- Maior divulgação dos problemas relacionados ao descarte inadequado de medicamentos e estabelecimento de políticas efetivas para conscientização da população e gerenciamento dos descartes de resíduos farmacêuticos;
- O ensaio do Tempo de Retenção do Corante Vermelho Neutro, com hemócitos de *Perna perna*, mostra a importância de se realizar estudos sobre a toxicidade do Triclosan e de outros fármacos, embasados no mecanismo de ação dos compostos a serem avaliados, nas concentrações encontradas no ambiente aquático e, em diferentes níveis de organização biológica, para detecção dos possíveis efeitos causados por concentrações mais próximas das detectadas no ambiente natural.

APÊNDICE A – Cartas-controle de sensibilidade para ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA - UNISANTA
INSTITUTO SUPERIOR DE EDUCAÇÃO SANTA CECÍLIA - ISESC
Departamento de Ecotoxicologia

CARTA CONTROLE DE SENSIBILIDADE DE ORGANISMOS -TESTE

Organismo – teste: *Lytechinus variegatus*
Método empregado: ABNT NBR 15350
Substância de referência: Sulfato de Zinco

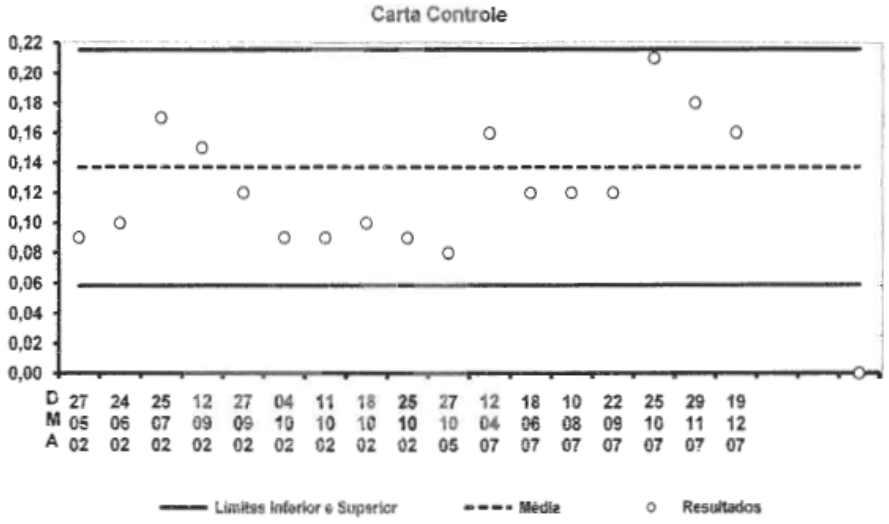
Data de atualização: 10/12/2007

Dados dos testes de sensibilidade utilizados no cálculo da carta controle

	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5	Teste 6	Teste 7	Teste 8	Teste 9	Teste 10
DATA	30/8/1995	21/11/1995	7/2/1996	4/9/1996	7/5/1998	21/5/1998	26/8/1998	5/10/1999	6/12/1999	17/4/2000
Resultado	0,08	0,11	0,08	0,21	0,16	0,15	0,13	0,15	0,14	0,07
	Teste 11	Teste 12	Teste 13	Teste 14	Teste 15	Teste 16	Teste 17	Teste 18	Teste 19	Teste 20
DATA	19/5/2000	11/11/2000	10/5/2002	4/7/2001	5/10/2001	8/11/2001	14/12/2001	6/3/2002	21/3/2002	18/4/2002
Resultado	0,13	0,12	0,14	0,16	0,21	0,18	0,13	0,09	0,13	0,17

Dados estatísticos obtidos na carta controle

MÉDIA mg/L	DESVIO PADRÃO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
0,14	**0,04**	**0,06**	**0,22**	**29**



ANÁLISE CRÍTICA:

Esta carta controle foi elaboradda com os resultados dos testes de sensibilidade com Sulfatode Zinco obtidos entre maio de 2002 a outubro de 2005. A partir de abril de 2007, os testes de sensibilidade passam a ser trimestrais, acompanhando a coleta de cada novo lote de organismo.

Eng. Aldo Ramos Santos
Coordenador do DET / ISESC

Fernando Sanzi Cortez
Biólogo Responsável

CÓDIGO: PL027DET-REV01

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA - UNISANTA
INSTITUTO SUPERIOR DE EDUCAÇÃO SANTA CECÍLIA - ISESC
Departamento de Ecotoxicologia

CARTA CONTROLE DE SENSIBILIDADE DE ORGANISMOS -TESTE

Organismo – teste: *Lytechinus variegatus*
Método empregado: ABNT NBR 15350
Substância de referência: Sulfato de Zinco

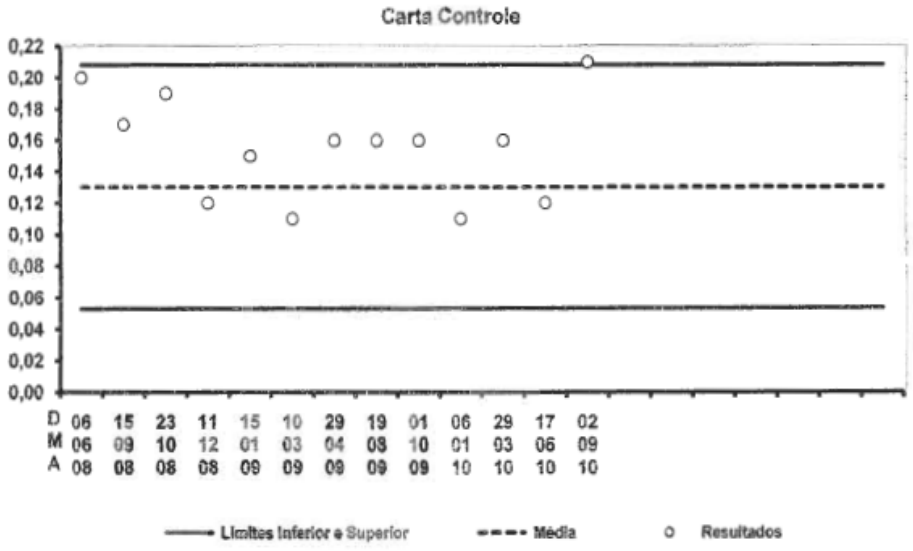
Data de atualização: 24/4/2008

Dados dos testes de sensibilidade utilizados no cálculo da carta controle

	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5	Teste 6	Teste 7	Teste 8	Teste 9	Teste 10
DATA	27/5/2002	24/6/2002	25/7/2002	12/9/2002	27/9/2002	4/10/2002	11/10/2002	18/10/2002	25/10/2002	27/10/2005
Resultado	0,09	0,10	0,17	0,15	0,12	0,09	0,09	0,10	0,09	0,08
	Teste 11	Teste 12	Teste 13	Teste 14	Teste 15	Teste 16	Teste 17	Teste 18	Teste 19	Teste 20
DATA	12/4/2007	16/6/2007	10/8/2007	22/9/2007	25/10/2007	29/11/2007	19/12/2007	15/2/2008	19/3/2008	24/4/2008
Resultado	0,16	0,12	0,12	0,12	0,21	0,18	0,16	0,16	0,11	0,19

Dados estatísticos obtidos na carta controle

MÉDIA mg/L	DESVIO PADRÃO	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)
0,13	**0,04**	**0,05**	**0,21**	**30**



ANÁLISE CRÍTICA:

Esta carta controle foi elaboradda com os resultados dos testes de sensibilidade com Sulfatode Zinco obtidos entre maio de 2002 a outubro de 2005. A partir de abril de 2007, os testes de sensibilidade passam a ser trimestrais, acompanhando a coleta de cada novo lote de organismo.

Eng. Aldo Ramos Santos
Coordenador do DET / ISESC

Fernando Sanzi Cortez
Biólogo Responsável

CÓDIGO: PL027DET-REV01

APÊNDICE B – Sumário estatístico dos ensaios de toxicidade aguda com *Nitokra sp*

Ensaio 1

TCS 1

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5

TCS 1

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
Control	20	1	0.0500	0.0000
0.1400	20	2	0.1000	0.0591
0.1700	20	5	0.2500	0.2160
0.2000	20	12	0.6000	0.5818
0.2400	20	15	0.7500	0.7387
0.2900	20	15	0.7500	0.7387
0.3500	20	20	1.0000	1.0000
0.4200	20	20	1.0000	1.0000
0.5000	20	20	1.0000	1.0000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 5.955
Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 12.592

TCS 1

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.105	0.072	0.129
LC/EC 50.00	0.207	0.184	0.226

Ensaio 2

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5

TCS 2

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls	Pr Pr Re
0.1400	20	2	0.1000	0.1000	
0.1700	20	7	0.3500	0.3500	
0.2000	20	15	0.7500	0.7500	
0.2400	20	20	1.0000	1.0000	
0.2900	20	20	1.0000	1.0000	
0.3500	20	20	1.0000	1.0000	
0.4200	20	20	1.0000	1.0000	
0.5000	20	20	1.0000	1.0000	

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 1.219
Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 12.592

Mu = -0.751983
Sigma = 0.067859

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence Lim	
Intercept	16.081482	1.961894	(12.236171,	19.926
Slope	14.736351	2.619554	(9.602025,	19.870

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

TCS 2

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.123	0.099	0.137
LC/EC 5.00	0.137	0.117	0.149
LC/EC 10.00	0.145	0.127	0.156
LC/EC 15.00	0.151	0.134	0.161
LC/EC 50.00	0.177	0.167	0.187
LC/EC 85.00	0.208	0.196	0.231
LC/EC 90.00	0.216	0.202	0.244
LC/EC 95.00	0.229	0.211	0.265
LC/EC 99.00	0.255	0.230	0.311

Ensaio 3

EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM
USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES
Version 1.5

TCS 3

Conc.	Number Exposed	Number Resp.	Observed Proportion Responding	Proportion Responding Adjusted for Controls
0.1400	20	3	0.1500	0.1500
0.1700	20	5	0.2500	0.2500
0.2000	20	12	0.6000	0.6000
0.2400	20	12	0.6000	0.6000
0.2900	20	19	0.9500	0.9500
0.3500	20	20	1.0000	1.0000
0.4200	20	20	1.0000	1.0000
0.5000	20	20	1.0000	1.0000

Chi - Square for Heterogeneity (calculated) = 4.560
Chi - Square for Heterogeneity
(tabular value at 0.05 level) = 12.592

Mu = -0.704358
Sigma = 0.121645

Parameter	Estimate	Std. Err.	95% Confidence	
Intercept	10.790268	0.843059	(9.137872,	12.
Slope	8.220630	1.215591	(5.838072,	10.

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000

TCS 3

Estimated LC/EC Values and Confidence Limits

Point	Exposure Conc.	95% Confidence Limits Lower	Upper
LC/EC 1.00	0.103	0.076	0.122
LC/EC 5.00	0.125	0.099	0.142
LC/EC 10.00	0.138	0.114	0.155
LC/EC 15.00	0.148	0.125	0.164
LC/EC 50.00	0.198	0.181	0.213
LC/EC 85.00	0.264	0.242	0.302
LC/EC 90.00	0.283	0.256	0.330
LC/EC 95.00	0.313	0.279	0.379
LC/EC 99.00	0.379	0.326	0.493

APÊNDICE C – Análises físicas e químicas dos ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo com *Nitokra sp*.

Concentrações (mg.L^{-1})	Ensaio 1						Ensaio 2						Ensaio 3					
	Inicial			Final			Inicial			Final			Inicial			Final		
	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal
Controle	7,72	5,4	25	7,69	5,2	25	7,94	5,5	25	7,69	5,3	26	7,12	5,8	25	7,08	5,8	26
Controle DMSO	8,02	5,1	25	7,71	5,1	26	8,02	5,1	25	7,71	5,1	26	7,01	5,4	25	6,97	5,3	26
0,14	7,84	5,1	25	7,72	5,0	26	7,11	5,9	25	7,08	5,8	27	7,01	5,8	25	6,98	5,8	26
0,17	7,64	5,1	25	7,33	4,9	26	7,20	5,5	25	7,11	5,4	28	6,94	5,3	25	6,91	5,6	26
0,20	7,94	5,1	25	7,74	5,0	27	7,27	5,6	25	7,08	5,3	26	6,91	5,3	25	6,86	5,3	25
0,24	7,99	5,1	25	7,70	5,1	25	7,29	5,4	26	7,10	5,5	26	6,97	5,5	25	6,89	5,4	27
0,29	7,95	5,1	25	7,65	5,0	25	7,24	5,3	25	7,15	5,3	25	6,97	5,8	25	6,90	5,6	26
0,35	7,94	5,0	25	7,69	4,8	25	7,23	5,6	25	7,17	5,4	27	6,95	5,8	25	6,90	5,6	26
0,42	7,90	5,2	25	7,70	5,0	25	7,26	5,5	26	7,08	5,5	27	7,04	5,5	25	6,97	5,2	28
0,50	8,09	5,1	25	7,81	5,1	26	7,32	5,4	25	7,11	5,3	25	7,02	5,6	25	6,98	5,3	25

APÊNDICE D - Sumário estatístico dos ensaios de toxicidade aguda com *Lytechinus variegatus*.

Ensaio 1

Toxicant/Effluent:

Test Start Date: Test Ending Date:

Test Species:

Test Duration:

DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	90.750	4.349	91.333
2	4	0.100	91.250	1.708	91.333
3	4	0.140	92.000	3.742	91.333
4	4	0.190	86.750	3.775	87.375
5	4	0.260	88.000	8.083	87.375
6	4	0.360	31.500	4.359	31.500
7	4	0.500	13.500	6.557	13.500

The Linear Interpolation Estimate: 0.3346 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.3343 Standard Deviation: 0.0029

Original Confidence Limits: Lower: 0.3288 Upper: 0.3404

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.3253 Upper: 0.3439

Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -71594952

Ensaio 2

Toxicant/Effluent:
Test Start Date: Test Ending Date:
Test Species:
Test Duration:
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	85.000	3.559	85.000
2	4	0.100	80.250	5.123	81.125
3	4	0.200	82.000	5.888	81.125
4	4	0.300	60.250	7.500	60.250
5	4	0.400	10.500	2.887	10.500
6	4	0.500	1.250	1.258	1.750
7	4	0.600	2.250	0.957	1.750

The Linear Interpolation Estimate: 0.3357 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.3349 Standard Deviation: 0.0043
Original Confidence Limits: Lower: 0.3282 Upper: 0.3426
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.3237 Upper: 0.3468
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 93425850

Ensaio 3

Toxicant/Effluent:
Test Start Date: Test Ending Date:
Test Species:
Test Duration:
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	85.000	3.559	87.375
2	4	0.100	89.750	3.096	87.375
3	4	0.200	77.500	5.916	77.500
4	4	0.300	7.000	3.742	7.000
5	4	0.400	2.000	2.708	2.125
6	4	0.500	2.250	2.217	2.125
7	4	0.600	0.000	0.000	0.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.2480 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.2478 Standard Deviation: 0.0022
Original Confidence Limits: Lower: 0.2439 Upper: 0.2524
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.2415 Upper: 0.2551
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -79022240

Ensaio 4

Toxicant/Effluent:
Test Start Date: Test Ending Date:
Test Species:
Test Duration:
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	97.000	1.633	97.000
2	4	0.100	77.750	3.862	77.750
3	4	0.200	77.250	1.500	77.250
4	4	0.300	4.250	2.217	4.250
5	4	0.400	1.500	0.577	1.500
6	4	0.500	0.250	0.500	0.250
7	4	0.600	0.000	0.000	0.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.2394 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.2390 Standard Deviation: 0.0009
Original Confidence Limits: Lower: 0.2374 Upper: 0.2406
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.2362 Upper: 0.2414
Resampling time in Seconds: 0.06 Random_Seed: -396895312

Ensaio 5

Toxicant/Effluent:

Test Start Date: Test Ending Date:

Test Species:

Test Duration:

DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	96.250	1.708	96.250
2	4	0.100	85.750	5.123	88.125
3	4	0.200	90.500	1.915	88.125
4	4	0.300	8.750	6.185	8.750
5	4	0.400	3.500	3.786	3.500
6	4	0.500	0.250	0.500	0.250
7	4	0.600	0.000	0.000	0.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.2504 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.2505 Standard Deviation: 0.0018

Original Confidence Limits: Lower: 0.2474 Upper: 0.2545

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.2457 Upper: 0.2569

Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -12782840

APÊNDICE E – Análises físicas e químicas dos ensaios de toxicidade para avaliação de efeito agudo com *Lytechinus variegatus*.

Concentrações (mg.L^{-1})	Ensaio 1		
	INICIAL		
	pH	OD	Sal
Controle	7,97	6,5	36
Controle DMSO	7,91	6,4	35
0,1	7,85	6,6	35
0,14	7,79	6,6	36
0,19	7,86	6,6	36
0,26	7,84	6,6	36
0,36	7,85	6,6	36
0,50	7,87	6,6	36

Concentrações ($mg.L^{-1}$)	Ensaio 2			Ensaio 3			Ensaio 4			Ensaio 5		
	INICIAL			INICIAL			INICIAL			INICIAL		
	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal
Controle	7,98	5,8	35	7,98	5,8	35	7,89	5,7	35	7,88	5,8	35
Controle DMSO	7,90	5,9	35	7,90	5,9	35	7,93	5,6	35	7,93	5,6	35
0,1	7,91	5,8	35	7,91	5,7	35	7,85	5,8	35	7,90	5,7	35
0,2	7,94	5,8	36	7,87	5,7	36	7,87	5,7	35	7,91	5,6	36
0,3	7,87	5,6	34	7,89	5,8	36	7,88	5,6	35	7,89	5,8	35
0,4	7,85	5,7	35	7,89	5,3	35	7,90	5,6	35	7,92	5,7	35
0,5	7,85	5,6	35	7,91	5,5	36	7,91	5,5	36	7,97	5,6	36
0,6	7,83	5,6	35	7,89	5,4	35	7,90	5,4	35	7,93	5,5	35

APÊNDICE F - Sumário estatístico dos ensaios de toxicidade crônica com *Lytechinus variegatus.*

Ensaio 1

Test Duration: 24 h
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	91.750	4.031	91.750
2	4	0.040	91.500	3.000	91.500
3	4	0.060	80.750	5.560	80.750
4	4	0.080	68.000	3.651	68.000
5	4	0.100	62.250	4.031	62.250
6	4	0.120	50.500	3.873	50.500
7	4	0.140	40.250	9.912	40.750
8	4	0.160	41.250	5.439	40.750
9	4	0.180	21.500	1.291	21.500
10	4	0.200	0.250	0.500	0.250

The Linear Interpolation Estimate: 0.1295 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.1301 Standard Deviation: 0.0049
Original Confidence Limits: Lower: 0.1234 Upper: 0.1436
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1197 Upper: 0.1521
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 146324850

Title: TCS

File: TCS . Transform: NO TRANSFORMATI

Bartlett's Test for Homogeneity of Variance

Calculated B1 statistic = 20.7830 (p-value = 0.0136)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

Critical B = 21.6660 (alpha = 0.01, df = 9)
= 16.9190 (alpha = 0.05, df = 9)

Title: TCS
File: TCS . Transform: NO TRANSFORMATI

ANOVA Table

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	9	32454.9000	3606.1000	156.4469
Within (Error)	30	691.5000	23.0500	
Total	39	33146.4000		

(p-value = 0.0000)

Critical F = 3.0665 (alpha = 0.01, df = 9,30)
= 2.2107 (alpha = 0.05, df = 9,30)

Since F > Critical F REJECT Ho: All equal (alpha = 0.05)

Title: TCS
File: TCS . Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	SIG T STAT 0.05
1	controle	91.7500	91.7500	
2	0.04	91.5000	91.5000	0.0736
3	0.06	80.7500	80.7500	3.2402 *
4	0.08	68.0000	68.0000	6.9959 *
5	0.10	62.2500	62.2500	8.6896 *
6	0.12	50.5000	50.5000	12.1508 *
7	0.14	40.2500	40.2500	15.1700 *
8	0.16	41.2500	41.2500	14.8755 *
9	0.18	21.5000	21.5000	20.6931 *
10	0.20	0.2500	0.2500	26.9526 *

Dunnett critical value = 2.5400 (1 Tailed, alpha = 0.05, df = 9,30)

Title: TCS
File: TCS . Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	MIN SIG DIFF (IN ORIG. UNITS)	% OF CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	4			
2	0.04	4	8.6229	9.4	0.2500
3	0.06	4	8.6229	9.4	11.0000
4	0.08	4	8.6229	9.4	23.7500
5	0.10	4	8.6229	9.4	29.5000
6	0.12	4	8.6229	9.4	41.2500
7	0.14	4	8.6229	9.4	51.5000
8	0.16	4	8.6229	9.4	50.5000
9	0.18	4	8.6229	9.4	70.2500
10	0.20	4	8.6229	9.4	91.5000

File: TCS 1 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	4	86.0000	95.0000	91.750
2	0,04	4	90.0000	96.0000	91.500
3	0,06	4	74.0000	87.0000	80.750
4	0,08	4	64.0000	72.0000	68.000
5	0,10	4	59.0000	68.0000	62.250
6	0,12	4	47.0000	56.0000	50.500
7	0,14	4	31.0000	53.0000	40.250
8	0,16	4	34.0000	47.0000	41.250
9	0,18	4	20.0000	23.0000	21.500
10	0,20	4	0.0000	1.0000	0.2500

Title: TCS1
File: TCS1 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	16.2500	4.0311	2.0156	4.3936
2	0,04	9.0000	3.0000	1.5000	3.2787
3	0,06	30.9167	5.5603	2.7801	6.8858
4	0,08	13.3333	3.6515	1.8257	5.3698
5	0,10	16.2500	4.0311	2.0156	6.4757
6	0,12	15.0000	3.8730	1.9365	7.6693
7	0,14	98.2500	9.9121	4.9561	24.6264
8	0,16	29.5833	5.4391	2.7195	13.1856
9	0,18	1.6667	1.2910	0.6455	6.0046
10	0,20	0.2500	0.5000	0.2500	200.0000

Ensaio 2

Test Species: Lytechinus variegatus
Test Duration: 24 h
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	93.500	1.291	93.500
2	4	0.040	92.250	2.217	92.250
3	4	0.060	91.500	3.512	91.500
4	4	0.080	87.500	4.041	87.500
5	4	0.100	80.000	0.816	80.000
6	4	0.120	76.500	5.000	76.500
7	4	0.140	41.000	2.160	41.000
8	4	0.160	30.750	0.957	30.750
9	4	0.180	1.500	0.577	1.500

The Linear Interpolation Estimate: 0.1368 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.1367 Standard Deviation: 0.0005
Original Confidence Limits: Lower: 0.1357 Upper: 0.1375
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1350 Upper: 0.1379
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -8436456

File: TRICLOSA. Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-Square Test for Normality

Actual and Expected Frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	2.4120	8.7120	13.7520	8.7120	2.4120
OBSERVED	0	14	11	11	0

Chi-Square = 9.1853 (p-value = 0.0566)

Critical Chi-Square = 13.277 (alpha = 0.01 , df = 4)
= 9.488 (alpha = 0.05 , df = 4)

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.

File: TRICLOSA. Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's Test for Homogeneity of Variance

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 75.0000

Table H statistic = 281.00 (alpha = 0.01)
93.90 (alpha = 0.05)

Used df = 3
Based on R (# groups) = 9

Data PASS homogeneity test (alpha = 0.01). Continue analysis.

Title: triclosan 2
File: TRICLOSA. Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's Test for Homogeneity of Variance

Calculated B1 statistic = 19.9409 (p-value = 0.0106)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

Critical B = 20.0902 (alpha = 0.01, df = 8)
= 15.5073 (alpha = 0.05, df = 8)

Title: triclosan 2
File: TRICLOSA. Transform: NO TRANSFORMATIO

ANOVA Table

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	8	35567.3889	4445.9236	598.7029
Within (Error)	27	200.5000	7.4259	
Total	35	35767.8889		

(p-value = 0.0000)

Critical F = 3.2558 (alpha = 0.01, df = 8,27)
= 2.3053 (alpha = 0.05, df = 8,27)

Since F > Critical F REJECT Ho: All equal (alpha = 0.05)

Title: triclosan 2
File: TRICLOSA. Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG 0.05
1	controle95	93.5000	93.5000		
2	0.04	92.2500	92.2500	0.6487	CENO
3	0.06	91.5000	91.5000	1.0379	
4	0.08	87.5000	87.5000	3.1138	* -CEO
5	0.10	80.0000	80.0000	7.0061	*
6	0.12	76.5000	76.5000	8.8224	*
7	0.14	41.0000	41.0000	27.2458	*
8	0.16	30.7500	30.7500	32.5652	*
9	0.18	1.5000	1.5000	47.7450	*

Dunnett critical value = 2.5300 (1 Tailed, alpha = 0.05, df [used] = 8,24)
(Actual df = 8,27)

Title: triclosan 2
File: TRICLOSA. Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	MIN SIG DIFF (IN ORIG. UNITS)	% OF CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle95	4			
2	0.04	4	4.8751	5.2	1.2500
3	0.06	4	4.8751	5.2	2.0000
4	0.08	4	4.8751	5.2	6.0000
5	0.10	4	4.8751	5.2	13.5000
6	0.12	4	4.8751	5.2	17.0000
7	0.14	4	4.8751	5.2	52.5000
8	0.16	4	4.8751	5.2	62.7500
9	0.18	4	4.8751	5.2	92.0000

File: TCS 2 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	4	92.0000	95.0000	93.5000
2	0,04	4	90.0000	95.0000	92.2500
3	0,06	4	88.0000	95.0000	91.5000
4	0,08	4	84.0000	93.0000	87.5000
5	0,10	4	79.0000	81.0000	80.0000
6	0,12	4	71.0000	83.0000	76.5000
7	0,14	4	38.0000	43.0000	41.0000
8	0,16	4	30.0000	32.0000	30.7500
9	0,18	4	1.0000	3.0000	1.7500

Title: TCS 2
File: TCS 2 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	1.6667	1.2910	0.6455	1.3807
2	0,04	4.9167	2.2174	1.1087	2.4036
3	0,06	12.3333	3.5119	1.7559	3.8381
4	0,08	16.3333	4.0415	2.0207	4.6188
5	0,10	0.6667	0.8165	0.4082	1.0206
6	0,12	25.0000	5.0000	2.5000	6.5359
7	0,14	4.6667	2.1602	1.0801	5.2689
8	0,16	0.9167	0.9574	0.4787	3.1136
9	0,18	0.9167	0.9574	0.4787	54.7101

Ensaio 3

Test Species: L. variegatus
Test Duration: 24 h
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	95.250	1.500	95.500
2	4	0.040	95.750	1.708	95.500
3	4	0.060	93.750	2.217	93.750
4	4	0.080	93.250	2.217	93.250
5	4	0.100	91.000	1.155	91.000
6	4	0.120	85.750	1.258	85.750
7	4	0.140	72.250	9.215	72.250
8	4	0.160	28.500	10.724	28.500
9	4	0.180	5.000	9.345	5.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.1512 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.1515 Standard Deviation: 0.0017
Original Confidence Limits: Lower: 0.1488 Upper: 0.1551
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1474 Upper: 0.1575
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -46479728

Triclosan 3
File: TCS 3 Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

---

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	2.144	7.744	12.224	7.744	2.144
OBSERVED	0	11	11	10	0

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 6.4368
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

Triclosan 3
File: TCS 3 Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley test for homogeneity of variance

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 86.25
Closest, conservative, Table H statistic = 249.0 (alpha = 0.01)

Used for Table H ==> R (# groups) = 8, df (# reps-1) = 3
Actual values ==> R (# groups) = 8, df (# avg reps-1) = 3.00

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

NOTE: This test requires equal replicate sizes. If they are unequal
but do not differ greatly, the Hartley test may still be used
as an approximate test (average df are used).

Triclosan 3
File: TCS 3 Transform: NO TRANSFORMATION

Bartletts test for homogeneity of variance

Calculated B statistic = 30.49
Table Chi-square value = 18.48 (alpha = 0.01)
Table Chi-square value = 14.07 (alpha = 0.05)

Average df used in calculation ==> df (avg n - 1) = 3.00
Used for Chi-square table value ==> df (#groups-1) = 7

Data FAIL homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.

NOTE: If groups have unequal replicate sizes the average replicate size is used to calculate the B statistic (see above).

Triclosan 3
File: TCS 3 Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETTS TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	95.250	95.250		
2	0.04	95.750	95.750	-0.136	
3	0.06	93.750	93.750	0.407	
4	0.08	93.250	93.250	0.542	
5	0.10	91.000	91.000	1.152	
6	0.12	85.750	85.750	2.575	*
7	0.14	72.250	72.250	6.233	*
8	0.16	28.500	28.500	18.090	*

Dunnett table value = 2.48 (1 Tailed Value, P=0.05, df=24,7)

Title: TCS FINAL 3
File: TCSFINAL. Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	4	94.0000	97.0000	95.2500
2	0,04	4	94.0000	98.0000	95.7500
3	0,06	4	91.0000	96.0000	93.7500
4	0,08	4	90.0000	95.0000	93.2500
5	0,10	4	90.0000	92.0000	91.0000
6	0,12	4	81.0000	87.0000	84.7500
7	0,14	4	61.0000	83.0000	72.2500
8	0,16	4	20.0000	44.0000	28.5000
9	0,18	4	0.0000	19.0000	5.0000

Title: TCS FINAL 3
File: TCSFINAL. Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	2.2500	1.5000	0.7500	1.5748
2	0,04	2.9167	1.7078	0.8539	1.7836
3	0,06	4.9167	2.2174	1.1087	2.3652
4	0,08	4.9167	2.2174	1.1087	2.3779
5	0,10	1.3333	1.1547	0.5774	1.2689
6	0,12	8.2500	2.8723	1.4361	3.3891
7	0,14	84.9167	9.2150	4.6075	12.7544
8	0,16	115.0000	10.7238	5.3619	37.6274
9	0,18	87.3333	9.3452	4.6726	186.9046

Ensaio 4

Test Species: L. variegatus
Test Duration: 24h
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mgL	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	92.750	2.217	94.700
2	4	0.040	95.750	2.630	94.700
3	4	0.060	93.750	1.258	94.700
4	4	0.080	95.250	2.872	94.700
5	4	0.100	96.000	2.944	94.700
6	4	0.120	84.250	4.349	84.250
7	4	0.140	71.250	5.909	71.250
8	4	0.160	18.750	9.535	18.750
9	4	0.180	0.250	0.500	0.250

The Linear Interpolation Estimate: 0.1491 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.1492 Standard Deviation: 0.0009
Original Confidence Limits: Lower: 0.1477 Upper: 0.1509
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1469 Upper: 0.1520
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -80882376

```
Title:  tcs4
File:      TCS4     .                    Transform:              NO TRANSFORMATION

                        Chi-Square Test for Normality
-----------------------------------------------------------------------------

                       Actual and Expected Frequencies

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5
              -----      -------------      -----------     -----------     -----
EXPECTED     2.1440        7.7440            12.2240         7.7440       2.1440
OBSERVED      0            10                 11             11            0

-----------------------------------------------------------------------------

     Chi-Square =   6.4368              (p-value = 0.1688)

     Critical Chi-Square   = 13.277  (alpha = 0.01 , df = 4)
                           =  9.488  (alpha = 0.05 , df = 4)

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.


Title:  tcs4
File:      TCS4                         Transform:              NO TRANSFORMATION

                Hartley's Test for Homogeneity of Variance
-----------------------------------------------------------------------------

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 57.4211

                       Table H statistic =  249.00  (alpha = 0.01)
                                             83.50  (alpha = 0.05)

             Used  df =   3
             Based on R (# groups) =   8

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS homogeneity test (alpha = 0.01). Continue analysis.


Title:  tcs4
File:      TCS4     .                    Transform:              NO TRANSFORMATION

               Bartlett's Test for Homogeneity of Variance
-----------------------------------------------------------------------------

Calculated B1 statistic = 14.8397                (p-value = 0.0381)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

-----------------------------------------------------------------------------

Critical B = 18.4753  (alpha = 0.01, df =  7)
           = 14.0671  (alpha = 0.05, df =  7)


Title:  tcs4
File:      TCS4     .                    Transform:              NO TRANSFORMATION

                              ANOVA Table
```

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	7	19428.9688	2775.5670	128.0415
Within (Error)	24	520.2500	21.6771	
Total	31	19949.2188		

(p-value = 0.0000)

Critical F = 3.4959 (alpha = 0.01, df = 7,24)
= 2.4226 (alpha = 0.05, df = 7,24)

Since F > Critical F REJECT Ho: All equal (alpha = 0.05)

Title: tcs4
File: TCS4 . Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG 0.05
1	controle	92.7500	92.7500		
2	0.04	95.7500	95.7500	-0.9112	
3	0.06	93.7500	93.7500	-0.3037	
4	0.08	95.2500	95.2500	-0.7594	
5	0.10	93.5000	93.5000	-0.2278	
6	0.12	84.2500	84.2500	2.5819	*
7	0.14	71.2500	71.2500	6.5306	*
8	0.16	18.7500	18.7500	22.4774	*

Dunnett critical value = 2.4800 (1 Tailed, alpha = 0.05, df = 7,24)

Title: tcs4
File: TCS4 . Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	MIN SIG DIFF (IN ORIG. UNITS)	% OF CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	4			
2	0.04	4	8.1646	8.8	-3.0000
3	0.06	4	8.1646	8.8	-1.0000
4	0.08	4	8.1646	8.8	-2.5000
5	0.10	4	8.1646	8.8	-0.7500
6	0.12	4	8.1646	8.8	8.5000
7	0.14	4	8.1646	8.8	21.5000
8	0.16	4	8.1646	8.8	74.0000

Title: TCS 4
File: TCS 4 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	4	90.0000	95.0000	92.7500
2	0,04	4	92.0000	98.0000	95.7500
3	0,06	4	92.0000	95.0000	93.7500
4	0,08	4	91.0000	97.0000	95.2500
5	0,10	4	90.0000	96.0000	93.5000
6	0,12	4	80.0000	90.0000	84.2500
7	0,14	4	63.0000	77.0000	71.2500
8	0,16	4	9.0000	30.0000	18.7500
9	0,18	4	0.0000	1.0000	0.2500

Title: TCS 4
File: TCS 4 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	4.9167	2.2174	1.1087	2.3907
2	0,04	6.9167	2.6300	1.3150	2.7467
3	0,06	1.5833	1.2583	0.6292	1.3422
4	0,08	8.2500	2.8723	1.4361	3.0155
5	0,10	7.0000	2.6458	1.3229	2.8297
6	0,12	18.9167	4.3493	2.1747	5.1624
7	0,14	34.9167	5.9090	2.9545	8.2934
8	0,16	90.9167	9.5350	4.7675	50.8535
9	0,18	0.2500	0.5000	0.2500	200.0000

Ensaio 5

Test Species:
Test Duration:
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	92.750	2.217	93.917
2	4	0.040	94.250	2.217	93.917
3	4	0.060	94.750	0.957	93.917
4	4	0.080	93.750	1.500	93.750
5	4	0.100	87.250	1.708	87.250
6	4	0.120	83.000	2.828	83.000
7	4	0.140	74.000	5.164	74.000
8	4	0.160	16.000	5.354	16.000
9	4	0.180	0.250	0.500	0.250

The Linear Interpolation Estimate: 0.1493 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.1493 Standard Deviation: 0.0006
Original Confidence Limits: Lower: 0.1483 Upper: 0.1502
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1477 Upper: 0.1507
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -59285914

```
Title:  TCS5
File:      TCS5     .                    Transform:              NO TRANSFORMATION

                        Chi-Square Test for Normality
-----------------------------------------------------------------------------

                       Actual and Expected Frequencies

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5
              -----      -------------      -----------     -----------     -----
EXPECTED     2.1440        7.7440            12.2240         7.7440       2.1440
OBSERVED      0            10                 10             12            0

-----------------------------------------------------------------------------

     Chi-Square =   7.6889              (p-value = 0.1037)

     Critical Chi-Square    = 13.277  (alpha = 0.01 , df = 4)
                            =  9.488  (alpha = 0.05 , df = 4)

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.


Title:  TCS5
File:      TCS5     .                    Transform:              NO TRANSFORMATION

                 Hartley's Test for Homogeneity of Variance
-----------------------------------------------------------------------------

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 12.7407

                        Table H statistic =  249.00  (alpha = 0.01)
                                              83.50  (alpha = 0.05)

              Used  df =    3
              Based on R (# groups) =    8

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS homogeneity test (alpha = 0.01). Continue analysis.


Title:  TCS5
File:      TCS5     .                    Transform:              NO TRANSFORMATION

                Bartlett's Test for Homogeneity of Variance
-----------------------------------------------------------------------------

Calculated B1 statistic =  8.6485                (p-value = 0.2789)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

-----------------------------------------------------------------------------

Critical B = 18.4753  (alpha = 0.01, df =  7)
           = 14.0671  (alpha = 0.05, df =  7)


Title:  TCS5
File:      TCS5     .                    Transform:              NO TRANSFORMATION

                                ANOVA Table
```

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	7	19823.8750	2831.9821	267.5889
Within (Error)	24	254.0000	10.5833	
Total	31	20077.8750		

(p-value = 0.0000)

Critical F = 3.4959 (alpha = 0.01, df = 7,24)
= 2.4226 (alpha = 0.05, df = 7,24)

Since F > Critical F REJECT Ho: All equal (alpha = 0.05)

Title: TCS5
File: TCS5 . Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG 0.05
1	controle	92.7500	92.7500		
2	0.04	94.2500	94.2500	-0.6521	
3	0.06	94.5000	94.5000	-0.7607	
4	0.08	93.7500	93.7500	-0.4347	
5	0.10	87.2500	87.2500	2.3909	
6	0.12	83.0000	83.0000	4.2385	*
7	0.14	74.0000	74.0000	8.1509	*
8	0.16	16.0000	16.0000	33.3643	*

Dunnett critical value = 2.4800 (1 Tailed, alpha = 0.05, df = 7,24)

Title: TCS5
File: TCS5 . Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	MIN SIG DIFF (IN ORIG. UNITS)	% OF CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	4			
2	0.04	4	5.7049	6.2	-1.5000
3	0.06	4	5.7049	6.2	-1.7500
4	0.08	4	5.7049	6.2	-1.0000
5	0.10	4	5.7049	6.2	5.5000
6	0.12	4	5.7049	6.2	9.7500
7	0.14	4	5.7049	6.2	18.7500
8	0.16	4	5.7049	6.2	76.7500

File: TCS 5 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	4	90.0000	95.0000	92.7500
2	0,04	4	92.0000	97.0000	94.2500
3	0,06	4	91.0000	97.0000	94.5000
4	0,08	4	92.0000	95.0000	93.7500
5	0,10	4	85.0000	89.0000	87.2500
6	0,12	4	79.0000	85.0000	83.0000
7	0,14	4	68.0000	80.0000	74.0000
8	0,16	4	11.0000	22.0000	16.0000
9	0,18	4	0.0000	1.0000	0.2500

Title: TCS 5
File: TCS 5 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	4.9167	2.2174	1.1087	2.3907
2	0,04	4.9167	2.2174	1.1087	2.3526
3	0,06	6.3333	2.5166	1.2583	2.6631
4	0,08	2.2500	1.5000	0.7500	1.6000
5	0,10	2.9167	1.7078	0.8539	1.9574
6	0,12	8.0000	2.8284	1.4142	3.4077
7	0,14	26.6667	5.1640	2.5820	6.9783
8	0,16	28.6667	5.3541	2.6771	33.4633
9	0,18	0.2500	0.5000	0.2500	200.0000

APÊNDICE G – Análises físicas e químicas dos ensaios de toxicidade para avaliação de efeito crônico com *Lytechinus variegatus*.

Concentrações (mg.L^{-1})	Ensaio 1					
	Inicial			Final		
	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal
Controle	7,97	6,8	34	7,93	6,5	35
Controle DMSO	7,96	6,3	35	7,94	6,1	35
0,04	7,93	6,7	35	7,92	6,3	36
0,06	7,95	6,6	35	7,96	6,5	35
0,08	7,91	6,6	35	7,97	6,6	36
0,10	7,97	6,7	35	7,95	6,6	35
0,12	7,99	6,2	35	7,94	6,1	36
0,14	7,90	6,1	36	7,89	6,0	36
0,16	7,89	6,0	35	7,89	6,0	35
0,18	7,87	6,1	35	7,82	6,0	35
0,20	7,83	6,2	36	7,79	6,0	36

Concentrações (mg.L^{-1})	Ensaio 2					
	Inicial			Final		
	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal
Controle	8,02	5,9	35	7,97	5,8	36
Controle DMSO	7,99	5,7	36	7,97	5,6	36
0,04	7,97	5,8	35	7,95	5,8	35
0,06	7,99	5,8	35	7,98	5,7	35
0,08	7,98	5,9	35	7,99	5,8	35
0,10	7,97	6,0	35	7,96	5,9	35
0,12	7,96	6,1	35	7,97	6,0	35
0,14	7,97	5,7	36	7,92	5,6	36
0,16	7,89	5,7	36	7,97	5,7	36
0,18	7,90	5,7	35	7,80	5,7	35
0,20	7,87	5,8	35	7,80	5,7	35

Concentrações ($mg.L^{-1}$)	Ensaio 3						Ensaio 4						Ensaio 5					
	Inicial			Final			Inicial			Final			Inicial			Final		
	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal
Controle	7,91	6,3	35	7,89	6,2	35	7,97	6,4	35	7,93	6,4	35	8,01	6,9	35	7,99	6,4	36
Controle DMSO	7,97	6,2	35	7,97	6,3	35	7,99	6,2	35	7,98	6,2	35	8,02	6,5	35	8,01	6,4	36
0,04	7,91	6,3	35	7,87	6,0	35	7,93	6,4	35	7,91	6,4	36	7,99	6,9	36	7,97	6,3	36
0,06	7,90	6,3	35	7,86	5,9	35	7,97	6,4	35	7,95	6,3	36	8,00	6,7	36	7,98	6,5	36
0,08	7,89	6,2	36	7,85	5,9	36	7,96	6,4	35	7,94	6,4	36	7,97	6,7	35	7,96	6,5	36
0,10	7,87	6,4	35	7,86	6,2	35	7,95	6,3	35	7,93	6,3	35	7,98	6,7	35	7,96	6,3	36
0,12	7,88	6,3	35	7,89	6,1	35	7,89	6,2	35	7,85	6,1	35	7,99	6,5	35	7,95	6,4	36
0,14	7,87	6,2	35	7,85	6,2	36	7,91	6,2	35	7,89	6,3	35	7,93	6,3	35	7,91	6,1	35
0,16	7,88	6,0	35	7,83	5,9	35	7,90	6,0	35	7,87	6,0	35	7,92	6,5	35	7,89	6,0	35
0,18	7,91	6,1	35	7,87	6,2	36	7,83	6,1	35	7,79	5,9	36	7,91	6,4	35	7,88	6,1	36
0,20	7,79	6,1	35	7,63	6,0	36	7,81	6,0	36	7,76	6,0	36	7,88	6,3	35	7,81	6,0	36

APÊNDICE H - Sumário estatístico dos ensaios de toxicidade crônica com *Perna perna.*

Ensaio 1

Test Start Date: 12012010 Test Ending Date: 14012010
Test Species: Perna perna
Test Duration: 48h
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mgL	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	78.250	5.439	79.333
2	4	0.010	79.750	1.708	79.333
3	4	0.018	80.000	1.414	79.333
4	4	0.030	75.250	2.062	75.250
5	4	0.060	73.500	1.291	73.500
6	4	0.100	60.000	2.160	60.000
7	4	0.190	0.000	0.000	0.000
8	4	0.320	0.000	0.000	0.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.1305 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.1302 Standard Deviation: 0.0014
Original Confidence Limits: Lower: 0.1268 Upper: 0.1324
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1245 Upper: 0.1335
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 85340249

```
Title:  mex1
File:      MEX1    .                Transform:              NO TRANSFORMATION

                      Chi-Square Test for Normality
-----------------------------------------------------------------------------

                     Actual and Expected Frequencies

INTERVAL      <-1.5     -1.5 to <-0.5     -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
              -----     -------------     -----------    -----------    -----
EXPECTED     1.6080        5.8080            9.1680         5.8080     1.6080
OBSERVED      0             7                11              6          0

-----------------------------------------------------------------------------

     Chi-Square =   3.8331             (p-value = 0.4291)

     Critical Chi-Square   = 13.277  (alpha = 0.01 , df = 4)
                           =  9.488  (alpha = 0.05 , df = 4)

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.


Title:  mex1
File:      MEX1    .                Transform:              NO TRANSFORMATION

                  Shapiro - Wilk's Test for Normality
-----------------------------------------------------------------------------

     D = 135.2500
     W =   0.9314

     Critical W  = 0.8840 (alpha = 0.01 , N = 24)
              W  = 0.9160 (alpha = 0.05 , N = 24)

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.


Title:  mex1
File:      MEX1    .                Transform:              NO TRANSFORMATION

                Hartley's Test for Homogeneity of Variance
-----------------------------------------------------------------------------

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 17.7500

                       Table H statistic =  184.00  (alpha = 0.01)
                                             62.00  (alpha = 0.05)

             Used  df =    3
             Based on R (# groups) =    6

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS homogeneity test (alpha = 0.01). Continue analysis.


Title:  mex1
File:      MEX1    .                Transform:              NO TRANSFORMATION

               Bartlett's Test for Homogeneity of Variance
```

```
Calculated B1 statistic =   9.1664                (p-value = 0.1026)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
-----------------------------------------------------------------------------
Critical B = 15.0863  (alpha = 0.01, df =  5)
           = 11.0705  (alpha = 0.05, df =  5)


Title:  mex1
File:      MEX1     .                Transform:              NO TRANSFORMATION
                  Levene's Test for Homogeneity of Variance
                              ANOVA Table
-----------------------------------------------------------------------------
   SOURCE              DF              SS                MS            F
-----------------------------------------------------------------------------
   Between              5            22.3750           4.4750        1.4848
   Within (Error)      18            54.2500           3.0139
-----------------------------------------------------------------------------
   Total               23            76.6250
-----------------------------------------------------------------------------
                                                        (p-value = 0.2437)
   Critical F  = 4.2479  (alpha = 0.01, df = 5,18)
               = 2.7729  (alpha = 0.05, df = 5,18)
   Since  F < Critical F  FAIL TO REJECT  Ho: All equal (alpha = 0.01)


Title:  mex1
File:      MEX1     .                Transform:              NO TRANSFORMATION
                              ANOVA Table
-----------------------------------------------------------------------------
   SOURCE              DF              SS                MS            F
-----------------------------------------------------------------------------
   Between              5          1134.7083         226.9417      30.2030
   Within (Error)      18           135.2500           7.5139
-----------------------------------------------------------------------------
   Total               23          1269.9583
-----------------------------------------------------------------------------
                                                        (p-value = 0.0000)
   Critical F  = 4.2479  (alpha = 0.01, df = 5,18)
               = 2.7729  (alpha = 0.05, df = 5,18)
   Since  F > Critical F  REJECT  Ho: All equal (alpha = 0.05)


Title:  mex1
File:      MEX1     .                Transform:              NO TRANSFORMATION
      Dunnett's Test   -   TABLE 1 OF 2            Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                              TRANSFORMED     MEAN CALCULATED IN          SIG
GROUP    IDENTIFICATION          MEAN          ORIGINAL UNITS    T STAT   0.05
----- --------------------    -----------    ------------------   ------   ---

  1               controle     78.2500            78.2500
  2                   0.01     79.7500            79.7500        -0.7739
  3                  0.018     80.0000            80.0000        -0.9029
  4                   0.03     75.2500            75.2500         1.5478
  5                   0.06     73.5000            73.5000         2.4506   *
  6                   0.10     60.0000            60.0000         9.4155   *
-----------------------------------------------------------------------------
Dunnett critical value = 2.4100   (1 Tailed, alpha = 0.05, df = 5,18)


Title:  mex1
File:      MEX1     .                Transform:              NO TRANSFORMATION
      Dunnett's Test   -   TABLE 2 OF 2            Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                          NUM OF     MIN SIG DIFF     % OF     DIFFERENCE
GROUP    IDENTIFICATION   REPS     (IN ORIG. UNITS)  CONTROL  FROM CONTROL
----- --------------------  -------  ----------------  -------  ------------
  1               controle     4
  2                   0.01     4           4.6713        6.0       -1.5000
  3                  0.018     4           4.6713        6.0       -1.7500
  4                   0.03     4           4.6713        6.0        3.0000
  5                   0.06     4           4.6713        6.0        4.7500
  6                   0.10     4           4.6713        6.0       18.2500
```

File: MEX 1 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	4	71.0000	84.0000	78.2500
2	0,01	4	78.0000	82.0000	79.7500
3	0,018	4	79.0000	82.0000	80.0000
4	0,03	4	73.0000	78.0000	75.2500
5	0,06	4	72.0000	75.0000	73.5000
6	0,10	4	57.0000	62.0000	60.0000
7	0,19	4	0.0000	0.0000	0.0000
8	0,32	4	0.0000	0.0000	0.0000

Title: mex1
File: MEX1 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	29.5833	5.4391	2.7195	6.9509
2	0,01	2.9167	1.7078	0.8539	2.1415
3	0,018	2.0000	1.4142	0.7071	1.7678
4	0,03	4.2500	2.0616	1.0308	2.7396
5	0,06	1.6667	1.2910	0.6455	1.7565
6	0,10	4.6667	2.1602	1.0801	3.6004
7	0,19	0.0000	0.0000	0.0000	N/A
8	0,32	0.0000	0.0000	0.0000	N/A

Ensaio 2

cant/Effluent: Triclosan
est Start Date: 11020210 Test Ending Date: 13022010
Test Species: Perna perna
Test Duration: 48
DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mgL	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	94.000	4.082	94.000
2	4	0.050	84.500	3.512	84.625
3	4	0.065	84.750	10.340	84.625
4	4	0.080	79.750	9.535	79.750
5	4	0.100	64.500	8.347	64.500
6	4	0.140	45.750	4.992	45.750
7	4	0.180	0.250	0.500	0.250

The Linear Interpolation Estimate: 0.1373 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.1373 Standard Deviation: 0.0034
Original Confidence Limits: Lower: 0.1301 Upper: 0.1423
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1258 Upper: 0.1452
Resampling time in Seconds: 0.06 Random_Seed: 2114602

Chi-Square Test for Normality

Actual and Expected Frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	1.8760	6.7760	10.6960	6.7760	1.8760
OBSERVED	0	8	11	9	0

Chi-Square = 4.7117 (p-value = 0.3182)

Critical Chi-Square = 13.277 (alpha = 0.01 , df = 4)
= 9.488 (alpha = 0.05 , df = 4)

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.

Title: mex3
File: MEX3 . Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's Test for Homogeneity of Variance

Calculated B1 statistic = 16.5377 (p-value = 0.0111)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

Critical B = 16.8119 (alpha = 0.01, df = 6)
= 12.5916 (alpha = 0.05, df = 6)

Title: mex3
File: MEX3 . Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA Table

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	6	25567.7143	4261.2857	92.7326
Within (Error)	21	965.0000	45.9524	
Total	27	26532.7143		

(p-value = 0.0000)

Critical F = 3.8117 (alpha = 0.01, df = 6,21)
= 2.5727 (alpha = 0.05, df = 6,21)

Since F > Critical F REJECT Ho: All equal (alpha = 0.05)

Dunnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG 0.05
1	controle	94.0000	94.0000		
2	0.05	84.5000	84.5000	1.9819	
3	0.065	84.7500	84.7500	1.9298	
4	0.08	79.7500	79.7500	2.9729	*
5	0.10	64.5000	64.5000	6.1544	*
6	0.14	45.7500	45.7500	10.0660	*
7	0.18	0.2500	0.2500	19.5584	*

Dunnett critical value = 2.4600 (1 Tailed, alpha = 0.05, df [used] = 6,20)
(Actual df = 6,21)

Title: mex3
File: MEX3 . Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	MIN SIG DIFF (IN ORIG. UNITS)	% OF CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	4			
2	0.05	4	11.7916	12.5	9.5000
3	0.065	4	11.7916	12.5	9.2500
4	0.08	4	11.7916	12.5	14.2500
5	0.10	4	11.7916	12.5	29.5000
6	0.14	4	11.7916	12.5	48.2500
7	0.18	4	11.7916	12.5	93.7500

Summary Statistics on Data TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	4	88.0000	97.0000	94.0000
2	0,05	4	81.0000	88.0000	84.5000
3	0,065	4	71.0000	96.0000	84.7500
4	0,08	4	70.0000	92.0000	79.7500
5	0,10	4	55.0000	75.0000	64.5000
6	0,14	4	41.0000	51.0000	45.7500
7	0,18	4	0.0000	1.0000	0.2500

Summary Statistics on Data TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	16.6667	4.0825	2.0412	4.3431
2	0,05	12.3333	3.5119	1.7559	4.1561
3	0,065	106.9167	10.3401	5.1700	12.2007
4	0,08	90.9167	9.5350	4.7675	11.9561
5	0,10	69.6667	8.3467	4.1733	12.9406
6	0,14	24.9167	4.9917	2.4958	10.9107
7	0,18	0.2500	0.5000	0.2500	200.0000

Ensaio 3

Test Duration: 48h

DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mgL	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	96.250	0.957	96.250
2	4	0.050	86.250	2.500	87.125
3	4	0.065	88.000	2.708	87.125
4	4	0.080	85.250	3.304	85.250
5	4	0.100	83.000	2.160	83.000
6	4	0.140	73.000	5.477	73.000
7	4	0.180	40.250	3.500	40.250

The Linear Interpolation Estimate: 0.1704 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.1703 Standard Deviation: 0.0018

Original Confidence Limits: Lower: 0.1673 Upper: 0.1738

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1654 Upper: 0.1759

Resampling time in Seconds: 0.06 Random_Seed: -210025000

```
File:      TCSMEX  .                Transform:            NO TRANSFORMATION

                      Chi-Square Test for Normality
-----------------------------------------------------------------------------

                     Actual and Expected Frequencies

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5
              -----      -------------      -----------     -----------     -----
EXPECTED     1.8760        6.7760            10.6960         6.7760       1.8760
OBSERVED      0             8                 11              9            0

-----------------------------------------------------------------------------

     Chi-Square =    4.7117              (p-value = 0.3182)

     Critical Chi-Square    = 13.277  (alpha = 0.01 , df = 4)
                            =  9.488  (alpha = 0.05 , df = 4)

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.


Title:  tcsmex
File:      TCSMEX  .                Transform:            NO TRANSFORMATION

                Hartley's Test for Homogeneity of Variance
-----------------------------------------------------------------------------

Calculated H statistic (max Var/min Var) =  6.4286

                        Table H statistic =  216.00  (alpha = 0.01)
                                              72.90  (alpha = 0.05)

             Used  df =   3
             Based on R (# groups) =   7

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS homogeneity test (alpha = 0.01). Continue analysis.


Title:  tcsmex
File:      TCSMEX  .                Transform:            NO TRANSFORMATION

               Bartlett's Test for Homogeneity of Variance
-----------------------------------------------------------------------------

Calculated B1 statistic =  3.3299                (p-value = 0.7664)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

-----------------------------------------------------------------------------

Critical B = 16.8119  (alpha = 0.01, df =  6)
           = 12.5916  (alpha = 0.05, df =  6)
```

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	6	7432.8571	1238.8095	108.8494
Within (Error)	21	239.0000	11.3810	
Total	27	7671.8571		

(p-value = 0.0000)

Critical F = 3.8117 (alpha = 0.01, df = 6,21)
= 2.5727 (alpha = 0.05, df = 6,21)

Since F > Critical F REJECT Ho: All equal (alpha = 0.05)

Title: tcsmex
File: TCSMEX . Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG 0.05
1	controle	90.7500	90.7500		
2	0.05	86.2500	86.2500	1.8864	
3	0.065	88.0000	88.0000	1.1528	
4	0.08	85.2500	85.2500	2.3056	
5	0.10	83.0000	83.0000	3.2488	*
6	0.14	73.0000	73.0000	7.4409	*
7	0.18	40.2500	40.2500	21.1698	*

Dunnett critical value = 2.4600 (1 Tailed, alpha = 0.05, df [used] = 6,20)
(Actual df = 6,21)

Title: tcsmex
File: TCSMEX . Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	MIN SIG DIFF (IN ORIG. UNITS)	% OF CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	4			
2	0.05	4	5.8683	6.5	4.5000
3	0.065	4	5.8683	6.5	2.7500
4	0.08	4	5.8683	6.5	5.5000
5	0.10	4	5.8683	6.5	7.7500
6	0.14	4	5.8683	6.5	17.7500
7	0.18	4	5.8683	6.5	50.5000

Summary Statistics on Data TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	4	95.0000	97.0000	96.2500
2	0,05	4	83.0000	89.0000	86.2500
3	0,065	4	84.0000	90.0000	88.0000
4	0,08	4	82.0000	89.0000	85.2500
5	0,10	4	81.0000	86.0000	83.0000
6	0,14	4	65.0000	77.0000	73.0000
7	0,18	4	36.0000	44.0000	40.2500

Title: mex4
File: MEX4 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	0.9167	0.9574	0.4787	0.9947
2	0,05	6.2500	2.5000	1.2500	2.8986
3	0,065	7.3333	2.7080	1.3540	3.0773
4	0,08	10.9167	3.3040	1.6520	3.8757
5	0,10	4.6667	2.1602	1.0801	2.6027
6	0,14	30.0000	5.4772	2.7386	7.5030
7	0,18	12.2500	3.5000	1.7500	8.6957

Ensaio 4

Test Duration: 48h

DATA FILE:

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mgL	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	90.750	2.872	90.750
2	4	0.050	82.250	1.258	82.250
3	4	0.065	78.500	3.697	78.500
4	4	0.080	60.500	4.655	60.500
5	4	0.100	46.500	4.041	46.500
6	4	0.140	11.000	14.674	11.000
7	4	0.180	0.000	0.000	0.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.1013 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated

The Bootstrap Estimates Mean: 0.1015 Standard Deviation: 0.0021

Original Confidence Limits: Lower: 0.0965 Upper: 0.1054

Expanded Confidence Limits: Lower: 0.0936 Upper: 0.1078

Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 445432638

```
                        Chi-Square Test for Normality
-----------------------------------------------------------------------------

                      Actual and Expected Frequencies

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5
              -----      -------------      -----------     -----------     -----
EXPECTED     1.6080        5.8080             9.1680          5.8080       1.6080
OBSERVED      0             7                 10               7            0

-----------------------------------------------------------------------------

     Chi-Square =    3.7808              (p-value = 0.4365)

     Critical Chi-Square    = 13.277  (alpha = 0.01 , df = 4)
                            =  9.488  (alpha = 0.05 , df = 4)

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.


Title:  mex5
File:      MEX5     .                Transform:             NO TRANSFORMATION

                Hartley's Test for Homogeneity of Variance
-----------------------------------------------------------------------------

Calculated H statistic (max Var/min Var) = 136.0000

                       Table H statistic =  184.00  (alpha = 0.01)
                                             62.00  (alpha = 0.05)

            Used  df =    3
            Based on R (# groups) =    6

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS homogeneity test (alpha = 0.01). Continue analysis.


Title:  mex5
File:      MEX5     .                Transform:             NO TRANSFORMATION

               Bartlett's Test for Homogeneity of Variance
-----------------------------------------------------------------------------

Calculated B1 statistic = 17.4324                (p-value = 0.0037)

Data FAIL B1 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.

-----------------------------------------------------------------------------

Critical B = 15.0863  (alpha = 0.01, df =  5)
           = 11.0705  (alpha = 0.05, df =  5)



Title:  mex5
File:      MEX5     .                Transform:             NO TRANSFORMATION

                              ANOVA Table
-----------------------------------------------------------------------------
```

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	5	17405.3333	3481.0667	75.4476
Within (Error)	18	830.5000	46.1389	
Total	23	18235.8333		

(p-value = 0.0000)

Critical F = 4.2479 (alpha = 0.01, df = 5,18)
= 2.7729 (alpha = 0.05, df = 5,18)

Since F > Critical F REJECT Ho: All equal (alpha = 0.05)

Title: mex5
File: MEX5 . Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG 0.0
1	controle	90.7500	90.7500		
2	0.05	82.2500	82.2500	1.7697	
3	0.065	78.5000	78.5000	2.5505	*
4	0.08	60.5000	60.5000	6.2981	*
5	0.10	46.5000	46.5000	9.2129	*
6	0.14	11.0000	11.0000	16.6040	*

Dunnett critical value = 2.4100 (1 Tailed, alpha = 0.05, df = 5,18)

Title: mex5
File: MEX5 . Transform: NO TRANSFORMATION

Dunnett's Test - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	MIN SIG DIFF (IN ORIG. UNITS)	% OF CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	4			
2	0.05	4	11.5754	12.8	8.5000
3	0.065	4	11.5754	12.8	12.2500
4	0.08	4	11.5754	12.8	30.2500
5	0.10	4	11.5754	12.8	44.2500
6	0.14	4	11.5754	12.8	79.7500

Summary Statistics on Data TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	controle	4	87.0000	94.0000	90.7500
2	0,05	4	81.0000	84.0000	82.2500
3	0,065	4	74.0000	83.0000	78.5000
4	0,08	4	56.0000	67.0000	60.5000
5	0,10	4	41.0000	50.0000	46.5000
6	0,14	4	0.0000	31.0000	11.0000
7	0,18	4	0.0000	1.0000	0.2500

Title: mex 5
File: MEX 5 . Transform: NO TRANSFORMATION

Summary Statistics on Data TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	controle	8.2500	2.8723	1.4361	3.1650
2	0,05	1.5833	1.2583	0.6292	1.5299
3	0,065	13.6667	3.6968	1.8484	4.7094
4	0,08	21.6667	4.6547	2.3274	7.6938
5	0,10	16.3333	4.0415	2.0207	8.6913
6	0,14	215.3333	14.6742	7.3371	133.4022
7	0,18	0.2500	0.5000	0.2500	200.0000

APÊNDICE I – Análises físicas e químicas dos ensaios de toxicidade para avaliação de efeito crônico com *Perna perna*.

Concentrações (mg.L^{-1})	Ensaio 1					
	Inicial			Final		
	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal
Controle	8,00	6,1	35	8,03	5,9	35
Controle DMSO	8,01	6,0	35	7,98	5,8	36
0,01	7,94	6,0	35	7,96	5,7	36
0,018	7,92	6,0	35	7,94	6,0	36
0,03	7,93	5,9	35	7,92	5,6	35
0,06	7,87	5,9	36	7,90	5,5	36
0,10	7,88	6,0	35	7,87	5,3	35
0,19	7,91	5,9	35	7,87	5,7	35
0,32	7,91	5,9	35	7,89	5,3	35

Concentrações ($mg.L^{-1}$)	Ensaio 2						Ensaio 3						Ensaio 4					
	Inicial			Final			Inicial			Final			Inicial			Final		
	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal
Controle	8,00	6,2	35	7,97	6,1	35	7,93	6,2	35	7,91	5,8	35	7,96	6,5	35	7,99	6,4	35
Controle DMSO	7,86	6,1	36	7,88	6,0	36	7,97	6,1	36	7,94	6,0	36	7,97	6,2	35	7,93	6,0	36
0,05	7,93	6,0	36	7,93	5,8	36	7,90	6,6	36	7,87	6,5	36	7,92	6,2	35	7,96	6,2	36
0, 065	7,94	6,0	35	7,82	5,8	36	7,86	6,4	36	7,86	6,2	36	7,97	6,3	35	7,98	6,2	36
0,08	7,85	6,0	36	7,86	5,3	36	7,79	6,4	36	7,81	6,4	36	7,89	6,2	36	7,89	6,1	36
0,10	7,88	5,9	35	7,77	5,7	36	7,86	6,5	36	7,88	6,5	36	7,88	6,1	36	7,92	6,0	36
0,14	7,91	5,9	35	7,90	5,8	36	7,82	6,4	36	7,81	6,3	36	7,93	6,0	35	7,95	5,8	35
0,18	7,87	5,9	35	7,88	5,8	35	7,84	6,3	36	7,86	6,0	36	7,84	6,1	36	7,92	5,9	36

APÊNDICE J – Análises físicas e químicas dos ensaios de citotoxicidade.

Concentrações (ng.L^{-1})	Ensaio 1 (definitivo)					
	Inicial			Final		
	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal
Controle	8,04	7,5	36	8,01	7,5	36
Controle DMSO	8,07	7,3	36	8,03	7,2	36
120	8,02	7,2	36	8,00	7,1	36
1200	8,07	7,0	36	7,86	7,2	35
12000	8,10	7,3	36	7,99	7,1	36

Concentrações (ng.L^{-1})	Ensaio 2 (definitivo)					
	Inicial			Final		
	pH	OD	Sal	pH	OD	Sal
Controle	7,89	6,6	35	7,67	6,4	34
Controle DMSO	7,84	6,5	34	7,61	6,6	34
1,2	7,67	6,5	35	7,55	6,3	34
12	7,69	6,3	35	7,63	6,6	35
120	7,71	6,8	35	7,62	6,4	35

ANEXO A – Ficha de segurança do Triclosan

Material Safety Data Sheet

CALBIOCHEM

647950 Triclosan

1. Product and company identification

Supplier/Manufacturer : EMD Chemicals, Inc.
10394 Pacific Center Court
San Diego, CA 92121
(858)450-5558/(800)854-3417
FAX: (858)453-3552

In case of emergency Call Chemtrec®
(800)424-9300 (within U.S.A.)
(703)527-3887 (outside U.S.A.)

Responsible name : **Company**
Not available.

Synonym : ether, 2'-hydroxy-2,4,4'-trichlorodiphenyl

Product name : Triclosan

Material uses : Other non-specified industry: Analytical reagent.

Validation date : **9/9/2008.**

Print date : 9/9/2008.

2. Hazards identification

Physical state : Solid. (Solid powder.)

OSHA/HCS status : This material is considered hazardous by the OSHA Hazard Communication Standard (29 CFR 1910.1200).

Emergency overview : Warning!
CAUSES RESPIRATORY TRACT, EYE AND SKIN IRRITATION.Dangerous for the environment.Toxic to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
Avoid contact with skin and clothing. Avoid breathing dust. Keep container closed. Use only with adequate ventilation. Wash thoroughly after handling.

Routes of entry : Dermal contact. Eye contact. Inhalation. Ingestion.

Potential acute health effects

Eyes : Irritating to eyes.

Skin : MAY BE HARMFUL IF ABSORBED THROUGH SKIN. Irritating to skin.

Inhalation : Irritating to respiratory system.

Ingestion : May be harmful if swallowed.

Potential chronic health effects : **CARCINOGENIC EFFECTS** Not available.
MUTAGENIC EFFECTS Not available.
TERATOGENIC EFFECTS Not available.

Medical conditions aggravated by over-exposure : Repeated skin exposure can produce local skin destruction or dermatitis. Repeated or prolonged exposure to the substance can produce lung damage. Repeated exposure of the eyes to a low level of dust can produce eye irritation.

See toxicological information (section 11)

3. Composition/information on ingredients

United States

Name	CAS number	%
5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol	3380-34-5	100

Triclosan

4. First aid measures

Eye contact : Immediately flush eyes with plenty of water for at least 15 minutes, occasionally lifting the upper and lower eyelids. Check for and remove any contact lenses. Get medical attention.

Skin contact : Flush contaminated skin with plenty of water. Remove contaminated clothing and shoes. Get medical attention if symptoms occur. Wash clothing before reuse. Clean shoes thoroughly before reuse.

Inhalation : Move exposed person to fresh air. If it is suspected that fumes are still present, the rescuer should wear an appropriate mask or self-contained breathing apparatus. Keep person warm and at rest. If not breathing, if breathing is irregular or if respiratory arrest occurs, provide artificial respiration or oxygen by trained personnel. It may be dangerous to the person providing aid to give mouth-to-mouth resuscitation. Get medical attention. If unconscious, place in recovery position and get medical attention immediately. Maintain an open airway. Loosen tight clothing such as a collar, tie, belt or waistband.

Ingestion : Wash out mouth with water. Remove dentures if any. Move exposed person to fresh air. Keep person warm and at rest. If material has been swallowed and the exposed person is conscious, give small quantities of water to drink. Stop if the exposed person feels sick as vomiting may be dangerous. Do not induce vomiting unless directed to do so by medical personnel. If vomiting occurs, the head should be kept low so that vomit does not enter the lungs. Get medical attention if symptoms occur. Never give anything by mouth to an unconscious person. If unconscious, place in recovery position and get medical attention immediately. Maintain an open airway. Loosen tight clothing such as a collar, tie, belt or waistband.

Protection of first-aiders : No action shall be taken involving any personal risk or without suitable training.

5. Fire-fighting measures

Flammability of the product : May be combustible at high temperature.

Products of combustion : These products are carbon oxides (CO, CO_2), halogenated compounds.

Extinguishing media

Suitable : Use an extinguishing agent suitable for the surrounding fire.

Not suitable : None known.

Special exposure hazards : No specific hazard.

Special protective equipment for fire-fighters : Fire-fighters should wear appropriate protective equipment and self-contained breathing apparatus (SCBA) with a full face-piece operated in positive pressure mode.

Special remarks on fire hazards : Store under nitrogen.

6. Accidental release measures

Personal precautions : Immediately contact emergency personnel. Keep unnecessary personnel away. Use suitable protective equipment.

Environmental precautions : Avoid dispersal of spilled material and runoff and contact with soil, waterways, drains and sewers.

Methods for cleaning up : If emergency personnel are unavailable, vacuum or carefully scoop up spilled material and place in an appropriate container for disposal by incineration. Avoid creating dusty conditions and prevent wind dispersal.

7. Handling and storage

Handling : Avoid contact with eyes, skin and clothing. Keep container closed. Use only with adequate ventilation. Avoid breathing dust. Wash thoroughly after handling.

Storage : Keep container tightly closed. Keep container in a cool, well-ventilated area.

Triclosan

8 . Exposure controls/personal protection

Consult local authorities for acceptable exposure limits.

Engineering measures : Use only with adequate ventilation. If user operations generate dust, fumes, vapor or mist, use process enclosures, local exhaust ventilation or other engineering controls to keep worker exposure to airborne contaminants below any recommended or statutory limits.

Personal protection

Eyes : Safety eyewear complying with an approved standard should be used when a risk assessment indicates this is necessary to avoid exposure to liquid splashes, mists, gases or dusts.

Skin : Personal protective equipment for the body should be selected based on the task being performed and the risks involved and should be approved by a specialist before handling this product.

Respiratory : Use a properly fitted, particulate filter respirator complying with an approved standard if a risk assessment indicates this is necessary. Respirator selection must be based on known or anticipated exposure levels, the hazards of the product and the safe working limits of the selected respirator.

Hands : Chemical-resistant, impervious gloves complying with an approved standard should be worn at all times when handling chemical products if a risk assessment indicates this is necessary.

Hygiene measures : Wash hands, forearms and face thoroughly after handling chemical products, before eating, smoking and using the lavatory and at the end of the working period. Appropriate techniques should be used to remove potentially contaminated clothing. Wash contaminated clothing before reusing. Ensure that eyewash stations and safety showers are close to the workstation location.

9 . Physical and chemical properties

Component : Not available.

Physical state : Solid. (Solid powder.)

Color : White.

Molecular weight : 289.6 g/mole

Molecular formula : $C_{12}H_7Cl_3O_2$

Boiling/condensation point : 280 to 260°C (536 to 500°F)

Melting/freezing point : 56 to 60°C (132.8 to 140°F)

Physical/chemical properties comments : Soluble in DMSO (50 mg/ml) or Ethanol (50 mg/ml)

10 . Stability and reactivity

Stability and reactivity : The product is stable.

Incompatibility with various substances : Reactive or incompatible with the following materials: oxidizing materials. Sensitive to light.

Hazardous decomposition products : These products are halogenated compounds.

Conditions of reactivity : Store under nitrogen.

11 . Toxicological information

Toxicity data

United States

Product/ingredient name	Test	Result	Route	Species
5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol	LD50	3700 mg/kg	Oral	Rat
	LD50	4530 mg/kg	Oral	Mouse
	LD50	9300 mg/kg	Dermal	Rabbit

Other toxic effects on humans : Hazardous in case of skin contact (irritant), of eye contact (irritant), of ingestion, of inhalation (lung irritant).

Triclosan

11 . Toxicological information

Special remarks on chronic effects on humans : Embryotoxic and/or fetotoxic in animals.

Special remarks on other toxic effects on humans : Material is irritating to mucous membranes and upper respiratory tract.

Specific effects

Carcinogenic effects : No known significant effects or critical hazards.

Mutagenic effects : No known significant effects or critical hazards.

Teratogenicity / Reproductive toxicity : No known significant effects or critical hazards.

Sensitization

Ingestion : No known significant effects or critical hazards.

Inhalation : Irritating to respiratory system.

Eyes : Irritating to eyes.

Skin : Irritating to skin.

12 . Ecological information

Ecotoxicity data

United States

Product/ingredient name	Species	Period	Result
5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol	Daphnia magna (EC50)	48 hour/hours	0.39 mg/l
	Pimephales promelas (LC50)	96 hour/hours	0.25 mg/l
	Oncorhynchus mykiss (LC50)	96 hour/hours	0.288 mg/l
	Pimephales promelas (LC50)	96 hour/hours	0.36 mg/l

Environmental precautions : Very toxic to aquatic organisms. May cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

Products of degradation : These products are carbon oxides (CO, CO_2) and water, halogenated compounds.

Toxicity of the products of biodegradation : The products of degradation are as toxic as the product itself.

13 . Disposal considerations

Waste disposal : The generation of waste should be avoided or minimized wherever possible. Avoid dispersal of spilled material and runoff and contact with soil, waterways, drains and sewers. Disposal of this product, solutions and any by-products should at all times comply with the requirements of environmental protection and waste disposal legislation and any regional local authority requirements.

Disposal should be in accordance with applicable regional, national and local laws and regulations. Local regulations may be more stringent than regional or national requirements.

The information presented below only applies to the material as supplied. The identification based on characteristic(s) or listing may not apply if the material has been used or otherwise contaminated. It is the responsibility of the waste generator to determine the toxicity and physical properties of the material generated to determine the proper waste identification and disposal methods in compliance with applicable regulations.

Refer to Section 7: HANDLING AND STORAGE and Section 8: EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION for additional handling information and protection of employees.

14 . Transport information

Triclosan

14 . Transport information

Regulatory information	UN number	Proper shipping name	Class	PG*	Label	Additional information
DOT Classification	Not regulated.	-	-	-		-
TDG Classification	Not available.	Not available.	Not available.	-		-
ADR/RID Class	UN3077	ENVIRONMENTALLY HAZARDOUS SUBSTANCE, SOLID, N.O.S. (5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol)	9	III		-
IATA-DGR Class	UN3077	Environmentally hazardous substance, solid, n.o.s. (5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol)	9	III		-

PG* : Packing group

15 . Regulatory information

United States

HCS Classification : Irritating material

U.S. Federal regulations : TSCA 8(b) inventory: 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol

SARA 302/304/311/312 extremely hazardous substances: No products were found.
SARA 302/304 emergency planning and notification: No products were found.
SARA 302/304/311/312 hazardous chemicals: No products were found.
SARA 311/312 MSDS distribution - chemical inventory - hazard identification: No products were found.

Clean Water Act (CWA) 307: 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol

Clean Water Act (CWA) 311: No products were found.

Clean Air Act (CAA) 112 accidental release prevention: No products were found.

Clean Air Act (CAA) 112 regulated flammable substances: No products were found.

Clean Air Act (CAA) 112 regulated toxic substances: No products were found.

State regulations : No products were found.

Canada

WHMIS (Canada) : Class D-2A: Material causing other toxic effects (Very toxic).
Class D-2B: Material causing other toxic effects (Toxic).

CEPA DSL: 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol

This product has been classified according to the hazard criteria of the CPR and the MSDS contains all the information required by the CPR.

Mexico

Classification :

EU regulations

Triclosan

15 . Regulatory information

Hazard symbol/symbols :

Risk phrases : R36/37/38- Irritating to eyes, respiratory system and skin.
R50/53- Very toxic to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

Safety phrases : S26- In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S36/39- Wear suitable protective clothing and eye/face protection.
S46- If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.
S60- This material and its container must be disposed of as hazardous waste.
S61- Avoid release to the environment. Refer to special instructions/Safety data sheets.

International regulations

International lists : Australia (NICNAS): 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol

China: 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol

Germany water class: 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol

Japan (METI): 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol

Korea (TCCL): 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol

Philippines (RA6969): 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol

16 . Other information

Label requirements : CAUSES RESPIRATORY TRACT, EYE AND SKIN IRRITATION.Dangerous for the environment.Toxic to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

Hazardous Material Information System (U.S.A.) :

Health	2
Fire hazard	0
Reactivity	0
Personal protection	C

National Fire Protection Association (U.S.A.) :

Notice to reader

To the best of our knowledge, the information contained herein is accurate. However, neither the above-named supplier, nor any of its subsidiaries, assumes any liability whatsoever for the accuracy or completeness of the information contained herein.
Final determination of suitability of any material is the sole responsibility of the user. All materials may present unknown hazards and should be used with caution. Although certain hazards are described herein, we cannot guarantee that these are the only hazards that exist.

ANEXO B – Certificado de Acreditação do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília segundo os requisitos estabelecidos na ABNT NBR 17025:2005.

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - Inmetro

Coordenação Geral de Acreditação

Signatário dos Acordos de Reconhecimento Mútuo da International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC), da Interamerican Accreditation Cooperation (IAAC) e do Acordo Bilateral de Reconhecimento Mútuo com a European Co-operation for Accreditation (EA)

Certificado de Acreditação

Acreditação n° CRL 0237

Acreditação inicial: 29-12-2006

LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA PROFESSOR CAETANO BELLIBONI
INSTITUTO SUPERIOR DE EDUCAÇÃO SANTA CECÍLIA
RUA OSWALDO CRUZ, 266 – BOQUEIRÃO
SANTOS – SP

A Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro – Cgcre/Inmetro – concede acreditação ao Laboratório acima identificado, segundo os requisitos estabelecidos na ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. Esta acreditação constitui a expressão formal do reconhecimento da sua competência para realizar os ensaios constantes no Escopo de Acreditação.

Marcos Aurélio Lima de Oliveira
Coordenador Geral de Acreditação

Emissão: 04-12-2008

Validade: 22-12-2010

ANEXO C – Ficha de segurança do solvente dimetilsufóxido (DMSO).

Material Safety Data Sheet

CALBIOCHEM

317275 Dimethyl Sulfoxide

1. Product and company identification

Supplier/Manufacturer : EMD Chemicals, Inc.
10394 Pacific Center Court
San Diego, CA 92121
(858)450-5558/(800)854-3417
FAX: (858)453-3552

In case of emergency Call Chemtrec®
(800)424-9300 (within U.S.A.)
(703)527-3887 (outside U.S.A.)

Responsible name : **Company**
Not available.

Synonym : DMSO; Methyl Sulfoxide; Sulfinylbis(methane)

Product name : Dimethyl Sulfoxide

Material uses : Other non-specified industry: Solvent.

Validation date : **6/19/2008.**

Print date : 6/19/2008.

2. Hazards identification

Physical state : Liquid.

OSHA/HCS status : This material is considered hazardous by the OSHA Hazard Communication Standard (29 CFR 1910.1200).

Emergency overview : Warning!
CAUSES DAMAGE TO THE FOLLOWING ORGANS: SKIN, EYES, EYE, LENS OR CORNEA.
COMBUSTIBLE LIQUID AND VAPOR.
VAPOR MAY CAUSE FIRE.
Keep away from heat, sparks and flame. Keep container closed. Use only with adequate ventilation.

Routes of entry : Dermal contact. Eye contact.

Potential acute health effects

Eyes : Slightly irritating to the eyes.

Skin : Slightly irritating to the skin.

Inhalation : No known significant effects or critical hazards.

Ingestion : Practically non-toxic if swallowed.

Potential chronic health effects : **CARCINOGENIC EFFECTS** Not available.
MUTAGENIC EFFECTS Not available.
TERATOGENIC EFFECTS Not available.

Medical conditions aggravated by over-exposure : Repeated skin exposure can produce local skin destruction or dermatitis. Repeated or prolonged contact with spray or mist may produce chronic eye irritation and severe skin irritation. Repeated or prolonged exposure to the substance can produce target organs damage.

See toxicological information (section 11)

3. Composition/information on ingredients

United States

Name	CAS number	%
dimethyl sulfoxide	67-68-5	100

Dimethyl Sulfoxide

4. First aid measures

Eye contact : Immediately flush eyes with plenty of water for at least 15 minutes, occasionally lifting the upper and lower eyelids. Check for and remove any contact lenses. Get medical attention if irritation occurs.

Skin contact : Wash skin thoroughly with soap and water or use recognized skin cleanser. Get medical attention if irritation occurs. Remove contaminated clothing and shoes. Wash clothing before reuse. Clean shoes thoroughly before reuse.

Inhalation : Move exposed person to fresh air. Keep person warm and at rest. If not breathing, if breathing is irregular or if respiratory arrest occurs, provide artificial respiration or oxygen by trained personnel. It may be dangerous to the person providing aid to give mouth-to-mouth resuscitation. Get medical attention if symptoms occur. If unconscious, place in recovery position and get medical attention immediately. Maintain an open airway. Loosen tight clothing such as a collar, tie, belt or waistband.

Ingestion : Wash out mouth with water. Remove dentures if any. Move exposed person to fresh air. Keep person warm and at rest. If material has been swallowed and the exposed person is conscious, give small quantities of water to drink. Stop if the exposed person feels sick as vomiting may be dangerous. Do not induce vomiting unless directed to do so by medical personnel. If vomiting occurs, the head should be kept low so that vomit does not enter the lungs. Get medical attention if symptoms occur. Never give anything by mouth to an unconscious person. If unconscious, place in recovery position and get medical attention immediately. Maintain an open airway. Loosen tight clothing such as a collar, tie, belt or waistband.

Protection of first-aiders : No action shall be taken involving any personal risk or without suitable training.

5. Fire-fighting measures

Flammability of the product : Combustible.

Products of combustion : These products are carbon oxides (CO, CO_2), sulfur oxides (SO_2, SO_3 etc.).

Extinguishing media

Suitable : Use dry chemical, CO_2, water spray (fog) or foam.

Not suitable : Do not use water jet.

Special exposure hazards : Combustible liquid and vapor. Vapor may cause flash fire. Vapors may accumulate in low or confined areas or travel a considerable distance to a source of ignition and flash back. Runoff to sewer may create fire or explosion hazard.

Special protective equipment for fire-fighters : Fire-fighters should wear appropriate protective equipment and self-contained breathing apparatus (SCBA) with a full face-piece operated in positive pressure mode.

Special remarks on fire hazards : Store under nitrogen.

Special remarks on explosion hazards : DMSO undergoes a violent exothermic reaction on mixing with copper wool and trichloroacetic acid. On mixing with potassium permanganate, it will flash instantaneously. It reacts violently with: acid halides, cyanuric chloride, silicon tetrachloride, phosphorus trichloride and trioxide, thionyl chloride, magnesium perchlorate, silver fluoride, methyl bromide, iodine pentafluoride, nitrogen periodate, diborane, sodium hydride, and perchloric and periodic acids. When heated above its boiling point methyl sulfoxide degrades giving off formaldehyde, methyl mercaptan, and sulfur dioxide.

6. Accidental release measures

Personal precautions : Immediately contact emergency personnel. Eliminate all ignition sources. Keep unnecessary personnel away. Use suitable protective equipment. Do not touch or walk through spilled material.

Environmental precautions : Avoid dispersal of spilled material and runoff and contact with soil, waterways, drains and sewers.

Dimethyl Sulfoxide

6 . Accidental release measures

Methods for cleaning up : If emergency personnel are unavailable, contain spilled material. For small spills, add absorbent (soil may be used in the absence of other suitable materials) and use a non-sparking or explosion-proof means to transfer material to a sealable, appropriate container for disposal. For large spills, dike spilled material or otherwise contain material to ensure runoff does not reach a waterway. Place spilled material in an appropriate container for disposal.

7 . Handling and storage

Handling : Keep container closed. Use only with adequate ventilation. Keep away from heat, sparks and flame. To avoid fire or explosion, dissipate static electricity during transfer by grounding and bonding containers and equipment before transferring material. Use explosion-proof electrical (ventilating, lighting and material handling) equipment.

Storage : Store in a segregated and approved area. Keep container in a cool, well-ventilated area. Keep container tightly closed and sealed until ready for use. Avoid all possible sources of ignition (spark or flame).

8 . Exposure controls/personal protection

Consult local authorities for acceptable exposure limits.

Engineering measures : Use only with adequate ventilation. If user operations generate dust, fumes, vapor or mist, use process enclosures, local exhaust ventilation or other engineering controls to keep worker exposure to airborne contaminants below any recommended or statutory limits. The engineering controls also need to keep gas, vapor or dust concentrations below any lower explosive limits. Use explosion-proof ventilation equipment.

Personal protection

Eyes : Safety eyewear complying with an approved standard should be used when a risk assessment indicates this is necessary to avoid exposure to liquid splashes, mists, gases or dusts.

Skin : Personal protective equipment for the body should be selected based on the task being performed and the risks involved and should be approved by a specialist before handling this product.

Respiratory : Use a properly fitted, air-purifying or air-fed respirator complying with an approved standard if a risk assessment indicates this is necessary. Respirator selection must be based on known or anticipated exposure levels, the hazards of the product and the safe working limits of the selected respirator.

Hands : Chemical-resistant, impervious gloves complying with an approved standard should be worn at all times when handling chemical products if a risk assessment indicates this is necessary.

Hygiene measures : Wash hands, forearms and face thoroughly after handling chemical products, before eating, smoking and using the lavatory and at the end of the working period. Appropriate techniques should be used to remove potentially contaminated clothing. Wash contaminated clothing before reusing. Ensure that eyewash stations and safety showers are close to the workstation location.

9 . Physical and chemical properties

Component : Not available.

Physical state : Liquid.

Flash point : Closed cup: 87°C (188.6°F).

Auto-ignition temperature : 300 to 302°C (572 to 575.6°F)

Flammable limits : Lower: 1.8% Upper: 63%

Color : Clear Colorless.

Molecular weight : 78.1 g/mole

Molecular formula : C_2H_6OS

Boiling/condensation point : 189°C (372.2°F)

Melting/freezing point : 18.5°C (65.3°F)

Dimethyl Sulfoxide

9 . Physical and chemical properties

Relative density	: 1.101 (Water = 1)
Vapor pressure	: 0.08 kPa (0.6 mm Hg) (at 20°C)
Vapor density	: 2.7 (Air = 1)
Evaporation rate	: 0.026 compared with Butyl acetate.
Viscosity	: Kinematic: 2.14 cSt

10 . Stability and reactivity

Stability and reactivity	: The product is stable.
Incompatibility with various substances	: Reactive or incompatible with the following materials: oxidizing materials, reducing materials and acids. Hygroscopic. Keep container tightly closed.
Hazardous polymerization	: Will not occur.
Conditions of reactivity	: Store under nitrogen. Explosive in the presence of the following materials or conditions: open flames, sparks and static discharge and heat. DMSO undergoes a violent exothermic reaction on mixing with copper wool and trichloroacetic acid. On mixing with potassium permanganate, it will flash instantaneously. It reacts violently with: acid halides, cyanuric chloride, silicon tetrachloride, phosphorus trichloride and trioxide, thionyl chloride, magnesium perchlorate, silver fluoride, methyl bromide, iodine pentafluoride, nitrogen periodate, diborane, sodium hydride, and perchloric and periodic acids. When heated above its boiling point methyl sulfoxide degrades giving off formaldehyde, methyl mercaptan, and sulfur dioxide.

11 . Toxicological information

Toxicity data

United States

Product/ingredient name	Test	Result	Route	Species
dimethyl sulfoxide	LD50	14500 mg/kg	Oral	Rat
	LD50	7920 mg/kg	Oral	Mouse
	LD50	>10000 mg/kg	Oral	Dog
	LD50	50000 mg/kg	Dermal	Mouse

Chronic effects on humans	: Causes damage to the following organs: skin, eyes, eye, lens or cornea.
Other toxic effects on humans	: Hazardous in case of skin contact (irritant), of eye contact (irritant).
Special remarks on other toxic effects on humans	: Avoid contact with DMSO solutions containing toxic materials or materials with unknown toxicological properties. Dimethyl Sulfoxide is readily absorbed through the skin and may carry materials into the body. Prolonged or repeated exposure is carcinogenic, terotogenic and mutagenic.

Specific effects

Carcinogenic effects	: No known significant effects or critical hazards.
Mutagenic effects	: No known significant effects or critical hazards.
Teratogenicity / Reproductive toxicity	: No known significant effects or critical hazards.

Sensitization

Ingestion	: No known significant effects or critical hazards.
Inhalation	: No known significant effects or critical hazards.
Eyes	: Slightly irritating to the eyes.
Skin	: Slightly irritating to the skin.

Dimethyl Sulfoxide

12 . Ecological information

Ecotoxicity data

United States

Product/ingredient name	Species	Period	Result
dimethyl sulfoxide	Pimephales promelas (LC50)	96 hour/hours	34000 mg/l
	Oncorhynchus mykiss (LC50)	96 hour/hours	35000 mg/l
	Lepomis macrochirus (LC50)	96 hour/hours	>400000 mg/l

Environmental precautions : No known significant effects or critical hazards.

Products of degradation : These products are carbon oxides (CO, CO_2) and water, sulfur oxides (SO_2, SO_3 etc.).

Toxicity of the products of biodegradation : The product itself and its products of degradation are not toxic.

13 . Disposal considerations

Waste disposal : The generation of waste should be avoided or minimized wherever possible. Avoid dispersal of spilled material and runoff and contact with soil, waterways, drains and sewers. Disposal of this product, solutions and any by-products should at all times comply with the requirements of environmental protection and waste disposal legislation and any regional local authority requirements.

Disposal should be in accordance with applicable regional, national and local laws and regulations. Local regulations may be more stringent than regional or national requirements.

The information presented below only applies to the material as supplied. The identification based on characteristic(s) or listing may not apply if the material has been used or otherwise contaminated. It is the responsibility of the waste generator to determine the toxicity and physical properties of the material generated to determine the proper waste identification and disposal methods in compliance with applicable regulations.

Refer to Section 7: HANDLING AND STORAGE and Section 8: EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION for additional handling information and protection of employees.

14 . Transport information

Regulatory information	UN number	Proper shipping name	Class	PG*	Label	Additional information
DOT Classification	Not regulated.	-	-	-		-
TDG Classification	Not regulated.	-	-	-		-
ADR/RID Class	Not regulated.	-	-	-		-
IATA-DGR Class	Not regulated.	-	-	-		-

PG* : Packing group

15 . Regulatory information

United States

HCS Classification : Combustible liquid
Target organ effects

U.S. Federal regulations : TSCA 8(b) inventory: dimethyl sulfoxide
SARA 302/304/311/312 extremely hazardous substances: No products were found.
SARA 302/304 emergency planning and notification: No products were found.
SARA 302/304/311/312 hazardous chemicals: No products were found.
SARA 311/312 MSDS distribution - chemical inventory - hazard identification: No products were found.
Clean Water Act (CWA) 307: No products were found.

Dimethyl Sulfoxide

15 . Regulatory information

Clean Water Act (CWA) 311: No products were found.
Clean Air Act (CAA) 112 accidental release prevention: No products were found.
Clean Air Act (CAA) 112 regulated flammable substances: No products were found.
Clean Air Act (CAA) 112 regulated toxic substances: No products were found.

State regulations : Pennsylvania RTK: dimethyl sulfoxide
New Jersey: dimethyl sulfoxide

Canada

WHMIS (Canada) : Class D-2B: Material causing other toxic effects (Toxic).
CEPA DSL: dimethyl sulfoxide

CEPA NDSL: dimethyl sulfoxide

This product has been classified according to the hazard criteria of the CPR and the MSDS contains all the information required by the CPR.

Mexico

Classification :

EU regulations

Hazard symbol/symbols :

Risk phrases : R36/38- Irritating to eyes and skin.

Safety phrases : S24/25- Avoid contact with skin and eyes.
S26- In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S36- Wear suitable protective clothing.

International regulations

International lists : Australia (NICNAS): dimethyl sulfoxide

China: dimethyl sulfoxide

Germany water class: dimethyl sulfoxide

Japan (METI): dimethyl sulfoxide

Korea (TCCL): dimethyl sulfoxide

Philippines (RA6969): dimethyl sulfoxide

16 . Other information

Label requirements : CAUSES DAMAGE TO THE FOLLOWING ORGANS: SKIN, EYES, EYE, LENS OR CORNEA.
COMBUSTIBLE LIQUID AND VAPOR.
VAPOR MAY CAUSE FIRE.

Hazardous Material Information System (U.S.A.) :

Health	*	1
Fire hazard		2
Reactivity		1
Personal protection		C

Dimethyl Sulfoxide

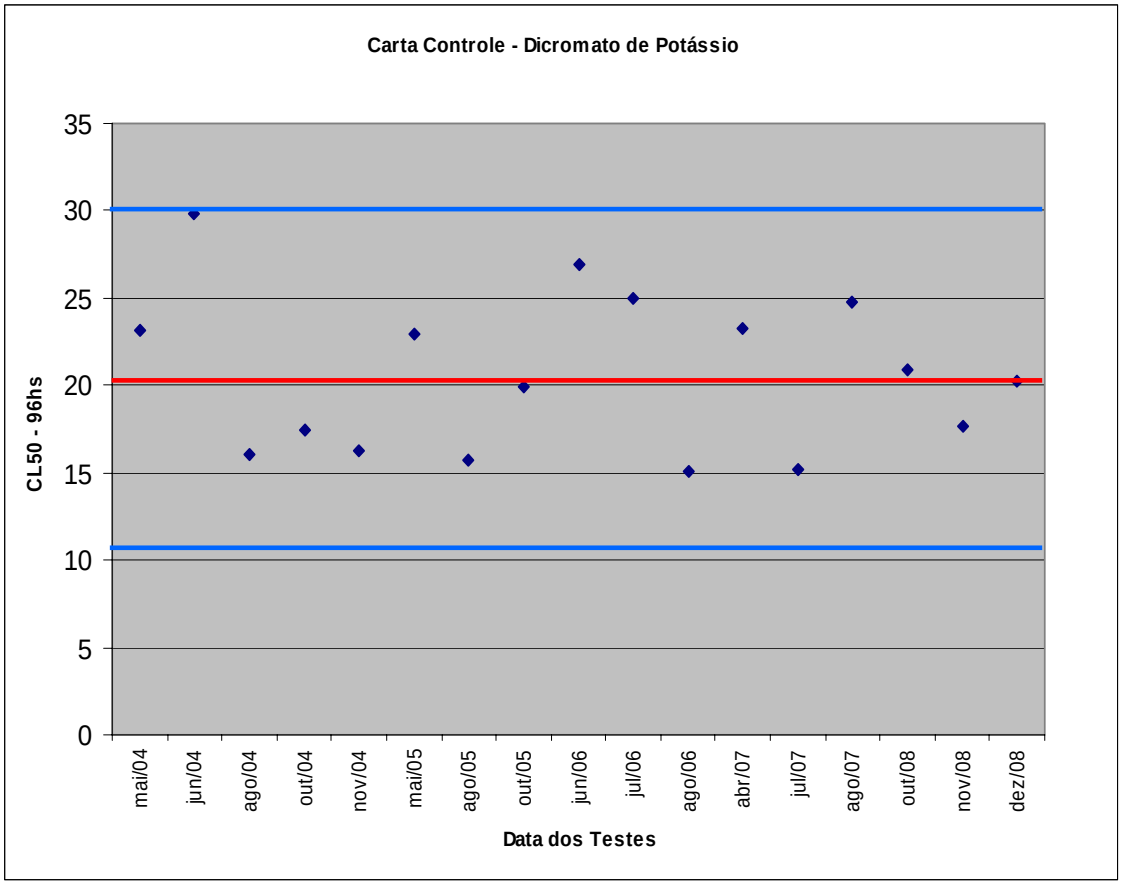
16 . Other information

National Fire Protection Association (U.S.A.) :

Notice to reader

To the best of our knowledge, the information contained herein is accurate. However, neither the above-named supplier, nor any of its subsidiaries, assumes any liability whatsoever for the accuracy or completeness of the information contained herein.
Final determination of suitability of any material is the sole responsibility of the user. All materials may present unknown hazards and should be used with caution. Although certain hazards are described herein, we cannot guarantee that these are the only hazards that exist.

ANEXO D – Carta-controle de sensibilidade para o copépodo *Nitokra sp*.


Carta Controle - Dicromato de Potássio
CL50 - 96hs
35
30
25
20
15
10
5
0
mai/04
jun/04
ago/04
out/04
nov/04
mai/05
ago/05
out/05
jun/06
jul/06
ago/06
abr/07
jul/07
ago/07
out/08
nov/08
dez/08
Data dos Testes

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)**. Rio de Janeiro. NBR 15350, 2006.

ABESSA, D. M. S. **Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, SP, Brasil**. Tese (Doutorado). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ABESSA, D. M. S; ZARONI, L. P; SOUSA, E. C. P. M; GASPARRO, M. R; PEREIRA, C. D. S; RACHID, B. R. F; DEPLEDGE, M; KING, R. S. Physiological and Cellular Responses in Two Populations of the Mussel *Perna perna* Collected at Different Sites from the Coast of São Paulo, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V.48(2). pp. 217-225, 2005.

ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química. **A Nova Politica de Substâncias Químicas da União Européia – REACH**. p. 10, 2007.

ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. Aquatic Toxicology Test Methods. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. A. Jr.; CAIRNS, J. Jr. **Handbook of Ecotoxicology**. Second Edition. Lewis Publisher. p. 19-43, 2002.

ADOLFSSON-ERICI, M.; PETTERSSON, M.; PARKKONEN, J.; STURVE, J. Triclosan, a commonly use bactericide found in humam milk and in the aquatic environment in Sweden**.** **Chemosphere**. 46: p. 1485-1489, 2002.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. RDC N° 306, Brasília, 7 de dezembro de 2004. Disponível em URL: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=13554. Acesso em 9 de setembro de 2009.

AGUERA, A.; ALBA-FERNÁNDEZ, A. R.; PIEDRA. L.; MÉZCUA, M.; GÓMEZ, M, J. Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. 480: p. 193-205, 2003.

ARANAMI, K. & READMAN, J.W. Photolytic degradation of Triclosan in freshwater and seawater. **Chemosphere**. 66. p. 1052-1056, 2007.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaios de Toxicidade com Organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP. Rima, p. 117-152, 2006.

ASTM – AMERICAN SOCIETY OF TESTING AND MATERIALS. E 724-89 Standard guide for conducting static toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve mollusks. **In: Annual Book of ASTM Standards: water and environmental technology**. Philadelphia, section 11, p. 377-394, 1992.

BALMER, M. E; POIGER, T; DROZ, C; ROMANIN, K; BERGQUVIST, P. A; MULLER, M. D; BUSER, H-R. Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. **Environ. Sci. Technol**. V 38 (2). p.390-395, 2003.

BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. Conclusions and future research needs. In: BARCELÓ, D. (editor). **Analyses, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle**. First edition. Elsevier. p. 515-526, 2007.

BEAUSSE, J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances**. Trends in Analytical Chemistry**. 23: p. 10-11, 2004.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. Aplicação dos Ensaios Ecotoxicológicos e Legislação Pertinente. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP. Rima, p. 347-359, 2006.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, 26 (4): p. 523-530, 2003.

BINELLI, A.; COGNI, D.; PAROLINI, M.; RIVA, C.; PROVINI,A. In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and citotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes. **Aquatic Toxicology**. 91: p. 238 – 244, 2009.

BOWEN, R. E; DEPLEDGE, M, H. Rapid Assessment of Marine Pollution (RAMP). **Marine Pollution Bulletin** 53: p. 631–639, 2006.

BORGMANN, U; BENNIE, D. T; BALL, A. L; PALABRICA, V. Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. **Chemosphere**. V. 66. pp. 1278–1283, 2007.

BLAISE, C.; GAGNÉ, F.; EULLAFFROY, P.; FÉRARD, J-F. Ecotoxicity of selected pharmaceuticals of urban origin discharged to the Saint-Lawrence River (Québec, Canadá): a review. **Braz. J. Aquat. Sci. Technol**. 10 (2): p. 29-51, 2006.

BLAYNE, M.; AVILA, C.; ZANDT, P-V. Review of REACH Annex IV – Establishing the minimun risk of a substance based on its intrinsic properties. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 56. p. 111–120, 2010.

BRASIL. **CONAMA, Resolução Federal N.º 357**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, Diário Oficial da União, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

BRASIL. **CONAMA, Resolução Federal N.º 358**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, Diário Oficial da União, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências.

BRASIL. Censo demográfico 2000. IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Rio de Janeiro. (2000). Disponível em: http://www.ibge.gov.br. Acesso em 21 de março de 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - MMA. **Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil na Escala da União**. Rio de Janeiro. MMA Brasília, 487p, 1996.

CAIRNS, J. Jr.; NIEDERLEHNER, B. R. **Ecological Toxicity Testing**. Lewis Publisher, Boca Raton, USA. p. 228, 1995.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**. 247: p.295-311, 2000.

CANESI, L.; CIACCI, C.; LORUSSO, L, C.; BETTI, M.; GALLO, G.; POJANA, G.; MARCOMINI, A. Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: Possible modes of action on non target organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**. C 145: p. 464-472, 2007.

CAPDEVIELLE, M; EGMOND, R. V; WHELAN, M; VERSTEEG, D; HOFMANN-KAMENSKY, M; INAUEN, J; CUNNINGHAM, V; WOLTERING, D. Consideration of Exposure and Species Sensitivity of Triclosan in the Freshwater Environment. **Integrated Environmental Assessment and Management**. V. 4 (1) pp. 15–23, 2007.

CEC (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES). Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, environmental risk assessment. **Luxembourg: Office for official publication of the European Communities**, 1996.

CESAR, A.; MARÍN-GUIRAO, L.; VITA, R.; MARÍN, A. Sensibilidad de anfípodos y erizos del Mar Mediterráneo a substancias tóxicas de referencia. **Ciencias Marinas**. 28(4): p. 407-417, 2002.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/informações.asp.> Acesso em 06 de julho de 2009.

COONEY, J.D. Sediment Tests. In: RAND, G. M. (Editor). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. Ecological Services Inc. North Palm Beach, Florida, 1995.

COSMETIC INGREDIENT HOTLIST. Changes to the Cosmetic Ingredient Hotlist. **List of Prohibited and Restricted Cosmetic Ingredients** (The Cosmetic Ingredient Hotlist). Canadá, 2010.

COOGAN, M, A.; EDZIYIE, R, E.; LA POINT, T, W.; VENABLES, B, J. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. **Chemosphere**. 67: p. 1911-1918, 2007.

CHAPMAN, P, M. Determining when contamination is pollution — Weight of evidence determinations for sediments and effluents. **Environment International** 33: p. 492–501, 2007.

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

CRANE, M.; WATTS, C.; BOUCARD, T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**. 367: p. 23-41, 2006.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? **Environ. Health. Perspectives**. 107 (6). p. 907-944, 1999.

DAUGHTON, C. G. Pharmaceuticals in the environment: sources and their management. In: BARCELÓ, D. (editor). **Analyses, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle**. First edition. Elsevier.p. 1-49, 2007.

DAYAN, A. D. Risk assessment of triclosan in humam breast milk. **Food and Chemical Toxicology**, 45: p. 125-129, 2007.

De LORENZO, M. E; FLEMING, J. Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** V 54. p. 203–210, 2008.

De LANGE, H. J; NOORDOVEN, W., MURK A. J; LURLING M; PEETERS E. T. H. M. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**. V. 78, pp. 209–216, 2006.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP. Rima, p. 153-184, 2006.

ELLIS, J. B. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. **Environmental Pollution**. 144: p. 184-189, 2006.
ENVIRONMENT AGENCY. Triclosan briefing. (2004). <http://environment-agency.gov.uk/commondata/acrobat/tricolsanbriefing 886859.pdf.> Acesso em 02 de novembro de 2010.

EUDRALEX – Volume 1 – Pharmaceutical Legislation Medicinal Products for Human Use: <http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-1/index_en.htm>, Acesso em 15 de outubro de 2010.

FAIR, P. A.; LEE, H-B.; ADAMS, J.; DARLING, C.; PACEPAVICIUS, G.; ALAEE, M.; BOSSART, G. D.; HENRY, N.; MUIR, D. Ocurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and their environment. **Environmental Pollution**. 157: p. 2248-2254, 2009.

FARRÉ, M., FERRER, I., GINEBREDA, A., FIGUERAS, M., OLIVELLA, L., TIRAPU, L., VILANOVA, M., BARCELÓ, D. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. **J. Chromatogr**. V 938. pp. 187−197, 2001.

FARRÉ, M; ASPERGER, D; KANTIANI, L; GONZÁLEZ, S; PETROVIC, M; BARCELÓ, D. Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*. **Anal Bioanal Chem**. V 390. p. 1999–2007, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Guidance for Industry: Environmental Assessment of Human Drug and Biologics Applications, Food and Drug Administration** (Center for Drug Evaluation and Research), CMC 6, Revision 1, 1998.

FONSECA, A.L. **A biologia das espécies *Daphnia laevis, Ceriodaphnia silvestrii* (Crustácea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poecillidae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais**. Dissertação de Mestrado em Hidráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. p. 210, 1991.

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

FRANZ, S.; ALTENBURGER, R, HEILMEIER, H.; SCHMITT-JANSEN, M. What contributes to the sensitivity of microalgae to triclosan? **Aquatic Toxicology.** V. 90: p.102-108, 2008.

FREIRE, M.M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. F.; ARIAS, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.** 12 (3): p. 347-354, 2008.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; ANDRÉ, C. Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Ecotoxicology and Environment Safety**. 64. P. 329-336, 2006.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; FOURNIER, M.; HANSEN, P. D. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. 143. p. 179-186, 2006.

GESAMP - Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. **A Sea of Troubles**. IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP. Rep. Stud. GESAMP N. 70. 35 pp, 2001.

GÓMEZ, M. J; BUENO, M. J. M; LACORTE, S; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R; AGUERA, A. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. **Chemosphere**. V. 66 pp. 993–1002, 2007.

GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: Ocorrência e determinação dos Interferentes endócrinos (IE) e Produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. (2006).

GLASER, A. The Ubiquitous Triclosan – A common antibacterial agent exposed. **Pesticides and You**. V. 24 (3). pp. 12-17, 2004.

HALDEN, R. U., PAULL, D. H. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in US water resources. **Environ. Sci. Technol**. V 39. p. 1420–1426, 2005.

HAMILTON, M. A., RUSSO R. C., THURSTON R. V. Trimmed Spearman–Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol**. 11:71. (1977).

HALLARE, A.V.; KOHLER, H-R.; TRIEBSKORN, R. Development toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenaco and its solvent, DMSO. Chemosphere. 56. p. 659-666, 2004.

HEATH, R. J; WHITE, S. W; ROCK, C. O. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. **Progress in Lipid Research**. V. 40. p 467–497, 2001.

HENSCHEL, K. P., WENZEL, A., DIEDRICH, M., FLIEDNER, A. Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. **Regul. Toxicol. Pharmacol**. V. 25, pp. 220−225, 1997.

ISHIBASHI, H.; MATSUMURA, N.; HIRANO, M.; MATSUOKA, M.; SHIRATSUSHI, H.; ISHIBASHI, Y.; TAKAO, Y.; ARIZONO, K. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. **Aquatic Toxicology**. 67: p. 167-179, 2004.

JJEMBA, P. K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. **Ecotoxicological and Environmental Safety**. 63. p. 113-130, 2006.

JONES, O. A.H.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. N. Potential Ecological and Human Health Risks Associated With the Presence of Pharmaceutically Active Compounds in the Aquatic Environment. **Critical Reviews in Toxicology.** 34(4): p. 335-350, 2004.

JONES, O. A.H.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. N. Ecotoxicity of pharmaceuticals. In: BARCELÓ, D. (editor). **Analyses, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle**. First edition. Elsevier. p. 387-417, 2007.

JONES , K. C.; VOOGT, P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. **Environmental Pollution**. V 100. p. 209-221, 1999.

KANETOSHI, A.; OGAWA, H.; KATSURA, E.; KANESHIMA, H. Chlorination of Irgasan DP300 and formation of dioxins from its chlorinated derivatives. **Journal of Chromatography.** 389: p. 139-153, 1987.

KELLY, J. R.; HARWELL, M. A. Indicators of ecosystem response and recovery. In: LEVIN, S. A.; HARWELIN, M. A.; KELLY, J. R.; and KIMBALL, K. D. (eds.) **Ecotoxicology: Problems and Approaches**. New York, Spring Vertag, pp. 9-40, 1989.

KIM, Y.; CHOI, K.; JUNG, J.; PARK, S.; KIM, P-G.; PARK, J. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepina, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. **Environment International**. 33. p. 370-375, 2007.

KING, R. Rapid assesment of marine pollution – Biological techniques. **Plymouth Environmental Research Center**, University of Plymouth, UK, 37p, 2000.

KIRSCHBAUM, A. A; SOUSA, E. C. P. M; EDINGER-NUNES, F. M; SOARES, K. C. V; MARTINS, M. M. S; OLIVEIRA, L. F. J; GASPARRO, M. R. Avaliação da taxa de eclosão dos ovos do copépodo bentônico *Nitokra sp* a partir de testes de toxicidade com diferentes números de organismos, com e sem alimentação. **Livro de Resumos do X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**. Bento Gonçalves, Brasil, 2008.

KUSTER, M.; ALDA, M. J. L.; HERNANDO, M. D.; PETROVIC, M.; MARTIN-ALONSO, J.; BARCELÓ, D. Analyses and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Lobregat river basin. **Journal of Hydrology**. 358. p. 112-123, 2008.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S.. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin.** 46 (2): p. 182-186, 2003.

LAMEIRA, V. Estudo dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco Triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestrii* (CLADOCERA, CRUSTACEA). **Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo**. p 209, 2008.

LAMPARELLI, M. C., COSTA, M. P., PRÓSPERI, V. A., BEVILACQUA, J. E; ARAÚJO, R. P. A., EYSINK, G. G. J., POMPÉIA, S. In: CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Sistema Estuarino de Santos e São Vicente**. 141 pp + anexos. 2001.

LARSSON, D. G. J.; PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journal of Hazardous Materials**. 148. P. 751-755, 2007.

LATCH, D. E.; PACKER, J. L.; ARNOLD, W. A.; McNEILL, K. Photochemical conversion of triclosan to 2,8 – dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. 158: p. 63-66, 2003.

LINDSTROM, A.; BUERGE, I. J.; POIGER, T.; BERGQVIST, P-A.; MULLER, M. D.; BUSER, H-R. Occurrence and Environmental Behavior of the Bactericide Triclosan and its Methyl Derivative in Surface Waters and in Wastewater. **Environ. Sci. Technol**. 36: p. 2322-2329, 2002.

LORES, M.; LLOMPART, M.; SANCHEZ-PRADO, L.; GARCIA-JARES, C.; CELA, R. Confirmation of the formation of dichlorodibenzo-p-dioxin in the photodegradation of triclosan by photo-SPME. **Short Communication. Anal Bioanal Chem**. 381: p 1294–1298, 2005.

LOOS, R. LOCORO, G; COMERO, S; CONTINI, S; SCHWESIG, D; WERRES, F; BALSAA, P; GANS, O; WEISS, S; BLAHA, L; BOLCHI, M; GAWLIK, B. M. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. **Water Research**. V. 44. pp. 4115-4126, 2010.

LOTUFO, G. R.; FLEEGER, J. W. Effects of sediment-associated phenantrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods**. Mar. Ecol. Progr. Serv**. 151: p. 91-102, 1997.

LOTUFO, G. R.; ABESSA, D. M. S. Uso de copépodes bentônicos estuarinos do Estado de São Paulo em testes de toxicidade com sedimentos. **In: Encontro de Ecotoxicologia, 6. Reunião da SETAC Latino-americana**, 3. São Carlos, Resumos, p.130, 2000.

LOWE, D. M.; PIPE, R. K. Contaminant induced lysossomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. **Aquatic Toxicology**. v30. p. 357-365, 1994.

LOWE, D. M.; FOSSATO, V. U.; DEPLEDGE, M. H. Contaminant-induced lysossomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study. **Marine Ecology Progress Series**. 129: p. 189-196, 1995.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. **Oecol. Bras**. 12 (3): p. 355-381, 2008.

McAVOY, D. C.; SCHATOWITZ, B.; JACOB, M.; HAUK, A.; ECKHOFF, W. S. Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. **Environmental Toxicology and Chemistry.** 21: p. 1323-1329, 2002.

McHENRY, M. N; SUCHAR, V; CHIGBU, P. The effects of triclosan on select marine algae species. **Fifth International Symposium on Recent Advances in Environmental Health Research**. MS, EUA, 2008.

MOORE, M. N. Cellular responses to pollutants. **Mar Pollut Bull**.16: p. 134-139, 1985.

MOORE, M. N. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. **Histochemical Journal**. 22: p. 187-191, 1990.

MOORE, M. N.; LOWE, D.; ALLEN, I.; MCVEIGH, A.; SOMERFIELD, P. Predicting health of the environment – lysosomal biomarker responses in mussels. **In: United Nations Environment Programme Mediterranean Action Plan – MEDPOL**. Map Technical Reports Series Athens. n. 166. p.245, 2007.

MOZETO, A. A. & ZAGATTO, P. A. Introdução de Agentes Químicos no Ambiente. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP. Rima, p. 15-38, 2006.

MULROY, A. When the cure is the problem**. Water Environment Technology**. 13(2): p. 32-36, 2001.

NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em Ecotoxicologia Marinha – Aplicações no Brasil.** São Paulo, SP. Artes Gráficas e Indústria Ltda. p. 262, 2002.

NASSEF, M; MATSUMOTO, S; SEKI, M; KHALIL, F; KANG, I. J; SHIMASAKI, Y; OSHIMA, Y; HONJO, T. Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**. V. 80. p 1095–1100, 2010.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA. S. A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como Instrumentos Preventivos de Poluição. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP. Rima, p. 413-432, 2006.

NEWMAN, M. C.; UNGER, M. A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. Second Edition. Lewis Publisher, 2002.

NICHOLSON, S. Ecotoxicological and toxicological responses to cooper in *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae) haemocyte lysossomal membranes. **Chemosphere**. v 45. p. 399-407, 2001.

NISHI, I.; KAWAKAMI, T.; ONODERA, S. Monitoring of triclosan in the Surface Water of the Tone Canal, Japan. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**. v. 80: p. 163-166, 2008.

NORBERG-KING, T. An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center. **Technical Report**. 05-88, 1988.

NUNES, B.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. **Ecotoxicological and Environmental Safety**. 61. p. 413-419, 2005.

NYBAKKEN, J. A. **Marine Biology: An Ecological Approach**. San Francisco, CA, 5th ed. 2001.

OECD – Organisation for economic co-operation and development. **The application of biotechnology to industrial sustainability**. Paris, OECD, 2001b.
OLIVEIRA, R; DOMINGUES, I; GRISOLIA, C. K; SOARES, A. M. V. M. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. **Environ. Sci. Pollut. Res.** V 16. p 679–688, 2009.

ORVOS, D. R.; VERSTEEG, D. J.; INAUEN, J.; CAPDEVIELLE, M.; ROTHENSTEIN, A.; CUNNINGHAM, V. Aquatic toxicity of triclosan. **Environment Toxicology and Chemistry**. vol. 21, p.1338- 1349, 2002.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L. Acetylcolinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Mar. Poll. Bull**. 32 (2): p. 225-231, 1996.

PALENSKE, N. M.; NALLANI, G. C.; DZIALOWSKI, E. M. Physiological effects and bioconcentration of triclosan on amphibian larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**. C, doi: 10.1016/cbpc.2010.04.009, 2010.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIBN. W. AND FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, 32 : (2), 225-231, 1996.

PEREIRA, C. D. S. **Biomarcadores de exposição, efeito e bioacumulação de xenobióticos em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) transplantados ao longo do litoral de São Paulo**. Tese (Doutorado). Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PONEZI, A. N.; DUARTE, M. C. T.; CLAUDINO. Fármacos Matrizes Ambientais – Revisão (2006). Disponível em: <http:www.cori.unicamp.br/ct2006/trabalhos/fármacos %20em%20matrizes%20ambientais. doc> Acesso em: 11 jan. 2008.

PORTO, G. E. L. Responsabilidade pela poluição marinha. Centro de Estudos Judiciários do Conselho da Justiça - R. CEJ, Brasília. N. 12, p. 51-57, 2000.

PUSCEDDU, F. H. Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados de água doce com ênfase em ensaios com sedimento marcado ("spiked sediment"). **Dissertação de mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo**. p. 116, 2009.

PUSCEDDU, F. H., LAMEIRA, V; BOHRER, M. B. Efeitos crônicos do fármaco Triclosan sobre *Ceriodaphnia dubia* através de ensaios crônicos de ecotoxicologia. **Livro de Resumos do VIII Congresso SETAC LA**, 2007.

QUINN, B.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. An investigation into acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarians, *Hydra attenuata*. **Science the Total Environment**. 389. p. 306-314, 2008.
RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L. S. Introduction to Aquatic Ecotoxicology. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. Ecological Services Inc. North Palm Beach, Florida, 1995.

RUPPERT, E.E., FOX, R.S. & BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados.** 7ª ed., Ed. Roca, São Paulo, p. 1145, 2005.

SÃO PAULO. **Resolução SMA N.º 3**. Secretaria do Meio Ambiente, de 22 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo.

SANCHEZ-PRADO, L.; LLOMPART, M.; LORES, M.; GARCÍA-JARES, C; BAYONA, J.M.; CELA, R. Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction. **Chemosphere** 65: p. 1338–1347, 2006.

SANTOS, L. H. M. L. M.; ARAÚJO, A. N.; FACHINI, A.; PENA, A.; MATOS-DELERUE, C.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**. 175. p. 45–95, 2010.

SIMM, M. Avaliação da qualidade da água em amostras provenientes da Baía da Babitonga – SC, através de ensaios de embriotoxicidade e de exposição prolongada ao ar, utilizando mexilhão da espécie *Perna perna* (linnaeus, 1758) na fase larval e adulta. **Dissertação de Mestrado. Universidade de Joinville – UNIVILLE**. P. 107, 2009.

SOUSA, E. C. P. M. Toxicologia Marinha: Histórico. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M (Editores). **Métodos em Ecotoxicologia Marinha – Aplicações no Brasil.** São Paulo, SP. Artes Gráficas e Indústria Ltda. p.262, 2002.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R-D.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**. 225. p. 135-141, 1999.

TATARAZAKO, N., ISHIBASHI, H., TESHIMA, K., KISHI, K., ARIZONO, K. Effects of triclosan on various aquatic organisms. **Environ. Sci**. 11. p. 133–140, 2004.

TERNES, T. A. Editorial to special issue in Water Research Emerging contaminants in water. **Water Research**. v. 44. p. 351, 2010.

TERNES, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and Rivers. **Water Research**. Vol. 32, N. 11, pp. 3245-3260, 1998.

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

THOMAS, K. V.; LANGFORD, K. Occurrence of pharmaceuticals in the aqueous environment. In: BARCELÓ, D. (editor). **Analyses, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle**. First edition. Elsevier. p. 337-356, 2007.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 1: p. 151-173, 1977.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME – UNEP Chemicals' work: breaking the barriers to information access, 2003. Disponível em: <**http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12909405**>. Acesso em: 03 mai. 2010.

US EPA – United States Environmental Protection Agency. **Reregistration Eligibility Decision for Triclosan**. List B. Case No. 2340. p. 98, 2008.

US EPA - United States Environmental Protection Agency. EPA/600/4-91/003 – Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and recliving waters to marine and estuarine organisms**.** Cincinati: U.S. **Environmental Protection Agency**. p. 579, 1991.

US EPA – **United States Environmental Protection Agency**. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth edition. EPA-821-R-02-012. 266p, 2002a.

US EPA – **United States Environmental Protection Agency**. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. Fourth Edition. EPA-821-R-02-013, 2002b.

VIGHI, M.; FINIZIO, A.; VILLA, S. The Evolution of Environmental Quality Concept: From the US EPA Red Book to the European Water Framework Directive**.** ESPR – **Environ. Sci & Pollut Res**. 13 (1) p. 9 – 14, 2006.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M. & PEAKALL, D. B. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, London, UK, 321p, 1996.

WARD, G. S. Saltwater tests. In: RAND, G. M. (Editor). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. Ecological Services Inc. North Palm Beach, Florida, 1995.

WEDDERBURN, J.; McFADZEN, I.; SANGER, R. C.; BEESLEY, A.; HEATH, C.; HORNSBY, M.; LOWE, D. The field application of cellular and physiological biomarkers, in the mussel *Mytilus edulis*, in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathlogy. Mar. Poll. Bull. V 40 (3): p. 257-267, 2000.

XIE, Z.; EBINGHAUS, R.; FLOSER, G.; CABA, A.; RUCK, W. Occurrence and distribution of triclosan in the German Bight (North Sea). **Environmental Pollution** (2008), doi: 10.1016/j.envpol.2008.04.008, 2008.

YANG, L-H; YING, G-G; SU, H-C; STAUBER, J. L; ADAMS, M. S; BINET, M. T. Growth-Inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Environ. Toxicol. Chem**. V 27. N. 5, p. 1201–1208, 2008.

YING, G-G; YU, X-Y; KOOKANA, R. S. Biological degradation of triclocarban and triclosan in a soil under aerobic and anaerobic conditions and comparison with environmental fate modeling. **Environmental Pollution**. V 150. p 300-305, 2007.

YU, J, C.; KWONG, T, Y.; LUO, Q.; CAI, Z. Photocatalytic oxidation of triclosan. **Chemosphere**. 65: p. 390-399, 2006.

YU, J. T; BOUWER, E. J; COELHAN, M. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. **Agricultural Water Management**. V. 86. pp. 72-80, 2006.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP. Rima, p. 1-13, 2006.

ZAGATTO, P. A. O Uso de Substâncias de Referência no Controle de Qualidade de Ensaios Ecotoxicológicos. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Editores). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos, SP. Rima, p. 185-197, 2006.

ZHAO, J-L.; YING, G-G.; LIU, Y-S.; CHEN, F.; YANG, J-F.; WANG, L. Occurrence and risk of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: From source to the receiving environment. **Journal of Hazardous Materials**. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.02.082, 2010.

ZARONI, L. P.; ABESSA, D. M. S.; LOTUFO, G. R.; SOUSA, E. C. P. M.; PINTO, Y. A. Toxicity Testing with Embryos of Marine Mussels: Protocol Standardization for *Perna perna* (Linnaeus, 1758). **Bull. Environ. Contam. Toxicol**. 74: p. 793-800, 2005.