

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS. UNIFAL-MG
CAMPUS AVANÇADO DE POÇOS DE CALDAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA AMBIENTAL-
PPGCEA**

ALINE ANDRADE GODOY

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS FÁRMACOS
CLORIDRATO DE PROPRANOLOL E LOSARTANA
POTÁSSICA, EM AÇÃO INDIVIDUAL E COMBINADA, NA
MACRÓFITA *Lemna minor* L. (1753)**

Poços de Caldas/MG
2014

ALINE ANDRADE GODOY

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS FÁRMACOS
CLORIDRATO DE PROPRANOLOL E LOSARTANA
POTÁSSICA, EM AÇÃO INDIVIDUAL E COMBINADA, NA
MACRÓFITA *Lemna minor* L. (1753)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental

Área de concentração: Ciência e Engenharia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Paulo Augusto Z. Pamplin
Coorientador: Prof. Dr. Fábio Kummrow

Poços de Caldas/MG
2014

ALINE ANDRADE GODOY

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DOS FÁRMACOS CLORIDRATO
DE PROPRANOLOL E LOSARTANA POTÁSSICA, EM AÇÃO
INDIVIDUAL E COMBINADA, NA MACRÓFITA *Lemna minor* L. (1753)**

A banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia Ambiental.

Aprovada em: 25 de julho de 2014.



Prof. Dr. Paulo Augusto Zaitune Pamplin

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)



Profa. Dra. Patrícia Neves Mendes

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)



Profa. Dra. Odete Rocha

Instituição: Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

À minha mãe, Maria Conceição (*in memoriam*),
por ter sido minha grande mestra no ensino da
humildade, do esforço e da importância do estudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a vida e por tê-la conservado até esse momento para que eu pudesse vivenciar mais essa etapa.

Ao Prof. Fábio Kummrow por toda a atenção e dedicação no auxílio durante a realização deste trabalho. Ao meu grande exemplo de competência profissional, de dedicação à docência e fonte de inspiração para prosseguir na carreira acadêmica, meus eternos agradecimentos.

Ao Prof. Carlos Antônio Neves, pela enorme atenciosidade com que me auxiliou no entendimento dos cálculos, durante a etapa inicial e mais difícil deste trabalho. Meus eternos agradecimentos.

Ao Prof. Paulo Augusto Zaitune Pamplin pelo convite para ingresso no Mestrado.

À Profa. Odete Rocha pelos ensinamentos na disciplina de Ecotoxicologia Aquática, os quais foram essenciais na realização deste trabalho.

À Profa. Patrícia Neves Mendes por toda a paciência e dedicação nos ensinamentos e no auxílio com os cálculos estatísticos.

À Profa. Gisela de Aragão Umbuzeiro pelas preciosas dicas e pelos ensinamentos durante o exame de qualificação, os quais certamente estão refletidos neste trabalho.

Aos meus colegas técnicos de laboratório João, Flávia, Bruno, Carlos, Ícaro, Alessandra, Ana Paula, Cristiano e Luis Gustavo pela companhia e pela paciência nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas-“irmãos” Júlio César, Eduardo e Carlos pelas agradáveis companhias durante as atividades de laboratório.

Ao Dr. Maurício de Castro Gomes, exemplo inigualável de profissionalismo médico e de humanismo admiráveis, pelos cuidados médicos essenciais a mim prestados sempre.

À minha querida amiga Telma, por ter carinhosamente estado presente em momentos difíceis de minha vida, meu muito obrigada.

À minha querida amiga Cláudia, pela linda amizade que se iniciou na Unifal e que perdurará pela vida. Por estar carinhosamente presente e compartilhar momentos difíceis e cruciais em minha vida, meus eternos agradecimentos.

Ao meu amor, Luciano, pelo efetivo auxílio em todas as etapas de realização deste trabalho e pelo amor, carinho, paciência e sabedoria comigo compartilhados todos os dias. Muito obrigada mesmo.

Aos meus irmãos, Gustavo e Henrique, pela amizade compartilhada desde sempre.

E finalmente e principalmente, aos meus pais, Domingos e Maria Conceição (*in memoriam*) por terem me ensinado a simplicidade, a honestidade, a humildade, a dedicação e a persistência nos estudos, no trabalho e na vida. Sou eternamente grata a vocês.

“Um dos aspectos mais alarmantes da poluição química da água é o fato de que aqui - nos rios, nos lagos, nos reservatórios ou, quanto a isto, também no copo de água que se serve à mesa do almoço ou do jantar - se encontram misturadas várias substâncias químicas que nenhum cientista de responsabilidade pensaria em combinar em seu laboratório”.

Rachel Carson (Primavera Silenciosa, 1962)

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos ecotoxicológicos das ações individual e combinada dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica, por meio do ensaio de inibição do crescimento da macrófita aquática *Lemna minor* e comparar esses efeitos com os preditos por meio dos modelos de adição de concentração e ação independente. Buscou-se também calcular critérios de qualidade da água para a proteção da vida aquática para esses dois fármacos. Os testes de sensibilidade foram realizados empregando-se o cloreto de sódio como substância de referência. Os testes ecotoxicológicos foram conduzidos de acordo com Protocolo da OECD, com a modificação do uso de fotoperíodo ao invés de luz contínua para simular condições ambientais mais realísticas. As bases de dados *Ecotox Database* e da *National Centers for Coastal Ocean Science* foram consultadas, respectivamente, para a obtenção de dados ecotoxicológicos para a derivação dos critérios de qualidade da água e para a obtenção de dados previstos por meio de relações quantitativas estrutura-atividade (RQEA). Com relação aos testes de sensibilidade, todos os resultados estiveram dentro da faixa de aceitabilidade ao nível de confiança de 95%, com um valor médio de concentração efetiva mediana (CE₅₀) de 4042,6 mg.L⁻¹. Os testes com o fármaco cloridrato de propranolol para os parâmetros número de frondes, área foliar total e peso fresco resultaram nos valores médios de CE₅₀ respectivos de 101,4 mg.L⁻¹; 76,2 mg.L⁻¹ e 84,0 mg.L⁻¹, enquanto que nos testes com a losartana potássica esses valores foram, respectivamente, de 63,9 mg.L⁻¹; 61,3 mg.L⁻¹ e de 76,9 mg.L⁻¹. Os valores de CENO e de CEO obtidos nos testes com o cloridrato de propranolol foram de 1,56 mg.L⁻¹ e 3,1 mg.L⁻¹, respectivamente, enquanto que nos testes com a losartana potássica, esses valores foram de 0,78 mg.L⁻¹ e de 1,56 mg.L⁻¹. O teste de ação combinada com os fármacos mostrou que ambos os modelos preditivos superestimaram, em todos os níveis de concentração testados, os efeitos de toxicidade da mistura nos testes com a *L. minor*. Portanto, observaram-se interações antagonísticas na ação combinada desses dois fármacos em relação aos efeitos preditos pelos modelos de referência. Com relação aos critérios de qualidade da água, calcularam-se os valores de 0,9 e 0,18 µg.L⁻¹ de cloridrato de propranolol para a proteção das espécies pelágicas de água doce e salina, respectivamente, enquanto que para a losartana potássica, os valores preliminares calculados para a proteção das espécies de água doce e marinhas foram, respectivamente, de 0,055 e de 0,0055 µg.L⁻¹. Os resultados obtidos permitiram observar que a losartana potássica mostrou-se mais tóxica para *L. minor* do que o cloridrato de propranolol. Além disso, a macrófita mostrou-se mais sensível aos efeitos de toxicidade da losartana potássica do que outras espécies relatadas na literatura. O teste de mistura mostrou que a capacidade dos dois modelos avaliados em predizer a toxicidade de misturas é limitada. As concentrações do cloridrato de propranolol em ambientes aquáticos não ultrapassam os critérios de qualidade da água. Testes crônicos adicionais com a losartana são necessários para a derivação de critérios definitivos.

Palavras-chave: *Lemna minor*. Fármacos anti-hipertensivos. Fitotoxicidade de fármacos. Toxicidade de mistura. Critérios de qualidade da água

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the single and joint ecotoxicological effects of the drugs propranolol hydrochloride and losartan potassium, using the *Lemna minor* growth inhibition test and to compare the observed effects with those predicted by the models of concentration addition and independent action. In addition, water quality criteria were derived for the protection of aquatic life against the possible adverse effects caused by these antihypertensive drugs. The sensitivity tests were carried out employing sodium chloride as a reference substance. Ecotoxicological tests were carried out according to OECD protocol, with the modification of using photoperiod instead of continuous lighting, in order to provide conditions closer to the environmental ones. The Ecotox Database and the database of the National Centers for Coastal Ocean Science were consulted for derivation of the water quality criteria and for the data predicted by quantitative structure-activity relationships (QSARs), respectively. With regard to the sensitivity tests, all results were within the range of acceptability at a 95% confidence level, with a mean value of median effective concentration (EC₅₀) of 4042.6 mg.L⁻¹. The tests with propranolol hydrochloride for the parameters frond number, total frond area and fresh weight resulted in mean EC₅₀ values of 101.4 mg.L⁻¹; 76.2 mg.L⁻¹ and 84.0 mg.L⁻¹, respectively, whereas in the tests with losartan potassium, those EC₅₀ values were 63.9 mg.L⁻¹, 61.3 mg.L⁻¹ and 76.9 mg.L⁻¹, respectively. The NOEC and LOEC values obtained in the tests with propranolol hydrochloride were 1.56 mg.L⁻¹ and 3.1 mg.L⁻¹, respectively, whereas in the tests with losartan potassium, these values were 0.78 mg.L⁻¹ and 1.56 mg.L⁻¹, respectively. Both the reference predictive models overestimated the mixture toxicity of the pharmaceuticals at all the effect concentration levels evaluated in the *L. minor* test. Therefore, the mixture of propranolol hydrochloride and losartan potassium showed an antagonistic interaction in the *L. minor* test in comparison to the predicted effects. Regarding to the water quality criteria, the values of 0.9 and 0.18 µg.L⁻¹ of propranolol hydrochloride were calculated for the protection of pelagic organisms living in freshwater and marine ecosystems, respectively, whereas for losartan potassium, the calculated preliminary criteria for protection of pelagic organisms living in freshwater and saltwater ecosystems were 0.055 and 0.0055 µg.L⁻¹, respectively. The results showed that losartan potassium proved to be more toxic to *L. minor* than propranolol hydrochloride. Furthermore, this macrophyte seemed to be more sensitive to losartan toxicity than other organisms reported in the literature. The mixture test showed that the capability of the two reference models in accurately predicting the mixture toxicity is limited. The concentrations reported of propranolol hydrochloride in aquatic environment are not usually higher than the water quality criteria values. More data on chronic test to losartan are necessary in order to derive definitive criteria.

Keywords : *Lemna minor*. Antihypertensive pharmaceuticals. Phytotoxicity of pharmaceuticals. Mixture toxicity. Water quality criteria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema das possíveis fontes e rotas de ocorrência de resíduos farmacológicos no ambiente aquático.....	20
Figura 2 - Estrutura química do cloridrato de propranolol.....	49
Figura 3 - Estrutura química da losartana potássica.....	52
Figura 4 - A macrófita aquática <i>Lemna minor</i>	57
Figura 5 - Carta-controle da sensibilidade de <i>L. minor</i> ao cloreto de sódio (NaCl).	71
Figura 6 - Curvas concentração-resposta dos efeitos do fármaco cloridrato de propranolol para a macrófita <i>L. minor</i> : A) Curva referente ao teste 1; B) Curva referente ao teste 2; C) Curva referente ao teste 3.	72
Figura 7 - Gráficos das áreas médias foliares totais (cm ²), com respectivas barras de desvio-padrão, da <i>L. minor</i> exposta a diferentes concentrações de propranolol e no grupo controle, durante os 7 dias de teste: (Os * indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; $\alpha = 0,05$)	76
Figura 8 - Gráficos das curvas concentração-resposta referentes aos 3 testes realizados na avaliação dos efeitos do cloridrato de propranolol na inibição do crescimento da <i>L. minor</i> , avaliada pela área foliar total: A) Gráfico referente ao teste 1; B) Gráfico referente ao teste 2; C) Gráfico referente ao teste 3	78
Figura 9 - Curvas concentração-resposta dos efeitos de inibição da taxa de crescimento de <i>L. minor</i> avaliada pelo peso fresco: A) Curva referente ao teste 1; B) Curva referente ao teste 2; C) Curva referente ao teste 3	83
Figura 10 - Aspectos macroscópicos das frondes de <i>L. minor</i> no grupo controle e nas expostas ao fármaco cloridrato de propranolol, após 24 h de início dos testes	86
Figura 11 - Aspectos macroscópicos das frondes de <i>L. minor</i> após 48 h de início dos testes:	88
Figura 12- Aspectos macroscópicos das plantas após 7 dias de teste com o cloridrato de propranolol.....	90
Figura 13 - Curvas concentração-resposta dos efeitos do fármaco losartana potássica para a macrófita <i>L. minor</i> , avaliados com base no número de frondes: A) Gráfico referente ao teste 1; B) Gráfico referente ao teste 2; C) Gráfico referente ao teste 3	94
Figura 14 - Gráficos das áreas médias foliares totais (cm ²), com respectivas barras de desvio-padrão, da <i>L. minor</i> exposta a diferentes concentrações de losartana e no grupo controle, durante os 7 dias de teste: : (Os * indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; $\alpha = 0,05$)	98
Figura 15 - Curvas concentração-resposta dos efeitos do fármaco losartana potássica para a macrófita <i>L. minor</i> , avaliados com base na área foliar total: A) Gráfico referente ao teste 1; B) Gráfico referente ao teste 2; C) Gráfico referente ao teste 3	100
Figura 16 - Curvas concentração-resposta dos efeitos do fármaco losartana para a macrófita <i>L. minor</i> , avaliados com base no peso fresco: A) Gráfico referente ao teste 1; B) Gráfico referente ao teste 2; C) Gráfico referente ao teste 3	104
Figura 17 - Aspectos macroscópicos das frondes de <i>L. minor</i> no grupo controle e nas expostas ao fármaco losartana potássica, após 5 dias de testes.....	107
Figura 18 - Aspectos macroscópicos das macrófitas expostas ao fármaco losartana potássica no último dia de testes.....	108
Figura 19 – Valores médios e respectivos desvios-padrão (barras) da porcentagem de inibição da taxa de crescimento de <i>L. minor</i> exposta a diferentes níveis de concentrações da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica.	112

- Figura 20** - Comparação da toxicidade medida da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica para *L. minor*, em relação às toxicidades em ação individual de cada fármaco e a toxicidade de mistura predita pelos conceitos de adição de concentração e de ação independente.116
- Figura 21** - Comparação das proporções residuais de efeito (%ERR) dos desvios dos efeitos da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica sobre *L. minor*, em relação aos efeitos preditos pelos modelos de adição de concentração e de ação independente.117
- Figura 22** - Alterações macroscópicas observadas nas frondes de *L. minor* pela ação combinada dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica, após 7 dias de teste 120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de ocorrências de fármacos em amostras ambientais, descritos na literatura.....	23
Tabela 2 - Exemplos de concentrações do fármaco cloridrato de propranolol, detectadas nos diversos ambientes aquáticos.....	32
Tabela 3 - Exemplos relatados na literatura dos efeitos ecotoxicológicos de alguns fármacos para as diversas espécies de diferentes níveis tróficos.....	34
Tabela 4 - Dados ecotoxicológicos dos efeitos do fármaco cloridrato de propranolol a diferentes espécies de organismos-teste.....	41
Tabela 5 - Dados ecotoxicológicos dos efeitos da losartana potássica.....	48
Tabela 6 - Nome químico, peso e fórmula moleculares e propriedades físico-químicas do cloridrato de propranolol.....	50
Tabela 7 - Nome químico, fórmula e peso moleculares e propriedades físico-químicas da losartana potássica.....	52
Tabela 8 - Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) com a média resultante, coeficiente de variação (C.V.) e desvio-padrão calculados a partir dos nove testes de sensibilidade com a <i>L. minor</i> . 69	69
Tabela 9 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos respectivos ajustes logísticos com respectivos desvios-padrão para as curvas concentração-resposta dos efeitos de inibição percentual da taxa de crescimento pelo cloridrato de propranolol sobre <i>L. minor</i> , avaliados pelo número de frondes.....	74
Tabela 10 - Valores de CE_{10} , CE_{20} , CE_{50} , CE_{70} e CE_{80} dos efeitos de cloridrato de propranolol para <i>L. minor</i> , calculados a partir das equações das análises de regressão.....	74
Tabela 11 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos ajustes logísticos para as curvas concentração-resposta dos efeitos do cloridrato de propranolol na inibição do crescimento de <i>L. minor</i> , avaliados pela área foliar.....	80
Tabela 12 - Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) referentes aos 3 testes realizados de inibição do crescimento de <i>L. minor</i> por cloridrato de propranolol, baseado na área foliar total.....	81
Tabela 13 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos ajustes logísticos para as curvas concentração-resposta dos efeitos do cloridrato de propranolol na inibição do crescimento de <i>L. minor</i> , avaliados pelo peso fresco.....	84
Tabela 14 - Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) referentes à inibição do crescimento de <i>L. minor</i> por cloridrato de propranolol, baseada no peso fresco, calculados para os 3 testes realizados com o fármaco.....	85
Tabela 15 - Valores de pH e de variação de pH (ΔpH) medidos a 25°C em cada uma das concentrações testadas, nos dias inicial e final de cada um dos três testes realizados com o fármaco cloridrato de propranolol.....	92
Tabela 16 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos ajustes logísticos para as curvas concentração-resposta dos efeitos da losartana na inibição do crescimento de <i>L. minor</i> , avaliados pelo número de frondes.....	95
Tabela 17 - Valores de CE_{10} , CE_{20} , CE_{50} , CE_{70} e CE_{80} ($mg.L^{-1}$) dos efeitos de losartana para <i>L. minor</i> , calculados a partir das equações das análises de regressão.....	96
Tabela 18 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos ajustes logísticos para as curvas concentração-resposta dos efeitos da losartana na inibição do crescimento de <i>L. minor</i> , avaliados pela área foliar.....	102
Tabela 19 - Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) referentes aos 3 testes realizados de inibição do crescimento de <i>L. minor</i> pela losartana, baseado na área foliar total.....	102
Tabela 20 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos ajustes logísticos para as curvas concentração-resposta dos efeitos da losartana na inibição do crescimento de <i>L. minor</i> , avaliados pelo peso fresco.....	105
Tabela 21 - Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) referentes à inibição do crescimento de <i>L. minor</i> pela losartana, baseada no peso fresco, calculados para os 3 testes realizados com o fármaco.....	106

Tabela 22 - Valores de pH e de Δ pH medidos a 25°C nos dias inicial e final, nos 3 testes realizados para a avaliação dos efeitos tóxicos da losartana potássica sobre a <i>L. minor</i>	110
Tabela 23 - Concentrações dos fármacos testados aplicadas no teste de mistura com a macrófita <i>L. minor</i>	111
Tabela 24 - Valores médios de porcentagem de inibição da taxa de crescimento (%I _r) obtidos no teste de mistura realizado com <i>L. minor</i>	112
Tabela 25 - Valores de inibição (%) da taxa de crescimento média de <i>L. minor</i> , que seriam causados em ação individual pelo cloridrato de propranolol, calculados para cada um dos 3 testes com esse fármaco, em cada uma das concentrações efetivas testadas na mistura.....	114
Tabela 26 - Valores de inibição (%) da taxa de crescimento média de <i>L. minor</i> , que seriam causados em ação individual pela losartana potássica, calculados para cada um dos 3 testes com esse fármaco, em cada uma das concentrações efetivas testadas na mistura.....	114
Tabela 27 - Toxicidade da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica para <i>L. minor</i> , em comparação com as toxicidades medidas em ação individual e a toxicidade da mistura predita pelos conceitos de adição de concentração e ação independente.	115
Tabela 28 - Valores de proporções residuais de efeito (% ERR), calculados para os desvios dos efeitos da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica em relação aos valores preditos pelos modelos de adição de concentração e de ação independente.	117
Tabela 29 - Valores de pH e de Δ pH medidos entre os dias inicial e final, nos 3 testes realizados para a avaliação dos efeitos tóxicos da losartana potássica sobre a <i>L. minor</i>	122
Tabela 30 - Dados para derivação de critérios de proteção da vida aquática de espécies pelágicas de água doce e salina, com relação aos efeitos do cloridrato de propranolol (CAS n° 318-98-9).	123
Tabela 31 - Dados ecotoxicológicos para os efeitos do fármaco losartana potássica, obtidos por meio de relações quantitativas estrutura-atividade (RQEA) calculadas pelo ECOSAR.....	125

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos	17
1.1.1 <i>Objetivo geral</i>	17
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Rotas de entrada e destino de fármacos em ambientes aquáticos	19
2.2 A ocorrência de fármacos em amostras ambientais	22
2.2.1 A presença dos fármacos propranolol e losartana em ecossistemas aquáticos	31
2.3 Efeitos de toxicidade de fármacos em organismos aquáticos	33
2.3.1 Efeitos ecotoxicológicos dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica em organismos aquáticos	40
2.4 Os fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica e as suas propriedades farmacológicas e físico-químicas	48
2.4.1 <i>O cloridrato de propranolol e suas propriedades farmacológicas e físico-químicas</i>	48
2.4.2 <i>A losartana potássica e suas propriedades farmacológicas e físico-químicas</i>	51
2.5 A predição de adição de concentração ou de ação independente para efeitos de combinação de fármacos	53
2.6 O organismo-teste <i>Lemna minor</i> e a importância dos testes de fitotoxicidade	56
2.7 Derivação de critérios de qualidade da água (CQA) para a proteção da vida aquática no Brasil	58
2.7.1 <i>O uso de modelos de relações quantitativas estrutura-atividade (RQEA) para a derivação de critérios preliminares de qualidade da água</i>	59
3 MATERIAIS E MÉTODOS	61
3.1 Local de realização dos testes ecotoxicológicos	61
3.2 Norma seguida para a realização dos testes ecotoxicológicos	61
3.3 Fármacos e reagentes	61
3.4 Cultivo do organismo-teste <i>Lemna minor</i>	62
3.5 Controle de sensibilidade da <i>Lemna minor</i> e estabelecimento da carta-controle	62
3.6 Testes de toxicidade dos fármacos para <i>Lemna minor</i>	63
3.7 Avaliações dos efeitos dos fármacos e determinações físico-químicas	64
3.8 Cálculo dos valores de concentrações-efetivas utilizados no teste de mistura e comparação entre os efeitos observados e preditos pelos modelos de adição de concentração e de ação independente	66
3.9 Cálculo dos critérios de qualidade da água para a proteção da vida aquática para os fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica	68
4 RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO	69
4.1 Testes de sensibilidade e carta-controle	69
4.2 Efeitos do fármaco cloridrato de propranolol para <i>L. minor</i>	71
4.2.1 <i>Efeitos de inibição do crescimento de <i>L. minor</i> por cloridrato de propranolol avaliados pelo parâmetro número de frondes</i>	71
4.2.2 <i>Efeitos de inibição do crescimento de <i>L. minor</i> por cloridrato de propranolol avaliados pelo parâmetro área foliar</i>	76
4.2.3 <i>Efeitos de inibição do crescimento de <i>L. minor</i> por cloridrato de propranolol avaliados pelo parâmetro peso fresco</i>	82
4.2.4 <i>Alterações macroscópicas promovidas por cloridrato de propranolol no desenvolvimento físico das plantas</i>	86
4.2.5 <i>Monitoramento do pH nos testes com o cloridrato de propranolol</i>	91
4.3 Efeitos do fármaco losartana potássica para <i>L. minor</i>	93

4.3.1 Efeitos de inibição do crescimento de <i>L. minor</i> por losartana potássica avaliados pelo parâmetro número de frondes	93
4.3.2 Efeitos de inibição do crescimento de <i>L. minor</i> por losartana potássica avaliados pelo parâmetro área foliar.....	98
4.3.3 Efeitos de inibição do crescimento de <i>L. minor</i> por losartana potássica avaliados pelo parâmetro peso fresco	103
4.3.4 Alterações macroscópicas no desenvolvimento físico das plantas promovidas pela losartana potássica	107
4.3.5 Monitoramento do pH nos testes com a losartana potássica.....	110
4.4 Efeitos da mistura dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica para a macrófita <i>L. minor</i>	111
4.4.1 Toxicidade da mistura dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica medida por meio da inibição do crescimento de <i>L. minor</i> , com base no número de frondes.....	111
4.4.2 Comparação dos efeitos da toxicidade medida da mistura com as toxicidades dos fármacos em ação individual e com a toxicidade de mistura predita pelos conceitos de adição de concentração e de ação independente	113
4.4.3 Alterações macroscópicas promovidas pela mistura de fármacos.....	119
4.4.4 Valores de pH medidos no teste de mistura	122
4.5 Derivação de critérios de qualidade da água para proteção das comunidades pelágicas de água doce e salina com relação aos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica.....	122
4.5.1 Critérios de qualidade da água para proteção das comunidades pelágicas de água doce e salina com relação ao fármaco cloridrato de propranolol (CAS n° 318-98-9).....	122
4.5.2 Critério preliminar de qualidade da água para proteção da comunidade aquática para o fármaco losartana potássica (CAS n. 124750-99-8).....	125
5 CONCLUSÕES	127
REFERÊNCIAS	129
APÊNDICE A - Curvas concentração-resposta com respectivas equações de regressão não-linear e valores dos parâmetros da equação com respectivos desvios-padrão dos 9 testes de sensibilidade realizados.....	149
APÊNDICE B - Tabelas de valores de taxa de crescimento específica média (μ) e de porcentagem de inibição da taxa de crescimento ($\%I_r$), médias e desvio-padrão (σ) referentes aos testes de sensibilidade ao cloreto de sódio (NaCl) e aos testes com os fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica, em ação individual e em mistura, relativos aos parâmetros número de frondes, área foliar total e peso fresco.	158
APÊNDICE C - Dados brutos referentes aos testes de sensibilidade e aos testes de ação individual e de ação combinada dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica	185
ANEXO A - Composição do meio de cultivo Steinberg modificado após ISO 20079 (OECD, 2006).....	212

1 INTRODUÇÃO

O rápido aperfeiçoamento da instrumentação analítica automatizada no final do século XX fez com que um grande número de substâncias, previamente não detectáveis, emergissem como contaminantes ambientais (TAYLOR; SENAC, 2014). Dentre essas classes dos chamados “contaminantes emergentes”, encontram-se os fármacos, os quais são extensivamente usados na medicina humana, como consequência do aumento crescente da população mundial e, conseqüentemente, de pessoas que necessitam de algum tipo de tratamento farmacológico.

O Brasil está entre os maiores consumidores de medicamentos do mundo, conforme dados da Associação Brasileira de Redes de Farmácias e Drogarias (Abrafarma), que apontam o país como o sétimo maior mercado mundial, podendo alcançar a quinta posição em 2015 (PEREIRA, 2012). Em 2011, o setor de medicamentos no Brasil movimentou R\$ 43,9 bilhões em vendas e a previsão é a de que, em 2017, esse faturamento seja duplicado (PEREIRA, 2012). Dentre os medicamentos de maior consumo no Brasil, destacam-se os anti-hipertensivos. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Medicamentos Genéricos (PRÓGENÉRICOS, 2013a), o consumo de medicamentos genéricos destinados ao controle da hipertensão arterial cresceu 190% entre janeiro de 2010 e abril de 2013, tendo subido de 41,1 milhões para 119 milhões de unidades consumidas nesse período, o que faz desse o maior crescimento isolado já registrado em uma categoria de medicamentos na história do Programa Brasileiro de Genéricos (FRIAS, 2013). Ainda de acordo com a PróGenéricos (2013b), o medicamento genérico mais vendido em maio de 2013 foi o anti-hipertensivo losartana potássica, responsável por 5,6% das vendas totais de medicamentos dessa categoria no Brasil. Dentre os medicamentos para hipertensão arterial distribuídos gratuitamente pelo Programa Farmácia Popular e de maior consumo no país encontram-se a losartana potássica e o cloridrato de propranolol. A losartana potássica corresponde, sozinha, por 5,6% das vendas de medicamentos genéricos no Brasil e o cloridrato de propranolol a 1,1% (PORTAL FATOR BRASIL, 2013).

Tal consumo elevado de medicamentos gera uma preocupação quanto às consequências da entrada dos resíduos de fármacos no ambiente, uma vez que esses compostos são intrinsecamente bioativos e, portanto, capazes de causar efeitos potenciais em sistemas vivos (GINEBREDA et al., 2010), além de muito deles terem sido projetados para terem alguma persistência no organismo (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

As duas principais rotas de entrada dos resíduos farmacológicos no ambiente são por meio da excreção de pacientes e do descarte inapropriado de medicamentos não utilizados ou com prazo de validade expirado nas redes de esgotos (BOUND; KITSOU; VOULVOULIS, 2006). Apesar disso, no que se refere à essa segunda fonte de contaminação ambiental, as Resoluções nº 306, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (BRASIL, 2004) e a nº 358 do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA (BRASIL, 2005), as quais dispõem sobre o gerenciamento dos resíduos dos serviços de saúde, não abordam o descarte de resíduos de medicamentos domiciliares (CARVALHO et al, 2009). Muito embora a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 44 da ANVISA (BRASIL, 2009) permita às farmácias e drogarias participarem de programas de coleta de medicamentos a serem descartados pela comunidade, de acordo com Leal (2012, p.7), “são poucos os estabelecimentos que assumem a responsabilidade sobre o descarte correto, dificultando o gerenciamento dos resíduos”.

Tais lacunas de regulamentação contribuem para dificultar os processos de tratamento adequados de resíduos de fármacos de origem doméstica. Sabe-se que os processos de tratamento de esgotos atuais nem sempre conseguem promover a completa remoção desse tipo de resíduo (TERNES, 1998), o que acarreta na presença dos mesmos em ambientes aquáticos. O cloridrato de propranolol tem sido frequentemente detectado em amostras ambientais de diversos países, tanto em águas superficiais (TERNES, 1998; HILTON; THOMAS, 2003; BENDZ et al., 2005; ROBERTS; THOMAS, 2006; GINEBREDÁ et al., 2010), quanto em efluentes hospitalares (GÓMEZ et al., 2006) e em efluentes de estações de tratamento de esgotos (ETE) (TERNES, 1998; HUGGETT et al., 2003; BENDEZ et al., 2005; ROBERTS; THOMAS, 2006). A losartana potássica, ainda pesquisada em menor extensão em amostras ambientais, foi detectada recentemente em águas superficiais e profundas da área de influência do emissário submarino de Santos-SP (GUIMARÃES et al., 2012).

Além disso, os efluentes de indústrias de produção de fármacos também exercem contribuições relevantes para a contaminação de corpos d'água (LARSSON; PEDRO; PAXEUS, 2007; FICK et al., 2009). Não obstante, a Resolução nº 430 do CONAMA (BRASIL, 2011), que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, estabelece que o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor. Dessa forma, surge a necessidade de se investigarem as consequências ecotoxicológicas do lançamento de fármacos, principalmente no ambiente aquático. Contudo, os contaminantes ambientais, dentre eles os fármacos, não estão geralmente presentes nos ambientes aquáticos de forma isolada, mas sim como misturas

(CLEUVERS, 2004). Portanto, a avaliação dos impactos ambientais de misturas de fármacos precisa ser considerada. Com essa finalidade, o uso de modelos que possam acuradamente prever a toxicidade de misturas a partir de dados de compostos em ação individual torna-se muito útil, uma vez que é inviável testar cada possível combinação de misturas (MARTIN et al., 2009). Dois dos modelos de referência mais utilizados para tal predição são: (1) a **adição de concentração**, desenvolvida por Loewe e Muischnek, em 1926 (MARTIN et al., 2009), a qual pressupõe que os componentes da mistura agem por meio de um mesmo mecanismo de ação ou causam uma resposta toxicológica em comum, e (2) a **ação independente**, desenvolvida por Bliss, em 1939, que parte do pressuposto de que os componentes de uma mistura resultam em uma resposta toxicológica comum, mas por meio de interações com alvos moleculares diversos entre si (FAUST et al., 2003).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade, para a macrófita *L. minor*, das ações individuais e combinada de dois fármacos anti-hipertensivos, de distintos mecanismos de ação farmacológica, de elevado consumo no Brasil e presentes em amostras ambientais, e comparar os efeitos da mistura com os efeitos previstos pelos dois modelos de referência supracitados, a fim de testar a adequabilidade dos mesmos na predição de riscos dos efeitos de misturas de fármacos para organismos-teste. Para tal, o elevado consumo no Brasil, conjugado com a presença relatada em amostras ambientais de corpos d'água, foram os primeiros critérios de escolha dos fármacos losartana potássica e cloridrato de propranolol para os testes realizados no presente trabalho. O segundo critério de escolha considerou o estudo realizado por Besse e Garric (2008), que classificaram os fármacos de acordo com a relevância ambiental, pela qual entende-se a presença dos mesmos no meio ambiente e seu potencial para causar efeitos ecotoxicológicos. Nesse estudo, os autores enquadraram os fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica nas classes II A e IB, respectivamente, as quais reúnem compostos potencialmente perigosos para o ambiente aquático e que, portanto, necessitam da implementação de estudos ecotoxicológicos. Por fim, o fato de possuírem diferentes mecanismos de ação farmacológicos e de estruturas químicas diversas entre si permite uma comparação dos efeitos em ação combinada desses fármacos com os preditos tanto pelo modelo de adição de concentração, quanto pelo modelo de ação independente, no caso de essas diferenças de alvos ou de mecanismos moleculares mantiverem-se em um organismo não-alvo. Ressalta-se que esses dois fármacos geralmente não são prescritos em conjunto para o tratamento da hipertensão arterial, mas a escolha da realização de testes em ação combinada com os mesmos deve-se à provável presença de

ambos em corpos d'água, como resultado do lançamento de efluentes contaminados com resíduos desses fármacos.

A macrófita aquática *Lemna minor* mostra-se adequada para os propósitos do presente trabalho, uma vez que, além de ser recomendada como organismo-teste em protocolos padronizados como os da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2006), o sistema de teste com essa espécie de macrófita apresenta baixa variabilidade de resultados, o que o torna indicado para a avaliação de possíveis interações químicas e/ou fisiológicas de compostos químicos (CEDERGREEN et al., 2007a).

Em adição, buscou-se calcular os critérios de qualidade da água para a proteção da vida aquática para os fármacos losartana potássica e cloridrato de propranolol, de acordo com Umbuzeiro et al. (2011), a fim de estabelecer uma proposta de valores de referência que possam vir a ser usados no estabelecimento de padrões legais ou de regulamentações com vistas a proteger a biota aquática dos efeitos adversos dos resíduos desses contaminantes, ou mesmo em metas de qualidade da água de corpos d'água específicos.

Diante do exposto, a importância do presente trabalho justifica-se por visar avaliar a relevância ecotoxicológica de fármacos de amplo uso humano, em ação individual e combinada, e comparar os efeitos observados com os preditos por modelos de referência, de forma a buscar contribuir com os ainda escassos dados de toxicidade de mistura de fármacos para o ambiente aquático.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos ecotoxicológicos das ações individuais e combinada dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica, no ensaio de inibição do crescimento da macrófita aquática *Lemna minor*, e comparar esses efeitos com os preditos pelos modelos de adição de concentração e de ação independente.

1.1.2 Objetivos específicos

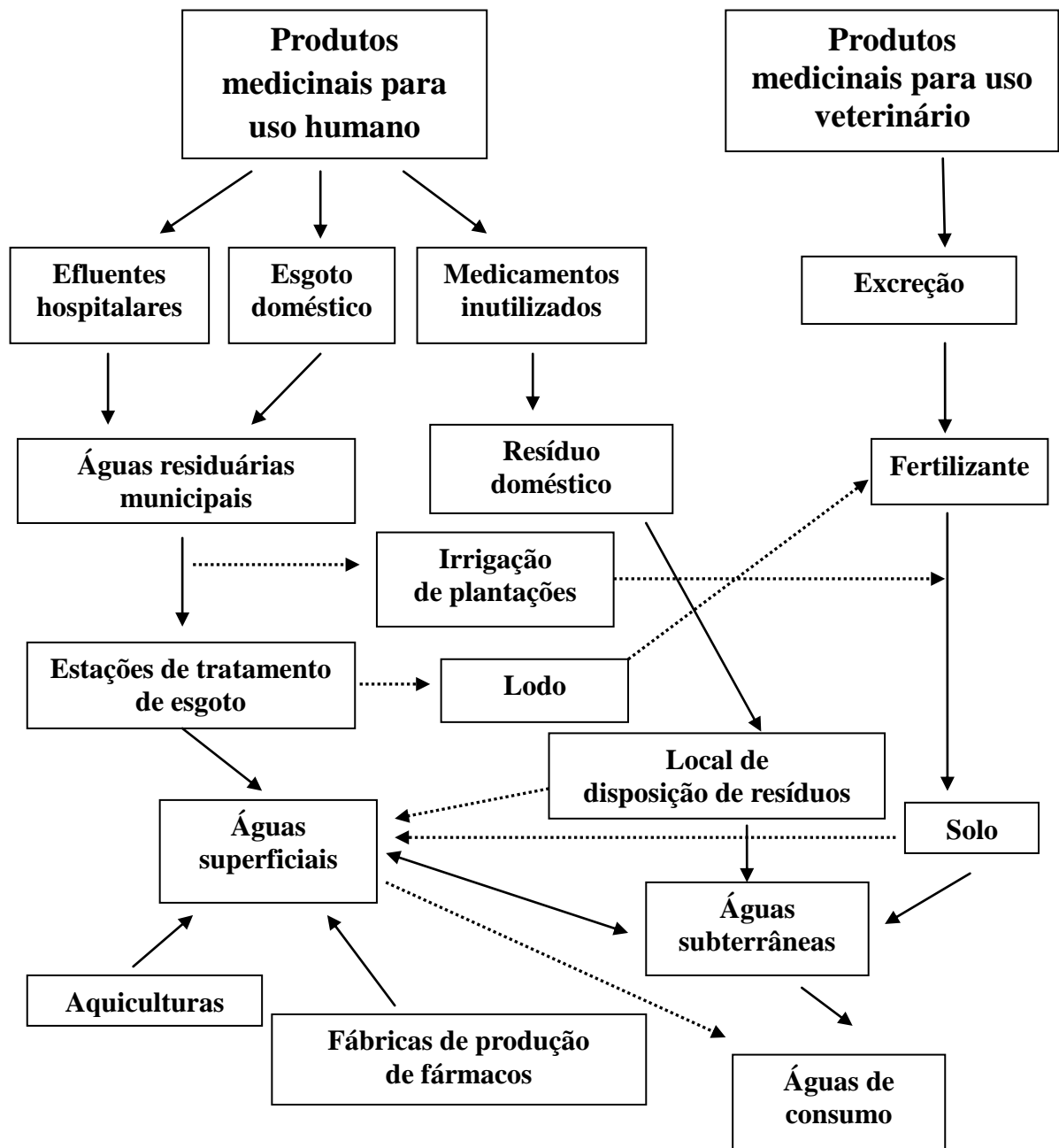
- ✓ Construir curvas concentração-resposta de toxicidade crônica dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica para a espécie *L. minor*;
- ✓ Avaliar os efeitos de inibição do crescimento de *L. minor* pelos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica, após exposições individuais, por meio das variáveis número de frondes, área foliar total e peso fresco;
- ✓ Avaliar possíveis alterações macroscópicas no desenvolvimento físico das plantas expostas a diferentes concentrações desses fármacos e de suas misturas;
- ✓ Avaliar possíveis interações toxicológicas entre os dois fármacos pesquisados nos ensaios com a *L. minor*;
- ✓ Calcular critérios de qualidade da água para a proteção da vida aquática contra os possíveis efeitos adversos causados pelos fármacos avaliados neste trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Rotas de entrada e destino de fármacos em ambientes aquáticos

A ocorrência de resíduos de fármacos é ampla em ambientes aquáticos (LI, 2014). Tais contaminantes emergentes podem entrar no ambiente aquático por diferentes rotas. De acordo com Gil e Mathias (2005), a contaminação ambiental por esses compostos pode se dar através da excreção urinária ou fecal, do descarte de medicamentos com prazo de validade expirado em lixo doméstico, do uso de antibióticos para a promoção de crescimento de animais na zona rural, da adição de hormônios em rações de animais e do uso de antiparasitários em criações animais. Além dessas rotas, cabe ressaltar a contaminação ambiental por meio de efluentes industriais gerados na produção de fármacos (LARSSON; PEDRO; PAXEUS, 2007). Na Figura 1, estão mostradas as possíveis fontes e rotas de ocorrência de resíduos de fármacos no ambiente aquático.

Figura 1 - Esquema das possíveis fontes e rotas de ocorrência de resíduos farmacológicos no ambiente aquático



Fonte: Adaptado de Heberer (2002).

De acordo com Flaherty e Dodson (2005), a rota de entrada via efluente de esgoto doméstico é talvez o caminho mais consistente que os resíduos farmacológicos seguem para adentrar o ambiente aquático, devido à elevada prescrição médica de medicamentos e devido ao fato de que, uma vez ingeridos, os fármacos podem ser excretados de uma forma biologicamente ativa, quer seja na forma da substância original ou na forma de um metabólito ativo.

Além disso, a introdução de compostos farmacológicos em sistemas de esgotos pode se dar também via descarte doméstico de medicamentos não mais utilizados, sendo alguns desses até mesmo com prazo de validade expirado. Em pesquisa realizada com 141 pessoas integrantes da comunidade acadêmica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Ueda et al. (2009) mostraram que 88,6% dos entrevistados afirmaram descartar seus resíduos farmacológicos no lixo doméstico, enquanto que outros 9,2% os descartam diretamente por meio do esgoto.

O uso de esterco como fertilizantes pode ser um caminho da entrada de resíduos de fármacos de origem veterinária em águas de subsolo, de acordo com Bila e Dezotti (2003). Ainda de acordo com essas autoras, as águas subterrâneas podem também ser contaminadas pelo uso do lodo digestivo de estações de tratamento de esgotos na agricultura. O biossólido é um produto que transforma o lodo resultante do processo de tratamento de esgotos em adubo. No Brasil, o biossólido é desenvolvido na estação de tratamento de esgotos de Franca-SP e pode ser utilizado no plantio de café, banana e reflorestamento (SABESP, 2014). Por serem uma valiosa fonte de nutrientes, o uso de biossólidos como fertilizantes é muito difundido em muitas áreas agrícolas próximas a populações urbanas. Porém, os produtos de uso pessoal e farmacológicos que persistem ao processo de tratamento de esgoto e que se separam juntamente com a matéria orgânica serão carregados no lodo e, por fim, nos biossólidos. Em última instância, esses contaminantes poderiam ser transportados do solo em que os biossólidos foram aplicados e virem a contaminar as águas adjacentes e subterrâneas (SABOURIN et al., 2009).

A contaminação do solo, de águas subterrâneas e superficiais pode, ainda, se dar devido ao uso de antibióticos e de outros fármacos de uso veterinário na produção do gado, na produção avícola, na criação de porcos e na aquicultura de peixes (BILA; DEZOTTI, 2003; HEBERER, 2002). Rabølle e Spliid (2000) afirmam que antibióticos de uso veterinário usados na produção suína como promotores de crescimento podem alcançar o solo por meio da lama dos porcos ou através de resíduos de alimentos. Ainda de acordo com esses autores, os antibióticos, na forma original ou na forma de seus metabólitos, podem alcançar o meio ambiente por meio de escoamento superficial ou por lixiviação através do perfil do solo.

No que se refere à contaminação ambiental oriunda de indústrias de produção de fármacos, pesquisas recentes têm evidenciado que os efluentes advindos dessas fábricas podem conter elevadas concentrações de compostos farmacológicos. Larsson, Pedro e Paxeus (2007), ao analisarem amostras de efluentes de uma estação de tratamento em Patancheru, na Índia, a qual recebe aproximadamente 1500 m³ de efluente por dia de, aproximadamente, 90

indústrias de produção de fármacos, concluíram que as amostras continham altos níveis desses compostos, alguns deles em concentrações acima de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Fick et al. (2009), em um estudo complementar, ao investigarem as águas superficiais, subterrâneas e de consumo na região de descarga dos efluentes dessa mesma estação de tratamento, detectaram que as mesmas estavam contaminadas com resíduos de fármacos. Por exemplo, em amostras de um rio, a 30 Km a jusante dessa estação, foram detectados resíduos de fármacos em concentrações de até $97 \mu\text{g.L}^{-1}$. Resíduos de fármacos foram também detectados em concentrações de até $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ em poços próximos a um rio onde os efluentes dessa estação são lançados, sendo que tais poços são usados como fontes de água de consumo. Tais achados mostram que a produção de fármacos contamina severamente águas de consumo e superficiais na região investigada (FICK et al., 2009).

2.2 A ocorrência de fármacos em amostras ambientais

Até a década de 90 do século passado, quaisquer esforços combinados no intuito de detectar a presença de resíduos de fármacos no meio ambiente encontrariam limitações relacionadas à insuficiência de instrumentos analíticos com eficiência elevada o suficiente para separar esse tipo de composto químico de outras substâncias, bem como com limites de detecção baixos o suficiente, na ordem de nanogramas por litro ou partes por milhão (DAUGHTON; TERNES, 1999). Atualmente, porém, com o rápido desenvolvimento de instrumentos analíticos altamente sensíveis e automatizados, um grande número de substâncias têm sido detectado em ambientes aquáticos, dentre as quais se encontram os resíduos farmacológicos. Conseqüentemente, atualmente muitas publicações relatam a ocorrência de fármacos, de diversas classes terapêuticas, em concentrações que variam entre nanogramas por litro a microgramas por litro, em águas superficiais e subterrâneas (CARDOSO; PORCHER; SANCHEZ, 2014; HEBERER, 2002).

Na Tabela 1, estão descritos exemplos de ocorrências de fármacos, de distintas classes farmacológicas, em diversas amostras ambientais, conforme relatados na literatura.

Tabela 1 - Exemplos de ocorrências de fármacos em amostras ambientais, descritos na literatura.

Classes/Fármacos	CAS nº	Amostra	País	Concentração relatada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Referência
Antimicrobianos					
Ciprofloxacina	85721331	Efluente de ETE industrial	Índia	28000-31000	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Ciprofloxacina	85721331	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,044-1,1	Fick et al. (2009)
Enrofloxacina	93106606	Efluente de ETE industrial	Índia	780-900	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Enrofloxacina	93106606	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,023-0,067	Fick et al. (2009)
Enoxacina	74011588	Efluente de ETE industrial	Índia	150-300	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Enoxacina	74011588	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,080-0,8	Fick et al. (2009)
Eritromicina	114078	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,01-0,07	Ginebreda et al. (2010)
Eritromicina	114078	Efluente hospitalar	Espanha	0,01-0,03	Gómez et al. (2006)
Eritromicina	114078	Efluente de ETE	Reino Unido	0,13-0,18	Hilton e Thomas (2003)
Eritromicina	114078	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	0,057-1,00	Hilton e Thomas (2003)
Eritromicina	114078	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,071-0,141	Roberts e Thomas (2006)
Eritromicina	114078	Efluente final de ETE	Reino Unido	0,145-0,290	Roberts e Thomas (2006)
Eritromicina	114078	Água rio Tyne	Reino Unido	<0,004-0,070	Roberts e Thomas (2006)
Lomefloxacina	98079528	Efluente de ETE industrial	Índia	150-300	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
					(continua)

(continuação)

Norfloxacina	70458967	Efluente de ETE industrial	Índia	390-420	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Norfloxacina	70458967	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,021-0,031	Fick et al. (2009)
Ofloxacina	82419361	Efluente de ETE industrial	Índia	150-160	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Ofloxacina	82419361	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,19-8,77	Ginebreda et al. (2010)
Ofloxacina	82419361	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,026-0,48	Fick et al. (2009)
Sulfametoxazol	7234662	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,03-11,92	Ginebreda et al. (2010)
Sulfametoxazol	7234662	Efluente de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Sulfametoxazol	7234662	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Sulfametoxazol	7234662	Afluente de ETE	Suécia	0,02	Bendz et al. (2005)
Sulfametoxazol	7234662	Efluente de ETE	Suécia	0,07	Bendz et al. (2005)
Sulfametoxazol	7234662	Água do rio Høje	Suécia	0,01	Bendz et al. (2005)
Sulfametoxazol	7234662	Águas subterrâneas	Estados Unidos	Até 0,17	Fram e Belitz (2011)
Trimetoprima	738705	Efluente de ETE	Reino Unido	0,083-0,27	Hilton e Thomas (2003)
Trimetoprima	738705	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,010-0,039	Hilton e Thomas (2003)
Trimetoprima	738705	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,02-0,47	Ginebreda et al. (2010)
Trimetoprima	738705	Efluente hospitalar	Espanha	0,01-0,03	Gómez et al. (2006)
Trimetoprima	738705	Afluente hospitalar	Suécia	0,08	Bendz et al. (2005)
					(continua)

(continuação)

Trimetoprima	738705	Efluente hospitalar	Suécia	0,04	Bendz et al. (2005)
Trimetoprima	738705	Água do rio Höje	Suécia	<0,001-0,02	Bendz et al. (2005)
Trimetoprima	738705	Efluente bruto	Reino Unido	0,213-0,300	Roberts e Thomas (2006)
Trimetoprima	738705	Efluente final	Reino Unido	0,218-0,322	Roberts e Thomas (2006)
Trimetoprima	738705	Água rio Tyne	Reino Unido	0,004-0,019	Roberts e Thomas (2006)
Trimetoprima	738705	Águas subterrâneas	Estados Unidos	Até 0,018	Fram e Belitz (2011)
Trimetoprima	738705	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,017-0,021	Fick et al. (2009)
Antiinflamatórios não-esteroidais					
Acetaminofeno	103902	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,06-2,42	Ginebreda et al. (2010)
Acetaminofeno	103902	Efluente hospitalar	Espanha	0,5-29	Gómez et al. (2006)
Acetaminofeno	103902	Efluente de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Acetaminofeno	103902	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Acetaminofeno	103902	Bacia do rio Atibaia	Brasil	0,84	Sodré et al. (2007)
Acetaminofeno	103902	Reservatório Billings	Brasil	0,0003-0,0103	Almeida e Weber (2005)
Acetaminofeno	103902	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,069570-6,924	Roberts e Thomas (2006)
Acetaminofeno	103902	Efluente final de ETE	Reino Unido	<0,020	Roberts e Thomas (2006)
Acetaminofeno	103902	Águas subterrâneas	Estados Unidos	Até 1,89	Fram e Belitz (2011)
Ácido acetilsalicílico	50782	Bacia do rio Atibais	Brasil	4,15	Sodré et al. (2007)
Ácido mefenâmico	61687	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,01-0,04	Ginebreda et al. (2010)
Ácido mefenâmico	61687	Efluente de ETE	Reino Unido	0,72-1,1	Hilton e Thomas (2003)
					(continua)

(continuação)

Ácido mefenâmico	61687	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,05-0,065	Hilton e Thomas (2003)
Ácido mefenâmico	61687	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,136-0,363	Roberts e Thomas (2006)
Ácido mefenâmico	61687	Efluente final de ETE	Reino Unido	0,290-0,396	Roberts e Thomas (2006)
Cetorolaco	74103074	Efluente hospitalar	Espanha	0,2-59,5	Gómez et al. (2006)
Diclofenaco	15307796	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,08-18,74	Ginebreda et al. (2010)
Diclofenaco	15307796	Efluente hospitalar	Espanha	0,06-1,9	Gómez et al. (2006)
Diclofenaco	15307796	Efluente de ETE	Reino Unido	0,35-0,46	Hilton e Thomas (2003)
Diclofenaco	15307796	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,02-0,091	Hilton e Thomas (2003)
Diclofenaco	15307796	Afluente de ETE	Suécia	0,16	Bendz et al. (2005)
Diclofenaco	15307796	Efluente de ETE	Suécia	0,12	Bendz et al. (2005)
Diclofenaco	15307796	Águas rio Høje	Suécia	0,01-0,12	Bendz et al. (2005)
Diclofenaco	15307796	Represa Billings	Brasil	0,0081-0,3945	Almeida e Weber (2005)
Diclofenaco	15307796	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,901-1,036	Roberts e Thomas (2006)
Diclofenaco	15307796	Efluente final de ETE	Reino Unido	0,261-0,598	Roberts e Thomas (2006)
Cetoprofeno	22071154	Afluente de ETE	Suécia	0,94	Bendz et al. (2005)
Cetoprofeno	22071154	Efluente de ETE	Suécia	0,33	Bendz et al. (2005)
Cetoprofeno	22071154	Águas do rio Høje	Suécia	0,01-0,07	Bendz et al. (2005)
					(continua)

(continuação)

Cetoprofeno	22071154	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,16-2,71	Ginebreda et al. (2010)
Ibuprofeno	79261497	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,16-9,89	Ginebreda et al. (2010)
Ibuprofeno	79261497	Efluente hospitalar	Espanha	1,5-151	Gómez et al. (2006)
Ibuprofeno	79261497	Efluente de ETE	Reino Unido	1,7-3,8	Hilton e Thomas (2003)
Ibuprofeno	79261497	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,02	Hilton e Thomas (2003)
Ibuprofeno	79261497	Afluente de ETE	Suécia	3,59	Bendz et al. (2005)
Ibuprofeno	79261497	Efluente de ETE	Suécia	0,15	Bendz et al. (2005)
Ibuprofeno	79261497	Águas do rio Høje	Suécia	0,01-0,22	Bendz et al. (2005)
Ibuprofeno	79261497	Represa Billings	Brasil	0,010-0,0782	Almeida e Weber (2005)
Ibuprofeno	79261497	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,027979-7,741	Roberts e Thomas (2006)
Ibuprofeno	79261497	Efluente final de ETE	Reino Unido	1,979-4,239	Roberts e Thomas (2006)
Ibuprofeno	79261497	Água do rio Tyne	Reino Unido	0,144-2,37	Roberts e Thomas (2006)
Indometacina	53861	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,05-0,38	Ginebreda et al. (2010)
Naproxeno	22204531	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,02-2,06	Ginebreda et al. (2010)
Naproxeno	22204531	Afluente de ETE	Suécia	3,65	Bendz et al. (2005)
Naproxeno	22204531	Efluente de ETE	Suécia	0,25	Bendz et al. (2005)
Naproxeno	22204531	Águas do rio Høje	Suécia	0,09-0,25	Bendz et al. (2005)
Antihipertensivos					
Atenolol	60966510	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,05-0,67	Ginebreda et al. (2010)
Atenolol	60966510	Efluente hospitalar	Espanha	0,1-122	Gómez et al. (2006)
					(continua)

(continuação)

Atenolol	60966510	Afluente de ETE	Suécia	0,03	Bendz et al. (2005)
Atenolol	60966510	Efluente de ETE	Suécia	0,16	Bendz et al. (2005)
Atenolol	60966510	Amostras do rio Høje	Suécia	0,01-0,06	Bendz et al. (2005)
Atenolol	60966510	Represa Billings	Brasil	0,0009-0,0164	Almeida e Weber (2005)
Metoprolol	51384511	Efluente de ETE industrial	Índia	800-950	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Metoprolol	51384511	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,01-0,18	Ginebreda et al. (2010)
Metoprolol	51384511	Afluente de ETE	Suécia	0,16	Bendz et al. (2005)
Metoprolol	51384511	Efluente de ETE	Suécia	0,19	Bendz et al. (2005)
Metoprolol	51384511	Águas do rio Høje	Suécia	0,03-0,07	Bendz et al. (2005)
Metoprolol	51384511	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,090	Fick et al. (2009)
Sotalol	959240	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,11-1,82	Ginebreda et al. (2010)
Agentes redutores lipídicos					
Ácido clofibrínico	882097	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,01-7,91	Ginebreda et al. (2010)
Ácido clofibrínico	882097	Efluente de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Ácido clofibrínico	882097	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,05	Hilton e Thomas (2003)
Ácido clofibrínico	882097	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	<0,020-0,651	Roberts e Thomas (2006)
Ácido clofibrínico	882097	Efluente final de ETE	Reino Unido	<0,020-0,044	Roberts e Thomas (2006)
Benzafibrato	41859670	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,03-15,06	Ginebreda et al. (2010)
Benzafibrato	41859670	Represa Billings	Brasil	0,0012-0,0037	Almeida e Weber (2005)
					(continua)

(continuação)

Gemfibrozila	25812300	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,04-7,78	Ginebreda et al. (2010)
Gemfibrozila	25812300	Afluente de ETE	Suécia	0,71	Bendz et al. (2005)
Gemfibrozila	25812300	Efluente de ETE	Suécia	0,18	Bendz et al. (2005)
Gemfibrozila	25812300	Águas do Rio Høje	Suécia	<0,001-0,17	Bendz et al. (2005)
Antidepressivos					
Citalopram	59729338	Efluente de ETE industrial	Índia	770-840	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Citalopram	59729338	Poços fontes de águas de consumo	Índia	0,076-1,4	Fick et al. (2009)
Lofepamina	23047258	Efluente de ETE	Reino Unido	<0,010	Hilton e Thomas (2003)
Lofepamina	23047258	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,010	Hilton e Thomas (2003)
Antiepilépticos					
Carbamazepina	298464	Efluente hospitalar	Espanha	0,03-0,07	Gómez et al. (2006)
Carbamazepina	298464	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,08-3,09	Ginebreda et al. (2010)
Carbamazepina	298464	Afluente de ETE	Suécia	1,68	Bendz et al. (2005)
Carbamazepina	298464	Efluente de ETE	Suécia	1,18	Bendz et al. (2005)
Carbamazepina	298464	Águas do rio Høje	Suécia	<0,001-0,5	Bendz et al. (2005)
Carbamazepina	298464	Águas subterrâneas	Estados Unidos	Até 0,42	Fram e Belitz (2011)
Ansiolíticos					
Diazepam	439145	Represa Billings	Brasil	0,0002-0,0048	Almeida e Weber (2005)
Anti-histamínicos					
Cetirizina	83881521	Efluente de ETE industrial	Índia	1300-1400	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)
Anti-ulcerativos					
Ranitidina	66357593	Efluente de ETE industrial	Índia	90-160	Larsson, Pedro e Paxeus (2007)

(continua)

(conclusão)

Ranitidina	66357593	Águas do rio Llobregat	Espanha	0,01-0,57	Ginebreda et al. (2010)
Ranitidina	66357593	Efluente hospitalar	Espanha	0,4-1,7	Gómez et al. (2006)
Anti-neoplásicos					
Tamoxifeno	10540291	Efluente hospitalar	Reino Unido	<0,010	Hilton e Thomas (2003)
Tamoxifeno	10540291	Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	<0,010	Hilton e Thomas (2003)
Tamoxifeno	10540291	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,143-0,215	Roberts e Thomas (2006)
Tamoxifeno	10540291	Efluente final de ETE	Reino Unido	0,146-0,369	Roberts e Thomas (2006)
Tamoxifeno	10540291	Água do rio Tyne	Reino Unido	0,027-0,212	Roberts e Thomas (2006)
Hormônios sexuais					
17 α -etinilestradiol	57636	Bacia do rio Atibaia	Brasil	0,006-0,31	Sodré et al. (2007)
17 α -etinilestradiol	57636	Águas superficiais	Áustria	0,00033	Hohenblum et al. (2004)
17 α -etinilestradiol	57636	Águas subterrâneas	Áustria	0,00094	Hohenblum et al. (2004)
17 α -etinilestradiol	57636	Águas subterrâneas	França	0,003	Vulliet et al. (2008)
17 β -estradiol	57636	Bacia do rio Atibaia	Brasil	0,038-2,51	Sodré et al. (2007)
Agentes opióides					
Codeína	76573	Efluente hospitalar	Espanha	0,01-5,7	Gómez et al. (2006)
Codeína	76573	Águas subterrâneas	Estados Unidos	Até 0,214	Fram e Belitz (2011)
Antiparasitários					
Metronidazol	443481	Efluente hospitalar	Espanha	1,8-9,4	Gómez et al. (2006)
Antifúngicos					
Clotrimazol	23593751	Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,031-0,033	Roberts e Thomas (2006)
Clotrimazol	23593751	Efluente final de ETE	Reino Unido	0,010-0,027	Roberts e Thomas (2006)
Clotrimazol	23593751	Água do rio Tyne	Reino Unido	0,006-0,034	Roberts e Thomas (2006)

Fonte: Da autora.

De acordo com a Tabela 1, verifica-se que resíduos de diversos fármacos têm sido detectados nos mais diversos ambientes aquáticos, tanto em efluentes de hospitais, em afluentes e em efluentes de estações de tratamento de esgoto e em efluentes de indústrias, quanto em águas superficiais, águas subterrâneas e até em águas de consumo. Embora esse número de fármacos investigados em amostras ambientais possa parecer amplo, Le Corre et al. (2012) estimam que mais de 95% dos compostos farmacológicos disponíveis em países como Estados Unidos e Austrália nunca foram investigados em amostras de água e de efluentes.

Ainda conforme observado na Tabela 1, nota-se que, de um modo geral, as concentrações dos resíduos de fármacos decrescem das amostras de estações de tratamento de efluentes até as amostras de águas superficiais e subterrâneas, provavelmente devido a processos tais como biotransformação, fotólise, volatilização, adsorção e dispersão, os quais podem causar redução de concentrações desses contaminantes (LI, 2014). Ainda assim, embora os estudos mostrem que as concentrações de fármacos detectadas em amostras ambientais possam estar muito abaixo dos níveis prováveis de causar danos à saúde humana e, na maioria dos casos, muito abaixo das concentrações de efeitos crônicos ambientais, deve-se ter em mente que tais compostos não estão presentes no ambiente de forma isolada. Portanto, embora cada componente de uma mistura possa ser inócua de forma isolada, juntos eles têm o potencial de causar danos ambientais (BOUND; KITSOU; VOULVOULIS, 2006).

2.2.1 A presença dos fármacos propranolol e losartana em ecossistemas aquáticos

A maioria dos fármacos está presente em ambientes aquáticos devido à sua remoção incompleta em estações de tratamento de esgotos (GILTROW et al., 2009). Tal é o caso do cloridrato de propranolol, o qual foi removido na taxa de 96% do afluente durante a passagem por uma estação municipal de tratamento de esgoto na Alemanha (TERNES, 1998), restando ainda 4%, os quais podem ser a causa de o propranolol estar amplamente presente em rios e córregos na América e Europa (GILTROW et al., 2009). Entretanto, de acordo com Solé et al. (2010), essa eficiência de remoção varia grandemente em função das características de cada estação de tratamento de esgoto, bem como de outros fatores ambientais.

Na Tabela 2, estão mostrados exemplos de concentrações em que o fármaco cloridrato de propranolol já foi detectado em diferentes amostras ambientais aquáticas.

Tabela 2 - Exemplos de concentrações do fármaco cloridrato de propranolol, detectadas nos diversos ambientes aquáticos.

Tipo de amostra	País	Concentração relatada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Referência
Afluente de estação de tratamento de esgoto (ETE)	Suécia	0,05	Bendz et al. (2005)
Efluente de ETE	Suécia	0,03	Bendz et al. (2005)
Água do Rio Høje	Suécia	<0,001- 0,01	Bendz et al. (2005)
Efluente bruto de ETE	Reino Unido	0,06-0,119	Roberts e Thomas (2006)
Efluente final de ETE	Reino Unido	0,195-0,373	Roberts e Thomas (2006)
Água do rio Tyne	Reino Unido	0,035-0,107	Roberts e Thomas (2006)
Efluente de ETE	Reino Unido	0,13-0,18	Hilton e Thomas (2003)
Águas superficiais a montante e a jusante da descarga de ETE	Reino Unido	Montante: <0,010 Jusante: 0,037	Hilton e Thomas (2003)
Efluentes de ETE	Alemanha	Média: 0,17 Máximo: 0,29	Ternes (1998)
Rios e córregos	Alemanha	Média: 0,012 Máxima: 0,59	Ternes (1998)
Efluentes de ETE	Estados Unidos	Média: 0,037 Máximo: 1,90	Huggett et al. (2003)
Efluente hospitalar	Espanha	0,2 - 6,5	Gómez et al. (2006)
Águas do rio Llobregat	Espanha	0,01 - 0,06	Ginebreda et al. (2010)
Águas marinhas e estuarinas	Bélgica (zona costeira)	0,001 - 0,024	Wille et al. (2010)
Águas superficiais estuarinas	Reino Unido	<0,004 - 0,056	Thomas e Hilton (2004)

De acordo com a Tabela 2, o cloridrato de propranolol tem sido detectado tanto em efluentes de hospitais e de estações de tratamento de esgoto, quanto em águas superficiais, tanto de ambientes de água doce quanto salinos.

Dados sobre a detecção do fármaco losartana em efluentes de estações de tratamento de esgotos e em rios são escassos. Entretanto, recentemente, Guimarães et al. (2012) detectaram a presença de diversos fármacos em águas superficiais e de fundo na área de descarte do efluente do emissário submarino de Santos-SP, na faixa de concentração de 0,01 a 2,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$,

dentre os quais se encontra a losartana. Bouissou-Schurtz et al. (2014) relataram que a losartana tem sido detectada em recursos hídricos na França em concentrações de até 0,011 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em relação à presença da losartana em estações de tratamento de esgotos, Oosterhuis, Sacher e ter Laak (2013) detectaram esse fármaco em concentrações de até 0,79 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,09 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente em afluentes e em efluentes de estações de tratamento de esgoto na Holanda. Por fim, Larsson, Pedro e Paxeus (2007) detectaram a presença da losartana, em uma faixa de concentrações de 2400 a 2500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, em amostras de uma estação de tratamento de efluentes industriais que serve, aproximadamente, a 90 fábricas de fármacos, em Patancheru, na Índia, um local de grande produção de fármacos genéricos para o mercado mundial. Tais achados indicam que, além de haver uma elevada produção desse fármaco, a remoção do mesmo por estações de tratamento de efluentes ainda é incompleta.

2.3 Efeitos de toxicidade de fármacos em organismos aquáticos

A presença de fármacos no ambiente aquático preocupa, pois fármacos são compostos bioativos e que, portanto, são capazes de causar efeitos potenciais em sistemas vivos (GINEBREDÁ et al, 2010). Halling-Sørensen et al. (1998) afirmam que os fármacos frequentemente são lipofílicos a fim de serem capazes de atravessar membranas e são persistentes a fim de evitar que sejam inativados antes de exercerem o efeito desejado, o que os torna prováveis de bioacumular e provocar efeitos em ecossistemas aquáticos e terrestres. Além disso, Ginebreda et al. (2010) afirmam que há um crescente aumento de seu uso e, portanto, de sua descarga no ambiente. Ternes (1998) ainda menciona que o tratamento de águas residuárias não remove completamente muitos fármacos do fluxo de resíduos, o que leva à contaminação do corpo de água receptor.

Apesar disso, há uma falta geral de informações a respeito de dados ecotoxicológicos sobre fármacos e seus metabólitos (KASPRZYK-HORDERN, 2010). Portanto, uma vez que muitos organismos não-alvo são expostos a resíduos de fármacos lançados no ambiente, faz-se necessário avaliar a toxicidade desses agentes químicos por meio de ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos, tanto de ambientes de água doce, quanto de águas estuarinas e marinhas, a fim de estabelecer limites permissíveis para a proteção da vida aquática, bem como para avaliar o impacto momentâneo que esses contaminantes causam aos diferentes organismos dos corpos hídricos (ARAGÃO; ARAÚJO, 2008).

Na Tabela 3, estão mostrados exemplos relatados na literatura dos efeitos ecotoxicológicos de alguns fármacos para organismos de diferentes níveis tróficos, incluindo tanto testes agudos quanto crônicos.

Tabela 3 - Exemplos relatados na literatura dos efeitos ecotoxicológicos de alguns fármacos para as diversas espécies de diferentes níveis tróficos.

Espécie	Fármaco	Expressão do resultado	Endpoint	Concentração calculada (intervalo de confiança a 95%)	Referência
Algas					
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	5-fluorouracil	CE _{50,3dias}	Inibição da taxa média de crescimento	48 mg.L ⁻¹ (44-51)	Zounkova et al. (2010)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Citarabina	CE _{50,3dias}	Inibição da taxa média de crescimento	53 mg.L ⁻¹ (29-95)	Zounkova et al. (2010)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Gencitabina	CE _{50,3dias}	Inibição da taxa média de crescimento	45 mg.L ⁻¹ (12-170)	Zounkova et al. (2010)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Ácido clofibrínico	CE _{50, 3dias}	Inibição da taxa média de crescimento	115 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Carbamazepina	CE _{50, 3dias}	Inibição da taxa média de crescimento	74 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Ibuprofeno	CE _{50, 3dias}	Inibição da taxa média de crescimento	315 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Diclofenaco	CE _{50, 3dias}	Inibição da taxa média de crescimento	72 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Naproxeno	CE _{50, 3dias}	Inibição da taxa média de crescimento	>320 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Captopril	CE _{50, 3dias}	Inibição da taxa média de crescimento	168 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Metformina	CE _{50, 3dias}	Inibição da taxa média de crescimento	>320 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)

(continua)

(continuação)

<i>Desmodemus subspicatus</i>	Metoprolol	CE _{50, 3 dias}	Inibição da taxa média de crescimento	7,3 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Desmodemus subspicatus</i>	Ácido acetilsalicílico	CE _{50, 3 dias}	Inibição da taxa média de crescimento	106,7 mg.L ⁻¹ (104,4-114,3)	Cleuvers (2004)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Cloridrato de sertralina	CE _{50, 72h}	Inibição da taxa média de crescimento	0,14 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Cloridrato de sertralina	CENO _{72h}	Inibição da taxa média de crescimento	0,05 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Fluoxetina	CE _{50, 72h}	Inibição da taxa média de crescimento	0,024 mg.L ⁻¹	Brooks et al. (2003)
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	Sulfametoxazol	CE _{50, 24h}	Inibição da taxa média de crescimento	1,54 mg.L ⁻¹	Bialk-Bielinska (2011)

Diatomáceas

<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Ácido salicílico	CE _{50, 72h}	Inibição do crescimento	255,5 mg.L ⁻¹ (242,2-269,6)	Claessens et al. (2013)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Acetaminofeno	CE _{50, 72h}	Inibição do crescimento	265,8 mg.L ⁻¹ (239,4-295,1)	Claessens et al. (2013)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Carbamazepina	CE _{50, 72h}	Inibição do crescimento	62,5 mg.L ⁻¹ (58,8-66,6)	Claessens et al. (2013)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Atenolol	CE _{50, 72h}	Inibição do crescimento	311,9 mg.L ⁻¹ (262,4-370,7)	Claessens et al. (2013)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Trimetoprima	CE _{50, 72h}	Inibição do crescimento	5,1 mg.L ⁻¹ (4,7-5,5)	Claessens et al. (2013)

Macrófitas

<i>Lemna minor</i>	Ácido clofibrínico	CE _{50, 7 dias}	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	12,5 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Lemna minor</i>	Carbamazepina	CE _{50, 7 dias}	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	25,5 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Lemna minor</i>	Ibuprofeno	CE _{50, 7 dias}	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	22 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
					(continua)

(continuação)

<i>Lemna minor</i>	Ibuprofeno	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	18,5 mg.L ⁻¹	Kaza, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2007)
<i>Lemna minor</i>	Diclofenaco	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	7,5 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Lemna minor</i>	Diclofenaco	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	148 mg.L ⁻¹	Kaza, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2007)
<i>Lemna minor</i>	Naproxeno	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	24,2 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Lemna minor</i>	Captopril	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	25 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Lemna minor</i>	Captopril	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	>200 mg.L ⁻¹	Kaza, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2007)
<i>Lemna minor</i>	Metformina	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	110 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Lemna minor</i>	Metoprolol	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	>320 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Lemna minor</i>	Amitriptilina	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	1,69 mg.L ⁻¹	Kaza, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2007)
					(continua)

(continuação)

<i>Lemna minor</i>	Clorpromazina	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	0,92 mg.L ⁻¹	Kaza, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2007)
<i>Lemna minor</i>	Verapamil	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	24,3 mg.L ⁻¹	Kaza, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2007)
<i>Lemna minor</i>	Sulfametoxazol	CE ₅₀ , 7 dias	Inibição da taxa média de crescimento (área foliar)	0,21 mg.L ⁻¹	Bialk-Bielinska (2011)

Invertebrados

<i>Daphnia magna</i>	Fluoxetina	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	0,82 mg.L ⁻¹	Brooks et al. (2003)
<i>Daphnia magna</i>	5-fluorouracil	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	15 mg.L ⁻¹ (5,2-45)	Zounkova (2010)
<i>Daphnia magna</i>	Citarabina	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	200 mg.L ⁻¹ (63-810)	Zounkova (2010)
<i>Daphnia magna</i>	Gentamicina	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	110 mg.L ⁻¹ (45-520)	Zounkova (2010)
<i>Daphnia magna</i>	Ácido clofibrínico	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	72 mg.L ⁻¹	Clevers (2003)
<i>Daphnia magna</i>	Carbamazepina	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	>100 mg.L ⁻¹	Clevers (2003)
<i>Daphnia magna</i>	Ibuprofeno	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	108 mg.L ⁻¹	Clevers (2003)
<i>Daphnia magna</i>	Diclofenaco	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	68 mg.L ⁻¹	Clevers (2003)
<i>Daphnia magna</i>	Naproxeno	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	174 mg.L ⁻¹	Clevers (2003)
<i>Daphnia magna</i>	Captopril	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	>100 mg.L ⁻¹	Clevers (2003)
<i>Daphnia magna</i>	Metformina	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	64 mg.L ⁻¹	Clevers (2003)
<i>Daphnia magna</i>	Metoprolol	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	>100 mg.L ⁻¹	Clevers (2003)
<i>Daphnia magna</i>	Ácido acetilsalicílico.	CE ₅₀ , 48h	Imobilização	88,1 mg.L ⁻¹ (72,8-106,6)	Clevers (2004)

(continua)

(continuação)

<i>Daphnia magna</i>	Metoprolol	CL _{50, 48h}	Imobilização	63,9 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Daphnia magna</i>	Cloridrato de sertralina	CL _{50, 48h}	Imobilização	1,3 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)
<i>Daphnia magna</i>	Cloridrato de sertralina	CENO _{48h}	Imobilização	0,10 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)
<i>Daphnia magna</i>	Cloridrato de sertralina	CENO _{21d}	Reprodução	0,032 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)
<i>Daphnia similis</i>	Cloridrato de fluoxetina	CE _{50,48h}	Imobilização	4,41 mg.L ⁻¹	Castro et al. (2009)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Fluoxetina	CE _{50, 48h}	Imobilização	0,234 mg.L ⁻¹	Brooks et al. (2003)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Fluoxetina	CENO _{7dias}	Reprodução	0,056 mg.L ⁻¹	Brooks et al. (2003)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Metoprolol	CL _{50, 48h}	Imobilidade	8,8 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Metoprolol	CL _{50, 48h}	Imobilidade	45,3 mg.L ⁻¹ (43,0-47,4)	Frayssé e Garric (2005)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Atenolol	CE _{50, 48h}	Imobilidade	33,4 mg.L ⁻¹ (28-38,2)	Frayssé e Garric (2005)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Acebutolol	CE _{50, 48h}	Imobilidade	50,9 mg.L ⁻¹ (46,8-55,6)	Frayssé e Garric (2005)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Nadolol	CE _{50, 48h}	Imobilidade	163,4 mg.L ⁻¹ (154,4-172,6)	Frayssé e Garric (2005)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Oxprenolol	CE _{50, 48h}	Imobilidade	10,1 mg.L ⁻¹ (9,2-11,1)	Frayssé e Garric (2005)
<i>Hyalella azteca</i>	Metoprolol	CL _{50, 48h}	Letalidade	≥100 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Cloridrato de sertralina	CL _{50, 24h}	Letalidade	0,6 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Cloridrato de sertralina	CL _{50, 24h}	CENO _{24h}	0,4 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)

Peixes

<i>Oryzias latipes</i>	Metoprolol	CL _{50, 48h}	Letalidade	≥100 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cloridrato de sertralina	CL _{50, 96h}	Letalidade	0,38 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)

(continua)

(continuação)

<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cloridrato de sertralina	CENO _{96h}	Letalidade	0,1 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)
<i>Pimephales promelas</i>	Fluoxetina	CL _{50, 48h}	Letalidade	0,705 mg.L ⁻¹	Brooks et al. (2003)
Bactérias					
<i>Vibrio fischeri</i>	Ofloxacina	CE _{50, 24h} CENO	Inibição da luminescência	0,01359 mg.L ⁻¹ 0,00113 mg.L ⁻¹	Backhaus, Scholze e Grimme (2000)
<i>Vibrio fischeri</i>	Norfloxacina	CE _{50, 24h} CENO	Inibição da luminescência	0,0220 mg.L ⁻¹ 0,01038 mg.L ⁻¹	Backhaus, Scholze e Grimme (2000)
<i>Vibrio fischeri</i>	Cloridrato de sertralina	CE _{50, 15min}	Inibição da luminescência	9,2 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)
<i>Vibrio fischeri</i>	Cloridrato de sertralina	CE _{50, 30 min}	Inibição da luminescência	7,3 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)
<i>Vibrio fischeri</i>	Cloridrato de sertralina	CENO _{15 min; 30 min}	Inibição da luminescência	2,25 mg.L ⁻¹	Minagh et al. (2009)
<i>Vibrio fischeri</i>	Sulfametoxazol	CE _{50, 30min}	Inibição da luminescência	>100 mg.L ⁻¹	Bialk-Bielinska et al. (2011)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Sulfametoxazol	CE _{50, 4h}	Inibição enzimática bacteriana	>127 mg.L ⁻¹	Bialk-Bielinska et al. (2011)
<i>Pseudomonas putida</i>	5-fluorouracil	CE _{50, 16h}	Inibição do crescimento	0,044 mg.L ⁻¹ (0,025-0,077)	Zounkova (2010)
<i>Pseudomonas putida</i>	Citarabina	CE _{50, 16h}	Inibição do crescimento	17 mg.L ⁻¹ (4,7-64)	Zounkova (2010)
<i>Pseudomonas putida</i>	Gencitabina	CE _{50, 16h}	Inibição do crescimento	100 mg.L ⁻¹	Zounkova (2010)

(continua)

(conclusão)

Moluscos					
<i>Planorbis carinatus</i>	Ibuprofeno	CL _{50,48h} CL _{50,72h}	Letalidade	17,1 mg.L ⁻¹	Pounds et al. (2008)
<i>Planorbis carinatus</i>	Ibuprofeno	CENO _{21d} CENO _{21d} CENO _{21d}	Sobrevivên. Reprodução Crescimento	5,36 mg.L ⁻¹ 2,43 mg.L ⁻¹ 1,02 mg.L ⁻¹	Pounds et al. (2008)

Fonte: Da autora.

De acordo com a Tabela 3, a toxicidade de um certo fármaco é muito heterogênea entre as espécies em que é testado. De fato, Lewis (1995) afirma que as sensibilidades relativas de plantas e de animais são espécie e química-específicas, ou seja, são imprevisíveis. O mesmo autor ainda afirma que não é realístico o conceito de que existe um grupo universal com relação à maior sensibilidade aos agentes químicos e que, portanto, dados de toxicidade de animais não são tecnicamente válidos como substitutos para dados de efeitos em plantas de água doce e marinhas. Portanto, testes de fitotoxicidade são necessários para avaliar o impacto de contaminantes ambientais, tais como os causados pelos resíduos farmacológicos.

Além disso, os dados observados nessa tabela confirmam a afirmação de Lewis (1995) de que, muito embora seja reconhecida a importância das plantas pelos ecólogos, as mesmas ainda não são rotineiramente usadas como espécies-teste em estudos de toxicidade, ao contrário do que acontece com vertebrados e invertebrados aquáticos.

2.3.1 Efeitos ecotoxicológicos dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica em organismos aquáticos

Uma vez que o fármaco cloridrato de propranolol tem sido detectado com frequência tanto em águas superficiais quanto em efluentes de estações de tratamento de esgotos e de hospitais, o seu potencial de causar efeitos adversos à biota aquática deve ser investigado. Além disso, o conhecimento de efeitos ecotoxicológicos desse fármaco a organismos de diferentes níveis tróficos e de diferentes ecossistemas aquáticos torna-se essencial a fim de se estabelecer critérios de qualidade da água para a proteção da vida aquática para esse contaminante.

Na Tabela 4, estão mostrados dados ecotoxicológicos dos efeitos do fármaco cloridrato de propranolol a diferentes espécies aquáticas. A *Ecotox Database* (ENVIRONMENTAL

PROTECTION AGENCY - EPA) foi utilizada como base de referência para os dados descritos na referida tabela.

Tabela 4 - Dados ecotoxicológicos dos efeitos do fármaco cloridrato de propranolol a diferentes espécies de organismos-teste.

Espécie	Endpoint	Duração teste	Parâmetro de avaliação do efeito	Concentração de efeito	Referência
Algas					
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	CE ₅₀	24 h	Inibição da taxa de crescimento em pH 6,5-7,2	80 µM (23,7 mg.L ⁻¹)	Neuwoehner e Escher (2011)
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	CE ₅₀	24 h	Inibição da taxa de crescimento em pH 7,5-7,9	41 µM (12,1 mg.L ⁻¹)	Neuwoehner e Escher (2011)
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	CE ₅₀	24 h	Inibição da taxa de crescimento em pH 8,5-8,6	3 µM (0,9 mg.L ⁻¹)	Neuwoehner e Escher (2011)
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	CE ₅₀	24 h	Inibição da taxa de crescimento em pH 9,0	1,5 µM (0,4 mg.L ⁻¹)	Neuwoehner e Escher (2011)
<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	CE ₅₀	24 h	Inibição da taxa de crescimento em pH 10,0-9,4	0,4 µM (0,1 mg.L ⁻¹)	Neuwoehner e Escher (2011)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	CE ₅₀	72 h	Taxa de crescimento média baseada na fluorescência de clorofila	5,8 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
					(continua)

(continuação)

<i>Desmodemus subspicatus</i>	CE ₅₀	72 h	Taxa de crescimento média baseada na fluorescência de clorofila	0,7 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2005)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CENO	72 h	Inibição da taxa de crescimento por propranolol	< 0,78 mg.L ⁻¹	Liu et al. (2009)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CENO	96 h	Inibição da taxa de crescimento	5 mg.L ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE ₅₀	96 h	Inibição da taxa de crescimento	7,4 mg.L ⁻¹	Ferrari et al. (2004)

Invertebrados

<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE ₅₀	48 h	Inibição da mobilidade	1,4 mg. L ⁻¹	Frayse e Garric (2005)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CL ₅₀	48 h	Imobilidade	0,85 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CENO	7 dias	Reprodução	0,125 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CEO	7 dias	Reprodução	0,25 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀	48 h	Imobilidade	7,5 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀	48 h	Imobilidade	7,7 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2005)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀	48 h	Imobilidade	1,4 – 1,67 mg.L ⁻¹	Stanley et al. (2006)
<i>Daphnia magna</i>	CEO	21 dias	Imobilidade	0,8437 mg.L ⁻¹	Stanley et al. (2006)
<i>Daphnia magna</i>	CEO	21 dias	Reprodução	0,050 mg.L ⁻¹	Stanley et al. (2006)
<i>Daphnia magna</i>	CEO	30 min.	Redução da frequência cardíaca	2,61-2,62 mg.L ⁻¹	Stanley et al. (2006)
<i>Daphnia magna</i>	CENO	9 dias	Massa corporal	0,22 mg.L ⁻¹	Dzialowski, Turner e Brooks (2006)
<i>Daphnia magna</i>	CEO	9 dias	Massa corporal	0,44 mg.L ⁻¹	Dzialowski, Turner e Brooks (2006)
					(continua)

(continuação)

<i>Daphnia magna</i>	CENO	9 dias	Fecundidade	0,055 mg.L ⁻¹	Dzialowski, Turner e Brooks (2006)
<i>Daphnia magna</i>	CEO	9 dias	Fecundidade	0,11 mg.L ⁻¹	Dzialowski, Turner e Brooks (2006)
<i>Daphnia magna</i>	CEO	9 dias	Frequência cardíaca	0,055 mg.L ⁻¹	Dzialowski, Turner e Brooks (2006)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀	24 h	Imobilidade	0,0104 mM (3,1 mg.L ⁻¹)	Lilius, Isomaa e Holmström (1994)
<i>Daphnia magna</i>	CL ₅₀	48 h	Imobilidade	1,6 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE ₅₀	48 h	Imobilidade	1,51 mg.L ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CENO	7 dias	Reprodução	0,009 mg.L ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
<i>Hyaella azteca</i>	CL ₅₀	48 h	sobrevivência	29,8 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Hyaella azteca</i>	CENO	27 dias	Reprodução	0,001 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Hyaella azteca</i>	CEO	27 dias	Reprodução	0,1 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Brachionus calyciflorus</i>	CENO	48 h	Reprodução: propranolol	1,0 mg.L ⁻¹	Liu et al. (2009)
<i>Brachionus calyciflorus</i>	CENO	48 h	Reprodução	0,18 mg.L ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
Peixes					
<i>Pimephales promelas</i>	CENO	21 dias	Sobrevivência	0,1 mg.L ⁻¹ (machos) e 1,0 mg.L ⁻¹ (fêmeas)	Giltrow et al. (2009)
<i>Pimephales promelas</i>	CENO	21 dias	Produção de ovos	0,1 mg.L ⁻¹	Giltrow et al. (2009)
<i>Pimephales promelas</i>	CENO	21 dias	Peso fresco	0,1 mg.L ⁻¹ (machos) e >1,0 mg.L ⁻¹ (fêmeas)	Giltrow et al. (2009)
<i>Pimephales promelas</i>	CENO	21 dias	Índice somático gonadal (GSI)	>1,0 mg.L ⁻¹ (machos) e 0,01 mg.L ⁻¹ (fêmeas)	Giltrow et al. (2009)
<i>Pimephales promelas</i>	CENO	21 dias	Número de tubérculos	>1,0 mg.L ⁻¹	Giltrow et al. (2009)

(continua)

					(continuação)
<i>Pimephales promelas</i>	CENO	21 dias	Eclodibilidade e (dias para eclosão)	0,01 mg.L ⁻¹	Giltrow et al. (2009)
<i>Pimephales promelas</i>	48 h	CL ₅₀	sobrevivência	1,21 mg.L ⁻¹	Stanley et al. (2006)
<i>Pimephales promelas</i>	7 dias	CEO	Peso médio por organismo sobrevivente	0,128 mg.L ⁻¹	Stanley et al. (2006)
<i>Pimephales promelas</i>	7 dias	CEO	Porcentagem de sobrevivência	0,750 mg.L ⁻¹	Stanley et al. (2006)
<i>Danio rerio</i>	4 dias	CENO	Movimentos espontâneos das embriões-larvas	<13,5 µM (4 mg.L ⁻¹)	Fraysse, Mons e Garric (2006)
<i>Danio rerio</i>	4 dias	CENO	Frequência cardíaca	13,5 µM (4 mg.L ⁻¹)	Fraysse, Mons e Garric (2006)
<i>Danio rerio</i>	4 dias	CENO	Área pericardial	<13,5 µM (4 mg.L ⁻¹)	Fraysse, Mons e Garric (2006)
<i>Danio rerio</i>	4 dias	CENO	Malformação da calda e comprimento da calda	27 µM (8 mg.L ⁻¹)	Fraysse, Mons e Garric (2006)
<i>Danio rerio</i>	4 dias	CENO	Circulação de sangue na calda e edema (pericardial, saco vitelino)	54 µM (16 mg.L ⁻¹)	Fraysse, Mons e Garric (2006)
<i>Danio rerio</i>	4 dias	CENO	Pro-larvas mortas e taxa de eclosão	54 µM (16 mg.L ⁻¹)	Fraysse, Mons e Garric (2006)
<i>Danio rerio</i>	21 dias	CENO	Índice gonadosomático; densidade dos compartimentos estruturais das gônadas femininas	0,0318 mg.L ⁻¹	Madureira et al. (2011)
<i>Danio rerio</i>	10 dias	CENO	Desenvolvimento embrionário	2 mg.L ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
					(continua)

(continuação)

<i>Oncorhynchus mykiss</i>	40 dias	CENO	Taxa de crescimento, peso fresco, fator condicional	1,0 mg.L ⁻¹	Owen et al. (2009)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	40 dias	CEO	taxa de crescimento, peso fresco, fator condicional	10 mg.L ⁻¹	Owen et al. (2009)
<i>Oryzias latipes</i>	48 h	CL ₅₀	Sobrevivência	24,3 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Oryzias latipes</i>	14 dias	CEO	Redução no crescimento	0,5 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)
<i>Oryzias latipes</i>	4 semanas	CEO	Diminuição da eclosão de ovos	0,0005 mg.L ⁻¹	Huggett et al. (2002)

Macrófitas

<i>Lemna minor</i>	7 dias	CE ₅₀	Inibição da taxa de crescimento (área foliar)	114 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Lemna minor</i>	7 dias	CE ₅₀	Inibição da taxa de crescimento (área foliar)	113 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2005)
<i>Lemna minor</i>	7 dias	CE ₅₀	Inibição da taxa de crescimento (área foliar)	114 mg.L ⁻¹	Cleuvers (2003)
<i>Lemna minor</i>	7 dias	CE ₅₀	Inibição da taxa de crescimento (área foliar)	21,2 mg.L ⁻¹	Kaza, Nalecz-Jaweckie e Sawicki (2007)

Protistas

<i>Spirostomum ambiguum</i>	24 h (dureza da água <10 mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CE ₅₀	Mudanças morfológicas	2,92 ppm (mg.L ⁻¹)	Nalecz-Jawecki e Sawicki (2005)
<i>Spirostomum ambiguum</i>	24 h (dureza da água <10 mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CL ₅₀	Resposta letal (deformação esférica e autólise)	4,23 ppm (mg.L ⁻¹)	Nalecz-Jawecki e Sawicki (2005)
					(continua)

(continuação)

<i>Spirostomum ambiguum</i>	24 h (dureza da água 200 mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CE ₅₀	Mudanças morfológicas	2,65 ppm (mg.L ⁻¹)	Nalecz-Jawecki e Sawicki (2005)
<i>Spirostomum ambiguum</i>	24 h (dureza da água 200 mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CL ₅₀	Resposta letal	4,10 ppm (mg.L ⁻¹)	Nalecz-Jawecki e Sawicki (2005)
<i>Spirostomum ambiguum</i>	48 h (dureza da água < 10 mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CE ₅₀	Mudanças morfológicas	2,63 ppm (mg.L ⁻¹)	Nalecz-Jawecki e Sawicki (2005)
<i>Spirostomum ambiguum</i>	48 h (dureza da água < 10 mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CL ₅₀	Resposta Letal	3,11 ppm (mg.L ⁻¹)	Nalecz-Jawecki e Sawicki (2005)
<i>Spirostomum ambiguum</i>	48 h (dureza da água 200 mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CE ₅₀	Mudanças morfológicas	1,60 ppm (mg.L ⁻¹)	Nalecz-Jawecki e Sawicki (2005)
<i>Spirostomum ambiguum</i>	48 h (dureza da água 200 mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CL ₅₀	Resposta Letal	3,20 ppm (mg.L ⁻¹)	Nalecz-Jawecki e Sawicki (2005)
<i>Tetrahymena termophila</i>	24 h (dureza da água <10 mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CE ₅₀	Inibição do crescimento	79,5 ppm (mg.L ⁻¹)	Nalecz-Jawecki e Sawicki (2005)
					(continua)

(conclusão)

<i>Tetrahymena termophila</i>	24 h (dureza da água 200 mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	CE ₅₀	Inibição do crescimento	43,5 ppm (mg.L ⁻¹)	Nalecz-Jawecki e Sawicki (2005)
Bactérias, Cianofíceas e Diatomáceas					
<i>Vibrio fischeri</i>	30 min	CE ₅₀	Inibição da luminescência	61 mg.L ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
<i>Synechococcus leopolensis</i>	96 h	CE ₅₀	Inibição do crescimento	0,668 mg.L ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
<i>Synechococcus leopolensis</i>	96 h	CENO	Inibição do crescimento	0,35 mg.L ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	96 h	CE ₅₀	Inibição do crescimento	0,244 mg.L ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	96 g	CENO	Inibição do crescimento	0,094 mg.L ⁻¹	Ferrari et al. (2004)
Moluscos					
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	10 dias	CENO	Taxa de alimentação	0,011 mg.L ⁻¹	Solé et al. (2010)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	10 dias	CEO	Taxa de alimentação; metabolismo de fase I; danos nos níveis de peroxidação lipídica	0,147 mg.L ⁻¹	Solé et al. (2010)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	10 dias	CEO	Atividade da glutathione S-transferase	0,011 mg.L ⁻¹	Solé et al. (2010)

Fonte: Da autora.

A observação da Tabela 4 permite depreender que os efeitos do fármaco cloridrato de propranolol foram avaliados na macrófita *Lemna minor* somente com relação ao parâmetro área foliar total (CLEUVERS, 2005; KAZA; NALE CZ-JAWECKIE; SAWICKI, 2007).

Já com relação aos dados ecotoxicológicos dos efeitos da losartana potássica, a base de dados da *Ecotox Database* não retorna nenhum resultado, o que reflete a escassez de avaliações ecotoxicológicas realizadas para esse fármaco. No entanto, com a detecção recente da presença desse composto farmacológico em águas superficiais e de fundo na área de descarte do efluente do emissário submarino de Santos-SP (GUIMARÃES et al., 2012), Yamamoto et al. (2012; 2014) têm avaliado os efeitos de toxicidade desse fármaco para cladóceros e para uma espécie de ouriço-do-mar, conforme mostrado na Tabela 5, na qual

também estão apresentados os dados de avaliação ecotoxicológica desse fármaco, realizada pelo Food and Drug Administration (FDA - USA).

Tabela 5 - Dados ecotoxicológicos dos efeitos da losartana potássica.

Espécie	Expressão do resultado	Duração teste	Endpoint	Concentração de efeito	Referência
Invertebrados					
<i>Daphnia similis</i>	CE ₅₀	48 h	Imobilidade	175,26 mg.L ⁻¹	Yamamoto et al. (2012)
<i>Daphnia magna</i>	CL ₅₀	48 h	Imobilidade	331 mg.L ⁻¹	United States of America-FDA (2001)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CENO CEO	7 dias 7 dias	Reprodução	10 mg.L ⁻¹ 100 mg.L ⁻¹	Yamamoto et al. (2012)
Peixes					
<i>Pimephales promelas</i>	CL ₅₀	48 h	Letalidade	>1000 mg.L ⁻¹	United States of America-FDA (2001)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	CL ₅₀ CENO	96 h	Letalidade	>929 mg.L ⁻¹ >929 mg.L ⁻¹	United States of America-FDA (2001)
Equinodermo					
<i>Lytechinus variegatus</i>	CENO CEO	24-28 h	Desenvolvimento embrio larval	50 mg.L ⁻¹ 70 mg.L ⁻¹	Yamamoto et al. (2014)

Fonte: Da autora.

Conforme observado na Tabela 5, não existem, até o momento da presente pesquisa, dados de fitotoxicidade de efeitos da losartana potássica para plantas superiores.

2.4 Os fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica e as suas propriedades farmacológicas e físico-químicas

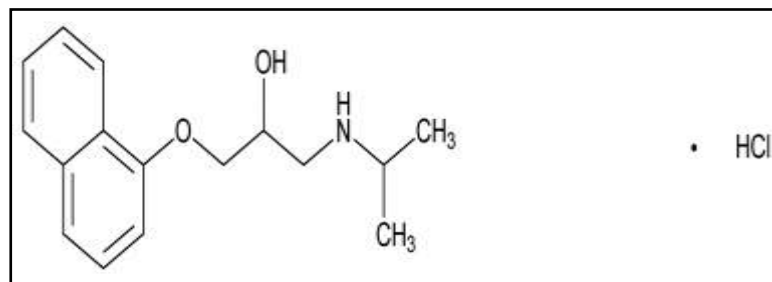
2.4.1 O cloridrato de propranolol e suas propriedades farmacológicas e físico-químicas

O cloridrato de propranolol (FIGURA 2) é um fármaco antagonista competitivo dos receptores β (betaadrenérgicos), com afinidade igual pelos receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos, isto é, trata-se de um antagonista não-seletivo dos receptores betaadrenérgicos. As suas

principais aplicações terapêuticas são no tratamento da angina, da hipertensão arterial, de arritmias cardíacas, da insuficiência cardíaca congestiva, do feocromocitoma, do glaucoma, da miocardiopatia obstrutiva hipertrófica, do hipertireoidismo, da profilaxia da enxaqueca e dos sintomas de pânico agudo (GOODMAN; GILMAN, 2006).

O propranolol é extensamente biotransformado, sendo que a maior parte dos metabólitos aparece na urina, dentre eles, o 4-hidroxiopropranolol (WESTFALL; WESTFALL, 2012) e menos de 1% é excretado de forma inalterada na urina (BRASIL, 2008).

Figura 2- Estrutura química do cloridrato de propranolol



Fonte: <https://mc.usp.org/monographs/propranolol-hydrochloride-0-1>

Esse fármaco apresenta-se na forma de um pó branco ou quase branco, inodoro, de sabor amargo e aspecto cristalino ou amorfo, solúvel em água e em etanol, pouco solúvel em clorofórmio, insolúvel em éter etílico (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Na Tabela 6, estão apresentados o nome químico, fórmula e peso moleculares, o número de registro *Chemical Abstracts Services* (CAS) e outras propriedades físico-químicas do cloridrato de propranolol.

Tabela 6 - Nome químico, peso e fórmula moleculares e outras propriedades físico-químicas do cloridrato de propranolol.

Nome químico	Cloridrato de 1-[(1-metiletil)amino]-3-(1-naftalenilox)-2-propranol
Fórmula molecular ^a	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂ . HCl
Número de registro CAS ^a	318-98-9
Peso molecular ^b	295,80
Log Kow ^c	0,74
Log Koc ^c	3,3
Solubilidade em água (mg.L⁻¹) ^c	3009
pKa ^d	9,60

^a Fonte: SciFinder®

^b Fonte: Proikakis, Tarantili e Andreopoulos (2006)

^c Fonte: Jones, Voulvoulis e Lester (2006)

^d Fonte: Wan et al. (2003)

O coeficiente de partição água-octanol (Kow) é uma medida da lipofilicidade de um composto e é definido como a razão da concentração do mesmo, em equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, água e octanol (SILVA; FERREIRA, 2003). Quanto menor o valor de log Kow, maior a tendência de um composto permanecer na fase líquida e maior a tendência de ser mais facilmente lixiviado de lodos ou sedimentos (JONES; VOULVOULIS; LESTER, 2006). No estudo realizado por Jones, Voulvoulis e Lester (2006), o cloridrato de propranolol mostrou-se mais provável de ser encontrado dissolvido na fase aquosa de sistemas contaminados, assim como predito por seu valor de log Kow.

O coeficiente de partição carbono orgânico-água (Koc), também conhecido como coeficiente de partição solo-água ou coeficiente de adsorção, é um parâmetro que representa a distribuição de um composto entre o carbono orgânico e a água (ATSDR-USA, 2005). De acordo com Jones, Voulvoulis e Lester (2006), quanto maior o valor de log Koc, maior a probabilidade de um composto adsorver-se a compostos contendo carbono orgânico, tais como sólidos suspensos, gorduras apolares, lipídios, óleos minerais, graxas e surfactantes geralmente presentes no esgoto doméstico.

A solubilidade em água é a medida da máxima concentração de um composto químico que se dissolve numa quantidade estabelecida de água pura. Em geral, agentes químicos muito solúveis em água, como é o caso do cloridrato de propranolol, tendem a ser transportados para

águas subterrâneas, ao contrário do que ocorre com compostos insolúveis (ATSDR-USA, 2005).

O K_a é chamado de constante de ionização ou de dissociação do ácido. O pK_a é o pH no qual a metade do fármaco (ácido ou base fraca) está em sua forma ionizada. Em geral, as moléculas não ionizadas são mais lipossolúveis e podem difundir-se facilmente pela membrana celular, enquanto que as moléculas ionizadas normalmente são menos capazes de penetrar na membrana lipídica porque são pouco lipossolúveis e sua transferência depende da permeabilidade da membrana (BUXTON; BENET, 2012). Quanto maior for o valor de pK_a , mais fraco é o ácido (ATKINS; JONES, 2006). O cloridrato de propranolol comporta-se como uma base fraca (PROIKAKIS; TARANTILI; ANDREOPOULOS, 2006).

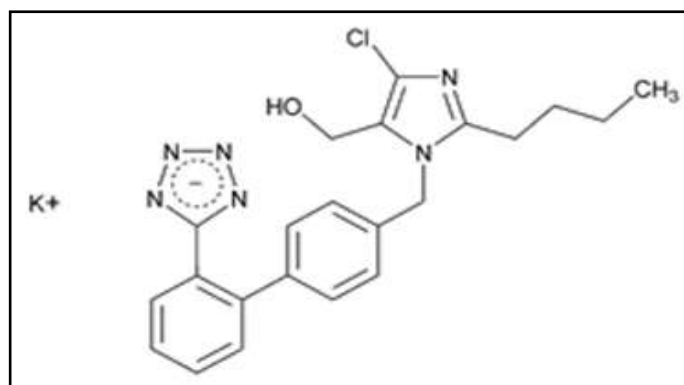
Com relação à estabilidade do cloridrato de propranolol em solução, Kaza, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2007) fizeram a análise das concentrações inicial e final desse fármaco, extraído do meio dos testes realizados com *L. minor*, após 7 dias de exposição à luz, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Os autores concluíram que não houve mudanças superiores a 2,5% da concentração inicial aplicada do fármaco em solução. Cleuvers (2005) afirma que a avaliação da fotodegradação do propranolol apresenta um tempo de meia-vida de 16,8 dias. Portanto, o cloridrato de propranolol apresenta uma persistência relativamente elevada à fotodegradação.

2.4.2 A losartana potássica e suas propriedades farmacológicas e físico-químicas

A losartana potássica (FIGURA 3) é um antagonista não-peptídico e seletivo dos receptores de angiotensina II e age de modo a reduzir a pressão arterial, além de ter sido aprovada para a profilaxia do acidente vascular cerebral (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Com relação ao metabolismo e excreção desse fármaco, aproximadamente 4% da dose administrada são excretadas de forma inalterada na urina e aproximadamente 6% são excretadas na urina na forma do metabólito ativo de ácido carboxílico (UNITED STATES OF AMERICA-FDA, 2002).

Figura 3 - Estrutura química da losartana potássica



Fonte: <https://mc.usp.org/monographs/losartan-potassium-1-0>

Esse fármaco apresenta-se na forma de um pó cristalino branco ou quase branco, solúvel em água e em etanol, praticamente insolúvel em acetato de etila, clorofórmio e cloreto de metileno (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Na Tabela 7, estão apresentados o nome químico, a fórmula e peso moleculares e outras propriedades físico-químicas da losartana potássica.

Tabela 7 - Nome químico, fórmula e peso moleculares e outras propriedades físico-químicas da losartana potássica.

Nome químico	Sal de potássio de 2-butil-4-cloro-1-[[2'-(2H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazol-5-metanol
Fórmula molecular ^a	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₆ O. K
Número de registro CAS ^a	124750-99-8
Peso molecular ^b	461,00
Log Kow ^c	1,19
Solubilidade em água (mg.L⁻¹) ^b	3.300
pKa ^b	4,9

^a Fonte: SciFinder[®]

^b Fonte: Williams et al. (1996)

^c Fonte: United States of America-FDA (2002)

A elevada solubilidade e o valor de log Kow sugerem que a losartana potássica, à semelhança do que ocorre com o cloridrato de propranolol, apresenta baixo potencial para se ligar ao lodo das estações de tratamento de esgoto e a outros materiais orgânicos (UNITED STATES OF AMERICA-FDA, 2002), ao mesmo tempo em que seu potencial para ser

transportado para corpos de água superficiais e subterrâneos não pode ser descartado. Porém, ao contrário do que ocorre com o cloridrato de propranolol, a losartana potássica é um ácido fraco (JALALIZADEH et al., 2003).

De acordo com a United States of America-FDA (2001), a losartana potássica não sofre hidrólise rápida em pH 5, 7 e 9 e, com relação à fotólise, a meia-vida desse fármaco é de 10, 12 e 18 horas em pH 5, 7 e 9, respectivamente. Contudo, tais dados não são, por si só, conclusivos para se inferir a respeito de uma possível atenuação das concentrações desse fármaco em condições ambientais, uma vez que se sabe que a fotodegradação em águas superficiais depende da intensidade de luz incidente, a qual varia na dependência das condições geográficas e sazonais. Além disso, a taxa de fotorreação é afetada por sólidos suspensos e dissolvidos, por exemplo, os ácidos húmicos que, por estarem, normalmente, presentes em concentrações superiores às do composto químico em consideração, absorvem a maior porção da luz solar penetrante nesses ambientes (EUROPEAN COMMUNITIES, 2003). Além disso, os relatos de detecção da losartana potássica em águas superficiais e de fundo (GUIMARÃES et al., 2012; BOUISSOU-SCHURTZ et al., 2014; OOSTERHUIS; SACHER; TER LAAK, 2013; LARSSON; PEDRO; PAXEUS, 2007) indicam uma relativa persistência desse fármaco em ambientes aquáticos, assim como ocorre com o cloridrato de propranolol.

2.5 A predição de adição de concentração ou de ação independente para efeitos de combinação de fármacos

De acordo com Cleuvers (2005), dois diferentes conceitos são usados para predizer a toxicidade de misturas e são chamados de adição de concentração e ação independente. Tais conceitos, de acordo com Faust et al. (2003), representam hipóteses diferentes sobre a relação funcional entre a toxicidade das substâncias em ação individual e em ação combinada.

O conceito de adição de concentração parte do princípio de que os componentes de uma mistura química compartilham de um mecanismo de ação comum, isto é, que cada componente apresenta a mesma interação específica com um alvo molecular no organismo-teste. Contudo, de um ponto de vista mais geral, a ação similar poderia ser observada para todas as substâncias capazes de causar uma resposta toxicológica em comum, por exemplo, morte ou inibição da reprodução (CLEUVERS, 2003; CLEUVERS, 2004; FAUST et al., 2003). Partindo deste ponto de vista, afirmam Faust et al. (2003), o conceito de adição de

concentração pode aplicar-se a quase todos os compostos químicos, dependendo apenas das concentrações biodisponíveis. Ainda de acordo com os mesmos autores, esse conceito tem sido sugerido como “a solução geral para o problema de se calcular um efeito quantitativo esperado para qualquer combinação de agentes químicos, e sem referência ao seu mecanismo de ação” (FAUST et al., 2003, p.44).

De acordo com Cleuvers (2005, p. 200), “adição de concentração significa que substâncias aplicadas abaixo de sua concentração de nenhum efeito observado individual podem, todavia, contribuir para o efeito total da mistura” . O conceito de adição de concentração pode ser descrito matematicamente por (BERENBAUM, 1985):

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{CEx_i} = 1 \quad (1)$$

em que: c_i são as concentrações individuais das substâncias, em separado, presentes em uma mistura com um efeito total de $x\%$ e CEx_i são as concentrações das substâncias, em separado, que, sozinhas, causariam o mesmo efeito x que foi observado para a mistura.

O conceito alternativo de ação independente, por sua vez, parte do princípio da ação diferente, não similar, entre os componentes de uma mistura, isto é, que os toxicantes interagem com alvos moleculares diferentes, resultando em uma resposta toxicológica comum por meio de cadeias de reações distintas em um organismo (CLEUVERS, 2003; FAUST et al., 2003). De acordo com esse conceito, “o efeito relativo de um dos toxicantes em uma mistura deveria permanecer imutável na presença de um outro” (CLEUVERS, 2005, p. 200).

A equação que descreve o efeito de combinação que age segundo a ação independente para uma mistura binária é dada, de acordo com Cleuvers (2005), por:

$$E(c_{mis}) = 1 - [(1 - E(c_1))(1 - E(c_2))] \quad (2)$$

em que: $E(c_1)$ e $E(c_2)$ são os efeitos das substâncias individuais e $E(c_{mis})$ é o efeito total da mistura.

O modelo de adição de concentração é frequentemente o preferido para o propósito de avaliação de risco (CEDERGREEN et al., 2007b), por ser, em geral, mais conservativo, pois na maioria dos casos, o modelo de ação independente prediz uma toxicidade mais baixa de uma mistura do que o modelo de adição de concentração, exceto quando a relação dose-resposta é rasa (CEDERGREEN; STREIBIG, 2005). Na literatura, são relatados exemplos de casos em que os modelos de adição de concentração e/ou de ação independente foram capazes

de prever satisfatoriamente a toxicidade de uma certa mistura de compostos químicos. Por exemplo, Cleuvers (2005) concluiu que o modelo de adição de concentração prediz a toxicidade da mistura dos fármacos beta-bloqueadores cloridrato de propranolol, atenolol e tartarato de metoprolol de forma muito acurada em testes de imobilidade realizados com *Daphnia magna*. Em testes de inibição da taxa de crescimento realizados com a alga *Desmodesmus subspicatus*, utilizando uma mistura dos anti-inflamatórios ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno e diclofenaco, Cleuvers (2004) também concluiu que o modelo de adição de concentração predisse a toxicidade da mistura acuradamente. Altenburger et al. (2000), ao testarem o efeito de mistura de 16 compostos químicos derivados do fenol em testes de 30 minutos com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*, concluíram que a adição de concentração mostrou um excelente poder preditivo, tendo sido a CE_{50} da mistura predita com um erro de, aproximadamente, 10%. Em testes com a duração de 24 h, realizados com essa mesma espécie de bactéria, utilizando uma mistura de 10 antibióticos sintéticos da classe das quinolonas, Backhaus, Scholze e Grimme (2000) relataram que a toxicidade dessa mistura foi melhor predita pelo modelo de adição de concentração. Por outro lado, exemplos de acurácia observada no poder preditivo do modelo de ação independente incluem, por exemplo, os estudos realizados por Faust et al. (2003), os quais concluíram que esse modelo resultou em previsões bastante precisas dos efeitos de ação combinada de 16 compostos químicos, com diferentes mecanismos ou alvos moleculares em algas, em testes de 24 h com a alga *Scenedesmus vacuolatus*. Cleuvers (2003) também encontrou uma predição acurada pelo modelo de ação independente ao testar os efeitos da mistura do redutor lipídico ácido clofibrínico e do anti-convulsivante carbamazepina na alga *Desmodesmus subspicatus*.

Contudo, embora ambos os modelos de adição de concentração e de ação independente possam fornecer um embasamento matemático inicial para a predição do efeito de mistura, conforme relatado nos exemplos supracitados, interações entre os compostos podem ocorrer, o que pode levar com que o efeito da mistura desvie de um modelo ou de outro ou, ainda, de ambos os modelos. Nesses casos, a presença de um composto genérico **A** modifica a toxicidade do composto **B** na mistura, o que significa que a toxicidade dos compostos em ação combinada não é a soma de suas toxicidades individuais e/ou que as probabilidades de resposta entre o composto **A** e o composto **B** não são completamente independentes (SPURGEON et al., 2010).

As interações que podem ocorrer entre os compostos em uma mistura podem ser associadas a processos causados por exposição externa, isto é, devido a interações dos compostos químicos com componentes abióticos, tais como partículas de solo e sedimento e

substâncias húmicas dissolvidas, o que pode alterar a disponibilidade ambiental desses compostos e, conseqüentemente, a extensão com que os organismos são expostos aos mesmos. As interações de compostos químicos podem, ainda, ser causadas por etapas toxicocinéticas, ou seja, por interações no local de captação e/ou de eliminação dos agentes químicos do organismo ou, ainda, por interações que modificam a detoxificação ou a compartimentalização de um ou mais compostos. Por último, as interações podem ocorrer por toxicodinâmica, ou seja, por interações no sítio de ação, afetando a ligação do(s) composto(s) ao receptor (SPURGEON et al, 2010).

Desta forma, por fim, diz-se que quando uma mistura de compostos químicos resulta em um efeito maior do que o predito por um dos dois modelos aqui descritos, essa mistura é dita ser sinérgica em relação à adição de concentração ou em relação à ação independente, ou a ambos. Por outro lado, se os efeitos combinados de dois compostos químicos é menor do que o predito pelos modelos, esse efeito é chamado de antagonismo (CEDERGREEN et al., 2007b).

2.6 O organismo-teste *Lemna minor* e a importância dos testes de fitotoxicidade

As comunidades vegetais são importantes no funcionamento de ecossistemas de água doce, marinho e estuarino. Em particular, as macrófitas provêm hábitat e abrigo e servem como alimento para diversas formas de vida animal, além de serem importantes na ciclagem de nutrientes e no controle da erosão (LEWIS, 1995). Ademais, as plantas desempenham um importante papel ao afetarem a intensidade luminosa, temperatura, pH, dureza e oxigênio dissolvido na coluna d'água de ambientes naturais (LEWIS, 1995), além de serem usadas para remover contaminantes de efluentes, ou seja, com fins de fitorremediação (AXTELL; STERNBERG; CLAUSSEN, 2003). Assim, a depleção das macrófitas pela poluição pode afetar negativamente os ecossistemas aquáticos (LEWIS, 1995).

As espécies comumente chamadas de lentilha-d'água (*Lemna* spp.), dentre as quais se encontra a *Lemna minor* L. (1753) (FIGURA 4), pertencem à família *Lemnaceae* e são um grupo de angiospermas aquáticas vasculares (WANG, 1990), amplamente encontradas em ambientes aquáticos, em águas paradas ou em ligeiro movimento e são encontradas em todas as intensidades luminosas (HILLMAN, 1961). Em geral, temperaturas entre 20° C e 30° C são mais favoráveis ao crescimento das plantas da família *Lemnaceae* (HILLMAN, 1961).

A *Lemna minor* é uma das formas mais diminutas dessa família, com 2 a 4 mm de diâmetro, frondes ovais e raiz única (LEWIS, 1995). Essa macrófita forma agregados de duas ou mais frondes em uma colônia e tem crescimento extremamente rápido, com tempo de duplicação de 1,3 a 2,8 dias (WANG, 1990). A reprodução é vegetativa, sendo que a produção de novas frondes “filhas” ocorre a partir da extremidade mais estreita de uma fronde “mãe”, próximo ao ponto de crescimento da raiz (HILLMAN, 1961).

Figura 4 - A macrófita aquática *Lemna minor*.



Fonte: <http://www.akva.sk/lemna-minor-t1780.html>.

As espécies de lentilha-d'água são as plantas vasculares mais comumente usadas em testes de fitotoxicidade por causa de seu pequeno tamanho, rápido crescimento e simplicidade estrutural (LEWIS, 1995). De acordo com Aliferes et al. (2009), o tamanho diminuto da planta, que é de fácil cultivo em condições laboratoriais, facilita a experimentação em condições cujo espaço é limitado, porém permite observações macroscópicas. Ainda assim, seu uso é consideravelmente menor do que o uso de algas para tal finalidade (LEWIS, 1995). Wang e Freemark (1995) afirmam que os testes de fitotoxicidade, embora indicados, não são rotineiramente praticados na avaliação ambiental de substâncias tóxicas e de efluentes complexos. Souza (2008) reforça essa afirmação ao lembrar que, muito embora seja amplamente distribuída no Brasil, a utilização de *Lemna sp.* em ensaios ecotoxicológicos é ainda pequena se comparada com outros organismos aquáticos. Muito embora testes com algas tenham sido usados como substitutos para plantas vasculares, a sensibilidade destas últimas pode diferir grandemente daquelas (LEWIS, 1995; CLEUVERS, 2003).

Portanto, os testes de fitotoxicidade com macrófitas são necessários e complementares na avaliação do impacto de potenciais contaminantes em ambientes aquáticos. Para esse propósito, organizações como a *Organisation for Economic Co-operation and Development*

(OECD) têm desenvolvido protocolos para estimarem-se os efeitos de agentes químicos em ensaios de inibição do crescimento com *Lemna* sp (OECD, 2006).

2.7 Derivação de critérios de qualidade da água (CQA) para a proteção da vida aquática no Brasil

Os critérios de qualidade da água são “valores máximos permitidos, para cada substância química possivelmente presente na água, que garantem os seus usos pretendidos” (UMBUZEIRO; KUMMROW; REI, 2010, p.4). No que se refere à proteção da vida aquática, os critérios de qualidade da água têm por objetivo garantir concentrações seguras para proteger as diferentes formas de vida, presentes nos ecossistemas de água doce e marinho, de efeitos adversos causados por agentes químicos (UMBUZEIRO et al., 2011). Nesse sentido, uma das etapas do processo de avaliação de efeitos ambientais compreende a determinação da concentração de nenhum efeito previsto ou, em inglês, *Predicted no effect concentration* (PNEC). A concentração de nenhum efeito previsto é a concentração abaixo da qual é improvável que ocorra um efeito inaceitável. A princípio, esse valor é calculado dividindo-se o valor mais baixo de CE_{50}/CL_{50} ou, ainda, o mais baixo valor de CENO por um fator de avaliação adequado, usando dados de espécies representativas de diferentes níveis tróficos, para um certo compartimento ambiental. O cálculo do PNEC parte dos pressupostos de que a sensibilidade de um ecossistema depende das espécies mais sensíveis e de que a proteção destas, por sua vez, protege o funcionamento do ecossistema (EUROPEAN COMMUNITIES, 2003).

A Resolução CONAMA nº 430 de 2011 (BRASIL, 2011), que estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes e veio complementar e alterar a Resolução CONAMA nº 357 de 2005 (BRASIL, 2005a), estabelece que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente no corpo receptor desde que obedeçam as condições e padrões previstos na referida Resolução. Contudo, tais padrões não contemplam especificamente os resíduos de fármacos, ainda que estabeleça que o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, baseados em critérios de ecotoxicidade.

De fato, uma vez que os fármacos são contaminantes ambientais emergentes com potencial de causar efeitos adversos aos seres vivos, surge a necessidade de se estabelecerem padrões de qualidade, para a proteção das variadas espécies aquáticas, também com relação a

esse tipo de agente químico. Nesse sentido, a derivação de critérios de qualidade da água surge como uma proposta para o cálculo de valores norteadores que poderão ser utilizados no estabelecimento de padrões legais e ou regulamentações para a proteção das diferentes formas de vida aquática dos ecossistemas de água doce e marinho, além de poderem servir também de referência para o estabelecimento de metas de qualidade da água para a proteção de um corpo d'água específico (UMBUZEIRO et al., 2011).

O Brasil ainda não possui uma metodologia estabelecida para derivar critérios de qualidade da água para a proteção da vida aquática, o que acarreta a falta de valores máximos permitidos individuais nas normas nacionais (UMBUZEIRO et al., 2011; UMBUZEIRO; KUMMROW; REI, 2010). Assim, uma proposta para o desenvolvimento de um protocolo para derivação de critérios de qualidade da água para proteção da vida aquática foi desenvolvido por Umbuzeiro et al. (2011), durante o workshop “Estratégias para definição de critérios ambientais para a proteção da saúde humana e do ecossistema”, durante o IX Congresso Brasileiro de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, em Jundiaí, São Paulo-SP. Nesse documento, os autores apontam a necessidade de se tratar a questão da contaminação ambiental por compostos emergentes, dentre eles, os produtos farmacêuticos.

Desta forma, depreende-se que a realização de testes ecotoxicológicos com fármacos e com produtos farmacêuticos torna-se necessária para o cálculo de concentrações de efeitos não previstos e, portanto, para o estabelecimento de padrões e ou de regulamentações que visem preservar a biota aquática também dos efeitos adversos causados por esses contaminantes.

2.7.1 O uso de modelos de relações quantitativas estrutura-atividade (RQEA) para a derivação de critérios preliminares de qualidade da água

De acordo com Umbuzeiro et al. (2011), quando não há dados suficientes para a derivação de critérios de qualidade da água para a proteção de organismos pelágicos, pode-se recorrer a modelos apropriados de relações quantitativas estrutura-atividade (RQEA) para a previsão dos dados faltantes. Tais modelos são relações quantitativas entre a estrutura da substância química, incluindo uma ou mais características físico-químicas ou estruturais, e um efeito biológico específico, que pode incluir qualquer efeito ou característica mensurável do destino biológico observado, após exposição crônica ou aguda a um agente químico (AUER; NABHOLZ; BAETCKE, 1990). Portanto, os modelos de RQEA são capazes de prever

propriedades físico-químicas, químicas e biológicas de compostos químicos não avaliados, por meio de comparações estruturais e/ou quantitativas de uma série de compostos relacionados e avaliados, baseadas na estrutura e na composição da molécula (SANDERSON et al., 2004). De acordo com Umbuzeiro et al. (2011), esses modelos partem do pressuposto de que compostos estruturalmente similares comportam-se toxicologicamente de forma também similar e, portanto, podem ser utilizados para prever a toxicidade de um agente químico.

Nesse sentido, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) desenvolveu o programa *Ecological Structure Activity Relationships* (ECOSAR), o qual consiste em um sistema preditivo computadorizado capaz de estimar a toxicidade aquática de compostos químicos orgânicos, por meio de relações estrutural-atividade baseadas nas similaridades estruturais destes compostos com outros cujas toxicidades aquáticas foram previamente medidas (SANDERSON et al., 2004). As previsões feitas por meio do ECOSAR são baseadas em dados validados de toxicidade resultantes de testes para peixes (de água doce e salgada), dafnídeos e algas verdes e, portanto, perfazem grupos de organismos-modelo e não espécies específicas, de acordo com Sanderson et al. (2004). Ainda de acordo com esses autores, as previsões realizadas por esse programa resultam em dados de valores de $CL_{50, 96 h}$ para peixes, $CL_{50, 48h}$ para dafnídeos e $CE_{50, 96h}$ para algas (combinando dados de testes de 72 h e 96 h), além de valores crônicos para peixes (20 a 28 dias), para dafnídeos (14 a 21 dias) e para algas verdes (combinando dados de 72 e 96 h de testes). Muito embora o ECOSAR possa ser muito útil na previsão da toxicidade de um determinado agente químico, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (UNITED STATES OF AMERICA-EPA, 2012), esse programa não é habilitado para a avaliação simultânea de compostos múltiplos e, portanto, não conta com efeitos sinérgicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos testes ecotoxicológicos

Os testes ecotoxicológicos foram realizados em câmara de germinação com fotoperíodo, marca Solab Científica, modelo SL 224, no laboratório multiusuário IV da Universidade Federal de Alfenas, *campus* Poços de Caldas-MG.

3.2 Norma seguida para a realização dos testes ecotoxicológicos

Os testes ecotoxicológicos com os fármacos cloridrato de propranolol, losartana potássica e os testes de sensibilidade ao cloreto de sódio (NaCl) foram conduzidos de acordo com o Guia da OECD para o teste de compostos químicos – OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS – *Lemna sp.* Growth Inhibition Test – 221 (2006).

3.3 Fármacos e reagentes

Os testes de sensibilidade foram realizados empregando-se cloreto de sódio (NaCl), grau analítico, fornecido pela Vetec Química Fina, de teor mínimo de 99,0%, como substância de referência. O meio de cultivo utilizado nos bioensaios foi o Steinberg modificado (OECD, 2006), cujos reagentes e respectivas quantidades utilizadas para o preparo das soluções-estoque, bem como os volumes empregados destas para o preparo da solução final do meio de cultivo, constam no ANEXO A.

Os fármacos testados foram o cloridrato de 1-[(1-metiletil)amino]-3-(1-naftalenilox)-2-propranolol, conhecido comercialmente como cloridrato de propranolol (CAS 318-98-9), de origem e procedência da China e com teor de 98,31%, fornecido pela Pharmanostra[®], e o sal de potássio de 2-butil-4-cloro-1-[[2'-(2H-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1H-imidazol-5-metanol, comercialmente conhecida como losartana potássica (CAS 124750-99-8), de origem e procedência da Índia e com teor de 100,6%, fornecido pela Fagron.

3.4 Cultivo do organismo-teste *Lemna minor*

O cultivo da macrófita *Lemna minor* foi realizado conforme as especificações da norma OECD (2006), com a modificação de que foi utilizado fotoperíodo ao invés de iluminação contínua, a fim de proporcionar condições mais próximas das ambientais.

As plantas foram obtidas de cultivos já mantidos no laboratório multiusuário IV da Universidade Federal de Alfenas.

Conforme estabelecido pela norma OECD (2006), as macrófitas foram aclimatadas durante 3 semanas antes da realização dos primeiros testes, em 2 L de meio de cultivo Steinberg contidos em cristalizador de vidro coberto com filme de PVC, com perfurações de cerca de 1mm de diâmetro para permitir as trocas gasosas e evitar contaminações. O cultivo foi mantido sob as mesmas condições dos testes, em câmara de germinação com fotoperíodo de 12/12 h, temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ e intensidade luminosa de 6550 lux.

Semanalmente, o meio do cultivo foi trocado e, a cada 15 dias, procedeu-se à desinfecção das macrófitas, por imersão das mesmas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v), por 5 minutos, seguido de lavagem com água destilada e, então, colocadas em meio de cultivo.

3.5 Controle de sensibilidade da *Lemna minor* e estabelecimento da carta-contrôle

A sensibilidade da *Lemna minor* cultivada foi avaliada, mensalmente, concomitante ao período de realização dos testes com os fármacos, utilizando o cloreto de sódio (NaCl) como substância de referência. As condições de realização dos testes de sensibilidade bem como as variáveis medidas foram as mesmas utilizadas nos demais testes de toxicidade realizados.

Para o preparo da solução-estoque, 50.000 mg.L⁻¹ de NaCl, exatamente pesados em balança analítica, foram diluídos em meio de cultivo até o volume de 500 mL, resultando na concentração final de 100.000 mg.L⁻¹. Os volumes de 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 e 7,5 mL foram transferidos da solução-estoque, com o auxílio de pipeta volumétrica, para balões volumétricos de 100 mL contendo meio de cultivo, resultando nas respectivas concentrações-teste de 1500; 2500; 3500; 4500; 5500; 6500 e 7500 mg.L⁻¹, além do controle. Foram feitas 3 réplicas para cada tratamento e para o controle.

A CE_{50-7 dias} média de cada teste de sensibilidade foi calculada com base no número de frondes. A partir dos valores de CE₅₀ obtidos, calcularam-se a média e os valores correspondentes a dois desvios-padrão superior e inferior à média, a fim de estabelecer a faixa

de aceitabilidade em termos de variabilidade dos testes, a um nível de 95% de confiança, expressa pela carta-controle.

3.6 Testes de toxicidade dos fármacos para *Lemna minor*

Os testes ecotoxicológicos foram realizados sob as mesmas condições do cultivo, em câmara de germinação com fotoperíodo de 12/12 h e temperatura de $24\pm 2^\circ\text{C}$, durante 7 dias.

Cada unidade experimental consistiu de um béquer de vidro de 250 mL, adequadamente limpo e estéril, preenchido com as concentrações determinadas de cada um dos fármacos dissolvido em 100 mL de meio de cultivo, coberto com filme plástico flexível de PVC com perfurações de cerca de 1 mm de diâmetro. Em cada unidade experimental, foram inoculadas 4 colônias de tamanhos semelhantes entre si da macrófita *Lemna minor*, com 3 frondes cada, num total de 12 frondes.

Para cada concentração de cada um dos fármacos testados, foram feitas 3 réplicas, bem como para os respectivos controles, as quais foram dispostas aleatoriamente na câmara de germinação, ou seja, o delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado. O sistema empregado de exposição das plantas aos fármacos foi o estático.

As soluções-estoque de cada um dos fármacos testados foram feitas diluindo-se 2000 mg dos mesmos, exatamente pesados em balança analítica, no meio de cultivo, em balão volumétrico de 1 L, resultando na concentração final de $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Os volumes determinados de cada uma das soluções-estoque foram transferidos, por meio de pipetadores automáticos, para balões volumétricos de 100 mL, os quais tiveram seus volumes completados com o meio de cultivo.

A fim de se encontrarem as concentrações-teste definitivas adequadas de cada um dos fármacos testados, foram realizados ensaios prévios independentes, na faixa de concentrações nominais de 0,04 a $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir desses ensaios prévios, as seguintes concentrações foram empregadas nos testes definitivos com o cloridrato de propranolol: 1,56; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e $400,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para os testes com a losartana potássica, as seguintes concentrações foram empregadas: 0,78; 1,56; 3,1; 6,2; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e $200,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.7 Avaliações dos efeitos dos fármacos e determinações físico-químicas

As avaliações dos efeitos dos fármacos na formação das frondes foram realizadas por meio de três variáveis de medida distintas: contagem do número de frondes, área total das frondes e peso fresco. Adicionalmente, os sinais visíveis de fitotoxicidade ocasionados nas frondes foram observados diariamente.

A contagem do número de frondes formadas foi realizada com auxílio de estereomicroscópio marca ZEISS, modelo Stemi 2000-C, no aumento de 80x, diariamente, em cada uma das réplicas de cada um dos tratamentos aplicados e no controle. As taxas de crescimento específicas foram calculadas, com base no número de frondes, na área foliar total e no peso fresco, para cada réplica do controle e dos tratamentos, conforme a seguinte fórmula (OECD, 2006):

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t} \quad (3)$$

em que:

μ_{i-j} = taxa de crescimento específica média do tempo i ao tempo j;

N_i = variável medida na parcela do ensaio ou no controle no tempo i;

N_j = variável medida na parcela do ensaio ou no controle do tempo j;

t = período de tempo de i a j.

As taxas de crescimento específicas de cada uma das réplicas de cada tratamento e de cada controle e os respectivos desvios-padrão foram calculados durante o tempo de exposição de 7 dias, com o auxílio do *software* livre SciDAVis (versão 0.2.4), empregando-se o ajuste linear, cujo coeficiente angular da reta ajustada aos pontos indica a taxa de crescimento específica média. A média da taxa de crescimento específica de cada uma das concentrações testadas e de cada grupo controle foi empregada no cálculo da porcentagem de inibição da taxa de crescimento específica média, baseada no número de frondes, na área foliar total e no peso fresco, conforme a seguinte fórmula (OECD, 2006):

$$\% Ir = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100 \quad (4)$$

em que:

% Ir = porcentagem de inibição na taxa de crescimento específica média;

μ_c = valor médio para μ no controle;

μ_T = valor médio para μ no grupo tratamento.

O cálculo das concentrações-efetivas a 10% (CE₁₀), 20% (CE₂₀), 50% (CE₅₀), 70% (CE₇₀) e 80% (CE₈₀) foi feito por regressão não-linear, empregando-se o modelo sigmoidal do tipo logístico com três parâmetros (SEBER; WILD, 1989), sendo eles: **a** = valor assintótico; **xc** = ponto de inflexão em que a taxa de crescimento da curva atinge seu valor máximo; **k** = taxa de variação da inclinação da curva. As porcentagens de inibição do crescimento calculadas foram tomadas como variável dependente (y) e as concentrações testadas dos fármacos como variável independente (x). O método de regressão não-linear empregando-se, por exemplo, o ajuste logístico para determinações dos valores de concentrações efetivas, foi recomendado por Cleuvers (2004), principalmente quando as curvas dose (concentração)-resposta são íngrimes. Para os ajustes das curvas, foram testadas as funções de Boltzman, Gompertz, Richards, Weibull e Logística. O modelo de ajuste logístico com três parâmetros foi o escolhido por ter sido o que melhor se ajustou aos dados, tomando-se por referência os valores de coeficiente de determinação (R²) resultantes.

Os cálculos dos valores de CENO (concentração de efeito não observado) e de CEO (concentração de efeito observado) relativos aos efeitos de cada um dos fármacos, baseados em cada um dos parâmetros avaliados, foram realizados por meio de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett, ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), o qual tem por embasamento comparar estatisticamente o grupo controle com cada um dos tratamentos aplicados. Tais análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* livre SISVAR (versão 5.3).

O cálculo das áreas totais das frondes foi realizado por meio do método de comparação de áreas. Para tanto, diariamente, capturou-se uma imagem digital com uma câmera de resolução de 5 mpx (Mega Pixel) de cada unidade experimental ao lado de um quadrado de papel colorset de coloração vermelha de área total de 1 cm², o qual foi usado como escala de comparação. Posteriormente, com o auxílio do *software* livre de tratamento de imagens GIMP (GNU Image Manipulation Program, versão 2.8.6), realizou-se a contagem de *pixels* do quadrado, cuja área era conhecida, selecionando-se a coloração vermelha do quadrado, e também a contagem dos *pixels* da amostra, selecionando-se a coloração predominante na mesma. Com a informação da quantidade de *pixels* de cada imagem, por meio de comparação matemática por regra de três simples, calculou-se a área de cada uma das amostras em estudo. Os valores da área foliar total em cada uma das réplicas de cada concentração-teste e do controle foram calculados a fim de se calcular a inibição porcentual da taxa de crescimento indicada por esse parâmetro avaliativo. Os valores médios de cada tratamento e do controle

foram também calculados, juntamente com seus respectivos desvios-padrão, a fim de se traçar um gráfico-perfil da inibição do crescimento indicada por essa variável-medida.

O peso fresco das plantas em cada uma das réplicas de cada concentração testada dos fármacos, bem como dos respectivos controles, foi determinado no último dia de cada teste, em balança analítica. O peso fresco foi determinado no início de cada teste a partir de uma amostra da cultura similar à utilizada no início dos testes, conforme norma OECD (2006). Os valores dos pesos frescos das plantas em cada uma das réplicas de cada tratamento e dos respectivos controles, no fim dos testes, foram subtraídos dos valores de peso fresco do dia inicial dos mesmos, a fim de se calcular a inibição porcentual da taxa de crescimento indicada pela biomassa fresca.

As médias dos valores obtidos de CE_{50} para os testes com cada um dos três parâmetros avaliativos, para cada um dos fármacos testados, foram comparados estatisticamente entre si por meio de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Scott-Knott, a fim de detectarem-se diferenças estatisticamente significativas, ao nível de 5% ($\alpha = 0,05$). O *software* utilizado para essas análises foi o SISVAR (versão 5.3).

As alterações macroscópicas referentes ao desenvolvimento físico das plantas também foram observadas ao longo dos testes de toxicidade.

O pH foi monitorado, em cada tratamento e controle, no início e no fim dos testes ecotoxicológicos, utilizando-se medidor de pH marca MS TECNOPON.

3.8 Cálculo dos valores de concentrações-efetivas utilizados no teste de mistura e comparação entre os efeitos observados e preditos pelos modelos de adição de concentração e de ação independente

O número de frondes foi o parâmetro de escolha para a avaliação da toxicidade da mistura dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica por ser a principal variável de medida sugerida pelo Protocolo da OECD (2006). Portanto, baseado na equação (1) descrita no referencial teórico do presente trabalho, a partir dos valores médios de CE_{10} , CE_{20} , CE_{50} , CE_{70} e CE_{80} calculados nos testes de inibição porcentual da taxa de crescimento, avaliada pelo número de frondes, com cada um dos fármacos, utilizou-se a metade dessas concentrações ($CE_x/2$) no teste de mistura, a fim de avaliar se esta seguiria o modelo de adição de concentração. A fim de se obterem as concentrações necessárias de cada um dos fármacos na mistura, foram preparadas duas soluções-estoque, uma com o fármaco cloridrato de propranolol e outra com o fármaco losartana potássica, dissolvidos no meio de cultivo,

ambas na concentração de 1000 mg.L⁻¹. A partir de cada uma das soluções-estoque preparadas, as alíquotas calculadas para a obtenção de cada uma das concentrações de efeito desejada na mistura foram transferidas, com o auxílio de micropipetas, para balões volumétricos de 100 mL e os volumes finais foram, então, completados com o meio Steinberg. As alíquotas pipetadas a partir de cada uma das soluções-estoque, para a obtenção dos tratamentos referentes às concentrações efetivas de CE₁₀/2, CE₂₀/2, CE₅₀/2, CE₇₀/2 e CE₈₀/2 foram de, respectivamente, 760 µL, 2,35 mL, 5,07 mL, 6,75 mL e 7,85 mL da solução de cloridrato de propranolol e de 330 µL, 1,32 mL, 3,19 mL, 4,87 mL e 6,38 mL da solução de losartana potássica. O teste de mistura foi realizado nas mesmas condições dos testes de ação individual com cada fármaco.

As taxas médias de crescimento da *L. minor*, bem como as inibições percentuais da taxa de crescimento, em cada concentração efetiva de mistura dos fármacos, foram calculadas da mesma forma como descrito para os testes de ação individual. Os valores médios de inibição percentual da taxa de crescimento foram, então, plotados *versus* os valores de CE_x/2, a fim de traçar um gráfico-perfil dos efeitos da mistura dos fármacos avaliados para a macrófita.

Posteriormente, com base na equação (2) descrita no referencial teórico, a hipótese de ação independente foi testada a partir dos cálculos dos efeitos que as concentrações presentes na mistura, de cada um dos fármacos em ação individual, causaria na inibição do crescimento da planta, baseado no número de frondes. Para o cálculo de tais efeitos de concentrações individuais, utilizaram-se os valores médios, obtidos a partir das equações de regressão não-linear, dos gráficos traçados para os efeitos de ação individual de cada fármaco.

A fim de se comparar os desvios dos efeitos observados na mistura em relação aos modelos de adição de concentração e de ação independente, utilizou-se o método da proporção residual de efeito (*effect residual ratio, ERR*), proposto por Wang et al. (2010). Esse modelo foi definido como sendo uma proporção da diferença entre o efeito (E) a um certo nível efetivo predito por um modelo de referência e aquele observado para esse mesmo nível. A equação que descreve o modelo ERR é a seguinte (WANG et al., 2010):

$$ERR = \frac{E_{prd} - E_{obs}}{E_{obs}} \times 100\% \quad (5)$$

em que: E_{prd} e E_{obs} são, respectivamente, os valores de efeito predito pelo modelo de ação independente ou adição de concentração e os valores de efeito observado a um certo nível de concentração.

3.9 Cálculo dos critérios de qualidade da água para a proteção da vida aquática para os fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica

Os critérios de qualidade da água para a proteção da vida aquática para os fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica foram calculados com base no Protocolo para derivação de critérios de qualidade da água para proteção da vida aquática no Brasil (UMBUZEIRO et al., 2011). As bases de dados ecotoxicológicos e de dados previstos por meio de relações quantitativas estrutura-atividade (RQEA) para peixes, invertebrados e algas, consultadas para a derivação desses critérios, foram, respectivamente, a *Ecotox Database* (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY-EPA) e a *National Centers for Coastal Ocean Science* (NCCOS-USA).

4 RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes de sensibilidade e carta-controlê

Os gráficos referentes às curvas concentração-resposta e as respectivas equações de regressão não-linear dos testes de sensibilidade estão mostrados no APÊNDICE A. Os valores calculados de taxa de crescimento específica média e de porcentagem de inibição da taxa de crescimento referentes a esses testes e aos demais testes ecotoxicológicos estão descritos no APÊNDICE B. Os dados brutos constam no APÊNDICE C.

Os valores da concentração efetiva a 50% (CE_{50}), com relação à inibição da taxa de crescimento específica média da *L. minor*, avaliada pelo número de frondes, bem como a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação (C.V.) entre os 9 testes de sensibilidade realizados, são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) com a média resultante, coeficiente de variação (C.V.) e desvio-padrão calculados a partir dos nove testes de sensibilidade com a *L. minor*.

Teste de sensibilidade	Valor de CE_{50} obtido ($mg.L^{-1}$)
1	4280,3
2	3898,6
3	3787,5
4	3928,7
5	3605,9
6	4292,3
7	4279,5
8	4211,4
9	4099,1
Média dos valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$)	4042,6
Desvio-padrão	249,0
C.V. (%)	6,2

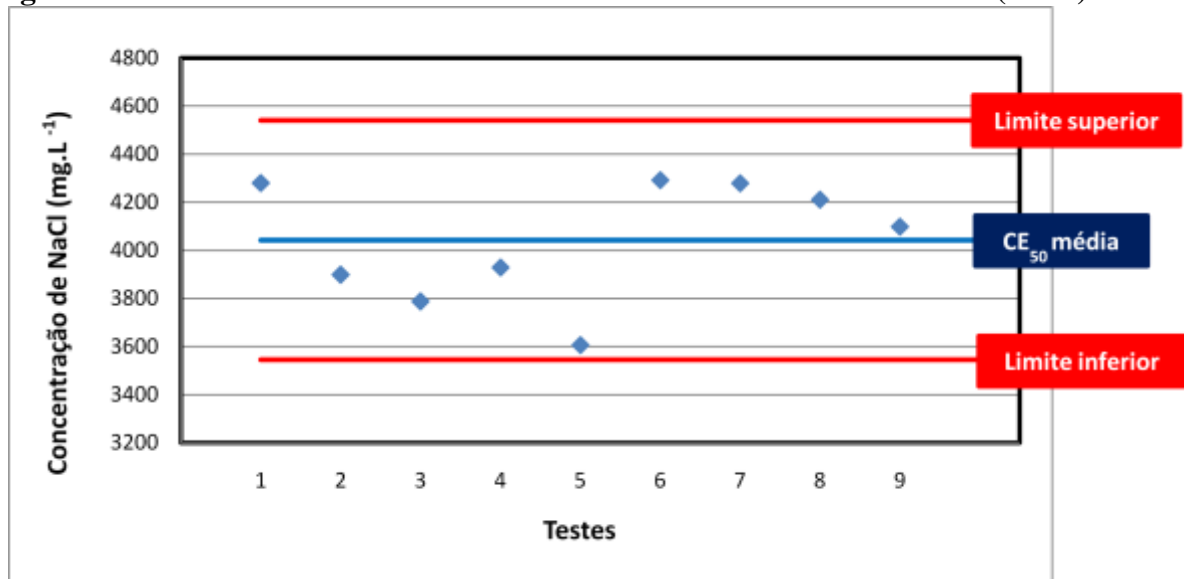
Fonte: Da autora.

Na Tabela 8, é apresentado o valor médio de CE_{50} obtido nos testes de sensibilidade para *L. minor*, com valor de 4042,6 $mg.L^{-1}$. Tais resultados são similares aos obtidos por Souza (2008), que encontrou o valor médio de $CE_{50-7 \text{ dias}}$ de 4294,34 $mg.L^{-1}$ em testes de sensibilidade realizados com o NaCl para *L. minor*, em condições de cultivo e ensaio similares aos realizados nesta pesquisa, com a diferença do meio de cultivo empregado. Tais valores obtidos de sensibilidade de *L. minor* ao cloreto de sódio foram intermediários aos valores citados na literatura com relação à sensibilidade de outros organismos a essa substância de referência. Castro (2008), em testes de sensibilidade realizados com *Danio rerio*, empregando o NaCl, obteve o valor de concentração letal média a 50% ($CL_{50, 96h}$) média ($n=9$) de 7916,6 $mg.L^{-1}$ de NaCl. Coelho (2008) encontrou o valor de $CE_{50, 48h}$ médio ($n=12$) de 1590 $mg.L^{-1}$ de NaCl em testes realizados com o cladóceros *Ceriodaphnia dubia* e de $CE_{50, 48h}$ médio ($n=9$) de 1180 $mg.L^{-1}$ de NaCl para *Ceriodaphnia silvestrii*. Em testes de sensibilidade realizados com *Hydra viridissima*, empregando esse mesmo sal, Massaro (2011) encontrou o valor médio de $CE_{50,96h}$ de 860 $mg.L^{-1}$ para efeitos de subletalidade e o valor de $CL_{50, 96h}$ de 1550 $mg.L^{-1}$ para os efeitos de letalidade. A mesma autora ainda realizou testes de sensibilidade, empregando o NaCl, com *Hydra salmacidis* e encontrou o valor médio de $CE_{50,96h}$ de 640 $mg.L^{-1}$ e o valor médio de $CL_{50, 96h}$ de 1360 $mg.L^{-1}$.

O valor de C.V. obtido de 6,2% entre os testes de sensibilidade realizados com a *L. minor* indica uma consistência adequada das respostas dessa macrófita ao NaCl e uma variabilidade dos resultados dos testes aceitável e relativamente baixa, pois de acordo com a *Environment Canada* (1990), a variação entre testes ecotoxicológicos é aceitável quando tiver valor de C.V. igual ou inferior a 30%.

Os valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) obtidos nos testes de sensibilidade, submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, enquadraram-se dentro da normalidade ($p>0,05$). A carta-controle foi então elaborada a partir dos resultados obtidos nos 9 testes de sensibilidade e está representada na Figura 5.

Figura 5 - Carta-controlre da sensibilidade de *L. minor* ao cloreto de sódio (NaCl).



Fonte: Da autora.

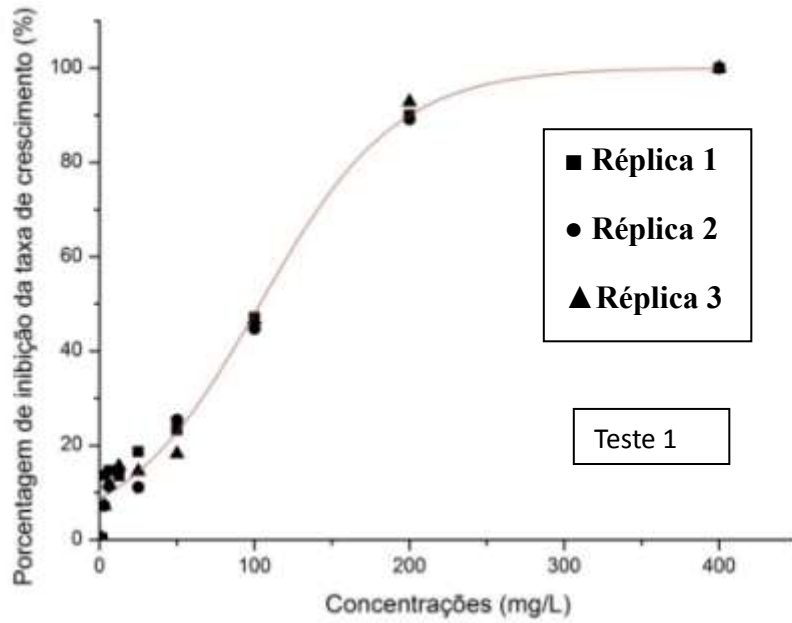
Como demonstrado na Figura 5, o limite superior de aceitabilidade foi de 4540,7 mg.L⁻¹ e o limite inferior foi de 3544,5 mg.L⁻¹ de NaCl. Portanto, todos os testes de sensibilidade realizados estiveram dentro da faixa de aceitabilidade em termos de variabilidade dos testes, a um nível de confiança de 95%, o que demonstra a eficiência das técnicas de cultivo e realização dos testes, além da consistência satisfatória das respostas de *L. minor* ao NaCl.

4.2 Efeitos do fármaco cloridrato de propranolol para *L. minor*

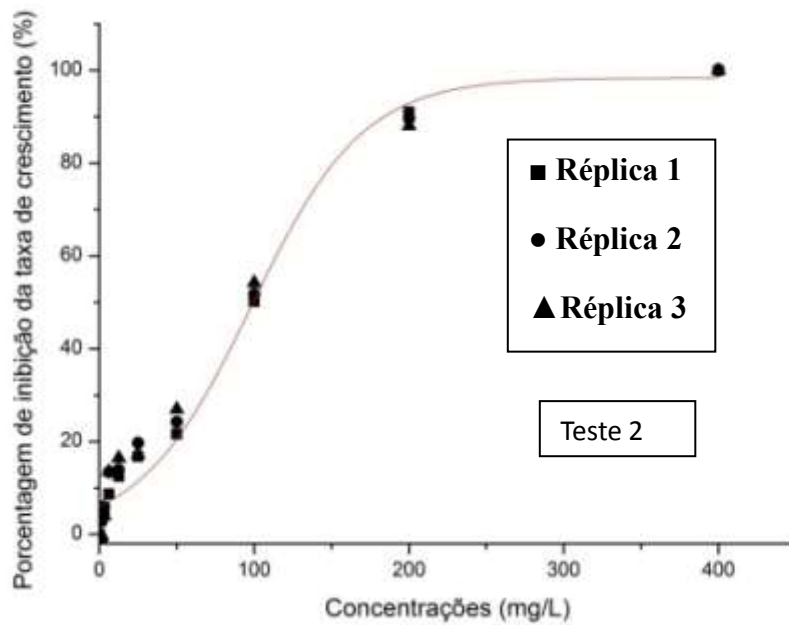
4.2.1 Efeitos de inibição do crescimento de *L. minor* por cloridrato de propranolol avaliados pelo parâmetro número de frondes

As 3 curvas concentração-resposta, obtidas a partir dos respectivos testes com o cloridrato de propranolol, a fim de determinar os valores de concentração efetiva média do fármaco a 10% (CE₁₀), a 20% (CE₂₀), a 50% (CE₅₀), a 70% (CE₇₀) e a 80% (CE₈₀) dos organismos-teste, são mostradas na Figura 6. Para a construção destas curvas concentração-resposta, foram considerados os valores de inibição percentual da taxa de crescimento, calculados a partir da avaliação do número diário de frondes nos tratamentos e no controle.

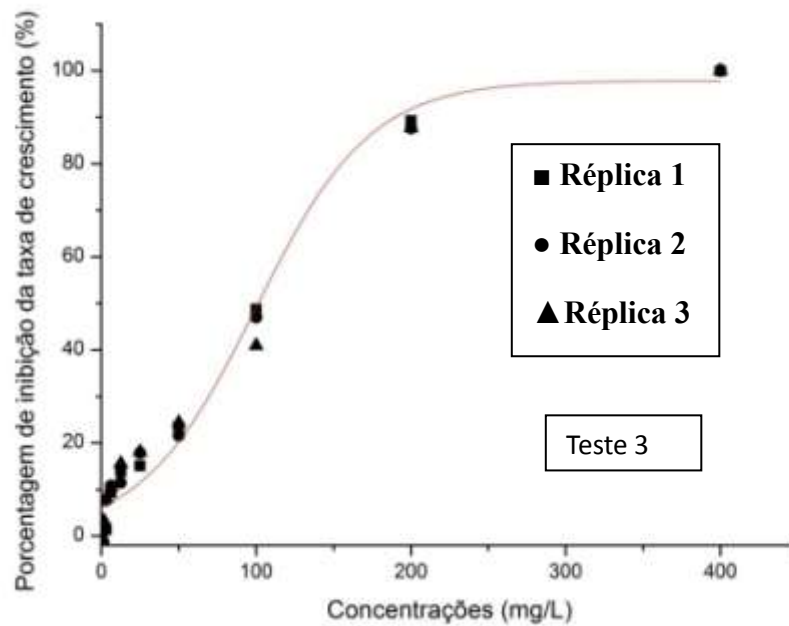
Figura 6 - Curvas concentração-resposta dos efeitos do fármaco cloridrato de propranolol para a macrófita *L. minor* : A) Curva referente ao teste 1; B) Curva referente ao teste 2; C) Curva referente ao teste 3.



A)



B)



C)

Fonte: Da autora.

Conforme mostrado na Figura 6, as curvas concentração-resposta dos efeitos de inibição percentual da taxa de crescimento, promovida pelo cloridrato de propranolol sobre a *L. minor*, seguiram um modelo sigmoideal do tipo logístico. As equações das respectivas regressões não-lineares, obtidas nas curvas concentração-resposta do propranolol para *L. minor*, e os valores dos parâmetros obtidos nos respectivos ajustes logísticos com os respectivos desvios-padrão, são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos respectivos ajustes logísticos com respectivos desvios-padrão para as curvas concentração-resposta dos efeitos de inibição percentual da taxa de crescimento pelo cloridrato de propranolol sobre *L.minor*, avaliados pelo número de frondes.

Teste	Equação*: $y = a / (1 + \exp(-k(x-xc)))$			
	Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro a \pm desvio-padrão	Valor do parâmetro xc \pm desvio-padrão	Valor do parâmetro k \pm desvio-padrão
1	0,97565	100,01560 \pm 5,07049	103,54022 \pm 10,52586	0,02271 \pm 0,0032
2	0,98317	98,39481 \pm 4,02583	98,16545 \pm 7,60759	0,02773 \pm 0,0036
3	0,97896	97,85798 \pm 4,53737	99,6574 \pm 8,79926	0,02704 \pm 0,0039

*O parâmetro **a** corresponde ao valor assintótico, que indica o valor de estabilização da variável dependente em relação ao tempo; o parâmetro **xc** corresponde ao parâmetro de localização, que indica o ponto de inflexão em que a taxa de crescimento da curva atinge seu valor máximo; o parâmetro **k** corresponde à medida relativa à taxa de variação da inclinação da curva. Fonte: Da autora.

Conforme observado na Tabela 9, os valores de coeficiente de determinação (R^2) resultantes do ajuste logístico para as curvas concentração-resposta da Figura 6 indicam que cerca de 97-98% da variabilidade da inibição percentual da taxa de crescimento de *L. minor* podem ser explicadas pela concentração aplicada do fármaco.

A partir dos dados da Tabela 9, foram calculados os valores médios estimados de CE₁₀, CE₂₀, CE₅₀, CE₇₀ e CE₈₀ dos respectivos testes com propranolol, mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de CE₁₀, CE₂₀, CE₅₀, CE₇₀ e CE₈₀ (mg.L⁻¹) dos efeitos de cloridrato de propranolol para *L. minor*, calculados a partir das equações das análises de regressão, para o parâmetro número de frondes.

Concentração efetiva (CE)	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média da concentração efetiva (CE)	Desvio-padrão
10	6,8	19,6	19,3	15,2	7,3
20	42,5	48,9	49,4	46,9	3,8
50	103,5	99,3	101,3	101,4	2,1
70	140,8	130,7	133,7	135,1	5,2
80	164,5	151,2	155,1	156,9	6,8

Fonte: Da autora.

Conforme mostrado na Tabela 10, o valor médio de CE₅₀ obtido com relação aos efeitos de inibição da taxa de crescimento específica de *L. minor* por cloridrato de propranolol, avaliada pelo número de frondes, foi de 101,4 \pm 2,1 mg.L⁻¹. As análises de variância (ANOVA) seguidas do teste de Dunnett, ao nível de significância de 5%, relativas aos efeitos desse fármaco nos testes de inibição da taxa de crescimento específica média de *L. minor*, para

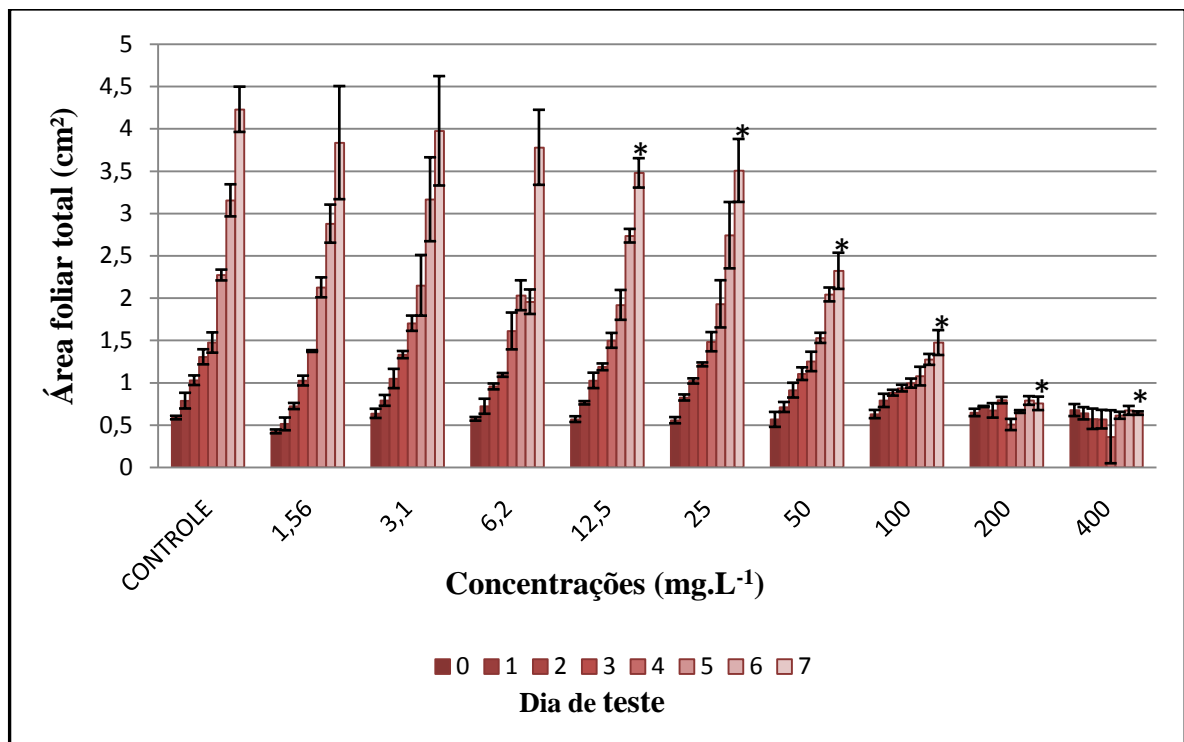
o número de frondes, resultaram nos valores de CENO igual a $1,56 \text{ mg.L}^{-1}$ e de CEO igual a $3,1 \text{ mg.L}^{-1}$. Não foi possível fazer uma comparação desses valores de toxicidade do cloridrato de propranolol com outros citados na literatura para essa macrófita, com relação ao parâmetro número de frondes, porque os trabalhos já realizados com esse fármaco avaliaram apenas a inibição do crescimento da *L. minor* por meio da área foliar total. Porém, uma comparação da toxicidade do cloridrato de propranolol para *L. minor* com outros organismos aquáticos permite verificar que algumas espécies de algas, de invertebrados e de peixes já estudados foram mais sensíveis aos efeitos desse fármaco. Com relação às algas, Cleuvers (2003) encontrou o valor de $\text{CE}_{50, 72\text{h}}$ de $5,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de cloridrato de propranolol em teste de inibição do crescimento com a alga *Desmodesmus subspicatus*, enquanto que Neuwoehner e Escher (2011) encontraram valores de CE_{50} de até $23,7 \text{ mg.L}^{-1}$ ($80\mu\text{M}$) de cloridrato de propranolol para os efeitos de inibição da taxa de crescimento de *Scenedesmus vacuolatus*. Com relação aos efeitos em cladóceros, o valor de $\text{CE}_{50,48\text{h}}$ de $1,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de cloridrato de propranolol foram encontrados por Fraysse e Garric (2005) para os efeitos de inibição de mobilidade em *Ceriodaphnia dubia*, enquanto que Stanley et al. (2006) calcularam valores de $\text{CE}_{50,48\text{h}}$ de até $1,67 \text{ mg.L}^{-1}$ dos efeitos desse fármaco na inibição da motilidade de *Daphnia magna*. Huggett et al. (2002), em testes de sobrevivência com o crustáceo *Hyaella azteca*, encontraram o valor de $\text{CL}_{50,48\text{h}}$ de $29,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de cloridrato de propranolol. Esses mesmos autores ainda calcularam o valor de $\text{CL}_{50,48\text{h}}$ de $24,3 \text{ mg.L}^{-1}$ do fármaco em testes de avaliação da sobrevivência com a espécie de peixe *Oryzias latipes*. Por fim, com relação aos efeitos do cloridrato de propranolol em espécies de protozoários, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2005) determinaram o valor de $\text{CE}_{50,24\text{h}}$ de $79,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (ppm) desse fármaco, em testes de inibição do crescimento de *Tetrahymena thermophila*. Portanto, em especial os cladóceros já estudados mostraram-se bastante sensíveis aos efeitos de toxicidade promovidos pelo cloridrato de propranolol e tais efeitos tóxicos devem-se, provavelmente em parte, ao fato de esse fármaco apresentar uma atividade estabilizadora de membrana, isto é, ele reduz a permeabilidade da membrana a vários íons (Na^+ , K^+ e Ca^{+2}), o que pode estar relacionado ao fato de o propranolol provocar interrupção das mensagens nervosas envolvidas no controle da frequência cardíaca, reduzindo a velocidade de transmissão (FRAYSSE; GARRIC, 2005).

4.2.2 Efeitos de inibição do crescimento de *L. minor* por cloridrato de propranolol avaliados pelo parâmetro área foliar

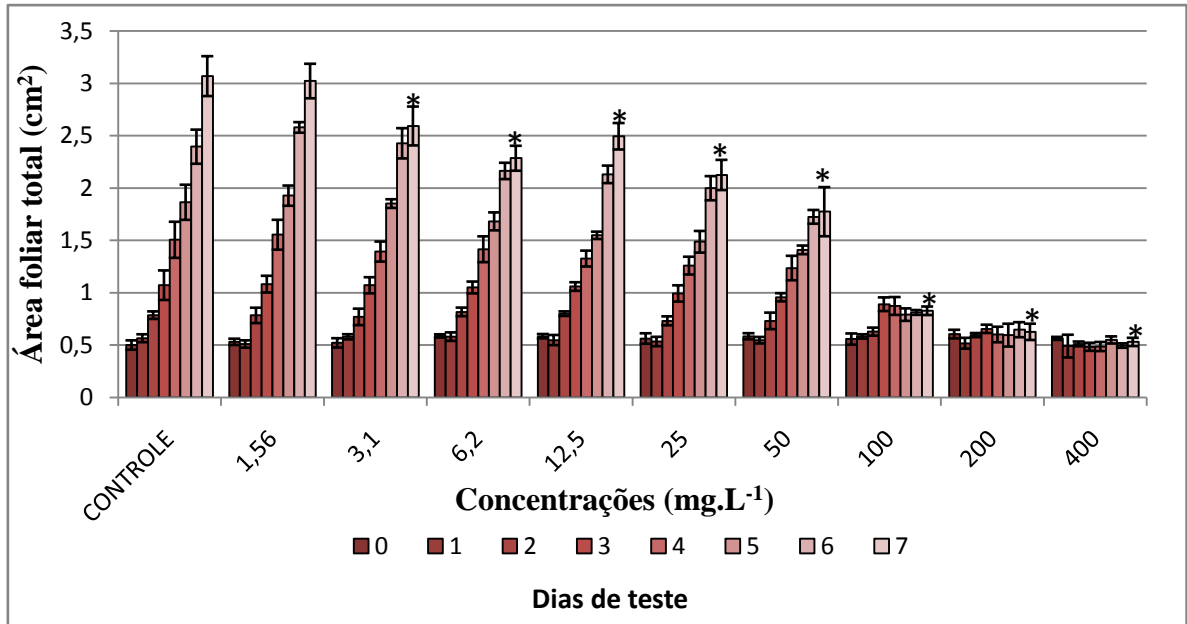
Além da toxicidade do propranolol avaliada por meio da inibição percentual da taxa de crescimento relativa à contagem do número de frondes, a toxicidade também foi avaliada diariamente por meio da área total das frondes. A Figura 7 mostra os gráficos das áreas médias foliares totais (cm²) de *L. minor*, dos três testes realizados com propranolol, calculadas em cada concentração aplicada do fármaco e no grupo controle, durante os 7 dias de testes.

Figura 7- Gráficos das áreas médias foliares totais (cm²), com respectivas barras de desvio-padrão, da *L. minor* exposta a diferentes concentrações de propranolol e no grupo controle, durante os 7 dias de teste: (Os * indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; $\alpha = 0,05$)
A) Gráfico correspondente ao teste 1
B) Gráfico correspondente ao teste 2
C) Gráfico correspondente ao teste 3

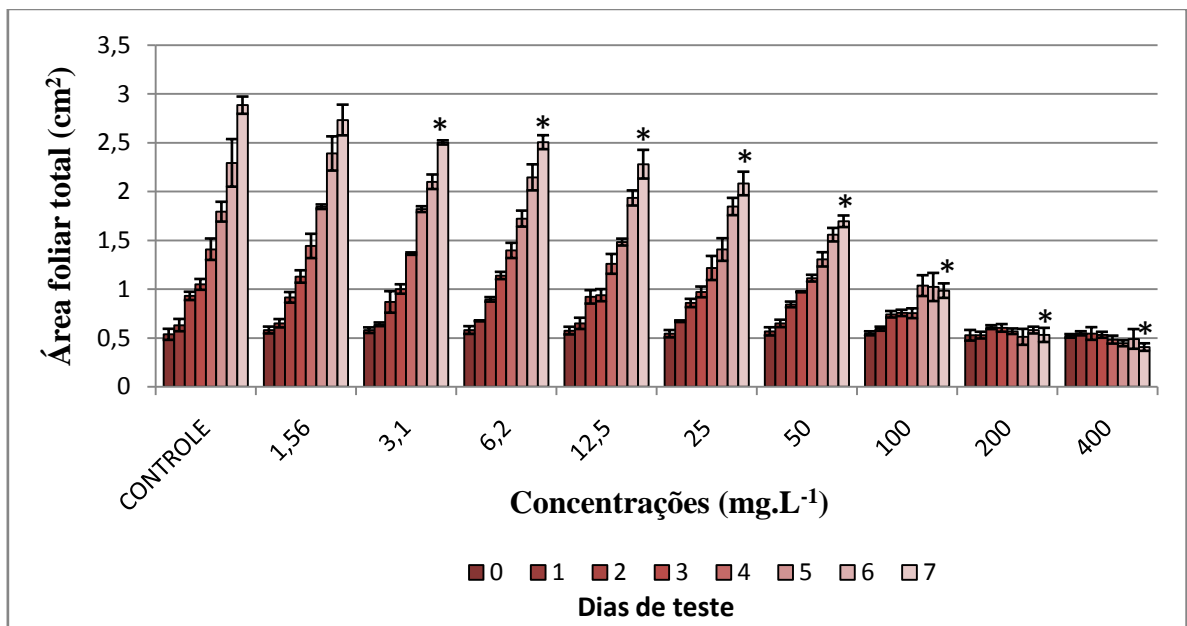
A)



B)



C)



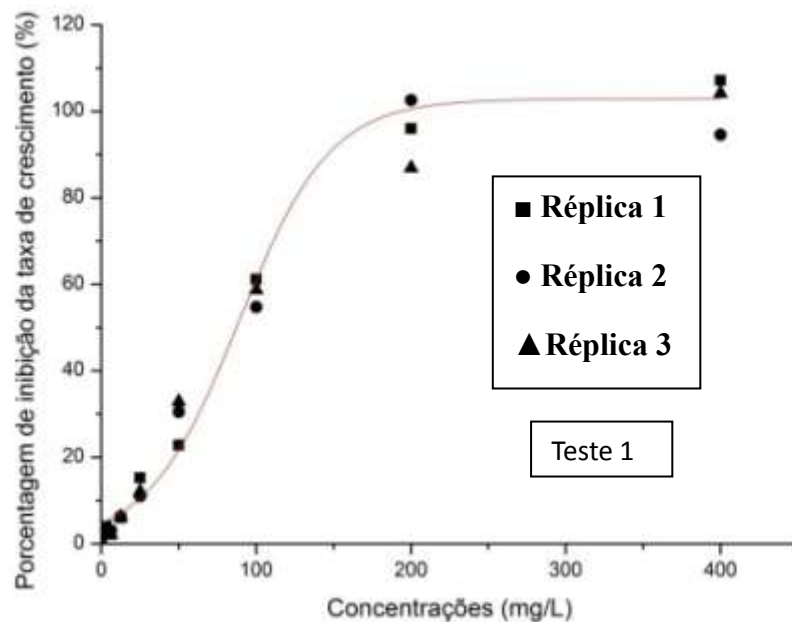
Fonte: Da autora.

Conforme demonstrado na Figura 7, observa-se que, até a concentração testada de 50,0 mg.L⁻¹ de cloridrato de propranolol, embora tenha ocorrido uma redução significativa do crescimento em termos de área foliar total, o mesmo manteve-se exponencialmente. A partir

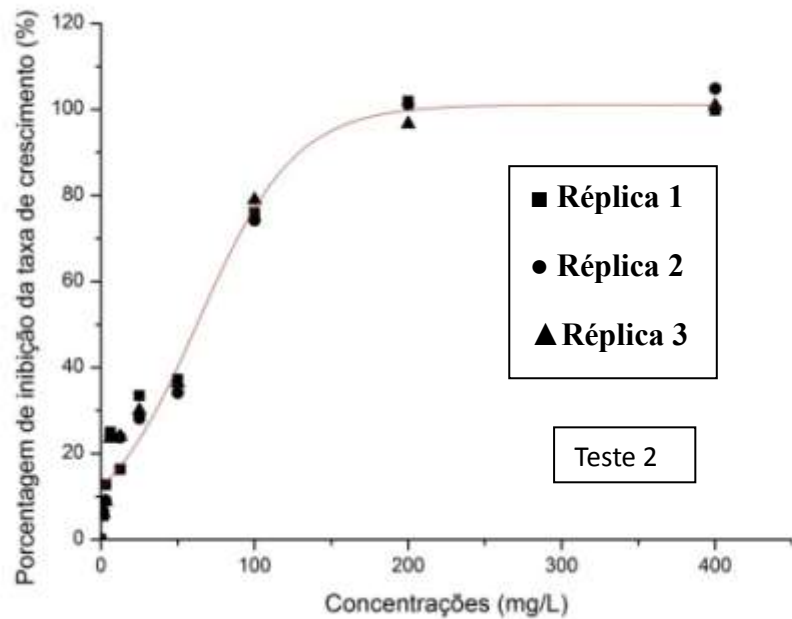
da concentração de $200,0 \text{ mg.L}^{-1}$, praticamente não mais se verifica crescimento em área foliar durante os testes.

A Figura 8 mostra os gráficos comparativos das curvas concentração-resposta dos três testes realizados para avaliar a CE_{50} referente à porcentagem de inibição do crescimento de *L. minor* pelo cloridrato de propranolol, avaliada pelo parâmetro área foliar total.

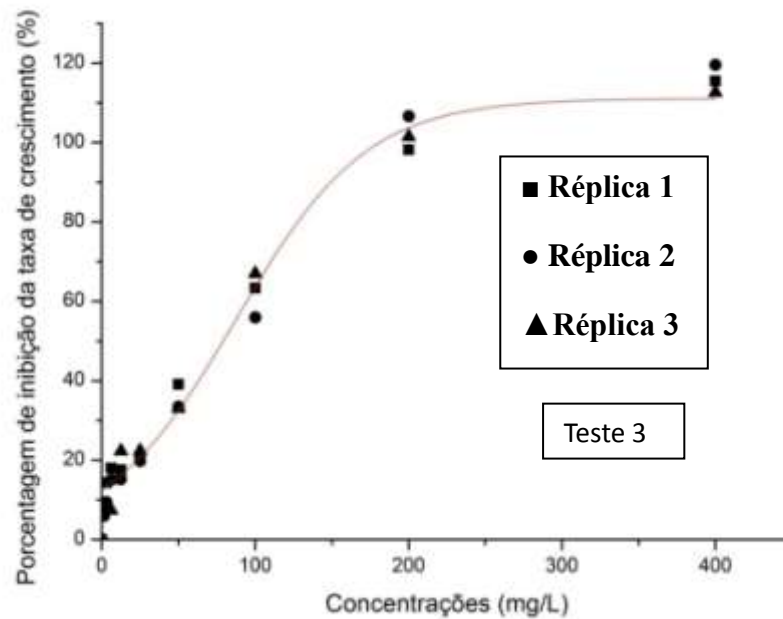
Figura 8 - Gráficos das curvas concentração-resposta referentes aos 3 testes realizados na avaliação dos efeitos do cloridrato de propranolol na inibição do crescimento da *L. minor*, avaliada pela área foliar total: A) Gráfico referente ao teste 1; B) Gráfico referente ao teste 2; C) Gráfico referente ao teste 3



A)



B)



C)

Fonte: Da autora.

Conforme observado na Figura 8, as curvas concentração-resposta dos efeitos do cloridrato de propranolol, avaliadas com base na área foliar total, seguiram o mesmo modelo sigmoideal do tipo logístico verificado para o parâmetro número de frondes.

As equações das regressões não-lineares, bem como os valores dos parâmetros das equações juntamente com os respectivos desvios-padrão, obtidos nos ajustes sigmoidais referentes aos gráficos da Figura 8, são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos ajustes logísticos para as curvas concentração-resposta dos efeitos do cloridrato de propranolol na inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados pela área foliar.

Teste	Equação*: $y = a / (1 + \exp(-k(x-xc)))$			
	Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro $a \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $xc \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
1	0,99048	102,86673 \pm 3,12314	88,82673 \pm 4,69666	0,034 \pm 0,00363
2	0,95770	101,10633 \pm 5,79607	63,09705 \pm 8,67805	0,03161 \pm 0,0057
3	0,97425	111,07531 \pm 5,44661	87,54029 \pm 9,53981	0,02354 \pm 0,0033

*O parâmetro **a** corresponde ao valor assintótico, que indica o valor de estabilização da variável dependente em relação ao tempo; o parâmetro **xc** corresponde ao parâmetro de localização, que indica o ponto de inflexão em que a taxa de crescimento da curva atinge seu valor máximo; o parâmetro **k** corresponde à medida relativa à taxa de variação da inclinação da curva. Fonte: Da autora.

Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos nos ajustes das curvas concentração-resposta da Figura 8 indicam que cerca de 96-99% da variabilidade da inibição percentual da taxa de crescimento de *L. minor* podem ser explicadas pelas concentrações aplicadas do cloridrato de propranolol. Portanto, o modelo sigmoidal do tipo logístico ajustou-se bem aos dados das curvas concentração-resposta para o parâmetro área foliar total, assim como ocorreu para o parâmetro avaliativo número de frondes.

Na Tabela 12, estão mostrados os valores de CE_{50} calculados com base nas respectivas equações de regressão não-linear das curvas concentração-resposta dos efeitos de inibição do crescimento da macrófita promovida pelo cloridrato de propranolol, com base na área foliar total.

Tabela 12 - Valores de CE₅₀ (mg.L⁻¹) referentes aos 3 testes realizados de inibição do crescimento de *L. minor* por cloridrato de propranolol, baseado na área foliar total.

Teste	Valor de CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)
1	87,2
2	62,4
3	79,0
Média dos valores de CE₅₀ (mg.L⁻¹)	76,2
Desvio-padrão	12,6
C.V. (%)	16,5

Fonte: Da autora.

De acordo com a Tabela 12, o valor médio de CE₅₀ obtido nos testes de inibição do crescimento de *L. minor*, com base na área foliar total, foi de 76,2 mg.L⁻¹ de cloridrato de propranolol. Tal valor encontrado no presente trabalho foi intermediário aos resultados encontrados por Cleuvers (2005) e por Kaza, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2007), os quais encontraram, respectivamente, os valores de CE₅₀ de 113 mg.L⁻¹ e de 21,2 mg.L⁻¹ de cloridrato de propranolol em testes de inibição da taxa de crescimento específica média baseada na área foliar total. Tais diferenças de valores, embora pareçam acentuadas, não são significativas entre si porque não diferem mais do que por um fator de 10, de acordo com a European Communities (2003).

Portanto, de acordo com o valor encontrado de CE₅₀ para os efeitos em *L. minor* e com base na Diretiva da União Européia 93/67/EEC (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 1996), Kaza, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2007) classificaram o cloridrato de propranolol como prejudicial à vida aquática. De maneira semelhante e seguindo a classificação proposta pelo Sistema de classificação harmonizado para riscos ambientais e à saúde humana de substâncias e de misturas químicas (OECD, 2001), o valor médio de CE₅₀ obtido, neste trabalho, para o parâmetro área foliar total de *L. minor* permite classificar o cloridrato de propranolol na categoria de substância perigosa para o ambiente aquático, na categoria de toxicidade aguda III, a qual compreende valores de CE₅₀ entre 10-100 mg.L⁻¹.

A comparação entre os valores médios de CE₅₀ obtidos nos testes de inibição do crescimento baseados no número de frondes e na área foliar total permite concluir que este último parâmetro mostrou-se mais sensível aos efeitos de toxicidade do cloridrato de propranolol do que o primeiro, o que confirma a necessidade de se avaliar pelo menos um

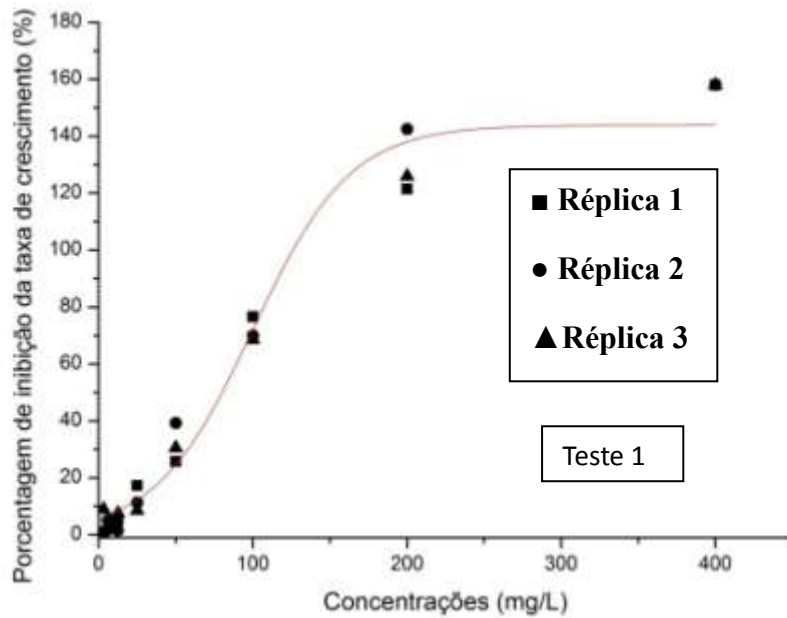
outro parâmetro além do número de frondes em testes de inibição do crescimento de *L. minor*, uma vez que algumas substâncias podem afetar outras variáveis de medida muito mais do que o número de frondes (OECD, 2006).

Com relação aos valores de efeitos crônicos, a CENO e a CEO calculadas estatisticamente nos testes de inibição da taxa de crescimento específica média de *L. minor*, baseados no parâmetro área foliar, resultaram nos valores respectivos de 1,56 mg.L⁻¹ e de 3,1 mg.L⁻¹ de cloridrato de propranolol. Tais resultados foram iguais aos encontrados na avaliação de toxicidade por meio do parâmetro número de frondes.

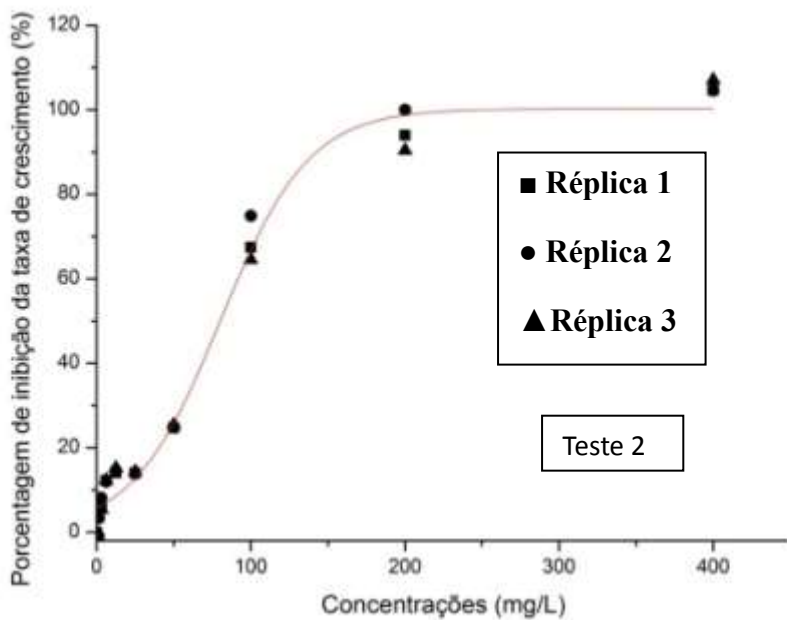
4.2.3 Efeitos de inibição do crescimento de L. minor por cloridrato de propranolol avaliados pelo parâmetro peso fresco

Em adição, a inibição da taxa de crescimento de *L. minor* por cloridrato de propranolol foi avaliada com relação à variação do peso fresco entre os dias final e inicial de testes. Os gráficos referentes às curvas concentração-resposta, para os 3 testes realizados, são mostrados na Figura 9.

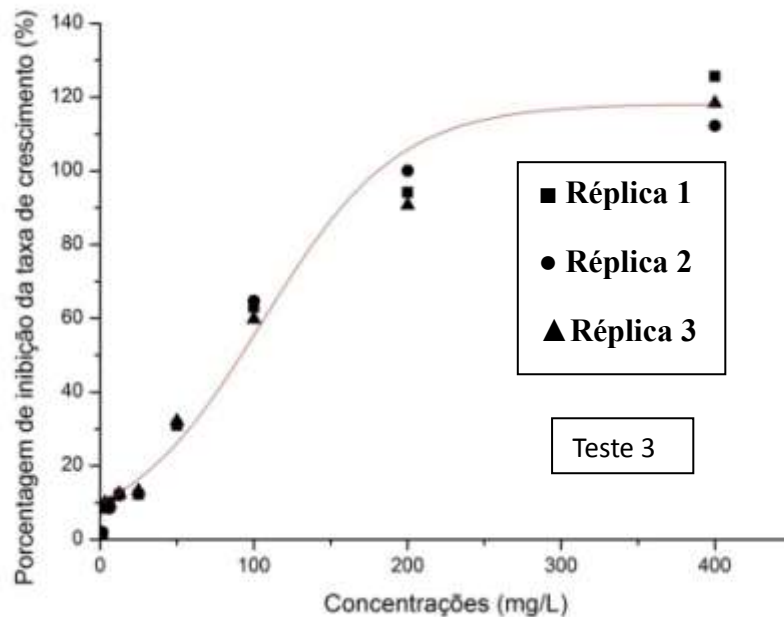
Figura 9 - Curvas concentração-resposta dos efeitos de inibição da taxa de crescimento de *L. minor* avaliada pelo peso fresco: A) Curva referente ao teste 1; B) Curva referente ao teste 2; C) Curva referente ao teste 3



A)



B)



C)

Fonte: Da autora.

A avaliação das curvas concentração-resposta da Figura 9 permite concluir que as mesmas seguiram um ajuste sigmoideal do tipo logístico, à semelhança do que foi observado para os parâmetros número de frondes e área foliar total.

As equações das regressões não-lineares referentes às curvas concentração-resposta da Figura 9, juntamente com os valores dos parâmetros das equações e respectivos desvios-padrão, estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos ajustes logísticos para as curvas concentração-resposta dos efeitos do cloridrato de propranolol na inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados pelo peso fresco.

Teste	Equação*: $y = a / (1 + \exp(-k(x - xc)))$			
	Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro $a \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $xc \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
1	0,97202	143,89469 \pm 7,68058	99,9227 \pm 9,26303	0,03164 \pm 0,00608
2	0,98267	100,23363 \pm 3,89387	80,23892 \pm 5,77609	0,03489 \pm 0,00433
3	0,96691	118,1908 \pm 7,4607	105,5387 \pm 13,15215	0,02265 \pm 0,00409

*O parâmetro a corresponde ao valor assintótico, que indica o valor de estabilização da variável dependente em relação ao tempo; o parâmetro xc corresponde ao parâmetro de localização, que indica o ponto de inflexão em que a taxa de crescimento da curva atinge seu valor máximo; o parâmetro k corresponde à medida relativa à taxa de variação da inclinação da curva. Fonte: Da autora.

Os coeficientes de determinação obtidos nos ajustes permitem verificar que, cerca de 97-98% da variabilidade da inibição percentual da taxa de crescimento de *L. minor*, com base no peso fresco, podem ser explicadas pelas concentrações aplicadas do fármaco em questão.

Na Tabela 14, estão demonstrados os valores de CE_{50} calculados com base nas respectivas equações de regressão não-linear das curvas concentração-resposta dos efeitos de inibição do crescimento da macrófita promovida por cloridrato de propranolol, com base no peso fresco.

Tabela 14 - Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) referentes à inibição do crescimento de *L. minor* por cloridrato de propranolol, baseada no peso fresco, calculados para os 3 testes realizados com o fármaco.

Teste	Valor de CE_{50} ($mg.L^{-1}$)
1	80,0
2	80,1
3	91,8
Média dos valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$)	84,0
Desvio-padrão	6,8
C.V. (%)	8,1

Fonte: Da autora.

Conforme observado na Tabela 14, o valor médio de CE_{50} obtido para os efeitos de toxicidade do cloridrato de propranolol para *L. minor*, com base no peso fresco, foi de 84,0 $mg.L^{-1}$. Portanto, tal valor foi intermediário aos valores de CE_{50} obtidos na avaliação de inibição do crescimento por meio do número de frondes e da área foliar total. A análise de variância, seguida do teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, indicou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a média de valores de CE_{50} para o parâmetro número de frondes em comparação com os demais parâmetros avaliativos, área foliar total e peso fresco, os quais não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$). Novamente, portanto, enfatiza-se a necessidade de se avaliar pelo menos um outro parâmetro além do número de frondes em testes de inibição do crescimento de *L. minor*, conforme OECD (2006).

Assim como para os parâmetros número de frondes e área foliar total, a avaliação dos efeitos do cloridrato de propranolol, nos testes de inibição da taxa de crescimento média de *L. minor*, baseados no parâmetro avaliativo peso fresco, resultaram nos valores de CENO igual a 1,56 $mg.L^{-1}$ e de CEO igual a 3,1 $mg.L^{-1}$.

4.2.4 Alterações macroscópicas promovidas por cloridrato de propranolol no desenvolvimento físico das plantas

Com relação às alterações macroscópicas referentes ao desenvolvimento físico das plantas, após 24 h de início dos testes com cloridrato de propranolol, observou-se abscisão na estrutura de todas as colônias das plantas expostas às concentrações de 200,0 mg.L⁻¹ e de 400 mg.L⁻¹ do fármaco, bem como início de clorose, isto é, amarelamento do tecido das frondes (OECD, 2006), conforme mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Aspectos macroscópicos das frondes de *L. minor* no grupo controle e nas expostas ao fármaco cloridrato de propranolol, após 24 h de início dos testes:

- A) Colônias íntegras de *L. minor* no controle
- B) Abscissão nas colônias e início de clorose nas frondes de *L. minor* expostas à concentração de 200 mg.L⁻¹ do fármaco
- C) Abscissão nas colônias e início de clorose nas frondes de *L. minor* expostas à concentração de 400 mg.L⁻¹ do fármaco





B)



C)

Fonte: Da autora.

Após 48h de início do teste, notaram-se lesões foliares nas colônias expostas às concentrações de 100,0, 200,0 e 400,0 mg.L⁻¹ de cloridrato de propranolol (FIGURA 11).

Figura 11 - Aspectos macroscópicos das frondes de *L. minor* após 48 h de início dos testes:

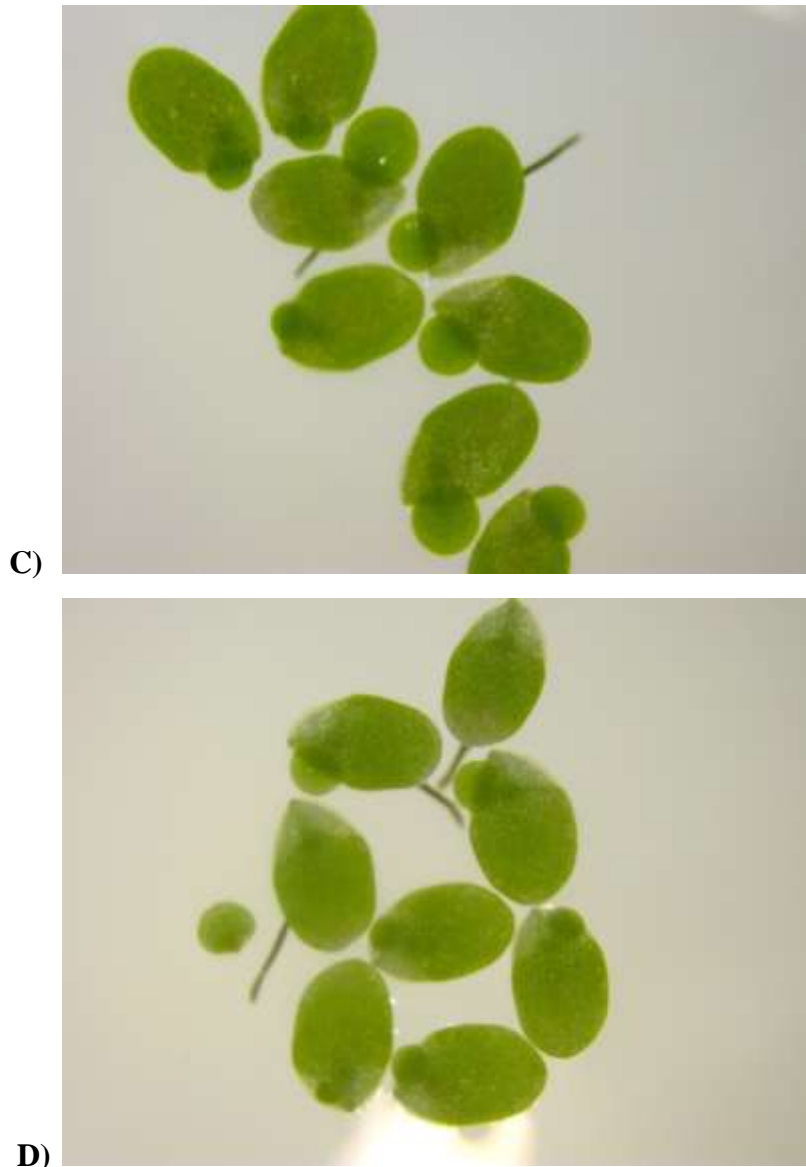
A) *L. minor* no grupo controle

B) *L. minor* exposta à concentração de 100 mg.L⁻¹

C) *L. minor* exposta à concentração de 200 mg.L⁻¹

D) *L. minor* exposta à concentração de 400 mg.L⁻¹





Fonte: Da autora.

Após 7 dias de ensaio, observaram-se início de clorose e lesões foliares nos organismos-teste expostos à concentração de $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$ desse fármaco, bem como necrose foliar, ou seja, a morte do tecido foliar (OECD, 2006), evidenciada pelo branqueamento das frondes nos indivíduos expostos às concentrações de $100,0$, $200,0$ e $400,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de cloridrato de propranolol (FIGURA 12). Portanto, a fitotoxicidade do cloridrato de propranolol para *L. minor* pôde ser evidenciada, além de pela inibição da taxa de crescimento, também pela clorose e necrose foliares, bem como pela partição na estrutura das colônias nas concentrações mencionadas.

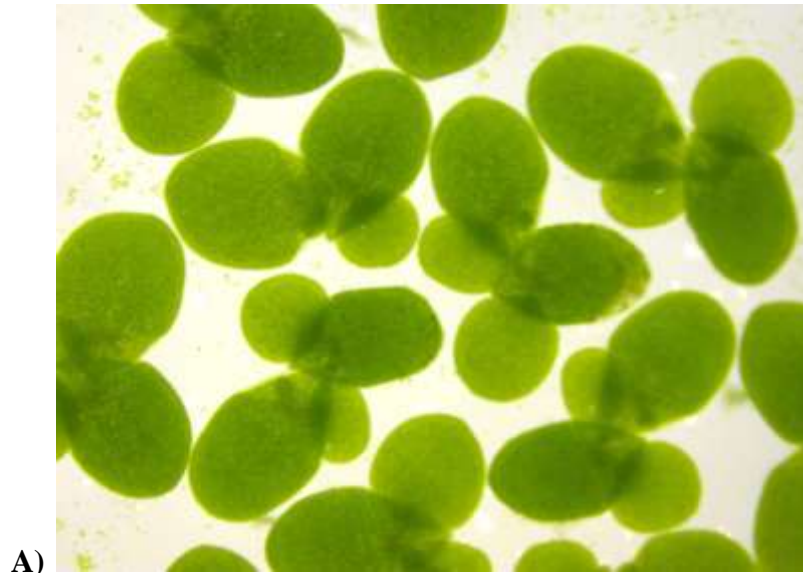
Figura 12 - Aspectos macroscópicos das plantas após 7 dias de teste com o cloridrato de propranolol:

A) *L. minor* no controle

B) *L. minor* exposta à concentração de 100 mg.L⁻¹ do fármaco

C) *L. minor* exposta à concentração de 200 mg.L⁻¹ do fármaco

D) *L. minor* exposta à concentração de 400 mg.L⁻¹ do fármaco





Fonte: Da autora.

4.2.5 Monitoramento do pH nos testes com o cloridrato de propranolol

O pH foi monitorado nos tratamentos e no grupo controle e não variou mais do que 1,5 unidade durante os testes, conforme recomendado pelo Protocolo da OECD (2006). Na Tabela 15, estão mostrados os valores de pH medidos (a 25°C) em cada uma das concentrações testadas, nos dias inicial (dia 0) e final (dia 7) de cada um dos três testes realizados com o cloridrato de propranolol, bem como a variação de pH (Δ pH) representada pela diferença entre os valores medidos no dia final e inicial de cada teste.

Tabela 15 - Valores de pH e de variação de pH (Δ pH) medidos a 25°C em cada uma das concentrações testadas, nos dias inicial e final de cada um dos três testes realizados com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração	Teste 1			Teste 2			Teste 3		
	pH início	pH fim	Δ pH	pH início	pH fim	Δ pH	pH início	pH fim	Δ pH
Controle	5,64	6,35	0,71	5,51	6,12	0,61	5,46	5,93	0,47
1,56 mg.L ⁻¹	5,64	6,35	0,71	5,69	6,21	0,52	5,58	6,09	0,51
3,1 mg.L ⁻¹	5,70	6,39	0,69	5,73	6,19	0,46	5,57	6,09	0,52
6,2 mg.L ⁻¹	5,72	6,39	0,67	5,78	6,15	0,37	5,59	6,08	0,49
12,5 mg.L ⁻¹	5,78	6,39	0,61	5,80	6,12	0,32	5,66	6,03	0,37
25,0 mg.L ⁻¹	5,75	6,27	0,52	5,81	6,07	0,26	5,67	5,96	0,29
50,0 mg.L ⁻¹	5,74	6,15	0,41	5,82	5,90	0,08	5,73	5,91	0,18
100,0 mg.L ⁻¹	5,73	5,66	0,07	5,82	5,53	0,29	5,77	5,53	0,24
200,0 mg.L ⁻¹	5,75	5,15	0,60	5,87	5,47	0,4	5,81	5,60	0,21
400,0 mg.L ⁻¹	5,75	4,33	1,42	5,84	5,24	0,6	5,81	4,86	0,95

Fonte: Da autora.

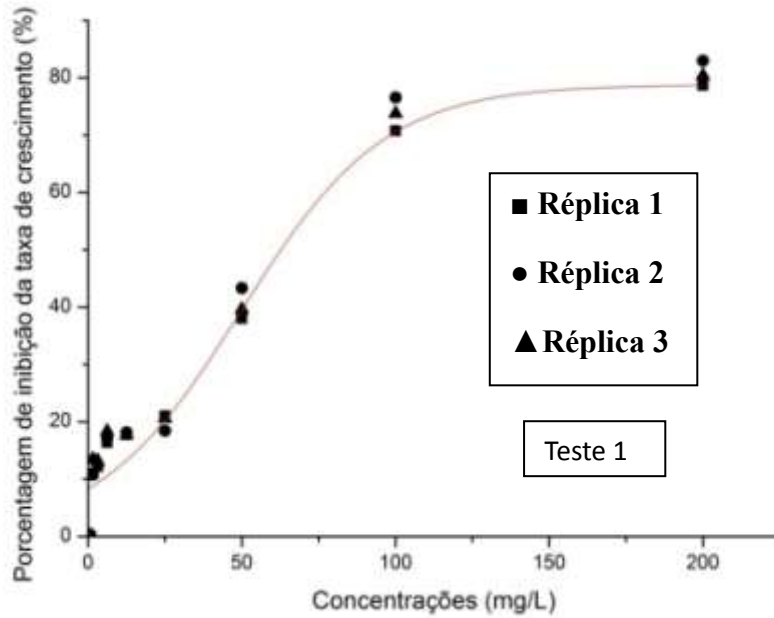
Conforme observado na Tabela 15, houve reduções nos valores de pH, entre os dias inicial e final de testes, nas réplicas com as concentrações de 100,0; 200,0 e 400,0 mg.L⁻¹ do fármaco. Tais resultados são concordantes com a clorose e a necrose observadas nas plantas expostas a essas concentrações do fármaco e podem ser indicativos da ocorrência de uma maior taxa de decomposição da matéria orgânica das macrófitas em presença do cloridrato de propranolol, uma vez que a acidez das águas pode ser resultante, além da presença de dióxido de carbono (CO₂) absorvido da atmosfera, da oxidação de matéria orgânica (VON SPERLING, 2005). Além disso, a redução acentuada do pH proporcional ao aumento da concentração testada do fármaco pode ser devido à menor taxa fotossintética, com consequente menor captação de CO₂, realizada pelas plantas nas concentrações superiores testadas do cloridrato de propranolol, uma vez que, além de as frondes terem sofrido redução em número e em área total com o aumento das concentrações do fármaco, o número reduzido de plantas ainda sofreu efeitos de clorose e necrose foliares, dificultando ou mesmo inviabilizando a realização da fotossíntese, devido à falta de clorofila evidenciada nesses casos (SCHUSTER, 2014).

4.3 Efeitos do fármaco losartana potássica para *L. minor*

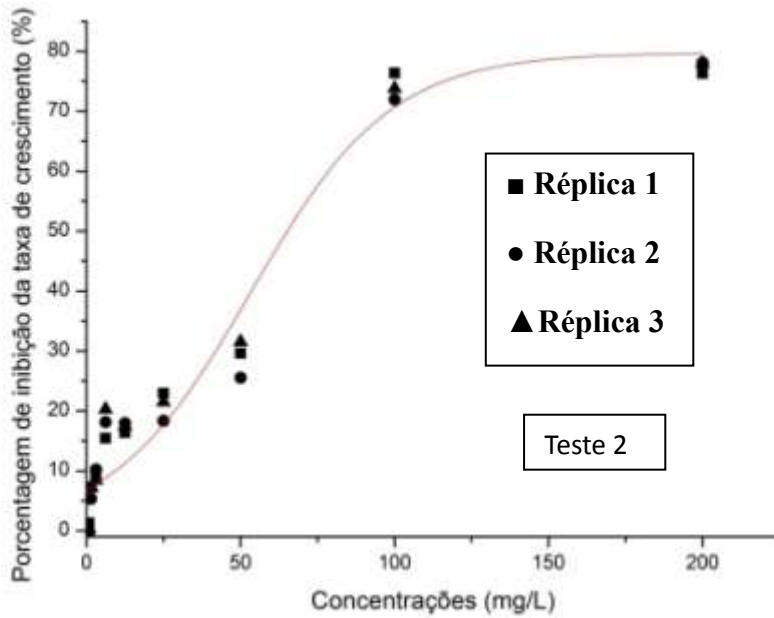
4.3.1 Efeitos de inibição do crescimento de *L. minor* por losartana potássica avaliados pelo parâmetro número de frondes

A fim de se determinar os valores de concentração efetiva do fármaco losartana potássica a 10% (CE₁₀), a 20% (CE₂₀), a 50% (CE₅₀), a 70% (CE₇₀) e a 80% (CE₈₀) dos organismos-teste, foram elaboradas 3 curvas concentração-resposta, referentes aos respectivos testes com o fármaco em questão, conforme mostrado na Figura 13. Para a construção destas curvas concentração-resposta, foram considerados os valores de inibição percentual da taxa de crescimento, calculados a partir da avaliação diária do número de frondes nos tratamentos e no controle, à semelhança do que foi realizado para cálculos do teste com o cloridrato de propranolol.

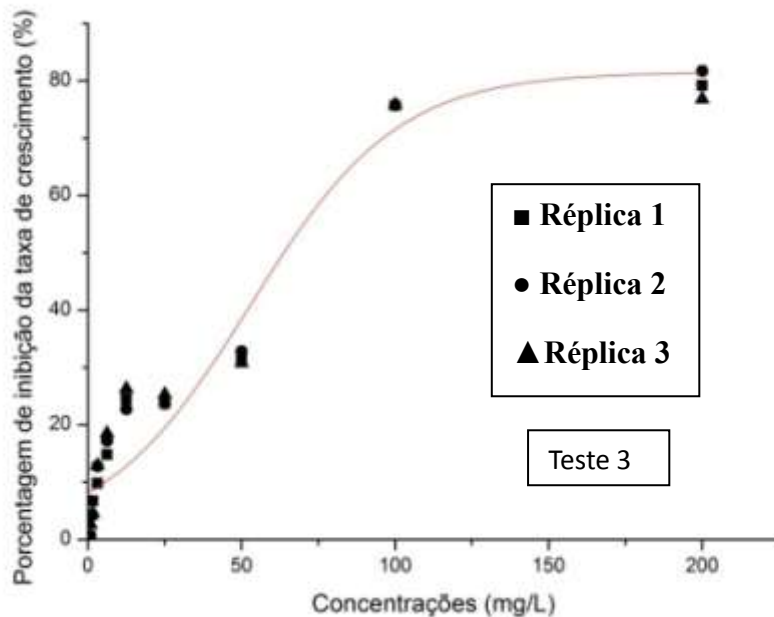
Figura 13 - Curvas concentração-resposta dos efeitos do fármaco losartana potássica para a macrófita *L. minor*, avaliados com base no número de frondes: A) Gráfico referente ao teste 1; B) Gráfico referente ao teste 2; C) Gráfico referente ao teste 3



A)



B)



C)

Fonte: Da autora.

Conforme demonstrado na Figura 13, as curvas concentração-resposta dos efeitos de inibição percentual da taxa de crescimento de *L. minor*, com base no número de frondes, causada pela losartana potássica, seguiram um ajuste sigmoideal do tipo logístico, à semelhança do que foi observado para essas mesmas curvas obtidas para os efeitos do cloridrato de propranolol. As equações das regressões não-lineares, obtidas para as curvas supracitadas, com os respectivos desvios-padrão, são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos ajustes logísticos para as curvas concentração-resposta dos efeitos da losartana na inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados pelo número de frondes.

Teste	Equação*: $y = a / (1 + \exp(-k(x - xc)))$			
	Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro a (desvio-padrão)	Valor do parâmetro xc (desvio-padrão)	Valor do parâmetro k (desvio-padrão)
1	0,96045	78,78173±5,05141	49,81292±6,75197	0,0428±0,00747
2	0,95088	79,71427±5,83326	53,39152±7,72937	0,04415±0,00877
3	0,93518	81,49886±6,89875	52,7163±9,10558	0,04171±0,00932

*O parâmetro **a** corresponde ao valor assintótico, que indica o valor de estabilização da variável dependente em relação ao tempo; o parâmetro **xc** corresponde ao parâmetro de localização, que indica o ponto de inflexão em que a taxa de crescimento da curva atinge seu valor máximo; o parâmetro **k** corresponde à medida relativa à taxa de variação da inclinação da curva. Fonte: Da autora.

A observação dos valores dos coeficientes de determinação obtidos nos ajustes das curvas concentração-resposta, conforme mostrado na Tabela 16, permite concluir que o modelo sigmoidal do tipo logístico apresentou adequado ajuste aos dados, com cerca de 93%-96% da variabilidade da inibição da taxa de crescimento de *L. minor* explicadas pelas concentrações aplicadas de losartana potássica.

A partir dos dados da Tabela 16, foram calculados os valores médios estimados de CE₁₀, CE₂₀, CE₅₀, CE₇₀ e CE₈₀ (mg.L⁻¹) dos respectivos testes com losartana, mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 - Valores de CE₁₀, CE₂₀, CE₅₀, CE₇₀ e CE₈₀ (mg.L⁻¹) dos efeitos de losartana para *L. minor*, calculados a partir das equações das análises de regressão.

Concentração efetiva (CE)	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média da concentração efetiva (CE)	Desvio-padrão
10	4,7	9,4	5,6	6,6	2,5
20	24,6	28,6	25,8	26,3	2,0
50	62,7	65,2	63,8	63,9	1,2
70	98,3	98,1	96,0	97,5	1,3
80	120,8	113,8	148,1	127,6	18,1

Fonte: Da autora.

Conforme mostrado na Tabela 17, o valor médio de CE₅₀ obtido na presente pesquisa para os efeitos de inibição da taxa de crescimento específica de *L. minor* pela losartana foi de 63,9 mg.L⁻¹ para o parâmetro de avaliação número de frondes. A comparação entre esse valor com dados da literatura não foi possível para losartana potássica, porque não há dados disponíveis acerca dos efeitos desse fármaco para a macrófita *L. minor*. Contudo, a comparação entre o valor médio de CE₅₀ para os efeitos de losartana em *L. minor*, obtido no presente trabalho, com valores de toxicidade descritos na literatura para outras espécies de organismos-teste, mostra que, ao contrário do que ocorreu para o fármaco cloridrato de propranolol, *L. minor* mostrou-se mais sensível aos efeitos desse fármaco do que as espécies animais já avaliadas. Por exemplo, Yamamoto et al. (2012) encontraram o valor médio de CE_{50, 48h} de 175,26 mg.L⁻¹ para os efeitos da losartana potássica na inibição da mobilidade do cladócero *Daphnia similis*. A United States of America-FDA (2001) menciona o valor de CL_{50, 48h} de 331 mg.L⁻¹ para os efeitos desse mesmo fármaco sobre a inibição da mobilidade do cladócero *Daphnia magna* e, ainda, os valores de CL_{50, 48h} de >1000 mg.L⁻¹ e CL_{50, 96h} de > 929 mg.L⁻¹ para os efeitos da losartana na letalidade das espécies de peixes respectivas de *Pimephales promelas* e

Oncorhynchus mykiss. Os valores de efeitos crônicos obtidos no presente trabalho para *L. minor*, de CENO igual a 0,78 mg.L⁻¹ e de CEO igual a 1,56 mg.L⁻¹ igualmente mostram valores mais baixos de CENO e de CEO em comparação com espécies animais testadas. Por exemplo, Yamamoto et al. (2012) calcularam os valores de CENO e de CEO respectivos de 10 e de 100 mg.L⁻¹ para os efeitos de losartana na reprodução de *Ceriodaphnia dubia*, em testes com duração de 7 dias. Em testes com duração de 24-28h, realizados com o intuito de avaliar a toxicidade da losartana no desenvolvimento embriolarval do molusco *Lytechinus variegates*, Yamamoto et al. (2014) determinaram os valores respectivos de CENO e de CEO de 50 mg.L⁻¹ e de 70 mg.L⁻¹.

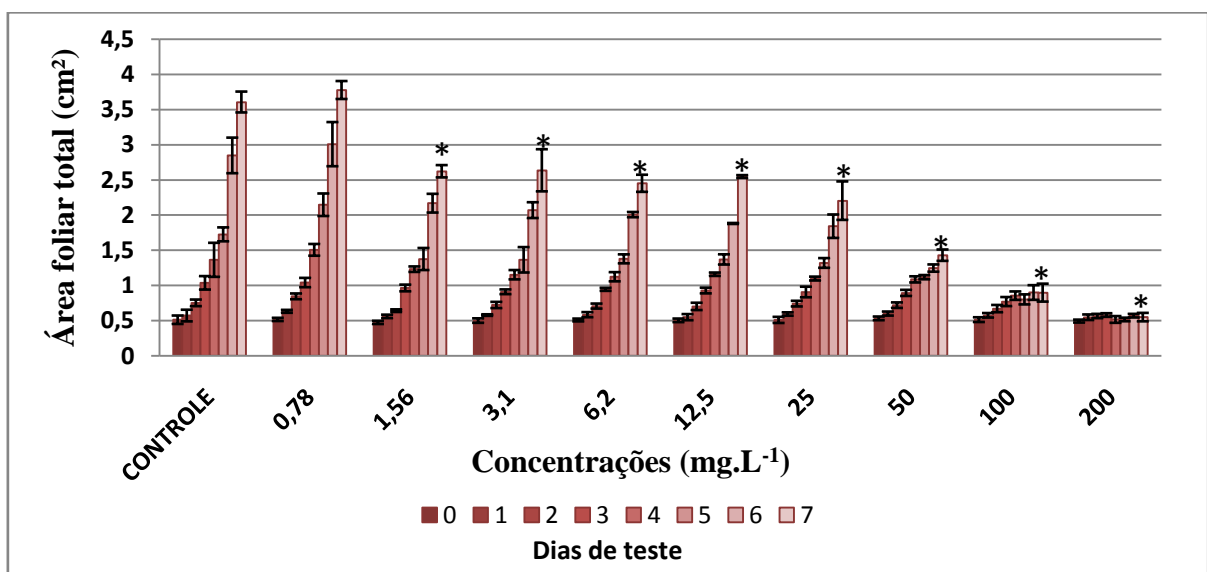
A maior sensibilidade de *L. minor* aos efeitos da losartana, quando comparado com outras espécies avaliadas, não é um fato exclusivo para esse fármaco em particular. Cleuvers (2003), ao testar a toxicidade de fármacos de distintas classes farmacológicas, entre analgésicos, redutor lipídico, anti-hipertensivos, anti-diabético e anti-convulsivante, nas espécies *Daphnia magna*, *Desmodesmus subspicatus* e *Lemna minor*, concluiu que a macrófita avaliada foi a espécie mais sensível à 6 dos 9 fármacos testados. Ainda de acordo com esse mesmo autor, tal fato não foi surpreendente, uma vez que o teste de 7 dias com a *L. minor* é um teste crônico e que permite avaliar diversos parâmetros de sensibilidade sub-letais, tais como a área foliar. Cleuvers (2003) ainda encontrou um valor de CE₅₀ cerca de 10 vezes mais baixo para os efeitos do diclofenaco na *L. minor* em comparação com o valor obtido para esse *endpoint* nos testes com a alga *Desmodesmus subspicatus* e no cladóceros *Daphnia magna*. Portanto, esses resultados e os obtidos no presente trabalho com relação aos efeitos da losartana potássica para *L. minor* confirmam as afirmações de Lewis (1995) de que as sensibilidades relativas de plantas e de animais são espécie e químico-específicas e, portanto, imprevisíveis e de que, conseqüentemente, dados de toxicidade animal não podem servir como substitutos para dados obtidos em testes com plantas de água doce e de ambientes salinos, sem que haja evidências científicas para isso. Além disso, conforme afirmam Lewis (1995) e Cleuvers (2003), a fitotoxicidade de certos compostos químicos pode diferir muito entre algas e plantas superiores, o que torna os testes de inibição do crescimento com *L. minor* muito úteis e adicionais para avaliar o impacto de potenciais contaminantes ambientais.

4.3.2 Efeitos de inibição do crescimento de *L. minor* por losartana potássica avaliados pelo parâmetro área foliar

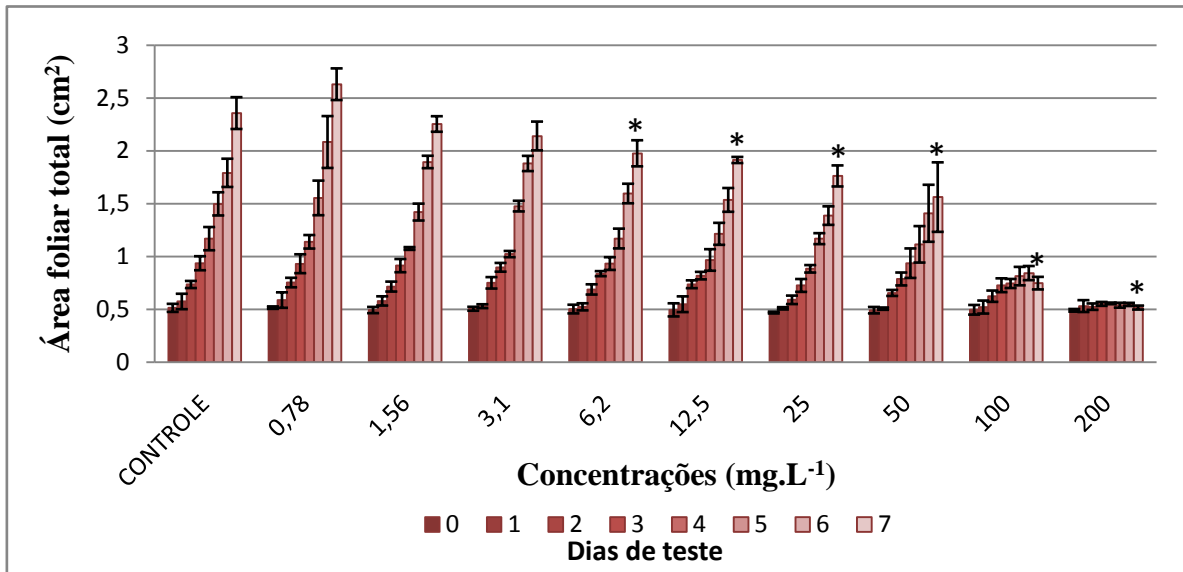
A toxicidade de losartana para *L. minor* também foi avaliada diariamente por meio da área total das frondes. Na Figura 14, estão mostrados os gráficos referentes aos 3 testes realizados para avaliarem-se os efeitos da losartana potássica na inibição do crescimento de *L. minor*, tomando-se por base as áreas médias foliares totais (cm^2), calculadas em cada concentração aplicada do fármaco e no grupo controle, durante os 7 dias de testes.

Figura 14 - Gráficos das áreas médias foliares totais (cm^2), com respectivas barras de desvio-padrão, da *L. minor* exposta a diferentes concentrações de losartana e no grupo controle, durante os 7 dias de teste: : (Os * indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; $\alpha = 0,05$)
 A) Gráfico referente ao teste 1;
 B) Gráfico referente ao teste 2;
 C) Gráfico referente ao teste 3.

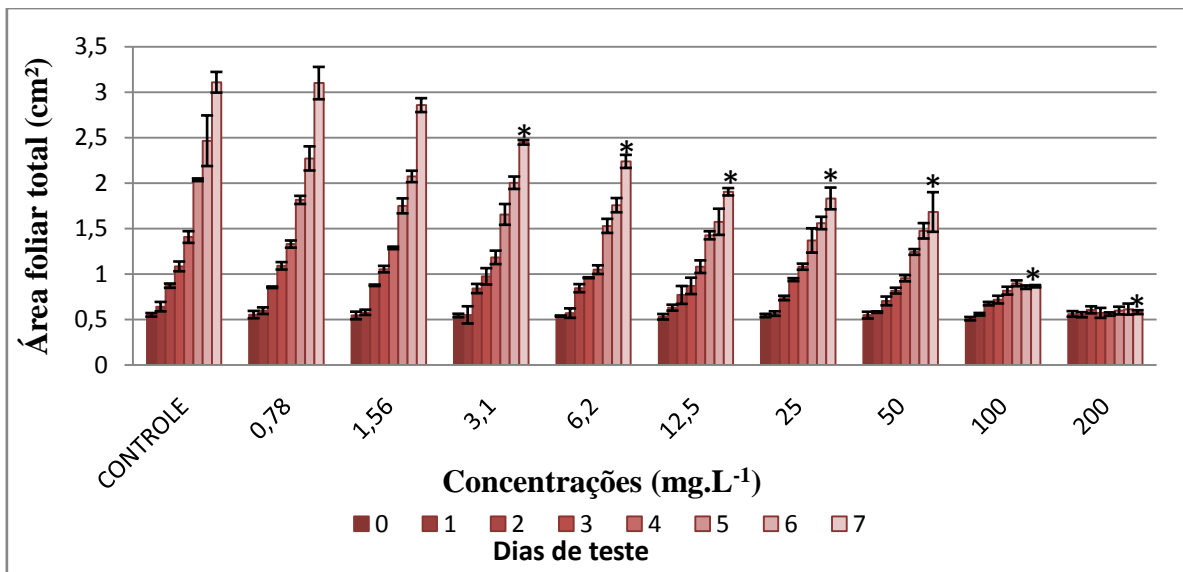
A)



B)



C)

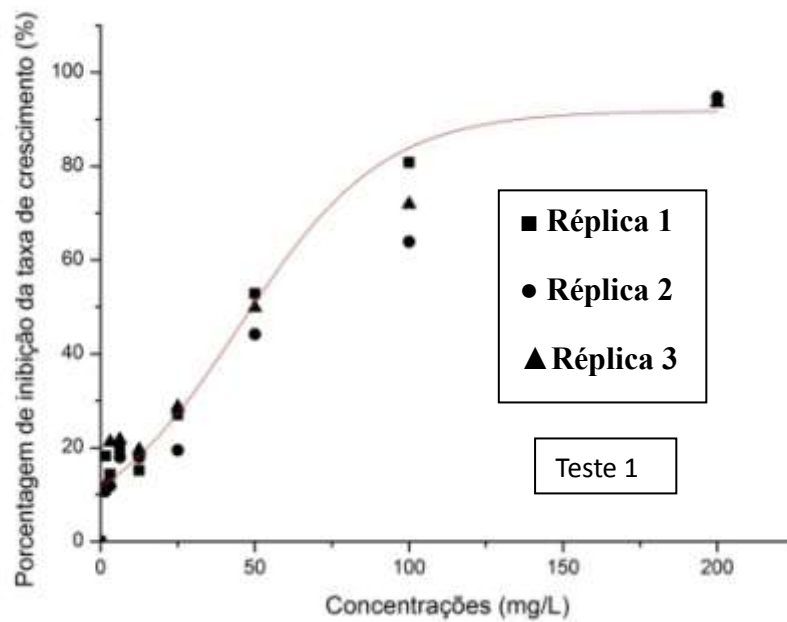


Fonte: Da autora.

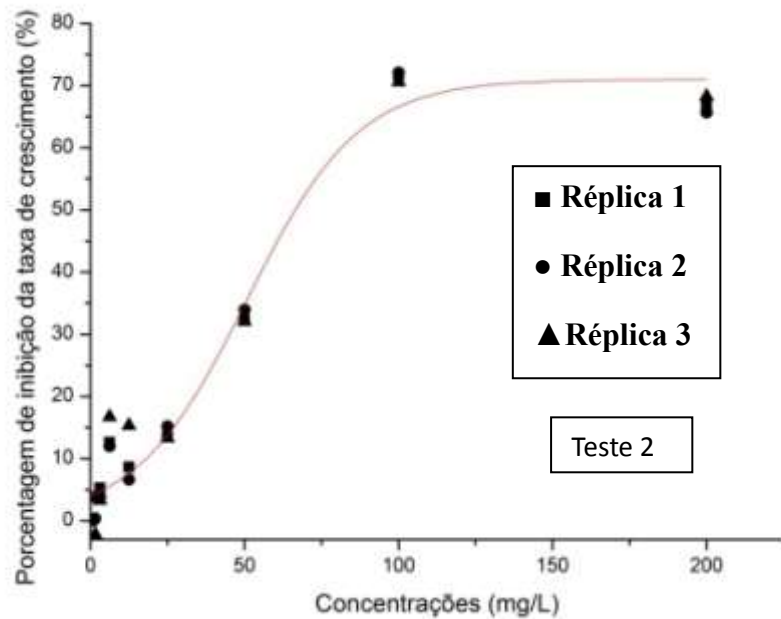
Como mostrado na Figura 14, observam-se que, até a concentração testada de 50,0 mg.L⁻¹ de losartana potássica, embora tenha havido uma redução significativa do crescimento em termos de área foliar total, o mesmo manteve-se exponencialmente. Na concentração de 100,0 mg.L⁻¹, houve crescimento modesto durante o período de teste, tendo-se mantido aproximadamente constante nos dias finais. Na concentração de 200,0 mg.L⁻¹, praticamente não mais se verifica crescimento em área foliar total durante os dias de teste.

Na Figura 15, estão mostrados os gráficos comparativos das curvas concentração-resposta dos três testes realizados para avaliar a CE_{50} referente à porcentagem de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliada pelo parâmetro área foliar total.

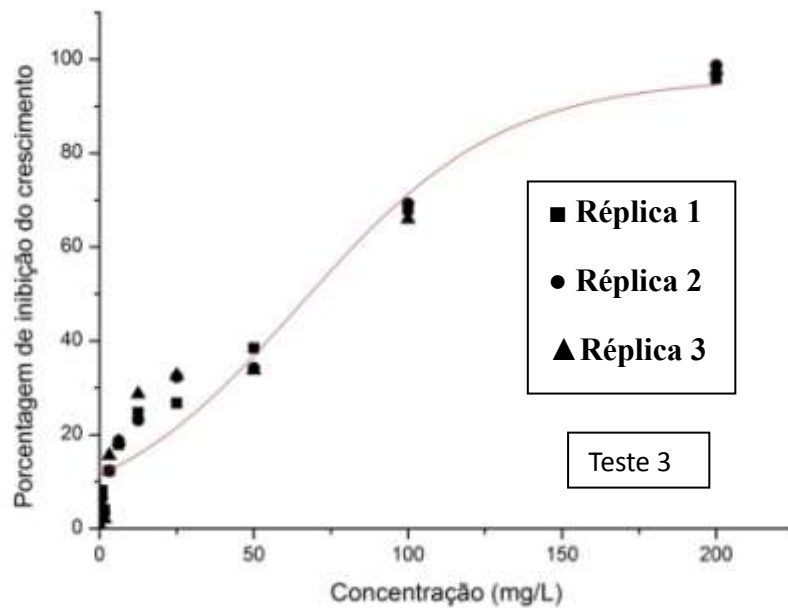
Figura 15 - Curvas concentração-resposta dos efeitos do fármaco losartana potássica para a macrófita *L. minor*, avaliados com base na área foliar total: A) Gráfico referente ao teste 1; B) Gráfico referente ao teste 2; C) Gráfico referente ao teste 3



A)



B)



C)

Fonte: Da autora.

Conforme observado na Figura 15, à semelhança do que foi verificado para os ajustes aos dados de efeitos de inibição da taxa de crescimento pelo cloridrato de propranolol, o modelo sigmoide do tipo logístico ajustou-se adequadamente às curvas concentração-resposta dos efeitos da losartana potássica, com base na área foliar total. Os valores de coeficiente de determinação (R^2) obtidos nos respectivos ajustes, bem como as regressões não-lineares

referentes aos gráficos da Figura 15, juntamente com os valores dos seus parâmetros e respectivos desvios-padrão, são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos ajustes logísticos para as curvas concentração-resposta dos efeitos da losartana na inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados pela área foliar.

Teste	Equação*: $y = a / (1 + \exp(-k(x-xc)))$			
	Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro $a \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $xc \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
1	0,96422	91,82201 \pm 5,52231	45,04409 \pm 6,1562	0,04289 \pm 0,0075
2	0,97470	70,98481 \pm 3,67194	50,72195 \pm 4,8905	0,05525 \pm 0,0095
3	0,94724	96,03671 \pm 7,88606	65,50949 \pm 10,23544	0,03061 \pm 0,00548

*O parâmetro a corresponde ao valor assintótico, que indica o valor de estabilização da variável dependente em relação ao tempo; o parâmetro xc corresponde ao parâmetro de localização, que indica o ponto de inflexão em que a taxa de crescimento da curva atinge seu valor máximo; o parâmetro k corresponde à medida relativa à taxa de variação da inclinação da curva. Fonte: Da autora.

De acordo com o mostrado na Tabela 18, aproximadamente 95% - 97% da variabilidade da inibição porcentual da taxa de crescimento de *L. minor*, com base na área foliar, podem ser explicadas pelas concentrações testadas de losartana.

Na Tabela 19, estão mostrados os valores de CE_{50} calculados com base nas respectivas equações de regressão não-linear das curvas concentração-resposta da Figura 15.

Tabela 19 - Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) referentes aos 3 testes realizados de inibição do crescimento de *L. minor* pela losartana, baseado na área foliar total.

Teste	Valor de CE_{50} ($mg.L^{-1}$)
1	49,2
2	66,4
3	68,2
Média dos valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$)	61,3
Desvio-padrão	10,5
C.V. (%)	17,1

Fonte: Da autora.

Conforme mostrado na Tabela 19, o valor médio de CE_{50} igual a 61,3 $mg.L^{-1}$, obtido para os efeitos sobre a área foliar total, foi bastante próximo do valor encontrado para os efeitos

com relação ao número de frondes, de $63,9 \text{ mg.L}^{-1}$. Portanto, a losartana potássica afetou a área foliar total de maneira apenas ligeiramente superior ao número de frondes de *L. minor*, ao contrário do que foi observado para os efeitos com o cloridrato de propranolol.

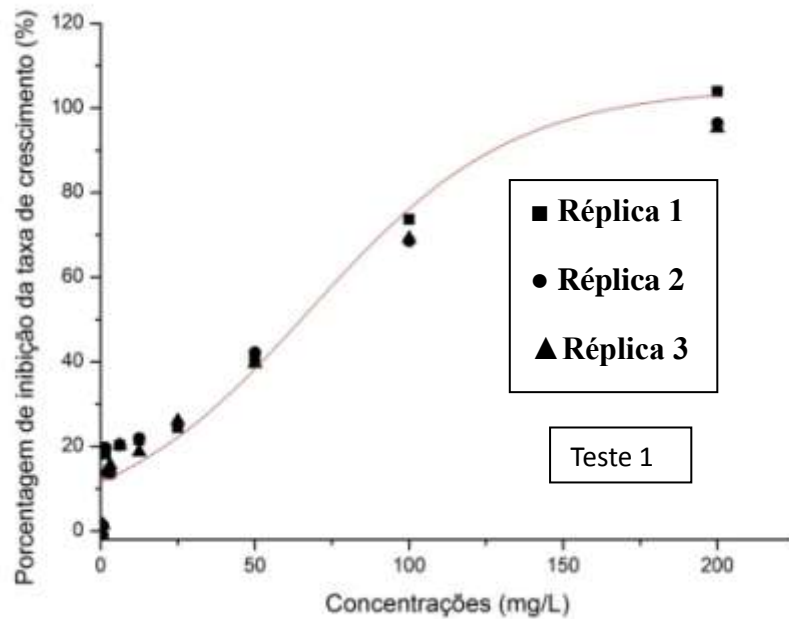
A comparação dos valores de CE_{50} obtidos nos testes com a *L. minor* exposta ao cloridrato de propranolol e à losartana potássica permite concluir que a macrófita foi mais sensível aos efeitos tóxicos deste último fármaco. Contudo, com base nos valores obtidos no presente trabalho e na classificação proposta pela OECD (2001), a losartana potássica enquadra-se na categoria de substância perigosa para o ambiente aquático, na classe de toxicidade aguda III, a qual compreende valores de CE_{50} entre $10\text{-}100 \text{ mg.L}^{-1}$, de forma semelhante ao cloridrato de propranolol.

À semelhança do que foi observado para o parâmetro número de frondes, os valores de CENO e de CEO calculados com relação ao parâmetro área foliar total foram de, respectivamente, $0,78 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,56 \text{ mg.L}^{-1}$.

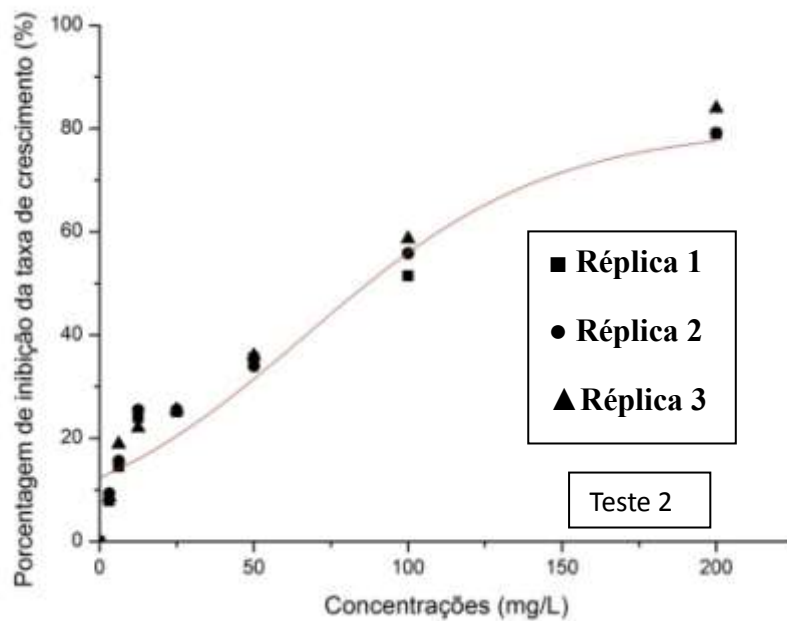
4.3.3 Efeitos de inibição do crescimento de L. minor por losartana potássica avaliados pelo parâmetro peso fresco

Em adição, a inibição do crescimento de *L. minor* pela losartana foi avaliada com relação à variação do peso fresco entre os dias final e inicial de testes. A partir dos valores de inibição percentual da taxa de crescimento de *L. minor* pelas diferentes concentrações testadas do fármaco, foram traçados os gráficos concentração-resposta para os 3 testes realizados, conforme mostrado na Figura 16.

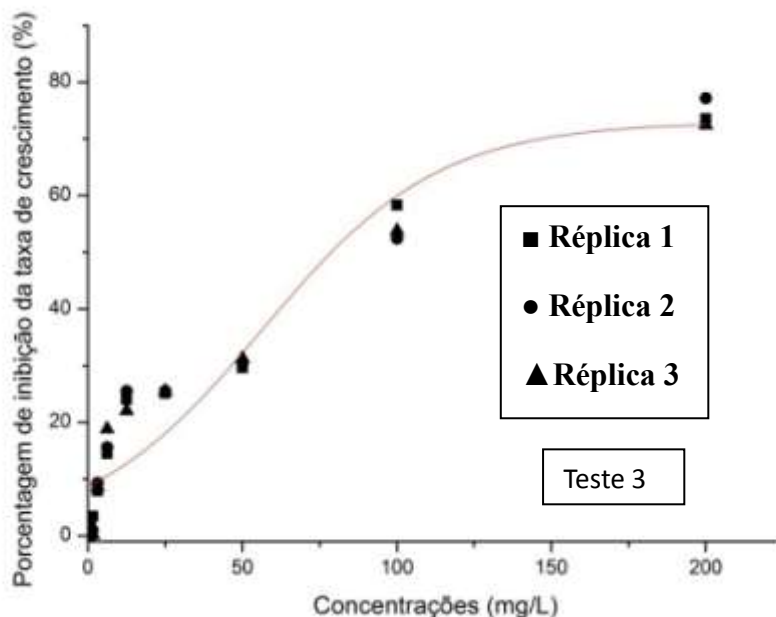
Figura 16 - Curvas concentração-resposta dos efeitos do fármaco losartana para a macrófita *L. minor*, avaliados com base no peso fresco: A) Gráfico referente ao teste 1; B) Gráfico referente ao teste 2; C) Gráfico referente ao teste 3



A)



B)



C)

Fonte: Da autora.

Novamente, da mesma forma como observado para as demais curvas concentração-resposta obtidas nos dois parâmetros avaliados anteriormente, o modelo sigmoideal do tipo logístico ajustou-se satisfatoriamente aos dados, conforme confirmado pelos respectivos coeficientes de determinação resultantes, mostrados na Tabela 20. Nessa mesma tabela, ainda estão relacionadas as equações das regressões não-lineares referentes aos gráficos da Figura 16, juntamente com os valores dos seus parâmetros e respectivos desvios-padrão.

Tabela 20 - Equações das regressões não-lineares e valores dos parâmetros obtidos nos ajustes logísticos para as curvas concentração-resposta dos efeitos da losartana na inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados pelo peso fresco.

Teste	Equação*: $y = a / (1 + \exp(-k(x - xc)))$			
	Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro $a \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $xc \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
1	0,94305	104,78603 \pm 9,00765	68,01897 \pm 10,74513	0,03056 \pm 0,00564
2	0,90674	80,21714 \pm 10,1357	67,14314 \pm 17,38422	0,02543 \pm 0,00721
3	0,91335	72,92568 \pm 7,45583	56,55351 \pm 11,83518	0,03518 \pm 0,00862

*O parâmetro **a** corresponde ao valor assintótico, que indica o valor de estabilização da variável dependente em relação ao tempo; o parâmetro **xc** corresponde ao parâmetro de localização, que indica o ponto de inflexão em que a taxa de crescimento da curva atinge seu valor máximo; o parâmetro **k** corresponde à medida relativa à taxa de variação da inclinação da curva. Fonte: Da autora.

Os coeficientes de determinação obtidos nos ajustes supracitados mostram que cerca de 91% - 94% da variabilidade da inibição da taxa de crescimento de *L. minor*, tomando-se o peso fresco por parâmetro avaliativo, puderam ser explicadas pelas concentrações testadas de losartana.

Na Tabela 21, estão demonstrados os valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$), calculados com base nas respectivas equações de regressão não-linear das curvas concentração-resposta da Figura 16.

Tabela 21 - Valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) referentes à inibição do crescimento de *L. minor* pela losartana, baseada no peso fresco, calculados para os 3 testes realizados com o fármaco.

Teste	Valor de CE_{50} ($mg.L^{-1}$)
1	65,0
2	86,9
3	78,7
Média dos valores de CE_{50} ($mg.L^{-1}$)	76,9
Desvio-padrão	11,1
C.V. (%)	14,4

Fonte: Da autora.

Conforme mostrado na Tabela 21, o valor médio de CE_{50} calculado para os efeitos da losartana potássica sobre a *L. minor*, com base no peso fresco, foi de 76,9 $mg.L^{-1}$. Embora tal valor tenha se mostrado maior do que os valores obtidos para o número de frondes e para a área foliar total, a análise de variância (ANOVA), entre os resultados obtidos de CE_{50} ($mg.L^{-1}$) para os três parâmetros abordados nos testes com a *L. minor*, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os mesmos, ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$). Portanto, diferente do que ocorreu com os efeitos do cloridrato de propranolol, a losartana potássica não afetou um parâmetro avaliativo para *L. minor* de forma estatisticamente diferente do outro. Igualmente e de forma análoga aos valores calculados para os parâmetros número de frondes e área foliar total, os valores crônicos de CENO e de CEO, determinados estatisticamente para os efeitos de toxicidade da losartana na inibição da taxa de crescimento com base no peso fresco da *L. minor*, foram de 0,78 $mg.L^{-1}$ e de 1,56 $mg.L^{-1}$, respectivamente.

4.3.4 Alterações macroscópicas no desenvolvimento físico das plantas promovidas pela losartana potássica

A observação diária das alterações macroscópicas das frondes permitiu observar que, até o 5º dia de teste, além da inibição da taxa de crescimento observada nas plantas expostas às diversas concentrações de losartana, nenhum efeito visível de clorose, necrose ou lesão foliar foi notado. A partir do 5º dia de teste, porém, notaram-se colônias com padrão irregular de formação nas macrófitas expostas à concentração de 100,0 mg.L⁻¹ de losartana, isto é, observaram-se estruturas de formação das colônias atípicas, diferentes das colônias do controle e dos demais tratamentos. Além disso, nas plantas expostas a essa mesma concentração do fármaco, houve também abscisão na estrutura de algumas colônias (FIGURA 17).

Figura 17 - Aspectos macroscópicos das frondes de *L. minor* no grupo controle e nas expostas ao fármaco losartana potássica, após 5 dias de testes:

A) *L. minor* no controle

B) *L. minor* exposta à concentração de 100,0 mg.L⁻¹ do fármaco





B)

Fonte: Da autora.

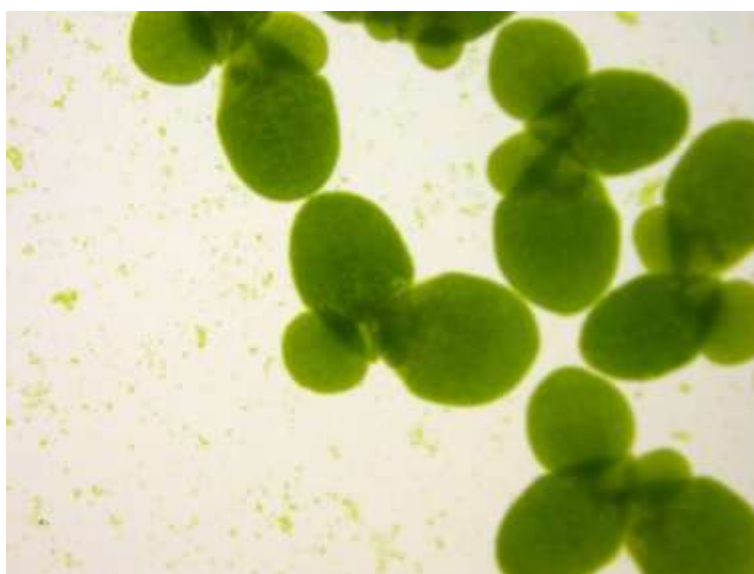
Após 7 dias de teste, notaram-se colônias com frondes com desvios da forma oval padrão, além de lesões visíveis nas mesmas, nas macrófitas expostas às concentrações de 50,0, e 100,0 mg.L⁻¹ de losartana (FIGURA 18).

Figura 18 - Aspectos macroscópicos das macrófitas expostas ao fármaco losartana potássica no último dia de testes:

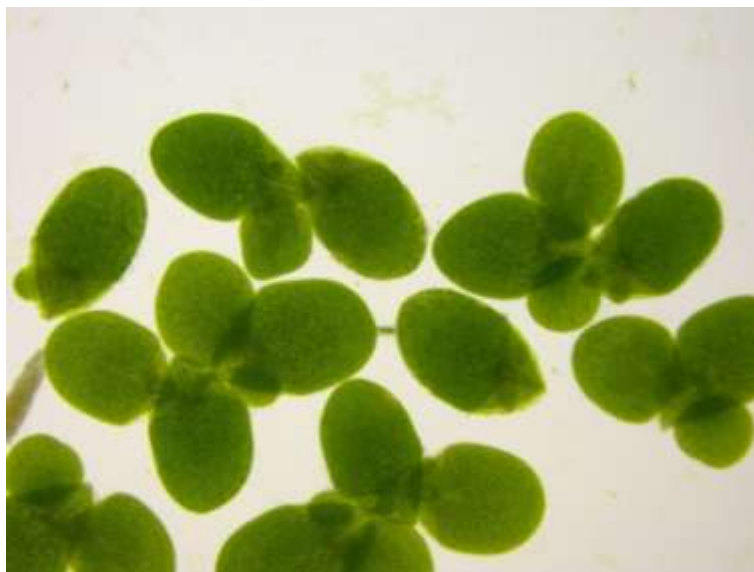
A) *L. minor* no controle

B) *L. minor* exposta à concentração de 50,0 mg.L⁻¹ do fármaco

C) *L. minor* exposta à concentração de 100,0 mg.L⁻¹ do fármaco



A)



B)



C)

Fonte: Da autora.

Muito embora a inibição percentual da taxa de crescimento promovida pela losartana sobre a *L. minor* tenha sido superior à verificada com o cloridrato de propranolol, curiosamente, diferentemente do que foi observado nos testes com este último fármaco citado, não se observaram sinais de clorose ou necrose acentuadas nas frondes até o último dia de testes com a losartana potássica. Portanto, tais sinais observados macroscopicamente podem ser indicativos de ações tóxicas realizadas por meio de diferentes mecanismos de ação de cada um dos fármacos avaliados.

4.3.5 Monitoramento do pH nos testes com a losartana potássica

O pH monitorado nos tratamentos e no grupo controle durante os testes com losartana, à semelhança dos testes com o cloridrato de propranolol, também não variou mais do que 1,5 unidade, conforme recomendado pelo Protocolo da OECD (OECD, 2006). Os valores de pH medidos (a 25°C) em cada uma das concentrações testadas, nos dias inicial (dia 0) e final (dia 7) de cada um dos três testes realizados com a losartana potássica, bem como a variação de pH (Δ pH) representada pela diferença entre os valores medidos no dia final e inicial de cada teste, estão mostrados na Tabela 22.

Tabela 22 - Valores de pH e de Δ pH medidos a 25°C nos dias inicial e final, nos 3 testes realizados para a avaliação dos efeitos tóxicos da losartana potássica sobre a *L. minor*.

Concentração	Teste 1			Teste 2			Teste 3		
	pH início	pH fim	Δ pH	pH início	pH fim	Δ pH	pH início	pH fim	Δ pH
Controle	5,51	6,72	1,21	5,60	6,18	0,58	5,46	6,06	0,60
0,78 mg.L ⁻¹	5,64	6,70	1,06	5,64	6,17	0,53	5,63	6,17	0,54
1,56 mg.L ⁻¹	5,66	6,70	1,04	5,73	6,16	0,43	5,65	6,15	0,50
3,1 mg.L ⁻¹	5,73	6,71	0,98	5,78	6,12	0,34	5,69	6,13	0,44
6,2 mg.L ⁻¹	5,79	6,73	0,94	5,81	6,03	0,22	5,75	6,11	0,36
12,5 mg.L ⁻¹	5,80	6,69	0,89	5,82	6,05	0,23	5,76	6,05	0,29
25,0 mg.L ⁻¹	5,82	6,60	0,78	5,83	6,06	0,23	5,79	6,02	0,23
50,0 mg.L ⁻¹	5,84	6,53	0,69	5,82	6,03	0,21	5,78	6,04	0,26
100,0 mg.L ⁻¹	5,86	6,45	0,59	5,85	6,00	0,15	5,78	6,03	0,25
200,0 mg.L ⁻¹	5,89	6,46	0,57	5,89	6,01	0,12	5,83	6,02	0,19

Fonte: Da autora.

Conforme pode ser observado na Tabela 22, diferentemente dos testes com cloridrato de propranolol, nos testes com *L. minor* em presença da losartana, não se observaram reduções significativas de pH entre os dias inicial e final dos testes.

4.4 Efeitos da mistura dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica para a macrófita *L. minor*

4.4.1 Toxicidade da mistura dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica medida por meio da inibição do crescimento de *L. minor*, com base no número de frondes

A fim de se avaliar a toxicidade da mistura dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica para *L. minor*, calcularam-se a metade dos valores médios das concentrações efetivas, obtidos nos testes de inibição da taxa de crescimento baseada no número de frondes, em ação individual, de cada fármaco ($CE_{10}/2$; $CE_{20}/2$; $CE_{50}/2$; $CE_{70}/2$; $CE_{80}/2$). Tais concentrações de cada um dos fármacos, conforme mostradas na Tabela 23, foram, então, aplicadas no teste de mistura realizado com a macrófita.

Tabela 23 - Concentrações dos fármacos testados aplicadas no teste de mistura com a macrófita *L. minor*.

Fármaco	$CE_{10}/2$ (mg.L ⁻¹)	$CE_{20}/2$ (mg.L ⁻¹)	$CE_{50}/2$ (mg.L ⁻¹)	$CE_{70}/2$ (mg.L ⁻¹)	$CE_{80}/2$ (mg.L ⁻¹)
Cloridrato de propranolol	7,6	23,5	50,7	67,5	78,5
Losartana potássica	3,3	13,2	31,9	48,7	63,8

Fonte: Da autora.

De forma semelhante ao realizado nos cálculos dos testes de ação individual com cada fármaco, os efeitos de toxicidade da mistura foram avaliados por meio da inibição percentual da taxa de crescimento de *L. minor*, com base no número de frondes. Na Tabela 24, estão mostrados os valores médios e os respectivos desvios-padrão de porcentagem de inibição da taxa de crescimento de *L. minor* promovidos pela mistura de fármacos, para cada valor de $CE_x/2$ testado.

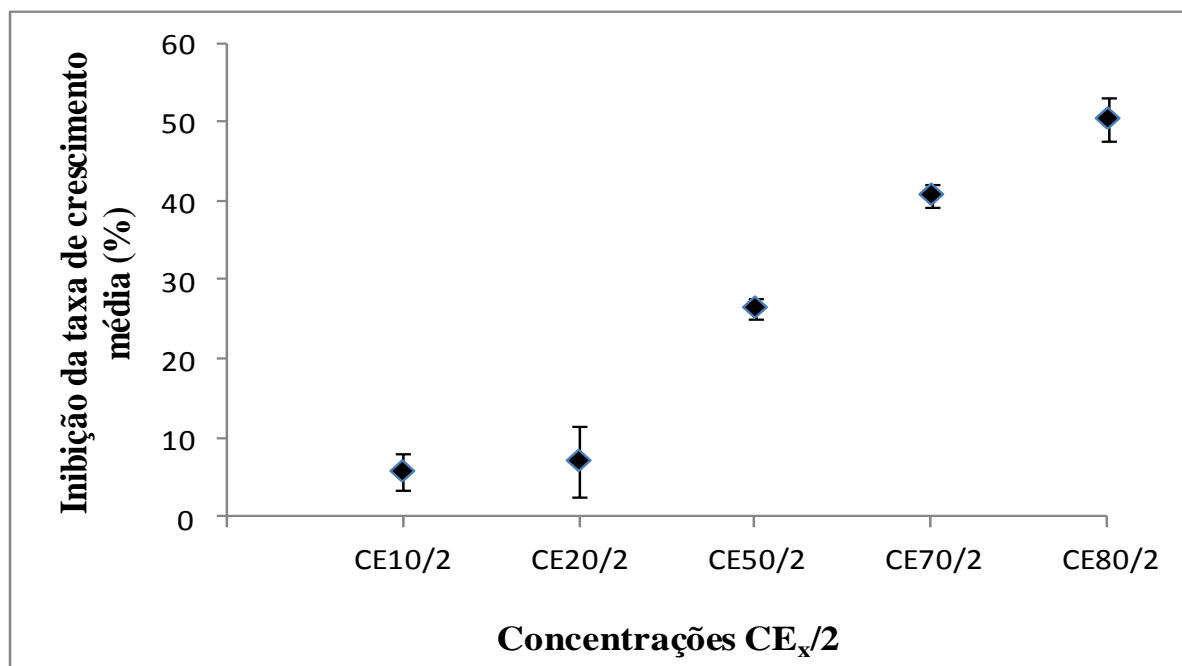
Tabela 24 - Valores médios de porcentagem de inibição da taxa de crescimento (%I_r) obtidos no teste de mistura realizado com *L. minor*.

Concentração efetiva	Média das %I _r	Desvio-padrão
CE ₁₀ /2	5,79	2,29
CE ₂₀ /2	7,13	4,53
CE ₅₀ /2	26,57	1,26
CE ₇₀ /2	40,89	1,40
CE ₈₀ /2	50,53	2,76

Fonte: Da autora.

Os valores mostrados na Tabela 24 podem ser melhor visualizados no gráfico da Figura 19, o qual representa a toxicidade medida da mistura dos fármacos testados, conforme obtido no teste de inibição do crescimento de *L. minor*.

Figura 19 – Valores médios e respectivos desvios-padrão (barras) da porcentagem de inibição da taxa de crescimento de *L. minor* exposta a diferentes níveis de concentrações da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica.



Fonte: Da autora.

Conforme visualizado na Tabela 24 e no gráfico da Figura 19, os efeitos de toxicidade da mistura para *L. minor* claramente seguiram efeitos abaixo do aditivo em todas as concentrações efetivas testadas da mistura. Por exemplo, ao nível da metade da concentração efetiva a 50% dos organismos, aplicada de cada um dos fármacos na mistura ($CE_{50}/2$), os efeitos de inibição percentual da taxa de crescimento de *L. minor* foram de apenas cerca de 26% em comparação com o controle. O efeito de inibição de cerca de 50% da taxa de crescimento só foi alcançado mediante a exposição das macrófitas à metade da concentração efetiva a 80% dos organismos, aplicada de cada um dos fármacos na mistura. Portanto, a presença de um dos fármacos modificou a toxicidade do outro na mistura, o que significa que a toxicidade do cloridrato de propranolol e da losartana potássica em ação combinada não é a soma de suas toxicidades individuais para *L. minor*, ou seja, ocorreram interações químicas entre os dois fármacos testados na mistura para os efeitos de inibição do crescimento de *L. minor*. Deste modo, verifica-se que a avaliação dos efeitos tóxicos de ação individual de um dado composto químico sobre um certo organismo-alvo nem sempre é preditiva dos reais efeitos a que esse organismo está exposto no ecossistema. Pelo contrário, uma vez que os fármacos não ocorrem sozinhos no meio ambiente e, sim, como misturas de diferentes substâncias ativas, metabólitos e produtos de transformação (SANTOS et al., 2010), a presença simultânea de diversos fármacos e de outros compostos químicos no ambiente pode resultar em efeitos ecotoxicológicos diferentes do predito pela ação desses mesmos compostos em ação individual, assim como ocorreu na avaliação ecotoxicológica dos efeitos dos fármacos, em ação combinada, realizada no presente trabalho.

4.4.2 Comparação dos efeitos da toxicidade medida da mistura com as toxicidades dos fármacos em ação individual e com a toxicidade de mistura predita pelos conceitos de adição de concentração e de ação independente

A fim de se determinar se os efeitos de toxicidade medida de mistura seguiriam o conceito preditivo de adição de concentração ou de ação independente, calcularam-se os efeitos de inibição da taxa de crescimento média para as respectivas concentrações efetivas testadas ($CE_x/2$), utilizando-se das respectivas equações para predição de toxicidade (1 e 2) descritas no referencial teórico deste trabalho. Para a avaliação do modelo de ação independente, foram calculados os valores da inibição da taxa de crescimento específica média de *L. minor*, que seriam causados, em ação individual, pelas concentrações aplicadas na

mistura dos fármacos cloridrato de propranolol e da losartana potássica, conforme mostrados na Tabela 25 (efeitos do cloridrato de propranolol em ação individual) e na Tabela 26 (efeitos da losartana potássica em ação individual).

Tabela 25 - Valores de inibição (%) da taxa de crescimento média de *L. minor*, que seriam causados em ação individual pelo cloridrato de propranolol, calculados para cada um dos 3 testes com esse fármaco, em cada uma das concentrações efetivas testadas na mistura.

Concentração efetiva (CE) de cloridrato de propranolol	Inibição da taxa de crescimento média de <i>L. minor</i> (%)				Desvio-padrão
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	
CE ₁₀ /2 (7,6 mg.L ⁻¹)	10,2	7,4	7,5	8,4	1,6
CE ₂₀ /2 (23,5 mg.L ⁻¹)	14,0	11,0	11,1	12,0	1,7
CE ₅₀ /2 (50,7 mg.L ⁻¹)	23,2	20,8	20,6	21,5	1,4
CE ₇₀ /2 (67,5 mg.L ⁻¹)	30,6	29,5	28,9	29,7	0,9
CE ₈₀ /2 (78,5 mg.L ⁻¹)	36,2	36,1	35,3	35,9	0,5

Fonte: Da autora.

Tabela 26 - Valores de inibição (%) da taxa de crescimento média de *L. minor*, que seriam causados em ação individual pela losartana potássica, calculados para cada um dos 3 testes com esse fármaco, em cada uma das concentrações efetivas testadas na mistura.

Concentração efetiva (CE) de losartana potássica	Inibição da taxa de crescimento média de <i>L. minor</i> (%)				Desvio-padrão
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	
CE ₁₀ /2 (3,3 mg.L ⁻¹)	9,4	7,9	9,2	8,8	0,8
CE ₂₀ /2 (13,2 mg.L ⁻¹)	13,6	11,6	13,1	12,8	1,0
CE ₅₀ /2 (31,9 mg.L ⁻¹)	25,0	22,2	24,1	23,8	1,4
CE ₇₀ /2 (48,7 mg.L ⁻¹)	38,5	35,7	37,3	37,2	1,4
CE ₈₀ /2 (63,8 mg.L ⁻¹)	50,8	48,8	50,0	49,9	1,0

Fonte: Da autora.

Os valores medidos de toxicidade de mistura foram, então, comparados com os valores teóricos preditos pelos efeitos de adição de concentração e de ação independente, bem como com os efeitos de ação individual de cada fármaco, conforme mostrado na Tabela 27.

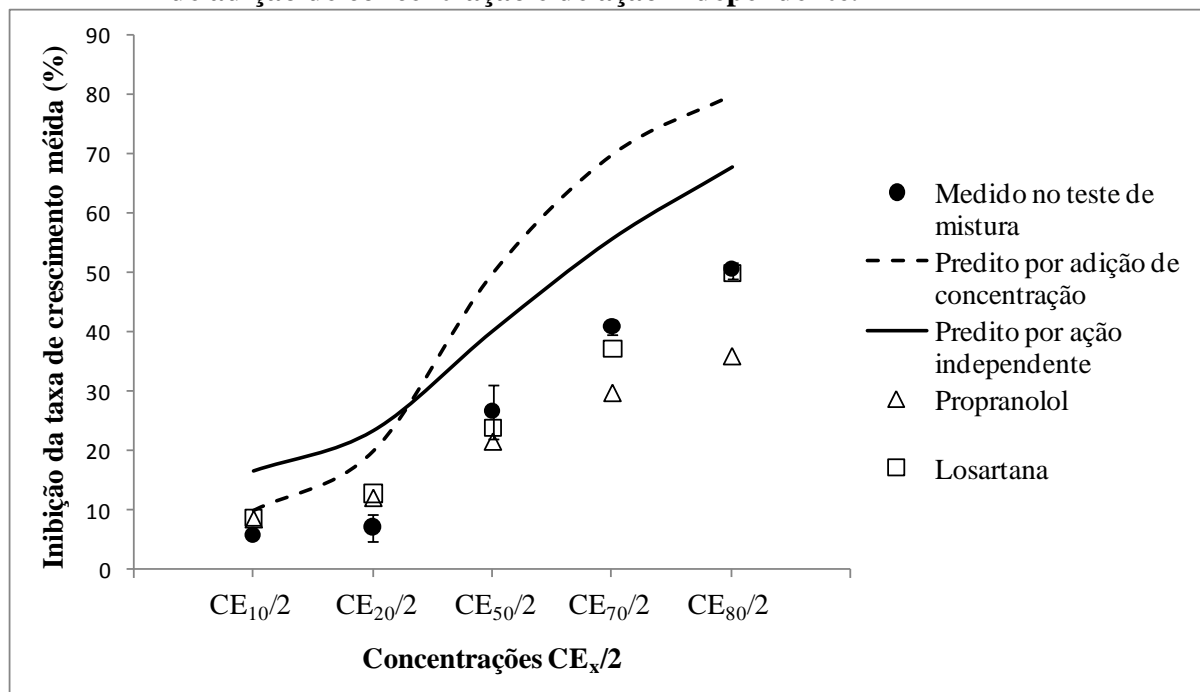
Tabela 27 - Toxicidade da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica para *L. minor*, em comparação com as toxicidades medidas em ação individual e a toxicidade da mistura predita pelos conceitos de adição de concentração e ação independente.

Concentração efetiva	Inibição da taxa de crescimento média de <i>L. minor</i> (%)				
	Medido no teste de mistura	Predito por Adição de concentração)	Predito por Ação independente	Calculado por ação individual (cloridrato propranolol)	Calculado por ação individual (losartana potássica)
CE_{10/2}	5,8	10,0	16,5	8,4	8,8
CE_{20/2}	7,1	20,0	23,3	12,0	12,8
CE_{50/2}	26,6	50,0	40,2	21,5	23,8
CE_{70/2}	40,9	70,0	55,8	29,7	37,2
CE_{80/2}	50,5	80,0	67,9	35,9	49,9

Fonte: Da autora.

Os dados comparativos dos efeitos de toxicidade medida da mistura com os efeitos preditos por adição de concentração e de ação independente, bem como com os efeitos de cada um dos fármacos em ação individual, conforme descritos na Tabela 27, podem ser melhor visualizados no gráfico comparativo mostrado na Figura 20.

Figura 20 - Comparação da toxicidade medida da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica para *L. minor*, em relação às toxicidades em ação individual de cada fármaco e a toxicidade de mistura predita pelos conceitos de adição de concentração e de ação independente.



Fonte: Da autora.

Conforme observado na Figura 20, ambos os modelos de adição de concentração e de ação independente superestimaram, em todos os níveis de concentração testados, os efeitos de toxicidade da mistura dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica no teste com a *L. minor*. Portanto, uma vez que os efeitos de ação combinada dos dois fármacos para *L. minor* foram inferiores do que o predito por ambos os modelos, tais efeitos são chamados de antagonismo. Nota-se, ainda, que os efeitos da mistura mostraram-se bastante próximos aos efeitos de um dos fármacos em ação individual, a losartana potássica.

De acordo com Spurgeon et al. (2010), em casos em que os efeitos de combinação de compostos químicos sofrem desvios de um ou de ambos os modelos de referência aqui citados, como é o caso do que ocorreu no teste de mistura realizado no presente trabalho, ocorrem divergências em relação às suposições matemáticas dos dois modelos de referência. A fim de se compararem os desvios dos efeitos observados da mistura em relação aos preditos pelos modelos de adição de concentração e de ação independente, calcularam-se os valores das proporções residuais de efeito (*effect residual ratio, ERR*), conforme Wang et al. (2010), os quais estão mostrados na Tabela 28.

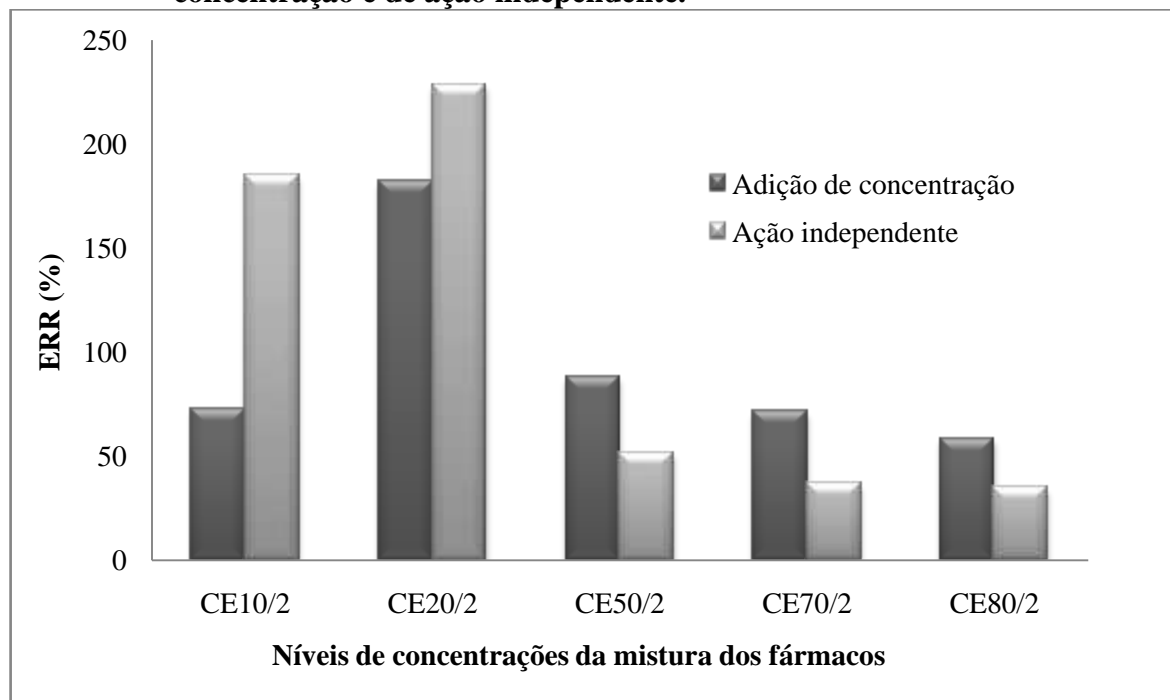
Tabela 28 - Valores de proporções residuais de efeito (% ERR), calculados para os desvios dos efeitos da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica em relação aos valores preditos pelos modelos de adição de concentração e de ação independente.

Nível de concentração	ERR (%) em relação ao modelo de adição de concentração	ERR (%) em relação ao modelo de ação independente
CE ₁₀ /2	72	184
CE ₂₀ /2	182	228
CE ₅₀ /2	88	51
CE ₇₀ /2	71	36
CE ₈₀ /2	58	34

Fonte: Da autora.

A comparação entre os desvios dos efeitos de mistura em relação aos valores preditos pelos modelos de referência pode ser melhor visualizada no gráfico da Figura 21.

Figura 21 - Comparação das proporções residuais de efeito (%ERR) dos desvios dos efeitos da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica sobre *L. minor*, em relação aos efeitos preditos pelos modelos de adição de concentração e de ação independente.



Fonte: Da autora.

De acordo com o observado na Tabela 28 e no gráfico da Figura 21, os desvios dos efeitos da mistura, em comparação com ambos os modelos de referência, foram maiores nas

concentrações inferiores de efeito combinado dos fármacos. Nesses casos, os desvios foram maiores em relação ao modelo de ação independente. Por outro lado, nas concentrações superiores de efeito combinado, os desvios dos efeitos da mistura foram menores e mais próximos dos valores preditos pelo modelo de ação independente. Portanto, fazendo-se um paralelo dos resultados obtidos no teste de mistura do presente trabalho com as afirmações de Spurgeon et al. (2010), a presença de um dos fármacos (a losartana potássica ou o cloridrato de propranolol) modificou a toxicidade do outro na mistura, em diferentes extensões, dependendo da concentração combinada dos fármacos. Assim, a toxicidade da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica sobre a *L. minor* não é a soma das suas toxicidades individuais, como anteriormente visto, além de as probabilidades de resposta entre esses dois fármacos não serem completamente independentes. Deste modo, claramente ocorreram interações entre os fármacos em ação combinada sobre a macrófita e, de acordo com Spurgeon (2010), nenhum dos dois modelos leva em consideração essas possíveis interações, conforme foi confirmado pelos resultados obtidos no teste de mistura realizado no presente trabalho.

Na literatura, encontram-se outros exemplos de casos em que os modelos preditivos de adição de concentração e de ação independente não foram capazes de descrever a toxicidade de ação combinada de compostos químicos, como resultado de interações entre esses. Dentre esses exemplos, encontram-se outros casos de antagonismo, como foi o caso descrito neste trabalho, além de casos de sinergismo e de interações dose (concentração)-dependente. Um exemplo de antagonismo em relação ao modelo de adição de concentração foi relatado por Posthuma et al. (1997) os quais, como resultado da avaliação dos efeitos de toxicidade em ação combinada de cobre e zinco sobre o oligoqueta terrestre *Enchytraeus crypticus*, em testes de concentrações corporais, observaram que os efeitos da mistura desses metais foram menores do que os efeitos preditos por adição de concentração. Também Van Gestel e Hensbergen (1997), ao avaliarem os efeitos de ação combinada de cádmio e zinco sobre o crescimento do artrópode *Folsomia candida*, concluíram que os efeitos dessa mistura foram antagonísticos. Exemplos de efeitos sinérgicos de mistura foram relatados, por exemplo, por Meled, Thrasyvoulou e Belzunces (1998), em testes de ação combinada do inseticida deltametrina com o fungicida plocloraz, em abelhas *Apis mellifera*. Nesse estudo, os dois compostos foram aplicados em doses subletais, quando considerados em ação individual, mas que produziram diferentes taxas de mortalidade ao agirem em ação combinada nas abelhas. Outros exemplos de interações sinérgicas entre compostos químicos foram descritos em testes de sobrevivência e de atividade da acetilcolinesterase no microcrustáceo marinho *Tigriopus*

brevicornis, realizados por Forget et al. (1999), os quais observaram efeitos letais sinérgicos notáveis principalmente para as misturas entre o metal cádmio e o inseticida diclorvos e entre os inseticidas diclorvos e malathion. Efeitos sinérgicos foram também relatados por esses autores na inibição da atividade da acetilcolinesterase em *Tigriopus brevicornis* pelas misturas dos metais e dos inseticidas testados.

Com relação ao efeito de mistura de fármacos, Cleuvers (2003) encontrou efeitos de sinergismo entre a mistura dos anti-inflamatórios diclofenaco e ibuprofeno, em teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*, em que os efeitos da mistura foram superiores aos preditos pelos modelos de adição de concentração e de ação independente, em todos os níveis testados de concentrações combinadas dos fármacos. Efeitos concentração-dependentes de mistura de fármacos foram observados por Cleuvers (2004), em testes agudos realizados com esse mesmo cladóceros. Esse autor testou os efeitos de ação combinada dos anti-inflamatórios diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno e ácido acetilsalicílico e concluiu que nenhum efeito foi observado na imobilidade da *Daphnia magna* nos níveis de concentrações combinadas mais baixos; porém, aos níveis mais elevados de CE₅₀ e de CE₈₀, a toxicidade da mistura foi tão ou mais elevada do que a predita pelo modelo de adição de concentração. Portanto, conforme afirma Spurgeon et al. (2010), as interações entre compostos químicos em mistura são comuns, embora difiram enormemente em magnitude e em significado biológico.

Deste modo, os resultados obtidos no presente trabalho, juntamente com outros relatados na literatura, como os exemplos supracitados, alertam para o fato de que, muito embora os modelos de adição de concentração e de ação independente possam fornecer um embasamento matemático inicial para predizer os efeitos de uma mistura de toxicantes ambientais, os efeitos experimentais a que os organismos estão expostos nos ecossistemas podem ser muito diferentes desses efeitos preditos, o que torna a toxicidade de mistura um desafio contínuo para os regimes regulatórios.

4.4.3 Alterações macroscópicas promovidas pela mistura de fármacos

A ação combinada dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica ocasionou abscisão na estrutura de algumas colônias de *L. minor*, nos níveis de concentração combinada de CE_{70/2} e CE_{80/2}, logo após 48 h de teste com a mistura. No 6º dia de teste, observou-se a adição dos efeitos de padrão irregular de formação das colônias com a necrose

parcial de algumas frondes, no maior nível de concentrações combinadas testado. Tais características intensificaram-se no último dia de teste e passaram a ser visíveis também nos níveis de efeitos combinados de CE₅₀/2 e CE₇₀/2 (FIGURA 22).

Figura 22 - Alterações macroscópicas observadas nas frondes de *L. minor* pela ação combinada dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica, após 7 dias de teste:

A) *L. minor* no controle

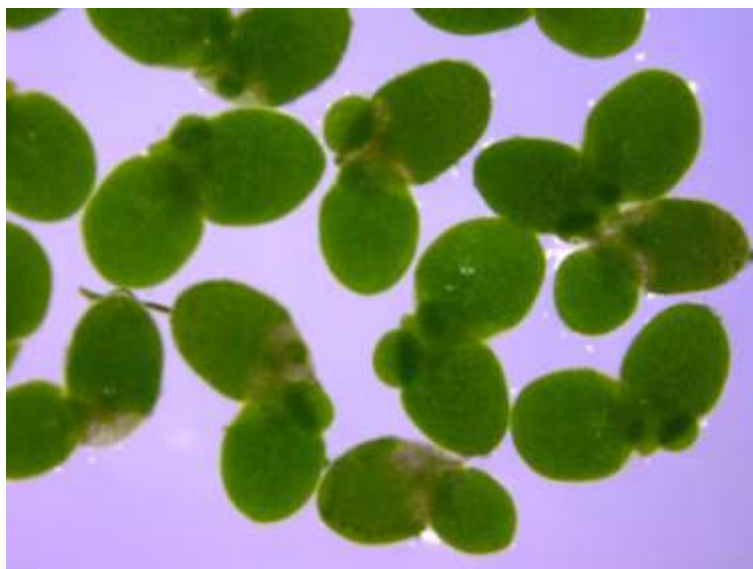
B) *L. minor* no nível de ação combinada de CE₅₀/2 dos fármacos

C) *L. minor* nível de ação combinada de CE₇₀/2 dos fármacos

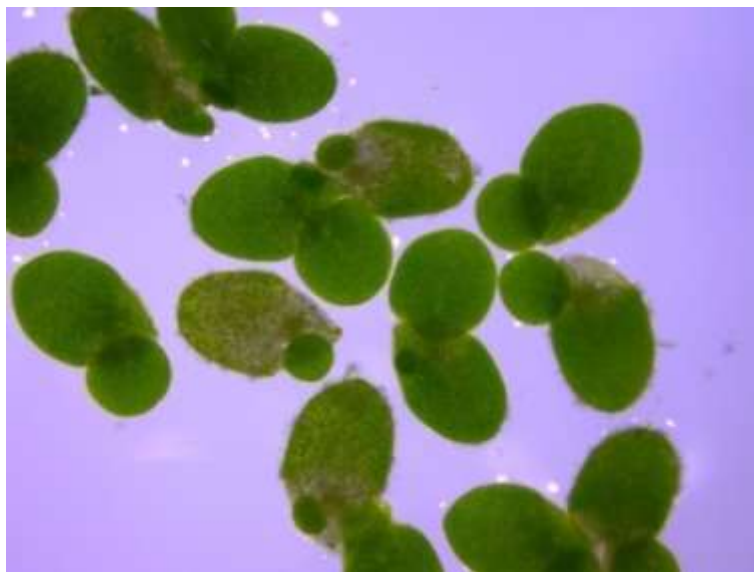
D) *L. minor* nível de ação combinada de CE₈₀/2 dos fármacos



A)



B)



C)



D)

Fonte: Da autora.

Portanto, quanto às alterações macroscópicas promovidas pela ação da mistura de cloridrato de propranolol e losartana potássica, houve uma adição dos efeitos individuais de cada fármaco sobre a *L. minor*.

4.4.4 Valores de pH medidos no teste de mistura

Os valores de pH medidos nas concentrações combinadas dos fármacos, nos dias inicial e final do teste de mistura, bem como a variação de pH (Δ pH) calculada entre esses dias, são mostrados no Tabela 29.

Tabela 29 - Valores de pH e de Δ pH medidos entre os dias inicial e final, nos 3 testes realizados para a avaliação dos efeitos tóxicos da losartana potássica sobre a *L. minor*.

Níveis de concentrações combinadas	pH início	pH fim	Δ pH
Controle	5,45	6,33	0,88
CE ₁₀ /2	5,71	6,40	0,69
CE ₂₀ /2	5,74	6,31	0,57
CE ₅₀ /2	5,78	6,16	0,38
CE ₇₀ /2	5,82	6,10	0,28
CE ₈₀ /2	5,79	6,04	0,25

Fonte: Da autora.

Conforme observado na Tabela 29, o pH não variou mais do que 1,5 unidade durante o teste, em nenhum nível de concentração testado, conforme recomendado pela OECD (2006). Quando se comparam os valores de pH entre os níveis de concentrações combinadas testados, no dia final de teste, observa-se uma redução gradativa de valores com o aumento das concentrações. Isso pode ser devido à menor taxa fotossintética, com menor captação relativa de CO₂, ocasionada pela redução do número de frondes e pelas necroses parciais ocorridas nas macrófitas, com o aumento das concentrações combinadas dos fármacos.

4.5 Derivação de critérios de qualidade da água para proteção das comunidades pelágicas de água doce e salina com relação aos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica

4.5.1 Critérios de qualidade da água para proteção das comunidades pelágicas de água doce e salina com relação ao fármaco cloridrato de propranolol (CAS n° 318-98-9)

Uma vez que existe um conjunto mínimo de dados disponíveis acerca dos efeitos ecotoxicológicos do fármaco cloridrato de propranolol (CAS n° 318-98-9), critérios de qualidade da água foram derivados para a proteção das espécies pelágicas de água doce e

salina com relação a esse fármaco, de acordo com Lepper (2005) e Umbuzeiro et al. (2011). Na Tabela 30, constam os dados adotados para a derivação desse critério.

Tabela 30 - Dados para derivação de critérios de proteção da vida aquática de espécies pelágicas de água doce e salina, com relação aos efeitos do cloridrato de propranolol (CAS nº 318-98-9).

Nível trófico	Ensaio	Espécies	Habitat	Expressão do resultado	Tempo exposição	Valor $\mu\text{g.L}^{-1}$	Referência
Peixes	Crônico	<i>Pimephales promelas</i>	Água doce	CENO	21 dias	10	Giltrow et al. (2009)
Peixes	Crônico	<i>Danio rerio</i>	Água doce	CENO	21 dias	31,8	Madureira et al. (2011)
Peixes	Crônico	<i>Danio rerio</i>	Água doce	CENO	10 dias	2000	Ferrari et al. (2004)
Peixes	Crônico	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Água doce	CENO	40 dias	1000	Owen et al. (2009)
Invertebrados	Crônico	<i>Daphnia magna</i>	Água doce	CENO	9 dias	55	Dzialowski, Turner e Brooks (2006)
Invertebrados	Crônico	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Água doce	CENO	7 dias	9	Ferrari et al. (2004)
Invertebrados	Crônico	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Água doce	CENO	2 dias	1000	Liu et al. (2009)
Invertebrados	Crônico	<i>Brachionus calyciflorus</i>	Água doce	CENO	2 dias	180	Ferrari et al. (2004)
Algas	Crônico	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Água doce	CENO	3 dias	156	Liu et al. (2009)
Algas	Crônico	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Água doce	CENO	4 dias	5000	Ferrari et al. (2004)
Moluscos	Crônico	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Água salina	CENO	10 dias	11	Solé et al. (2010)

Fonte: Da autora.

De acordo com a Tabela 30, uma vez que três CENO para, no mínimo, três espécies representantes de três níveis tróficos estão disponíveis, utilizou-se o fator de avaliação (FA) de 10 a fim de derivar um critério de qualidade para a proteção das comunidades pelágicas de água doce, conforme o seguinte cálculo:

$$CQA = \frac{\text{Valor crônico menor de 3 níveis tróficos}}{10 \text{ FA}} = \frac{9 \mu\text{g/L}}{10} = 0,9 \mu\text{g/L}$$

Salienta-se que o valor determinado para o critério de qualidade da água acima descrito refere-se ao fármaco propranolol na forma do sal cloridrato, de CAS nº 318-98-9. Assim, considera-se que, até a concentração máxima de $0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ desse fármaco, é improvável que ocorram efeitos adversos a espécies pelágicas de ecossistemas de água doce. Um comparativo desse valor com dados de detecção do cloridrato de propranolol em águas superficiais, como de rios e córregos, permite concluir que as maiores concentrações até então quantificadas desse fármaco são, aproximadamente, de 1,5 a 100 vezes menores do que o critério de qualidade aqui calculado (BENDZ et al., 2005; ROBERTS; THOMAS, 2006; HILTON; THOMAS, 2003; TERNES, 1998; GINEBREDA et al. 2010).

Para a derivação de um critério de qualidade da água para a proteção de organismos pelágicos de águas salinas ou salobras, utilizou-se um FA de 50, uma vez que apenas uma CENO de um grupo taxonômico marinho adicional esteve disponível. O critério para águas salinas ou salobras foi então derivado conforme o seguinte cálculo:

$$CQA = \frac{\text{Valor crônico menor de 2 níveis tróficos} + 1 \text{ marinho}}{50 \text{ FA}} = \frac{9 \mu\text{g/L}}{50} = 0,18 \mu\text{g/L}$$

Portanto, é improvável que ocorram efeitos adversos a espécies pelágicas de águas salinas ou salobras até a concentração máxima de $0,18 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cloridrato de propranolol. As maiores concentrações relatadas desse fármaco em águas salinas e salobras são, aproximadamente, de 3 a 10 vezes menores do que o critério de qualidade da água calculado neste trabalho (WILLE et al., 2010; THOMAS; HILTON, 2004). No entanto, muito embora as concentrações residuais individuais desse fármaco em ambientes aquáticos sejam relativamente baixas para causar riscos à biota, deve-se sempre considerar que existe a possibilidade de ocorrerem interações resultantes da ação combinada de fármacos, as quais podem tanto atenuar (antagonismo) quanto potencializar (sinergismo) os efeitos adversos sobre os organismos aquáticos, conforme descrito no presente trabalho.

4.5.2 Critério preliminar de qualidade da água para proteção da comunidade aquática para o fármaco losartana potássica (CAS n. 124750-99-8)

A quantidade de dados ecotoxicológicos acerca dos efeitos do fármaco losartana potássica ainda é escassa e insuficiente para derivar-se um critério de qualidade da água para organismos pelágicos. Portanto, recorreu-se a dados de relações quantitativas estrutura-atividade (RQEA), disponibilizados pelo National Centers for Coastal Ocean Science (NCCOS), um centro de pesquisa do National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), dos Estados Unidos, extraídos de dados de Sanderson et al. (2004), obtidos por meio do programa ECOSAR. Os valores desses dados são mostrados na Tabela 31.

Tabela 31 - Dados ecotoxicológicos para os efeitos do fármaco losartana potássica, obtidos por meio de relações quantitativas estrutura-atividade (RQEA) calculadas pelo ECOSAR.

Nível trófico	Valor predito de CEO (mais baixa concentração de efeito tóxico) $\mu\text{g.L}^{-1}$
Peixe	13.000
Alga	1.817
Dafinídeo	55

Fonte: NCCOS (USA) – The National Centers for Coastal Ocean Science.

Uma vez que os dados da previsão RQEA apresentaram valores mais baixos do que os escassos valores ecotoxicológicos disponíveis na literatura, calculou-se um critério preliminar de qualidade (CPQA) da água doce, conforme Umbuzeiro et al. (2011), previsto por meio do modelo RQEA para peixes, invertebrados e algas, tendo-se dividido o valor mais baixo por um FA de 1000, de acordo com o cálculo a seguir:

$$\text{CPQA} = \frac{\text{Menor valor RQEA de 3 níveis tróficos}}{1000 \text{ FA}} = \frac{55 \mu\text{g/L}}{1000} = 0,055 \mu\text{g/L}$$

Para o cálculo de um critério preliminar de qualidade da água para a proteção das espécies marinhas, o menor valor predito por RQEA foi dividido por um FA de 10.000 (UMBUZEIRO et al., 2011), conforme o seguinte cálculo:

$$\text{CPQA} = \frac{\text{Menor valor RQEA de 3 níveis tróficos}}{10.000 \text{ FA}} = \frac{55 \mu\text{g/L}}{10.000} = 0,0055 \mu\text{g/L}$$

Portanto, de acordo com os resultados obtidos para os cálculos de critérios preliminares de qualidade da água para o fármaco losartana potássica, considera-se que, até as concentrações máximas de 0,055 e de 0,0055 $\mu\text{g.L}^{-1}$ desse fármaco, é improvável que ocorram efeitos adversos aos organismos de água doce e marinhos, respectivamente. Contudo, salienta-se que esses são dados preliminares e, portanto, testes ecotoxicológicos adicionais, sobretudo crônicos, como os realizados no presente trabalho, são necessários para a derivação de critérios definitivos de qualidade da água para a proteção da comunidade aquática contra os possíveis efeitos adversos ocasionados por esse fármaco.

5 CONCLUSÕES

Com relação aos testes de sensibilidade, os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o cloreto de sódio mostrou-se uma substância de referência adequada para testes com o organismo *L. minor*, dada a consistência satisfatória de respostas da macrófita a esse sal, verificada por meio do relativamente baixo valor de coeficiente de variação entre os testes. Além disso, o uso do NaCl apresenta como vantagens a sua toxicidade relativamente baixa, o que acarreta uma maior facilidade no descarte dos resíduos gerados durante os testes ecotoxicológicos.

Com relação aos resultados obtidos na avaliação ecotoxicológica do fármaco cloridrato de propranolol com a *L. minor*, verificou-se que essa macrófita mostrou-se menos sensível aos efeitos desse fármaco em comparação com outros organismos-teste. Ainda assim, os resultados obtidos na avaliação do parâmetro área foliar total para essa macrófita permitem classificar o cloridrato de propranolol como uma substância perigosa para o ambiente aquático, com relação aos seus efeitos de toxicidade aguda.

A comparação entre os resultados de concentração efetiva mediana, obtidos entre os 3 parâmetros avaliados nos testes com o cloridrato de propranolol, permitiu concluir que a sensibilidade entre estes pode diferir significativamente, dependendo da substância avaliada. No caso do cloridrato de propranolol, a área foliar total mostrou-se ser o parâmetro mais sensível aos efeitos de toxicidade desse fármaco, o que confirma a necessidade de se avaliar pelo menos um outro parâmetro além do número de frondes em testes de inibição do crescimento de *L. minor*.

Os resultados obtidos nos testes com a losartana potássica mostraram que a *L. minor* foi mais sensível aos efeitos desse fármaco do que outros organismos-teste já avaliados. Portanto, uma vez que a sensibilidade aos compostos químicos pode diferir muito entre animais e plantas e mesmo entre algas e plantas superiores, a realização de testes com *L. minor* torna-se muito útil e adicional na avaliação do impacto de contaminantes ambientais.

A avaliação das alterações macroscópicas observadas no desenvolvimento das plantas mostrou que, muito embora ambos os fármacos tenham promovido inibições na taxa de crescimento de *L. minor*, as ações tóxicas provocadas por eles nas plantas diferiram qualitativamente entre si, o que pode ser indicativo de efeitos provocados por meio de diferentes mecanismos de ação sobre a planta.

Ambos os modelos de adição de concentração e de ação independente, os quais são usualmente utilizados para a predição da toxicidade de misturas, superestimaram os efeitos da ação combinada dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica sobre *L. minor*. Portanto, ocorreram interações antagonísticas entre esses dois fármacos nos efeitos sobre a macrófita. Uma vez que esses modelos preditivos não levam em consideração as possíveis interações entre compostos químicos em uma mistura, resultados como os observados no presente trabalho, juntamente com outros relatados na literatura, mostraram que a aplicabilidade desses modelos para a previsão de riscos ambientais de misturas reais é limitada. No entanto, testar cada possível combinação de compostos químicos, presentes em misturas ambientalmente relevantes, é impraticável, o que gera a necessidade de desenvolverem-se modelos compreensíveis e capazes de prever a toxicidade de misturas de forma mais acurada e realística, principalmente para espécies de organismos cujos processos fisiológicos envolvidos na resposta a toxicantes são ainda pouco investigados (MARTIN et al., 2009). Nesse sentido, uma possível alternativa para o propósito de se desenvolver uma base para a avaliação ambiental do risco de misturas, apontada por Martin et al. (2009), consistiria na geração de um extenso conjunto de dados de estudos de misturas, perfazendo a superfície de concentrações-respostas como um todo, de forma que os dados assim gerados pudessem ser usados para avaliar as probabilidades e magnitudes de desvios dos modelos preditivos existentes. Portanto, os dados gerados na presente pesquisa contribuem, ainda que de forma incipiente, para a geração desse conjunto de dados requeridos para a predição de efeitos de ação combinada de contaminantes ambientais, principalmente sobre organismos-teste ainda pouco utilizados em avaliações ecotoxicológicas, que são as macrófitas aquáticas.

Por fim, conclui-se que a realização de testes ecotoxicológicos com outros fármacos e por meio de outras espécies de organismos-teste, além dos utilizados no presente trabalho, torna-se necessária a fim de que se possam calcular critérios de qualidade da água que visem a nortear o estabelecimento de padrões e ou de regulamentações para a preservação da biota aquática dos efeitos adversos causados por esses contaminantes.

REFERÊNCIAS

ALIFERIS, K. A. et al. *Lemna minor* L. as a model organism for ecotoxicological studies performing ¹ H NMR fingerprinting. **Chemosphere**, v. 76, p. 967-973, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653509004792>>. Acesso em: 11 out. 2012.

ALMEIDA, G.A.; WEBER, R.R. Fármacos na Represa Billings. **Revista Saúde e Ambiente/ Health and Environment Journal**, v.6, n.2, p.7-13, 2005. Disponível em: <<http://periodicos.univille.br/index.php/RSA/article/viewFile/72/115>>. Acesso em: 19 abr. 2014.

ALTENBURGER, R. et al. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n.9, p. 2341-2347, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620190926/pdf>>. Acesso em: 01 maio 2014.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática-princípios e aplicações**. 2 ed. São Carlos: RiMa, 2008. p. 117-152.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15287**: Informação e documentação : Projeto de pesquisa: Apresentação. 2 ed. Rio de Janeiro, 2011.

ATKINS, P.W.; JONES, L. **Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3 ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 965p.

ATSDR- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY –USA. **Public Health Assessment guidance manual (update)**. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service, Atlanta, Georgia, jan. 2005. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/hac/PHAManual/PDFs/PHAGM_final1-27-05.pdf>. Acesso em: 03 maio 2014.

AUER, C.M.; NABHOLZ, J.V.; BAETCKE, K.P. Mode of action and the assessment of chemical hazards in the presence of limited data: use of structure-activity relationships (SAR) under TSCA, section 5. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 183-197, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1567831/pdf/envhper00420-0174.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2014.

AXTELL, N.R.; STERNBERG, S.P.K.; CLAUSSEN, K. Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 41-48, 2003. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0960852403000348/1-s2.0-S0960852403000348-main.pdf?_tid=2de4cc10-d1f0-11e3-91c4-00000aab0f26&acdnat=1399031704_788974a83fecefc4b9a4bce5981945ab>. Acesso em: 02 maio 2014.

BACKHAUS, T.; SCHOLZE, M.; GRIMME, L.H. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. **Aquatic Toxicology**, v. 49, p. 49-61, 2000. Disponível em: <<http://ac.els-cdn.com/S0166445X99000697/1-s2.0->

S0166445X99000697-main.pdf?_tid=589fcde4-cd6b-11e3-92cb-00000aacb360&acdnat=1398534848_014f1d2eb08a0f1d70c8ec7cc35a832e>. Acesso em: 01 maio 2014.

BENDZ, D. et al. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, p. 195-204, 2005. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0304389405000907/1-s2.0-S0304389405000907-main.pdf?_tid=d4cb676c-1bcb-11e4-974b-00000aacb362&acdnat=1407152479_facf974c280246010e2be6478e9795f3>. Acesso em: 15 mar. 2013.

BERENBAUM, M. C. The expected effect of a combination of agents: the general solution. **Journal of Theoretical Biology**, v. 114, p. 413-431, 1985. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0022519385801764/1-s2.0-S0022519385801764-main.pdf?_tid=9417c838-1bca-11e4-9c21-00000aab0f6c&acdnat=1407151941_758b67842da780f77744d7b9d92ffa0b>. Acesso em: 30 abr. 2013.

BIALK-BIELINSKA, A. et al. Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. **Chemosphere**, v. 85, p. 928-933, 2011. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0045653511007156/1-s2.0-S0045653511007156-main.pdf?_tid=f4015f74-ca27-11e3-ba0c-00000aacb35d&acdnat=1398176049_0abbcb5d9038771fa9921bde8e7e6e4b>. Acesso em: 22 abr. 2014.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26. n. 4, p. 523-530, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v26n4/16435.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2014.

BOUISSOU-SCHURTZ, C. et al. Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** (2014). No prelo. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0273230014000695/1-s2.0-S0273230014000695-main.pdf?_tid=03a03c64-f96e-11e3-bac1-00000aab0f02&acdnat=1403373845_596e56691caa5fad0d557754d84edf29>. Acesso em: 21 jun. 2014.

BOUND, J.P.; KITSOU, K.; VOULVOULIS, N. Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 301-307, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138266890500178X/pdf?md5=a1003b3221590337e8433c4e580c78f9&pid=1-s2.0-S138266890500178X-main.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário Terapêutico Nacional 2008. Rename 2006**. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2008. 897p. Disponível em: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/formulario_terapeutico_nacional_2008.pdf. Acesso em: 05 maio 2014.

BRASIL. Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA- n. 357, de 17 de março de 2005a. Publicada no DOU n. 053, de 18 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. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2014.

BRASIL. Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA- n. 358, de 29 de abril de 2005b. Publicada no DOU n.84 de 4 de maio de 2005. **Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências.** Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/legislacao/CONAMA_RES_CONS_2005_358.pdf. Acesso em: 14 ago. 2013.

BRASIL. Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA- n. 430, de 13 de maio de 2011. Publicada no DOU n. 92, de 16 de maio de 2011. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n. 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.** Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 17 set. 2013.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n. 44, de 17 de agosto de 2009. **Dispõe sobre Boas Práticas Farmacêuticas para o controle sanitário do funcionamento, da dispensação e da comercialização de produtos e da prestação de serviços farmacêuticos em farmácias e drogarias e dá outras providências.** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4f6b6a80474575cf83b9d73fbc4c6735/180809_dc_44.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 14 ago. 2013.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n. 306, de 07 de dezembro de 2004. Publicada no DOU de 10 de dezembro de 2004. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ebe26a00474597429fb5df3fbc4c6735/RDC_306.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 14 ago. 2013.

BROOKS, B.W. et al. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 169-183, 2003. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S0378427403000663/1-s2.0-S0378427403000663-main.pdf?_tid=3a5dc996-ca26-11e3-9aeb-00000aacb360&acdnat=1398175308_33b70fcd0665efe77c9b98adcdcc48c4. Acesso em: 22 abr. 2014.

BUXTON, I.L.O.; BENET, L.Z. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição, ação e eliminação dos fármacos. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. (Org.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. McGrawHill, 2012, p. 17- 40.

CARDOSO, O.; PORCHER, J.M.; SANCHEZ, W. Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: Review of evidence and need for knowledge. **Chemosphere** (2014). No prelo. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S0045653514002057/1-s2.0-S0045653514002057-main.pdf?_tid=a009dc7a-cec3-11e3-b172-00000aacb362&acdnat=1398682715_e51721b3ec0e8e67cc6e7855e682fb63. Acesso em: 30 abr. 2014.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**. Tradução de Raul de Polillo. 2. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1969.

CARVALHO, E.V. et al. Aspectos legais e toxicológicos do descarte de medicamentos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 22, n. 1-2, p.1-8, 2009. Disponível em: <<http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/lilacs/revbrastoxicol/2009v22n1-2/revbrastoxico2009v22n1-2p1-8.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2013.

CASTRO, A.A.A.S. **Avaliação ecotoxicológica de efluentes industriais utilizando *Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822 (TELEOSTEI, CYPRINIDAE)**. 2008. 64 f. Dissertação (mestrado) - Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal, Rio Grande do Norte, 2008. Disponível em: <<http://www.sigaa.ufrn.br/sigaa/verProducao?idProducao=594830&key=3208d8ff5ceec3bd84fd99f05fdb3151>>. Acesso em: 06 maio 2014.

CASTRO, F.J. et al. Avaliação da toxicidade do fármaco cloridrato de fluoxetina sobre o organismo *Daphnia similis*. **Revista Ceciliana**, v. 1, n.2, p. 155-160, 2009. Disponível em: <http://sites.unisanta.br/revistaceciliana/edicao_02/2-2009-155-160.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2014.

CEDERGREEN, N. et al. Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 149-156, 2007a. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/06-196R.1/pdf>>. Acesso em: 10 maio 2014.

CEDERGREEN, N. et al. Is mixture toxicity measured on a biomarker indicative of what happens on a population level? A study with *Lemna minor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, p. 323-332, 2007b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651306002600>>. Acesso em: 26 abr. 2014.

CEDERGREEN, N.; STREIBIG, J.C. Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n.7, p.1676-1683, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/04-362R.1/pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2014.

CLAESSENS, M. et al. Emerging contaminants in Belgian marine waters: Single toxicant and mixture risks of pharmaceuticals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 71, p. 41-50, 2013. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0025326X13001811/1-s2.0-S0025326X13001811-main.pdf?_tid=507a8986-ca25-11e3-8fb5-00000aacb361&acdnat=1398174921_ac0da53f95dac9e3a203125da42e0f28>. Acesso em: 22 abr. 2014.

CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 185-194, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427403000687>>. Acesso em: 11 out. 2012.

CLEUVERS, M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, p. 309-315, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651303001416>>. Acesso em: 21 abr. 2014.

CLEUVERS, M. Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment. **Chemosphere**, v. 59, p.199-205, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653504011981>>. Acesso em: 14 ago. 2012.

COELHO, K.S. **Estudos ecotoxicológicos com ênfase na avaliação da toxicidade de surfactantes aniônicos aos cladóceros *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii***. 2008. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008. Disponível em: <http://www.bdt.d.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2096>. Acesso em 06 maio 2014.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) n. 1488/94 on risk assessment for existing substances – Part II: Environmental Risk Assessment**. Luxembourg: Office for official publications of the European Communities, 1996. Disponível em: <<http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/kornybio/elm/EuTGD/7%20FEJEZET.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2014.

COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DE SÃO PAULO - SABESP. **Biossólido**. Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=60>>. Acesso em: 27 abr. 2014.

VAN GESTEL, C.A.M.; HENSBERGEN, P.J. Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 1177-1186, 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620160612/pdf>>. Acesso em: 02 maio 2014.

DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health and Perspectives**, v. 107, supplement 6, p. 907-938, 1999. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br.ez37.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_tim=2014-04-28T07%3A56%3A42IST&url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&rft_id=info:sid/primo.exlibrisgroup.com:primo3-Article-medline&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&rft.genre=article&rft.atitle=Pharmaceuticals%20and%20personal%20care%20products%20in%20the%20environment:%20agents%20of%20subtle%20change%3F&rft.jtitle=Environmental%20health%20perspectives&rft.btitle=&rft.aulast=Daughton&rft.auinit=&rft.auinit1=&rft.auinitm=&rft.ausuffix=&rft.au=Daughton%2C%20C%20G&rft.aucorp=&rft.date=199912&rft.volume=107&rft.issue=&rft.part=&rft.quarter=&rft.ssn=&rft.space=907&rft.epage=&rft.pages=907-38&rft.artnum=&rft.issn=0091-6765&rft.eissn=&rft.isbn=&rft.sici=&rft.coden=&rft_id=info:doi/&rft.object_id=&svc_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&rft.eisbn=&rft_dat=%3Cmedline%3E10592150%3C/medline%3E&rft_id=info:oai/&svc.fulltext=yes&gathStatIcon=true>. Acesso em: 30 abr. 2014.

DZIALOWSKI, E.M.; TURNER, P.K.; BROOKS, B.W. Physiological and reproductive effects of beta adrenergic receptor antagonists in *Daphnia magna*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p. 503- 510, 2006. Disponível em: <

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**. Report EPS 1/RM/12. 1990, 85 p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. Ecotox Database: provides single chemical toxicity information for aquatic and terrestrial life. USA. Disponível em: <<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

EUROPEAN COMMUNITIES – Institute for Health and Consumer Protection. **Technical guidance document on risk assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances; Commission regulation (EC) n. 1488/94 on risk assessment for existing substances; Directive 98/8/EC of the European parliament and of the council concerning the placing of biocidal products on the market – Part II**. European Communities, Italy, 2003. Disponível em: <http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/public-health/risk_assessment_of_Biocides/doc/tgd/tgdpart2_2ed.pdf>. Acesso em: 10 maio 2014.

FARMACOPEIA BRASILEIRA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz. v. 2 Brasília: Anvisa, 2010. 5 ed, 836p.

FAUST, M. et al. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. **Aquatic Toxicology**, v. 63, p. 43-63, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X02001339>>. Acesso em: 26 abr. 2014.

FENT, K; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 122-159, 2006. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0166445X05003267/1-s2.0-S0166445X05003267-main.pdf?_tid=2fa3a488-13d1-11e2-83f2-00000aacb362&acdnat=1349980174_71b6da51e59c680e0ad1c80836aa7c28>. Acesso em: 11 out. 2012.

FERRARI, B. et al. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1344-1354, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/03-246/pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2014.

FICK, J. et al. Contamination of surface, ground and drinking water from pharmaceutical production. **Environment Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2522-2527, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/09-073.1/pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

FLAHERTY, C.M.; DODSON, S.I. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth and reproduction. **Chemosphere**, v. 61, p. 200-207, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565350500295X>>. Acesso em: 27 abr. 2014.

FORGET, J. et al. Joint action of pollutant combinations (pesticides and metals) on survival (LC50 values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 912-918, 1999. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620180514/pdf>>. Acesso em: 02 maio 2014.

FRAM, M.S.; BELITZ, K. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 3409-3417, 2011. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0048969711005778/1-s2.0-S0048969711005778-main.pdf?_tid=a80ca788-d07e-11e3-9930-00000aabb0f01&acdnat=1398872995_5b4858f5dc60423eb4e4656363673909>. Acesso em: 30 abr. 2014.

FRAYSSE, B.; GARRIC, J. Prediction and experimental validation of acute toxicity of β -blockers in *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p. 2470-2476, 2005. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/ez37.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_tim=2014-04-16T08%3A27%3A12IST&url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&rft_id=info:sid/primo.exlibrisgroup.com:primo3-Article-wos&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:&rft.genre=article&rft.atitle=Prediction%20and%20experimental%20validation%20of%20acute%20toxicity%20of%20beta-blockers%20in%20Ceriodaphnia%20dubia&rft.jtitle=ENVIRONMENTAL%20TOXICOLOGY%20AND%20CHEMISTRY&rft.btitle=&rft.aulast=Fraysse&rft.auinit=&rft.auinit1=&rft.auinitm=&rft.ausuffix=&rft.au=Fraysse%20B&rft.aucorp=&rft.date=200510&rft.volum e=24&rft.issue=10&rft.part=&rft.quarter=&rft.ssn=&rft.space=2470&rft.epage=2476&rft.p ages=&rft.artnum=&rft.issn=0730-7268&rft.eissn=&rft.isbn=&rft.sici=&rft.coden=&rft_id=info:doi/&rft.object_id=&svc_val_f mt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&rft.eisbn=&rft_dat=%3Cwos%3E000232264400009%3C/ wos%3E&rft_id=info:oai/&svc.fulltext=yes&gathStatIcon=true>. Acesso em: 16 abr. 2014.

FRAYSSE, B.; MONS, R.; GARRIC, J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.63, p. 253-267, 2006. Disponível em:

<http://ac.els-cdn.com/S0147651304001903/1-s2.0-S0147651304001903-main.pdf?_tid=a2042a7e-c565-11e3-9aa4-00000aab0f6b&acdnat=1397652785_6f6977586d670438483951040c8a1065>. Acesso em: 16 abr. 2014.

FRIAS, M.C. Uso de genéricos contra hipertensão cresce 190%. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 09 ago. 2013. Disponível em:

<<http://www1.folha.uol.com.br/colunas/mercadoaberto/2013/08/1323813-uso-de-genericos-contra-hipertensao-cresce-190.shtml>>. Acesso em: 20 set. 2013.

GIL, E.S.; MATHIAS, R.O. Classificação e riscos associados aos resíduos químico-farmacêuticos. **Revista eletrônica de farmácia**, v.2, p.87-93, 2005. Disponível em: <www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/download/1954/1887>. Acesso em: 11 out. 2012.

GILTROW, E. et al. Chronic effects assessment and plasma concentrations of the β - blocker propranolol in fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Aquatic Toxicology**, v. 95, p. 195-202, 2009. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0166445X0900304X/1-s2.0-S0166445X0900304X-main.pdf?_tid=efc6246e-c566-11e3-88d2-00000aacb35f&acdnat=1397653345_e2b717c793bf04206a236ee2bf751c9b>. Acesso em: 16 abr. 2014.

GINEBREDA, A. et al. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). **Environment International**, v. 36 , p. 153-162, 2010. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0160412009002098/1-s2.0-S0160412009002098-main.pdf?_tid=26108058-13e0-11e2-8141-00000aab0f01&acdnat=1349986600_6eb921e9d21ea598e165909a361d5ab8>. Acesso em: 09 set. 2012.

GÓMEZ, M.J. et al. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, p. 224-233, 2006. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0021967306003633/1-s2.0-S0021967306003633-main.pdf?_tid=823d0888-13e0-11e2-a087-00000aacb35d&acdnat=1349986755_1837b90a59ac2d152e4f9a7f7bdfa744>. Acesso em: 04 out. 2012.

GONSALVES, A.A. et al. Contextualizando reações ácido-base de acordo com a teoria protônica de Brønsted-Lowry usando comprimidos de propranolol e nimesulida. **Química Nova**. No prelo. Publicado na web em 14 mai. 2013. Disponível em: <<http://quimicanova.sbq.org.br/qn/No%20Prelo/ED/ED12821.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2013.

GOODMAN & GILMAN: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006, 1821p.

GRECO, W.R.; BRAVO, G.; PARSONS, J.C. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 2, p. 331-385, 1995.

Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/47/2/331.full.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2014.

GUIMARÃES, L.L. et al. Determinação de fármacos na área de influência do emissário submarino de Santos-SP. In: **Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, 12., 2012, Porto de Galinhas-PE. Disponível em: <http://www.infoteca.inf.br/ecotox/smarty/templates/arquivos_template/upload_arquivos/acer vo/docs/199.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2014.

HALLING-SØRENSEN, B. et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. **Chemosphere**, v. 36, n.2, p. 357-393, 1998. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0045653597003548/1-s2.0-S0045653597003548-main.pdf?_tid=1c3c55c0-cec4-11e3-8704-00000aab0f26&acdnat=1398682923_ccba4d9351f2b78542eb3c4d4ecb9fa6>. Acesso em: 28 abr. 2014.

HEBERER, T. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment : a review of recent research data. **Toxicology Letters**, v. 131, p. 5-17, 2002. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0378427402000413/1-s2.0-S0378427402000413-main.pdf?_tid=b39249f4-cec2-11e3-a14f-00000aacb35f&acdnat=1398682318_0a02c4e03045cdca79938e60ba1d5f31>. Acesso em: 28 abr. 2014.

HILLMAN, W.S. The Lemnaceae or Duckweeds – A review of the descriptive and experimental literature. **The Botanical Review**, v. 27, p. 221-287, 1961. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/ez37.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_tim=2014-05-02T14%3A36%3A02IST&url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&rft_id=info:sid/primoxlibrisgroup.com:primox3-Article-springer_jour&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:article&rft.genre=article&rft.atitle=The%20Lemna%20ceae%20or%20duckweeds&rft.jtitle=The%20Botanical%20Review&rft.btitle=&rft.aula st=Hillman&rft.auinit=&rft.auinit1=&rft.auinitm=&rft.ausuffix=&rft.au=Hillman%20William&rft.aucorp=&rft.date=196104&rft.volume=27&rft.issue=2&rft.part=&rft.quarter=&rft.ssn=&rft.spage=221&rft.epage=287&rft.pages=&rft.artnum=&rft.issn=0006-8101&rft.eissn=1874-9372&rft.isbn=&rft.sici=&rft.coden=&rft_id=info:doi/10.1007/BF02860083&rft.object_id=&svc_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&rft.eisbn=&rft_dat=%3Cspringer_jour%3E10.1007/BF02860083%3C/springer_jour%3E&rft_id=info:oai/&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 02 maio 2014.

HILTON, M.J.; THOMAS, K.V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 129-141, 2003. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0021967303012135/1-s2.0-S0021967303012135-main.pdf?_tid=202952ae-13e1-11e2-ba1a-00000aab0f02&acdnat=1349987021_6170378c9db18acfa6e577adb2856170>. Acesso em: 04 out. 2012.

HOHENBLUM, P. et al. Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. **Science of the Total Environment**, v. 333, p. 185-193, 2004. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0048969704003420/1-s2.0-S0048969704003420-main.pdf?_tid=66802192-d07d-11e3-94cd-00000aab0f6b&acdnat=1398872456_39fc3247a145f929d2c22df9e51cb09a>. Acesso em: 30 abr. 2014.

HUGGETT, D.B. et al. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-Blockers) on aquatic organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 43, p. 229-235, 2002. Disponível em: <[HUGGETT, D.B. et al. Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in United States wastewater effluent. **Environmental pollution**, v. 121, p. 199-205, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749102002269>>. Acesso em: 11 out. 2012.](http://link.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_tim=2014-06-15T13%3A20%3A47IST&url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&rft_id=info:sid/primo.exlibrisgroup.com:primo3-Article-wos&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:&rft.genre=article&rft.atitle=Toxicity%20of%20select%20beta%20adrenergic%20receptor-blocking%20pharmaceuticals%20(B-blockers)%20on%20aquatic%20organisms&rft.jtitle=ARCHIVES%20OF%20ENVIRONMENTAL%20CONTAMINATION%20AND%20TOXICOLOGY&rft.btitle=&rft.aulast=Huggett&rft.auinit=&rft.auinit1=&rft.auinitm=&rft.ausuffix=&rft.au=Huggett%2C%20DB&rft.aucorp=&rft.date=200208&rft.volume=43&rft.issue=2&rft.part=&rft.quarter=&rft.ssn=&rft.spage=229&rft.epage=235&rft.pages=&rft.artnum=&rft.issn=0090-4341&rft.eissn=1432-0703&rft.isbn=&rft.sici=&rft.coden=&rft_id=info:doi/10.1007/s00244-002-1182-7&rft.object_id=&svc_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&rft.eisbn=&rft_dat=%3Cwos%3E000176923800012%3C/wos%3E&rft_id=info:oai/&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 04 out. 2012.</p>
</div>
<div data-bbox=)

JACOBSEN, T. Acute toxicity of 16 water-soluble chemicals to the Fungus *Geotrichum candidum* measured by reduction in glucose uptake. **Toxicology in Vitro**, v. 9, p. 169-173, 1995. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/088723339400208C/1-s2.0-088723339400208C-main.pdf?_tid=4aa5da56-c561-11e3-addc-00000aab0f27&acdnat=1397650920_30fd4f33327e92f86fdf7a0760642888>. Acesso em: 16 abr. 2014.

JALALIZADEH, H. et al. A high-performance liquid chromatography assay for the determination of losartan in plasma. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v. 2, n.1, p. 18-21, 2003. Disponível em: <<http://www.bioline.org.br/pdf?pt03004>>. Acesso em: 05 maio 2014.

JONES, O.A.H.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J.N. Partitioning behavior of five pharmaceutical compounds to activated sludge and river sediment. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, p. 297-305, 2006. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/7440162_Partitioning_behavior_of_five_pharmaceutical_compounds_to_activated_sludge_and_river_sediment>. Acesso em: 02 maio 2014.

KASPRZYK-HORDERN, B. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 4466-4503, 2010. Disponível em: <[KAZA, M.; NALECZ-JAWECKI, G.; SAWICKI, J. The toxicity of selected pharmaceuticals to the aquatic plant *Lemna minor*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 16, p. 524-531, 2007. Disponível em: <\[http://www.psp-parlar.de/pdf/F_26_251_OriginalPaper_pp524_531.pdf\]\(http://www.psp-parlar.de/pdf/F_26_251_OriginalPaper_pp524_531.pdf\)>. Acesso em: 14 abr. 2014.](http://link.periodicos.capes.gov.br/sfx1cl41?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_tim=2014-05-01T16%3A38%3A33IST&url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&rft_id=info:sid/primo.exlibrisgroup.com:primo3-Article-wos&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:&rft.genre=unknown&rft.atitle=Pharmacologically%20active%20compounds%20in%20the%20environment%20and%20their%20chirality&rft.jtitle=CHEMICAL%20SOCIETY%20REVIEWS&rft.btitle=&rft.aulast=Kasprzyk-Hordern&rft.auinitl=&rft.auinit1=&rft.auinitm=&rft.ausuffix=&rft.au=Kasprzyk-Hordern%2C%20B&rft.aucorp=&rft.date=2010&rft.volume=39&rft.issue=11&rft.part=&rft.quarter=&rft.ssn=&rft.spage=4466&rft.epage=4503&rft.pages=&rft.artnum=&rft.issn=0306-0012&rft.eissn=&rft.isbn=&rft.sici=&rft.coden=&rft_id=info:doi/10.1039/c000408c&rft.object_id=&svc_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&rft.eisbn=&rft_dat=%3Cwos%3E000283141300031%3C/wos%3E&rft_id=info:oai/&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 16 abr. 2014.</p>
</div>
<div data-bbox=)

LARSSON, D.G.J.; PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, p. 751-755, 2007. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0304389407009909/1-s2.0-S0304389407009909-main.pdf?_tid=19d5dd5a-13e6-11e2-9fd1-00000aab0f6c&acdnat=1349989157_c08e973f0c560e609759fadb6914f9a2>. Acesso em: 10 out. 2012.

LE CORRE, K.S. et al. Consumption-based approach for assessing the contribution of hospitals towards the load of pharmaceutical residues in municipal wastewater. **Environment International**, v. 45, p. 99-111, 2012. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0160412012000591/1-s2.0-S0160412012000591-main.pdf?_tid=e2905be6-cec3-11e3-a818-00000aacb35d&acdnat=1398682826_85bf879e0606c29a4cb8ec71e6663ea1>. Acesso em: 16 abr. 2014.

LEAL, G.S.S. Projeto piloto do CRF/MG, ANVISA, Feam e Governo de Minas estimula o descarte correto de medicamentos domiciliares: ausência de regulamentação favorece descarte incorreto: depoimento. [novembro-dezembro, 2012]. Belo Horizonte: **Revista do Conselho Regional de Farmácia do Estado de Minas Gerais n°32**.

LEPPER, P. Manual on the methodological framework to derive environmental quality standards for priority substances in accordance with article 16 of the water framework directive (2000/60/EC). **Fraunhofer-Institute Molecular Biology and Applied Ecology, Schmallenberg, Germany**. 2005. Disponível em: <http://www.helpdeskwater.nl/onderwerpen/wetgeving-beleid/kaderrichtlijn-water/publicaties-krw/publicaties-europees/item_27240/@6240/manual_environmental/>. Acesso em: 18 abr. 2014.

LEWIS, M.A. Algae and vascular plant tests. In: RAND, G.M. (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology- Effects, environmental fate and risk assessment**. 2 ed. CRC Press, 1995. p. 135-169.

LI, W.C. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. **Environmental Pollution**, v. 187, p. 193-201, 2014. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0269749114000219/1-s2.0-S0269749114000219-main.pdf?_tid=1753d3d2-cec2-11e3-a22e-00000aab0f02&acdnat=1398682056_b1d259565b1f89b2a6443048c0d46eb5>. Acesso em: 30 abr. 2014.

LILIUS, H; ISOMAA, B.; HOLMSTRÖM, T. A comparison of the toxicity of 50 reference chemicals to freshly isolated rainbow trout hepatocytes and *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 30, p. 47-60, 1994. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/0166445X94900051/1-s2.0-0166445X94900051-main.pdf?_tid=2dcf4e8c-c55f-11e3-a5ba-00000aacb35d&acdnat=1397650013_7fe87882c8400ec131b824854fcd9c58>. Acesso em: 16 abr. 2014.

LIU, Q.T. et al. Comparative aquatic toxicity of propranolol and its photodegraded mixtures: algae and rotifer screening. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, p. 2622-2631, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/09-071.1/pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2014.

MADUREIRA, T.V. et al. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): Assessing impacts on gonadal maturation with a histopathological and stereological study of zebrafish ovary and testis after sub-acute exposures. **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 292-299, 2011. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com.ez37.periodicos.capes.gov.br/S0166445X1100186X/1-s2.0-S0166445X1100186X-main.pdf?_tid=e7569ef4-c56f-11e3-b3d4-00000aab0f02&acdnat=1397657196_f0733159fd5a3f8c5e8924a94098948f>. Acesso em: 16 ago. 2014.

MARTIN, H.L. et al. Measurement and modeling of the toxicity of binary mixtures in the nematode *Caenorhabditis elegans* – a test of independent action. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 01, p. 97-104, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/07-215.1/pdf>>. Acesso em: 02 maio 2014.

MASSARO, F.C. **Estudos ecológicos e ecotoxicológicos de espécies nativas de Hydra (Cnidaria:Hydrozoa)**. 2011. 502 f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-25072006-134025/pt-br.php>>. Acesso em: 07 maio 2014.

MELED, M.; THRASYVOULOU, A.; BELZUNCES, L.P. Seasonal variations in susceptibility of *Apis mellifera* to the synergistic action of prochloraz and deltamethrin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 2517-2520, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620171220/pdf>>. Acesso em: 02 maio 2014.

MINAGH, E. et al. Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species. **Ecotoxicology and Environmental**

Safety, v. 72, p. 434-440, 2009. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0147651308001413/1-s2.0-S0147651308001413-main.pdf?_tid=8eaa85b4-ca28-11e3-b217-00000aab0f27&acdnat=1398176309_77c876af1a6809669872e1228d41d8f3>. Acesso em: 22 abr. 2014.

NALECZ-JAWECKI, G.; SAWICKI, J. Influence of water hardness on the toxicity of selected pharmaceuticals and metals to the protozoa *Spirostomum ambiguum* and *Tetrahymena termophila*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 14, p. 873-877, 2005. Disponível em: <http://www.psp-parlar.de/pdf/F_25_121_pp873_877.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2014.

NATIONAL CENTERS FOR COASTAL OCEAN SCIENCE (NCCOS). Pharmaceuticals in the environment. Disponibiliza informações sobre fármacos no meio ambiente. Disponível em: <<http://products.coastalscience.noaa.gov/peiar/detail.aspx?substanceid=241>>. Acesso em: 18 abr. 2014.

NEUWOEHNER, J.; ESCHER, B.I. The pH-dependent toxicity of basic pharmaceuticals in the green algae *Scenedesmus vacuolatus* can be explained with a toxicokinetic ion-trapping model. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 266-275, 2011. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0166445X10004133/1-s2.0-S0166445X10004133-main.pdf?_tid=26b715c0-c56f-11e3-b853-00000aab0f26&acdnat=1397656878_6060a271677a483b96e41cb56c3f9ccd>. Acesso em: 16 abr. 2014.

OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development. **Harmonised Integrated Classification System for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures**. In: OECD series on testing and assessment, n. 33, 14 aug. 2001. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd_hclfinaw.pdf>. Acesso em: 10 maio 2014.

OECD . Organization for Economic Cooperation and Development. 221. **Lemna sp. Growth Inhibition Test**. In: Guidelines for the testing of chemicals, 23 mar. 2006. Disponível em: <<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9722101e.pdf?expires=134999040&id=id&acname=freeContent&checksum=7EB74B2CF305F50A05BDFE664806B77B>>. Acesso em: 07 ago. 2011.

OOSTERHUIS, M.; SACHER, F.; TER LAAK, T.L. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. **Science of the Total Environment**, v. 442, p. 380-388, 2013. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0048969712013289/1-s2.0-S0048969712013289-main.pdf?_tid=4ff1f9c2-f96e-11e3-80e5-00000aacb362&acdnat=1403373973_8aea1e7eb6b31636c9ef62076f50e681>. Acesso em: 21 jun. 2014.

OWEN, S.F. et al. Uptake of propranolol, a cardiovascular pharmaceutical, from water into fish plasma and its effects on growth and organ biometry. **Aquatic Toxicology**, v. 93, p. 217-224, 2009. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com.ez37.periodicos.capes.gov.br/S0166445X09001635/1-s2.0-S0166445X09001635-main.pdf?_tid=5bb45d86-c566-11e3-a8db-

0000aab0f02&acdnat=1397653096_2c198c0480f2f9814c8aae115b9b3ce3>. Acesso em: 16 abr. 2014.

PEREIRA, L.A. Brasil será quinto maior mercado farmacêutico em 2015. **Pharmacia Brasileira**, n. 86, setembro/outubro/novembro, 2012. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/138/pb86web.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2013.

PORTAL FATOR BRASIL. **Consumo de medicamentos genéricos para hipertensão cresce 190% em menos de 2 anos**. 13 ago. 2013. Disponível em: <http://www.revistafatorbrasil.com.br/ver_noticia.php?not=243422>. Acesso em: 17 maio 2014.

POSTHUMA, L. et al. Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38, p. 108-121, 1997. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com.ez37.periodicos.capes.gov.br/S0147651397915682/1-s2.0-S0147651397915682-main.pdf?_tid=57774b6e-cd74-11e3-ba26-00000aab0f27&acdnat=1398538711_cd26757a9e27acb259818dabaf51287d>. Acesso em: 02 maio 2014.

POUNDS, N. et al. Acute and chronic effects of ibuprofen in the mollusc *Planorbis carinatus* (Gastropoda: Planorbidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 47-52, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651307001546>>. Acesso em: 21 abr. 2014.

PRÓGENÉRICOS. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS. 2013a. **Genéricos ganham a confiança do brasileiro**. Disponível em: <<http://www.progenericos.org.br/index.php/noticias/332-genericos-ganham-a-confianca-do-brasileiro>>. Acesso em: 20 set. 2013.

PRÓGENÉRICOS. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS. 2013b. **“Saiba quais são os genéricos mais vendidos no País”**. Disponível em: <<http://www.progenericos.org.br/index.php/noticias/326-qsabia-quais-sao-os-genericos-mais-vendidos-no-paisq>>. Acesso em: 20 set. 2013.

PROIKAKIS, C.S.; TARANTILI, P.A.; ANDREOPOULOS, A.G. The role of polymer/drug interactions on the sustained release from poly (DL-lactic acid) tablets. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 3269-3276, 2006. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0014305706002953/1-s2.0-S0014305706002953-main.pdf?_tid=fec53358-d220-11e3-ba6e-00000aab0f26&acdnat=1399052670_9d0b5fc8e062f85a5a65f0c34c5fbd24>. Acesso em: 02 maio 2014.

RABØLLE, M.; SPLIID, N.H. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. **Chemosphere**, v. 40, p. 715-722, 2000. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0045653599004427/1-s2.0-S0045653599004427-main.pdf?_tid=a3b0ad7e-cec6-11e3-9b89-00000aab0f02&acdnat=1398684009_91825efd81360c5a50cad4da184e7a55>. Acesso em: 28 abr. 2014.

ROBERTS, P.H.; THOMAS, K.V. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. **Science of the Total Environment**, v. 356, p. 143-153, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969705002408>>. Acesso em: 03 out. 2012.

SABESP. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. **Biossólido**. Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/interna/Default.aspx?secaoId=60>>. Acesso em: 17 abr. 2014.

SABOURIN, L. et al. Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of dewatered municipal biosolids to an agricultural field. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 4596-4604, 2009. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0048969709003623/1-s2.0-S0048969709003623-main.pdf?_tid=aee2d57a-f61f-11e3-965d-00000aab0f01&acdnat=1403010349_416dded4daf19a118a1fc6c568be0bc4>. Acesso em: 27 abr. 2014.

SANDERSON, H. et al. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface water. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 158-183, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230004000029>>. Acesso em: 18 abr. 2014.

SANDERSON, H.; THOMSEN, M. Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode-of-action. **Toxicology Letters**, v. 187, p. 84-93, 2009. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com.ez37.periodicos.capes.gov.br/S0378427409000721/1-s2.0-S0378427409000721-main.pdf?_tid=f35544ca-d222-11e3-81e6-00000aacb35e&acdnat=1399053510_8fcd337ee7a28615e98f81d86c8a407f>. Acesso em: 02 maio 2014.

SANTOS, L.H.M.L.M. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 45-95, 2010. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0304389409017518/1-s2.0-S0304389409017518-main.pdf?_tid=af69ce00-13f3-11e2-97ba-00000aacb360&acdnat=1349994991_9d265c33c4b31582e5fa7e22996ad836>. Acesso em: 12 set. 2012.

SCHUSTER, J. **Focus on plant problems-Chlorosis**. University of Illinois Extension. 2014. Disponível em: <<http://urbanext.illinois.edu/focus/index.cfm?problem=chlorosis>>. Acesso em: 12 maio 2014.

SCIFINDER[®] - The choice for chemistry research[™]. Aplicativo que fornece acesso integrado a fontes de referências, substâncias e reações na Química e em ciências afins. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/scifinder/login?TYPE=33554433&REALMOID=06-b7b15cf0-642b-1005-963a-830c809fff21&GUID=&SMAUTHREASON=0&METHOD=GET&SMAGENTNAME=-SM-iYG5ztVYxHteIkyf1NPKvNDKibSNNjl8U8%2fnkLXxeiRXrU1c2zAgjop7oSyZKNL%2b&>>

STANLEY, J. K. et al. Enantiospecific toxicity of the β -blocker propranolol to *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 1780-1786, 2006. Disponível em: <[TAYLOR, D.; SENAC, T. Human pharmaceutical products in the environment – The “problem” in perspective. **Chemosphere** \(2014\). No prelo. Disponível em: <\[http://ac.els-cdn.com/S0045653514000770/1-s2.0-S0045653514000770-main.pdf?_tid=4c779dcc-cec3-11e3-a9f7-00000aab0f6b&acdnat=1398682574_b1a05b03f331a34207af93f1b70d45b5\]\(http://ac.els-cdn.com/S0045653514000770/1-s2.0-S0045653514000770-main.pdf?_tid=4c779dcc-cec3-11e3-a9f7-00000aab0f6b&acdnat=1398682574_b1a05b03f331a34207af93f1b70d45b5\)>. Acesso em: 02 maio 2014.](http://link.periodicos.capes.gov.br.ez37.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_tim=2014-04-16T08%3A36%3A52IST&url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&rft_id=info:sid/primo.exlibrisgroup.com:primo3-Article-wos&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:&rft.genre=article&rft.atitle=Enantiospecific%20toxicity%20of%20the%20beta-blocker%20propranolol%20to%20Daphnia%20magna%20and%20Pimephales%20promelas&rft.jtitle=ENVIRONMENTAL%20TOXICOLOGY%20AND%20CHEMISTRY&rft.btitle=&rft.aulast=Stanley&rft.auinit=&rft.auinit1=&rft.auinitm=&rft.ausuffix=&rft.au=Stanley%20C%20JK&rft.aucorp=&rft.date=200607&rft.volume=25&rft.issue=7&rft.part=&rft.quarter=&rft.ssn=&rft.spage=1780&rft.epage=1786&rft.pages=&rft.artnum=&rft.issn=0730-7268&rft.eissn=&rft.isbn=&rft.sici=&rft.coden=&rft_id=info:doi/&rft.object_id=&svc_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&rft.eisbn=&rft_dat=%3Cwos%3E000240429200012%3C/wos%3E&rft_id=info:oai/&svc.fulltext=yes&gathStatIcon=true>. Acesso em: 16 abr. 2014.</p>
</div>
<div data-bbox=)

TERNES, T.A.. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Water Res.**, v. 32, n.11, p. 3245-3260, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135498000992>>. Acesso em: 14 set. 2012.

THOMAS, K.V.; HILTON, M.J. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 436-444, 2004. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0025326X04000840/1-s2.0-S0025326X04000840-main.pdf?_tid=de65d6d4-f968-11e3-a9a1-00000aacb361&acdnat=1403371635_ba711d1cc873588e36c5169c260d0b36>. Acesso em: 21 jun. 2014.

UEDA, J. et al. Impacto ambiental do descarte de fármacos e estudo da conscientização da população a respeito do problema. **Revista Ciências do Ambiente on-line**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2009. Disponível em: <<http://sistemas.ib.unicamp.br/be310/index.php/be310/article/viewFile/176/129>>. Acesso em: 27 abr. 2014.

UMBUZEIRO, G.A. et al. Protocolo para derivação de critérios de qualidade da água para proteção da vida aquática no Brasil – Critérios de qualidade da água (CQA). In: WORKSHOP ESTRATÉGIAS PARA DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS AMBIENTAIS PARA PROTEÇÃO DA SAÚDE HUMANA E DO ECOSSISTEMA, do CONGRESSO BRASILEIRO DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENÊNESE E TERATOGENÊNESE AMBIENTAL, 9, 2009, Jundiaí-SP. **Protocolo...** 2011, p. 1-54. Disponível em:

<http://www.sbmcta.org.br/_img/_documentos/4f7edff394522f1aca11501d3f332477.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2013.

UMBUZEIRO, G.A.; KUMMROW, F.; REI, F.F.C. Toxicologia, padrões de qualidade de água e a legislação. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v. 5, n. 1, Resenha, p. 1-14, jan./abr. 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.sp.senac.br/index.php/ITF/article/view/64>>. Acesso em: 26 abr. 2014.

UNITED STATES OF AMERICA. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). **Ecological Structure Activity Relationships (ECOSAR)**. 2012. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppt/newchems/tools/21ecosar.htm>>. Acesso em: 17 maio 2014.

UNITED STATES OF AMERICA. U.S. Food and Drug Administration- FDA. Center for Drug evaluation and research. Environmental Assessment/ FONSI. Approval package for application number 20-386/ S-019 and 029. **Review of Environment Assessment NDA 20-386 Cozaar Tablets (Losartan potassium)**. Set/2001. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/20-386S032_Cozaar_EAfonsi.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2013.

UNITED STATES OF AMERICA. U.S. Food and Drug Administration-FDA. Center for Drug evaluation and research. Environmental Assessment/FONSI. Approval package for application number 20-387/S-013, 015 and 027/ Center for drug evaluation and research division of cardio-renal drug products (HFD-110). **Environmental Assessment and finding of no significant impact for Hyzaar Tablets (50 mg losartan potassium-12,5 mg hydrochlorothiazide and 100 mg losartan potassium-25 mg hydrochlorotiazide) - NDA 20-387/ SE 1-027**. Maio/2002. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/20387S013_HYZAAR_EAFONSI.pdf>. Acesso em: 05 maio 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS- Unifal-MG. Biblioteca Central. **Manual de normalização para elaboração de trabalhos acadêmicos, dissertações e teses da Unifal-MG**. Alfenas-MG, 2006.

VAN GESTEL, C.A.M.; HENSBERGEN, P.J. Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 1177-1186, 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620160612/pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2014.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. v.1, 3ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais; 2005. 452p.

VULLIET, E. et al. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1210, p. 84-91, 2008. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0021967308015896/1-s2.0-S0021967308015896-main.pdf?_tid=12d2dcb4-d07e-11e3-9590-00000aacb35d&acdnat=1398872745_55b8d0a335f8c2b6ab4675edcc1dbf8c>. Acesso em: 30 abr. 2014.

WAN, H. et al. High-throughput screening of pKa values of pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis and mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 17, p. 2639-2648, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.1229/pdf>>. Acesso em: 02 maio 2014.

WANG, L.J. et al. A new effect residual ratio (ERR) method for the validation of the concentration addition and independent action models. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, p. 1080-1089, 2010. Disponível em: <[WANG, W. Literature review on duckweed toxicity testing. **Environmental Research**, v. 52, p. 7-22, 1990. Disponível em: <\[http://ac.els-cdn.com/S0013935105801471/1-s2.0-S0013935105801471-main.pdf?_tid=fc24b0f2-d201-11e3-aded-00000aab0f27&acdnat=1399039351_9d1f0c15b96ac192f6bc54392216c94c\]\(http://ac.els-cdn.com/S0013935105801471/1-s2.0-S0013935105801471-main.pdf?_tid=fc24b0f2-d201-11e3-aded-00000aab0f27&acdnat=1399039351_9d1f0c15b96ac192f6bc54392216c94c\)>. Acesso em: 02 maio 2014.](http://link.periodicos.capes.gov.br/ez37.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_tim=2014-05-14T09%3A30%3A55IST&url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:ctx&rft_id=info:sid/primo.exlibrisgroup.com:primo3-Article-wos&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:article&rft.genre=article&rft.atitle=A%20new%20effect%20residual%20ratio%20(ERR)%20method%20for%20the%20validation%20of%20the%20concentration%20addition%20and%20independent%20action%20models&rft.jtitle=ENVIRONMENTAL%20SCIENCE%20AND%20POLLUTION%20RESEARCH&rft.btitle=&rft.aulast=Wang&rft.auinit=&rft.auinit1=&rft.auinitm=&rft.ausuffix=&rft.au=Wang%2C%20LJ&rft.aucorp=&rft.date=201006&rft.volume=17&rft.issue=5&rft.part=&rft.quarter=&rft.ssn=&rft.spage=1080&rft.epage=1089&rft.pages=&rft.artnum=&rft.issn=0944-1344&rft.eissn=&rft.isbn=&rft.sici=&rft.coden=&rft_id=info:doi/10.1007/s11356-009-0265-7&rft.object_id=&svc_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&rft.eisbn=&rft_dat=%3Cwos%3E000279221700007%3C/wos%3E&rft_id=info:oai/&svc.fulltext=yes>. Acesso em: 14 maio 2014.</p>
</div>
<div data-bbox=)

WANG, W.; FREEMARK, K. The use of plants for environmental monitoring and assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 30, p. 289-301, 1995. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0147651385710330/1-s2.0-S0147651385710330-main.pdf?_tid=f165f578-1271-11e2-b6dc-00000aacb361&acdnat=1349829316_d97e67580066b11143886605d97d8c03>. Acesso em: 09 out. 2012.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. Agonistas e Antagonistas adrenérgicos. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. McGrawHill, 2012, p. 277-333.

WILLE, K. et al. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 5, p. 1797-1808, 2010. Disponível em: <<http://www.vliz.be/imisdocs/publications/215358.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2014.

WILLIAMS, R.C. et al. Comparison of liquid chromatography, capillary electrophoresis and super-critical fluid chromatography in the determination of Losartan Potassium drug substance in Cozaar[®] tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p.

1539-1546, 1996. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/0731708596017402/1-s2.0-0731708596017402-main.pdf?_tid=0198f952-d226-11e3-b2e5-00000aacb35e&acdnat=1399054823_078b1a1724ce567161b60e263e0ba4d1>. Acesso em: 02 maio 2014.

YAMAMOTO, N.S. et al. Avaliação dos efeitos biológicos do fármaco Losartan em microcrustáceos *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* (CRUSTACEA, CLADOCERA). **UNISANTA BioScience**, Santos-SP, v.1, n.2, p. 49-53, 2012. Disponível em: <<http://periodicos.unisanta.br/index.php/bio/article/view/59/25>>. Acesso em: 14 ago. 2013.

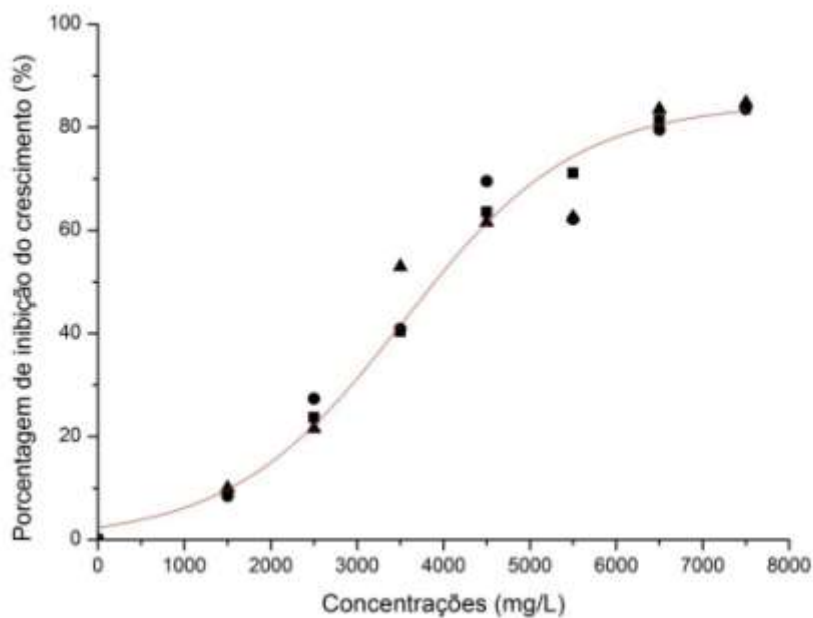
YAMAMOTO, N.S. et al. Avaliação dos efeitos biológicos adversos dos fármacos anti-hipertensivos Losartan e Valsartan em ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA). **UNISANTA BioScience**, Santos-SP, v. 3, n.1, p. 27-32, 2014. Disponível em: <<http://periodicos.unisanta.br/index.php/bio/article/download/196/199>>. Acesso em: 18 abr. 2014.

ZAGATTO, P. A. O uso de substâncias de referência no controle de qualidade de ensaios ecotoxicológicos. In: ZAGATTO, P.A. e BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2008. p. 185-197.

ZOUNKOVA, R. et al. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites. **Chemosphere**, v. 81, p. 253-260, 2010. Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/S0045653510007034/1-s2.0-S0045653510007034-main.pdf?_tid=819b04d0-ca27-11e3-9dec-00000aacb362&acdnat=1398175857_53e14efdccb705e30911bfa1e7e5907^a](http://ac.els-cdn.com/S0045653510007034/1-s2.0-S0045653510007034-main.pdf?_tid=819b04d0-ca27-11e3-9dec-00000aacb362&acdnat=1398175857_53e14efdccb705e30911bfa1e7e5907<sup>a</sup)>. Acesso em: 22 abr. 2014.

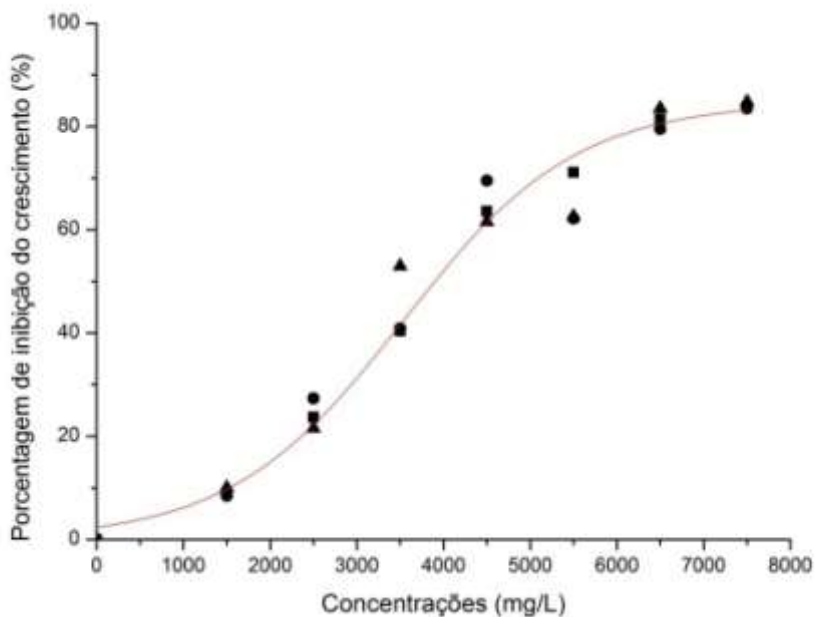
APÊNDICE A - Curvas concentração-resposta com respectivas equações de regressão não-linear e valores dos parâmetros da equação com respectivos desvios-padrão dos 9 testes de sensibilidade realizados:

- A) Teste de sensibilidade 1;
- B) Teste de sensibilidade 2;
- C) Teste de sensibilidade 3;
- D) Teste de sensibilidade 4;
- E) Teste de sensibilidade 5;
- F) Teste de sensibilidade 6;
- G) Teste de sensibilidade 7;
- H) Teste de sensibilidade 8;
- I) Teste de sensibilidade 9.



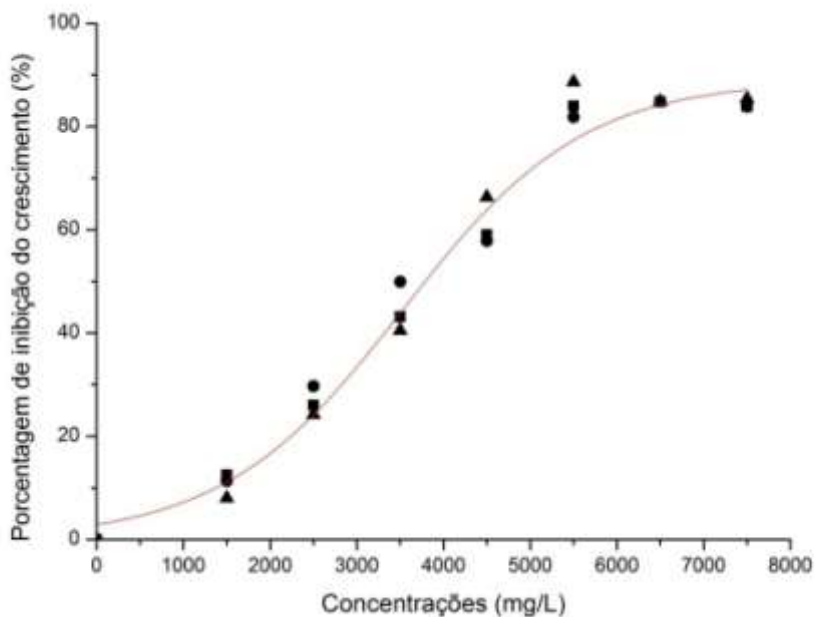
A)

Equação: $y = a / (1 + \exp(-k(x - xc)))$			
Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro a \pm desvio-padrão	Valor do parâmetro $xc \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
0,98787	91,80497 \pm 5,09618	4073,76018 \pm 210,36873	8,6687.10 ⁻⁴ \pm 1,1617. 10 ⁻⁴



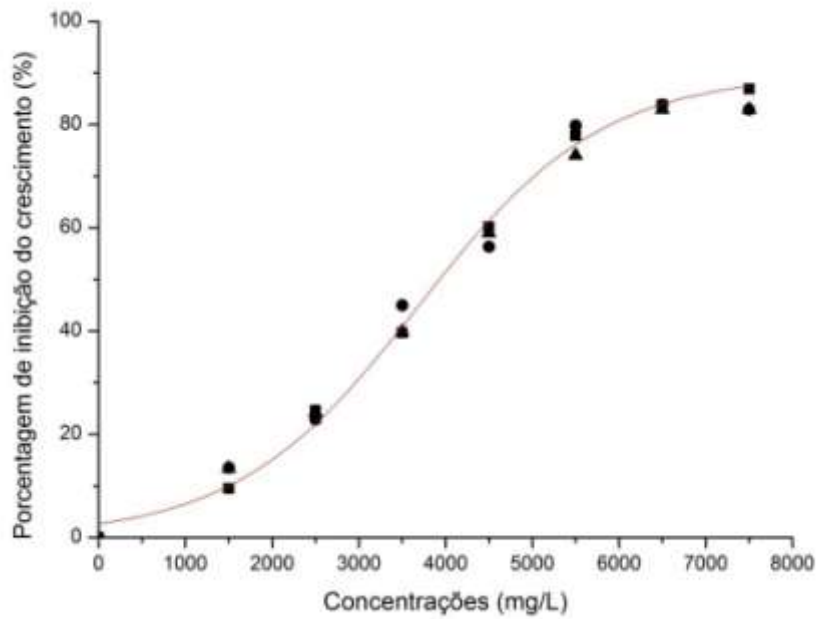
B)

Equação: $y = a / (1 + \exp(-k(x - x_c)))$			
Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro $a \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $x_c \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
0,99512	84,70988 \pm 2,1859	3533,63205 \pm 100,27237	0,001 \pm 8,31112. 10^{-5}



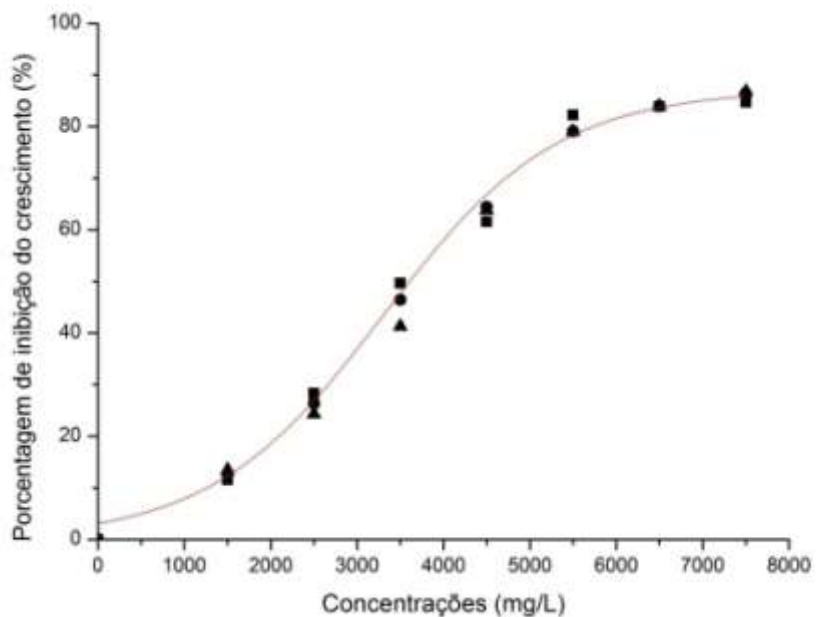
C)

Equação: $y = a / (1 + \exp(-k(x - x_c)))$			
Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro a \pm desvio-padrão	Valor do parâmetro $x_c \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
0,98397	89,06493 \pm 4,2634	3530,23828 \pm 188,40789	9,59242 $\cdot 10^{-4} \pm 1,42061 \cdot 10^{-4}$



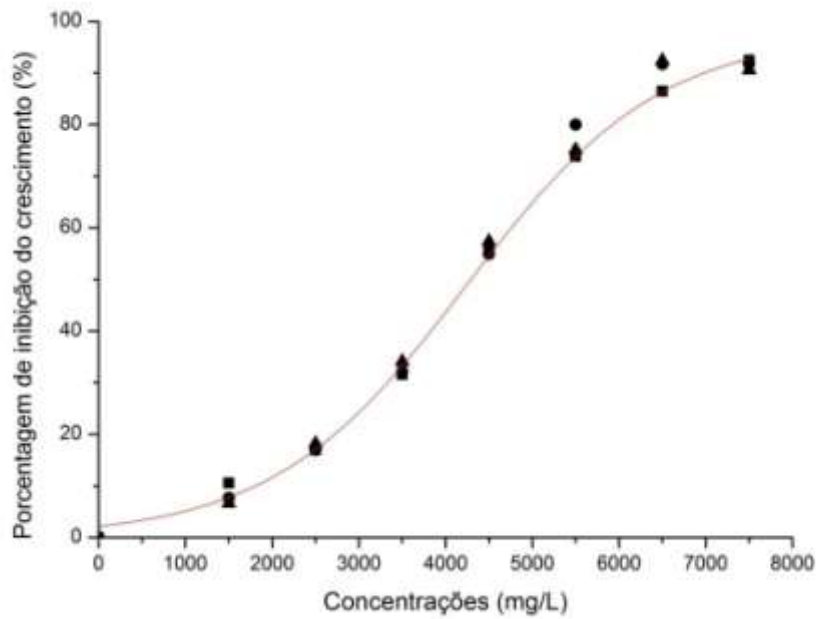
D)

Equação: $y = a / (1 + \exp(-k(x - x_c)))$			
Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro $a \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $x_c \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
0,9965	89,81604 \pm 2,14329	3688,35173 \pm 92,25933	9,47592 $\cdot 10^{-4} \pm$ 6,63197 $\cdot 10^{-5}$



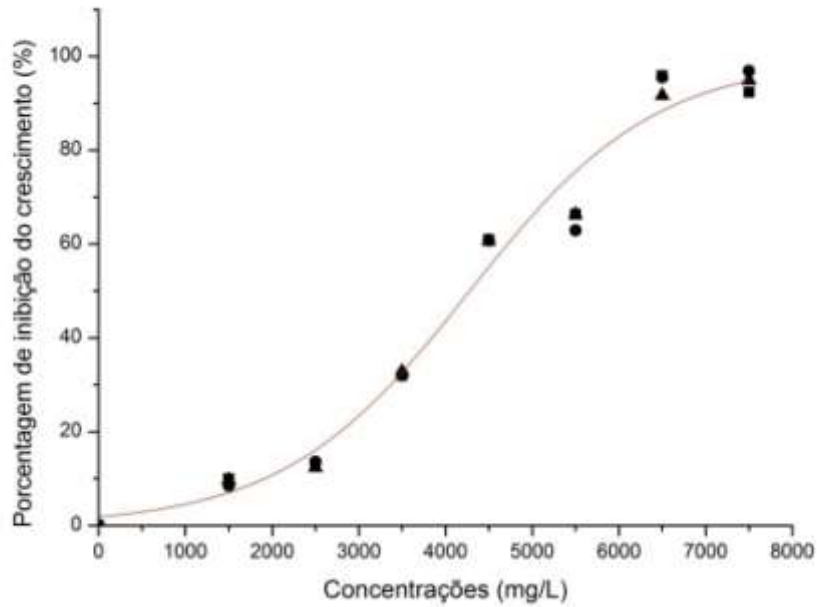
E)

Equação: $y = a / (1 + \exp(-k(x - x_c)))$			
Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro $a \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $x_c \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
0,98953	87,15396 \pm 3,0752	3308,07261 \pm 141,61974	9,97191.10 ⁻⁴ \pm 1,19213. 10 ⁻⁴



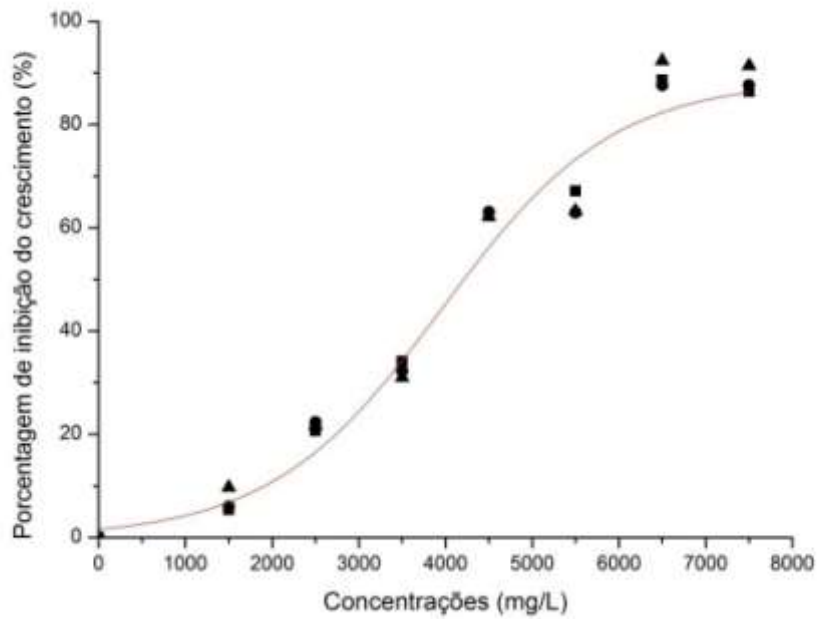
F)

Equação: $y = a / (1 + \exp(-k(x - x_c)))$			
Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro a \pm desvio-padrão	Valor do parâmetro $x_c \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
0,99748	97,84262 \pm 2,53356	4242,88094 \pm 94,8114	8,92271 $\cdot 10^{-4} \pm 5,44704 \cdot 10^{-5}$



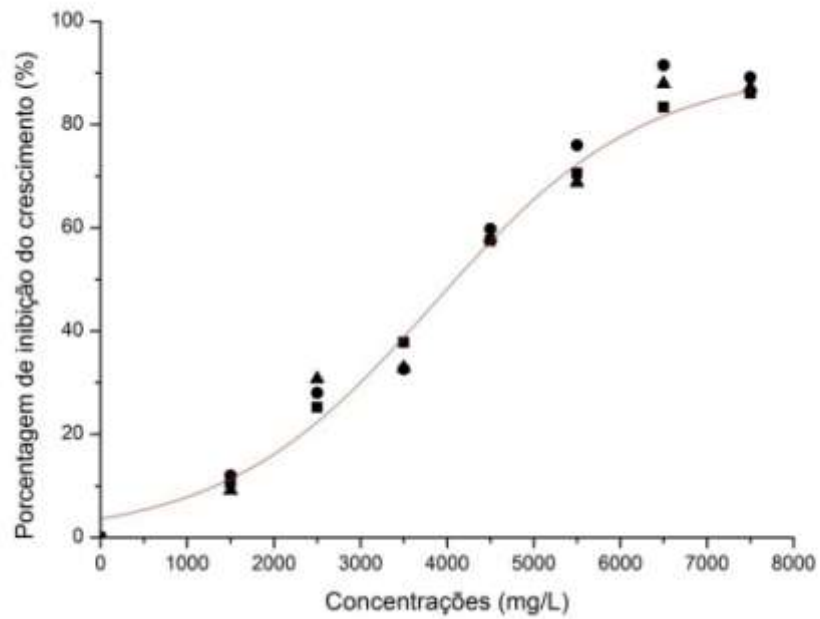
G)

Equação: $y = a / (1 + \exp(-k(x - x_c)))$			
Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro a \pm desvio-padrão	Valor do parâmetro $x_c \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
0,97172	99,52558 \pm 8,56152	4269,26705 \pm 308,58504	9,29363 $\cdot 10^{-4} \pm 1,94617 \cdot 10^{-4}$



H)

Equação: $y = a / (1 + \exp(-k(x - x_c)))$			
Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro a \pm desvio-padrão	Valor do parâmetro $x_c \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
0,97772	88,6537 \pm 5,70303	3956,55115 \pm 234,48249	0,00101 \pm 1,87982 $\cdot 10^{-4}$



I)

Equação: $y = a / (1 + \exp(-k(x - x_c)))$			
Coefficiente de determinação (R^2)	Valor do parâmetro $a \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $x_c \pm$ desvio-padrão	Valor do parâmetro $k \pm$ desvio-padrão
0,99471	90,78612 \pm 3,1481	3852,71586 \pm 137,63742	8,2673.10 ⁻⁴ \pm 7,06908. 10 ⁻⁵

APÊNDICE B - Tabelas de valores de taxa de crescimento específica média (μ) e de porcentagem de inibição da taxa de crescimento ($\%I_r$), médias e desvio-padrão (σ) referentes aos testes de sensibilidade ao cloreto de sódio (NaCl) e aos testes com os fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica, em ação individual e em mistura, relativos aos parâmetros número de frondes, área foliar total e peso fresco.

Tabela 1 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor* referentes ao teste 1 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	Σ	I_r (%)	Média de I_r (%)	σ
Controle/1	0,27817					
Controle/2	0,27354	0,27463	0,00314	0	0	0
Controle/3	0,27219					
1500 / 1	0,25788			6,09820		
1500 / 2	0,24962	0,24761	0,01141	9,10705	9,83915	4,15566
1500 / 3	0,23532			14,31221		
2500 / 1	0,22232			19,04915		
2500 / 2	0,21667	0,21818	0,00362	21,10532	20,55378	1,31842
2500 / 3	0,21557			21,50686		
3500 / 1	0,16979			38,17383		
3500 / 2	0,15283	0,16121	0,00848	44,35128	41,30022	3,08942
3500 / 3	0,16100			41,37556		
4500 / 1	0,12659			53,90613		
4500 / 2	0,11396	0,12157	0,00671	58,50619	55,73205	2,44223
4500 / 3	0,12418			54,78384		
5500 / 1	0,09250			66,31712		
5500 / 2	0,08572	0,07728	0,02077	68,78620	71,85928	7,56247
5500 / 3	0,05362			80,47453		
6500 / 1	0,03776			86,25186		
6500 / 2	0,03495	0,03684	0,00164	87,27352	86,58436	0,59695
6500 / 3	0,03782			86,22771		
7500 / 1	0,03776			86,25186		
7500 / 2	0,04126	0,04053	0,00249	84,97749	85,24074	0,90857
7500 / 3	0,04259			84,49286		

Tabela 2 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor* referentes ao teste 2 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,26170					
Controle/2	0,26562	0,26197	0,00353	0	0	0
Controle/3	0,25857					
1500 / 1	0,23832			9,02761		
1500 / 2	0,23981	0,23797	0,00204	8,45791	9,16074	0,77798
1500 / 3	0,23578			9,99669		
2500 / 1	0,19980			23,73014		
2500 / 2	0,19027	0,19851	0,00768	27,36667	24,22156	2,93047
2500 / 3	0,20547			21,56787		
3500 / 1	0,15607			40,42396		
3500 / 2	0,15482	0,14468	0,01865	40,90013	44,76990	7,11893
3500 / 3	0,12316			52,98549		
4500 / 1	0,09537			63,59262		
4500 / 2	0,07984	0,09196	0,01083	69,52366	64,89594	4,13316
4500 / 3	0,10067			61,57154		
5500 / 1	0,07564			71,12556		
5500 / 2	0,09912	0,09091	0,01324	62,16438	65,29524	5,05381
5500 / 3	0,09800			62,59580		
6500 / 1	0,04851			81,48121		
6500 / 2	0,05356	0,04840	0,00521	79,55270	81,52271	1,99108
6500 / 3	0,04313			83,53422		
7500 / 1	0,04215			83,90942		
7500 / 2	0,04313	0,04171	0,00169	83,53422	84,07764	0,64422
7500 / 3	0,03985			84,78928		

Tabela 3 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor* referentes ao teste 3 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,24716			0		
Controle/2	0,25325	0,25124	0,00352	0	0	0
Controle/3	0,25329			0		
1500 / 1	0,21974			12,53504		
1500 / 2	0,22272	0,22451	0,00586	11,35116	10,63939	2,33438
1500 / 3	0,23106			8,03198		
2500 / 1	0,18578			26,05329		
2500 / 2	0,17667	0,18427	0,00696	29,67981	26,65587	2,77221
2500 / 3	0,19035			24,23450		
3500 / 1	0,14277			43,17329		
3500 / 2	0,12573	0,13929	0,01220	49,95657	44,55726	4,85752
3500 / 3	0,14938			40,54191		
4500 / 1	0,10292			59,03346		
4500 / 2	0,10596	0,09782	0,01157	57,82532	61,06527	4,60527
4500 / 3	0,08457			66,33703		
5500 / 1	0,04019			84,00336		
5500 / 2	0,04557	0,03806	0,00876	81,86267	84,84957	3,48787
5500 / 3	0,02843			88,68269		
6500 / 1	0,03802			84,86517		
6500 / 2	0,03802	0,03802	$5,99 \cdot 10^{-12}$	84,86517	84,86517	$2,383 \cdot 10^{-9}$
6500 / 3	0,03802			84,86517		
7500 / 1	0,0405			83,88441		
7500 / 2	0,0405	0,03921	0,00222	83,88441	84,39410	0,88281
7500 / 3	0,0366			85,41348		

Tabela 4 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor* referentes ao teste 4 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,27179			0		
Controle/2	0,27100	0,26876	0,00457	0	0	0
Controle/3	0,26351			0		
1500 / 1	0,24326			9,49095		
1500 / 2	0,23241	0,23614	0,00616	13,52580	12,13823	2,29350
1500 / 3	0,23276			13,39794		
2500 / 1	0,20255			24,63739		
2500 / 2	0,20731	0,20444	0,00252	22,86560	23,93264	0,93981
2500 / 3	0,20347			24,29494		
3500 / 1	0,16209			39,69005		
3500 / 2	0,14780	0,15716	0,00811	45,00761	41,52523	3,01729
3500 / 3	0,16159			39,87803		
4500 / 1	0,10709			60,15485		
4500 / 2	0,11743	0,11156	0,00531	56,30770	58,49134	1,97561
4500 / 3	0,11016			59,01147		
5500 / 1	0,05940			77,89950		
5500 / 2	0,05423	0,06113	0,00792	79,82319	77,25355	2,94621
5500 / 3	0,06978			74,03795		
6500 / 1	0,04340			83,85118		
6500 / 2	0,04340	0,04422	0,00142	83,85118	83,54558	0,52931
6500 / 3	0,04587			82,93438		
7500 / 1	0,03511			86,93654		
7500 / 2	0,04587	0,04228	0,00621	82,93438	84,26843	2,31065
7500 / 3	0,04587			82,93438		

Tabela 5 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor* referentes ao teste 5 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,26433			0		
Controle/2	0,27535	0,27078	0,00575	0	0	0
Controle/3	0,27266			0		
1500 / 1	0,23940			11,58906		
1500 / 2	0,23681	0,23681	0,00259	12,54546	12,54642	0,95785
1500 / 3	0,23421			13,50476		
2500 / 1	0,19410			28,31642		
2500 / 2	0,19943	0,19946	0,00536	26,34968	26,33990	1,98143
2500 / 3	0,20484			24,35359		
3500 / 1	0,13628			49,67010		
3500 / 2	0,14505	0,14677	0,01145	46,43178	45,79571	4,22845
3500 / 3	0,15899			41,28526		
4500 / 1	0,10401			61,58899		
4500 / 2	0,09635	0,09944	0,00404	64,41657	63,27688	1,49138
4500 / 3	0,09795			63,82509		
5500 / 1	0,04802			82,26602		
5500 / 2	0,05669	0,05380	0,00501	79,06347	80,13099	1,84899
5500 / 3	0,05669			79,06347		
6500 / 1	0,043402			83,97143		
6500 / 2	0,043402	0,04340	0	83,97143	83,97143	0
6500 / 3	0,043402			83,97143		
7500 / 1	0,041309			84,74432		
7500 / 2	0,03665	0,03789	0,00300	86,46635	86,00650	1,10641
7500 / 3	0,03572			86,80884		

Tabela 6 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor* referentes ao teste 6 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,25860			0		
Controle/2	0,26384	0,25844	0,00549	0	0	0
Controle/3	0,25287			0		
1500 / 1	0,23107			10,58803		
1500 / 2	0,23857	0,23697	0,00528	7,68601	8,30606	2,04375
1500 / 3	0,24127			6,64414		
2500 / 1	0,21458			16,97124		
2500 / 2	0,21469	0,21353	0,00191	16,92792	17,37600	0,73890
2500 / 3	0,21133			18,22884		
3500 / 1	0,17681			31,58631		
3500 / 2	0,17545	0,17419	0,00342	32,11282	32,59821	1,32315
3500 / 3	0,17032			34,09550		
4500 / 1	0,11521			55,42122		
4500 / 2	0,11646	0,11395	0,00332	54,93719	55,90682	1,28329
4500 / 3	0,11019			57,36205		
5500 / 1	0,06762			73,83476		
5500 / 2	0,05169	0,06117	0,00839	80,00035	76,32878	3,24708
5500 / 3	0,06422			75,15124		
6500 / 1	0,03495			86,47612		
6500 / 2	0,02136	0,02529	0,00841	91,73351	90,21402	3,25593
6500 / 3	0,01956			92,43244		
7500 / 1	0,01937			92,50312		
7500 / 2	0,02125	0,02165	0,00250	91,77630	91,62218	0,96725
7500 / 3	0,02433			90,58713		

Tabela 7 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor* referentes ao teste 7 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,24990			0		
Controle/2	0,25918	0,25500	0,00470	0	0	0
Controle/3	0,25592			0		
1500 / 1	0,22961			9,95820		
1500 / 2	0,23327	0,23106	0,00195	8,52027	9,38851	0,76404
1500 / 3	0,23030			9,68705		
2500 / 1	0,22152			13,12748		
2500 / 2	0,22039	0,22176	0,00150	13,57267	13,03455	0,59010
2500 / 3	0,22337			12,40350		
3500 / 1	0,17339			32,00377		
3500 / 2	0,17342	0,17272	0,00119	31,99072	32,26770	0,46848
3500 / 3	0,17134			32,80861		
4500 / 1	0,09956			60,95670		
4500 / 2	0,10006	0,10003	0,00046	60,75959	60,77141	0,17966
4500 / 3	0,10047			60,59795		
5500 / 1	0,08589			66,31591		
5500 / 2	0,09462	0,08881	0,00503	62,89476	65,17404	1,97391
5500 / 3	0,08590			66,31144		
6500 / 1	0,01061			95,83791		
6500 / 2	0,01143	0,01442	0,00589	95,51582	94,34665	2,30963
6500 / 3	0,02120			91,68621		
7500 / 1	0,01956			92,33040		
7500 / 2	0,00797	0,01353	0,00581	96,87584	94,69262	2,27800
7500 / 3	0,01308			94,87163		

Tabela 8 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor* referentes ao teste 8 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,25712			0		
Controle/2	0,25753	0,25736	0,00022	0	0	0
Controle/3	0,25745			0		
1500 / 1	0,24347			5,39852		
1500 / 2	0,24191	0,23925	0,00601	6,00469	7,03893	2,33605
1500 / 3	0,23237			9,71357		
2500 / 1	0,20408			20,70361		
2500 / 2	0,19984	0,20178	0,00214	22,35022	21,59652	0,83208
2500 / 3	0,20142			21,73573		
3500 / 1	0,16946			34,15753		
3500 / 2	0,17447	0,17382	0,00408	32,21026	32,46203	1,58468
3500 / 3	0,17753			31,01831		
4500 / 1	0,09650			62,50596		
4500 / 2	0,09506	0,09633	0,00120	63,06273	62,56948	0,46476
4500 / 3	0,09744			62,13974		
5500 / 1	0,08455			67,14707		
5500 / 2	0,09539	0,09151	0,00604	62,93730	64,44487	2,34540
5500 / 3	0,09458			63,25023		
6500 / 1	0,02920			88,65370		
6500 / 2	0,03188	0,02688	0,00648	87,61388	89,55616	2,51788
6500 / 3	0,01956			92,40090		
7500 / 1	0,03495			86,41976		
7500 / 2	0,03188	0,02962	0,00675	87,61388	88,49238	2,62456
7500 / 3	0,02202			91,44350		

Tabela 9 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor* referentes ao teste 9 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,25504			0		
Controle/2	0,26328	0,26235	0,00690	0	0	0
Controle/3	0,26874			0		
1500 / 1	0,23435			10,67394		
1500 / 2	0,23085	0,23448	0,00370	12,00872	10,62399	1,41037
1500 / 3	0,23824			9,18931		
2500 / 1	0,19618			25,22134		
2500 / 2	0,18881	0,18891	0,00722	28,03034	27,99291	2,75305
2500 / 3	0,18174			30,72706		
3500 / 1	0,16306			37,84791		
3500 / 2	0,17678	0,17200	0,00775	32,61731	34,43885	2,95465
3500 / 3	0,17617			32,85131		
4500 / 1	0,11149			57,50265		
4500 / 2	0,10563	0,10902	0,00304	59,73844	58,44319	1,15933
4500 / 3	0,10995			58,08848		
5500 / 1	0,07718			70,57938		
5500 / 2	0,06293	0,07403	0,00990	76,01216	71,78210	3,77523
5500 / 3	0,08197			68,75475		
6500 / 1	0,04362			83,37001		
6500 / 2	0,02226	0,03253	0,01070	91,51426	87,59838	4,08000
6500 / 3	0,03172			87,90888		
7500 / 1	0,03648			86,09413		
7500 / 2	0,02846	0,03284	0,00406	89,15010	87,48246	1,54701
7500 / 3	0,03357			87,20314		

Tabela 10 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro número de frondes, referentes ao teste 1 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,26496					
Controle/2	0,25784	0,27059	0,01630	0	0	0
Controle/3	0,28896					
1,56/1	0,26445			2,26911		
1,56/2	0,28043	0,26707	0,01227	-3,63650	1,30209	4,53311
1,56/3	0,25632			5,27366		
3,1/1	0,23367			13,64410		
3,1/2	0,25107	0,24527	0,01005	7,21347	9,35701	3,71272
3,1/3	0,25107			7,21347		
6,2/1	0,23097			14,64249		
6,2/2	0,23998	0,23655	0,00487	11,31057	12,58031	1,80178
6,2/3	0,23869			11,78786		
12,5/1	0,23392			13,54960		
12,5/2	0,23093	0,23107	0,00278	14,65736	14,60238	1,02640
12,5/3	0,22837			15,60019		
25,0/1	0,22004			18,67929		
25,0/2	0,24051	0,23059	0,01025	11,11406	14,78341	3,78770
25,0/3	0,23120			14,55689		
50,0/1	0,20756			23,29290		
50,0/2	0,20191	0,21023	0,00994	25,38137	22,30456	3,67213
50,0/3	0,22123			18,23940		
100,0/1	0,14320			47,07662		
100,0/2	0,14951	0,14575	0,00332	44,74547	46,13444	1,22812
100,0/3	0,14454			46,58123		
200,0/1	0,02711			89,97986		
200,0/2	0,02942	0,02530	0,00527	89,12802	90,65058	1,946600
200,0/3	0,01936			92,84385		
400,0/1	0			100,00000		
400,0/2	0	0	0	100,00000	100,000000	0
400,0/3	0			100,00000		

Tabela 11 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro número de frondes, referentes ao teste 2 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,26829			0		
Controle/2	0,26958	0,26736	0,00281	0	0	0
Controle/3	0,26420			0		
1,56/1	0,27248			-1,91602		
1,56/2	0,25978	0,26693	0,00650	2,83295	0,16046	2,42994
1,56/3	0,26852			-0,43554		
3,1/1	0,25600			4,24924		
3,1/2	0,25129	0,25464	0,00291	6,00910	4,75747	1,09030
3,1/3	0,25662			4,01407		
6,2/1	0,24399			8,74015		
6,2/2	0,23156	0,23562	0,00725	13,38734	11,87109	2,71191
6,2/3	0,23130			13,48577		
12,5/1	0,23402			12,46999		
12,5/2	0,23003	0,22914	0,00537	13,96069	14,29346	2,01061
12,5/3	0,22338			16,44970		
25,0/1	0,22258			16,74718		
25,0/2	0,21478	0,21955	0,00418	19,66407	17,88194	1,56249
25,0/3	0,22128			17,23457		
50,0/1	0,20957			21,61489		
50,0/2	0,20261	0,20247	0,00717	24,21627	24,27050	2,68314
50,0/3	0,19522			26,98035		
100,0/1	0,13322			50,16953		
100,0/2	0,12889	0,12821	0,00540	51,78954	52,04501	2,01539
100,0/3	0,12251			54,17595		
200,0/1	0,02397			91,03316		
200,0/2	0,027815	0,02790	0,00397	89,59628	89,56323	1,48673
200,0/3	0,03192			88,06024		
400,0/1	0			100,00000		
400,0/2	0	0	0	100,00000	100,00000	0
400,0/3	0			100,00000		

Tabela 12 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro número de frondes, referentes ao teste 3 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,25811					
Controle/2	0,25735	0,25898	0,00220	0	0	0
Controle/3	0,26148					
1,56/1	0,26373			-1,83585		
1,56/2	0,25453	0,25630	0,00672	1,71858	1,03420	2,59641
1,56/3	0,25064			3,21986		
3,1/1	0,25551			1,33934		
3,1/2	0,23909	0,24422	0,00980	7,67859	5,69730	3,77926
3,1/3	0,23807			8,07392		
6,2/1	0,23470			9,37298		
6,2/2	0,23110	0,23261	0,00187	10,76475	10,18012	0,72207
6,2/3	0,23204			10,40263		
12,5/1	0,22306			13,86864		
12,5/2	0,22938	0,22368	0,00542	11,42787	13,62975	2,09269
12,5/3	0,21860			15,59275		
25,0/1	0,22002			15,04385		
25,0/2	0,21282	0,21499	0,00437	17,82467	16,98658	1,68773
25,0/3	0,21213			18,09124		
50,0/1	0,19814			23,49176		
50,0/2	0,20308	0,19900	0,00373	21,58344	23,15970	1,43925
50,0/3	0,19578			24,40390		
100,0/1	0,13283			48,71124		
100,0/2	0,13722	0,14101	0,01061	47,01613	45,54975	4,09649
100,0/3	0,15300			40,92187		
200,0/1	0,02781			89,25976		
200,0/2	0,03192	0,03055	0,00237	87,67403	88,20261	0,91552
200,0/3	0,03192			87,67403		
400,0/1	0			100,00000		
400,0/2	0	0	0	100,00000	100,00000	0
400,0/3	0			100,00000		

Tabela 13 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro área foliar total, referentes ao teste 1 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,27694			0		
Controle/2	0,28454	0,28060	0,00380	0	0	0
Controle/3	0,28033			0		
1,56/1	0,27523			1,91376		
1,56/2	0,27956	0,27830	0,00268	0,37063	0,81848	0,95377
1,56/3	0,28012			0,17106		
3,1/1	0,26913			4,08989		
3,1/2	0,27428	0,27256	0,00298	2,25160	2,86436	1,06133
3,1/3	0,27428			2,25160		
6,2/1	0,27443			2,20025		
6,2/2	0,27191	0,27359	0,00145	3,09820	2,49957	0,51843
6,2/3	0,27443			2,20025		
12,5/1	0,26381			5,98345		
12,5/2	0,26310	0,26334	0,00041	6,23720	6,15262	0,14650
12,5/3	0,26310			6,23720		
25,0/1	0,23772			15,28094		
25,0/2	0,24972	0,24472	0,00624	11,00444	12,78631	2,22556
25,0/3	0,24672			12,07356		
50,0/1	0,21665			22,79015		
50,0/2	0,195208	0,20010	0,01474	30,43275	28,69206	5,25254
50,0/3	0,18841			32,85330		
100,0/1	0,10894			61,17516		
100,0/2	0,12702	0,11726	0,00912	54,73402	58,21196	3,25128
100,0/3	0,11581			58,72671		
200,0/1	0,01121			96,00335		
200,0/2	-0,00727	0,01353	0,02204	102,58978	95,17861	7,85606
200,0/3	0,03664			86,94272		
400,0/1	-0,02001			107,13096		
400,0/2	0,01518	-0,00552	0,01839	94,59139	101,96651	6,55557
400,0/3	-0,01172			104,17718		

Tabela 14 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro área foliar total, referentes ao teste 2 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,27038			0		
Controle/2	0,25478	0,26059	0,00852	0	0	0
Controle/3	0,25663			0		
1,56/1	0,24614			5,54810		
1,56/2	0,24384	0,24488	0,00116	6,43122	6,02978	0,44700
1,56/3	0,24467			6,11002		
3,1/1	0,22743			12,72757		
3,1/2	0,23712	0,23401	0,00570	9,00951	10,20160	2,18870
3,1/3	0,23749			8,86773		
6,2/1	0,19553			24,96758		
6,2/2	0,19829	0,19768	0,00192	23,90699	24,14214	0,73658
6,2/3	0,19922			23,55184		
12,5/1	0,21802			16,33569		
12,5/2	0,19874	0,20496	0,01132	23,73641	21,34862	4,34295
12,5/3	0,19812			23,97377		
25,0/1	0,17337			33,47208		
25,0/2	0,18715	0,18097	0,00700	28,18377	30,55616	2,68573
25,0/3	0,18238			30,01262		
50,0/1	0,16364			37,20627		
50,0/2	0,17176	0,16710	0,00419	34,08976	35,87725	1,60804
50,0/3	0,16591			36,33572		
100,0/1	0,06250			76,01786		
100,0/2	0,06715	0,06149	0,00622	74,23055	76,40277	2,38805
100,0/3	0,05483			78,95990		
200,0/1	-0,00482			101,84962		
200,0/2	-0,00286	0,00040	0,00741	101,09907	99,84624	2,84483
200,0/3	0,00889			96,59001		
400,0/1	0,00063			99,75970		
400,0/2	-0,01253	-0,00470	0,00693	104,81009	101,80415	2,65894
400,0/3	-0,00219			100,84265		

Tabela 15 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro área foliar total, referentes ao teste 3 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,25171			0		
Controle/2	0,24676	0,24242	0,01206	0	0	0
Controle/3	0,22879			0		
1,56/1	0,22074			8,94478		
1,56/2	0,22798	0,22365	0,00382	5,95623	7,74284	1,57774
1,56/3	0,22223			8,32752		
3,1/1	0,20768			14,33071		
3,1/2	0,21959	0,21616	0,00738	9,41595	10,83355	3,04665
3,1/3	0,22120			8,75401		
6,2/1	0,19889			17,95582		
6,2/2	0,20603	0,20978	0,01317	15,01191	13,46383	5,43401
6,2/3	0,22442			7,42376		
12,5/1	0,19996			17,51581		
12,5/2	0,20566	0,19801	0,00878	15,16383	18,31775	3,62209
12,5/3	0,18842			22,27361		
25,0/1	0,19169			20,92587		
25,0/2	0,19447	0,19148	0,00310	19,77822	21,01241	1,27967
25,0/3	0,18828			22,33316		
50,0/1	0,14760			39,11417		
50,0/2	0,16131	0,15707	0,00822	33,45885	35,20687	3,39006
50,0/3	0,16231			33,04760		
100,0/1	0,08881			63,36692		
100,0/2	0,10683	0,09188	0,01368	55,93214	62,10042	5,64265
100,0/3	0,079994			67,00219		
200,0/1	0,00440			98,18624		
200,0/2	-0,01597	-0,00502	0,01027	106,58773	102,07180	4,23607
200,0/3	-0,00349			101,44142		
400,0/1	-0,03748			115,46168		
400,0/2	-0,04729	-0,03848	0,00835	119,50849	115,87535	3,44498
400,0/3	-0,03068			112,65589		

Tabela 16 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro peso fresco, referentes ao teste 1 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,30975			0		
Controle/2	0,30452	0,30862	0,00367	0	0	0
Controle/3	0,31160			0		
1,56/1	0,30729			0,43095		
1,56/2	0,30443	0,30723	0,00276	1,35766	0,45147	0,89610
1,56/3	0,30996			-0,43419		
3,1/1	0,31021			-0,51551		
3,1/2	0,30834	0,29981	0,01642	0,09156	2,85587	5,32231
3,1/3	0,28087			8,99154		
6,2/1	0,29604			4,07755		
6,2/2	0,30306	0,29628	0,00666	1,80327	4,00028	2,15941
6,2/3	0,28973			6,12002		
12,5/1	0,29292			5,08752		
12,5/2	0,30403	0,29411	0,00939	1,48730	4,70278	3,04141
12,5/3	0,28537			7,53352		
25,0/1	0,25528			17,28305		
25,0/2	0,27385	0,27038	0,01370	11,26849	12,39142	4,43803
25,0/3	0,28201			8,62271		
50,0/1	0,22910			25,76676		
50,0/2	0,18745	0,21032	0,02112	39,26083	31,85109	6,84398
50,0/3	0,21441			30,52566		
100,0/1	0,07216			76,61990		
100,0/2	0,09276	0,08729	0,01328	69,94280	71,71466	4,30226
100,0/3	0,09696			68,58128		
200,0/1	-0,06633			121,49202		
200,0/2	-0,13090	-0,09239	0,03404	142,41374	129,93652	11,02845
200,0/3	-0,07994			125,90379		
400,0/1	-0,17897			157,98854		
400,0/2	-0,17897	-0,17897	0	157,98854	157,98854	0
400,0/3	-0,17897			157,98854		

Tabela 17 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro peso fresco, referentes ao teste 2 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,34526			0		
Controle/2	0,34923	0,34791	0,00229	0	0	0
Controle/3	0,34923			0		
1,56/1	0,35309			-1,49006		
1,56/2	0,33627	0,34770	0,00990	3,34628	0,06136	2,84629
1,56/3	0,35373			-1,67215		
3,1/1	0,32743			5,88700		
3,1/2	0,31962	0,32533	0,00500	8,13133	6,49026	1,43772
3,1/3	0,32894			5,45246		
6,2/1	0,30528			12,25305		
6,2/2	0,30616	0,30557	0,00051	11,99880	12,16830	0,14679
6,2/3	0,30528			12,25305		
12,5/1	0,29893			14,07831		
12,5/2	0,29706	0,29705	0,00188	14,61506	14,61743	0,540318
12,5/3	0,29517			15,15893		
25,0/1	0,29893			14,07831		
25,0/2	0,29985	0,29893	0,00093	13,81254	14,07888	0,26664
25,0/3	0,29800			14,34581		
50,0/1	0,26210			24,66515		
50,0/2	0,26089	0,26089	0,00121	25,01166	25,01264	0,34799
50,0/3	0,25968			25,36112		
100,0/1	0,11332			67,42878		
100,0/2	0,08727	0,10792	0,01855	74,91517	68,97993	5,33167
100,0/3	0,12317			64,59583		
200,0/1	0,02094			93,98024		
200,0/2	0	0,01810	0,016867	100,00000	94,79589	4,84802
200,0/3	0,03337			90,40743		
400,0/1	-0,15889			104,56709		
400,0/2	-0,15889	-0,01878	0,00500	104,56709	105,39687	1,43722
400,0/3	-0,02455			107,05642		

Tabela 18 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro peso fresco, referentes ao teste 3 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,35623					
Controle/2	0,35808	0,35767	0,00128	0	0	0
Controle/3	0,358700					
1,56/1	0,35623			0,40208		
1,56/2	0,35053	0,35433	0,00329	1,99638	0,93352	0,92047
1,56/3	0,35623			0,40208		
3,1/1	0,32743			8,45563		
3,1/2	0,32667	0,32537	0,00293	8,66865	9,03182	0,82045
3,1/3	0,32201			9,97118		
6,2/1	0,32279			9,75112		
6,2/2	0,32743	0,32434	0,00267	8,45563	9,31929	0,74795
6,2/3	0,32279			9,75112		
12,5/1	0,31389			12,24116		
12,5/2	0,31472	0,31389	0,00083	12,00826	12,24161	0,23357
12,5/3	0,31305			12,47541		
25,0/1	0,31389			12,24116		
25,0/2	0,31305	0,31248	0,00176	12,47541	12,63437	0,49233
25,0/3	0,31051			13,18654		
50,0/1	0,24691			30,96678		
50,0/2	0,24557	0,24511	0,00207	31,34181	31,47040	0,57873
50,0/3	0,24285			32,10261		
100,0/1	0,13239			62,98441		
100,0/2	0,12631	0,13418	0,00889	64,68427	62,48537	2,48626
100,0/3	0,14383			59,78744		
200,0/1	0,02094			94,14454		
200,0/2	0	0,01810	0,01687	100,00000	94,93793	4,71570
200,0/3	0,03337			90,669243		
400,0/1	-0,09169			125,63614		
400,0/2	-0,04362	-0,06700	0,02406	112,19718	118,72913	6,72732
400,0/3	-0,06567			118,35407		

Tabela 19 – Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro número de frondes, referentes ao teste 1 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,26473			0		
Controle/2	0,26461	0,26274	0,00334	0	0	0
Controle/3	0,25888			0		
0,78/1	0,26456			-0,69270		
0,78/2	0,25785	0,26236	0,00390	1,86115	0,14590	1,31528
0,78/3	0,26466			-0,73076		
1,56/1	0,23392			10,96960		
1,56/2	0,23445	0,23186	0,00403	10,76910	11,75371	1,53504
1,56/3	0,22721			13,52244		
3,1/1	0,23065			12,21458		
3,1/2	0,23044	0,22970	0,00147	12,29218	12,57632	0,56070
3,1/3	0,22800			13,22222		
6,2/1	0,21961			16,41667		
6,2/2	0,21759	0,21724	0,00256	17,18390	17,31793	0,97520
6,2/3	0,21452			18,35321		
12,5/1	0,21613			17,73848		
12,5/2	0,21503	0,21575	0,00064	18,16030	17,88311	0,24012
12,5/3	0,21610			17,75056		
25,0/1	0,20739			21,06643		
25,0/2	0,21433	0,21012	0,00370	18,42551	20,02715	1,40741
25,0/3	0,20864			20,58950		
50,0/1	0,16276			38,05144		
50,0/2	0,14886	0,15676	0,00714	43,34222	40,33630	2,71809
50,0/3	0,15865			39,61525		
100,0/1	0,07679			70,77324		
100,0/2	0,06165	0,06912	0,00757	76,53377	73,69241	2,88105
100,0/3	0,06892			73,77020		
200,0/1	0,05598			78,69188		
200,0/2	0,04483	0,05075	0,00561	82,93811	80,68312	2,13536
200,0/3	0,05145			80,41936		

Tabela 20 – Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro número de frondes, referentes ao teste 2 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,25198			0		
Controle/2	0,25719	0,25247	0,00449	0	0	0
Controle/3	0,24824			0		
0,78/1	0,24925			1,27468		
0,78/2	0,25387	0,25155	0,00231	-0,5529	0,36531	0,91384
0,78/3	0,25153			0,37419		
1,56/1	0,23416			7,25171		
1,56/2	0,23907	0,23592	0,00274	5,30624	6,55516	1,08400
1,56/3	0,23453			7,10753		
3,1/1	0,22997			8,91402		
3,1/2	0,22675	0,22928	0,00227	10,18847	9,18394	0,90043
3,1/3	0,23114			8,44934		
6,2/1	0,21347			15,44692		
6,2/2	0,20673	0,20717	0,00609	18,11715	17,94154	2,41161
6,2/3	0,20132			20,26055		
12,5/1	0,21120			16,34810		
12,5/2	0,20721	0,20894	0,00204	17,92677	17,24154	0,80967
12,5/3	0,20842			17,44975		
25,0/1	0,19463			22,90981		
25,0/2	0,20618	0,19969	0,00591	18,33452	20,90473	2,33941
25,0/3	0,19827			21,46986		
50,0/1	0,17773			29,60472		
50,0/2	0,18809	0,17955	0,00778	25,50012	28,88100	3,08338
50,0/3	0,17285			31,53815		
100,0/1	0,05961			76,38790		
100,0/2	0,07080	0,06550	0,00561	71,96105	74,05495	2,22308
100,0/3	0,06611			73,81590		
200,0/1	0,05983			76,30365		
200,0/2	0,05540	0,05693	0,00251	78,05732	77,45075	0,99397
200,0/3	0,05556			77,99129		

Tabela 21 – Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro número de frondes, referentes ao teste 3 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,27448			0		
Controle/2	0,26317	0,27067	0,00649	0	0	0
Controle/3	0,27435			0		
0,78/1	0,26907			0,59125		
0,78/2	0,26876	0,26711	0,00312	0,70564	1,31342	1,15320
0,78/3	0,26351			2,64338		
1,56/1	0,25242			6,74193		
1,56/2	0,25914	0,25661	0,00365	4,25970	5,19338	1,35052
1,56/3	0,25828			4,57852		
3,1/1	0,24414			9,80224		
3,1/2	0,23605	0,23865	0,00476	12,79006	11,83062	1,75749
3,1/3	0,23575			12,89957		
6,2/1	0,23056			14,81949		
6,2/2	0,22417	0,22511	0,00504	17,17842	16,83243	1,86418
6,2/3	0,22060			18,49937		
12,5/1	0,20440			24,48507		
12,5/2	0,20916	0,20435	0,00482	22,72593	24,50035	1,78210
12,5/3	0,19951			26,29004		
25,0/1	0,20646			23,72422		
25,0/2	0,20645	0,20505	0,00242	23,72563	24,24232	0,89615
25,0/3	0,20225			25,27710		
50,0/1	0,18505			31,63286		
50,0/2	0,18188	0,18473	0,00270	32,80252	31,74956	0,99973
50,0/3	0,18727			30,81330		
100,0/1	0,06572			75,71912		
100,0/2	0,06572	0,06565	0,00013	75,71912	75,74674	0,04784
100,0/3	0,06550			75,80200		
200,0/1	0,05634			79,18598		
200,0/2	0,04951	0,05621	0,00663	81,70775	79,23353	2,45080
200,0/3	0,06278			76,80685		

Tabela 22 – Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro área foliar total, referentes ao teste 1 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,28703			0		
Controle/2	0,26733	0,27466	0,01077	0	0	0
Controle/3	0,26963			0		
0,78/1	0,27236			0,83740		
0,78/2	0,26958	0,27031	0,00180	1,84956	1,58499	0,65658
0,78/3	0,26898			2,06801		
1,56/1	0,22458			18,23451		
1,56/2	0,24537	0,23729	0,01114	10,66485	13,60626	4,05697
1,56/3	0,24192			11,91942		
3,1/1	0,23526			14,34524		
3,1/2	0,24217	0,23126	0,01336	11,83001	15,80099	4,86505
3,1/3	0,21636			21,22773		
6,2/1	0,21994			19,92445		
6,2/2	0,22533	0,22009	0,00517	17,96019	19,86848	1,88092
6,2/3	0,21500			21,72079		
12,5/1	0,23301			15,16310		
12,5/2	0,22550	0,22648	0,00611	17,89988	17,54364	2,22393
12,5/3	0,22092			19,56795		
25,0/1	0,20038			27,04540		
25,0/2	0,22116	0,20580	0,01349	19,47895	25,07209	4,91326
25,0/3	0,19586			28,69192		
50,0/1	0,12957			52,82466		
50,0/2	0,15340	0,14023	0,01211	44,14897	48,94501	4,40984
50,0/3	0,13771			49,86140		
100,0/1	0,05276			80,78928		
100,0/2	0,09926	0,07643	0,02326	63,86233	72,17311	8,46760
100,0/3	0,07727			71,86771		
200,0/1	0,01724			93,72203		
200,0/2	0,01456	0,01656	0,00177	94,69966	93,96881	0,64395
200,0/3	0,01789			93,48475		

Tabela 23 – Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro área foliar total, referentes ao teste 2 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,20025			0		
Controle/2	0,22091	0,21833	0,01693	0	0	0
Controle/3	0,23382			0		
0,78/1	0,22294			-2,11508		
0,78/2	0,23983	0,23263	0,00871	-9,84740	-6,55220	3,99064
0,78/3	0,23512			-7,69414		
1,56/1	0,20991			3,85668		
1,56/2	0,21743	0,21683	0,00665	0,41169	0,68405	3,04560
1,56/3	0,22316			-2,21623		
3,1/1	0,20670			5,32274		
3,1/2	0,20989	0,20924	0,00228	3,86571	4,16242	1,04408
3,1/3	0,21112			3,29880		
6,2/1	0,19077			12,61914		
6,2/2	0,19214	0,18824	0,00561	11,99527	13,78056	2,57092
6,2/3	0,18181			16,72728		
12,5/1	0,19941			8,66485		
12,5/2	0,20385	0,19605	0,00991	6,63251	10,20436	4,54171
12,5/3	0,18489			15,31572		
25,0/1	0,18863			13,60206		
25,0/2	0,18520	0,18768	0,00216	15,17299	14,03796	0,99174
25,0/3	0,18920			13,33883		
50,0/1	0,14803			32,19612		
50,0/2	0,14429	0,14686	0,00223	33,91280	32,73235	1,02372
50,0/3	0,14827			32,08813		
100,0/1	0,06199			71,60633		
100,0/2	0,06096	0,06239	0,00168	72,07915	71,42089	0,76795
100,0/3	0,06424			70,57720		
200,0/1	0,07172			67,15071		
200,0/2	0,07492	0,07196	0,00284	65,68363	67,03929	1,30352
200,0/3	0,06924			68,28353		

Tabela 24 – Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro área foliar total, referentes ao teste 3 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,24498			0		
Controle/2	0,25464	0,25224	0,00640	0	0	0
Controle/3	0,25709			0		
0,78/1	0,23178			8,10930		
0,78/2	0,23578	0,23586	0,00412	6,52614	6,49348	1,63240
0,78/3	0,24002			4,84500		
1,56/1	0,24214			4,00536		
1,56/2	0,24406	0,24443	0,00250	3,24328	3,09644	0,99054
1,56/3	0,24709			2,04067		
3,1/1	0,22125			12,28417		
3,1/2	0,22126	0,21846	0,00484	12,28307	13,39180	1,91942
3,1/3	0,21287			15,60816		
6,2/1	0,20710			17,89618		
6,2/2	0,20525	0,20594	0,00101	18,62934	18,35552	0,40024
6,2/3	0,20547			18,54104		
12,5/1	0,18992			24,70504		
12,5/2	0,19404	0,18795	0,00727	23,07406	25,48577	2,88250
12,5/3	0,17990			28,67822		
25,0/1	0,18486			26,71275		
25,0/2	0,17069	0,17517	0,00840	32,33157	30,55556	3,33114
25,0/3	0,16995			32,62235		
50,0/1	0,15525			38,44976		
50,0/2	0,16612	0,16283	0,00658	34,14092	35,44716	2,60763
50,0/3	0,16711			33,75081		
100,0/1	0,080800			67,96730		
100,0/2	0,07775	0,08146	0,00409	69,17507	67,70329	1,62001
100,0/3	0,08584			65,96749		
200,0/1	0,01046			95,85362		
200,0/2	0,00337	0,00659	0,00359	98,66521	97,38652	1,42293
200,0/3	0,00595			97,64074		

Tabela 25 – Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro peso fresco, referentes ao teste 1 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,32688			0		
Controle/2	0,32812	0,32785	0,00086	0	0	0
Controle/3	0,32853			0		
0,78/1	0,32532			0,77169		
0,78/2	0,31965	0,32343	0,00327	2,50114	1,34817	0,99850
0,78/3	0,32532			0,77169		
1,56/1	0,26834			18,15096		
1,56/2	0,26326	0,27139	0,01001	19,70044	17,21980	3,05458
1,56/3	0,28258			13,80801		
3,1/1	0,28314			13,63612		
3,1/2	0,28314	0,28103	0,00365	13,63612	14,27917	1,11380
3,1/3	0,27682			15,56528		
6,2/1	0,26131			20,29600		
6,2/2	0,26131	0,26131	0,00000	20,29600	20,29600	0,00000
6,2/3	0,26131			20,29600		
12,5/1	0,25732			21,51211		
12,5/2	0,25596	0,25991	0,00570	21,92514	20,72094	1,74033
12,5/3	0,26645			18,72558		
25,0/1	0,24756			24,48908		
25,0/2	0,24464	0,24487	0,00258	25,37838	25,30831	0,78654
25,0/3	0,24242			26,05748		
50,0/1	0,19599			40,22002		
50,0/2	0,18964	0,19455	0,00438	42,15698	40,65670	1,33658
50,0/3	0,19804			39,59304		
100,0/1	0,08622			73,70132		
100,0/2	0,10304	0,09677	0,00919	68,56899	70,48291	2,80383
100,0/3	0,10105			69,17843		
200,0/1	-0,01280			103,90480		
200,0/2	0,01175	0,00480	0,01536	96,41652	98,53532	4,68441
200,0/3	0,01546			95,28466		

Tabela 26 – Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, avaliados por meio do parâmetro peso fresco, referentes ao teste 3 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ⁻¹) / Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,34593			0		
Controle/2	0,34660	0,34526	0,00178	0	0	0
Controle/3	0,34324			0		
0,78/1	0,33980			1,58186		
0,78/2	0,34459	0,34410	0,00408	0,19258	0	0
0,78/3	0,34792			-0,77196		
1,56/1	0,33338			3,43950		
1,56/2	0,34187	0,33995	0,00585	0,98074	0,33416	1,18328
1,56/3	0,34459			0,19258		
3,1/1	0,31801			7,89293		
3,1/2	0,31305	0,31554	0,00248	9,32812	1,53760	1,69357
3,1/3	0,31555			8,60430		
6,2/1	0,29517			14,50700		
6,2/2	0,29131	0,28887	0,00782	15,62536	8,60845	0,71760
6,2/3	0,28012			18,86649		
12,5/1	0,26210			24,08626		
12,5/2	0,25721	0,26281	0,00599	25,50100	16,33295	2,26425
12,5/3	0,26912			22,05091		
25,0/1	0,25845			25,14275		
25,0/2	0,25721	0,25762	0,00071	25,50100	23,87939	1,73432
25,0/3	0,25721			25,50100		
50,0/1	0,24285			29,66109		
50,0/2	0,24008	0,24006	0,00280	30,46455	25,38158	0,20683
50,0/3	0,23725			31,28392		
100,0/1	0,14383			58,34144		
100,0/2	0,16427	0,15584	0,01068	52,42035	30,46985	0,81143
100,0/3	0,15943			53,82310		
200,0/1	0,09130			73,55679		
200,0/2	0,07887	0,08846	0,00853	77,15706	54,86163	3,09414
200,0/3	0,09521			72,42310		

Tabela 27 - Valores de inibição do crescimento de *L. minor*, referentes ao teste de mistura dos fármacos losartana potássica e cloridrato de propranolol.

Concentração de efeito combinado (CE _x /2) - Repetição	μ	Média de μ	σ	I _r (%)	Média de I _r (%)	σ
Controle/1	0,271496					
Controle/2	0,26489	0,26212	0,01103	0	0	0
Controle/3	0,24997					
CE ₁₀ /2 - 1	0,24102			8,04665		
CE ₁₀ /2 - 2	0,25301	0,24693	0,00600	3,47492	5,79424	2,28660
CE ₁₀ /2 - 3	0,24675			5,86116		
CE ₂₀ /2 - 1	0,24629			6,03844		
CE ₂₀ /2 - 2	0,25361	0,24342	0,01188	3,24369	7,13072	4,53300
CE ₂₀ /2 - 3	0,23037			12,11002		
CE ₅₀ /2 - 1	0,19222			26,66688		
CE ₅₀ /2 - 2	0,19590	0,19248	0,00330	25,26024	26,56615	1,25857
CE ₅₀ /2 - 3	0,18932			27,77133		
CE ₇₀ /2 - 1	0,15692			40,13360		
CE ₇₀ /2 - 2	0,15721	0,15494	0,00367	40,02403	40,88670	1,40037
CE ₇₀ /2 - 3	0,15071			42,50247		
CE ₈₀ /2 - 1	0,13403			48,86552		
CE ₈₀ /2 - 2	0,13364	0,12966	0,00724	49,01330	50,53389	2,76272
CE ₈₀ /2 - 3	0,121300			53,72286		

APÊNDICE C – Dados brutos referentes aos testes de sensibilidade e aos testes de ação individual e de ação combinada dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica

Tabela 1 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 1 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	18	24	30	43	51	67	90
Controle/2	16	21	28	39	47	61	83
Controle/3	15	20	28	40	47	60	77
1500/1	14	17	28	30	42	55	67
1500/2	15	18	26	34	40	56	64
1500/3	16	21	24	32	39	51	65
2500/1	16	18	25	33	39	45	57
2500/2	14	18	23	32	35	43	52
2500/3	14	16	23	28	33	43	51
3500/1	13	16	21	27	29	31	37
3500/2	12	16	16	23	25	27	33
3500/3	14	16	18	25	25	31	37
4500/1	12	14	15	21	23	25	25
4500/2	12	15	16	22	20	23	25
4500/3	12	16	15	21	24	24	26
5500/1	12	15	15	18	18	21	22
5500/2	12	15	15	18	18	20	21
5500/3	13	14	16	18	15	17	18
6500/1	12	13	15	16	15	15	15
6500/2	12	15	15	16	16	16	15
6500/3	13	16	15	17	16	16	16
7500/1	12	13	15	16	15	15	15
7500/2	12	14	15	16	16	16	15
7500/3	12	16	15	17	16	16	16

Tabela 2 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 2 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	22	28	40	50	59	73
Controle/2	16	22	28	38	50	57	79
Controle/3	16	22	27	36	48	56	75
1500/1	16	18	25	32	43	52	60
1500/2	16	18	27	32	46	52	60
1500/3	16	17	26	31	43	50	59
2500/1	16	18	25	28	34	44	48
2500/2	15	16	19	25	28	39	45
2500/3	15	16	24	27	30	43	50
3500/1	14	16	18	22	24	30	37
3500/2	14	16	18	24	24	30	36
3500/3	16	16	18	24	24	26	30
4500/1	13	15	16	18	19	22	23
4500/2	14	15	16	17	17	21	22
4500/3	15	15	16	19	21	23	25
5500/1	12	13	16	20	19	20	17
5500/2	12	13	15	19	20	20	22
5500/3	12	13	16	20	20	21	21
6500/1	12	13	16	16	16	16	16
6500/2	12	13	16	16	16	16	17
6500/3	12	13	16	16	16	16	15
7500/1	12	12	16	16	16	15	15
7500/2	12	13	16	16	16	16	15
7500/3	12	12	16	16	15	15	15

Tabela 3 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 3 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	24	28	39	48	59	65
Controle/2	16	24	28	37	49	60	69
Controle/3	16	24	28	38	50	59	69
1500/1	16	21	27	33	40	51	54
1500/2	16	22	26	33	40	52	56
1500/3	16	21	27	33	40	52	61
2500/1	15	19	24	26	32	41	43
2500/2	14	19	24	26	29	36	42
2500/3	14	20	24	27	30	40	46
3500/1	14	18	21	24	26	28	34
3500/2	14	17	21	23	25	25	30
3500/3	13	18	20	24	26	30	33
4500/1	12	16	18	20	22	22	23
4500/2	13	15	17	21	23	23	23
4500/3	12	15	17	19	20	20	20
5500/1	12	15	16	16	17	16	15
5500/2	12	15	16	16	17	16	16
5500/3	12	15	16	16	16	15	14
6500/1	12	15	16	16	16	15	13
6500/2	12	15	16	16	16	16	15
6500/3	12	15	16	16	16	14	12
7500/1	12	14	16	16	16	16	15
7500/2	12	16	16	16	16	16	14
7500/3	12	14	16	16	16	15	15

Tabela 4 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 4 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	23	28	40	50	61	82
Controle/2	16	21	28	40	50	59	80
Controle/3	16	24	28	38	50	59	78
1500/1	15	19	26	32	42	50	65
1500/2	16	22	25	31	40	51	64
1500/3	16	22	27	32	41	51	64
2500/1	15	19	24	28	34	43	49
2500/2	15	16	23	28	32	42	50
2500/3	16	17	23	28	34	42	50
3500/1	13	16	18	24	26	30	36
3500/2	15	16	17	24	26	28	35
3500/3	13	16	16	23	25	30	36
4500/1	13	16	16	21	22	22	25
4500/2	12	16	16	19	23	24	25
4500/3	14	15	16	21	22	24	25
5500/1	13	15	16	16	17	16	20
5500/2	12	15	16	16	17	17	17
5500/3	12	15	15	16	16	18	20
6500/1	12	14	16	16	16	16	14
6500/2	12	15	16	16	16	16	16
6500/3	12	15	15	15	16	14	16
7500/1	12	14	15	16	15	15	15
7500/2	12	14	16	16	16	16	16
7500/3	12	14	15	16	16	15	14

Tabela 5 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 5 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	21	29	36	49	59	76
Controle/2	16	22	28	40	50	62	83
Controle/3	16	23	28	42	49	61	83
1500/1	16	21	27	33	45	51	65
1500/2	16	19	26	32	42	50	63
1500/3	16	23	27	33	43	53	63
2500/1	16	18	23	28	32	42	47
2500/2	15	17	24	28	33	40	48
2500/3	14	18	24	27	32	41	50
3500/1	15	16	19	23	24	26	34
3500/2	14	16	19	23	24	27	35
3500/3	12	16	19	24	24	29	35
4500/1	13	15	18	20	22	22	24
4500/2	13	16	16	21	21	20	24
4500/3	13	16	17	20	21	21	24
5500/1	13	15	16	17	16	17	17
5500/2	12	15	18	17	16	17	16
5500/3	12	14	15	15	17	17	17
6500/1	12	15	16	16	16	16	16
6500/2	12	15	16	16	15	15	15
6500/3	12	14	16	16	16	16	14
7500/1	12	14	14	15	16	16	15
7500/2	12	14	16	16	16	15	15
7500/3	12	15	16	16	15	16	15

Tabela 6 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 6 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	24	28	36	47	57	78
Controle/2	16	24	28	37	48	59	80
Controle/3	16	24	28	35	47	55	75
1500/1	16	22	27	35	42	48	64
1500/2	16	23	27	35	44	51	67
1500/3	16	24	27	36	46	53	67
2500/1	16	19	24	29	39	46	53
2500/2	15	19	24	30	38	46	51
2500/3	15	19	24	29	38	45	50
3500/1	14	17	21	24	28	33	43
3500/2	15	16	20	24	28	33	43
3500/3	13	18	20	24	27	33	39
4500/1	13	16	17	22	24	24	25
4500/2	13	16	16	23	24	24	25
4500/3	12	16	16	21	21	22	25
5500/1	12	15	16	17	18	17	19
5500/2	12	14	15	16	16	16	17
5500/3	12	15	16	17	17	17	19
6500/1	12	16	16	15	16	16	15
6500/2	13	16	16	16	16	15	14
6500/3	12	15	16	16	14	14	14
7500/1	12	14	15	15	13	14	14
7500/2	12	15	16	15	15	14	14
7500/3	12	15	15	15	16	14	14

Tabela 7 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 7 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	23	28	36	47	57	69
Controle/2	16	24	28	39	48	58	76
Controle/3	16	24	28	39	48	57	74
1500/1	16	23	27	36	42	50	62
1500/2	16	22	28	36	42	51	63
1500/3	16	22	27	36	44	49	61
2500/1	16	19	24	31	41	47	55
2500/2	16	18	24	31	39	46	55
2500/3	14	18	24	31	37	46	53
3500/1	14	17	20	23	27	34	41
3500/2	14	16	21	24	27	34	40
3500/3	13	16	21	24	27	34	37
4500/1	13	16	16	20	22	22	23
4500/2	13	15	17	21	21	22	23
4500/3	12	16	16	21	21	21	23
5500/1	12	16	16	19	20	21	20
5500/2	12	15	16	20	21	21	21
5500/3	12	15	16	20	20	20	20
6500/1	12	14	15	14	14	13	13
6500/2	12	15	16	16	15	13	13
6500/3	12	14	15	14	13	14	14
7500/1	12	15	16	16	14	14	14
7500/2	12	14	15	14	13	13	13
7500/3	12	14	15	14	15	13	13

Tabela 8 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 8 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	24	28	38	49	60	72
Controle/2	16	24	28	38	48	60	73
Controle/3	16	24	27	36	48	59	74
1500/1	16	24	28	35	47	55	67
1500/2	16	22	27	35	44	56	64
1500/3	16	22	28	33	44	52	61
2500/1	16	19	24	28	36	43	51
2500/2	16	18	24	28	36	41	49
2500/3	16	19	24	28	35	43	50
3500/1	14	17	21	25	30	33	38
3500/2	14	17	22	24	30	34	40
3500/3	15	17	21	24	30	38	40
4500/1	13	16	18	20	21	22	23
4500/2	12	16	17	20	24	22	20
4500/3	13	15	17	20	22	22	22
5500/1	13	16	16	18	20	21	21
5500/2	12	15	15	20	21	21	21
5500/3	12	15	15	20	19	22	21
6500/1	12	15	15	16	16	15	14
6500/2	12	15	15	15	15	15	15
6500/3	12	15	15	15	14	14	14
7500/1	12	15	15	16	16	15	12
7500/2	12	15	14	15	14	14	13
7500/3	12	14	14	14	14	14	14

Tabela 9 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 9 de sensibilidade ao NaCl.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	17	24	28	38	50	60	72
Controle/2	16	24	28	38	50	60	75
Controle/3	16	24	29	40	50	61	78
1500/1	16	21	25	33	45	55	60
1500/2	16	21	25	35	44	51	58
1500/3	16	24	27	35	45	54	64
2500/1	15	17	22	26	36	43	45
2500/2	16	17	24	26	34	42	45
2500/3	16	18	24	25	30	43	46
3500/1	15	16	22	23	28	33	38
3500/2	13	17	21	24	28	35	40
3500/3	13	16	20	24	28	35	39
4500/1	13	16	17	21	22	22	25
4500/2	12	16	17	18	21	22	24
4500/3	13	16	19	20	24	23	24
5500/1	13	15	16	16	18	21	21
5500/2	12	16	16	16	18	18	18
5500/3	13	16	15	17	18	21	22
6500/1	12	16	16	16	16	15	15
6500/2	12	15	16	14	15	14	14
6500/3	12	16	15	15	15	15	15
7500/1	12	16	16	16	16	15	15
7500/2	12	14	15	14	15	14	14
7500/3	12	15	16	15	15	15	15

Tabela 10 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 1 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	21	28	39	48	59	76
Controle/2	16	22	28	39	45	57	75
Controle/3	16	22	28	39	51	67	92
1,56/1	16	24	28	38	48	60	89
1,56/2	16	24	28	38	49	61	90
1,56/3	16	24	28	38	48	60	89
3,1/1	16	21	28	34	40	52	63
3,1/2	16	22	28	39	46	56	68
3,1/3	16	21	28	40	51	63	88
6,2/1	16	21	26	30	39	53	60
6,2/2	16	21	26	32	40	56	63
6,2/3	16	22	28	33	43	50	67
12,5/1	16	20	28	29	38	52	63
12,5/2	16	20	27	31	43	50	60
12,5/3	16	21	25	35	39	51	61
25,0/1	16	20	27	34	37	43	59
25,0/2	16	20	24	28	42	55	62
25,0/3	16	21	25	29	40	50	62
50,0/1	16	18	24	33	36	42	55
50,0/2	16	19	25	29	35	40	53
50,0/3	16	20	27	29	39	46	56
100,0/1	16	20	22	25	27	32	32
100,0/2	16	19	24	26	28	31	35
100,0/3	16	18	22	25	26	35	31
200,0/1	13	16	15	15	15	15	15
200,0/2	13	16	15	16	15	16	15
200,0/3	14	16	15	16	15	14	15
400,0/1	12	15	12	12	12	12	12
400,0/2	12	16	12	12	12	12	12
400,0/3	12	15	12	12	12	12	12

Tabela 11 – Área foliar total (mm²) de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 1 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Área foliar total (mm ²)							
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	57,76	70,88	103,23	140,32	160,88	223,19	319,30	411,87
Controle/2	61,10	76,26	96,97	122,98	143,13	223,71	294,72	453,38
Controle/3	57,33	88,97	108,32	128,15	138,10	234,49	332,03	403,47
1,56/1	51,25	42,59	72,55	97,58	137,59	180,36	262,19	359,42
1,56/2	50,30	56,26	75,87	100,88	136,13	210,36	304,41	359,10
1,56/3	42,59	54,89	68,64	108,85	138,18	256,32	296,83	332,13
3,1/1	57,76	72,49	111,07	129,23	171,89	182,11	370,36	409,78
3,1/2	63,10	85,29	91,71	137,65	178,24	209,58	272,66	455,15
3,1/3	57,33	79,24	111,76	132,45	160,41	253,16	306,82	327,64
6,2/1	54,79	62,31	91,51	106,63	175,57	208,05	196,36	393,86
6,2/2	59,08	74,34	97,72	109,57	136,00	217,93	209,66	327,91
6,2/3	57,78	79,61	97,27	111,07	171,50	183,64	180,72	412,22
12,5/1	54,88	73,91	100,26	114,07	140,97	173,04	267,19	366,38
12,5/2	54,99	77,27	112,68	121,45	158,51	208,03	270,91	345,05
12,5/3	60,76	77,37	94,93	120,44	150,32	194,40	282,60	331,98
25,0/1	58,07	86,14	99,31	123,05	148,19	192,37	283,86	308,24
25,0/2	57,39	78,97	101,28	122,64	137,09	221,29	231,05	366,17
25,0/3	51,39	82,25	105,32	118,90	159,77	165,54	307,64	377,59
50,0/1	46,86	68,64	98,96	107,02	117,23	156,89	194,84	211,94
50,0/2	58,61	77,97	92,66	105,53	119,58	155,79	210,24	229,83
50,0/3	64,19	67,03	81,73	119,16	138,20	146,00	207,41	254,52
100,0/1	64,69	81,78	85,90	97,71	99,03	107,13	134,08	143,65
100,0/2	66,53	70,14	92,06	92,99	104,98	118,98	121,21	163,51
100,0/3	57,33	85,05	86,30	89,87	94,20	96,94	127,04	134,80
200,0/1	66,98	71,07	73,11	75,67	51,21	65,76	84,78	76,09
200,0/2	67,53	71,84	71,07	79,14	56,76	64,23	76,62	67,27
200,0/3	59,73	72,45	57,39	83,20	43,57	67,55	75,31	83,14
400,0/1	74,05	72,14	68,00	69,40	51,55	66,10	70,46	64,63
400,0/2	59,98	60,24	59,53	48,91	51,55	58,18	69,95	65,59
400,0/3	68,67	58,98	44,27	52,18	56,62	59,95	61,12	61,66

Tabela 12 – Peso fresco (mg) de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 1 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Peso fresco (mg)	
	Dia inicial*	Dia final
Controle/1	3,5	30,6
Controle/2	3,5	29,5
Controle/3	3,5	31,0
1,56/1	3,5	31,1
1,56/2	3,5	31,8
1,56/3	3,5	32,0
3,1/1	3,5	30,7
3,1/2	3,5	30,3
3,1/3	3,5	25,0
6,2/1	3,5	27,8
6,2/2	3,5	29,2
6,2/3	3,5	26,6
12,5/1	3,5	27,2
12,5/2	3,5	29,4
12,5/3	3,5	25,8
25,0/1	3,5	20,9
25,0/2	3,5	23,8
25,0/3	3,5	25,2
50,0/1	3,5	17,4
50,0/2	3,5	13,0
50,0/3	3,5	15,7
100,0/1	3,5	5,8
100,0/2	3,5	6,7
100,0/3	3,5	6,9
200,0/1	3,5	2,2
200,0/2	3,5	1,4
200,0/3	3,5	2,0
400,0/1	3,5	1,0
400,0/2	3,5	1,0
400,0/3	3,5	1,0

*Peso fresco referente à amostra da cultura similar à utilizada no início do teste.

Tabela 13 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 2 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	23	28	39	47	60	82
Controle/2	16	23	28	40	47	61	82
Controle/3	16	21	28	37	45	59	78
1,56/1	16	23	28	39	46	61	86
1,56/2	16	23	28	37	45	60	76
1,56/3	16	21	28	40	48	58	80
3,1/1	16	22	28	37	45	58	73
3,1/2	16	23	28	37	44	58	71
3,1/3	16	22	28	37	43	58	75
6,2/1	16	20	27	36	42	56	64
6,2/2	16	22	27	36	40	53	61
6,2/3	16	20	27	36	40	51	60
12,5/1	16	20	27	32	39	53	62
12,5/2	16	17	25	32	36	51	58
12,5/3	16	20	27	31	36	49	60
25,0/1	16	20	26	32	36	50	58
25,0/2	16	20	25	31	36	46	56
25,0/3	16	17	24	29	34	45	59
50,0/1	16	19	25	31	33	42	57
50,0/2	16	19	26	32	35	40	53
50,0/3	16	19	24	29	33	41	49
100,0/1	16	16	19	24	27	29	30
100,0/2	16	16	16	20	24	29	30
100,0/3	16	16	16	20	25	28	28
200,0/1	16	16	16	16	16	16	16
200,0/2	15	16	16	16	16	16	16
200,0/3	14	16	16	16	16	15	16
400,0/1	12	12	12	12	12	12	12
400,0/2	12	12	12	12	12	12	12
400,0/3	12	12	12	12	12	12	12

Tabela 14 – Área foliar total (mm²) de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 2 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Área foliar total (mm ²)							
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	46,55	57,46	77,63	97,87	166,28	185,71	234,65	300,41
Controle/2	55,09	59,85	82,62	123,48	153,41	201,02	257,75	328,46
Controle/3	48,65	52,42	75,62	100,41	132,13	172,64	226,27	292,07
1,56/1	53,20	53,84	77,00	100,02	165,47	192,24	260,41	284,75
1,56/2	50,10	47,08	71,89	108,75	139,10	185,78	252,17	317,48
1,56/3	56,10	52,25	86,35	115,99	161,76	200,30	261,34	304,64
3,1/1	57,32	59,14	84,75	116,04	139,61	182,98	259,33	280,61
3,1/2	49,54	59,58	77,12	103,43	148,83	189,97	232,51	246,49
3,1/3	49,65	55,10	69,00	102,04	129,69	182,67	236,58	250,88
6,2/1	57,76	53,52	86,46	109,54	142,59	178,05	222,97	217,12
6,2/2	60,62	61,35	79,83	106,99	153,38	164,29	218,43	240,88
6,2/3	58,01	59,41	78,97	98,73	128,78	162,32	207,75	227,56
12,5/1	56,22	59,52	82,09	108,41	125,16	158,60	215,45	264,11
12,5/2	59,13	49,84	80,30	108,27	132,64	151,62	220,12	264,11
12,5/3	60,25	55,22	77,77	101,22	140,32	154,45	203,86	241,51
25,0/1	61,12	58,13	72,45	107,60	135,53	160,26	208,54	200,26
25,0/2	56,72	49,21	77,82	92,11	119,30	140,27	204,36	208,96
25,0/3	51,15	52,99	69,33	98,42	123,03	145,65	186,89	228,45
50,0/1	60,43	51,25	74,34	93,15	111,12	137,60	176,69	187,11
50,0/2	55,18	55,62	80,40	100,20	134,19	145,60	175,98	194,63
50,0/3	59,88	57,28	64,74	93,74	125,62	139,83	164,96	187,75
100,0/1	61,84	60,69	67,01	96,09	89,04	81,39	83,84	80,48
100,0/2	53,96	57,13	62,29	83,15	95,02	83,68	80,43	87,54
100,0/3	51,57	57,13	59,37	87,97	78,19	72,40	79,46	80,40
200,0/1	59,43	48,79	61,82	69,57	52,17	71,05	63,30	55,30
200,0/2	65,08	57,77	58,85	65,43	61,44	49,33	72,57	70,80
200,0/3	57,08	48,86	58,13	61,65	66,87	58,29	58,42	62,00
400,0/1	55,88	42,81	53,62	52,17	43,63	51,27	47,68	57,15
400,0/2	58,11	61,62	50,77	44,46	51,22	57,98	49,21	49,31
400,0/3	55,40	42,78	49,13	48,54	51,15	55,61	51,89	52,70

Tabela 15 – Peso fresco (mg) de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 2 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Peso fresco (mg)	
	Dia inicial*	Dia final
Controle/1	1,9	21,3
Controle/2	1,9	21,9
Controle/3	1,9	21,9
1,56/1	1,9	22,5
1,56/2	1,9	20,0
1,56/3	1,9	22,6
3,1/1	1,9	18,8
3,1/2	1,9	17,8
3,1/3	1,9	19,0
6,2/1	1,9	16,1
6,2/2	1,9	16,2
6,2/3	1,9	16,1
12,5/1	1,9	15,4
12,5/2	1,9	15,2
12,5/3	1,9	15,0
25,0/1	1,9	15,4
25,0/2	1,9	15,5
25,0/3	1,9	15,3
50,0/1	1,9	11,9
50,0/2	1,9	11,8
50,0/3	1,9	11,7
100,0/1	1,9	4,2
100,0/2	1,9	3,5
100,0/3	1,9	4,5
200,0/1	1,9	2,2
200,0/2	1,9	1,9
200,0/3	1,9	2,4
400,0/1	1,9	1,7
400,0/2	1,9	1,7
400,0/3	1,9	1,6

*Peso fresco referente à amostra da cultura similar à utilizada no início do teste.

Tabela 16 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 3 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	24	28	38	47	58	76
Controle/2	16	24	28	38	46	58	76
Controle/3	16	23	28	38	48	58	77
1,56/1	16	24	28	39	47	58	81
1,56/2	16	23	28	37	48	57	72
1,56/3	16	24	28	38	46	57	71
3,1/1	16	24	28	38	48	58	73
3,1/2	16	23	28	35	46	55	63
3,1/3	16	23	27	37	45	55	62
6,2/1	16	24	27	35	43	53	64
6,2/2	16	23	26	34	40	53	62
6,2/3	16	23	27	33	42	53	62
12,5/1	16	21	26	31	37	49	60
12,5/2	16	21	28	31	41	52	60
12,5/3	16	20	25	30	36	47	58
25,0/1	16	20	25	31	36	49	57
25,0/2	16	21	25	30	36	45	57
25,0/3	16	19	26	28	36	45	55
50,0/1	16	18	25	30	36	42	47
50,0/2	16	20	26	29	36	44	51
50,0/3	16	20	25	30	36	43	47
100,0/1	16	16	20	25	29	29	29
100,0/2	16	16	23	25	30	30	30
100,0/3	16	16	22	26	31	33	33
200,0/1	15	16	16	16	16	16	16
200,0/2	14	16	16	16	16	16	16
200,0/3	14	16	16	16	16	16	16
400,0/1	12	12	12	12	12	12	12
400,0/2	12	12	12	12	12	12	12
400,0/3	12	12	12	12	12	12	12

Tabela 17 – Área foliar total (mm²) de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 3 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Área foliar total (mm ²)							
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	50,86	69,59	96,98	104,48	145,47	177,44	208,63	294,82
Controle/2	49,95	57,01	88,53	99,49	128,36	170,31	223,26	278,44
Controle/3	60,18	62,76	93,61	110,56	148,82	190,36	256,25	292,34
1,56/1	62,07	68,36	96,36	119,00	156,41	186,40	254,04	290,74
1,56/2	55,53	66,49	92,67	113,52	144,85	185,09	243,31	269,20
1,56/3	56,56	60,19	85,66	106,33	131,52	181,86	219,75	260,09
3,1/1	61,06	62,36	95,79	105,61	135,60	185,35	218,63	249,78
3,1/2	57,20	66,03	90,21	96,52	137,80	180,71	206,23	252,70
3,1/3	55,44	63,37	74,54	98,22	135,73	179,83	205,26	248,49
6,2/1	61,80	67,87	92,11	109,72	147,71	174,85	201,70	243,08
6,2/2	58,45	66,88	88,63	115,70	132,17	163,07	213,59	251,35
6,2/3	53,88	67,64	87,74	116,52	139,08	178,85	228,35	257,34
12,5/1	53,72	59,01	85,86	89,91	114,67	144,45	184,57	214,42
12,5/2	57,18	70,54	99,43	100,94	134,40	151,41	196,88	243,63
12,5/3	61,56	65,11	90,81	90,53	128,53	148,76	198,84	225,98
25,0/1	50,10	66,19	81,32	90,82	107,39	127,59	174,81	194,32
25,0/2	55,46	67,89	89,74	100,77	128,37	149,88	191,99	215,23
25,0/3	57,34	67,16	86,28	99,80	129,18	144,27	187,17	215,22
50,0/1	61,35	68,78	86,59	97,62	107,34	138,74	163,13	168,14
50,0/2	53,16	61,19	81,04	97,29	113,96	128,05	154,93	164,42
50,0/3	55,59	64,58	85,29	96,68	112,39	124,72	149,35	176,05
100,0/1	53,65	57,30	70,57	75,68	77,89	91,45	85,67	98,27
100,0/2	53,36	61,46	75,08	78,83	69,52	111,42	112,34	105,98
100,0/3	57,05	59,48	77,06	72,34	78,46	107,90	108,54	91,10
200,0/1	52,73	56,42	61,41	62,50	60,11	57,52	60,67	54,98
200,0/2	47,22	49,53	58,84	55,72	55,05	41,88	54,09	45,05
200,0/3	58,12	52,59	62,76	62,50	55,33	53,84	59,27	59,14
400,0/1	53,02	53,35	55,13	50,05	45,03	41,22	45,93	42,33
400,0/2	49,94	57,11	60,68	56,15	46,85	45,09	40,73	36,15
400,0/3	53,22	53,60	47,73	53,37	52,81	47,29	60,21	43,29

Tabela 18 – Peso fresco (mg) de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 3 com o fármaco cloridrato de propranolol.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Peso fresco (mg)	
	Dia inicial*	Dia final
Controle/1	1,9	23,0
Controle/2	1,9	23,3
Controle/3	1,9	23,4
1,56/1	1,9	23,0
1,56/2	1,9	22,1
1,56/3	1,9	23,0
3,1/1	1,9	18,8
3,1/2	1,9	18,7
3,1/3	1,9	18,1
6,2/1	1,9	18,2
6,2/2	1,9	18,8
6,2/3	1,9	18,2
12,5/1	1,9	17,1
12,5/2	1,9	17,2
12,5/3	1,9	17,0
25,0/1	1,9	17,1
25,0/2	1,9	17,0
25,0/3	1,9	16,7
50,0/1	1,9	10,7
50,0/2	1,9	10,6
50,0/3	1,9	10,4
100,0/1	1,9	4,8
100,0/2	1,9	4,6
100,0/3	1,9	5,2
200,0/1	1,9	2,2
200,0/2	1,9	1,9
200,0/3	1,9	2,4
400,0/1	1,9	1,0
400,0/2	1,9	1,4
400,0/3	1,9	1,2

*Peso fresco referente à amostra da cultura similar à utilizada no início do teste.

Tabela 19 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 1 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	21	28	37	47	58	78
Controle/2	16	21	28	40	47	55	80
Controle/3	16	21	28	39	47	56	74
0,78/1	16	23	28	41	50	62	87
0,78/2	16	23	28	42	49	64	82
0,78/3	16	23	28	39	50	61	80
1,56/1	16	19	24	30	40	50	62
1,56/2	16	20	26	31	42	51	62
1,56/3	16	20	25	30	38	49	61
3,1/1	16	19	27	31	39	50	61
3,1/2	16	20	26	31	39	51	61
3,1/3	16	18	24	29	36	47	62
6,2/1	16	18	26	30	35	46	58
6,2/2	16	20	25	30	35	47	58
6,2/3	16	19	25	31	35	43	58
12,5/1	16	18	24	30	35	46	55
12,5/2	16	18	24	29	34	44	57
12,5/3	16	18	24	30	36	43	57
25,0/1	16	18	24	30	32	43	54
25,0/2	16	18	23	29	33	45	56
25,0/3	16	18	23	29	31	43	53
50,0/1	16	18	20	24	28	35	39
50,0/2	16	18	20	24	24	34	36
50,0/3	16	17	20	25	29	33	37
100,0/1	13	16	19	20	20	20	20
100,0/2	16	17	20	20	20	20	20
100,0/3	15	16	18	20	20	20	20
200,0/1	16	16	17	19	19	19	19
200,0/2	13	16	17	18	18	17	16
200,0/3	14	16	17	19	19	18	17

Tabela 20 – Área foliar total (mm²) de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 1 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Área foliar total (mm ²)							
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	44,46	47,78	70,33	96,05	108,55	161,30	255,52	343,53
Controle/2	55,81	63,18	75,79	100,57	152,37	179,81	299,91	368,04
Controle/3	53,45	60,70	79,67	114,43	148,18	176,62	298,67	370,18
0,78/1	54,33	64,06	87,45	107,08	153,30	208,25	323,57	388,85
0,78/2	50,24	60,85	79,83	96,54	141,18	202,81	264,97	363,76
0,78/3	50,58	64,71	86,18	108,70	157,14	232,81	313,65	380,30
1,56/1	49,79	56,39	61,99	91,06	118,66	120,06	216,30	259,07
1,56/2	47,38	53,42	65,30	100,14	124,79	150,42	230,40	272,09
1,56/3	45,24	58,23	65,10	97,98	125,85	142,10	203,82	255,05
3,1/1	47,12	58,56	69,02	94,46	110,26	123,25	206,24	264,98
3,1/2	53,44	56,62	77,26	90,70	122,75	156,97	218,57	292,80
3,1/3	49,70	58,46	70,37	87,77	112,69	129,02	196,15	233,00
6,2/1	52,45	62,58	67,22	93,95	107,35	131,08	204,39	257,85
6,2/2	48,67	57,05	74,30	96,86	109,97	138,49	196,96	243,83
6,2/3	51,58	55,77	70,51	92,63	119,72	143,76	200,53	233,63
12,5/1	48,15	54,07	66,60	89,20	114,65	132,39	187,71	256,05
12,5/2	49,92	51,06	67,86	91,94	114,38	133,13	187,53	252,19
12,5/3	53,13	59,63	76,16	97,18	118,66	145,34	188,80	255,56
25,0/1	55,98	62,11	78,65	91,96	109,74	136,95	194,37	231,53
25,0/2	49,03	58,40	72,80	97,51	112,49	134,80	193,15	240,45
25,0/3	48,01	57,66	71,02	82,59	107,04	124,05	164,93	189,32
50,0/1	55,38	58,68	70,14	85,68	109,61	115,08	126,94	134,30
50,0/2	50,31	58,04	69,29	88,36	103,80	109,27	128,29	150,28
50,0/3	53,90	63,31	76,46	94,16	112,35	110,89	118,75	144,29
100,0/1	51,57	54,20	71,01	70,00	79,99	72,21	77,95	75,06
100,0/2	47,93	60,58	69,02	78,73	91,86	85,93	96,63	97,20
100,0/3	54,67	57,88	61,25	82,52	84,62	82,38	95,26	97,00
200,0/1	51,74	57,88	57,63	55,08	56,89	52,45	59,97	60,18
200,0/2	48,08	50,36	53,15	58,75	50,60	48,83	55,40	56,43
200,0/3	48,24	56,19	58,90	60,00	47,50	53,69	55,70	56,41

Tabela 21 – Peso fresco (mg) de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 1 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Peso fresco (mg)	
	Dia inicial*	Dia final
Controle/1	3,5	34,5
Controle/2	3,5	34,8
Controle/3	3,5	34,9
0,78/1	3,5	31,5
0,78/2	3,5	29,6
0,78/3	3,5	29,5
1,56/1	3,5	22,9
1,56/2	3,5	22,1
1,56/3	3,5	25,3
3,1/1	3,5	25,4
3,1/2	3,5	25,4
3,1/3	3,5	24,3
6,2/1	3,5	21,8
6,2/2	3,5	21,8
6,2/3	3,5	21,8
12,5/1	3,5	21,2
12,5/2	3,5	21,0
12,5/3	3,5	22,6
25,0/1	3,5	13,8
25,0/2	3,5	13,2
25,0/3	3,5	14,0
50,0/1	3,5	19,8
50,0/2	3,5	19,4
50,0/3	3,5	19,1
100,0/1	3,5	6,4
100,0/2	3,5	7,2
100,0/3	3,5	7,1
200,0/1	3,5	3,2
200,0/2	3,5	3,8
200,0/3	3,5	3,9

*Peso fresco referente à amostra da cultura similar à utilizada no início do teste.

Tabela 22 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 2 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	24	28	37	45	55	75
Controle/2	16	24	28	35	47	57	77
Controle/3	16	22	28	33	43	56	70
0,78/1	16	22	27	34	44	53	73
0,78/2	16	24	27	34	47	58	73
0,78/3	16	24	28	36	45	57	73
1,56/1	16	22	27	32	40	53	64
1,56/2	16	23	27	31	42	52	69
1,56/3	16	23	27	33	43	51	65
3,1/1	16	23	28	32	40	50	65
3,1/2	16	23	26	31	40	48	64
3,1/3	16	22	27	31	40	53	62
6,2/1	16	23	25	29	39	45	58
6,2/2	16	21	25	29	36	43	55
6,2/3	16	18	25	28	33	40	53
12,5/1	16	23	24	28	33	39	55
12,5/2	16	21	25	28	33	43	57
12,5/3	16	18	25	28	33	38	53
25,0/1	16	16	24	28	37	43	51
25,0/2	15	17	23	28	37	41	49
25,0/3	16	17	24	28	35	44	51
50,0/1	15	16	21	25	33	37	38
50,0/2	16	17	24	27	35	40	43
50,0/3	16	16	22	24	33	37	38
100,0/1	16	18	20	20	20	20	20
100,0/2	16	16	20	20	20	21	21
100,0/3	15	17	19	20	20	20	20
200,0/1	15	16	17	19	19	19	19
200,0/2	15	16	16	19	18	18	19
200,0/3	14	16	17	18	19	18	18

Tabela 23 – Área foliar total (mm²) de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 2 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Área foliar total (mm ²)							
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	52,81	65,31	76,40	100,65	109,06	139,31	163,87	219,36
Controle/2	54,28	56,15	74,31	92,80	129,46	161,21	185,36	249,00
Controle/3	47,07	50,85	69,83	87,45	112,20	148,97	188,37	238,91
0,78/1	50,97	52,31	71,23	86,61	109,77	138,37	184,92	245,80
0,78/2	50,94	57,27	74,71	89,58	110,71	157,00	206,32	270,96
0,78/3	52,93	66,73	80,15	103,34	121,28	171,02	233,88	272,48
1,56/1	52,39	57,69	68,95	85,34	106,38	147,39	196,27	221,64
1,56/2	46,50	53,74	68,70	97,84	108,99	132,87	185,89	220,72
1,56/3	49,14	62,45	76,97	90,96	107,45	145,91	186,34	233,92
3,1/1	48,67	54,45	70,05	90,95	103,46	150,76	194,84	199,53
3,1/2	50,62	53,55	74,38	85,18	98,97	141,88	180,48	216,05
3,1/3	52,38	50,95	80,83	93,19	104,51	150,52	188,86	226,62
6,2/1	54,49	56,04	74,25	86,48	100,26	127,34	167,04	210,27
6,2/2	46,29	49,45	67,40	82,85	89,59	114,63	162,58	197,20
6,2/3	50,05	51,63	64,88	81,98	90,12	109,12	149,26	185,61
12,5/1	46,83	51,86	72,21	77,89	92,91	116,29	148,84	191,60
12,5/2	45,07	49,36	71,06	83,28	89,01	114,66	145,45	194,13
12,5/3	56,61	63,31	77,98	84,59	108,31	133,45	166,44	188,37
25,0/1	46,22	50,84	63,60	79,62	90,47	115,34	139,37	174,14
25,0/2	46,79	52,10	56,19	68,88	90,33	112,68	129,66	167,54
25,0/3	47,88	49,95	57,19	69,31	84,28	122,71	147,16	187,13
50,0/1	45,86	51,74	63,04	71,83	82,55	94,91	117,57	130,05
50,0/2	49,99	49,59	68,63	83,47	109,37	129,37	170,47	193,16
50,0/3	51,80	50,61	64,92	80,94	89,16	110,30	134,71	145,48
100,0/1	51,82	54,52	68,62	78,74	78,37	81,86	90,07	79,73
100,0/2	52,61	56,78	59,49	73,87	75,14	89,97	85,94	76,44
100,0/3	44,33	45,19	59,20	65,81	69,88	72,54	76,98	68,18
200,0/1	50,33	53,86	56,03	57,11	55,36	56,22	54,27	89,62
200,0/2	47,84	58,28	50,92	53,46	55,01	51,60	53,39	88,33
200,0/3	49,08	47,13	50,65	54,90	56,48	53,90	56,29	85,90

Tabela 24 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 3 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	16	23	28	36	50	60	87
Controle/2	16	23	28	36	47	60	78
Controle/3	16	24	28	39	48	60	89
0,78/1	16	23	28	36	48	58	85
0,78/2	16	23	28	39	49	60	81
0,78/3	16	24	28	36	48	59	80
1,56/1	16	24	28	35	45	55	76
1,56/2	16	22	28	37	46	55	78
1,56/3	16	23	28	36	46	57	77
3,1/1	16	22	28	35	45	52	69
3,1/2	16	21	28	33	43	51	64
3,1/3	16	23	28	35	46	52	63
6,2/1	16	21	28	30	44	50	61
6,2/2	16	24	27	30	40	50	62
6,2/3	16	21	24	28	36	48	60
12,5/1	16	22	27	30	36	44	54
12,5/2	16	22	25	30	37	45	55
12,5/3	16	22	26	28	36	43	52
25,0/1	16	18	26	29	37	43	51
25,0/2	15	17	25	29	34	43	49
25,0/3	16	18	25	29	34	43	50
50,0/1	16	18	23	27	35	39	43
50,0/2	16	17	22	24	31	39	43
50,0/3	15	19	21	25	33	38	45
100,0/1	16	17	20	20	20	20	21
100,0/2	16	17	20	20	20	20	21
100,0/3	15	17	20	20	20	20	20
200,0/1	15	17	18	18	19	19	19
200,0/2	16	16	18	18	18	18	19
200,0/3	15	16	19	19	19	19	20

Tabela 25 – Área foliar total (mm²) de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 3 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Área foliar total (mm ²)							
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle/1	57,20	65,57	87,56	102,84	135,17	203,10	214,63	302,15
Controle/2	53,26	58,40	84,68	113,55	139,24	205,37	259,71	306,96
Controle/3	55,03	68,46	89,34	108,88	147,76	202,57	265,54	323,80
0,78/1	58,67	63,88	84,65	112,74	137,45	183,94	224,02	296,16
0,78/2	50,88	57,26	85,42	109,74	131,39	184,26	241,77	330,10
0,78/3	56,62	57,95	86,35	104,65	130,01	176,37	215,76	303,86
1,56/1	51,77	61,09	88,46	102,40	128,69	177,19	203,82	276,98
1,56/2	59,26	57,26	86,86	109,36	130,14	165,91	203,67	290,46
1,56/3	52,24	55,37	87,56	104,57	127,38	181,93	214,62	289,96
3,1/1	52,61	60,45	81,65	97,38	114,97	155,72	193,48	246,82
3,1/2	54,26	44,16	80,62	88,57	113,24	162,93	200,68	245,93
3,1/3	56,41	60,64	89,88	106,53	126,85	178,15	207,10	242,05
6,2/1	53,80	63,06	81,32	96,36	109,23	158,00	184,68	223,65
6,2/2	53,06	53,67	89,56	95,39	105,51	156,89	172,58	216,86
6,2/3	54,35	54,39	82,47	96,13	99,76	144,02	170,05	231,23
12,5/1	51,39	61,85	72,47	84,14	111,84	140,85	149,02	186,53
12,5/2	51,15	60,46	70,28	79,72	100,10	139,38	149,32	190,32
12,5/3	56,55	66,68	88,30	97,04	112,39	147,67	174,08	194,65
25,0/1	55,67	55,47	74,91	94,53	111,32	149,95	160,04	196,78
25,0/2	52,25	54,71	70,86	91,96	104,63	123,22	148,28	174,43
25,0/3	55,19	59,35	75,25	95,02	108,37	137,70	160,12	178,28
50,0/1	50,51	59,06	65,52	78,08	93,13	120,83	137,83	143,33
50,0/2	56,42	57,69	70,57	83,72	93,72	127,01	151,36	177,54
50,0/3	57,49	57,58	75,15	83,49	99,28	125,06	153,48	183,87
100,0/1	50,60	55,85	65,30	70,92	83,97	89,73	87,19	85,33
100,0/2	52,90	57,18	68,07	76,49	84,41	93,04	86,00	87,91
100,0/3	49,24	54,34	68,96	68,23	76,70	86,60	83,42	86,60
200,0/1	52,91	52,07	56,50	51,05	53,86	56,67	54,58	55,70
200,0/2	56,62	56,24	64,10	61,40	56,71	58,17	66,14	58,70
200,0/3	58,93	57,39	61,38	59,37	57,33	64,65	63,60	59,82

Tabela 26 – Peso fresco (mg) de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste 3 com o fármaco losartana potássica.

Concentração (mg.L ¹)/Repetição	Peso fresco (mg)	
	Dia inicial*	Dia final
Controle/1	1,9	21,4
Controle/2	1,9	21,5
Controle/3	1,9	21,0
0,78/1	1,9	20,5
0,78/2	1,9	21,2
0,78/3	1,9	21,7
1,56/1	1,9	19,6
1,56/2	1,9	20,8
1,56/3	1,9	21,2
3,1/1	1,9	17,6
3,1/2	1,9	17,0
3,1/3	1,9	17,3
6,2/1	1,9	15,0
6,2/2	1,9	14,6
6,2/3	1,9	13,5
12,5/1	1,9	11,9
12,5/2	1,9	11,5
12,5/3	1,9	12,5
25,0/1	1,9	11,6
25,0/2	1,9	11,5
25,0/3	1,9	11,5
50,0/1	1,9	10,4
50,0/2	1,9	10,2
50,0/3	1,9	10,0
100,0/1	1,9	5,2
100,0/2	1,9	6,0
100,0/3	1,9	5,8
200,0/1	1,9	3,6
200,0/2	1,9	3,3
200,0/3	1,9	3,7

*Peso fresco referente à amostra da cultura similar à utilizada no início do teste.

Tabela 27 – Contagem do número de frondes de *L. minor*, em cada tratamento e nos controles, referente ao teste de mistura dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica.

Concentração de efeito combinado (CE _x /2)-Repetição	Número de frondes por unidade experimental						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Controle-1	16	24	28	39	48	60	86
Controle-2	16	24	29	42	48	60	79
Controle-3	16	24	28	38	45	56	72
CE ₁₀ /2 - 1	16	23	27	36	41	54	68
CE ₁₀ /2 - 2	16	23	28	39	45	55	74
CE ₁₀ /2 - 3	16	24	27	37	45	54	71
CE ₂₀ /2 - 1	16	23	27	37	44	54	70
CE ₂₀ /2 - 2	16	24	28	39	45	57	74
CE ₂₀ /2 - 3	16	23	26	36	41	51	62
CE ₅₀ /2 - 1	16	18	25	32	32	38	49
CE ₅₀ /2 - 2	16	19	27	32	35	38	51
CE ₅₀ /2 - 3	16	18	25	32	34	37	47
CE ₇₀ /2 - 1	16	16	17	25	30	33	34
CE ₇₀ /2 - 2	16	16	20	26	31	32	35
CE ₇₀ /2 - 3	16	16	17	25	30	31	33
CE ₈₀ /2 - 1	15	16	17	20	24	30	30
CE ₈₀ /2 - 2	16	16	16	20	24	30	31
CE ₈₀ /2 - 3	16	16	16	20	21	29	29

ANEXO A - Composição do meio de cultivo Steinberg modificado após ISO 20079 (OECD, 2006).

Macroelementos	g/L
<u>Solução-estoque 1:</u>	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
<u>Solução-estoque 2:</u>	
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,00
<u>Solução-estoque 3:</u>	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	14,75
Microelementos	mg/L
<u>Solução-estoque 4:</u>	
H ₃ BO ₃	120,0
<u>Solução-estoque 5:</u>	
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	180,0
<u>Solução-estoque 6:</u>	
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	44,0
<u>Solução-estoque 7:</u>	
MnCl ₂ . 4H ₂ O	180,0
<u>Solução-estoque 8:</u>	
FeCl ₃ .6H ₂ O	760,00
EDTA-sal dissódico	1500,00

- As soluções-estoque de 1 a 7 foram esterilizadas por autoclavagem a 121°C por 20 minutos.
- A solução final do meio Steinberg modificado foi preparada adicionando-se 20 mL das soluções-estoque 1, 2 e 3 e 1 mL das soluções-estoque 4, 5, 6, 7 e 8 a, aproximadamente, 900 mL de água deionizada. O pH da solução monitorado esteve a 5,5 ±0,2. O volume final foi acertado para 1000 mL com água deionizada