UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
ENGENHARIA AMBIENTAL

Análise dos efeitos tóxicos do nonilfenol e do bisfenol A em organismos
de água doce

Mestranda: Mariângela Spadoto

Orientadora: Profa Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos - SP

2013

MARIÂNGELA SPADOTO

**Análise dos efeitos tóxicos do nonilfenol e do bisfenol A em organismos
de água doce**

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de São Carlos, da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências – Programa de
Ciências da Engenharia Ambiental

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos - SP

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

S732a Spadoto, Mariangela
Análise dos efeitos tóxicos do nonilfenol e do
bisfenol A em organismos de água doce / Mariangela
Spadoto; orientadora Eny Maria Vieira. São Carlos,
2013.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Engenharia Ambiental e Área de
Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2013.

1. Bisfenol A. 2. Nonilfenol. 3. Cladóceros. 4.
Quironomídeos. 5. Toxicidade. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel e Licenciada **MARIÂNGELA SPADOTO**.

Título da dissertação: "Análise dos efeitos tóxicos do nonilfenol e do bisfenol A em organismos de água doce".

Data da defesa: 15/02/2013

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof^a. Dr^a. **Eny Maria Vieira (Orientadora)**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

Aprovada

Prof. Associado **Evaldo Luiz Gaeta Espíndola**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Dr^a. **Dalva Aparecida de Souza**
(Global Análise e Consultoria)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:
Prof. Dr. **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

Protocolado em 15/02/2013
Serviço de Pós-Graduação
EESC/USP

*“Este é o dia,
Esta é a hora, este o momento, isto
É quem somos”.*

Fernando Pessoa - Ricardo Reis

AGRADECIMENTOS

Especialmente à Profa. Dra. *Eny Maria Vieira* pela orientação, confiança, carinho e incentivo.

Aos meus pais *Angelo* e *Maria* por me apoiarem e proporcionarem as condições para que eu chegasse até aqui.

Às minhas irmãs *Mariane* e *Marcela* pela amizade, pelo carinho e pelo incentivo.

Ao meu avô *Justino* “in memoriam” pelo exemplo de vida e determinação.

Ao meu namorado *André* pelo apoio, amor e confiança.

Aos meus familiares pelo afeto e incentivo.

À Profa. Dra. *Clarice Maria Rispoli Botta* e ao Dr. *Paulo Jorge Marques Cordeiro* pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. *Evaldo Luiz Gaeta Espíndola* e a Dra. *Dalva Aparecida de Souza* pelas sugestões apresentadas na defesa da dissertação.

À Profa. Dra. *Clarice Maria Rispoli Botta* pelo fundamental auxílio durante todo o período do mestrado, pela orientação e pelos conselhos.

Ao Prof. Dr. *Evaldo Luiz Gaeta Espíndola* pela estrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao *Amândio M. Nogueira* por sua valorosa ajuda com os cultivos dos cladóceros e aos demais funcionários do CRHEA que viabilizaram o desenvolvimento desta pesquisa.

À *Letícia Costa* pelo auxílio precioso durante a realização dos testes ecotoxicológicos.

À *Ana Paula E. Sueitt* e ao *Lucas B. Mendes* pelo auxílio com os testes com quironomídeos.

Aos colegas do CRHEA pelo apoio na convivência diária.

Às secretárias do IQSC, *Gislei* e *Veroneide*, pela atenção e incentivo.

Às amigas: *Ana Paula, Laira, Adelina, Fabiola, Juliana, Nathe, Chien, Carol, Priscila, Maressa*, pela convivência harmoniosa, respeito, palavras de apoio e incentivo, pelas risadas e, principalmente, pela amizade que construímos a partir de então...

Em especial à *Sabrina, Bárbara, Tati e ao Carlos Eduardo* pelos anos de amizade, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos queridos amigos do LaQuAAE: *Carol, Dani Beraldo, Lia, Lú, Daniele, Gabriela, Lucas, Raphael*, e *Tiago* pela amizade, auxílio e inúmeros conselhos. *Tiago*, especialmente pela fundamental ajuda nas diversas etapas da realização desse trabalho.

Aos meus colegas de profissão pelo incentivo desde o início dessa jornada.

Aos amigos da Bio UFSCar que estão sempre presentes.

Aos amigos da vida toda: *Dani, Márcia, Adi, Sandra, Jô, Mari e Marcelo*, pela amizade, afeto, incentivo e apoio... vocês sempre acreditaram que era possível....

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o Mestrado.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O sistema endócrino humano (GHISELLI e JARDIM, 2007).	22
Figura 2: Disfunções endócrinas: (a) resposta natural; (b) efeito agonista; (c) efeito antagonista (BIRKETT e LESTER, 2003).	23
Figura 3: Fórmula estrutural do 4-nonilfenol.	27
Figura 4: Fórmula estrutural do bisfenol A.	29
Figura 5: Vista geral da espécie de <i>Daphnia similis</i> . (Foto: IPEN – arquivo CQMA, à partir a internet: http://www.ipen.br/sitio/?idc=388).	30
Figura 6: Vista geral da espécie <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> . (Foto obtida à partir da internet: http://species.wikimedia.org/wiki/Ceriodaphnia_silvestrii).	31
Figura 7: Vista geral da espécie <i>Ceriodaphnia dubia</i> . (Foto obtida à partir da internet: http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/species.html).	31
Figura 8: Vista da larva de <i>Chironomus xanthus</i> . (Foto obtida à partir da internet: http://www.cbd.int/programmes/areas/water/toolkit/html/1.7.4d_invertebrates.html). .	32
Figura 9: Montagem dos teste de toxicidade aguda. (Foto: Mariângela Spadoto).	36
Figura 10: Porcentagem de sobrevivência dos indivíduos de <i>Daphnia similis</i> para as diferentes concentrações amostradas, em mgL^{-1} , durante testes de toxicidade aguda com BPA.	46
Figura 11: Porcentagem de sobrevivência dos cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> para as concentrações amostradas, em mgL^{-1} , durante testes de toxicidade aguda com NP..	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação de alguns compostos classificados como desreguladores endócrinos (Adaptado de BILA e DEZOTTI, 2007).....	21
Tabela 2 – Valores da Média, Desvio Padrão com Limites inferior e superior obtidos à partir de testes de sensibilidade para <i>Daphnia similis</i>	34
Tabela 3 – Valores da Média, Desvio Padrão, Limites inferior, Limite superior e Faixa de sensibilidade obtidos à partir de testes de sensibilidade para <i>Ceriodaphnia dubia</i>	34
Tabela 4 – Valores da Média, Desvio Padrão, Limites inferior, Limite superior e Faixa de sensibilidade obtidos à partir de testes de sensibilidade para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	34
Tabela 5 – Valores de CE(I) ₅₀ ; 48h do NP e respectivos intervalos de confiança (IC) obtidos à partir dos testes de toxicidade agudos para <i>Daphnia similis</i> . Média, desvio padrão e faixa de sensibilidade.	41
Tabela 6 – Faixa das variáveis físicas e químicas medidas nos testes de toxicidade agudos com nonilfenol para <i>Daphnia similis</i>	42
Tabela 7 – Faixa das variáveis físicas e químicas medidas nos testes de toxicidade agudos com nonilfenol para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> e <i>Ceriodaphnia dubia</i>	42
Tabela 8 – Valores de CE(I) ₅₀ do nonilfenol e respectivos intervalos de confiança para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> em testes de toxicidade aguda, em solvente água e em solvente etanol.	43
Tabela 9 – Valores de CE(I) ₅₀ do nonilfenol e respectivos intervalos de confiança para <i>Ceriodaphnia dubia</i> em testes de toxicidade aguda 44	
Tabela 10 – Valores de CE(I) ₅₀ do BPA obtidos nos testes de toxicidade agudos para <i>Daphnia similis</i> . Média, desvio padrão e faixa de sensibilidade.	45
Tabela 11 – Valores de CE(I) ₅₀ do BPA obtidos à partir dos testes de toxicidade agudos para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> . Média, desvio padrão e faixa de sensibilidade.....	46
Tabela 12 – Valores de CEO do NP e do BPA em mgL ⁻¹ obtidos à partir dos testes de toxicidade crônicos para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> . Média, desvio padrão e faixa de sensibilidade.....	48
Tabela 13 – Valores de CENO, CEO e VC do NP e do BPA obtidos à partir dos testes de toxicidade crônicos para <i>Chironomus xanthus</i>	49

Tabela 14 – Valores de CE/CL ₅₀ para diversas espécies de cladóceros em relação ao NP, obtidos a partir da literatura comparados com o presente estudo.	51
Tabela 15 – Valores de CE/CL ₅₀ para diferentes organismos expostos ao nonilfenol, obtidos a partir da literatura, comparados com o presente estudo.	51
Tabela 16 – Valores de CE/CL ₅₀ do bisfenol A para diversas espécies de cladóceros, obtidos a partir da literatura, comparados com o presente estudo.	52
Tabela 17 – Estudos feitos no Brasil quantificando Bisfenol A e Nonilfenol em corpos d’água locais.	53
Tabela 18 – Estudos quantificando Bisfenol A e Nonilfenol em corpos d’água internacionais.	54

LISTA DE SÍMBOLOS, NOMENCLATURAS E ABREVIACÕES

ABNT.....	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APs.....	Alquifenóis
APEs.....	Alquifenóis Etoxilados
BPA.....	Bisphenol A (Bisfenol A)
CE ₅₀	Concentração Efetiva a 50% da população
CENO.....	Concentração de Efeito não observado
CEO	Concentração de Efeito observado
DE	Desreguladores Endócrinos
EPA.....	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental)
NP.....	Nonyphenol (Nonilfenol)
NPE.....	Nonylphenol Ethoxylates (Nonilfenol Etoxilado)
VC	Valor crônico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivos específicos	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1. Recursos hídricos e impactos.....	17
3.1 Desreguladores Endócrinos	19
3.3. O sistema endócrino e os hormônios	22
3.4. Mecanismos de ação dos Desreguladores Endócrinos	23
3.5. A Ecotoxicologia	25
3.6. O Nonilfenol como Desregulador Endócrino	26
3.7. O bisfenol A como Desregulador Endócrino.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1. Organismos-teste estudados.....	30
4.2. Cultivo e manutenção das espécies de <i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> 32	
4.3. Teste para determinação da sensibilidade dos organismos.....	33
4.4. Testes de toxicidade aguda do nonilfenol (NP) e do bisfenol A (BPA) para <i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	34
4.4.1. Preparo das soluções-teste	35
4.4.2. Testes preliminares	35
4.4.3. Testes definitivos.....	35
4.4.4. Análise Estatística	36
4.5. Testes de toxicidade crônica do nonilfenol (NP) e do bisfenol A (BPA) para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	37
4.6. Testes de toxicidade crônica com <i>Chironomus xanthus</i>	38
4.7. Análise estatística	38

4.8. Destino e tratamento dos resíduos gerados na pesquisa	39
5. RESULTADOS	40
5.1. Testes de sensibilidade dos Cladóceros	40
5.2. Testes de toxicidade aguda do Nonilfenol aos Cladóceros.....	40
5.3. Teste de toxicidade aguda do Bisfenol A aos Cladóceros	44
5.4. Testes de toxicidade crônica do nonilfenol e do bisfenol A aos organismos <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> e ao <i>Chironomus xanthus</i>	47
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	57
8. RECOMENDAÇÕES	58
APÊNDICE B	75
APÊNDICE C	81
APÊNDICE D	87
APÊNDICE E	96
APÊNDICE F	99
APÊNDICE G	103
APÊNDICE H	109
APÊNDICE I	115

RESUMO

SPADOTO, M. (2013). *Análise dos efeitos tóxicos do nonilfenol e do bisfenol A em organismos de água doce*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

O bisfenol A (BPA) e o nonilfenol (NP), presentes em detergentes, pesticidas, plásticos e resinas, são conhecidos como *Endocrine Disrupting-Chemicals* (EDCs), Disruptores ou Desreguladores Endócrinos (DE) ou ainda Perturbadores Endócrinos ou Interferentes Endócrinos. O desregulador endócrino pode ser definido como uma substância química exógena ou mistura, que promove alterações em uma ou mais funções do sistema endócrino e na sua estrutura, causando, conseqüentemente, efeitos adversos na saúde de um organismo, ou a sua descendência. Esses compostos estão presentes nas águas de abastecimento, nos efluentes domésticos e industriais. Os desreguladores endócrinos têm ação mimética aos hormônios tanto no sítio de ligação quanto nos efeitos provocados nos seres vivos a eles expostos. Os compostos bisfenol A e nonilfenol foram identificados como desreguladores endócrinos em inúmeros trabalhos em diversos países, porém sendo pouco os efeitos em organismos tropicais. Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda do bisfenol A e do nonilfenol para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*, bem como, a toxicidade crônica para *Ceriodaphnia silvestrii* e *Chironomus xanthus*. Nos testes de toxicidade aguda com BPA os valores de CE(I)₅₀; 48h foram de 10,64 mgL⁻¹ para *Daphnia similis* e 19,9 mgL⁻¹ para *Ceriodaphnia silvestrii*. Nos testes crônicos o valor do CEO obtido para *Ceriodaphnia silvestrii* foi 1,29 mgL⁻¹ e para *Chironomus xanthus* 12 mgL⁻¹ e o CENO 6 mgL⁻¹. Nos testes de toxicidade aguda feitos com NP, os valores de CE(I)₅₀; 48h foram de 0,309 mgL⁻¹ para *Daphnia similis*, 0,4520 mgL⁻¹ para *Ceriodaphnia silvestrii* com solvente água e 0,0541 mgL⁻¹ com solvente etanol, e 0,03398 mgL⁻¹ para *Ceriodaphnia dubia*. O valor do CEO para *Ceriodaphnia silvestrii* foi 0,0198 mgL⁻¹ e para *Chironomus xanthus* foi 100 µgg⁻¹, com CENO de 50 µgg⁻¹. Apesar das concentrações encontradas nos testes serem maiores que as encontradas nos estudos que quantificaram esses compostos no ambiente, outros estudos demonstraram que, mesmo em concentrações inferiores as obtidas nesse estudo já ocorrem problemas relacionados com o tempo da muda e com a androgenização do metabolismo de cladóceros. Além disso, a partir dos resultados obtidos com estes testes, pretende-se alertar o poder público sobre os riscos inerentes da presença destes produtos químicos nas águas e da urgência em se adotar novas técnicas no tratamento de efluentes visando à remoção eficaz desses poluentes.

Palavras – chave: Bisfenol A, nonilfenol, cladóceros, quironomídeos, toxicidade.

ABSTRACT

SPADOTO, M. (2013). *The effects of nonylphenol and bisphenol A on freshwater organisms*. Msc. Dissertation – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Bisphenol A (BPA) and nonylphenol (NP), present in detergents, pesticides, plastics and resins, are known as Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs), Disruptors or Endocrine Disruptors (ED), Endocrine Disruption or Interferences Endocrine. The endocrine disruptors can be defined as an exogenous chemical substance or mixture, which causes changes in one or more functions of the endocrine system and its structure, causing, therefore, adverse effects on the health of an organism, or its progeny. These compounds are present in the water supply in domestic and industrial effluents. EDs have mimetic action to hormones in both binding site as the effects caused in living beings exposed to them. The compounds bisphenol A and nonylphenol were identified as endocrine disruptors in numerous studies in many countries, but with little effects on tropical organisms. This study aimed to evaluate the acute toxicity of bisphenol A and nonylphenol *Daphnia similis* and *Ceriodaphnia silvestrii*, as well as chronic toxicity to *Ceriodaphnia silvestrii* and *Chironomus xanthus*. In acute toxicity tests with BPA values EC(I) 50, 48 h were 10.64 mg L⁻¹ for *Daphnia similis* and 19.9 mg L⁻¹ for *Ceriodaphnia silvestrii*; chronic In the tests the value obtained for the CEO *Ceriodaphnia silvestrii* was 1.29 mg L⁻¹ and 12 mg L⁻¹ *Chironomus xanthus* CENO and 6 mgL⁻¹. In acute toxicity tests made with NP values EC(I) 50; 48h were 0.309 mg L⁻¹ for *Daphnia similis*, 0.4520 mg L⁻¹ for *Ceriodaphnia silvestrii* solvent and water with 0.0541 mg L⁻¹ ethanol solvent and 0.03398 mg L⁻¹ for *Ceriodaphnia dubia*. The value of the CEO to *Ceriodaphnia silvestrii* was 0.0198 mg L⁻¹ and *Chironomus xanthus* was 100 µg g⁻¹, with CENO was 50 µg g⁻¹. Although the found concentrations in the tests are higher than those found in studies to have quantified these compounds in the environment, other studies showed that at concentrations lower than those obtained in this study have problems occur with time and the change of the metabolism of Cladocera androgenization. Also, based on the results obtained with these tests, is intended to alert the public on the risks associated of the presence of these chemicals in the water and the urgency in adopting new techniques in wastewater treatment aiming at the effective removal of these pollutants in water and in the sediment.

Key-words: Bisphenol A, nonylphenol, daphnids, chironomid, toxicity

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A água é fundamental para os seres vivos e durante séculos foi considerada como um recurso natural infinito. Porém, durante os processos de exploração dos recursos hídricos para uso no abastecimento público, pecuário, agrícola e industrial, o homem não tem priorizado a manutenção da qualidade ambiental. Assim, com a disposição inadequada de resíduos líquidos e sólidos sobre o solo e nos corpos d'água, somando-se ao uso indiscriminado dos recursos hídricos pela população, a consequência direta é a redução da qualidade e da quantidade da água para consumo humano (TUNDISI, 2003).

Os corpos d'água vêm sendo continuamente degradados, incorporando diversos grupos de substâncias decorrentes das atividades antrópicas, reduzindo ou até mesmo eliminando a sua capacidade natural de autodepuração. Entre esses compostos destaca-se um grupo de substâncias orgânicas perturbadoras da atividade endócrina dos seres vivos, as quais estão presentes em detergentes, pesticidas, plásticos e resinas, além de estarem presentes nos esgotos sanitário e industrial.

Entre os compostos com ação desreguladora do sistema endócrino destacam-se o bisfenol A (BPA), um subproduto da degradação de plásticos e resinas epóxi (USEPA, 2001), e o nonilfenol (NP), produto do ciclo de degradação de alquifenóis etoxilados, tendo utilização em produtos de higiene pessoal e limpeza, como surfactante não iônico (SCHRODER, 2001).

Vários estudos têm demonstrado a toxicidade do BPA e do NP aos cladóceros (COMBER et al, 1993; ZHANG et al, 2003; HIRANO et al, 2004; SUN e GU, 2005; HONG e LI, 2007) e quironomídeos (BETINETTI e PROVINI, 2002; BETINETTI et al, 2002; WATTS et al, 2003; MIHAICH et al, 2009) . Os cladóceros e chironomídeos são amplamente usados em avaliações ecotoxicológicas de água e sedimento. Porém, na maioria destas avaliações foram utilizados organismos-testes que não ocorrem em sistemas aquáticos tropicais.

Assim sendo, o objetivo da pesquisa foi avaliar a toxicidade aguda e crônica do nonilfenol e do bisfenol A em organismos planctônicos (*Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*) e bentônicos (*Chironomus xanthus*) por meio de testes

toxicidade, contribuindo para uma melhor análise dos efeitos tóxicos desses produtos e dos riscos .

2. OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivo geral avaliar os efeitos tóxicos do bisfenol A e do nonilfenol em organismos zooplancônicos e bentônicos de água doce, visando determinar os possíveis riscos da presença desses compostos no ambiente.

2.1. Objetivos específicos

a) avaliar a toxicidade aguda do nonilfenol e bisfenol A através de testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*;

b) avaliar os efeitos do nonilfenol para *Ceriodaphnia dubia* submetidos a testes de toxicidade agudos;

c) avaliar o efeito do nonilfenol e bisfenol A para *Ceriodaphnia silvestrii* e *Chrironomus xanthus* submetidos a testes de toxicidade crônicos;

d) avaliar o risco ecológico da presença do nonilfenol e do bisfenol A no ambiente.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Recursos hídricos e impactos

Em 1972, através da Declaração de Estocolmo, a Assembléia Geral das Nações Unidas reuniu-se atendendo à necessidade de estabelecer critérios e princípios de modo a orientar a preservação do meio ambiente, com intuito de garantir a manutenção da flora, fauna e recursos hídricos. Além disso, destacou-se a importância de um adequado gerenciamento dos compostos químicos, realizar avaliações dos riscos inerentes para a saúde humana e para o meio ambiente (BRASIL, 2011).

Posteriormente, com a elaboração da Constituição Federal do Brasil, em seu Capítulo VI, no artigo 225, ficou estabelecido que: “Todos têm direito ao meio

ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações” (BRASIL, 1988).

Contrariamente ao proposto no artigo 225, o meio ambiente vem sendo alvo de diversos impactos antropogênicos ao longo do tempo, porém após a Revolução Industrial esse processo foi acelerado. A fabricação em larga escala dos produtos tornou-os mais acessíveis e estimulou o aumento no consumo (PIMENTEL et al., 2006), gerando assim mais resíduos e, conseqüentemente, provocando uma maior degradação ambiental.

Através da introdução de produtos de diversidade e complexidade variáveis no ambiente aquático, têm ocorrido sucessivos impactos, resultando em um amplo espectro de efeitos possíveis, relacionados com a composição química do poluente e da interação deste com o meio (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008), sendo a biota diretamente afetada pela exposição constante a compostos xenobióticos (JESUS e CARVALHO, 2008).

Os surfactantes encontram-se relacionados entre os contaminantes orgânicos de maior consumo mundial (ALVAREZ et al., 1999). As moléculas dos surfactantes possuem comportamento anfifílico, sendo que a parte hidrofóbica é formada por cadeias alquílicas contendo de 10 a 18 átomos de carbono, enquanto a porção hidrofílica pode ser constituída por grupos não iônicos ligados à cadeia carbônica (PENTEADO et al.; 2006). Uma das conseqüências do comportamento anfifílico é a adsorção das interfaces como da solução com o ar: formando micelas, estruturas coloidais, cristais líquidos liotrópicos e vesículas (SINGER e TJERDEMA, 1993). Essas propriedades possuem aplicações importantes na indústria, tais como na formulação de produtos de higiene pessoal, tintas, agroquímicos e fármacos.

Os surfactantes, em função da carga elétrica da porção hidrofílica da molécula, são classificados em quatro categorias: não-iônicos, aniônicos, catiônicos e zwitteriônicos (RAND, 1995). O nonilfenol é considerado um surfactante não-iônico.

O BPA também é um composto orgânico, oxigenado, formado por dois anéis aromáticos ligados entre si por um átomo de carbono. O consumo mundial de bisfenol A em 2006 foi de 3,9 milhões de toneladas e em 2010 aumentou para 5 milhões

(BALLESTEROS-GOMEZ et al., 2009). É usado na produção de plásticos policarbonatos, tendo usos na fabricação de frascos, mamadeiras, CDs, DVDs, componentes automotivos (VOGEL, 2009; CHEN et al., 2010).

O nonilfenol é pouco solúvel em água enquanto que o bisfenol é moderadamente solúvel (a solubilidade é $4,9 \text{ mgL}^{-1}$ e 300 mgL^{-1} , respectivamente), sendo o NP um composto lipossolúvel. As propriedades físicas e químicas são as indicadoras da destinação desses compostos no ambiente (STAPLES et al., 1998; SOUSA, 2011).

O uso crescente e inadequado desses produtos têm provocado reflexos negativos no equilíbrio dos ecossistemas, sendo fundamental a compreensão dos mecanismos de atuação desses compostos no ambiente, bem como nos organismos.

Como consequência direta do crescimento do uso desses compostos capazes de provocar desregulação endócrina, ocorreu um aumento na preocupação quanto à qualidade da água de consumo e no ciclo de vida de produtos. No que concerne à qualidade da água e ao ciclo de vida de produtos com potencial de desregulação endócrina, são de responsabilidade da comunidade científica, da indústria, do governo e da sociedade em geral (LAFLEUR e SCHUG, 2011), uma vez que os produtos gerados pela indústria são utilizados por toda a população e entram continuamente em contato com água de consumo humano, seja no uso adequado ou não.

Assim sendo, coloca-se como um dos maiores desafios do homem neste século XXI equalizar o desenvolvimento econômico e industrial e garantir a preservação dos ecossistemas e recuperar o equilíbrio ecológico (ANDRADE, 2009).

Entre os principais focos de estudos da comunidade científica nesse século estão os compostos orgânicos conhecidos como desreguladores endócrinos, são hormonalmente ativos, alterando o sistema endócrino dos organismos, através de mudanças comportamentais, reprodutivas e/ou funcionais (SADIK e WITT, 1999; GOLOUBKOVA e SPRITZER, 2000).

3.1 Desreguladores Endócrinos

Certas substâncias podem interferir no metabolismo endócrino dos seres vivos, sendo responsáveis pela desregulação endócrina, podendo afetar a saúde, o crescimento ou a reprodução do indivíduo (BIRKETT e LESTER, 2003).

Esses produtos químicos são conhecidos como *Endocrine Disrupting-Chemicals* (EDCs), Disruptores ou Desreguladores Endócrinos (DE) ou ainda Perturbadores Endócrinos ou Interferentes Endócrinos. O desregulador endócrino pode ser definido como uma substância química exógena ou mistura, que promove alterações em uma ou mais funções do sistema endócrino e na sua estrutura, causando, conseqüentemente, efeitos adversos na saúde de um organismo, ou a sua descendência, com base em estudos científicos (COMISSÃO EUROPÉIA, 1996; USEPA, 1997). Os efeitos provocados nos organismos pelos desreguladores endócrinos ocorrem nos mamíferos e nos demais grupos animais, incluem diversos mecanismos de ação que dependem da característica do composto, do meio e do organismo exposto (LINTELMANN et al, 2003).

Existem muitas definições para o termo desregulador endócrino, algumas com base em seus efeitos, ou seja, são substâncias que podem interferir no funcionamento normal do sistema endócrino, causando doenças entre elas o câncer, mesmo estando presentes em baixas concentrações no ambiente (JIMENES, 1997; SANTAMARTA, 2001; WITORSCH, 2002; CREWS e MCLACHLAN, 2006).

O impactos dos desreguladores endócrinos nos ecossistemas podem ser avaliados em diversos componentes da biota aquática, sendo o NP a principal substância DE em área industriais, além dos ftalatos e do bisfenol A, ambos estão presentes em efluentes industriais (JOHNSON e JURGENS, 2003). Além disso, a necessidade de ampliar os conhecimentos sobre os efeitos potenciais dos desreguladores endócrinos nos organismos propiciou um aumento nos métodos de ensaios in vitro e in vivo, identificando com mais eficácia os efeitos biológicos dessas substâncias naturais e sintéticas presentes no ambiente (BILA e DEZOTTI, 2007).

A União Europeia e os Estados Unidos criaram uma lista com as substâncias que necessitam de um maior número de estudos mediante os indícios já existentes sobre seu potencial de desregulação endócrino. A lista contendo alguns desses compostos é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1- Relação de alguns compostos classificados como desreguladores endócrinos (Adaptado de BILA e DEZOTTI, 2007).

Classe	Composto
Ftalatos	Dimetil ftalato, dietil ftalato, di-iso-butil ftalato, di-n-butil ftalato, dicicloexilo ftalato, di (2-etil-exil) ftalato, di-n-octil ftalato, di-isooctil ftalato
Alquifenóis	Nonilfenol, nonilfenol etoxilado, octifenol, octifenol etoxilado
Organoclorado	dibenzo-p-dioxina, TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina), TCDF (2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano)
Bisfenol	Bisfenol A
Parabenos	Benzilparabeno, isobutilparabeno Butilparabeno, n-propilparabeno Etilparabeno, metilparabeno
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Naftalina, acenaftileno, criseno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno.
Metais pesados	Cádmio, mercúrio, chumbo, zinco
Pesticidas	<i>Inseticidas</i> : DDT, DDE , deltametrin, carbofurano. <i>Herbicidas</i> : atrazina, linuron. <i>Fungicidas</i> : vinclozolina, carbendazime, penconazol, procloraz, propiconazol.
Policlorados de bifenilas	2,4,4'-triclorobifenil, 2,2',5,5'-tetraclorobifenil, 2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil, 2,3',4,4',5-pentaclorobifenil, 2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil
Retardantes de chama bromado	Polibromofenila (PBP), 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE 47), 2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE 99), tetrabromobisfenol A (TBBA).
Fitoestrogênicos	<i>Isoflavonas</i> : daidzeína e genisteína. <i>Lignan</i> s: metaresinol e enterodiol.
Medicamentos	dietilestilbestrol (DES) 17 α -etinilestradiol (EE2)
Estrogênios naturais	estrona (E1) 17 β -estradiol (E2)

A tabela acima apresenta compostos naturais, tais como: fitoestrogênicos e os estrogênios humanos, além dos compostos químicos fabricados pelo homem, tais como medicamentos, ftalatos, pesticidas, bisfenol A, alquifenóis e parabenos, ambos os grupos possuem ação estrogênica.

3.3. O sistema endócrino e os hormônios

O sistema endócrino está presente nos organismos multicelulares, responsável pelo controle das funções das células e órgãos, atuando em conjunto com o sistema nervoso, na regulação da produção de hormônios por glândulas específicas, relacionadas ao crescimento, reprodução e manutenção do organismo (BIRKETT e LESTER, 2003; GUYTON e HALL, 2006).

O sistema endócrino é formado por glândulas localizadas em diferentes partes do corpo (Figura 1), tais como a hipófise, tireóide, gônadas e por hormônios específicos sintetizados por elas (BIRKETT e LESTER, 2003; GUYTON e HALL, 2006; NORRIS e CARR, 2006).

Figura 1: O sistema endócrino humano (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Os hormônios são substâncias químicas produzidas pelas glândulas endócrinas e são transportadas através do sangue para os locais de atuação, provocando respostas em diferentes partes do corpo distintas do local de sua produção (NOLLET, 2011).

As gônadas e o fígado são os órgãos mais diretamente afetados pelos interferentes endócrinos, pois as gônadas são o local de produção de hormônios e o fígado de metabolização dos mesmos.

O fígado pode detoxificar substâncias como o álcool, eliminar fármacos, alterar quimicamente e excretar hormônios (TORTORA e GRABOWSKI, 2002). Além disso, é o fígado o principal órgão responsável pela degradação dos compostos xenobióticos no organismo (BERRY e EDWARDS, 2000).

3.4. Mecanismos de ação dos Desreguladores Endócrinos

Os efeitos gerados pelos DEs no sistema endócrino e reprodutor dos seres vivos são decorrentes da capacidade de: ser miméticos aos hormônios endógenos; possuir efeitos antagônicos aos hormônios endógenos; interromper a produção e metabolismo de hormônios; interromper a síntese de receptores de hormônios (VOS et al., 2000; MENDES, 2002). De uma maneira geral, a ação dos hormônios na célula pode ser explicada conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2: Disfunções endócrinas: (a) resposta natural; (b) efeito agonista; (c) efeito antagonista (BIRKETT e LESTER, 2003).

O processo de ativação do metabolismo endócrino começa com a secreção de hormônios pelo hipotálamo que controlam a liberação de outros hormônios pela hipófise. As glandotrofinas, induzem a síntese e a atividade de outros hormônios de tecidos específicos, que são transportados pelo sangue até as células-alvo, modificando

a atividade celular nos receptores. A mudança de atividade celular é transmitida pela membrana plasmática, de acordo com o tipo do hormônio, através de diversos caminhos metabólicos. A quantidade dos hormônios presentes no organismo, pode ativar ou desativar mecanismos de feedback, visto que esses processos fisiológicos são relacionados em cascata e independentes (AZEVEDO e CHASIN, 2003; GUYTON e HALL, 2006; GHISELLI e JARDIM, 2007).

A alteração e funcionamento do sistema endócrino ocorrem quando um DE interage com os receptores hormonais celulares e modifica a resposta natural do organismo (GHISELLI, 2006). Os desreguladores endócrinos podem competir por receptores de estrogênio ou pelos receptores de androgênio, exercendo assim, efeitos de feminização ou de masculinização no organismo (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Os efeitos dos xenobióticos no ambiente e no sistema endócrino dos seres vivos tem sido alvo de diversos estudos nas ultimas cinco décadas (CARSON, 1962; GIGER et al., 1984; COLBORN, 1997; SANTAMARTA, 2001; MENDES, 2002; BILA E DEZOTTI, 2007; SOARES et al., 2008; SÁNCHEZ-ÁVILA et al, 2009). Os primeiros relatos sobre o efeito dos produtos químicos nos seres vivos foram feitos por Rachel Carson, com a publicação do livro *Silent Spring* em 1962, analisando os impactos do DDT no meio ambiente e em animais. Porém, em 1997 foi a publicação do livro *Our Stolen Future*, de Theo Colborn que de fato promoveu uma maior preocupação na sociedade, pois o autor relata em suas pesquisas as conseqüências do uso indiscriminado de produtos químicos pelo homem que estão contaminando todo o planeta.

Outros estudos alertando para a problemática dos desreguladores endócrinos foram relatados entre os anos 1948 e 1971, período em que as mulheres usavam um medicamento antiabortivo que continha o hormônio dietilestilbestrol (DES). Os filhos que nasceram dessas mulheres, na adolescência e vida adulta, tiveram diversos problemas, dentre os quais alterações em seus órgãos reprodutores, câncer genital, alterações na gestação, alterações de fertilidade, depressão e alterações no sistema imunológico (BIRKETT e LESTER, 2003). Esse é um exemplo devidamente documentado de exposição humana aos desreguladores endócrinos, no qual a administração de um hormônio pela mãe causa efeito na sua descendência (BILA e DEZOTTI, 2007).

A exposição ao DDT foi relacionada com a diminuição das populações de espécies e alterações de características em aves e jacarés, nos EUA. Na década de 1980,

na região dos Grandes Lagos, observaram-se caracteres femininos em aves masculinas e ovos com cascas frágeis, e na Flórida, os jacarés apresentaram o mesmo problema (BIRKETT e LESTER, 2003; LINTELMANN et al, 2003).

A exposição aos DEs pode induzir ao aparecimento de determinados tipos de câncer, além de interferir na capacidade de proliferação e diferenciação de grupos celulares específicos (PISAPIA et al., 2012).

No Brasil, foram feitos diversos estudos sobre os desreguladores endócrinos em águas superficiais, porém são cronologicamente bem mais recentes (TERNES et al., 1999; LOUREIRO, 2002; LEANDRO, 2006; GHISELLI, 2006; RAIMUNDO, 2007; GEROLIN, 2008; REIS-FILHO, 2008; MOREIRA et al., 2009; SODRÉ et al, 2010; BERALDO, 2012).

É necessário conhecer detalhadamente as propriedades dos compostos desreguladores endócrinos, para que se possa compreender melhor o destino e o efeito dessas substâncias nos organismos e no ambiente, tais como: solubilidade em água, hidrofobicidade, coeficiente de partição, biomagnificação e toxicidade (GHISELLI e JARDIM, 2007).

3.5. A Ecotoxicologia

Mediante a contaminação dos recursos hídricos por compostos orgânicos e inorgânicos, a Ecotoxicologia Aquática se mostra como um instrumento eficaz na avaliação da toxicidade desses compostos químicos para a comunidade aquática. Assim, a Ecotoxicologia Aquática pode ser usada como ferramenta na elaboração de cenários e predição de efeitos, ao avaliar a ação dos poluentes de acordo com o ambiente estudado e as interações existentes (NEWMAN e UNGER, 2003).

Organismos de diferentes níveis tróficos podem ser usados em testes toxicidade como forma de ressaltar o impacto que essas substâncias químicas exercem sobre os seres vivos, abrangendo todas ou algumas fases do ciclo de vida dos mesmos, sob condições controladas (ZAMBONI, 1993).

Os testes de toxicidade podem ser feitos *in situ* ou em laboratório. Os ensaios *in situ* apresentam a condição ambiental real em que os organismos estão expostos, enquanto que nos ensaios laboratoriais os organismos são submetidos à condições

controladas e as respostas podem ser melhor observadas (CONNELL e MILLER, 1984).

Os testes podem ser de toxicidade aguda, no qual os organismos são expostos por um período curto de tempo (24 a 96h), sendo observada a mortalidade de uma porcentagem de indivíduos (10, 25 ou 50%) a CE_{10} , CE_{25} e CE_{50} . Em testes crônicos os indivíduos são expostos aos produtos tóxicos em doses sub-letais por um período significativo do ciclo de vida, avaliando-se os efeitos da substância tóxica sobre uma ou várias de suas funções biológicas, interferindo, por exemplo, na sobrevivência, reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, maturação e/ou comportamento (FONSECA, 1997). À partir dos testes crônicos pode-se obter os valores da Concentração do efeito não observado (CENO), Concentração de efeito observado (CEO) e o Valor crônico (VC), que é a média aritmética entre os valores do CENO e do CEO.

Dessa forma, os testes ecotoxicológicos determinam as concentrações dos agentes químicos que provocam efeitos danosos aos organismos da biota aquática, auxiliando no conhecimento sobre a ação dos agentes tóxicos no ambiente e sendo feitos em condições controladas podem ser utilizados no desenvolvimento de padrões de qualidade da comunidade aquática (CALOW, 1995; BERTOLETTI, 2000).

Os organismos-teste utilizados no Brasil são geralmente espécies exóticas, usadas para determinar a toxicidade de efluentes ou substâncias em ambientes nos quais elas não ocorrem ou não são relevantes (CAIRNS, 1993). Assim, os estudos ecotoxicológicos feitos com espécies locais ou autóctones, valendo-se de sua importância ecológica e da representatividade no ecossistema, torna-se uma ferramenta mais eficiente para definir critérios de qualidade de água e lançamento de efluentes em corpos d'água (FONSECA, 1991).

3.6. O Nonilfenol como Desregulador Endócrino

Existem diversos compostos capazes de atuar como um DE, que podem ser naturais (estrogênios como o 17β estradiol e a estrona, além dos fitoestrogênios) ou artificiais como pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas, bisfenol A, produtos farmacêuticos (medicamentos e produtos de higiene pessoal) e alquifenóis (BILA e DEZOTTI, 2007).

Entre as substâncias consideradas como desreguladores endócrinos tem-se o grupo dos alquifenóis (APs). Os APs estruturalmente são formados por uma cadeia carbônica ligada a um grupo fenólico e podem ser usados no processo de fabricação dos alquifenóis etoxilados (APEs). Os APEs pertencem ao grupo dos surfactantes não iônicos. Entre eles estão presentes o nonilfenol (NP), octifenol (OP) e nonilfenol etoxilado (NPE). O 4-nonilfenol ($C^{15}H^{24}O$) (Figura 3) é um isômero mais produzido, sendo diferenciado dos demais isômeros pela posição do anel fenólico e pela cadeia de carbonos ligada a ele (CWQG, 1999).

Figura 3: Fórmula estrutural do 4-nonilfenol.

Possui valor de partição octanol/água, o $\log K_{ow} = 4,48$ evidenciando seu caráter hidrofóbico, o que indica uma maior afinidade pela fase orgânica, além disso, possui baixa solubilidade em água, apenas de $4,90 \text{ mgL}^{-1}$. O NP é um composto semi-volátil pela pressão de vapor de $1,33 \text{ Pa}$ e o pK_a é de $10,7$.

Alquifenóis, incluindo NP e NPE, são detectados no ambiente natural incluindo ar, sedimentos, plantas, solo, águas superficiais, poeira domiciliar e tecidos animais (MDEP, 2010).

O NP e outras substâncias com atividade estrogênica ainda não estão inseridos na legislação brasileira para águas superficiais – Resolução n° 357/2005 do CONAMA (BRASIL, 2005). O NP entrou na lista de substâncias prioritárias da União Europeia, em conjunto com o octifenol, benzeno, os PHA's e uma gama de hidrocarbonetos clorados (EC, 2008). Como parâmetro, a concentração limite de NP e seus etoxilados é de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ no Canadá, em águas naturais (CANADA, 2002).

O nonilfenol está presente em substâncias como detergentes industriais, dispersantes, emulsificantes, flocculantes, tintas, plásticos, óleos, PVC e espermicidas (AHEL e GIGER, 1985; LEE, 1998; GEROLIN, 2008; EPA, 2011). Após o uso

doméstico e industrial o nonilfenol é levado até as Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e durante o processo de tratamento dos efluentes pode ocorrer a biodegradação do NP, levando a formação de produtos mais tóxicos que os de origem (SILVA et al, 2007; WU et al, 2010).

A principal fonte de entrada de NP no ambiente é através da biodegradação do NPE em estações de tratamento de efluentes que utilizam o método convencional. Dessa maneira estima-se que entre 30 e 35% dos NPEs são convertidos a NP e NPEs de cadeia curta, sendo mais recalcitrantes e ainda mais tóxicos (AHEL et al, 1994; SOARES, 2008).

O NP é um desregulador endócrino com ação estrogênica, tóxica e carcinogênica em mamíferos e nos demais grupos animais (AZEVEDO et al, 2001; SILVA et al., 2007; YANG et al, 2008). Em humanos, são muitos os efeitos que podem estar relacionados à exposição ao NP e NPE, nos adolescentes e homens adultos a redução de fertilidade, da produção de esperma e da capacidade de fertilização dos espermatozoides, enquanto que nas mulheres podemos relacionar a dificuldade em engravidar e em manter a gravidez, o aumento da incidência de endometriose e em ambos os gêneros, o aumento da incidência de: câncer, hiperatividade, alergias, problemas imunológicos (QUEIRÓZ et al., 2006).

Segundo Giger et al (1984) as doses letais de nonilfenol para peixes estão entre 0,13 e 0,3 mgL⁻¹, enquanto que para *Daphnia magna* a CE₅₀ é de 0,19 mgL⁻¹ (COMBER et al, 1993).

3.7. O bisfenol A como Desregulador Endócrino

O bisfenol A é produzido em larga escala sendo utilizado como intermediário para produção de policarbonato, plástico rígido, resinas epóxi e retardantes de chama (STAPLES et al, 1998; ERLER et al, 2010). Como produtos finais, o bisfenol A está envolvido na produção de adesivos, revestimentos protetores, tintas em pó, CDs, lentes automotivas, lentes ópticas e forros térmicos para alimento (STAPLES et al, 1998; ERLER et al, 2010).

Devido a durabilidade dos policarbonatos eles são mais vantajosos para o uso industrial, mas seu efeito mimético aos estrógenos foi reconhecido e vem sendo estudado.

O bisfenol A (BPA) em condições ambiente encontra-se no estado sólido, sendo vendido em cristais, grânulos ou flocos. Geralmente se dissolve bem em água, sua solubilidade em água é de 120 - 300mgL⁻¹, pK a 9,59- 11,30 e possui fórmula molecular C₁₅H₁₆O₂ e a fórmula estrutural está representada na Figura 4. O BPA possui log Kow 3,4 o que é indicativo de sua tendência à lipofilicidade podendo ligar-se mais facilmente às partículas de sedimento (BIRKETT e LESTER, 2003). Pelo tempo de meia-vida no sedimento, nas águas superficiais e na coluna d'água, o bisfenol A é considerado uma substância orgânica persistente (LINTELMANN et al, 2003).

Figura 4: Fórmula estrutural do bisfenol A.

A legislação brasileira não contempla limites para o BPA nas águas, apenas nos alimentos, através do Limite de Migração Específico. O chamado Limite de Migração Específico (LME) é definido como a quantidade máxima admissível de um componente específico de um material transferida a um simulante do alimento, em condições laboratoriais, no Brasil é de 3 mg kg⁻¹ de alimento, enquanto na União Européia esse valor é de 0,6 mg g⁻¹ (BALLESTEROS-GOMEZ et al., 2009).

A exposição humana a baixas doses de BPA se dá continuamente, principalmente por meio do contato com alimentos, plásticos e a partir do revestimento de alimentos e recipientes de bebidas (HEALTH CANADA, 2008), selantes de materiais dentários e produtos de uso infantil, tais como mamadeiras e chupetas, além da exposição ocupacional em fábricas que utilizam esse composto como matéria prima, nesse último caso, essa exposição se dá principalmente por inalação e através da pele (

O BPA reduz os níveis séricos de cálcio em ratas grávidas, ao atuar sobre a expressão do gene envolvido na transferência de Ca, inibindo a absorção de Ca no intestino e sua posterior reabsorção no rim (KIM et al., 2013).

Em relação aos organismos aquáticos, um estudo realizado por Mu et al. (2005) com *Daphnia magna* mostrou que o BPA pode interferir no processo de produção de hormônios relacionados à muda. Chen et al. (2002), em ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna*, obtiveram os valores de CE₅₀ para 24 horas e 48 horas, de 24 mgL⁻¹ e 10 mgL⁻¹, respectivamente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Organismos-teste estudados

As espécies zooplanctônicas selecionadas como organismos-teste foram os cladóceros *Daphnia similis* e a *Ceriodaphnia dubia*, padronizados internacionalmente, a espécie endêmica *Ceriodaphnia silvestrii*, padronizado pela ABNT e uma espécie bentônica da família *Chironomidae*, o *Chironomus xanthus*.

A espécie *Daphnia similis* Straus, 1820 (*Cladocera*, *Crustacea*) possui comprimento máximo de 3,5 mm (Figura 5) e o gênero possui abundante distribuição no hemisfério norte (ABNT, 2004).

Figura 5: Vista geral da espécie de *Daphnia similis*. (Foto: IPEN – arquivo CQMA, à partir a internet: <http://www.ipen.br/sitio/?idc=388>).

Os indivíduos da espécie *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Figura 6) possuem comprimento do corpo entre 0,8 e 0,9 mm, formato corporal ovalado com

acentuado sinus cervical e com 9 a 12 espinhos anais. Esta espécie é nativa do Brasil e da Argentina (ABNT, 2005).

Figura 6: Vista geral da espécie *Ceriodaphnia silvestrii*. (Foto obtida à partir da internet: http://species.wikimedia.org/wiki/Ceriodaphnia_silvestrii).

Os cladóceros da espécie *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (Figura 7) são originários da América do Norte e Europa, possuem tamanho médio entre 0,8 e 0,9 mm de comprimento na fase adulta e o corpo no formato ovalado, tendo de 8 a 10 espinhos anais no pós-abdomen (ABNT, 2005).

Figura 7: Vista geral da espécie *Ceriodaphnia dubia*. (Foto obtida à partir da internet: <http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/species.html>).

Nos testes com sedimento foi utilizada uma espécie nativa de quironomídeo, o *Chironomus xanthus* (Figura 8), cuja biologia, condições de cultivo e sensibilidade

foram estudadas por Fonseca; Rocha, 2004. As espécies *Chironomus riparius*, *Chironomus tentans* e *Chironomus yohimatsui* são padronizadas internacionalmente pela OECD (OECD, 2004).

Figura 8: Vista da larva de *Chironomus xanthus*. (Foto obtida à partir da internet: http://www.cbd.int/programmes/areas/water/toolkit/html/1.7.4d_invertebrates.html).

4.2. Cultivo e manutenção das espécies de *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*

Os cultivos dos organismos e a sua manutenção foram realizados de acordo com as normas padronizadas (ABNT, 2004; 2005) e mantidos no Laboratório do Núcleo de Estudos de Ecossistemas Aquáticos da Universidade de São Paulo, localizado no Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (Itirapina, SP).

Os indivíduos de *Daphnia similis* foram cultivados em água reconstituída acrescida de soluções específicas (Solução 1 e 2) para configurar as seguintes características: pH 7,2 a 7,6 e dureza entre 40 e 48 mg CaCO₃ L⁻¹. Essa espécie de cladóceros foi mantida em béqueres de 2 litros, com um máximo de 50 indivíduos por recipiente, sendo que a manutenção das culturas foi realizada três vezes por semana, quando eram renovados a água e o alimento. Os organismos de *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia* foram cultivados em água reconstituída preparada segundo norma da ABNT (2005), nas características já descritas para o cultivo de *Daphnia similis*. Os indivíduos foram mantidos em béqueres de 1 litro, com um máximo de 70 indivíduos. A renovação da água e do alimento também foi realizada três vezes por semana. Os cultivos foram mantidos com controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ$ para *Daphnia similis* e 25

$\pm 2^{\circ}\text{C}$ para *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia*) e com fotoperíodo controlado de 16h (claro) /8h (escuro).

A alimentação dos cladóceros foi feita a partir de uma suspensão algal de *Pseudokirchneriella subcapitata*, cultivada em meio L.C.Oligo a uma concentração final de 1×10^5 células L^{-1} para *Daphnia similis* e 6×10^4 células L^{-1} para *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia*. Além da alga, foi fornecido um alimento composto (levedura e ração de peixe fermentada na proporção de 1:1) na concentração de 1mLL^{-1} , conforme descrito na norma ABNT (2005).

4.3. Teste para determinação da sensibilidade dos organismos

Foram feitos testes periódicos com substâncias de referência para controle da sensibilidade dos organismos, visando obter uma maior confiabilidade nos resultados. A recomendação é que os testes de sensibilidade sejam feitos 14 dias antes ou após a realização dos testes de toxicidade, ou em paralelo a estes (ENVIRONMENT CANADA, 1992). As substâncias de referência usadas foram o cloreto de sódio (NaCl) para *Ceriodaphnia silvestrii* e para *Ceriodaphnia dubia*, e o cloreto de potássio (KCl) para *D. similis* (ABNT, 2005).

Para as espécies *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia* foram colocadas cinco neonatas em tubos falcon contendo 10 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl), em diferentes concentrações: 0 (controle); 0,6; 1,0; 1,3; 1,6; 2,2 gL^{-1} , em quatro réplicas.

Para *Daphnia similis* foram colocados cinco neonatas em cada tubo falcon contendo 10 mL da solução de cloreto de potássio (KCl), em diferentes concentrações: 0 (controle); 150; 300; 450; 600; 900 mgL^{-1} , em quatro réplicas.

Durante a realização dos testes, os organismos de *Daphnia similis* foram mantidos a $20 (\pm 2^{\circ}\text{C})$ e os indivíduos de *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* foram mantidos a $23 (\pm 2^{\circ}\text{C})$. Os organismos-teste foram mantidos sem alimentação e após o período de 48h registrou-se o número de indivíduos imóveis para o cálculo da CE(I)_{50} , a concentração efetiva mediana que causa efeito a 50% dos organismos em 48h de exposição.

Os organismos foram considerados adequados para ser utilizados em testes quando o valor da CE(I)_{50} estava dentro da faixa de sensibilidade estabelecida pela carta

controle (ABNT, 2004; ABNT, 2005). As faixas de sensibilidade para os cladóceros obtidas nos testes com as substâncias de referência para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*, estão relacionadas nas tabelas 2, 3 e 4, respectivamente.

Tabela 2 – Valores da Média, Desvio Padrão com Limites inferior e superior obtidos à partir de testes de sensibilidade para *Daphnia similis*

Média	546,54
DP	35,59
Limite inferior	475,35
Limite Superior	617,73

Tabela 3 – Valores da Média, Desvio Padrão, Limites inferior, Limite superior e Faixa de sensibilidade obtidos à partir de testes de sensibilidade para *Ceriodaphnia dubia*.

Média	1,20
DP	0,19
Limite inferior	0,82
Limite Superior	1,58
Faixa de sensibilidade	0,82 – 1,58

Tabela 4 – Valores da Média, Desvio Padrão, Limites inferior, Limite superior e Faixa de sensibilidade obtidos à partir de testes de sensibilidade para *Ceriodaphnia silvestrii*

Média	1,47
DP	0,23
Limite inferior	1,01
Limite Superior	1,93
Faixa de sensibilidade	1,01 – 1,93

4.4. Testes de toxicidade aguda do nonilfenol (NP) e do bisfenol A (BPA) para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*

4.4.1. Preparo das soluções-teste

As soluções-teste foram preparadas no dia da realização dos experimentos, com o auxílio de ultrassom para favorecer a dissolução da solução padrão, antes das diluições sucessivas. As soluções-teste foram preparadas à partir de soluções estoque de cada composto, sendo que para diluição do nonilfenol utilizou-se etanol como solvente e água destilada para diluição do bisfenol A. As soluções estoque foram mantidas em frasco de vidro âmbar, em refrigerador a 4°C.

O composto nonilfenol utilizado no presente estudo foi de Número CAS: 84852-15-3; Massa Molecular: 220,35; Massa molecular $C_{15}H_{24}O$, Dr. Ehrenstorfer[®], Alemanha. O composto bisfenol A utilizado foi o de Número CAS: 80-05-7; Massa Molecular: 228,29 g mol⁻¹; $C_{15}H_{16}O_2$, Marca Sigma-Aldrich[®], Estados Unidos.

4.4.2. Testes preliminares

Foram realizados testes preliminares com indivíduos de *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia* para estabelecer as concentrações de bisfenol A e nonilfenol a ser utilizadas nos testes definitivos. O intervalo de concentrações foi delimitado pelo valor da menor concentração que causou imobilidade a 100% do organismos e a maior concentração na qual não foi observada imobilidade.

4.4.3. Testes definitivos

A metodologia seguida para a realização dos testes foi de acordo com a descrita na norma padronizada (ABNT, 2004).

Para os testes de toxicidade aguda foram utilizados neonatos de *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* com menos de 24 horas de idade obtidos a partir de fêmeas de 7 a 15 dias de idade (terceira a sexta geração). Neonatos de *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia* foram expostos a diferentes concentrações de bisfenol A e nonilfenol, estabelecidas nos testes preliminares. Em cada tubo falcon de 15 mL foram colocados 5 neonatas juntamente com 10mL da solução-teste (Figura 9). Os organismos-teste foram mantidos à mesma temperatura dos

cultivos-estoque e não foram alimentados durante a realização dos testes de toxicidade aguda.

Figura 9: Montagem dos teste de toxicidade aguda. (Foto: Mariângela Spadoto).

Foram testadas quatro réplicas para cada concentração e o controle, no qual era usada a água de cultivo dos cladóceros. Foram feitas medidas das variáveis: pH (pHmetro B374 - Micronal), condutividade (Condutivímetro model 145 - Orion) e oxigênio dissolvido (OD - YSI) e dureza (titulometria com EDTA) sendo realizadas as medições dos parâmetros no início e no final dos testes, quando possível. A imobilidade dos organismos-teste foi avaliada após 48h do início do teste e os resultados foram expressos como porcentagem de organismos imóveis. O teste foi descartado quando mais de 10% dos organismos estava imóvel no controle, segundo o estabelecido pela norma (ABNT, 2005).

4.4.4. Análise Estatística

Os dados relativos aos testes de toxicidade aguda do nonilfenol e do bisfenol A foram analisados utilizando-se o programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber para estimar a concentração efetiva mediana (CE) da substância analisada que causa efeito a 50% dos indivíduos expostos (HAMILTON et al., 1977).

4.5. Testes de toxicidade crônica do nonilfenol (NP) e do bisfenol A (BPA) para *Ceriodaphnia silvestrii*

As concentrações de bisfenol A e nonilfenol que foram utilizadas nos testes crônicos foram obtidas a partir dos resultados dos testes de toxicidade aguda. Para a realização dos testes de toxicidade crônica foram utilizados neonatos de *Ceriodaphnia silvestrii* entre 6 e 24 horas de idade (ABNT, 2005).

Os testes foram realizados em tubos de ensaio de 15 mL, sendo 10 réplicas de cada concentração do nonilfenol e bisfenol A, e 10 réplicas do controle com água reconstituída, para cada substância, as quais foram mantidas sob a mesma temperatura e fotoperíodo dos cultivos estoque. Foram feitos testes com o padrão diluído em água e diluição em etanol. Nos testes realizados com etanol foram feitos, além do controle normal, o controle do solvente utilizando-se para tal a maior concentração amostrada no respectivo teste.

Em cada réplica foram colocados 15 mL da solução-teste e um organismo-teste. A solução-teste foi renovada durante os oito dias da realização do teste, a cada 48 horas, sendo colocada solução nova com alimento para o organismo-teste. Durante o processo de renovação da solução-teste, o organismo-teste foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur, sendo verificada a imobilidade e o número de indivíduos jovens em cada réplica, para fins de avaliar a fecundidade sobrevivência. Durante o período de realização dos testes crônicos, os cladóceros foram alimentados com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e alimento composto, de acordo com o procedimento já descrito anteriormente para os cultivos-estoque.

Foram feitas medições de pH (pHmetro B374 - Micronal), dureza (titulometria com EDTA), condutividade (Condutivímetro Orion – Model 145) e oxigênio (OD - YSI) dissolvido das soluções-teste recém-preparadas e das soluções a serem descartadas a cada troca da solução-teste, nas concentrações: maior, intermediária e menor (ABNT, 2005). Os testes foram considerados válidos quando a mortalidade de organismos adultos no controle não excedeu o valor de 20% e quando 60% ou mais das fêmeas adultas sobreviventes no controle tivessem produzido no mínimo 15 neonatas, não ultrapassando o oitavo dia, o que determina o término do teste (ABNT, 2005).

4.6. Testes de toxicidade crônica com *Chironomus xanthus*

Os organismos-teste são da espécie bentônica não padronizada *Chironomus xanthus* (Chironomidae, Diptera) de fácil manutenção e cultivo, anteriormente objeto de alguns estudos (FONSECA, 1997; DORNEFELD, 2006).

Os indivíduos de *Chironomus xanthus* foram colocados em bandejas plásticas e cobertos por gaiolas de nylon para impedir a saída dos adultos emergentes. No início da cultura foram colocadas 200 larvas no I instar na bandeja. Para a montagem das bandejas é colocado o sedimento controle (previamente esterilizado em mufla, 550°C por 1 hora) e quatro litros de água de manutenção (pH 6,5 – 7,5 e dureza 12 -16 mg de $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$), o cultivo deve ser mantido em aeração constante, em sala com temperatura controlada ($\pm 25^\circ\text{C}$) com fotoperíodo de 12 horas. As larvas foram alimentadas com solução algal na concentração de 10^5 células/mL apenas no primeiro dia, nos demais foi fornecida ração para peixes TetraMin[®] triturada diluída em água (FONSECA, 1997; USEPA, 2000; OECD, 2001).

O experimento foi desenvolvido em recipientes de 1 litro de capacidade, contendo 800mL da solução-teste (feita com água de cultivo e a solução na concentração a ser testada, em três réplicas), 200g de sedimento (areia) e o alimento fornecido foi 4mL de ração TetraMin[®] triturada e diluída em água (VERMEULEN et al, 2000; DORNEFELD, 2006). Os recipientes foram mantidos sob aeração constante durante o período de realização do teste. Em cada recipiente foram colocadas 10 larvas no I instar. As condições de manutenção do teste foram semelhantes às do cultivo (fotoperíodo e temperatura).

Os testes foram montados em sistema fechado, sob aeração constante. Três réplicas para cada concentração e controle, foi feita troca de 50% da água a cada dois dias, juntamente com a troca era adicionado alimento, e o período de duração do teste foi determinado em 15 dias, tempo necessário para ocorrer a emergência, sendo variável de acordo com o ciclo de vida de espécie.

4.7. Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes crônicos, relativos à sobrevivência e reprodução, foram testados para normalidade e variância de homogeneidade (Chi-quadrado e Testes Hartley) e posteriormente submetidos ao teste paramétrico de Dunnett se a distribuição fosse considerada normal, ou ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis caso a distribuição não fosse normal. O teste de Dunnett foi usado para determinação dos valores da menor concentração que causa efeito deletério na reprodução (CEO), a maior concentração que não causa efeito deletério na reprodução (CENO) e o Valor Crônico (VC) média entre os valores do CENO e CEO. Para a realização dessas análises foi usado o programa de computador TOXSTAT 3.3 (Gulley et al., 1991) (USEPA, 1993).

4.8. Destino e tratamento dos resíduos gerados na pesquisa

A disposição inadequada de resíduos gerados após uma pesquisa científica ou processo industrial pode acarretar danos ao meio ambiente, contrapondo-se aos objetivos do grupo de pesquisa. Assim, uma das metas deste projeto foi fornecer o tratamento adequado aos resíduos gerados durante a sua execução, minimizando os efeitos que estes compostos poderiam trazer ao meio ambiente. Os resíduos gerados foram acondicionados em recipientes apropriados, etiquetados e estocados em local ventilado e encaminhados ao Laboratório de Resíduos Químicos do Campus – USP.

4.9 Risco e conceitos relacionados

Risco pode ser definido como o potencial de ocorrência de um efeito indesejável para o homem, propriedade, para a saúde e ou meio ambiente (SRA, 2003). Para a toxicologia o risco pode ser considerado como a probabilidade de um composto químico, sob condições de exposições reais, atingir uma população e produzir efeitos adversos (RODRICKS, 1992).

A toxicidade é condição inerente às substâncias químicas e todas as substâncias tem o potencial de ser tóxicas e consequentemente produzir efeitos adversos, dependendo das condições de exposição, da probabilidade de atingir o alvo (órgão) e da concentração (RODRICKS, 1992).

Um dos possíveis métodos para se calcular o risco é através da comparação entre as estimativas de valores da concentração ambiental nos compartimentos ambientais (ar, água, sedimento, solo e biota), denominado de PEC “*Predicted Environmental Concentration*” (Concentração Ambiental Estimada) que pode ser calculado com base no pior cenário ambiental possível, e a PNEC “*Predicted No Effect Concentration*” (Concentração em que não são ocorrem efeitos). Quando o valor do PEC é maior que o do PNEC, consideramos que há o risco ambiental, diretamente proporcional a razão entre PEC/PNEC (UNEP/IPCS, 1999).

O homem e os demais seres vivos estão continuamente expostos a diversos compostos químicos presentes na água, no ar, nos alimentos, nas superfícies e nos produtos que utilizam. Através dessa exposição contínua pode-se ou não estabelecer uma correlação direta ou indireta com o aumento no número de mortes prematuras e doenças; por isso são fundamentais os estudos com identificação e avaliação das exposições aos contaminantes, bem como mensurar os riscos a elas associados (NARDOCCI, 2010).

5. RESULTADOS

5.1. Testes de sensibilidade dos Cladóceros

Os valores de CE(I)₅₀; 48h para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia* ficaram dentro da faixa estabelecida para os mesmos, nas condições de laboratório: 475,35 – 617,73 mgL⁻¹ para *Daphnia similis*, 0,82 - 1,58 gL⁻¹ para *Ceriodaphnia silvestrii* e 1,01 - 1,93 gL⁻¹ para *Ceriodaphnia dubia*, indicando que esses organismos estariam em condições adequadas para serem utilizados nos testes de toxicidade. *Ceriodaphnia silvestrii* foi mais sensível ao cloreto de sódio que *Ceriodaphnia dubia*. As cartas-controle estão no apêndice A.

5.2. Testes de toxicidade aguda do Nonilfenol aos Cladóceros

À partir dos testes preliminares foi estabelecido uma faixa de concentração para os ensaios definitivos. As concentrações estabelecidas para serem usadas nos ensaios definitivos foram: 0,045; 0,09; 0,18; 0,36 e 0,72 mgL⁻¹. Os dados brutos estão apresentados nos Apêndices C, D e F. No controle, a porcentagem de indivíduos imóveis foi inferior a 10%.

Na Tabela 5 são indicados os valores de CE(I)₅₀; 48h, os intervalos de confiança (IC), a média do CE(I)₅₀ e a faixa de sensibilidade, obtidos nos testes de toxicidade agudos feitos com *Daphnia similis* e nonilfenol, nas concentrações 0,045; 0,09; 0,18; 0,36 e 0,72 mgL⁻¹.

Tabela 5 – Valores de CE(I)₅₀; 48h do NP e respectivos intervalos de confiança (IC) obtidos à partir dos testes de toxicidade agudos para *Daphnia similis*. Média, desvio padrão e faixa de sensibilidade.

Ensaio	CE(I) ₅₀ ; 48h (mgL ⁻¹)	Intervalo de confiança (IC)
1	0,170	0,140 – 0,200
2	0,174	0,150 – 0,210
3	0,160	0,130 -0,190
4	0,410	0,330 – 0,530
5	0,410	0,300 – 0,550
6	0,410	0,300 – 0,550
7	0,250	0,210 -0,310
8	0,413	0,340 – 0,500
9	0,250	0,210 – 0,310
10	0,443	0,360 – 0,550
Média	0,309	
Desvio	0,193	
Faixa	0,115 - 0,502	

Assim, para a espécie *Daphnia similis* a faixa de sensibilidade ao NP foi de 0,115 a 0,502 mgL⁻¹ e o CE(I)₅₀ médio foi de 0,309 (±0,193) mgL⁻¹.

Na tabela 6 são indicadas as faixas das variáveis físicas e químicas obtidas nos testes de toxicidade agudos com *Daphnia similis* expostas ao nonilfenol. O pH, o oxigênio dissolvido, a condutividade e a dureza não tiveram variação ampla entre o início e o final dos testes, portanto não foram essas variáveis que afetaram a sobrevivência dos organismos-teste

Tabela 6 – Faixa das variáveis físicas e químicas medidas nos testes de toxicidade agudos com nonilfenol para *Daphnia similis*.

Variáveis físicas e químicas	Faixa
Ph	7,40 – 7,68
Condutividade	
Oxigênio dissolvido	7,09 – 7,71
Dureza	42 – 44

Nos testes feitos com *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia* expostas ao nonilfenol, as variáveis físicas e químicas estão indicadas na Tabela 7. O pH, o oxigênio dissolvido, a condutividade e a dureza não tiveram variação ampla entre o início e o final dos testes, portanto não foram essas variáveis que afetaram a sobrevivência dos organismos-teste.

Tabela 7 – Faixa das variáveis físicas e químicas medidas nos testes de toxicidade agudos com nonilfenol para *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia*.

Variáveis físicas e químicas	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	<i>Ceriodaphnia dubia</i>
pH	6,97 – 7,54	7,27 – 7,65
Condutividade		
Oxigênio dissolvido	6,60 – 7,76	6,95 – 7,24
Dureza	42 -44	42 – 44

Para *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia* foram estabelecidas as faixas de sensibilidade de 0,005 – 0,421 mgL⁻¹ e 0,029 – 0,038 mgL⁻¹, respectivamente. Para

Ceriodaphnia silvestrii foram estabelecidos dois valores de CE₅₀; 48h. No teste com solvente água o valor obtido para o CE₅₀; 48h foi de 0,452 mgL⁻¹, e uma faixa de variação de 0,145 mgL⁻¹. No teste com solvente etanol o valor obtido para o CE₅₀; 48h foi de 0,054 mgL⁻¹ e o coeficiente de variação 0,006 mgL⁻¹ (Tabela 8). Já para *Ceriodaphnia dubia* o valor do CE₅₀ foi de 0,034 e o coeficiente de variação de 0,004 (Tabela 9). Os valores de CE₅₀; 48h e os intervalos de confiança de cada teste estão indicados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Valores de CE(I)₅₀ do nonilfenol e respectivos intervalos de confiança para *Ceriodaphnia silvestrii* em testes de toxicidade aguda, em solvente água e em solvente etanol.

Testes	CE(I) ₅₀ ; 48h (mgL ⁻¹) (água)	Intervalo de confiança (IC)	CE(I) ₅₀ ; 48h (mgL ⁻¹) (etanol)	Intervalo de confiança (IC)
1	0,347	0,30 - 0,41	0,062	0,06 – 0,07
2	0,352	0,31 – 0,40	0,053	0,05 – 0,06
3	0,553	0,47 – 0,65	0,053	0,05 – 0,06
4	0,553	0,47 – 0,65	0,050	0,05 – 0,05
5	-	-	0,052	0,05 – 0,05
6	-	-	0,053	0,05 – 0,06
Média	0,452	0,412 - 0,527	0,054	0,051 - 0,583
Desvio	0,145		0,006	
Faixa	0,306 - 0,597		0,047 - 0,060	

A diferença na solubilidade do NP na solução estoque com água e com etanol, deve-se ao fato de se tratar de um composto pouco solúvel em água (4,9 mgL⁻¹ a 20°C), sendo assim mais disponível na solução etanol, conforme pode ser indicado pela variação no intervalo de confiança, que é menor na solução estoque de etanol.

Tabela 9 – Valores de CE(I)₅₀ do nonilfenol e respectivos intervalos de confiança para *Ceriodaphnia dubia* em testes de toxicidade aguda

Testes	CE(I) ₅₀ ; 48h (mgL ⁻¹)	Intervalo de confiança (IC)
1	0,037	-
2	0,037	-
3	0,034	0,03 – 0,04
4	0,031	0,03 – 0,04
5	0,030	0,03 – 0,03
Média	0,034	
Desvio	0,005	
Faixa	0,029 – 0,038	

5.3. Teste de toxicidade aguda do Bisfenol A aos Cladóceros

A partir dos testes preliminares com bisfenol A foi estabelecida uma faixa de concentração para ser usada nos testes definitivos. As concentrações estabelecidas para serem utilizadas nos testes definitivos com *Daphnia similis* foram: 3,2; 6,4; 12,8; 25,6 e 51,2 mg L⁻¹.

Os resultados obtidos nos testes agudos do BPA com *Daphnia similis* estão apresentados na Tabela 10, com valores de CE(I)₅₀; 48h e nos Apêndices B e E. No controle, a porcentagem de indivíduos imóveis foi inferior a 10%.

Tabela 10 – Valores de $CE(I)_{50}$ do BPA obtidos nos testes de toxicidade agudos para *Daphnia similis*. Média, desvio padrão e faixa de sensibilidade.

Ensaio	$CE(I)_{50;48h}$ (mgL^{-1})
1	8,3
2	8,4
3	9,05
4	11,50
5	11,94
6	11,94
7	11,50
8	11,53
9	11,14
10	11,14
Média	10,64
Desvio	2,008
Faixa	12,65 – 8,63

Na Figura 10 está indicada a sobrevivência dos organismos de *Daphnia similis* por concentração de BPA testada. Nas maiores concentrações testadas (25,6 e 51,2 mgL^{-1}) não houveram sobreviventes, conforme indicado, mostrando a toxicidade do BPA nessas concentrações.

A solução estoque de BPA foi preparada utilizando-se água como solvente e de acordo a alta solubilidade do composto em meio aquoso (120 - 300 mgL^{-1} de 20 a 25°C) , não foi necessário utilizar outro solvente.

Figura 10: Porcentagem de sobrevivência dos indivíduos de *Daphnia similis* para as diferentes concentrações amostradas, em mgL⁻¹, durante testes de toxicidade aguda com BPA.

Em relação aos testes com *Ceriodaphnia silvestrii*, as concentrações de BPA estabelecidas para os ensaios definitivos foram: 3,2; 6,4; 12,8; 25,6 e 51,2 mgL⁻¹. Os resultados estão apresentados na Tabela 11 e no Apêndice E. No controle, a porcentagem de indivíduos imóveis foi inferior a 10%

Tabela 11 – Valores de CE(I)₅₀ do BPA obtidos à partir dos testes de toxicidade agudos para *Ceriodaphnia silvestrii*. Média, desvio padrão e faixa de sensibilidade.

Testes.	CE(I) ₅₀ ; 48h (mgL ⁻¹)	Intervalo de confiança (IC)
1	27,87	25,88 – 30,01
2	19,40	17,68 – 21,29
3	12,72	-
Média	19,90	
Desvio	10,71	
Faixa	9,19 - 30,6	

5.4. Testes de toxicidade crônica do nonilfenol e do bisfenol A aos organismos *Ceriodaphnia silvestrii* e ao *Chironomus xanthus*

A partir dos resultados dos testes de toxicidade aguda foram estabelecidas as concentrações sub-letais de NP e BPA a serem utilizadas nos testes de toxicidade crônica com *C. silvestrii* as quais foram para o NP: 0,021; 0,037; 0,065; 0,114 e 0,20 mgL⁻¹ e para o BPA: 1,38; 2,07; 3,11; 4,66; 7,0; 10,5 mgL⁻¹. Os testes foram considerados válidos quando 60 % ou mais das fêmeas do controle produzissem 15 ou mais neonatas (correspondendo a terceira geração de descendentes) e quando a mortalidade no controle fosse inferior a 20 %, nesse caso, durante o período dos testes não ocorreu mortalidade no controle.

O pH e a dureza das soluções-teste não variaram amplamente entre o início e o final dos testes de toxicidade. Para *Ceriodaphnia silvestrii*, o pH variou entre 7,35 e 7,60 e a dureza entre 42 e 44 mgCaCO₃ L⁻¹ nos testes com nonilfenol. Nos testes realizados com bisfenol A, o pH oscilou entre 7,36 e 7,58 e a dureza na faixa de 42 e 44 mgCaCO₃ L⁻¹. Os dados brutos referentes aos testes crônicos com NP e BPA, encontram-se nos Apêndices G e H.

Os resultados obtidos nos testes crônicos apresentaram homogeneidade e distribuição normal de acordo como os Testes de Hartley e de Chi-quadrado, e, portanto, a análise estatística foi realizada por meio do teste paramétrico de Dunnett. Os resultados do teste crônico com *Ceriodaphnia silvestrii* mostraram diferença significativa entre o número de descendentes produzidos dos neonatos no controle e o observado para concentrações amostradas, comprovando a existência de efeito do nonilfenol e do bisfenol A na reprodução dos cladóceros.

A Tabela 12 indica os valores da Concentração de Efeito Observado (CEO) para cada composto, ou seja, as menores concentrações em que são observados efeitos para o NP e BPA em *Ceriodaphnia silvestrii*, além disso estão representadas as médias do CEO, os respectivos desvios e as faixas do CEO.

Tabela 12 – Valores de CEO do NP e do BPA em mgL^{-1} obtidos à partir dos testes de toxicidade crônicos para *Ceriodaphnia silvestrii*. Média, desvio padrão e faixa de sensibilidade.

Ensaio	NP	BPA
1	0,015	0,935
2	0,021	1,38
3	0,021	1,38
4	0,021	1,38
5	0,021	1,38
Média	0,0198	1,29
Desvio	0,00424	0,315
Faixa	0,0155 - 0,024	0,97 – 1,6

A Figura 11 representa a porcentagem de sobrevivência de *Ceriodaphnia silvestrii* por concentração amostrada para o NP, nos testes de toxicidade agudos.

Figura 11: Porcentagem de sobrevivência dos cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* para as concentrações amostradas, em mgL^{-1} , durante testes de toxicidade aguda com NP.

As concentrações utilizadas para a montagem dos testes de *Chironomus xanthus* com o nonilfenol foram obtidas a partir dos resultados de Meregalli et al., (2001) para *Chironomus riparius*. As concentrações utilizadas foram: 25, 50 e 100 $\mu\text{g g}^{-1}$. Já para o bisfenol A, as concentrações utilizadas (6; 12; 24 mg g^{-1}) também foram a partir de testes com *Chironomus riparius* (WATTS et al., 2003).

Nos testes feitos com *Chironomus xanthus* não houve grande variação entre as variáveis físicas e químicas. Para o nonilfenol o pH oscilou entre 7,34 e 7,60 e a dureza entre 15 e 17 $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Em relação ao bisfenol A, a variação de pH foi de 7,31 e 7,87, a dureza foi de 16 $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Os dados brutos referentes aos testes crônicos do *Chironomus xanthus* encontram-se no Apêndice I.

Os valores de CENO (Concentração de Efeito Não Observado), CEO (Concentração de Efeito Observado) e VC (Valor Crônico) obtidas para os testes crônicos feitos com *Chironomus xanthus* utilizando-se NP e BPA estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 – Valores de CENO, CEO e VC do NP e do BPA obtidos à partir dos testes de toxicidade crônicos para *Chironomus xanthus*.

	NP μgg^{-1}	BPA mgg^{-1}
CENO	50	6
CEO	100	12
VC	75	9

6. DISCUSSÃO

Segundo Bila e Dezotti (2007), a exposição dos seres vivos aos desreguladores endócrinos levantou uma série de questionamentos, entre os quais: se os DEs provocam efeitos tóxicos em consequência da exposição em concentrações reduzidas e quais são os efeitos; se as concentrações ambientais causam risco aos seres vivos e se existe mínima concentração permitida, sem riscos a biota; se os testes usados podem realmente prever o mecanismo de ação dessas substâncias nos organismos expostos.

Os organismos possuem variabilidade o que afeta a sensibilidade dos mesmos mediante a exposição aos compostos químicos e conseqüentemente produzindo diferentes resultados nos testes de toxicidade. A variabilidade entre os organismos decorre de características fisiológicas das espécies (nutrição, sexo, estágio de vida), técnicas de cultivo e característica do composto químico a ser testado (solubilidade, volatilidade, degradabilidade e pureza) (COWGILL, 1987; RAND, 1995).

Segundo Servos (1999), a toxicidade do NP em invertebrados pode variar entre 20 e 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$ enquanto a toxicidade do BPA em organismos aquáticos encontra-se na faixa de 1000 e 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ALEXANDER et al., 1988).

Assim, para a espécie *Daphnia similis* o CE(I)_{50} médio ao NP foi de 0,309 ($\pm 0,193$) mgL^{-1} . Para *Ceriodaphnia silvestrii* foram obtidas duas médias para CE_{50} , uma para solução padrão em água 0,4520 ($\pm 0,145$) mgL^{-1} e outra com padrão em etanol de 0,054 ($\pm 0,006$) mgL^{-1} e para *Ceriodaphnia dubia* o valor de CE_{50} foi de 0,0339 ($\pm 0,0048$) mgL^{-1} . Esses resultados evidenciam a toxicidade do nonilfenol a esses Cladóceros.

Em relação ao BPA, para *Daphnia similis* o CE(I)_{50} médio foi de 10,64 ($\pm 2,008$) mgL^{-1} e para *Ceriodaphnia silvestrii* foi de 19,9 ($\pm 10,71$) mgL^{-1} , indicando o efeito tóxico do bisfenol A a esses organismos.

Os organismos-teste apresentaram uma menor sensibilidade ao nonilfenol quando comparado com os demais cladóceros em estudos anteriores e para o bisfenol A estão na mesma faixa de concentração. As Tabelas 14 e 15 relacionam alguns estudos feitos com Cladóceros obtidos à partir da literatura e indicando os valores de CE(I)_{50} obtidos nesta pesquisa com os organismos estudados.

Tabela 14 – Valores de CE/CL₅₀ para diversas espécies de cladóceros em relação ao NP, obtidos a partir da literatura comparados com o presente estudo.

Organismo	CE/CL₅₀ mg L⁻¹	Autores
<i>Daphnia magna</i>	0,19	COMBER et al., 1993
<i>Daphnia magna</i>	0,18	HIRANO et al., 2004
<i>Daphnia magna</i>	0,13	BRENNAN et al., 2006
<i>Daphnia similis</i>	0,309	Presente estudo
<i>Ceriodaphnia cornuta</i>	20 µg L ⁻¹	HONG e LI, 2007
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	0,054*	Presente estudo
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0,033	Presente estudo

As diferenças em relação a CE₅₀ obtidas nesse estudo em relação aos demais trabalhos indicados na tabela, podem estar relacionadas à dureza da água utilizada nos testes e as condições de cultivo dos cladóceros. Lewis (1992) aponta que a toxicidade de vários surfactantes aniônicos, pode aumentar à medida que a dureza aumenta.

Tabela 15 – Valores de CE/CL₅₀ para diferentes organismos expostos ao nonilfenol, obtidos a partir da literatura, comparados com o presente estudo.

Organismo-teste	CE/CL₅₀ (µg L⁻¹)	Autores
<i>Dugesia japônica</i>	457; 96 h	HONG e LI, 2007
<i>Physa acuta</i>	120; 96 h	HONG e LI, 2007
<i>Neocaridina denticulate</i>	220; 96 h	HONG e LI, 2007
<i>Caridina pseudodenticulata</i>	195; 96 h	HONG e LI, 2007
<i>Moina macrocopa</i>	104; 48 h	HONG e LI, 2007

Podemos verificar que os organismos testados no presente estudo são mais sensíveis ao nonilfenol que os três crustáceos *Neocaridina denticulate*, *Caridina pseudodenticulata* e *Moina macrocopa*, além da planária *Dugesia japonica* e do o caramujo gastrópodo *Physa acuta*

Tabela 16 – Valores de CE/CL₅₀ do bisfenol A para diversas espécies de cladóceros, obtidos a partir da literatura, comparados com o presente estudo.

Organismo	CE/CL ₅₀ mg L ⁻¹	Autores
<i>Daphnia magna</i>	7,75	BRENNAN et al., 2006
<i>Daphnia magna</i>	10,0	IKE et al., 2002
<i>Daphnia magna</i>	12,8	HIRANO et al., 2004
<i>Daphnia magna</i>	16,0	MU et al., 2005
<i>Daphnia magna</i>	20,0	HENDRICKS et al., 1994
<i>Daphnia similis</i>	10,64	Presente estudo
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	19,9	Presente estudo

Os resultados com BPA do presente estudo com *Daphnia similis* (10,64 mg L⁻¹) e *Ceriodaphnia silvestrii* (19,9 mg L⁻¹) encontram-se dentro da faixa obtida nos estudos feitos com *Daphnia magna* (7,75 – 20 mg L⁻¹).

Já nos testes feitos no presente estudo com indivíduos de *Chironomus xanthus*, os resultados obtidos indicam que para o NP o valor do CEO para a emergência foi 100 µgg⁻¹ e para o BPA foi de 12 mgg⁻¹.

Diversos estudos de toxicidade aguda e crônica sobre a toxicidade do NP e BPA para os *Chironomus* sp foram feitos para *Chironomus riparius* indicando valores distintos: NP CL₅₀, 10 dias, 315-465 µg L⁻¹ (BETTINETTI et al., 2002); CE₅₀ para emergência, 380 µgg⁻¹ (BETTINETTI e PROVINI, 2002); concentrações de 50 e 100 µg L⁻¹ induziram a deformidades do mento e do pécten (MEREGALLI et al., 2001) . Em relação ao BPA foram feitos estudos de efeitos não-letais, tais como verificação de deformidades, nos quais observou-se que níveis intermediários e mais baixos de BPA

(10 ngL⁻¹ – 10 µgL⁻¹) são responsáveis por maior incidência de deformidades no mento (WATTS et al., 2003).

A legislação brasileira atualmente vigente não contém valores de restrição para esses compostos, de tal forma ambos podem ser inclusos em uma categoria mais abrangente, a dos compostos orgânicos: 0,018 µgL⁻¹ para águas doces de classe 1 e 2 (BRASIL, 2005). Foram realizados alguns estudos no Brasil que quantificaram o BPA e o NP em corpos d'água superficiais e de abastecimento, os dados estão indicados na Tabela 17.

Tabela 17 – Estudos feitos no Brasil quantificando Bisfenol A e Nonilfenol em corpos d'água locais.

Local e autor	Bisfenol A	Nonilfenol
Rio das velhas. Ouro Preto a Nova Lima, MG. (MOREIRA, 2010)	8,6 a 168,3 ng L ⁻¹	25,9 a 1435,3 ng L ⁻¹
Rio Paraíba do Sul, SP. (SOUZA, 2011)	≤0,16 µg L ⁻¹ em águas superficiais < 0,044 µg L ⁻¹ em água de abastecimento	0,178 a 0,846 µg L ⁻¹ águas superficiais < 0,049 µg L ⁻¹ em águas de abastecimento
Rio Piracicaba e Rio Quilombo. Americana, SP. (BERALDO, 2012)	5,645 a 295,255 µg L ⁻¹	5,028 a 10,524 µg L ⁻¹

Os valores encontrados em águas locais na maioria dos casos anteriormente citados, encontram-se abaixo das faixas obtidas nos testes do presente estudo.

NP [5,028 a 10,524 µg L⁻¹/ 34 a 310 µg/L]: valores abaixo das CE₅₀ encontradas

Daphnia similis: CE(I)₅₀ = 0,309 (±0,193) mgL⁻¹ ou 310 µg/L.

Ceriodaphnia silvestrii: CE₅₀ = 0,054 (±0,006) mgL⁻¹

Ceriodaphnia dubia: CE₅₀ = 0,0339 (±0,0048) mgL⁻¹ ou 34 µg/L.

BPA [0,0056 a 0,295 mg/L / 10,64 a 19,9 mg/L] : valores abaixo das CE₅₀ encontradas

Daphnia similis: CE(I)₅₀ = 10,64 (±2,008) mgL⁻¹

Ceriodaphnia silvestrii: CE₅₀ = 19,9 (±10,71) mgL⁻¹

Em relação aos sedimentos, não foram feitas análises quantificando o BPA e NP no Brasil, alguns trabalhos feitos em outros países estão listados na Tabela 18.

Tabela 18 – Estudos quantificando Bisfenol A e Nonilfenol em corpos d'água internacionais.

Local e autor	Nonilfenol	Bisfenol A
Rio Kalamazoo, Michigan, USA (KANNAN, 2003).	5,8 - 15.3 ng g ⁻¹	-
Áreas de rios que desaguam na bacia de Okinawa, Japão (KITADA, 2008)	áreas rurais: 0 – 6,8 µg kg ⁻¹ áreas urbanizadas: <1,2–22,0 µg kg ⁻¹	-
Rio Elba e alguns tributários, República Checa e Alemanha (STACHEL et al., 2003)	27 – 428 µg kg ⁻¹	10 - 379 µg kg ⁻¹
Rio Elba, Alemanha (STACHEL et al., 2005)	-	7 - 1630 ng g ⁻¹
Rio Wenyu, Beijing, China (LEI et al., 2008)	-	0,6 – 59,6 ng g ⁻¹

Entre os critérios de restrição para o nonilfenol nas águas superficiais, temos: a concentração limite de 1µg L⁻¹ na Dinamarca (EA, 1998); e o mesmo valor (1µg L⁻¹) no Canadá, em águas naturais (CANADA, 2002). Além disso, outras iniciativas relacionadas a redução da emissão de alquifenóis no ambiente, merecem ser destacadas: os Alquifenóis Etoxilados não são mais utilizados como matéria prima pela indústria de detergentes na Áustria; na Bélgica desde 2000 houve redução no uso dos APES nas formulações de limpeza industrial e em 1995 foram banidos nas formulações de uso doméstico; na Holanda o NPE não é utilizado desde 1988 em produtos de uso doméstico (NONILFENOL RISK REDUCTION STRATEGY, 1999).

O bisfenol A não possui legislação para sua restrição em águas, possuindo apenas o valor limite de migração específico (LME) relacionado ao contato do bisfenol

A com alimentos, no Brasil é estimado em 3 mgkg^{-1} , enquanto na União Européia esse valor é estabelecido em $0,6 \text{ mgg}^{-1}$ (BALLESTEROS-GOMEZ et al., 2009). O limite diário de ingestão (TDI) foi reduzido de $50 \text{ } \mu\text{g}$ por kg/dia para $10 \text{ } \mu\text{g}$ por kg/dia com NOEC em estudos com ratos

Pode-se fazer uso da avaliação de risco ambiental para analisar o impacto dos compostos tóxicos com base nos valores de CE_{50} obtidos em laboratório com a concentração ambiental estimada (CAE) relacionando com a recomendação de uso para cada composto químico (Zagatto e Bertoletti, 2008) de acordo com a equação:

$$\text{Risco} = \frac{\text{Concentração Ambiental Estimada (CAE)}}{\text{CE}_{50}}$$

Com base nos resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda, utilizando-se a espécie com menor valor de CE_{50} e os dados da Concentração Ambiental Estimada obtida por BERALDO (2012) na cidade de Americana - SP, pode-se calcular o risco ambiental do BPA e do NP em água. Já nos cálculos do sedimento, para o NP foram utilizados dados da bacia de Okinawa, Japão (KITADA, 2008) e do BPA os resultados obtidos no Rio Elba, Alemanha (STACHEL et al., 2005). Quando a Concentração Ambiental Estimada / $\text{CE}_{50} < 1$ indicam que com o presente padrão de uso, não são esperados risco ambientais ou o risco do uso é baixo (HALLING-SØRENSEN et al, 2000; OLIVEIRA, 2005) e quando o risco for 1,0 a probabilidade de ocorrência de dano ambiental é alta (OLIVEIRA, 2005).

Assim, para o nonilfenol, na água: consideramos a CAE de $5,028 \text{ } \mu\text{g}/\text{L}$ e o CE_{50} de $0,034 \text{ mg}/\text{L}$ usando a mesma unidade, $34 \text{ } \mu\text{g}/\text{L}$, o risco será de 0,15. Em relação ao sedimento consideramos: CAE de $1,2 \text{ } \mu\text{g}/\text{L}$ e o CENO é de $50 \text{ } \mu\text{g}/\text{L}$, assim o risco será de 0,024, assim em ambos os casos o risco ambiental é considerado baixo.

Já para o bisfenol A, considerando a CAE de $5,645 \text{ } \mu\text{g}/\text{L}$ e o CE_{50} de $10,64 \text{ mg}/\text{L}$, ou $10.640 \text{ } \mu\text{g}/\text{L}$ o risco será de 0,00053 considerado de baixo risco. Para o sedimento, consideramos a CAE de $0,007 \text{ } \mu\text{g}/\text{L}$ e o CENO de $0,006 \text{ } \mu\text{g}/\text{L}$, o risco será

de 1,16 é considerado elevado segundo os critérios de avaliação de risco utilizados (HALLING-SØRENSEN et al, 2000; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Os fenóis e esteroides devido à sua lipofilicidade possuem tendência de acumulação em matrizes sólidas, o que é indicado pelos valores elevados de Log Kow (BPA= 3.32 e NP=4.48). Assim, os sedimentos podem assim adsorver elevadas quantidades de compostos fenólicos e estrógenos, o que caracteriza uma ameaça potencial à biota dos sedimentos (TERNES et al., 1999; YING et al., 2002).

O risco pode ser estimado através da Concentração e Efeito não observado, ou PNEC (Predicted no Effect Concentrations) para o BPA em espécies aquáticas, calculado em 64 µg/L, considerando os valores de CENO em peixes, invertebrados e algas (STAPLES et al., 2000). Em estudos de análise de risco quando a exposição humana foi considerada, determinou-se que o BPA é de baixa preocupação para a saúde humana (considerando os estudos feitos até o momento), e categorias de efeitos ambientais avaliados; a preocupação é considerada moderada para o ecotoxicidade e foram usadas categorias de propriedades físico-químicas na avaliação. O BPA foi considerado como substância que ainda pode ser usada mas com restrições e com melhorias (ROST, 2012).

O BPA além de causar mortalidade nos organismos pode prolongar o período intermuda e provocando o desenvolvimento embrionário anormal em *Daphnia magna*. Interferindo no metabolismo, modificando a ação do hormônio ecdisona fazendo-o funcionar similarmente ao hormônio juvenil (MU et al., 2005)

Além dos efeitos agudos e crônicos detectados para os organismos-teste, o NP como desregulador endócrino pode afetar o funcionamento do metabolismo dos mesmos. Alguns trabalhos relatam que em níveis sub-letais de exposição, o NP em *Daphnia magna*, de 25 µgL⁻¹ (BALDWIN et al, 1997) e 42 µgL⁻¹ (COMBER et al, 1993) já são suficientes para alterar as taxas de eliminação de metabólitos de testosterona, provocando androgenização metabólica nesses invertebrados e alteram a fecundidade de daphnideos sem causar mortalidade. As concentrações de NP encontradas no presente estudo encontram-se dentro da faixa que causa androgenização no metabolismo de *Daphnia* sp.

7. CONCLUSÕES

- Nonilfenol causou toxicidade aguda para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia* em concentrações superiores às concentrações encontradas no ambiente.
- Bisfenol A causou toxicidade aguda para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii* em concentrações superiores às concentrações encontradas no ambiente.
- Nonilfenol e bisfenol A *Ceriodaphnia silvestrii* e *Chironomus xanthus* apresentaram sensibilidade crônica ao bisfenol e ao nonilfenol, em concentrações superiores às concentrações encontradas no ambiente.
- O bisfenol A e o nonilfenol em concentrações sub-letais ocasionam toxicidade crônica em *Ceriodaphnia silvestrii* reduzindo a fecundidade dos organismos, reduzindo a produção de neonatas.
- O bisfenol A e o nonilfenol reduziram o percentual de emergência de *Chironomus xanthus*.
- O etanol utilizado como solvente na solução padrão de nonilfenol, nas concentrações utilizadas nesses testes, não interferiu na fecundidade e não causou toxicidade.
- O risco ambiental calculado para o nonilfenol é considerado baixo para as espécies testadas mediante as concentrações ambientais encontradas. Para o bisfenol A o risco é considerado elevado em *Chironomus xanthus*.

8. RECOMENDAÇÕES

- Desenvolver mais estudos sobre a toxicidade do bisfenol A e do nonilfenol sobre populações de espécies nativas para o estabelecimento das faixas de tolerância em condições tropicais.
- Realizar mais trabalhos sobre a concentração do nonilfenol e do bisfenol A em ambientes aquáticos brasileiros para estimular a elaboração e implantação de uma legislação específica, atrelada a um sistema de controle de seu uso e disposição nestes ambientes.
- Realizar atividades de conscientização para estimular mudanças de comportamento na busca de consumo de novos produtos de higiene pessoal e limpeza que não contenham em sua formulações o nonilfenol; bem como de plásticos, tintas e resinas, que não tenham em sua base o bisfenol A.

9. REFERÊNCIAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 12713: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade Aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro. 2004. 21 p.
- _____.NBR 13373: **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp.(Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro. 2005. 15 p.
- AGUAYO, S.; MUÑOZ, M.J.; LA TORRE, A.; ROSET, J.; LA PEÑA, E.; CARBALLO, M. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. **Science of the Total Environment**, 2004. v.328, p. 69–81.
- AHEL, M. GINGER, W. Determination of alkylphenol and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, 1985. v. 57, n.8, p.1577-1583.
- AHEL, M.; GIGER, W.; SCHAFFNER, C. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment— II. Occurrence and transformation in rivers. **Water Research**, 1994. v. 28, p.1143–1152.
- AHEL, M.; SCULLY, F.E.; HOIGNÉ, J.; Giger, W. Photochemical degradation of 220 nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. **Chemosphere**, 1994. v.28.
- ALEXANDER, H.C.; DILL, D.C.; SMITH, L.W.; GUINEY, P.D.; DORN, P.B. Bisphenol A: acute aquatic toxicity. **Environmental Toxicology Chemistry**, 1988. v.7, p.19-26.
- ALVAREZ, G.; MEDINA, G.; SÁNCHEZ, G. Efecto del detergente biodegradable (Alquil sulfonato de sodio) em el consumo de oxígeno y tasa de filtración del bivalvo *Semimytilus algosus*. **Revista Peruana de Biología.**, 1999. v.6, p. 68-74.
- ANDRADE, F.M. **Determinação de Cianotoxinas em amostras de florações de cianobactérias coletadas em pesque-pagues e pisciculturas situadas na região do Alto Mogi**. Dissertação (Mestrado), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- AZEVEDO, D. A.; LACORTE, S.; VINHAS, T.; VIANA, P.; BARCELÓ, D.; J. **Chromatogr., A**, 2000. v. 13, p.879.
- AZEVEDO, D.A.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Occurrence of Nonylphenol and Bisphenol-A in Surface Waters from Portugal. **J. Braz. Chem. Soc.**, 2001. v.12, n.4, jul./ago.
- BALLESTEROS-GOMEZ, A.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENEDITO, D. **Journal of Chromatography A**, 2009. v.1216, p.449-469.

BENNIE, D.T.; SULLIVAN, C.A.; LEE, H.B.; PEART, T.E.; MAGUIRE, R.J. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. **The Science of the Total Environment**, 1997. v. 193, p.263-275.

BERALDO, D.A.S. **Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de bisfenol A e nonilfenol em águas superficiais na cidade de Americana, SP.** Dissertação (Mestrado), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

BERRY, M.N.; EDWARDS, A.M. **The hepatocyte review**, 1ªed., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2000.

BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces: Cyprinidae).** 117 p. Tese (Doutorado), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

BETTINETTI, R.; PROVINI, A. Toxicity of 4-Nonylphenol to *Tubifex tubifex* and *Chironomus riparius* in 28-Day Whole-Sediment Tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2002. v. 53, p.113-121.

BETTINETTI, R.; CUCCATO, D.; GALASSI, S.; PROVINI, A. Toxicity of 4-nonylphenol in spiked sediment to three populations of *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, 2002. v.46, p.201-207.

BIAN, H.; LI, Z.; LIU, P.; PAN, J. Spatial distribution and deposition history of nonylphenol and bisphenol A in sediments from the Changjiang River (Yangtze River) Estuary and its adjacent East China Sea. **Acta Oceanol. Sin.**, 2010. v. 29, n. 5, p. 44-51.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, 2007. v. 30, n.3, p.651-666.

BIRKETT, J.W.; LESTER, J.N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process**, 1ªed., IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press, LLC: USA, 2003.

BONACCI, S.; IACOCCA, A.; FOSSI, S.; LANCINI, L.; CARUSO, T.; CORSI, I. & FOCARDI, S. Biomonitoring aquatic environmental quality in a marine protected area: a biomarker approach. **Ambio**, 2007. v.36, n.4, p.308-315.

BRASIL. Constituição Federal. Presidência da República, Casa Civil. Brasília, 1988. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constitui%C3%A7ao.htm>. Acesso em: 21 jun. 2011.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Declaração de Estocolmo. <http://www.mma.gov.br/estruturas/agenda21/_arquivos/estocolmo.doc>. Acesso em: 18 set. 2011.

_____. Ministério do desenvolvimento urbano e meio ambiente. Conselho nacional do meio ambiente (CONAMA). **Resolução n. 357**, D.O.U. de 17/03/05, Brasília.

BROOKE, L.T. Acute and chronic toxicity of nonylphenol to ten species of aquatic organisms. USEPA contract no. 68-C1-0034, 1-36. U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN. 1993.

CABANA, H.; JIWAN, H.J.L.; ROZENBERG, R.; ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; AGATHOS, S.N.; JONES, J.P. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. **Chemosphere**, 2007. v.67, p.770–778.

CAIRNS, J. Jr. Environmental science and resource management in the 21st century: scientific perspective. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 1993. v.12, p.1321-1329.

CALOW, P. **Handbook of Ecotoxicology**, vol.1, Blackwell Science Ltda, Oxford, 471p.

CANADIAN ENVIRONMENTAL QUALITY GUIDELINES. **Canadian Water Quality Guidelines for the protection of aquatic life: Nonylphenol and its ethoxylates**. Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999. Winnipeg, Canada.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2006**. Série Relatórios / Secretaria do Estado do Meio Ambiente, São Paulo, v.1, p. 327, 2007.

CHAPMAN, P.M. Current approaches to developing sediment quality criteria. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 1989. v.8, n.7, p.589-599.

CHEN, M.Y.; IKE, M. FUJITA, M. Acute Toxicity, Mutagenicity, and Estrogenicity of Bisphenol-A and Other Bisphenols. **Environmental Toxicology**, 2002. v. 17, p. 80–86.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**, UNICAMP Editora: Campinas, 2006.

COMBER, M.H.I.; WILLIAMS, T.D.; STEWART, K.M. The effects of Nonylphenol on *Daphnia magna*. **Water Research**, 1993. v. 27, n. 2, p. 273-276.

CONNEL, D.W.; MILLER, G.L. **Chemistry and Ecotoxicology of Pollution**. John Wiley & Sons, 1984, 444p.

CORREA-REYES, G.; VIANA, M.T.; MARQUEZ-ROCHA, F.J.; LICEA, A.F.; PONCE, E.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain. **Chemosphere**, 2007. v.68, p.662–670.

CREWS, D.; MCLACHLAN, A. Epigenetics, Evolution, Endocrine Disruption, Health, and Disease. **Endocrinology**, 2006. v. 147, n.6, (Supplement):S4–S10.

CRUZ, C.; NETO, J. M.; MENEZES, M. L. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Ecotoxicol e Meio Ambiente**, 2004. v.14, p. 93-102.

DEARDORFF, A.D.; STARK, J.D. Population-level toxicity of the insecticide, spinosad and the nonylphenol polyethoxylate, R-11, to the cladoceran species *Ceriodaphnia dubia* Richard. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, 2011. v.46, 336–340.

ENVIRONMENT AGENCY. **Endocrine-Disrupting Substances in the Environment: What Should be Done?**, Environment Agency, 1998, Bristol.

ENVIRONMENT CANADA. **Biological test methods: test of reproduction and survival using the cladoceran *Ceriodaphnia dubia***. Report EPS 1/RM/21. Environment Canada, Conservation and Protection, Ottawa, Ontario. 72p.1992

EPA (Environmental Protection Agency). Disponível em:
<<http://www.epa.gov/waterscience/criteria/aqlife.html>>. Acesso em 18 de Abril de 2011.

ERLER, C.; NOVAK, J. Bisphenol A exposure: human risk and health policy. **Journal of Pediatric Nursing**, 2010. v. 25. p. 400–407.

EUROPEAN COMMISSION. **European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife**, 2–4 December 1996, Weybridge, UK. Report of Proceedings. Disponível em:
<http://ec.europa.eu/environment/chemicals/pdf/workshop_report.pdf>. Acesso em: 24 de Maio de 2011.

_____. **European Union Summary Risk Assessment Report**. 4,4'-Isopropylidenediphenol (Bisphenol – A), CAS No: 80-05-7, EINECS No: 201-245-8, Summary risk assessment report. UK, Final Report. 2003.

_____, EC. **Priority Substances Directive** 2008/105/EC. European Commission, 2008.

FENT, K. Effects of organotin compounds in fish: from the molecular to the population level. In: Braunbeck, T.; Hinton, D.E.; Streit, B. **Fish Ecotoxicology**, 1998. v. 259-303, Birkhauser, Berlin.

FONSECA, A.L. **Avaliação da qualidade da água da bacia do Rio Piracicaba através de testes de toxicidade com invertebrados**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997. 217 p.

FONSECA, A.L.; ROCHA, O. Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel (1939) (Diptera-Chironomidae). **Acta Limnol. Brasil.**, 2004. v.16, p. 153-161.

FRAGA, A. S. **Citocromos P-450 de fígado de mugilídeo como biomarcadores de exposição à xenobióticos**. Dissertação (Mestrado). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006. 53 p.

FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G.; GINUINO, I.O.F.; ARIAS, A.R.L. Biomarcadores na Avaliação da Saúde Ambiental dos Ecossistemas Aquáticos. **Oecol. Bras.**, 2008. v.12, n.3, p. 347-354.

GEROLIN, E.R.R. **Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré.** Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, 2008.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, 2007. v.30, n.3, p. 695-706.

GIGER, W.; BRUNNER, P.H.; SCHAFFNER, C. 4-Nonylphenol in Sewage Sludge: Accumulation of Toxic Metabolites from Nonionic Surfactants. **Science**, 1984. v.225, n.4662, p.623-625.

GIGER, W.; **Anal. Bioanal. Chem.**, 2009. v. 393, p. 37.

GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P.M. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol A. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 2000.v. 44, n.4, p.323-330.

GOKSØYR, A.; FÖRLIN, L. The cytochrome *P*-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. **Aquatic Toxicology**, 1992. v.22, n. 4, p. 287-311.

GULLEY, D.D.; BOELTER, A.M.; BERGMAN, H.L. 1994. Toxtat 3.4 Computer Program.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2006. 1128 p.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURFTON, R.B. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, 1977. v.11, n.7, p. 714-719.

HAO, C.; ZHAO, X.; YANG, P. GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, 2007. v. 26, n. 6.

HALLING-SØRENSEN, B.; LUTZHØLF, H.C.H.; ANDERSEN, H.R.; INGERSLEV, F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2000. v.46, suppl. S1, p.53-58.

HEALTH CANADA. **Health Risk Assessment of Bisphenol A from Food Packaging Applications**. Bureau of Chemical Safety Food Directorate Health Products and Food Branch, 2008. Ottawa, Ontario.

HELFRICH, L.A.; HIPKINS, P.; STINSON, E. **Pesticides and aquatic animals: guide to reducing impacts on aquatic systems**. Virginia State University. 2009. 24 p.

HENDRIKS, A.J.; MAAS-DIEPEVEEN, A.N.; VAN DER GAAG, M.A. Monitoring response of XAD – concentrated water in the Rhine Delta: a Major Part of the toxic compounds remains unidentified. **Water Research**, 1994. v.28, n.3, p. 581-598.

HIRANO, M.; HIROSHI, I.; MATSUMURA, N.; NAGAO, Y.; WATANABE, N.; WATANABE, A.; ONIKURA, N.; KISHI, K.; ARIZONO, K. Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. **Journal of Health Science**, 2004. v. 50, n. 1, p. 97-100.

HONG, L.; LI, M.H. Acute Toxicity of 4-Nonylphenol to Aquatic Invertebrates in Taiwan. **Bull Environ Contam Toxicol.**, 2007. v.78, p. 445–449.

IBAMA. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente. **Manual de testes para avaliação da Ecotoxicologia de agentes químicos**. IBAMA, Brasília, 1990.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Guia de cidades. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=354890>>. Acesso em: 24 de Outubro de 2011.

IKE, M.; CHEN, M-Y.; JIN, M-Y.; FUJITA, M. Acute Toxicity, Mutagenicity, and Estrogenicity of Biodegradation Products of Bisphenol-A. **Environmental Toxicology**, 2002. n. 17, p.457-461.

IPT - Instituto de Pesquisa Tecnológico. Relatórios técnicos. São Paulo, 1994, 27p.

IUPAC (Analytical Chemistry Division Commission on Analytical Nomenclature). Pure Appl. Chem.; 1993. Disponível em: <[http:// old.iupac.org/publications/analytical_compendium/](http://old.iupac.org/publications/analytical_compendium/) > . Acesso em: 05 de novembro de 2011.

JIMENES, B. Environmental effects of endocrine disruptors and current methodologies for assessing wildlife health effects. **Trends in Analytical Chemistry**, 1997. v. 16, n. 10.

JOHNSON, A.; JURGENS, M. Endocrine active industrial chemicals: Release and occurrence in the environment. **Pure Appl. Chem.**, 2003. v. 75, n. 11–12, p. 1895–1904.

JONKERS, N. KOHLER, H.P.E.; DAMMSHAUSER, A.; GIGER, W. Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions. **Environmental Pollution**, 2009. v. 157, 714–723.

KIM, S.; AN, B.S.; YANG, H.; JEUNG, E.B. Effects of octylphenol and bisphenol A on the expression of calcium transport genes in the mouse duodenum and kidney during pregnancy. **Toxicology**, 2013. v.303, p.99-106.

LAFLEUR, A.D.; SCHUG, K.A. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. **Analytica Chimica Acta**, 2011. v. 696, p. 6–26.

LEANDRO, F.Z. **Bisfenol A: validação de método e ocorrência em água superficial e tratada da cidade de Araraquara**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

LEE, P.C. Disruption of male reproductive tract development by administration of the xenoestrogen, nonylphenol to male newborn rats. **Endocrine**, 1998. v.9, n.1, p.105-111.

LEE, H.J.; CHATTOPADHYAY, S.; GONG, E.Y.; AHN, R.S.; LEE, K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. **Toxicological Sciences**, 2003. v.75, p. 40-46.

LEI, B.L.; LUO, J.P.; ZHA, J.M.; HUANG, S.B.; LIU, C.; WANG, Z.J. Distribution of nonylphenols and bisphenol-A in the sediments of Wenyuhe River. **Environ Chem.**, 2008. v. 27, p. 314-317.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, M.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure Applied Chemistry**, 2003. v. 75, n.5, p. 631-681.

LOPES, L.G. **Estudo sobre a ocorrência de estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal-SP**. Tese (Doutorado), Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

LOPES, L.G.; MARCHI, M.R.R.; SOUZA, J.B.G.; MOURA, J.A.; LORENZON, C.S.; CRUZ, C.; AMARAL, L.A. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. **Quim. Nova**, 2010, v. 33, n. 3, p. 639-643.

MDEP. MAINE DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL PROTECTION (2010). Basis statement for chapter 883, designation of the chemical class nonylphenol and nonylphenol ethoxylates as a priority chemical and safer chemicals program support document for the designation as a priority chemical of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates. Disponível em: [http://www.maine.gov/dep/oc/safechem/nonylphenol%20support document final.pdf](http://www.maine.gov/dep/oc/safechem/nonylphenol%20support%20document%20final.pdf). Acesso em: 07 de Novembro de 2011.

MARTINELLI, M. Relevância do Estado de São Paulo. **Confins [Online]**, 7 | 2009. Disponível em: <http://confins.revues.org/6168>. Acesso em 24 de Outubro de 2011.

McANDREW, B.J. **Evolution, phylogenetic, relationships and biogeography**. In: Beveridge, M.C.M e McAndrew, B.J. (Ed) *Tilapias: Biology and Exploitation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, p. 1-28, 2000.

McMASTER, M.C. **GC/MS: a practical user's guide**. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2ª edição, 192p, 2008.

MIHAICH, E.M.; FRIEDERICH, U.; CASPERS, N.; HALL, A.T.; KLECKA, G.M.; DIMOND, S.S.; STAPLES, C.A.; ORTEGO, L.S.; HENTGES, S.G. Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2009. v. 72, p. 1392-1399.

MENDES, J.J.A. The endocrine disruptors: a major medical challenge. **Food and Chemical Toxicology**, 2002. v.40, p.781-788.

MEREGALLI, G.; PLUYMERS, L.; OLLEVIER, F. Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-nonylphenol. **Environmental Pollution**, 2001. v.111, p.241-246.

MOREIRA, M.A. **Avaliação de perturbadores endócrinos em águas do Rio das Velhas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

MU, X.; RIDER, C.V.; HWANG, G.S.; HOY, H.; LEBLAN, G.A. Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2005. v. 24, n. 1, p. 146–152.

NARDOCCI, A.C. **Avaliação probabilística de riscos da exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) para a população da cidade de São Paulo**. Tese (Livre Docência), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2010.

NEWMAN, M.C.; UNGER, M.A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 2nd Ed. Lewis Publishers. Boca Raton, 2003, 458 p.

NOLLET, L.M.L. **Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food**. 1^a Edição, Iowa, USA: Blackwell, 2011, 504 p.

NONYLPHENOL RISK REDUCTION STRATEGIC. **Final Report, Department of the Environment, Transport and the Regions**. Risk & Policy Analysts Limited, Farthing Green House, 1 Beccles Road, Loddon, 1999.

NORRIS, D.O.; CARR, J.A. **Endocrine Disruption – Biological Bases for Health Effects in Wildlife and Humans**. 1^aed, Oxford University Press, USA, 2006.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for the Testing of Chemicals / Section 3: Degradation and Accumulation Test No. 305: Bioconcentration: Flow-through Fish Test**, 1996. Disponível em: <<http://www.oecd.org/daf/investment/guidelines>>. Acesso em 10 de Março de 2011.

_____. **Guidelines for the Testing of Chemicals**, 1992. Disponível em: <<http://www.oecd.org/daf/investment/guidelines>>. Acesso em 10 de Setembro de 2011.

OHNO, K.; ARAKI, N.; YANASE, T.; NAWATA, H.; IIDA, M. A Novel Nonradioactive Method for Measuring Aromatase Activity Using a Human Ovarian Granulosa-Like Tumor Cell Line and an Estrone ELISA. **Toxicological Sciences**, 2004. v.82, p. 443–450.

OLIVEIRA, S.S. **O papel na avaliação de riscos no gerenciamento de produtos agrotóxicos: diretrizes para a formulação de políticas públicas**. Tese (Doutorado), Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2005.

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

PENTEADO, J.C.P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J.C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, 2008. v. 31, n. 8, p. 2190-2193.

PIMENTEL, L.C.F; CHAVES, C.R.; FREIRE, L.A.A.; AFONSO, J.C. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. **Química Nova**, 2006. v. 29, n.5, p. 1138-1149.

PISAPIA, L.; POZZO, G.D.; BARBA, P.; CAPUTO, L.; MITA, L. VIAGGIANO, E.; RUSSO, G.L.; NICOLUCCI, C.; ROSSI, S. BENCIVENGA, U.; MITA, D.G.; DIANO, N. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, 2012. v.176 n.3, p. 1-10.

PROSAB. Programa de Pesquisa em Saneamento Básico. **Remoção de Organismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para o consumo humano**. ABES, RJ, 2009. Disponível em: <<http://www.finep.gov.br/prosab/index.html>>. Acesso em 30 de Março de 2011.

QUEIRÓS, J.; MAGALHÃES, A.; MEDINA, J.L. Disruptores endócrinos: sinais do tempo. **Rev. Port. Endocrin. Diab. e Metabol**, 2006. n.1, p.31-36.

RAND, G.M. **Fundamental Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.**, 2a ed, Taylor & Francis: USA, cap 31, 1995.

REIS FILHO, R.W.; ARAÚJO, J.C.; VIEIRA, E.M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, 2006, v. 29, n.4, p. 817-822.

REIS FILHO, R.W.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E.M. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, 2007. v. 2, n. 3, p. 283-288.

REIS FILHO, R.W. **Hormônios estrogênicos do rio Monjolinho, São Carlos – SP: uma avaliação da problemática dos desreguladores endócrinos ambientais**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, São Carlos, 2008.

ROSS, L.G. Environmental physiology and energetic. In: Beveridge, M.C.M e McAndrew, B.J. (Ed) **Tilapias: Biology and Exploitation**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, p. 89-113, 2000.

ROST, J. M. Risk based green assessment of bisphenol A. Science and Strategies for health and the environment. University Road, Cambridge, 2012.

SADIK, O.A.; WITT, D.M. Monitoring endocrine disrupting chemicals. **Environmental Science Technology**, 1999. v.33, p.368A-374A.

SÁNCHEZ-ÁVILA, J.; BONET, J.; VELASCO, G.; LACORTE, S. Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs, and PHAs in a

industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant. **Science of the Total Envir.**, 2009. v.407, p.4157-4167.

SANDERSON, J.T. The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. **Toxicological Sciences**, 2006. v. 94, n.1, p. 3-21.

SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. **Agroecologia e Desenvol. Rural Sustent.**, Porto Alegre, v.2, n.3, jul/set, 2001.

SCHRODER, H. F., Tracing of surfactants in the biological wastewater treatment process and the identification of their metabolites by flow injection-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry and -tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2001. v. 926, p.127-150.

SEGNER, H.; CAROLL, K.; FENSKE, M.; JANSSEN, C.R.; MAACK, G.; PASCOE, D.; SCHAFERS, C.; VANDENBERGH, G.F.; WATTS, M.; WENZEL, A. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2003. v.54, p.302–314..

SILVA, C.G.A.; COLLINS, C.H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Quim. Nova**, 2011. v. 34, n. 4, p.665-676.

SILVA, F.V.; RODRIGUES, J.L.;BATISTA, B.L.;OLIVEIRA, D.P.Alquifenois e alquifenois etoxilados: uma visao ambiental. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 2007. v.20, n.1 e 2, p.1-12.

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

SOARES, A.; GUIEYSSE, B.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E.; LESTER, J.N. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. **Environment International**, 2008. v.34, p.1033–1049.

SOUZA, R.R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas nas águas da região do Rio Paraíba do Sul, SP**. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SPARKMAN, O.D.; PENTON, Z.E.; KITSON, F.G. **Gas chromatography and mass Spectrometry: a practical guide**. Oxford, UK, Academic Press, 2ª edição, 2011. 611 p.

STACHEL, B.; EHRHORN, U.; HEEMKENB, O.P.; LEMPOM, P.; REINCKE, H.; SAWAL, G.; THEOBALD, N.; Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. **Environmental Pollution**, 2003. v.124, 497–507.

STARK, J.D.; WALTHALL, W.K. Agricultural adjuvants: acute mortality and effects on population growth rate of *Daphnia pulex* after chronic exposure. **Environ. Toxicol. Chem.**, 2003. v. 22, p.3056–3061.

TAMBOSI, J.L. **Remoção de fármacos e avaliação de seus produtos de degradação através de tecnologias avançadas de tratamento.** Tese (Doutorado), Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008. 141 p.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.-D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of Total Environment**, 1999. v. 225, n. 1-2, p. 81-90.

TORTORA, G.J.; GRABOWSKI, S.R. **Princípios de anatomia e fisiologia.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 9ª edição, 2002. 1047 p.

TUNDISI, J.G. **A água no século XXI: Enfrentando a escassez.** São Carlos: Rima, 2003. 622 p.

VAZQUEZ-DUHALT, R.; MARQUEZ-ROCHA, F.; PONCE, E.; LICEA, A.F.; VIANA, M.T. Nonyphenol, an integrated vision of a pollutant. **Applied Ecology and Environmental Research**, 2005. v. 4, n.1, p.1-25..

VAZZOLER, A. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática.** Maringá, EDUEM. 1996. 169p.

VERMEULEN, A.C.; LIBERLOO, G.; DUMONT, P.; OLLEVIER, F.; GODDEERIS, B. Exposure of *Chironomus riparius* larvae (Diptera) to lead, mercury and b-sitosterol: effects on mouthpart deformation and moulting. **Chemosphere**, 2000. v. 41, p. 1581-1591.

VOS, J.G.; DYBING, E.; HELMUT, A.G.; LADEFOGED, O.; LAMBRÉ, C.; TARAZONA, J.V.; BRANDT, I.; VETHAAK, D. Health Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife, with Special Reference to the European Situation. **Critical Reviews in Toxicology**, 2000. v.30, n.1, p. 71–133.

WATTS, M.M.; PASCOE, D.; CARROLL, K. Exposure to 17a-ethinylestradiol and bisphenol A—effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2003. v. 54, p. 207–215.

WHATLEY, A.; CHO, I.K.; MAGRATH, C.; STEWART, P.M.; ROBERT, W. Cytochrome P450 Induction and Gene Expression in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Following Wastewater Treatment Plant Effluent Exposure in Field and Laboratory Settings. **Journal of Environmental Protection**, 2010. v.1, p. 362-373.

WITORSCH, R.J. Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2002. n.36, p.118–130.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS) – Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva; 1993.

WU, Z.Y.; ZENG, Z.; MARRIOTT, P.J. Comparative qualitative analysis of nonylphenol isomers by gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometric resolution. **Journal of Chromatography A**, 2010. v. 1217 , p. 7759–7766.

XIE, Z.; SELZER, J.; EBINGHAUS, R.; CABA, A.; RUCK, W. Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere. **Anal. Chim. Acta**, 2006. v.565, p.198–207.

ZAGATTO, E.A.G.; MATTOS, I.L.; JACINTHO, A.O. Determination of sucrose in sugar-cane juice and molasses by flow-injection spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, 1988. v.204, p.259-270.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2^a Edição, São Carlos: Editora Rima, 2008. 486 p.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. New Jersey, Ed. Prentice Hall, 718p., 1984.

ZHANG, L.; GIBBLE, R.; BAER, K.N. The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2003. v. 55, p. 330–337.

YANG, L.; LIN, L.; WENG, S.; FENG, Z.; LUAN, T. Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on male silver carp (*Carassius auratus*) in aquatic microcosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2008. v. 71, p.400-411.

YING, G.G.; WILLIAMS, B.; KOOKANA, R.S. **Environmental**, 2002. v. 28, p.215.

APÊNDICE A

Cartas controle dos testes de sensibilidade dos cladóceros *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

Daphnia similis

	Lim Inf	CE50 média	Lim Sup	CE50, 48h
19/01/2011	469,5	541	613	558
15/02/2011	469,5	541	613	570
08/03/2011	469,5	541	613	587
31/05/2011	469,5	541	613	547
14/06/2011	469,5	541	613	607,3
06/12/2011	469,5	541	613	526,88
20/02/2012	469,5	541	613	494,5
13/03/2012	469,5	541	613	546,9
10/04/2012	469,5	541	613	504,8
24/04/2012	469,5	541	613	522,98
09/05/2012	469,5	541	613	501,91
04/09/2012	469,5	541	613	501,91
02/10/2012	469,5	541	613	566,6

Média	546,54
DP	35,59
Lim Inf	475,35
LimSup	617,73

Ceriodaphnia dubia

data	L. Inferior	CE50 médio	L. Superior	CE50,48h
18/01/2011	1,01	1,47	1,93	1,14
01/03/2011	1,01	1,47	1,93	1,32
22/03/2011	1,01	1,47	1,93	1
24/05/2011	1,01	1,47	1,93	1,58
31/05/2011	1,01	1,47	1,93	1,47
14/06/2011	1,01	1,47	1,93	1,57
05/07/2011	1,01	1,47	1,93	1,59
06/12/2011	1,01	1,47	1,93	1,68
28/08/2012	1,01	1,47	1,93	1,61
11/09/2012	1,01	1,47	1,93	1,75
18/09/2012	1,01	1,47	1,93	1,46

CE50 média	1,47
DP	0,23
Lim Inf	1,01
Lim Sup	1,93
Faixa sensibilidade	1,01 - 1,93

Ceriodaphnia silvestrii

	Lim Inf	CE50 média	Lim Sup	CE50,48h
18/01/2011	0,82	1,2	1,58	1,14
01/03/2011	0,82	1,2	1,58	1,32
10/05/2011	0,82	1,2	1,58	1,34
10/05/2011	0,82	1,2	1,58	1,11
11/05/2011	0,82	1,2	1,58	1,09
14/06/2011	0,82	1,2	1,58	1,34
06/07/2011	0,82	1,2	1,58	1,11
06/07/2011	0,82	1,2	1,58	1,1
12/07/2011	0,82	1,2	1,58	1,03
12/07/2011	0,82	1,2	1,58	1,07
17/01/2012	0,82	1,2	1,58	1
17/01/2012	0,82	1,2	1,58	0,83
22/05/2012	0,82	1,2	1,58	1,23
24/07/2012	0,82	1,2	1,58	1,43
17/07/2012	0,82	1,2	1,58	1,4
17/08/2012	0,82	1,2	1,58	1,25
16/10/2012	0,82	1,2	1,58	1,59

CE50, 48h Média	1,20
DP	0,19
Lim Inferior	0,82
Lim Superior	1,58
Faixa de sensibilidade	0,82 - 1,58

APÊNDICE B

Dados brutos dos testes de toxicidade aguda com o cladóceros *Daphnia similis* expostos
ao Bisfenol A.

Tabela 1 – Resultados do teste de toxicidade aguda de *Daphnia similis* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)		Cond (µS/cm ⁻¹)		Dureza mg/L CaCO ₃	
BPA	D.similis		13/03/12		7,37		7,50		155,1		44	
Concentração mg/L	No.imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste					
	1	2	3	4	Total	%	pHin	pHf	ODin	OdF		
Controle	1	1	0	0	2	10	7,37	7,20	7,50	7,35		
3,2	1	0	0	0	1	4	7,64	7,39	7,61	7,34		
6,4	2	1	0	1	4	20	7,54	6,88	7,91	7,23		
12,8	4	5	4	5	18	90	7,55	7,38	7,80	7,25		
25,6	5	5	5	5	20	100	7,51	7,42	7,75	7,31		
51,2	5	5	5	5	20	100	7,45	7,40	7,91	7,23		
CE(I)50,48h: 8,3mg/L						IC: 7,01 – 9,83 mg/L						

Tabela 2 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		Ph		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃	
BPA	D.similis		20/03/12		7,41		7,45	149,6	44	
Concentração mg/L	No. imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pHin	pHf	ODin	OdF
Controle	0	0	0	0	0	0	7,41	7,35	7,45	7,21
3,2	0	0	0	0	0	0	7,60	7,47	7,90	7,21
6,4	1	0	0	2	3	15	7,62	7,50	7,90	7,31
12,8	5	5	5	4	19	95	7,62	7,48	7,92	7,49
25,6	5	5	5	5	20	100	7,55	7,36	7,99	7,32
51,2	5	5	5	5	20	100	7,52	7,30	7,94	7,47
CE(I)50,48h: 8,4mg/L						IC: 7,42 – 9,61 mg/L				

Tabela 3 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (µS/cm ⁻¹)		Dureza mg/L CaCO ₃	
BPA	D.similis		27/03/12		7,58		7,04	150,9		42	
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pHin	pHf	ODin	Odf
Controle		1	1	0	0	2	10	7,58	7,66	7,04	7,10
3,2		0	0	1	0	1	5	7,60	7,33	7,85	7,33
6,4		0	0	1	0	1	5	7,62	7,46	7,73	7,31
12,8		4	5	5	5	19	95	7,55	7,40	7,66	7,49
25,6		5	5	5	5	20	100	7,54	7,38	7,61	7,32
51,2		5	5	5	5	20	100	7,49	7,30	7,59	7,41
CE(I)50,48h: 9,05 mg/L							Intervalo de confiança: 8,48 – 9,66				

Tabela 4 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
BPA	D.similis		10/04/12		7,20		7,41	148,4	42		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	total	%	pHin	pHf	ODin	Odf
Controle		1	0	0	1	2	10	7,47	7,54	7,25	7,10
3,2		1	0	0	1	2	10	7,51	7,33	7,85	7,12
6,4		0	0	1	0	1	5	7,53	7,40	8,00	7,31
12,8		3	3	3	3	12	60	7,55	7,40	7,66	7,49
25,6		5	5	5	5	20	100	7,55	7,34	7,91	7,42
51,2		5	5	5	5	20	100	7,49	7,30	7,89	7,41
CE(I)50,48h: 11,50 mg/L							Intervalo de confiança: 9,59 – 13,80 mg/L				

Tabela 5 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃	
BPA	D.similis		17/04/12		7,42		7,00	146,8	44	
Concentração mg/L	No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	total	%	pHin	pHf	ODin	OdF
Controle	1	0	0	0	1	5	7,49	7,56	7,25	7,10
3,2	0	0	0	0	0	0	7,50	7,54	7,85	7,20
6,4	0	0	0	1	1	5	7,48	7,54	8,00	7,31
12,8	2	3	2	3	10	50	7,50	7,55	7,66	7,34
25,6	5	5	5	5	20	100	7,51	7,58	7,91	7,42
51,2	5	5	5	5	20	100	7,50	7,60	7,89	7,41
CE(I)50,48h: 11,94 mg/L						Intervalo de confiança: 9,97– 14,31 mg/L				

Tabela 6 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃	
BPA	D.similis		17/04/12		7,40		7,05	147,5	44	
Concentração mg/L	No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle	0	0	0	1	1	5	7,47	7,57	7,21	7,08
3,2	0	0	0	0	0	0	7,50	7,56	7,81	7,23
6,4	1	0	0	0	1	5	7,48	7,57	7,95	7,31
12,8	3	2	2	3	10	50	7,50	7,56	7,76	7,34
25,6	5	5	5	5	20	100	7,51	7,59	7,91	7,42
51,2	5	5	5	5	20	100	7,50	7,60	7,89	7,41
CE(I)50,48h: 11,94 mg/L						Intervalo de confiança: 9,97– 14,31 mg/L				

Tabela 7 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
BPA	D.similis		17/04/12		7,40		7,05	147,5	44		
Concentração mg/L		No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pHin	pHf	Odin	Odf
Controle		1	1	0	0	2	10	7,43	7,50	7,10	7,00
3,2		0	0	1	1	2	10	7,50	7,63	7,45	7,12
6,4		1	0	0	0	1	5	7,53	7,60	7,50	7,31
12,8		4	4	2	2	12	60	7,45	7,60	7,56	7,29
25,6		5	5	5	5	20	100	7,55	7,64	7,51	7,22
51,2		5	5	5	5	20	100	7,49	7,63	7,49	7,21
CE(I)50,48h: 11,50 mg/L							Intervalo de confiança: 9,59 – 13,80 mg/L				

Tabela 8 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)		Cond (µS/cm ⁻¹)		Dureza mg/L CaCO ₃	
BPA	D.similis		19/04/12		7,42		7,10		148,5		44	
Concentração mg/L		No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste				
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f	
Controle		1	1	0	0	2	10	7,42	7,50	7,10	6,81	
3,2		0	0	0	0	0	0	7,50	7,63	7,40	7,06	
6,4		1	0	0	0	1	5	7,53	7,60	7,43	7,04	
12,8		4	4	2	2	12	60	7,52	7,60	7,44	7,09	
25,6		5	5	5	5	20	100	7,53	7,64	7,42	7,10	
51,2		5	5	5	5	20	100	7,53	7,63	7,41	7,07	
CE(I)50,48h: 11,53 mg/L							Intervalo de confiança: 9,77 – 13,62 mg/L					

Tabela 9 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (µS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
BPA	D.similis		19/04/12		7,42		7,10	148,5	44		
Concentração mg/L		No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		1	1	0	0	2	10	7,42	7,55	7,10	6,85
3,2		0	0	0	0	0	0	7,50	7,66	7,40	6,98
6,4		1	1	0	0	2	10	7,53	7,69	7,43	7,00
12,8		4	4	2	2	12	60	7,52	7,65	7,44	7,01
25,6		5	5	5	5	20	100	7,53	7,67	7,42	6,99
51,2		5	5	5	5	20	100	7,53	7,66	7,41	7,00
CE(I)50,48h: 11,14 mg/L							Intervalo de confiança: 9,33 – 13,31 mg/L				

Tabela 10 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
BPA	D.similis		19/04/12		7,42		7,10	148,5	44		
Concentração mg/L		No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		1	1	0	0	2	10	7,42	7,55	7,10	6,85
3,2		0	0	0	0	0	0	7,50	7,66	7,40	6,98
6,4		1	1	0	0	2	10	7,53	7,69	7,43	7,00
12,8		4	4	2	2	12	60	7,52	7,65	7,44	7,01
25,6		5	5	5	5	20	100	7,53	7,67	7,42	6,99
51,2		5	5	5	5	20	100	7,53	7,66	7,41	7,00
CE(I)50,48h: 11,14 mg/L							Intervalo de confiança: 9,33 – 13,31 mg/L				

APÊNDICE C

Dados brutos dos testes de toxicidade aguda com organismos de *Daphnia similis* expostos ao Nonilfenol.

Tabela 11 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃	
NP	D.similis		13/03/12		7,37		7,00	155.1	44	
Concentração mg/L	No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle	0	0	0	0	0	0	7,37	7,51	7,00	6,89
0,045	0	0	0	0	0	0	7,43	7,64	7,09	6,95
0,09	0	0	0	0	0	0	7,40	7,61	7,06	6,94
0,18	3	4	3	3	13	65	7,41	7,60	7,06	6,91
0,36	4	5	5	5	19	90	7,42	7,62	7,11	6,90
0,72	5	5	5	5	20	100	7,45	7,65	7,13	6,91
CE(I)50,48h: 0,17 mg/L						Intervalo de confiança: 0,14 – 0,20 mg/L				

Tabela 12 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	D.similis		13/03/12		7,37		7,00	155.1	44		
Concentração mg/L		No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		0	0	0	0	0	0	7,37	7,55	7,00	6,75
0,045		0	0	0	0	0	0	7,43	7,68	7,09	6,92
0,09		0	0	0	0	0	0	7,40	7,65	7,06	6,92
0,18		4	3	2	3	12	65	7,41	7,63	7,06	6,93
0,36		4	5	5	5	19	90	7,42	7,65	7,11	6,89
0,72		5	5	5	5	20	100	7,45	7,68	7,13	6,90
CE(I)50,48h: 0,1738 mg/L						Intervalo de confiança: 0,15 – 0,21 mg/L					

Tabela 13 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃	
NP	D.similis		20/03/12		7,41		7,15	149,6	44	
Concentração mg/L	No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle	0	0	0	0	0	0	7,41	7,54	7,15	6,99
0,045	0	0	0	0	0	0	7,42	7,63	7,29	7,03
0,09	0	0	0	0	0	0	7,42	7,61	7,26	7,02
0,18	3	2	5	3	13	65	7,41	7,60	7,26	7,04
0,36	5	4	4	5	18	90	7,43	7,60	7,21	7,00
0,72	5	5	5	5	20	100	7,49	7,56	7,19	6,97
CE(I)50,48h: 0,16 mg/L						Intervalo de confiança: 0,13 – 0,19 mg/L				

Tabela 14 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	D.similis		27/03/12		7,41		7,15	149,6	44		
Concentração mg/L		No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		0	0	0	0	0	0	7,38	7,55	7,10	6,86
0,045		0	0	0	0	0	0	7,42	7,63	7,25	7,03
0,09		0	0	0	0	0	0	7,42	7,61	7,24	7,05
0,18		0	0	0	0	0	0	7,41	7,60	7,26	7,04
0,36		1	2	2	3	8	40	7,43	7,60	7,21	7,02
0,72		3	5	5	4	17	85	7,49	7,56	7,19	7,02
CE(I)50,48h: 0,41 mg/L						Intervalo de confiança: 0,33 – 0,53 mg/L					

Tabela 15– Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo	Teste definitivo		pH	OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃			
NP	D.similis	10/04/12		7,42	7,00	146,8	42			
Concentração mg/L	No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle	0	0	0	0	0	0	7,42	7,55	7,00	6,86
0,045	0	0	0	0	0	0	7,40	7,63	7,25	7,03
0,09	0	0	0	0	0	0	7,42	7,61	7,24	7,05
0,18	0	0	0	0	0	0	7,41	7,60	7,26	7,09
0,36	3	2	3	1	9	45	7,43	7,60	7,21	7,02
0,72	4	4	3	5	16	80	7,49	7,56	7,19	7,04
CE(I)50,48h: 0,41 mg/L						Intervalo de confiança: 0,30 – 0,55 mg/L				

Tabela 16 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	D.similis		10/04/12		7,42		7,00	146,8	42		
Concentração mg/L		No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		0	0	0	0	0	0	7,42	7,53	7,00	6,90
0,045		0	0	0	0	0	0	7,40	7,64	7,25	7,00
0,09		0	0	0	0	0	0	7,42	7,60	7,22	7,04
0,18		0	0	0	0	0	0	7,41	7,62	7,26	7,09
0,36		2	3	1	3	9	45	7,43	7,60	7,23	7,02
0,72		5	4	3	4	16	80	7,44	7,59	7,19	7,01
CE(I)50,48h: 0,41 mg/L						Intervalo de confiança: 0,30 – 0,55 mg/L					

Tabela 17 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (µS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃	
NP	D.similis		17/04/12		7,42		7,00	146,8	44	
Concentração mg/L	No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle	1	1	0	0	2	10	7,49	7,59	7,10	7,00
0,09	0	0	0	0	0	0	7,52	7,62	7,40	7,10
0,18	0	0	0	0	0	0	7,52	7,61	7,42	7,15
0,36	2	2	1	1	6	30	7,51	7,60	7,53	7,08
0,72	4	4	3	3	14	70	7,53	7,63	7,67	7,18
1,44	5	5	5	5	20	100	7,49	7,61	7,66	7,14
CE(I)50,48h: 0,25 mg/L						Intervalo de confiança: 0,21 – 0,31 mg/L				

Tabela 18 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	D.similis		17/04/12		7,42		7,00	146,8	44		
Concentração mg/L		No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		1	1	0	0	1	5	7,49	7,65	7,10	6.97
0,09		0	0	0	0	0	0	7,52	7,68	7,40	7,13
0,18		0	0	0	0	0	0	7,52	7,68	7,42	7,12
0,36		3	3	2	2	10	50	7,51	7,68	7,53	7,14
0,72		5	4	4	3	16	70	7,53	7,60	7,67	7,18
1,44		5	5	5	5	20	100	7,49	7,65	7,66	7,23
CE(I)50,48h: 0,4135mg/L						Intervalo de confiança: 0,34 – 0,50 mg/L					

Tabela 19 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)		Cond (µS/cm ⁻¹)		Dureza mg/L CaCO ₃	
NP	D.similis		17/04/12		7,42		7,00		146,8		44	
Concentração mg/L		No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste				
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f	
Controle		1	1	0	0	2	10	7,49	7,59	7,15	7,00	
0,09		0	0	0	0	0	0	7,52	7,62	7,65	7,12	
0,18		0	0	0	0	0	0	7,52	7,61	7,70	7,15	
0,36		2	2	1	1	6	30	7,51	7,60	7,66	7,09	
0,72		4	4	3	3	14	70	7,53	7,60	7,71	7,12	
1,44		5	5	5	5	20	100	7,49	7,56	7,69	7,14	
CE(I)50,48h: 0,25 mg/L							Intervalo de confiança: 0,21 – 0,31 mg/L					

Tabela 20 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Daphnia similis* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (µS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	D.similis		17/04/12		7,42		7,00	146,8	44		
Concentração mg/L		No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		1	1	0	0	2	10	7,49	7,59	7,15	7,00
0,09		0	0	0	0	0	0	7,52	7,62	7,65	7,12
0,18		0	0	0	0	0	0	7,52	7,61	7,70	7,15
0,36		3	3	2	2	10	30	7,51	7,60	7,66	7,09
0,72		4	4	3	3	14	70	7,53	7,60	7,71	7,12
1,44		5	5	5	5	20	100	7,49	7,56	7,69	7,14
CE(I)50,48h: 0,4432 mg/L							Intervalo de confiança: 0,36 – 0,55 mg/L				

APÊNDICE D

Dados brutos dos testes de toxicidade aguda realizados com organismos de
Ceriodaphnia silvestrii expostos ao Nonilfenol.

Tabela 21 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	C.silvestrii		22/05/12		7,50		7,31	146,7	42		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		0	0	0	0	0	0	7,50	7,60	7,31	6,95
0,045		0	0	0	0	0	0	7,54	7,38	7,66	6,72
0,09		0	0	0	0	0	0	7,50	7,37	7,71	6,70
0,18		0	0	0	0	0	0	7,53	7,29	7,66	6,67
0,36		2	3	4	2	11	55	7,52	7,39	7,76	6,64
0,72		5	5	5	5	20	100	7,51	7,23	7,65	6,60
CE(I)50,48h: 0,3477 mg/L						Intervalo de confiança: 0,30 – 0,41mg/L					

Tabela 22 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (µS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	C.silvestrii		29/05/12		7,44		7,01	145,9	42		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		0	0	0	0	0	0	7,50	7,65	7,01	6,85
0,050		0	0	0	0	0	0	7,54	7,38	7,06	6,72
0,10		0	0	0	0	0	0	7,50	7,37	7,10	6,70
0,20		0	0	0	0	0	0	7,53	7,29	7,16	6,77
0,40		3	3	3	2	11	55	7,52	7,39	7,17	6,76
0,80		5	5	5	4	19	95	7,51	7,23	7,16	6,80
CE(I)50,48h: 0,3528 mg/L						Intervalo de confiança: 0,31 – 0,40mg/L					

Tabela 23 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	C.silvestrii		12/06/12		7,33		7,11	145,8	40		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		0	0	0	0	0	0	7,33	7,56	7,11	6,96
0,15		0	0	0	0	0	0	7,48	7,65	7,23	6,99
0,225		0	0	0	1	1	5	7,48	7,66	7,24	6,97
0,337		0	0	1	1	2	10	7,43	7,67	7,26	6,98
0,51		2	3	2	1	8	40	7,47	7,63	7,18	6,96
0,75		4	4	4	2	14	70	7,47	7,64	7,17	6,99
CE(I)50,48h: 0,5538 mg/L						Intervalo de confiança: 0,47 – 0,65mg/L					

Tabela 24 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	C.silvestrii		12/06/12		7,33		7,11	145,8	40		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		0	0	0	0	0	0	7,33	7,52	7,11	6,98
0,15		0	0	0	0	0	0	7,48	7,62	7,23	7,00
0,225		0	1	0	0	1	5	7,48	7,63	7,24	6,99
0,337		1	0	0	1	2	10	7,43	7,64	7,23	6,99
0,51		3	2	2	1	8	40	7,47	7,60	7,18	6,96
0,75		4	4	4	2	14	70	7,45	7,61	7,19	6,99
CE(I)50,48h: 0,5538 mg/L							Intervalo de confiança: 0,47 – 0,65mg/L				

Tabela 25 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo	Teste definitivo	pH	OD (mg/L)	Cond (µS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃				
NP + etanol	C.silvestrii	12/06/12	7,44	7,34	153,7	42				
Concentração mg/L	No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle	0	0	0	0	0	0	7,44	7,26	7,34	7,12
Cont.Et. 73µL	0	0	0	0	0	0	7,37	7,20	7,25	7,00
0,045	0	0	0	0	0	0	7,36	7,18	7,13	7,00
0,078	5	4	4	5	18	90	7,50	6,97	7,26	6,98
0,13	5	5	5	5	20	100	7,52	6,98	7,32	6,96
0,24	5	5	5	5	20	100	7,51	6,97	7,33	6,99
0,42	5	5	5	5	20	100	7,50	6,98	7,31	6,97
CE(I)50,48h: 0,0624 mg/L						Intervalo de confiança: 0,06 – 0,07 mg/L				

Tabela 26– Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo	Teste definitivo		pH	OD (mg/L)	Cond (µS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃			
NP + etanol	C.silvestrii	28/08/12		7,37	7,55	154,3	42			
Concentração mg/L	No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle	0	0	0	0	0	0	7,37	7,47	7,55	7,26
Cont.Et. 73µL	0	0	0	0	0	0	7,28	7,48	7,38	7,08
0,037	0	0	0	0	0	0	7,33	7,54	7,13	7,02
0,045	0	1	0	0	1	5	7,37	7,57	7,16	6,98
0,054	2	2	3	4	11	55	7,45	7,58	7,17	6,98
0,065	4	5	5	5	19	95	7,47	7,61	7,20	7,00
0,077	5	5	5	5	20	100	7,49	7,64	7,15	6,98
CE(I)50,48h: 0,05348 mg/L						Intervalo de confiança: 0,05 – 0,06 mg/L				

Tabela 27– Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo	Teste definitivo	pH	OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃				
NP + etanol	C.silvestrii	28/08/12	7,37	7,55	154,3	42				
Concentração mg/L	No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	Od _f
Controle	0	0	0	0	0	0	7,37	7,49	7,55	7,27
Cont.Et. 73μL	0	0	0	0	0	0	7,28	7,45	7,36	7,08
0,037	0	0	0	0	0	0	7,33	7,56	7,15	7,02
0,045	0	1	0	0	1	5	7,37	7,59	7,16	6,98
0,054	2	2	3	4	11	55	7,45	7,60	7,17	6,98
0,065	4	5	5	5	19	95	7,47	7,61	7,22	7,03
0,077	5	5	5	5	20	100	7,49	7,65	7,15	6,97
CE(I)50,48h: 0,05346 mg/L						Intervalo de confiança: 0,05 – 0,06 mg/L				

Tabela 28– Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo	Teste definitivo		pH	OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃			
NP + etanol	C.silvestrii	30/08/12		7,42	7,40	149,3	42			
Concentração mg/L	No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle	0	0	0	0	0	0	7,42	7,13	7,40	7,12
Cont.Et. 73μL	0	0	0	0	0	0	7,34	7,45	7,30	7,08
0,037	0	0	0	0	0	0	7,37	7,56	7,15	7,00
0,045	0	1	0	0	1	5	7,38	7,59	7,17	6,98
0,054	2	2	3	4	11	55	7,45	7,60	7,15	6,98
0,065	4	5	5	5	19	95	7,47	7,61	7,20	7,03
0,077	5	5	5	5	20	100	7,49	7,65	7,15	6,97
CE(I)50,48h: 0,05012 mg/L						Intervalo de confiança: 0,05 – 0,05 mg/L				

Tabela 29 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo	Teste definitivo		pH	OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃			
NP + etanol	C.silvestrii	30/08/12		7,42	7,40	149,3	42			
Concentração mg/L	No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle	0	0	0	0	0	0	7,42	7,10	7,40	7,07
Cont.Et. 73μL	0	0	0	0	0	0	7,34	7,49	7,30	7,04
0,037	0	0	0	0	0	0	7,37	7,58	7,15	7,01
0,045	0	1	0	0	1	5	7,38	7,59	7,17	6,96
0,054	2	2	3	4	11	55	7,45	7,60	7,15	6,97
0,065	4	5	5	5	19	95	7,47	7,61	7,20	7,00
0,077	5	5	5	5	20	100	7,49	7,65	7,15	6,96
CE(I)50,48h: 0,05203 mg/L						Intervalo de confiança: 0,05 – 0,05 mg/L				

Tabela 30 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP + etanol	C.silvestrii		18/09/12		7,42		7,30	149,3	42		
Concentração		No imóvel / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
mg/L		1	2	3	4	Total	%	Phin	pHf	ODin	Odf
Controle		0	0	0	0	0	0	7,42	7,60	7,30	7,10
Cont.Et. 73μL		0	0	0	0	0	0	7,37	7,20	7,15	7,00
0,037		0	0	0	0	0	0	7,32	7,18	7,13	7,00
0,045		0	1	0	0	1	5	7,30	7,14	7,16	6,98
0,054		2	2	3	4	11	55	7,32	7,21	7,17	6,96
0,065		4	5	5	5	19	95	7,31	7,13	7,20	7,00
0,077		5	5	5	5	20	100	7,33	7,21	7,15	6,98
0,092		5	5	5	5	20	100	7,29	7,16	7,19	6,99
CE(I)50,48h: 0,05321 mg/L							Intervalo de confiança: 0,05 – 0,06 mg/L				

APÊNDICE E

Dados brutos dos testes de toxicidade aguda com organismos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos ao Bisfenol A.

Tabela 31 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo	Teste definitivo	Ph	OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃				
BPA + etanol	C.silvestrii	11/09/12	7,34	7,44	153,7	40				
Concentração mg/L	No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle	0	0	0	0	0	0	7,34	7,56	7,44	7,04
Etanol	5	5	5	5	20	100	7,53	7,65	7,40	7,10
3,2	5	5	5	5	20	100	7,55	7,65	7,42	6,99
6,4	5	5	5	5	20	100	7,51	7,66	7,41	7,07
12,8	5	5	5	5	20	100	7,50	7,62	7,43	7,10
25,6	5	5	5	5	20	100	7,53	7,66	7,45	7,08
51,2	5	5	5	5	20	100	7,55	7,66	7,44	7,09
CE(I)50,48h: -						Intervalo de confiança: -				

Tabela 32 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
BPA	C.silvestrii		12/06/12		7,33		7,00	145,8	40		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		0	0	0	0	0	0	7,33	7,66	7,00	6,66
15,0		0	0	0	0	0	0	7,46	7,51	7,13	6,94
19,0		0	0	0	0	0	0	7,48	7,53	7,10	6,90
25,0		1	2	1	2	6	30	7,44	7,57	7,14	6,99
32,9		4	4	4	4	16	80	7,42	7,55	7,19	7,05
42,8		5	5	5	5	20	100	7,36	7,50	7,26	7,09
CE(I)50,48h: 27,87						Intervalo de confiança: 25,88 - 30,01mg/L					

Tabela 33 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
BPA	C.silvestrii		22/05/12		7,45		7,35	145,6	40		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		0	0	0	0	0	0	7,45	7,60	7,35	7,00
3,2		0	0	0	0	0	0	7,51	7,65	7,42	6,99
6,4		0	0	0	0	0	0	7,54	7,67	7,43	7,01
12,8		0	0	0	0	0	0	7,53	7,67	7,50	7,10
25,6		5	5	4	4	18	90	7,53	7,68	7,51	7,08
51,2		5	5	5	5	20	100	7,55	7,66	7,51	7,09
CE(I)50,48h: 19,40mg/L						Intervalo de confiança: 17,68 – 21,29 mg/L					

Tabela 34 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia silvestrii* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo	Teste definitivo		pH	OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃			
BPA	C.silvestrii	29/05/12		7,44	7,01	145,9	42			
Concentração mg/L	No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
	1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle	0	0	0	0	0	0	7,44	7,60	7,01	6,89
3,2	0	0	0	0	0	0	7,47	7,65	7,15	6,99
6,4	0	0	0	0	0	0	7,48	7,60	7,13	7,01
12,8	5	5	5	4	19	92,5	7,43	7,59	7,16	7,02
25,6	5	5	5	5	20	100	7,45	7,55	7,12	6,99
51,2	5	5	5	5	20	100	7,49	7,57	7,13	6,98
CE(I)50,48h: 12,7279 mg/L						Intervalo de confiança: - mg/L				

APÊNDICE F

Dados brutos dos testes de toxicidade aguda com organismos de *Ceriodaphnia dubia*
expostos ao Nonilfenol.

Tabela 35 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia dubia* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (µS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	C.dubia		18/09/12		7,42		7,30	149,3	42		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	OD _f
Controle		0	0	0	0	0	0	7,42	7,58	7,30	7,00
Cont.Etanol 73µL/L		0	0	0	0	0	0	7,38	7,50	7,23	7,00
0,037		5	1	2	2	10	50	7,35	7,60	7,23	7,01
0,045		5	5	5	5	20	100	7,30	7,59	7,18	7,02
0,054		5	5	5	5	20	100	7,31	7,60	7,18	6,97
0,065		5	5	5	5	20	100	7,28	7,63	7,15	6,98
0,077		5	5	5	5	20	100	7,27	7,65	7,15	6,96
0,092		5	5	5	5	20	100	7,27	7,50	7,16	6,95
CE(I)50,48h: 0,037 mg/L							Intervalo de confiança: -				

Tabela 36 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia dubia* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	C.dubia		20/09/12		7,44		7,25	153,3	44		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pHin	pHf	ODin	OdF
Controle		0	0	0	0	0	0	7,44	7,55	7,25	7,05
Cont.Etanol 73μL/L		0	0	0	0	0	0	7,39	7,50	7,23	7,05
0,037		4	2	1	1	8	40	7,36	7,58	7,24	7,03
0,045		5	5	5	4	19	95	7,33	7,59	7,19	7,00
0,054		5	5	5	5	20	100	7,31	7,57	7,18	6,98
0,065		5	5	5	5	20	100	7,28	7,58	7,18	6,99
0,077		5	5	5	5	20	100	7,27	7,53	7,19	6,99
CE(I)50,48h: 0,037 mg/L							Intervalo de confiança: -				

Tabela 37 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia dubia* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (µS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	C.dubia		20/09/12		7,44		7,25	153,3	44		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pHin	pHf	ODin	OdF
Controle		0	0	0	0	0	0	7,44	7,55	7,25	7,07
Cont.Etanol 73µL/L		0	0	0	0	0	0	7,38	7,50	7,23	7,04
0,030		2	2	2	2	8	40	7,36	7,56	7,24	7,02
0,037		4	3	2	2	11	55	7,33	7,57	7,19	7,01
0,045		5	5	5	5	20	100	7,31	7,55	7,18	6,99
0,054		5	5	5	5	20	100	7,28	7,54	7,18	6,98
0,065		5	5	5	5	20	100	7,27	7,50	7,19	6,98
CE(I)50,48h: 0,03429 mg/L							Intervalo de confiança: 0,03 – 0,04				

Tabela 38 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia dubia* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	C.dubia		25/09/12		7,45		7,20	156,3	44		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pHin	pHf	ODin	Odf
Controle		0	0	0	0	0	0	7,44	7,56	7,25	7,01
Cont.Etanol 73μL/L		0	0	0	0	0	0	7,38	7,50	7,23	7,02
0,025		4	2	1	1	8	40	7,36	7,52	7,24	7,03
0,030		5	5	5	4	19	95	7,35	7,51	7,19	7,02
0,037		5	5	5	5	20	100	7,32	7,50	7,18	6,99
0,045		5	5	5	5	20	100	7,30	7,48	7,18	6,97
0,054		5	5	5	5	20	100	7,31	7,50	7,19	6,98
CE(I)50,48h: 0,03141 mg/L							Intervalo de confiança: 0,03 – 0,04				

Tabela 39 – Resultados do teste de toxicidade aguda da *Ceriodaphnia dubia* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Amostra	Organismo		Teste definitivo		pH		OD (mg/L)	Cond (μS/cm ⁻¹)	Dureza mg/L CaCO ₃		
NP	C.dubia		25/09/12		7,45		7,20	156,3	44		
Concentração mg/L		No imóveis / réplica				Imobilidade		Variáveis do teste			
		1	2	3	4	Total	%	pH _{in}	pH _f	OD _{in}	Od _f
Controle		0	0	0	0	0	0	7,44	7,58	7,25	7,00
Cont.Etanol 73μL/L		0	0	0	0	0	0	7,38	7,50	7,23	7,01
0,025		4	2	1	1	8	40	7,36	7,52	7,24	7,02
0,030		5	5	5	4	19	95	7,35	7,52	7,19	7,00
0,037		5	5	5	5	20	100	7,32	7,51	7,18	6,98
0,045		5	5	5	5	20	100	7,30	7,49	7,18	6,97
0,054		5	5	5	5	20	100	7,31	7,52	7,19	6,99
CE(I)50,48h: 0,03020 mg/L							Intervalo de confiança: 0,03 – 0,03				

APÊNDICE G

Dados brutos dos testes de toxicidade crônica com organismos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos ao Nonilfenol.

Tabela 40 – Resultados do teste de toxicidade crônica da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Organismo-teste: <i>C.silvestrii</i>				Início do teste: 13/07/12						Término do teste: 20/07/12			
Amostra	Número de organismos		Sobrevivência (%)	Neonatos		pH		OD (mg.LP ⁻¹ P)		Condutividade (µS/cm ⁻¹)		Dureza (mg.LP ⁻¹ P)	
NP	I	F		total	Média	I	F	I	F	I	F	I	F
Controle	10	10	90	178	17,8	7,50	7,58	6,90	6,80	146	153,6	42	42
0,015	10	10	100	113	11,3*	7,49	7,60	6,88	6,58	144	148,6	42	42
0,031	10	10	100	124	12,4	7,48	7,57	6,87	6,60	147	153,6	42	42
0,062	10	10	100	106	10,6	7,48	7,60	6,88	6,64	143	151,2	42	42
0,125	10	10	100	99	9,9	7,47	7,60	6,89	6,67	145	153	42	42
0,25	10	0	0	0	0	7,47	7,58	6,90	6,65	145	151,2	42	42
Resultado: Toxicidade crônica													
*: diferença significativa na reprodução (Bonferroni T test)													

Controle de laboratório: Água reconstituída. I - inicial F – final

Tabela 41 – Resultados do teste de toxicidade crônica da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Organismo-teste: <i>C.silvestrii</i>				Início do teste: 24/07/12						Término do teste: 31/07/12			
Amostra	Número de organismos		Sobrevivência	Neonatos		pH		OD (mg.LP ⁻¹) ^P		Condutividade (µS/cm ⁻¹)		Dureza (mg.LP ^{-1P}) e Temp	
NP	I	F	(%)	total	Média	I	F	I	F	I	F	D	T(°C)
Controle	10	10	100	214	21,4	7,21	7,35	7,37	7,07	148	153,6	42	22,4
0,021	10	10	100	103*	10,3*	7,43	7,58	7,30	7,01	153,4	158,0	42	23,0
0,037	10	10	100	111	11,1	7,40	7,55	7,32	7,05	155,1	159,0	42	23,1
0,065	10	10	100	73	7,3	7,40	7,52	7,28	7,00	156,2	159,5	42	23,5
0,114	10	10	100	59	5,9	7,41	7,56	7,29	7,02	157,0	159,8	42	23,4
0,20	10	0	0	0	0	7,42	7,58	7,31	7,03	158,1	160,0	42	23,4
Resultado: Toxicidade crônica													
*: diferença significativa na reprodução (Bonferroni T test)													

Tabela 42 – Resultados do teste de toxicidade crônica da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Organismo-teste: <i>C.silvestrii</i>				Início do teste: 01/08/12						Término do teste: 09/08/12			
Amostra	Número de organismos		Sobrevivência	Neonatos		pH		OD (mg.LP ⁻¹) ^P		Condutividade (µS/cm ⁻¹)		Dureza (mg.LP ⁻¹) e Temp	
NP	I	F	(%)	total	média	I	F	I	F	I	F	D	T(°C)
Controle	10	10	100	180	18,0	7,36	7,50	7,27	7,00	148,9	153,9	42	22,9
0,021	10	10	100	79*	7,9*	7,39	7,52	7,30	7,01	153,4	158,0	42	22,7
0,037	10	10	100	63	6,3	7,40	7,55	7,22	7,00	149,1	157,0	42	23,1
0,065	10	10	100	60	6,0	7,40	7,52	7,21	7,02	148,7	159,5	42	22,6
0,114	10	10	100	59	5,9	7,39	7,56	7,24	7,01	150,5	158,5	42	22,4
0,157	10	0	0	0	0	7,42	7,58	7,23	7,01	149,9	157,9	42	22,6
0,20	10	0	0	0	0	7,40	7,59	7,22	7,00	148,9	159,1	42	22,5
Resultado: Toxicidade crônica													
*: diferença significativa na reprodução (Bonferroni T test)													
Controle de laboratório: Água reconstituída. I - inicial F – final													

Tabela 43 – Resultados do teste de toxicidade crônica da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Organismo-teste: <i>C.silvestrii</i>				Início do teste: 08/08/12						Término do teste: 15/08/12			
Amostra	Número de organismos		Sobrevivência	Neonatos		pH		OD (mg.LP ⁻¹) ^P		Condutividade (μS/cm ⁻¹)		Dureza (mg.LP ⁻¹) e Temp	
NP	I	F	(%)	Total	média	I	F	I	F	I	F	D	T(°C)
Controle	10	10	100	167	16,7	7,30	7,50	7,20	7,00	147,9	153,9	42	23,2
0,021	10	10	100	78*	7,8*	7,35	7,52	7,21	7,01	151,4	157,0	42	23,0
0,037	10	10	100	63	6,3	7,36	7,53	7,22	7,00	148,1	155,0	42	23,1
0,065	10	10	100	60	6,0	7,35	7,54	7,21	7,02	149,7	156,5	42	23,6
0,114	10	10	100	5,1	51	7,37	7,56	7,23	7,01	151,5	159,5	42	23,6
0,20	10	7	70	28	4	7,38	7,58	7,23	7,01	151,9	158,9	42	23,7
Resultado: Toxicidade crônica													
*: diferença significativa na reprodução (Bonferroni T test)													

Controle de laboratório: Água reconstituída. I - inicial F – final

Tabela 44 – Resultados do teste de toxicidade crônica da *Ceriodaphnia silvestrii* ao nonilfenol e valores das variáveis físicas e químicas.

Organismo-teste: <i>C.silvestrii</i>				Início do teste: 08/08/12						Término do teste: 15/08/12			
Amostra	Número de organismos		Sobrevivência	Neonatos		pH		OD (mg.LP ⁻¹ P)		Condutividade (µS/cm ⁻¹)		Dureza (mg.LP ⁻¹ P) e Temp	
NP	I	F	(%)	total	média	I	F	I	F	I	F	D	T(°C)
Controle	10	10	100	213	21,3	7,30	7,52	7,20	7,01	147,9	156,6	42	23,1
0,021	10	10	100	103*	10,3*	7,35	7,58	7,23	7,01	149,4	159,0	42	23,0
0,037	10	10	100	111	11,1	7,37	7,55	7,25	7,01	148,1	159,5	42	23,1
0,065	10	10	100	73	7,3	7,38	7,52	7,28	7,00	149,2	159,8	42	23,1
0,114	10	10	100	59	5,9	7,37	7,56	7,29	7,01	149,5	159,7	42	23,3
0,20	10	0	0	0	0	7,39	7,58	7,29	7,00	148,5	159,8	42	23,2
Resultado: Toxicidade crônica													
*: diferença significativa na reprodução (Bonferroni T test)													

Controle de laboratório: Água reconstituída. I - inicial F – final

APÊNDICE H

Dados brutos dos testes de toxicidade crônica com organismos de *Ceriodaphnia silvestrii* expostos ao bisfenol A.

Tabela 45 – Resultados do teste de toxicidade crônica da *Ceriodaphnia silvestrii* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Organismo-teste: <i>C.silvestrii</i>				Início do teste: 13/07/12						Término do teste: 20/07/12			
Amostra	Número de organismos		Sobrevivência	Neonatos		pH		OD (mg.LP ^{-1P})		Condutivi- dade (μS/cm ⁻¹)		Dureza (mg.LP ^{-1P}) e Temp	
BPA	I	F	(%)	total	média	I	F	I	F	I	F	D	T(°C)
Controle	10	10	100	134	13,4	7,35	7,52	7,23	7,01	147,9	156,6	42	23,1
0,935	10	9	90	59*	6,55*	7,40	7,58	7,25	7,01	149,4	159,0	42	23,0
1,85	10	10	70	70	7,0	7,43	7,55	7,26	7,01	148,1	159,5	42	23,1
3,5	10	9	90	58	5,88	7,44	7,55	7,28	7,00	149,2	159,8	42	23,1
7,5	10	4	40	0	0	7,45	7,56	7,29	7,01	149,5	159,7	42	23,3
15,0	10	0	0	0	0	7,45	7,58	7,29	7,00	148,5	159,8	42	23,2
Resultado: Toxicidade crônica													
*: diferença significativa na reprodução (Bonferroni T test)													

Controle de laboratório: Água reconstituída. I - inicial F – final

Tabela 46 – Resultados do teste de toxicidade crônica da *Ceriodaphnia silvestrii* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Organismo-teste: <i>C.silvestrii</i>				Início do teste: 24/07/12						Término do teste: 31/07/12			
Amostra	Número de organismos		Sobrevivência	Neonatos		pH		OD (mg.LP ^{-1P})		Condutivi- dade (μS/cm ⁻¹)		Dureza (mg.LP ^{-1P}) e Temp	
BPA	I	F	(%)	total	média	I	F	I	F	I	F	D	T(°C)
Controle	10	10	100	200	20,0	7,40	7,54	7,24	7,01	145,9	156,6	42	23,0
1,38	10	10	100	113*	11,3*	7,45	7,58	7,28	7,01	147,4	158,5	42	23,4
2,07	10	10	100	95	9,5	7,44	7,56	7,29	7,01	147,8	158,7	42	23,3
3,11	10	10	100	91	9,1	7,45	7,57	7,28	7,00	147,9	159,8	42	23,5
4,66	10	10	100	41	4,1	7,46	7,56	7,30	7,01	148,5	159,7	42	23,3
7,0	10	3	30	6	2	7,45	7,58	7,29	7,00	148,9	159,1	42	23,4
Resultado: Toxicidade crônica													
*: diferença significativa na reprodução (Bonferroni T test)													

Tabela 47 – Resultados do teste de toxicidade crônica da *Ceriodaphnia silvestrii* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Organismo-teste: <i>C.silvestrii</i>				Início do teste: 01/08/12						Término do teste: 08/08/12			
Amostra	Número de organismos		Sobrevivência	Neonatos		pH		OD (mg.LP ^{-1P})		Condutivi- dade (μS/cm ⁻¹)		Dureza (mg.LP ^{-1P}) e Temp	
BPA	I	F	(%)	total	média	I	F	I	F	I	F	D	T(°C)
Controle	10	10	100	169	16,9	7,36	7,50	7,12	6,98	146,9	156,3	42	23,2
1,38	10	10	100	67*	6,9*	7,40	7,58	7,28	7,00	147,4	158,5	42	23,4
2,07	10	10	100	49	4,9	7,41	7,56	7,25	7,01	147,8	158,7	42	23,3
3,11	10	10	100	39	3,9	7,42	7,57	7,27	7,05	147,1	159,8	42	23,5
4,66	10	10	100	32	3,2	7,40	7,56	7,29	7,01	147,5	159,7	42	23,3
7,0	10	6	60	6	2	7,41	7,58	7,29	7,04	147,3	159,1	42	23,4
10,5	10	0	0	0	0	7,42	7,57	7,28	7,03	147,9	158,4	42	23,0
Resultado: Toxicidade crônica													
*: diferença significativa na reprodução (Bonferroni T test)													

Tabela 48 – Resultados do teste de toxicidade crônica da *Ceriodaphnia silvestrii* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

Organismo-teste: <i>C.silvestrii</i>				Início do teste: 08/08/12						Término do teste: 15/08/12			
Amostra	Número de organismos		Sobrevivência	Neonatos		pH		OD (mg.LP ^{-1P})		Condutivi- dade (µS/cm ⁻¹)		Dureza (mg.LP ^{-1P}) e Temp	
BPA	I	F	(%)	total	média	I	F	I	F	I	F	D	T(°C)
Controle	10	10	100	167	16,7	7,35	7,50	7,32	7,03	146,8	155,3	42	23,2
1,38	10	10	100	67*	6,7*	7,36	7,52	7,35	7,05	147,4	157,5	42	23,4
2,07	10	10	100	47	4,7	7,38	7,55	7,37	7,06	147,8	158,7	42	23,3
3,11	10	10	100	39	3,9	7,37	7,53	7,36	7,05	148,1	157,5	42	23,5
4,66	10	10	100	30	3,0	7,39	7,53	7,37	7,04	148,5	157,7	42	23,3
7,0	10	6	60	6	2	7,40	7,54	7,36	7,04	148,9	158,9	42	23,4
10,5	10	0	0	0	0	7,41	7,55	7,35	7,05	149,1	158,6	42	23,0
Resultado: Toxicidade crônica													
*: diferença significativa na reprodução (Bonferroni T test)													

Tabela 49 – Resultados do teste de toxicidade crônica da *Ceriodaphnia silvestrii* ao bisfenol A e valores das variáveis físicas e químicas.

			Organismo-teste: <i>C.silvestrii</i>		Início do teste: 08/08/12					Término do teste: 15/08/12			
Amostra BPA	Número de organismos		Sobrevivência (%)	Neonatos		pH		OD (mg.LP ^{-1P})		Condutividade (mS/cm-1)		Dureza(mg.LP ^{-1P})	Temp (°C)
	I	F		Total	média	I	F	I	F	I	F	D	T
Controle	10	10	100	214	21,4	7,35	7,52	7,32	7,05	146,8	155,9	42	23,2
1,38	10	10	100	64*	6,4*	7,36	7,56	7,35	7,08	147,4	158	42	23,4
2,07	10	10	100	66	6,6	7,38	7,55	7,37	7,09	147,8	158,5	42	23,3
3,11	10	10	100	49	4,9	7,37	7,53	7,36	7,1	148,1	158,4	42	23,5
4,66	10	10	100	14	1,4	7,39	7,53	7,37	7,09	148,5	158,4	42	23,3
7	10	3	30	0	0	7,4	7,54	7,36	7,08	148,9	158,6	42	23,4
10,5	10	0	0	0	0	7,41	7,55	7,35	7,07	149,1	158,9	42	23
			Resultado: Toxicidade crônica										
			*: diferença significativa na reprodução (Bonferroni T test)										

APENDICE I
Dados brutos relativos aos testes de toxicidade crônica realizados com larvas de
Chironomus xanthus expostas ao bisfenol A e ao nonilfenol

Tabela 50 - Resultado do teste de toxicidade crônica do *Chironomus xanthus* ao Nonilfenol e variáveis físicas e químicas.

				Organismo-teste: <i>C.xanthus</i>		Início do teste: 23/10/12						Término do teste: 05/11/12		
Amostra	Número de organismos			Sobrevivência (%)	Emergentes		pH		OD (mg.LP ⁻¹) ^P		Condutividade (mS/cmP ^{2P})		Dureza (mg.LP ^{-1P}) e Temp	
NP	1	2	3		Total	média	I	F	I	F	I	F	D	T(°C)
Controle	10	10	10	100	30	10	7,32	7,65	7,32	7,05	63	136,8	13	23,2
Cont.Etanol	10	10	10	100	30	10	7,32	7,54	7,35	7,08	62	101,9	17	23,4
25 µL	10	10	10	100	30	10	7,34	7,55	7,37	7,09	61	72,9	15	23,3
50 µL	9	10	9	93,33	28	9,33	7,39	7,53	7,36	7,1	61	74,9	15	23,5
100 µL	6	7	5	60	18*	6	7,39	7,6	7,37	7,09	61	79,5	15	23,3
				Resultado: Toxicidade crônica										
				*: diferença significativa na emergência (Bonferroni T test)										

Tabela 51 - Resultado do teste de toxicidade crônica do *Chironomus xanthus* ao bisfenol A e variáveis físicas e químicas

				Organismo-teste: <i>C.xanthus</i>			Início do teste: 12/11/12				Término do teste: 26/11/12			
Amostra	Número de organismos			Sobrevivência (%)	Emergentes		Ph		OD (mg.LP ⁻¹) ^P		Condutividade (mS/cmP ^{2P})		Dureza (mg.LP ^{-1P}) e Temp	
	1	2	3		Total	média	I	F	I	F	I	F	D	T(°C)
BPA														
Controle	10	10	10	100	30	10	7,32	7,5	7,32	7,05	64,7	115,2	14	23,2
6 mgL ⁻¹	7	8	9	80	24	8	7,31	7,52	7,3	7,02	63,4	120,6	16	23,2
12 mgL ⁻¹	6	8	9	76,66	23*	7,66	7,33	7,5	7,32	7,14	62,7	128,7	16	23
24mL ⁻¹	3	1	2	30	6*	2	7,34	7,87	7,35	7,09	61,9	130,4	16	23
Resultado: Toxicidade crônica *: diferença significativa na emergência (Bonferroni T test)														

Tabela 52 – Resultados da análise estatística do teste do BPA em *Chironomus xanthus*.

File: CHIRONOMUS BPA Transform: NO TRANSFORMATION

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

TRANSFORMED MEAN CALCULATED IN						
GROUP	IDENTIFICATION		MEAN	ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG

1	CONTROLE		10.000	10.000		
2	6	8.000	8.000	2.353		
3	12	7.667	7.667	2.746	*	
4	24	2.000	2.000	9.414	*	

Dunnett table value = 2.42 (1 Tailed Value, P=0.05, df=8,3)						

Tabela 53 - Resultados da análise estatística do teste do NP em *Chironomus xanthus*.

File: NP CHIRON Transform: NO TRANSFORMATION

BONFERRONI T-TEST - TABLE 1 OF 2					Ho:Control<Treatment	

TRANSFORMED MEAN CALCULATED IN						
GROUP	IDENTIFICATION		MEAN	ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG

1	CONTROLE NORMAL		10.000	10.000		
2	CONTROLE ETANOL		10.000	10.000	0.000	
3	25	10.000	10.000	0.000		
4	50	9.333	9.333	1.581		
5	100	6.000	6.000	9.487	*	

Bonferroni T table value = 2.63 (1 Tailed Value, P=0.05, df=10.4)						