INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DOS EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS (REPRODUÇÃO E
TERATOGENESE) DO FÁRMACO TRICLOSAN PARA *Daphnia similis*,
Ceriodaphnia dubia, *Ceriodaphnia silvestrii* (CLADOCERA, CRUSTACEA).**

VANESSA LAMEIRA

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

Orientadora:

Dra. Maria Beatriz Bohrer-Morel

SÃO PAULO

2008

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DOS EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS (REPRODUÇÃO E
TERATOGENESE) DO FÁRMACO TRICLOSAN PARA *Daphnia similis*,
Ceriodaphnia dubia, *Ceriodaphnia silvestrii* (CLADOCERA, CRUSTACEA).**

VANESSA LAMEIRA

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

Orientadora:

Dra. Maria Beatriz Bohrer-Morel

SÃO PAULO

2008

Dedico este Trabalho ao meu
pai, a minha mãe e a minha
sobrinha, pessoas que eu
amo incondicionalmente.

Agradecimentos

A Deus pelo amor, oportunidades, desafios e pela presença em minha vida,

A minha querida orientadora, Dra. Maria Beatriz Bohrer-Morel, pela orientação, paciência, amizade e principalmente pela dedicação nesse final corrido de Dissertação,

Aos meus pais, Sonia Mariza e Nilo Lameira, por mostrarem que as coisas mais simples fazem à diferença...obrigada pelo sorriso e pelo abraço em meio a minha ansiedade,

A minha irmã, Fabíola, pela energia e principalmente pelo companheirismo,

Ao meu irmão, Roger, pelas palavras sempre sábias e equilibradas que me confortam,

A minha cunhada Elenita pela grande amizade,

A minha sobrinha, Alwdree, pelos momentos de descontração, amor e por deixar minha vida mais alegre...amo muito...

A minha amiga Carol pelo companheirismo, carinho, amizade verdadeira e histórias que construímos,

A minha amiga Angélica pela companhia nos ensaios e principalmente pela “amizade-irmandade”,

Ao meu amigo Fábio, pela paciência (e haja paciência né?), companheirismo, amizade sincera e ajuda na realização dos testes,

Ao Gustavo pela amizade e auxílio nas análises estatísticas,

Aos meus mais novos amigos, Caio e Joaquim pelas “risadas” no laboratório,

A Juliana M. pela amizade sincera e grandiosa ajuda neste trabalho,

A Juliana B. pelo importante incentivo na reta final desse trabalho,

Ao pessoal do CQMA, em especial, Maria Aparecida, Maricel, Elaine, Nilce, Beth, Denise, Luiz Fernando “Macarrão”, Evelin, Lillian, Juliana “Chança”, Maria Nogueira e Elias,

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

.....A todos aqueles que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho...sem palavras....fica só o sentimento.....

.....Muito obrigada.....

Pedras no caminho? Guardo todas....um
dia construirei um castelo....

FERNANDO PESSOA.

ESTUDO DOS EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS (REPRODUÇÃO E TERATOGENESE) DO FÁRMACO TRICLOSAN PARA *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestrii* (CLADOCERA, CRUSTACEA).

RESUMO

Até pouco tempo, o conhecimento da contaminação dos ecossistemas aquáticos, estava restrito a metais e agrotóxicos, sendo pouca ênfase dada a produtos farmacêuticos, que, apesar de serem encontrados em concentrações de nanogramas a microgramas, podem causar efeitos letais e induzir malformações nos organismos. Estudos ecotoxicológicos têm sido realizados para identificar os efeitos destas substâncias, contudo, os dados são insuficientes, principalmente no que se refere a efeitos subletais e de toxicidade em espécies de ambientes tropicais e subtropicais. Efeitos letais e subletais, como crescimento e reprodução, são determinados através de ensaios ecotoxicológicos agudos e crônicos, sendo as malformações dificilmente evidenciadas por estes ensaios. Diante disto, pesquisadores vêm desenvolvendo metodologias mais refinadas, como por exemplo, a exposição direta de embriões a produtos químicos em ensaios de teratogênese. Para Cladocera estes ensaios são restritos. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos letais e subletais de um antimicrobiano, Triclosan, através de ensaios de ecotoxicidade com *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *C. silvestrii*. A fim de se estimar com maior rigor os efeitos em ambientes tropicais e subtropicais, os ensaios foram realizados com água natural como água de diluição, com e sem fotoperíodo. Também foram realizados ensaios em água Milli-Q água reconstituída, sem fotoperíodo de modo a observar a toxicidade do produto sem interferentes externos. Estágio do desenvolvimento embrionário de *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii* foram identificado de modo a otimizar os ensaios de teratogênese. Para o estudo da toxicidade, foram realizados ensaios de ecotoxicidade aguda com *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii* e ensaios crônicos com *D. similis* e *C. silvestrii*. Para a classificação dos estágios do desenvolvimento embrionário, ovos foram cultivados “*in vivo*” a temperatura de 20°C (*D. similis*) e 25°C (*C. dubia* e *silvestrii*), observados a cada hora, até o desenvolvimento completo do organismo. Posteriormente, as condições dos

ensaios de teratogênese foram estabelecidas sendo realizados com *D. similis*. A CE50 48H de Triclosan para *D. similis* e *C. silvestrii* em água natural reconstituída com fotoperíodo foi de 0,23 e 0,10 mg.L⁻¹, respectivamente, e de 0,13 mg.L⁻¹ para *C. silvestrii*, sem fotoperíodo. Para os ensaios com água Milli-Q reconstituída, sem fotoperíodo, os valores de CE50;48H para *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii* foram de 0,22; 0,09 e 0,08 mg.L⁻¹, respectivamente. O CEO para *D. similis* foi de 0,1 mg.L⁻¹ e o valor de IC50 relativo às malformações das neonatas nos testes crônicos foi de 0,057 mg.L⁻¹. Para *C. silvestrii* o CEO foi de 0,04 mg.L⁻¹, não sendo evidenciadas malformações nas neonatas. Sete estágios foram observados no desenvolvimento embrionário dos cladoceros com duração (horas) de 34 (±3) para *C. dubia*, 36(±2) para *C. silvestrii* e de 51 (±5) para *D. similis*. O valor de IC50 para malformação nos ensaios de teratogênese (exposição direta de embriões) para *D. similis* foi de 0,075 mg.L⁻¹, próximo ao obtido nos ensaios crônicos.

**STUDY OF SUBLETHAL AND LETHAL EFFECTS (REPRODUCTION AND
TERATOGENESIS) OF THE PHARMACEUTICAL COMPOUND TRICLOSAN TO
Daphnia similis, *Ceriodaphnia dubia*, and *Ceriodaphnia silvestrii*
(CLADOCERA, CRUSTACEA)**

Vanessa Lameira

ABSTRACT

Until recently, the knowledge of contamination on aquatic ecosystems was restricted to metals and pesticides, with little emphasis on pharmaceuticals. Despite being found in concentrations of nanograms to micrograms per litre, these compounds can cause lethal and development defects on living organisms. Ecotoxicological studies have been performed to identify effects of these substances. However, the data available is not sufficient, especially for species in tropical and sub-tropical environments. Lethal and sublethal effects, such as growth and reproduction, are determined through acute and chronic toxicity tests, but developmental effects are hardly evaluated in these tests. Thus, researchers have been developing refined methods, such as the direct exposure of embryos to chemicals in tests of teratogenesis. These tests are restricted to Cladocera. The purpose of study was to evaluate lethal and sublethal effects of an antimicrobial compound, Triclosan (5-chloro-2[2,4-dichloro-phenol]) to *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* and *C. silvestrii*. Acute toxicity tests with *Daphnia similis* and *Ceriodaphnia silvestrii* were conducted with natural reconstituted water, with and without photoperiod, aiming to estimate more rigorous effects in tropical and subtropical environments. Acute toxicity tests were conducted with reconstituted water (Milli-Q) without photoperiod to observe the toxicity of Triclosan without external interferences. Embryonic stages of development in *D. similis*, *C. dubia* and *C. silvestrii* were identified to optimize teratogenesis tests. Acute toxicity tests were performed with *D. similis*, *C. dubia*, *C. silvestrii* and chronic toxicity tests with *D. similis* and *C. silvestrii*. Eggs were cultivated "in vivo" at temperature of 20°C (*D. similis*) and 25°C (*C. dubia* and *C. silvestrii*), and observed every hour until full development. Subsequently, the conditions of the teratogenesis tests were established and tests were performed with *D. similis*. The EC50,48H of Triclosan

for *D.similis* and *C. silvestrii* in natural reconstituted water with photoperiod was 0.23 and 0.10 mg.L⁻¹, respectively, and 0.13 mg.L⁻¹ for *C. silvestrii*, without photoperiod. The EC50;48H values to *D. similis*, *C. dubia* and *C. silvestrii* for the tests with reconstituted water (Milli-Q) without photoperiod, were: 0.218, 0.088 and 0.083 mg.L⁻¹, respectively. The CEO for *D. similis* was 0.1 mg.L⁻¹ and the IC50 value (malformation) for neonates was 0.057 mg.L⁻¹. The CEO was 0.04 mg.L⁻¹ for *C.silvestrii*, not being verified malformations in neonates. Seven stages were observed in the embryonic development of cladocerans with duration (hours) of 51 (± 5) to *D. similis*, 34 (± 3) to *C. dubia* and 36 (± 2) to *C. silvestrii*. The IC50 value (malformation) in the teratogenesis test was 0.075 mg.L⁻¹ to *D. similis*, which is close to the value obtained for chronic toxicity.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivo específico	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Fármacos no ambiente	4
3.1.1. Triclosan	6
3.1.1.1. Aplicação do Triclosan	7
3.1.1.2. Toxicidade	8
3.2. Ecotoxicologia	9
3.2.1. Ensaio de ecotoxicidade	10
3.2.2. Organismo–teste	10
3.2.2.1. <i>Daphnia similis</i>	10
3.2.2.2 <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	11
3.2.2.4. Ensaio de ecotoxicidade aguda	12
3.2.2.5. Ensaio de ecotoxicidade crônica	12
3.2.2.5.1. Teratogênese	13
3.2.2.5.1.1. Condições para o desenvolvimento de malformações	13
3.3. Novas metodologias de ensaios de ecotoxicidade	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. Ensaio de ecotoxicidade	17
4.1.1. Triclosan: substancia-teste	17
4.1.2. Ensaio de ecotoxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	17
4.1.2.1. Testes preliminares	17
4.1.2.2. Teste definitivo	19
4.1.2.2.1. Água natural reconstituída com e sem fotoperíodo.	19
4.1.2.2.2. Água Mill-Q reconstituída sem fotoperíodo	19
4.1.2.3. Análise estatística	20
4.1.3. Ensaio de ecotoxicidade crônica com <i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	20
4.1.3.1. Testes preliminares	20
4.1.3.2. Testes definitivos	21
4.1.3.3. Análise estatística	22
4.1.3.4. Desenvolvimento embrionário	24
4.1.3.4.1. Determinação dos estágios do desenvolvimento embrionário de <i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	24
4.1.3.4.2. Estabelecimento das condições do ensaio de teratogênese	25
4.1.3.4.3. Análise estatística	25
4.2. Cultivo de organismos aquáticos para utilização em ensaios de ecotoxicidade	25
4.2.1.1. Temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa.	25
4.2.2. Água de cultivo.	25
4.2.2.1. Parâmetros físicos e químicos da água de cultivo.	26
4.2.3. Alimento	27
4.2.4. Cultivo individual de <i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	27
4.1.5. Teste de sensibilidade	27

4.1.5.1. Análise estatística	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Avaliação da toxicidade de Triclosan	29
5.1.1. Ensaio de ecotoxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	29
5.1.1.1. Toxicidade do solvente DMSO	29
5.1.1.2. Toxicidade de Triclocan em ensaios em água natural reconstituída, sem fotoperíodo e com fotoperíodo	29
5.1.1.3. Toxicidade de Triclosan em ensaios com água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo.	31
5.1.2 Ensaio de ecotoxicidade crônica com <i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	33
5.1.2.1. <i>Daphnia similis</i>	34
5.1.2.1.1. Efeito na reprodução	34
5.1.2.1.2. Efeitos na sobrevivência	34
5.1.2.1.3. Teratogênese	36
5.1.2.2. <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	38
5.1.2.2.1. Efeito na reprodução	38
5.1.2.2.2. Efeitos na sobrevivência	39
5.1.2.2.3. Teratogênese	39
5.1.2.3. Influência o do alimento composto na toxicidade de Triclosan para <i>C.silvestrii</i>	39
5.1.2.3.1. Efeito na reprodução.	39
5.1.2.3.2. Efeitos na sobrevivência	41
5.1.2.3.3. Teratogênese	41
5.1.3. Desenvolvimento embrionário de <i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	41
5.1.3.1. Estabelecimento de critérios para ensaios de teratogênese	41
5.1.3.1.1. Determinação dos estágios do desenvolvimento partenogenético <i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	41
5.1.3.1.2. Condições do ensaio de teratogênese	44
5.1.3.1.2.1. Análise estatística	45
5.1.4. Ensaio de teratogênese com <i>Daphnia similis</i>	46
5.1.4.1. Malformação	46
5.1.4.2. Desenvolvimento tardio e mortalidade	47
5.2. Teste de sensibilidade	47
6. DISCUSSÃO	49
6.1. Toxicidade de Triclosan	49
6.1.1. Toxicidade aguda para <i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	49
6.1.1.1. Influência da água em ensaios de ecotoxicidade	50
6.1.1.2. Influência do fotoperíodo	52
6.1.2. Toxicidade crônica para <i>Daphnia similis</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	53
6.1.2.1. Reprodução	53
6.1.2.1.1. <i>Daphnia similis</i>	53
6.1.2.1.2. <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	54
6.1.2.2. Sobrevivência	56
6.1.2.2.1. <i>Daphnia similis</i>	56

6.1.2.2.2. <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	57
6.1.3. Ensaios de teratogênese	57
6.1.3.1. Desenvolvimento embrionário	57
6.1.3.2. Metodologia para ensaios de teratogênese com <i>Daphnia similis</i>	60
6.1.3.3. Ensaios de teratogênese com Triclosan para <i>Daphnia similis</i>	62
6.1.4. Ensaios agudos, crônicos e de teratogênese com Triclosan.	63
6.1.5. Vantagens do ensaio de teratogênese com <i>Daphnia similis</i> .	65
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
8. CONCLUSÕES	68
APÊNDICES	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	200

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Características de Triclosan e DMSO (Dimetilsulfoxido).	17
TABELA 2 - Condições dos testes de toxicidade aguda	20
Tabela 3 - Condições dos ensaios de ecotoxicidade crônica com <i>D. similis</i> e <i>C. silvestrii</i> .	22
TABELA 4 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L-1) para <i>D. similis</i> em água natural reconstituída com fotoperíodo.	29
TABELA 5 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L-1) para <i>C. silvestrii</i> em água natural reconstituída com fotoperíodo.	30
TABELA 6 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L-1) para <i>C. silvestrii</i> em água natural reconstituída sem fotoperíodo.	30
Tabela 7 - Teste t de Student para os resultados dos ensaios de toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L-1) para <i>C. silvestrii</i> em água natural reconstituída sem e com fotoperíodo.	31
TABELA 8 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L-1) para <i>D. similis</i> em água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo.	31
TABELA 9 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L-1) para <i>C. dubia</i> e em água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo.	32
TABELA 10 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L-1) para <i>C. silvestrii</i> em água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo.	32
TABELA 11 - Teste t de Student para os resultados dos ensaios de toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L-1) para <i>C. dubia</i> e <i>C. silvestrii</i> em água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo.	33
TABELA 12 - Teste t de Student para os resultados dos ensaios de toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L-1) para <i>C. silvestrii</i> em água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo e água natural sem fotoperíodo.	33
TABELA 13 - Efeito de Triclosan na reprodução de <i>Daphnia similis</i> .	34
TABELA 14 - Malformações (%) em 3 ninhadas de <i>Daphnia similis</i> nos ensaios de ecotoxicidade crônica com Triclosan.	36
TABELA 15 - Média de malformações nas posturas de <i>Daphnia similis</i> durante o teste crônico na concentração de 0,05 mg.L -1.	37
TABELA 16 - Concentração de Triclosan (mgL-1) que causou malformações (IC50) em <i>Daphnia similis</i> .	37
TABELA 17 - Efeito de Triclosan na reprodução de <i>C. silvestrii</i> nos ensaios com dieta a base de alga e alimento composto.	38
TABELA 18 - Valores de CENO e CEO de Triclosan na reprodução de <i>C. silvestrii</i>	40
TABELA 19 - Efeito do Triclosan na reprodução de <i>C. silvestrii</i>	40
TABELA 20 - Caracterização dos estágios de desenvolvimento embrionário de <i>D. similis</i> , <i>C. dubia</i> e <i>C. silvestrii</i> (n=3).	42
TABELA 21 - Ilustração dos estágios do desenvolvimento partenogenético de <i>D. similis</i> ; <i>C. dubia</i> e <i>C. silvestrii</i> .	43
TABELA 22 - Duração dos estágios do desenvolvimento embrionário de <i>D. similis</i> , <i>C. dubia</i> e <i>C. silvestrii</i> (n=3).	44
TABELA 23 - Condições do ensaio de teratogênese com Cladocera.	45
TABELA 24 - Toxicidade (IC50;51H) de Triclosan para <i>Daphnia similis</i> para malformações.	46

TABELA 25 - Teste t de Student para os resultados dos ensaios de teratogênese (IC50) de Triclosan (mg.L ⁻¹) para <i>D. similis</i> e para os resultados dos ensaios de ecotoxicidade crônica.	47
TABELA 26 - Valor médio de IC50;51H de Triclosan para <i>D. similis</i> (mortalidade).	47
TABELA 27 - Toxicidade de Triclosan para organismos aquáticos.	49
TABELA 28 - Resultado do experimento realizado por BURATINI-MENDES (2002) através de análises de gerações.	51
TABELA 29 - Toxicidade de Triclosan (mg.L ⁻¹) para os diferentes ensaios realizados com <i>Daphnia similis</i> com água natural como água de diluição.	64

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA1 - Rotas de exposição de fármacos no ambiente.	5
FIGURA 2 - Fórmula molecular do Triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol).	7
FIGURA 3 - <i>Daphnia similis</i> . Fêmea ovada. Aumento: 100x.	11
FIGURA 4 - <i>Ceriodaphnia dubia</i> . Fêmea ovada. Aumento: 100x.	11
FIGURA 5 - <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> . Fêmea ovada. Aumento:100x.	12
FIGURA 6 - Ovos e embriões de <i>Xenopus laevis</i>	15
FIGURA 7 - Embrião de <i>Danio rerio</i>	15
FIGURA 8 - Análise Estatística.	23
FIGURA 9 - Modelo digital do terreno da Bacia do Rio Jundiá com destaque do ponto de coleta Ribeirão do Pirai. Salto de Itu, SP.	26
FIGURA 10 - Ponto de coleta, Salto de Itu, SP.	26
FIGURA 11 - Ecotoxicidade crônica (reprodução) de Triclosan (mg.L ⁻¹) para <i>Daphnia similis</i> . (Barras representam o desvio padrão e * CEO).	34
FIGURA 12 - Sobrevivência (%) de <i>D. similis</i> exposta ao Triclosan por 14 dias.	35
FIGURA 13 - Neonatas de <i>D. similis</i> . A: normal; B e C: malformadas; D: embrião prematuro.	36
FIGURA - Ecotoxicidade crônica (reprodução) de Triclosan (mg.L ⁻¹) para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> . (Barras representam o desvio padrão e * CEO).	39
FIGURA 15 - Ecotoxicidade crônica (reprodução) de Triclosan (mg.L ⁻¹) para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> . (Barras representam o desvio padrão e * CEO).	40
FIGURA 16 - Sensibilidade CE(I)50; 48H de <i>D. similis</i> ao Cloreto de Sódio.	48
FIGURA 17 - Sensibilidade CE(I)50; 48H de <i>C. dubia</i> ao Cloreto de Sódio.	48
FIGURA 18 - Sensibilidade CE(I)50; 48H de <i>C. silvestrii</i> ao Cloreto de Sódio	48
FIGURA 19 - Resultado da exposição materna a agentes químicos durante o período de gestação.	62

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, a ocupação demográfica desordenada, o uso insustentável dos recursos naturais e sua degradação, geram um cenário ambiental mundial extremamente problemático.

Diariamente são produzidas e lançadas diversas substâncias no ambiente alterando suas propriedades físicas e químicas, intensificando assim, os fenômenos naturais, como por exemplo, o aquecimento global que nos últimos anos está projetando uma terrível condição para o futuro da humanidade.

Pesquisas do IPCC – “*Intergovernmental Panel on Climate Change*” (2007), demonstram que o aquecimento global está provocando inúmeras alterações no ambiente. Dentre estas, podem ser destacadas as mudanças no clima, na biodiversidade dos ecossistemas, derretimento de geleiras e consequentemente, mudanças no ciclo hidrológico.

Segundo WALDMAN (2002), a água doce em estado livre na natureza perfaz um total de apenas 0,0002% do volume mundial, revelando um pequeno estoque de água potável plenamente acessível aos seres humanos. Segundo Relatório do desenvolvimento Humano (2006), em decorrência do aquecimento global, a disponibilidade de água será reduzida devido o declínio do regime pluviométrico e da elevação da temperatura.

Por volta de 2050, estima-se que mais de quatro bilhões de pessoas (quase a metade da população mundial) estarão vivendo em países com carência crônica de água, ou seja, com quantidade de água insuficiente para a criação de animais, limpeza e para dessedentação (CLARKE & KING, 2005). Esta previsão poderá ser intensificada se os recursos hídricos continuarem sendo contaminados, uma vez que a poluição hídrica pode reduzir o volume de água disponível para as necessidades dos organismos.

Os ecossistemas aquáticos recebem diariamente uma ampla gama de substâncias químicas e, segundo a SMA (2004), a poluição tem sido muito expressiva nos últimos anos. Parte dos efluentes domésticos e industriais produzidos é jogada, sem tratamento, no sistema hidrobiológico provocando contaminação dos corpos hídricos. De acordo com estudos de CLARKE & KING (2005), a contaminação de 1 m³ de água pode deteriorar mais de 10 m³ de água pura.

Efluentes domésticos e industriais que passam por um sistema de tratamento, têm grande parte dos contaminantes retirados antes do despejo nos ecossistemas aquáticos pelas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Porém, existem substâncias como fármacos e produtos de higiene pessoal (PPCPs – “*Pharmaceuticals and Personal Care Products*”) que não são completamente removidos por este sistema, sendo então, lançados nos corpos d’água.

Até pouco tempo, a contaminação dos ecossistemas aquáticos esteve relacionada apenas à contaminantes de origem industrial e a agrícolas. Pouco se conhecia sobre a contaminação por fármacos e produtos de higiene pessoal, devido à dificuldade de detecção destes produtos pelos métodos analíticos disponíveis na época, uma vez que estão presentes na ordem de nano a microgramas (BILA & DEZOTTI, 2003).

Fármacos, juntamente com compostos exógenos e endógenos, são conhecidos como substâncias emergentes com componentes ativos que podem ser disponibilizados em grandes quantidades na sociedade moderna (HALLIONG-SORENSEN *et al*, 1998; SODRE *et al*, 2007). Estas substâncias podem causar toxicidade nos organismos, contudo, os dados são insuficientes, principalmente no que se refere a efeitos subletais e de toxicidade em espécies de ambientes tropicais e subtropicais.

Muitas das regulamentações sobre o descarte de substâncias químicas em ambientes aquáticos estão baseadas em resultados de ensaios ecotoxicológicos com espécies endêmicas da Europa e América do Norte. Poucos dados de toxicidade são representados por espécies de regiões tropicais ou subtropicais. Deste modo, os critérios de qualidade da água para ambientes tropicais são extrapolados de dados de regiões temperadas.

Apesar das espécies tropicais e temperadas, apresentarem sensibilidade similar (KWOK *et al*, 2007) é de extrema importância o conhecimento da resposta de uma espécie tropical a uma substância tóxica, uma vez que os ensaios ecotoxicológicos realizados com espécies temperadas envolvem características ambientais específicas de regiões temperadas, como por exemplo, o pH, a temperatura e dureza da água.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliação dos efeitos letais e subletais de Triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da toxicidade aguda para *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii*;
- Avaliação da toxicidade crônica para *D. similis* e *C. silvestrii*;
- Estabelecer condições de testes para realização de ensaios de teratogênese com Cladocera;
- Classificar os estágios e determinar o período do desenvolvimento embrionário de *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii*;
- Avaliação do efeito teratogênico de Triclosan para *D. similis*

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fármacos no ambiente

A indústria farmacêutica, que comercializa milhões de substâncias com propósitos terapêuticos, tem crescido muito nos últimos tempos, como também, a comercialização de medicamentos de venda ilegal (ARRAIS *et al*, 1997; REIS *et al*, 2007). A facilidade de obtenção de um medicamento em farmácias ou mediante comércio ilegal proporcionou o uso indiscriminado deste produto e sua maior disponibilidade nos corpos hídricos.

Atualmente, a quantidade de fármacos e produtos de higiene pessoal que adentram ao ambiente em cada ano, é estimada como sendo similar ao total de pesticidas utilizados durante o mesmo período (DAUGHTON & TERNES, 1999). De acordo com HIRSCH *et al*, (1999), fármacos com maior probabilidade de serem encontrados no ambiente são provenientes de aplicações na medicina humana e veterinária e da eliminação incompleta durante o tratamento de esgoto, porém pouco se conhece sobre o comportamento destes fármacos e produtos de higiene pessoal no ambiente.

Os fármacos podem atingir os ecossistemas via “*runoff*”, aplicação direta na água pela aquicultura, eliminação imprópria, produtos utilizados na limpeza doméstica e hospitalar, produtos de higiene pessoal e descarte industrial (BILA & DEZOTTI, 2006), como também, através da excreção dos seres vivos (HIRSCH *et al*, 1999).

Uma vez absorvidos e distribuídos para que possam exercer seus efeitos farmacológicos, os fármacos são biotransformados e metabolizados, através de reações enzimáticas que transformam parte do fármaco em um composto diferente daquele original administrado, para que possa ser excretado (ANDRADE, 2002; ZUCCATO *et al*, 2000). Cerca de 50% a 90% de uma dosagem do fármaco é excretada inalteradamente via urinária ou pelas fezes no esgoto doméstico e persiste no meio ambiente (ZUCCATO *et al*, 2000; DEZOTTI & BILA, 2003; JONES *et al*, 2005).

Fármacos quando introduzidos nos ecossistemas aquáticos, podem ser totalmente ou parcialmente biodegradados, fotodegradados ou podem se acumular no sedimento. As vias de exposição dos fármacos são vastas e podem atingir águas superficiais, água de subsolo, sedimento e até Estações de

Tratamento de Água, tornando os seres humanos mais disponíveis a este tipo de contaminação (FIG.1).

FIGURA 1 – Rotas de exposição de fármacos no ambiente (Fonte: HEBERER & FELDMANN, 2002, modificada).

A ocorrência de fármacos no ambiente aquático tem sido investigada em alguns países como Itália, Suíça; Grécia, dentre outros, por autores como ZUCCATO *et al*, (2005); BALMER *et al*, (2004); KOLPIN *et al*, (2002); TERNES *et al*, (1999); HALLING-SORENSES *et al*, (1998); HISCH *et al*, (1999).

De acordo com estes autores, o Ácido Acetilsalicílico, Amoxicilina, Diazepam, Diclofenaco, Ibuprofen, Naproxen; Propranolol, Tetraciclina e Triclosan já foram encontrados nos efluentes das estações de tratamento de esgoto e em água de rios.

No Brasil, pesquisas realizadas por SODRE *et al*, (2007), demonstraram a presença de fármacos como, Paracetamol, Ácido Acetilsalicílico, interferentes endócrinos como, 17 β -estradiol, Progesterona e também cafeína e Bisfenol nas

Águas Superficiais da Região de Campinas-SP em 83% das amostras analisadas. Segundo STUMPF *et al*, (1999), Ácido Clorídrico, Diclofenaco e Naproxen foram detectados em concentrações entre 0,01 a 0,06 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no mais importante rio usado para o abastecimento da população no Rio de Janeiro, o Rio Paraíba do Sul.

Os fármacos no ambiente ou no próprio efluente provocam diversas alterações no ambiente. Dentre as alterações, pode ser destacar a indução da resistência de bactérias.

Em pequenas concentrações, bactérias podem sofrer mudanças no material genético gerando resistência ao fármaco. Sendo assim, a bactéria pode incorporar a informação genética que codifica a resistência e transferi-la a outras bactérias (KÜMMERER, 2004). Este processo resulta em infecções que não podem ser tratadas com os antibióticos conhecidos, provocando sérios danos à saúde humana.

A resistência de bactérias em efluentes foi analisada por DEPIZZOL *et al*, (2005), mediante estudos de resistência aos antimicrobianos para colônias isoladas do efluente bruto hospitalar e doméstico. Como resultado, evidenciou-se a presença de microorganismos resistentes a Eritromicina, Penicilina, Amoxicilina e Tetraciclina em ambos efluentes.

Outro problema associado à disposição de fármacos no ambiente é a interferência na dinâmica de populações aquáticas, como por exemplo, efeitos diretos no ciclo de vida dos organismos. Segundo EPA (2005), fármacos presentes no ambiente podem estar relacionados com os efeitos na reprodução da vida aquática dos organismos. Além disso, os fármacos podem ser resistentes a biodegradação favorecendo assim, sua permanência por longos períodos de tempo no meio ambiente, podendo ser biomagnificado na cadeia alimentar (BILA & DEZOTTI, 2006) podendo atingir os seres humanos.

3.1.1. Triclosan

Triclosan (CAS-NUMBER 3380-34-5) é um composto orgânico amplamente utilizado por indústrias farmacêuticas e têxteis. Também é conhecido como: Irgasan DP 300, Irgacare MP, Lexol 300, Ster-Zac, Cloxifenolum, Irgagard® B 1000 e 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) - fenol (TIXTER *et al.*, 2002).

Triclosan é um composto clorado aromático com representantes funcionais do grupo dos fenóis e apresenta forma de finos cristais brancos. É um produto com de baixa solubilidade em água, necessitando de solventes como Etanol e Dimetilsulfoxido (DMSO) para sua aplicação. A FIG.2 representa a estrutura molecular do Triclosan.

FIGURA 2 – Fórmula molecular do Triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol). Fonte: (<http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=191>, acessado em 10/08/07 modificada).

Estudos demonstram que este produto pode ser fotodegradado, sofrer influências do pH e da matéria orgânica presente na água. De acordo com ARANAMI & READMAN (2007), a presença de matéria orgânica pode interferir na fotodegradação do Triclosan uma vez que reduz a incidência de luz. Em relação ao pH, estudos realizados por TIXTER *et al*, (2002), indicam que a meia vida em pH<6 é 19 vezes maior do que em pH>10. De acordo com ARANAMI & READMAN (2007), a meia vida do Triclosan em água doce e água do mar é aproximadamente 8 e 4 dias respectivamente.

3.1.1.1. Aplicação do Triclosan

A primeira aplicação do Triclosan ocorreu em 1970 através da introdução do produto na formulação de sabão devido suas propriedades antimicrobianas (SCBWMI, 2006).

Desde então, tem sido empregado pelas indústrias de cosméticos, na formulação de xampus, sabonetes, desodorantes, cremes para pele, loções para o corpo, protetores solares e pelas indústrias farmacêuticas como anti-sépticos bucais. De acordo com TORRES *et al*, (2000), o Triclosan é muito aplicado na área da Odontologia por reduzir em até 32% da placa bacteriana quando associado à formulação de um dentifrício.

Além destas aplicações, o produto pode ser utilizado como um aditivo em plásticos, polímeros e roupas esportivas, para dar a estes materiais propriedades antibacterianas (KALYON & OLGUM, 2001). A concentração na qual Triclosan é encontrado nos produtos varia de 0,1 a 0,3% (SABALIUNAS *et al*, 2003).

O Triclosan entra na célula bacteriana por difusão (BHARGAVA, 1996) e sua ação baseia-se na desorganização da membrana celular e na inibição de enzimas da membrana (TORRES *et al*, 2000).

Segundo REGOS & HITZ (1974), a ação microbiana do Triclosan é direcionada ao RNA e a síntese de proteína em bactéria, não sendo direcionada a ao DNA.

Este composto é muito efetivo contra bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Salmonella sp*, porém menos efetivo contra estreptococos e *Propionibacterium acnes* (BHARGAVA, 1996).

3.1.1.2. Toxicidade

A crescente aplicação do Triclosan em produtos farmacêuticos e em produtos de higiene pessoal de uso diário pela sociedade, proporcionou uma maior disposição nos ecossistemas aquáticos como também maior exposição aos organismos.

Um estudo realizado por ADOLFSSON-ERIC *et al*, (2002), demonstrou que Triclosan pode ser acumulado no organismo dos seres humanos. O autor detectou a presença do produto em 3 de 5 amostras de leite materno estudadas, na concentração de 60, 130 e 300 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ por peso de lipídio. ALLMYR *et al*, (2006), também observou Triclosan no plasma e no leite de mulheres e sugeriu a aplicação de produtos de higiene pessoal, como cremes, a maior fonte de exposição de mulheres. Apesar dos estudos serem restritos nesta área, acredita-se que a excreção do Triclosan através do leite materno pode resultar em efeitos diretos na criança amamentada.

Além destes resultados, o autor observou níveis elevados de Triclosan na bile de peixes que foram mantidos em amostras de água recebidas de uma estação de tratamento de esgoto.

Estações de Tratamento de Esgoto que empregam mecanismos mais sofisticados como clarificação, tratamento biológico ou nitrificação, floculação e filtração, removem 94% do Triclosan, porém Estação de Tratamento de Esgoto de

portes menores removem 79% do produto por tratamento biológico (SINGER *et al*, 2002; SAMSOE-PETERSEN *et al*, 2003).

Independente do tratamento utilizado em Estações de Tratamento de Esgoto, parte do Triclosan não removido entra nos ecossistemas aquáticos e permanece disponível na coluna d'água ou no sedimento.

Uma vez liberado no meio ambiente o Triclosan pode ser fotodegradado, biodegradado e transformado em componentes potencialmente tóxicos como o metil-triclosan, dioxinas, clorofórmios e outros clorinados (SCBWMI, 2006).

Estudos demonstram que Triclosan já foi encontrado no sedimento na faixa de 0,001 – 0,035 mg.Kg⁻¹ (JONES 1998 *apud* SINGER *et al*, 2002), em rios entre 0,00005 – 0,0023 mg.L⁻¹ (MCMURRY *et al*, 1998) e em estações de tratamento de esgoto na concentração de 0,00007 – 14mg.L⁻¹ (ORVOS *et al*, 2002).

Embora seja encontrado em baixas concentrações no ambiente, Triclosan pode causar toxicidade aos organismos. A toxicidade aos organismos aquáticos vem sendo conhecida nos últimos anos mediante estudos de ecotoxicidade realizados com algas, cladóceros e peixes por autores como ADOLFSSON-ERICI *et al* (2002), ORVOS *et al*, (2002) e PUSCEDDU *et al*, (2007).

3.2. Ecotoxicologia

A Ecotoxicologia é um ramo da Toxicologia que estuda a relação dos efeitos tóxicos das substâncias químicas presentes no ambiente, sobre os organismos vivos dos ecossistemas, especialmente em populações e comunidades de um ecossistema, incluindo os caminhos da transferência desses agentes e sua interação com o ambiente (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

A principal ferramenta da Ecotoxicologia para avaliar os efeitos tóxicos de uma substância química e realizar o biomonitoramento de um ecossistema aquático, é mediante a realização de ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos vivos, ou organismos-teste como são denominados. Segundo RAYA-RODRIGUEZ (2000), os organismos-testes podem fornecer indicações sobre as condições de um ecossistema frente à presença de impacto ambiental.

3.2.1. Ensaios de Ecotoxicidade

Os ensaios ecotoxicológicos são caracterizados pela exposição de organismos aquáticos, a várias concentrações de um efluente ou de uma substância química em um determinado período de seu ciclo de vida.

Através destes ensaios, podem-se conhecer os efeitos que as substâncias químicas, que adentram os corpos hídricos, podem causar aos organismos aquáticos, tais como, efeitos letais, fisiológicos, desordens comportamentais, mutagênicos e teratogênicos.

3.2.2. Organismo - Teste

Muitos organismos aquáticos podem ser utilizados como indicadores de problemas ambientais, porém, uma espécie ou grupo de organismos somente é adotado como organismo-teste se apresentarem algumas peculiaridades.

De acordo com EPA (2002), os organismos-testes devem ser de fácil coleta e manutenção no laboratório e devem ser disponíveis ao longo do ano. Além disso, é de extrema importância o conhecimento do ciclo de vida e da sensibilidade destes organismos às substâncias de referência, como também a escolha de organismos autóctones.

Os cladóceros são largamente utilizados como organismos-testes em ensaios de ecotoxicidade devido à rápida reprodução assexuada e extrema sensibilidade aos tóxicos no ambiente (SHURIN & DODSON, 1997). As espécies de Cladocera mais utilizadas são as exóticas como, *Daphnia similis*, *Daphnia magna* e cosmopolita, *Ceriodaphnia dubia*.

A utilização de espécies nativas vem se tornando uma prática em diversos Centros de Pesquisa no Brasil. Autores como FONSECA (1991; 1997), BOHRER (1995), MELETTI (2003), LAMEIRA (2003), SILVA (2005), JACONETTI (2005), realizaram estudos para a introdução de espécies nativas em ensaios ecotoxicológicos com relevância ecológica em ecossistemas tropicais e subtropicais.

3.2.2.1. *Daphnia similis*

Daphnia similis foi implantada em testes de toxicidade aguda pela CETESB devido a melhor adaptação desta espécie as águas de baixa dureza, características das águas superficiais do Estado de São Paulo (ARAGÃO *et al*,

2003). A ocorrência de *D. similis* em águas brasileiras, mesmo que ocasional, pode ser explicada pela introdução acidental nos ecossistemas aquáticos. A distribuição dessa espécie restringe-se ao continente americano (HETERS & BERNADI, 1987).

Pertencente a Família Daphnidae, Ordem Cladocera, *D. similis* (FIG.3) é uma espécie planctônica filtradora que apresenta comprimento máximo de 2,74mm (LAMEIRA, 2004).

FIGURA 3 – *Daphnia similis*. Fêmea ovada. Aumento: 100x.

3.2.2.2. *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*

C. dubia (FIG.4) é uma espécie cosmopolita que apresenta comprimento máximo de 0,96mm (JACONETTI, 2005). Ocorre em todos os tipos de água continentais, sendo freqüente na região litorânea de lagoas (ARMENGOL, 1978).

FIGURA 4 – *Ceriodaphnia dubia*. Fêmea ovada. Aumento 100x.

C. silvestrii (FIG.5) foi padronizada como organismo-teste em ensaios ecotoxicológicos recentemente pela NBR ABNT (2005). É uma espécie de cladócero pequena com aproximadamente 1,06mm de comprimento, segundo JACONETTI (2005).

Apresenta ampla distribuição, sendo sua ocorrência relatada na maioria dos reservatórios brasileiros, como por exemplo, Barra Bonita, Bairi, Ibitinga, Xavantes, Salto Grande e Broa (MATSUMURA TUINDISI *et al*, 1990; GÜNTZEL, 2000; ROCHA, 2000; SAMPAIO, 2002; NOGUEIRA *et al*, 2003).

FIGURA 5 – *Ceriodaphnia silvestrii*. Fêmea ovada. Aumento 100x.

3.2.2.4. Ensaio de ecotoxicidade aguda

Os ensaios de ecotoxicidade aguda são caracterizados por abrangerem um curto período do ciclo de vida dos organismos-testes, sendo então um período variável para cada espécie.

O efeito agudo observado é a letalidade dos organismos ou a imobilidade. A partir destes testes se estabelece a CL50 (concentração letal), e CE(I)50 (concentração efetiva), ou seja, a concentração que causa a imobilidade a 50% dos organismos em teste, sendo essa a resposta considerada mais significativa para ser extrapolada em uma população (ABNT, 2004).

Estes testes avaliam os efeitos quantitativos, não evidenciando efeitos que poderiam ocorrer em tempos mais prolongados de exposição, tais como o de bioacumulação, efeitos sobre a reprodução e crescimento.

Os ensaios de toxicidade aguda são importantes para fornecer informações fundamentais e rápidas para o desenvolvimento e adoção de critérios para a melhoria da qualidade ambiental (FONSECA, 1991).

3.2.2.5. Ensaio de ecotoxicidade crônica

Os ensaios de ecotoxicidade crônica geralmente, compreendem um maior período de realização, que varia de acordo com o ciclo de vida do organismo-teste.

Nestes ensaios determina-se o CENO, ou seja, a concentração do agente tóxico que não causa efeito observado no ciclo de vida do organismo testado e o CEO, concentração do agente tóxico que causa efeito no ciclo de vida dos organismos (ABNT, 2005).

Os ensaios de ecotoxicidade crônica possuem a finalidade de estudar os efeitos subletais, como por exemplo, efeitos no crescimento e na reprodução de diferentes concentrações de substâncias tóxicas.

Apesar de serem importantes ferramentas para a detecção de efeitos subletais no ciclo de vida dos organismos, os ensaios de ecotoxicidade crônica não evidenciam facilmente a viabilidade dos filhotes produzidos em uma postura de um organismo-teste. Portanto, efeitos teratogênicos, malformações em filhotes gerados pela exposição de mães a uma substância química durante o período de gestação, são dificilmente registrados.

3.2.2.5.1. Teratogênese

Quando inserido no ecossistema aquático, um contaminante poderá ser metabolizado e excretado pelos organismos aquáticos não induzindo efeitos tóxicos, porém, dependendo da sua concentração como também do período de exposição, poderá gerar efeitos subletais ou letais aos organismos aquáticos.

Segundo FREITAS *et al*, (2001) e NEWMANN & UNGER (2003), alguns contaminantes podem causar impactos no desenvolvimento de fetos ou embriões, através de alterações no DNA, quebra dos cromossomos e influência na mitose, causando morte, malformações anatômicas, deficiências bioquímicas ou funcionais e crescimento tardio. Estes efeitos subletais são denominados efeitos teratogênicos.

A teratogênese pode ser considerada como um efeito colateral grave, caracterizado pela ação da droga sobre o feto, podendo provocar alterações morfológicas, funcionais e emocionais no mesmo (ANDRADE, 2002).

Quaisquer substâncias, organismos, agentes físicos, estado de deficiência que, estando presentes durante a vida embrionária ou fetal, produzam alterações na estrutura ou função da descendência, são conhecidos como agentes teratogênicos (SANSEVERINO *et al*, 2005).

3.2.2.5.1.1. Condições para o desenvolvimento de malformações

Segundo SANSEVERINO *et al*, (2005), as manifestações do desenvolvimento anormal aumentam à medida que se incrementa a dose do agente tóxico, variando desde nenhum efeito, passando pelos danos funcionais e malformações até a morte do embrião.

A interferência no desenvolvimento embrionário pela ação do teratógeno depende de diversos fatores, dentre eles destacam-se, a concentração e mecanismo específico do teratógeno e o período de exposição do embrião SANSEVERINO *et al*, (2005).

Existem períodos no desenvolvimento embrionário em que as malformações podem ocorrer com maior facilidade. Acredita-se que os estágios mais suscetíveis a teratogênese compreendem os de diferenciação celular, uma vez que, prematuros efeitos em desenvolvimento tendem a ser mais deletérios (BANTLE, 1995).

Considerando a complexidade e a dificuldade de detecção dos efeitos teratogênicos mediante ensaios ecotoxicológicos crônicos convencionais, pesquisadores desenvolveram metodologias mais refinadas de ensaios ecotoxicológicos para detecção destes efeitos.

3.3. Novas metodologias de ensaios de Ecotoxicidade

Para a detecção de efeitos teratogênicos em organismos aquáticos algumas metodologias de testes com a exposição direta de embriões foram desenvolvidas.

Testes com embriões são designados para detectar a influência de agentes xenobióticos no desenvolvimento embrionário de organismos, por isso são importantes ferramentas de ecotoxicidade, visto que resultam em análises cada vez mais refinadas e rápidas para determinação de efeitos subletais. Além disso, estudos demonstram que os embriões apresentam uma maior sensibilidade para alguns tóxicos que estágios tardios.

Segundo TIETGE *et al*, (2000), o desenvolvimento de anormalidade em anfíbios tem sido largamente observado nos últimos anos. As anormalidades em anfíbios são observadas através do teste FETAX ("*Frog Embryo Teratoenesis Assay-Xenopus*") pela exposição de embriões (FIG.6).

FIGURA 6 - Ovos e Embriões de *Xenopus laevis*

Este teste consiste em expor embriões de *Xenopus sp* a diferentes concentrações de substâncias químicas ou amostras ambientais, a fim de se estabelecer o potencial de indução de malformações destas amostras (ASTM, 1991).

De acordo com HOKE & ANKLEY (2005), estes testes servem como uma alternativa para modelos de testes de teratogênese com mamíferos, uma vez que anfíbios são facilmente manipulados em laboratório, seu desenvolvimento embrionário é muito conhecido e as primeiras 96 horas do desenvolvimento embrionário em *Xenopus laevis* são semelhantes à maioria dos processos de organogênese humana (ASTM, 1991; FETAX 2000).

Outro organismo muito empregado em testes de teratogênese para análise de efeitos de várias substâncias químicas é *Danio rerio*. Este organismo é muito utilizado, devido à transparência de seus embriões (FIG.7), fácil identificação craniofacial, cardíaca e deformidades esqueléticas (CHENG *et al*, 2000).

FIGURA 7 - Embrião de *Danio rerio*.

Os efeitos observados nestes testes de teratogênese são fundamentalmente: mortalidade, desenvolvimento tardio e malformações.

Para monitorar a qualidade do sedimento em ambientes aquáticos, os quironomídeos são largamente utilizados (MEREGALLI *et al*, 2001). Segundo HAMILTON & SAETHER (1971), a deformidade observada nestes organismos

pode ser induzida por contaminantes presentes no sedimento no qual as larvas vivem. Nestes testes, larvas são expostas aos sedimentos e deformidades no aparato bucal são observadas.

O uso de cladóceros em testes de teratogênese é restrito e pouco se conhece sobre seu desenvolvimento embrionário. Autores como FOX (1948), SOBRAL *et al*, (2001) e KAST- HUTCHESON *et al*, (2001), estudaram o desenvolvimento embrionário de *Daphnia magna* e classificaram seus estágios. A partir desta classificação foram realizados testes de teratogênese com fungicidas (OTHA *et al*, (1998); KAST- HUTCHESON *et al*, (2001), anilina (ABE *et al*, 2001), organoclorados, pesticidas, metais, surfactantes (SOBRAL *et al*, 2001) e também com hormônios (ZHANG *et al*, 2003)).

Como pode ser observada, muita atenção é dada aos efeitos teratogênicos causados por agrotóxicos e metais pesados, sendo os dados presentes na literatura para fármacos muito escassos.

Existe uma grande necessidade do desenvolvimento de estudos ecotoxicológicos voltados para fármacos principalmente no que se refere aos efeitos subletais para espécies tropicais e subtropicais, como por exemplo, os efeitos teratogênicos.

Alem disso, uma avaliação de risco ambiental devido à contaminação por fármacos tem sido requerida em vários países (BILA & DEZOTTI & 2003) intensificando assim, a necessidade de estudos voltados para esta área.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Ensaios de ecotoxicidade

4.1.1. Triclosan: Substancia-teste

Sendo o Triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-fenol), uma substância com baixa solubilidade em água ($0,017\text{g.L}^{-1}$), foi utilizado um solvente, Dimetilsulfoxido (DMSO) para sua aplicação nos ensaios ecotoxicológicos.

Triclosan e DMSO foram adquiridos da MERCK S.A. sendo seu fabricante CALBIOCHEM. As demais informações estão na TAB.1.

TABELA 1 – Características de Triclosan.

CARACTERÍSTICAS	TRICLOSAN	DMSO
Nº do produto	647950	-
lote	B73296	-
pureza	> 97%	> 99%
	- não consta	

4.1.2. Ensaios de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

4.1.2.1. Testes preliminares

Os testes preliminares apresentaram como objetivo, determinar da faixa de concentração do produto a ser utilizada no teste agudo definitivo. Realizou-se um teste preliminar para *D. similis* e um teste para *C. silvestrii*. Resultados obtidos para *C. silvestrii* foram extrapolados para *C. dubia*, considerando que ambas apresentam sensibilidade e ciclo de vida semelhantes segundo JACONETTI (2005).

As soluções teste foram preparadas a partir de uma solução estoque de 10.000 mg.L^{-1} de Triclosan. Por se tratar de uma substância insolúvel em água a solução estoque de Triclosan foi diluída em DMSO (Dimetilsofoxide). Pesou-se 0,1 mg de Triclosan e diluiu-se em 10 mL de DMSO. A solução-estoque foi mantida a -10°C e descongelada no momento do teste. As concentrações adotadas para *D. similis* e *C. silvestrii* foram: 0,031; 0,061; 0,123; 0,25 e 0,50 mg.L^{-1} . Estas concentrações foram escolhidas com base nos ensaios de ecotoxicidade aguda de Triclosan com protozoários, realizado no Laboratório de Ecotoxicologia IPEN.

Neonatas entre 6 a 24 horas foram selecionadas de cultivos individuais a partir da 3ª postura para exposição às soluções-teste. Como água de diluição, utilizou-se água reconstituída produzida pelo sistema Milli-Q, por meio da desionização da água previamente filtrada por osmose reversa. A dureza da água de diluição foi ajustada entre 40-48 mg.L⁻¹ de CaCO₃, e submetida à aeração por no mínimo 24 horas.

Os testes foram realizados em tubos de ensaio aferidos para 10 ml. Foram colocados 8 ml da solução-teste, nas diferentes concentrações, cinco organismos, e completou-se o volume com a solução-teste. Para cada concentração foram preparadas quatro réplicas.

Para cada teste preparou-se um controle com 10 ml de água de diluição, com quatro réplicas contendo cada uma, cinco organismos. O teste compreendeu o período de 48 horas. Durante o período do teste os organismos não foram alimentados.

Os ensaios foram mantidos a 20°C (±2) para *D. similis* e 25°C (±2) para *C. dubia* e *C. silvestrii*. O teste foi mantido ao abrigo da luz, uma vez que a luz pode degradar o produto.

O efeito observado para os organismos foi imobilidade. Os organismos que não apresentaram movimentação em um intervalo de 15 segundos foram considerados imóveis (ABNT 2004; EPA, 2002).

Foram observados os seguintes requisitos durante os testes para considerá-los válidos: mortalidade inferior a 10% dos organismos expostos no controle e o teor de oxigênio superior a 2 mg L⁻¹.

Ao final do teste foi estabelecida a concentração que causou imobilidade a 100% dos organismos e a concentração mais elevada na qual não se observou nenhuma imobilidade. A partir dos resultados dos testes preliminares foram abertas 5 concentrações em séries logarítmicas da substância a ser testada a partir do cálculo:

$$n - 1 \sqrt{\frac{a_n}{a_o}}$$

Onde:

n = número de concentrações

a_n = concentração final

a_o = concentração inicial

As concentrações utilizadas para os testes definitivos com *D. similis* e *C. silvestrii* foram 0,062; 0,104; 0,175; 0,290; 0,490 mg.L⁻¹ e 0,031; 0,052; 0,087; 0,147; 0,250 mg.L⁻¹, respectivamente.

4.1.2.2. Teste definitivo

Foram realizados testes de toxicidade aguda em condições diferenciadas.

4.1.2.2.1. Água natural reconstituída com e sem fotoperíodo.

De acordo com a EPA (2002), a água de superfície ou água reconstituída são aceitáveis como água de diluição para testes com substâncias químicas, se os dafnídeos sobreviverem na duração do cultivo, aclimação e no período do teste, sem mostrar sinais de estresse.

Com a finalidade de estudar a toxicidade de Triclosan e proporcionar maior relevância nos resultados para ambientes tropicais e subtropicais, foram realizados ensaios de ecotoxicidade aguda com *C. silvestrii* com água natural reconstituída, proveniente de Salto de Itu, como água de diluição.

A água natural de Salto de Itu é também utilizada pela CETESB, no cultivo de organismos aquáticos, portanto é uma água que apresenta seus parâmetros monitorados por este órgão.

Sabendo que o Triclosan é um produto que degrada com a luz, realizaram-se três ensaios de ecotoxicidade aguda com *C. silvestrii* com e sem fotoperíodo, a fim de se conhecer a influência da luz na toxicidade do produto. Também foram realizados três testes de toxicidade aguda com *D. similis* com fotoperíodo a fim de se aproximar as condições do teste com as condições naturais.

4.1.2.2.2. Água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo.

Estes ensaios apresentaram como objetivo, avaliar a toxicidade do Triclosan para *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii* sem a interferência de fatores externos, como por exemplo, matéria orgânica presente na água e luz (OECD, 2006). Foram realizados três ensaios para cada espécie.

A TAB.2 apresenta um esquema do tratamento diferenciado nos ensaios de ecotoxicidade aguda.

TABELA 2 – Condições dos testes de toxicidade aguda

ÁGUA DE DILUIÇÃO	FOTOPERÍODO	ORGANISMO-TESTE	OBJETIVOS
Natural reconstituída	Sem e com	<i>C.silvestrii</i>	Maior relevância nos resultados para ambientes tropicais e subtropicais.
	Com	<i>D. similis</i>	Aproximar as condições de ambientes naturais.
Milli-Q reconstituída	Sem	<i>D. similis</i> ; <i>C. dubia</i> ; <i>C.silvestrii</i>	Toxicidade do produto sem interferentes externos.

A metodologia do teste foi a mesma adotada para os testes preliminares de acordo.

Testes agudos foram realizados com DMSO para verificar a toxicidade do solvente para os organismos aquáticos. As concentrações utilizadas foram equivalentes às utilizadas para solubilizar o Triclosan nos testes agudos. Os organismos-testes utilizados foram *D.similis* e *C. silvestrii*.

4.1.2.3. Análise estatística

A CE(I)50;48H foi determinada para cada teste através do método Spearman-Kärber (HAMILTON *et al*, 1977) e a influência da água e do fotoperíodo foi analisada segundo *t – Student* através do TOXTAT 3.5.

4.1.3. Ensaio de ecotoxicidade crônica com *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*

4.1.3.1. Testes preliminares

As concentrações adotadas para *C. silvestrii* e *D. similis* nos testes preliminares crônicos foram baseadas na CE(I)50;48H obtida nos testes de toxicidade aguda.

Para *C. silvestrii* as concentrações iniciais foram: 0,005; 0,010; 0,020; 0,040; 0,080.mg.L⁻¹. A partir dos resultados do primeiro teste foram estabelecidas as seguintes concentrações definitivas 0,010; 0,020; 0,040; 0,080 e 0,16mg.L⁻¹.

As concentrações preliminares adotadas para *D. similis* foram: 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; e 0,025 mg.L⁻¹. Tais concentrações foram mantidas nos testes definitivos.

4.1.3.2. Testes definitivos

Os ensaios de ecotoxicidade crônica com *D. similis* e *C.silvestrii* foram realizados de acordo com as normas EPA (2002) e ABNT (2004).

Neonatas entre 6-24 horas de idade obtidas a partir da terceira postura de fêmeas cultivadas individualmente foram expostas às soluções-testes. O alimento oferecido para *D. similis* e *C.silvestrii* foi à base de alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*) na concentração de 1×10^5 céls.mL⁻¹. Para *C. silvestrii* foi oferecido também alimento composto.

De acordo com TIXER *et al*, (2002) e SINGER *et al*, (2002), Triclosan pode ser degradado pela ação de bactérias. De modo a observar a toxicidade crônica do Triclosan sem este interferente biológico realizou-se três teste de toxicidade crônica com alimentação apenas a base de alga para *C. silvestrii*. As demais condições destes testes foram as mesmas adotadas nos testes com a dieta a base de alga e alimento composto.

Diariamente os neonatas produzidos por cada fêmea foram contados e observados (oito neonatas observados para *C.silvestrii* e quinze neonatas para *D. similis*) com auxílio de um microscópio óptico. As malformações, desenvolvimento incompleto e mortalidade das neonatas foram registradas.

Medidas dos parâmetros iniciais e finais como pH, condutividade e oxigênio dissolvido, foram realizadas a cada troca de soluções-teste.

A duração do teste crônico e a fecundidade média por fêmea para *C. silvestrii* e *D. similis* foram baseadas nos estudos dos parâmetros biológicos das espécies nas mesmas condições de cultivo e alimentação realizadas por JACONETTI (2005) e LAMEIRA (2005), respectivamente. As condições dos ensaios com *C. silvestrii* e *D. similis* estão na TAB.3.

Para um teste de toxicidade crônica ser considerado válido as condições de teste devem ser constantes durante o período de exposição, a mortalidade dos organismos adultos não deve exceder 20% e a concentração de oxigênio dissolvido, medido nas soluções-teste, for maior ou igual a 5,0 mg.L⁻¹ (ABNT, 2005).

TABELA 3 – Condições dos ensaios de ecotoxicidade crônica com *D. similis* e *C. silvestrii*.

PARÂMETROS	<i>D. similis</i>	<i>C. silvestrii</i>
Tipo de teste	Semi-estático	Semi-estático
Diluições	Controle e 5 concentrações	Controle e 5 concentrações
Substância-teste	Triclosan	Triclosan
Temperatura	20°C (±2)	25°C (±2)
Fotoperíodo	16/08 horas/luz	16/08 horas/luz
Câmara-teste	Béqueres de 30 mL	Béqueres de 30 mL
Volume da solução-teste	25 mL	25 mL
Nº de neonatas/câmara	1	1
Nº de réplicas/tratamento	10	10
Troca de soluções	Diária	Diária
Alimentação	Algas (1x10 ⁵ céls/mL)	Algas (1x10 ⁵ céls/mL) e alimento composto
Água de diluição	Natural (Salto Itu)	Natural (Salto Itu)
Duração do teste	14 dias, até 60% das fêmeas do controle apresentarem 3 posturas e média de neonatas por fêmea ≥23	7 dias, até 60% das fêmeas do controle apresentarem 3 posturas e média de neonatas por fêmea ≥15
Efeito observado	Reprodução e sobrevivência de fêmeas adultas, teratogênese (observação de 15 neonatas/concentração) e mortalidade das neonatas	Reprodução e sobrevivência de fêmeas adultas, teratogênese (observação de 8 neonatas/concentração) e mortalidade das neonatas

4.1.3.3. Análise estatística

O CENO (Concentração de Efeitos Não observados) e o CEO (Concentração de Efeitos Observados) na reprodução foram determinados, conforme esquema adotado pela EPA (2002), (FIG.8).

Para observar a ocorrência de diferente sensibilidade entre as posturas dos organismos, quanto a indução de malformações, os dados dos 3 testes (n = 3: dados compostos pelo número de malformações existentes na 1ª postura dos três testes, o mesmo para a 2ª e 3ª postura) foram submetidos ao teste de comparações múltiplas de Tukey.

Como não foram encontradas diferenças significativa entre as malformações nas neonatas em cada postura, a interpolação linear (IC50) de cada teste crônico (considerando as 3 posturas) foi calculada.

Se fosse observada, diferença significativa entre o número de malformações entre as posturas, o cálculo do IC50 seria aplicado na postura mais sensível.

A concentração que causou mortalidade nas neonatas foi calculada pela interpolação linear (IC50) aplicada no resultado final das 3 posturas de cada teste.

FIGURA 8 – Análise Estatística (EPA, 2002).

4.1.3.4. Desenvolvimento embrionário

4.1.3.4.1. Determinação dos estágios do desenvolvimento embrionário de *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

Segundo BAIRD *et al*, (1991), após a passagem do ovo para a câmara de incubação, o desenvolvimento do ovo independe dos organismos maternos uma vez que não existe um tecido de nutrição para estes ovos. Diante desta condição, o período e os estágios do desenvolvimento embrionário podem ser determinados mediante culturas “*in vivo*” sem a proteção da câmara de incubação.

De acordo com BOTTRELL (1975), o período embrionário é definido como o período da deposição do ovo até sua liberação. Porém, autores como ANDERSON & JENKINS (1942), consideram este período como a completa formação do embrião, excluindo o tempo em que as neonatas totalmente formadas ficam retidas na câmara de incubação.

Neste trabalho optou-se pela definição de ANDERSON & JENKINS (1942), pois o estudo do desenvolvimento foi realizado fora da câmara de incubação, portanto o período no qual as neonatas ficam retidas na câmara de incubação não poderá ser evidenciado.

Para o cultivo de ovos partenogenéticos, fêmeas cultivadas individualmente foram observadas em intervalos de 30 minutos para registrar o momento exato da passagem dos ovos dos ovários para câmara de incubação e assim considerar o tempo inicial do desenvolvimento.

Ovos de fêmeas a partir da 3ª postura de *D. similis*, *C. dubia*, *C. silvestrii* foram coletados após 4 horas do tempo inicial, mediante uma pressão leve da região superior dos organismos, lavados 2 vezes com água de cultivo e transferidos para um vidro de relógio com 2 ml de água de cultivo (SOBRAL 2001). A remoção dos ovos foi realizada sob auxílio da lupa (WILD – HEERBRUGG) com o aumento de 12 vezes.

Foram observados 10 ovos para o estudo de cada estágio, resultando em um total de 70 ovos observados. Os experimentos foram mantidos a temperatura de 20°C (±2) para *D. similis* de 25°C (±2) para *C. dubia* e *C. silvestrii* e 16 horas-luz para todas as espécies.

A observação foi realizada a cada hora sob microscópio estereoscópico da marca Leica modelo DMLS, com aumento de 40 vezes. As fotografias foram tiradas com a câmera fotográfica Sony Cyber shot DS W-100, 8.1 Mega pixels.

4.1.3.4.2. Estabelecimento das condições do ensaio de teratogênese

A partir do cultivo dos ovos partenogenéticos e definição dos estágios, um protocolo de ensaios de teratogênese foi desenvolvido. Além deste parâmetro, utilizou-se como base ABNT (2004; 2005), EPA (2002) e as metodologias adotadas por OTHA *et al*, (1998), KAST-HUTCHESON *et al*, (2001), SOBRAL *et al*, (2001), ABE *et al*, (2001), ZHANG *et al*, (2003), que desenvolveram testes com embriões de *D. magna* a 20°C com exceção de OTHA *et al*, (1998) que desenvolveu a temperatura de 23°C.

4.1.3.4.3. Análises estatísticas

A concentração que causou efeito teratogênico, desenvolvimento tardio e mortalidade nas neonatas foi calculada através da interpolação linear IC50.

4.2. Cultivo de organismos aquáticos para utilização em testes de toxicidade

A metodologia adotada seguiu os procedimentos descritos nas normas ABNT (2004; 2005) e EPA (2002), modificado para as espécies selecionadas.

4.2.1. Temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa.

Os cultivos populacionais foram mantidos em incubadoras FANEM, modelo 347 CDG a 20°C (± 2) para *D. similis* e 25°C (± 2) para *C. dubia* e *C. silvestrii*, com fotoperíodo 16 horas-luz e intensidade luminosa de 2000 lux.

4.2.2. Água de cultivo.

A água utilizada para o cultivo dos organismos foi coletada periodicamente (a cada 15 dias) em Salto de Itu, SP, no Reservatório de Ribeirão do Piraí (FIG.9 e FIG.10). A água foi armazenada em galões de 20 litros e mantida ao abrigo da luz.

Antes da utilização, a água foi filtrada em rede de malha 68 μ m para a eliminação de detritos e organismos zooplanctônicos. A qualidade da água foi monitorada em cada lote coletado através de testes de viabilidade e os parâmetros de temperatura, oxigênio, pH e condutividade e dureza foram medidos inicialmente.

FIGURA 9 – Modelo digital do terreno da Bacia do Rio Jundiá com destaque do ponto de coleta Ribeirão do Piraí. Salto de Itupeva, SP. Fonte: NEVES & PEREIRA (2005).

FIGURA 10 – Ponto de coleta Salto de Itupeva, SP.

4.2.2.1. Parâmetros físicos e químicos da água de cultivo.

Os cultivos foram realizados com o ajuste dos valores de dureza total da água entre 40-48 mg.L^{-1} de CaCO_3 e submetidos à aeração por no mínimo 24 horas, para a completa solubilização e manutenção da saturação de oxigênio dissolvido.

A dureza foi ajustada através da solução de Sulfato de Cálcio (1.500 mg.L^{-1}) e solução de Cloreto de Potássio (200 mg.L^{-1}), Sulfato de Magnésio (6.100 mg.L^{-1}) e Bicarbonato de Sódio (4.800 mg.L^{-1}). Antes da utilização da água, o pH

foi ajustado para 7,0 com soluções de Ácido Clorídrico (HCl 0,1M) ou Hidróxido de Sódio (NaOH 0,1M).

A água dos cultivos foi renovada três vezes por semana e os parâmetros iniciais como: temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, condutividade e pH foram medidas a cada troca de água. Os parâmetros finais foram medidos uma vez por semana.

4.2.3. Alimento

Como alimento, utilizou-se a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Chloroficeae*), na concentração de 1×10^5 células.mL⁻¹. A alga foi cultivada em meio nutriente L.C. Oligo sob aeração e iluminação constantes, intensidade luminosa de 1000 lux, temperatura de 24°C (± 2), durante sete dias, quando atingiu a fase exponencial de crescimento.

Além da alga, utilizou-se ração de peixe fermentada (Tetramim®) e levedura ABNT (2005) para *C. silvestrii* e *C. dubia*.

4.2.4. Cultivo individual de *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii*

As espécies foram cultivadas individualmente em béqueres aferidos para 30 ml com 25 ml de água natural e alimento diário. As demais condições de cultivos foram descritas no item 4.2.

4.2.5. Teste de sensibilidade

Os testes de sensibilidade apresentam como objetivo verificar a qualidade dos organismos, por isso são considerados como pré-requisito para realização de ensaios ecotoxicológicos.

A avaliação da sensibilidade foi realizada mensalmente mediante ensaios com *D. similis*, *C. silvestrii* e *C. dubia*. com Cloreto de Sódio como substância de referência. A metodologia de ensaios foi baseada nas normas EPA (2002) e ABNT (2004; 2005).

Neonatas entre 6 a 24 horas foram selecionadas de cultivos individuais a partir da 3ª postura para exposição às soluções-teste.

Como água de diluição, utilizou-se água reconstituída produzida pelo sistema Milli-Q, por meio da desionização da água previamente filtrada por

osmose reversa. A dureza da água de diluição foi ajustada entre 40-48 mg.L⁻¹ de CaCO₃, e submetida à aeração por no mínimo 24 horas.

A solução-estoque de 10.000 mg.L⁻¹ de NaCl foi preparada no momento da realização dos testes e por meio desta, as soluções-testes de: 500; 1.000; 2.000; 4.000; 8.000 mg.L⁻¹ para *D.similis* e 1.000; 1.300; 1.600; 1.900; 2.200 mg.L⁻¹ para *C. dubia* e *C. silvestrii*.

Os testes foram realizados em tubos de ensaio aferidos para 10 ml. Foram colocados 8 ml da solução-teste, cinco organismos, e completou-se o volume com a solução-teste. Para cada concentração foram preparadas quatro réplicas.

Para cada teste preparou-se um controle com 10 ml de água de diluição, com quatro réplicas contendo cada uma 5 organismos. O teste compreendeu o período de 48 horas. Durante o período do teste os organismos não foram alimentados.

Os ensaios foram mantidos a 20°C (±2) para *D. similis* e 25°C (±2) para *C. dubia* e *C. silvestrii*, com fotoperíodo 16 horas-luz e intensidade luminosa de 2000lux.

O efeito observado para os organismos foi imobilidade. Os organismos que não apresentaram movimentação em um intervalo de 15 segundos foram considerados imóveis (ABNT 2004; EPA, 2002).

Foram observados os seguintes requisitos durante os testes para considerá-los válidos: mortalidade inferior a 10% dos organismos expostos no controle e o teor de oxigênio superior a 2 mg.L⁻¹.

De acordo com a carta controle estabelecida no laboratório de Ecotoxicologia do Ipen, os resultados deverão estar na faixa de 2,03 mg.L⁻¹ (0,087 – 3,186) para *D. similis*; 1,58 mg.L⁻¹ (1,076 - 2,084) para *C. dubia* e 1,648 mg.L⁻¹ (1,226 – 2,070) *C. silvestrii*.

4.1.5.1. Análise estatística

A CE(I)50;48H foi determinada pelo método Spearman-Kärber (HAMILTON *et al*, 1977). O limite superior e o limite inferior da faixa foram estabelecidos pelo limite de dois desvios padrões (2σ) em relação aos valores médios obtidos a cada teste realizado: $\bar{x} + 2\sigma$ e $\bar{x} - 2\sigma$, respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da toxicidade de Triclosan.

5.1.1. Ensaios de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

5.1.1.1. Toxicidade do solvente DMSO.

O solvente é um importante fator a ser considerado em ensaios ecotoxicológicos, uma vez que pode interferir na toxicidade do produto a ser testado. DMSO não apresentou toxicidade aguda (APÊNDICE A) para *D. similis* e *C. silvestrii*, não sendo observada mortalidade em nenhuma das concentrações testadas (maior concentração: 0,490 mg.L⁻¹).

5.1.1.2. Toxicidade de Triclosan em ensaios em água natural reconstituída, sem fotoperíodo e com fotoperíodo.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda tiveram como objetivo conhecer a toxicidade de Triclosan em água natural de modo a estimar os efeitos em ambientes tropicais e subtropicais. Os resultados (CE(I)50;48H) em água natural com fotoperíodo para *D. similis* (0,23 mg.L⁻¹) e *C. silvestrii* (0,10 mg.L⁻¹) demonstram que *D. similis* é mais resistente na presença de Triclosan. Os resultados encontram-se nas TAB. 4 e 5 (APÊNDICE B, C, D).

TABELA 4 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L⁻¹) para *D. similis* em água natural reconstituída com fotoperíodo.

TESTE N°	CE(I)50;48H (mg.L ⁻¹)	INTERVALO DE CONFIANÇA (mg.L ⁻¹)
1	0,23	0,21 - 0,26
2	0,20	0,17 - 0,23
3	0,26	0,26 - 0,31
Média		0,23
Faixa de sensibilidade		0,17 - 0,31
σ		0,030
CV		13%

σ = Desvio Padrão; CV = Coeficiente de Variação.

TABELA 5 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L^{-1}) para *C. silvestrii* em água natural reconstituída com fotoperíodo.

TESTE N°	CE(I)50;48H (mg.L^{-1})	INTERVALO DE CONFIANÇA (mg.L^{-1})
1	0,08	0,06 – 0,10
2	0,12	0,08 – 0,17
3	0,11	0,07 – 0,16
Média		0,10
Faixa de sensibilidade		0,08 - 0,12
σ		0,021
CV		20%

σ = Desvio Padrão; **CV** = Coeficiente de Variação.

Estudos indicam que, Triclosan pode ser facilmente degradado pela presença da luz. De modo a conhecer a influência da luminosidade na toxicidade do Triclosan em água natural foram realizados ensaios sem o fotoperíodo com *C. silvestrii*. O valor obtido foi de: CE(I)50;48H 0,13 mg.L^{-1} , o resultado encontra-se na TAB.6.

TABELA 6 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L^{-1}) para *C. silvestrii* em água natural reconstituída sem fotoperíodo.

TESTE N°	CE(I)50;48H (mg.L^{-1})	INTERVALO DE CONFIANÇA (mg.L^{-1})
1	0,14	0,12 – 0,18
2	0,09	0,05 – 0,17
3	0,16	0,15 - 0,18
4	0,13	0,10 - 0,15
Média		0,13
Faixa de sensibilidade		0,09 - 0,16
σ		0,029
CV		23%

σ = Desvio Padrão; **CV** = Coeficiente de Variação.

Os valores de CE(I)50;48H obtidos para *C. silvestrii* com e sem fotoperíodo, 0,13 e 0,10 mg.L^{-1} , respectivamente, não apresentaram diferenças significativas segundo análises teste *t* de Student (TAB.7).

TABELA 7 - Teste *t* - *Student* para os resultados dos ensaios de toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L⁻¹) para *C. silvestrii* em água natural reconstituída sem e com fotoperíodo.

Diferença entre as médias	<i>t</i> - <i>Student</i>	Prob > <i>t</i>
-0,25	-1,3	0,27
Em um nível de significância de 0.05 não há diferença estatística significativa nos resultados.		

5.1.1.3. Toxicidade de Triclosan em ensaios com Água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo.

Com o objetivo de avaliar a toxicidade de Triclosan sem interferentes externos (substâncias presentes na água natural e fotoperíodo) foram realizados ensaios com Água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo (APÊNDICE E, F, G). Os resultados da CE(I)50;48H de Triclosan para *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii* estão nas TAB. 8, 9 e 10.

TABELA 8 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L⁻¹) para *D. similis* em água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo.

TESTE N°	CE(I)50;48H (mg.L ⁻¹)	INTERVALO DE CONFIANÇA (mg.L ⁻¹)
1	0,18	0,15 – 0,22
2	0,30	0,26 – 0,35
3	0,19	0,16 – 0,22
4	0,20	0,17– 0,23
Média		0,22
Faixa de sensibilidade		0,18 - 0,30
σ		0,056
CV		25%

σ = Desvio Padrão, CV = Coeficiente de Variação.

TABELA 9 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L^{-1}) para *C. dubia* e em água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo.

TESTE N°	CE(I)50;48H (mg.L^{-1})	INTERVALO DE CONFIANÇA (mg.L^{-1})
1	0,10	0,08 - 0,12
2	0,07	0,05 - 0,10
3	0,08	0,07 - 0,10
4	0,08	0,07 - 0,10
Média		0,08
Faixa de sensibilidade		0,07 - 0,10
σ		0,013
CV		15%

σ = Desvio Padrão, **CV** = Coeficiente de Variação.

TABELA 10 - Toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L^{-1}) para *C. silvestrii* em água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo.

TESTE N°	CE(I)50;48H (mg.L^{-1})	INTERVALO DE CONFIANÇA (mg.L^{-1})
1	0,08	0,06 - 0,10
2	0,08	0,07 - 0,09
3	0,08	0,06 - 0,09
4	0,11	0,09 - 0,13
Média		0,09
Faixa de sensibilidade		0,08 - 0,11
σ		0,015
CV		17%

σ = Desvio Padrão, **CV** = Coeficiente de Variação.

C. dubia e *C. silvestrii* apresentaram maior sensibilidade em 48H ao Triclosan (0,08 e 0,09 mg.L^{-1} respectivamente) do que *D. similis* (0,22 mg.L^{-1}). Os valores de CE(I)50;48H obtidos para *C. silvestrii* e *C. dubia* ao Triclosan não apresentaram diferenças significativas segundo análises teste *t* de Student (TAB.11).

TABELA 11 - Teste *t* de *Student* para os resultados dos ensaios de toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L⁻¹) para *C. dubia* e *C. silvestrii* em água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo.

Diferença entre as médias	<i>t</i> - <i>Student</i>	Prob > <i>t</i>
0,005	0,48	0,06
Em um nível de significância de 0.05 não há diferença estatística significativa nos resultados.		

Os resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade aguda do Triclosan para *C. silvestrii* com água reconstituída como água de diluição sem fotoperíodo (0,09 mg.L⁻¹) quando comparados com aos resultados dos ensaios de ecotoxicidade aguda do Triclosan para mesma espécie com água natural reconstituída como água de diluição e sem fotoperíodo (0,13 mg.L⁻¹) não apresentaram diferenças significativas segundo análises teste *t* de *Student* (TAB.12).

TABELA 12 - Teste *t* de *Student* para os resultados dos ensaios de toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan (mg.L⁻¹) para *C. silvestrii* em água Milli-Q reconstituída sem fotoperíodo e água natural sem fotoperíodo.

Diferença entre as médias	<i>t</i> - <i>Student</i>	Prob > <i>t</i>
-0,04	- 2,53	0,08
Em um nível de significância de 0.05 não há diferença estatística significativa nos resultados.		

5.1.2 Ensaios de ecotoxicidade crônica com *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

Os ensaios de ecotoxicidade crônica foram realizados para conhecer os efeitos de Triclosan na reprodução de *D. similis* e *C. silvestrii*. De modo a estimar os efeitos em ambientes tropicais e subtropicais, foram realizados com água natural e fotoperíodo. As planilhas dos testes e as análises estatísticas utilizadas

para o cálculo do CEO reprodução e sobrevivência e malformação estão nos APÊNDICE H e I.

5.1.2.1. *Daphnia similis*.

Foram avaliados efeitos do Triclosan nas fêmeas adultas (reprodução e sobrevivência) e nas neonatas (teratogênese) de *Daphnia similis*.

5.1.2.1.1. Efeito na reprodução.

Para *D. similis* os valores de CENO e o CEO obtidos nos três testes foram, respectivamente, de 0,05 e 0,1 mg.L⁻¹ de Triclosan (TAB. 13, FIG.11).

TABELA 13 – Efeito do Triclosan na reprodução para *Daphnia similis*.

CONCENTRAÇÕES mg.L ⁻¹	TESTE 1			TESTE 2			TESTE 3		
	MÉDIA	σ	CV (%)	MÉDIA	DP	CV (%)	MÉDIA	DP	CV (%)
Controle	34,20	7,25	21,21	32,20	7,28	22,62	48,40	5,19	10,72
0,025	31,60	8,60	27,23	30,70	6,07	19,79	47,90	3,41	7,13
0,05	31,00	4,22	13,60	30,20	8,98	29,75	48,30	5,42	11,22
*0,10	22,80	7,84	34,40	16,20	4,76	29,41	24,25	7,34	30,28
0,20	3,50	1,00	28,57	1,40	1,95	139,24	0,00	0,00	0,00
0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

σ = Desvio Padrão, CV = Coeficiente de Variação, * CEO.

FIGURA 11 – Ecotoxicidade crônica (reprodução) de Triclosan (mg.L⁻¹) para *Daphnia similis*. (Barras representam o desvio padrão, * CEO).

5.1.2.1.2. Efeitos sobrevivência.

A concentração que causou efeito na sobrevivência de acordo com a análise de *Fisher's Exact Test* foi de 0,2 mg.L⁻¹. Na concentração de 0,4 mg.L⁻¹ 100% dos organismos morreram em 24 horas no 1º teste e em 48 horas nos demais testes (FIG.12)

FIGURA 12 – Sobrevivência (%) de *D. similis* exposta ao Triclosan por 14 dias.

5.1.2.1.3. Teratogênese.

A viabilidade das neonatas produzidas foi analisada através da observação de uma alíquota de neonatas por concentração. Triclosan induziu o desenvolvimento de malformações em todos os testes realizados. As malformações encontradas foram: espinho curvado e antenas incompletas. Foram detectados também, neonatas abortados com desenvolvimento tardio na concentração de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ (FIG.13).

FIGURA 13 – Neonatas de *D. similis*. A: normal; B e C: malformadas; D: embrião prematuro.

Foi detectada também a ocorrência de machos na 1ª ninhada no teste 2 na concentração $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$ (TAB. 14).

TABELA 14 – Malformações (%) em 3 ninhadas de *Daphnia similis* nos ensaios de ecotoxicidade crônica com Triclosan.

ENSAIO	NINHADAS	CONTROLE	CONCENTRAÇÕES (mg.L^{-1})				
			0,025	0,05	0,1	0,2	0,4
1	1º	0	0	44	100	100	-
	2º	0	0	60	100	90 *	-
	3º	0	0	30	100	-	-
2	1º	0	0 •	18	100	100	-
	2º	0	0	50	100	-	-
	3º	0	0	30	100	-	-
3	1º	0	0	50	100	-	-
	2º	0	0	33	100	-	-
	3º	0	0	50	100	-	-

– sem reprodução

• 26% machos

* 10% prematuras

Os valores representam à porcentagem de malformações.

Em Cladocera, neonatas não apresentam diferenças morfológicas se comparadas com as adultas. O tamanho da câmara de incubação é proporcional

ao crescimento do indivíduo, resultando em um número maior de ovos/postura ao longo do ciclo de vida. No caso de malformações, provavelmente o número de indivíduos malformados é diferente na medida em que as posturas vão se sucedendo.

De modo a verificar se o número de malformações difere nas três posturas, os dados dos testes foram submetidos ao teste de comparações múltiplas de Tukey. Para os dados testados, não houve diferenças estatisticamente significativas (TAB.15).

TABELA 15 - Média de malformações nas posturas de *Daphnia similis* durante o teste crônico na concentração de 0,05 mg.L⁻¹.

POSTURA	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	σ	CV
1	37,3	18	50	17	45,5
2	47,6	33	60	14	28,6
3	36,6	30	50	11	31,5

σ = Desvio Padrão, **CV** = Coeficiente de Variação

A partir destes resultados, o valor de IC50 para cada teste considerando as 3 posturas/concentração foi calculado. O valor de IC50 situou-se na faixa de 0,0565 a 0,0623 de Triclosan (mgL⁻¹). Os resultados são apresentados na TAB.16.

TABELA 16 – Concentração de Triclosan (mgL⁻¹) que causou malformações (IC50) em *Daphnia similis*.

TESTE N°	IC50; 51H	INTERVALO DE CONFIANÇA
1	0,0565	0,033 – 0,046
2	0,0623	0,036 – 0,050
3	0,0546	0,044 – 0,050
Média		0,0578
σ		0,004
CV		7%

σ = Desvio Padrão, **CV** = Coeficiente de Variação, * CEO.

A mobilidade das neonatas também foi observada sendo detectada a presença de neonatas mortas em algumas das posturas. A IC_{50;51H} para mortalidade foi de 0,1621 mg.L⁻¹. A mortalidade dos neonatas pode estar relacionada à malformação, uma vez que, maior parte dos neonatas mortos esteve presente nas concentrações que induziram malformações. As alterações morfológicas interferem na dinâmica dos organismos tornando difícil sua sobrevivência no meio.

5.1.2.2. *Ceriodaphnia silvestrii*

Foram avaliados efeitos do Triclosan nas fêmeas adultas (reprodução e sobrevivência) e nas neonatas (teratogênese) de *Ceriodaphnia silvestrii*.

5.1.2.2.1. Efeito na reprodução.

O CENO e o CEO obtidos para *C. silvestrii* foram respectivamente 0,02 e 0,04 mg.L⁻¹ de Triclosan (TAB.17, FIG.14).

TABELA 17 - Efeito do Triclosan (mg.L⁻¹) na reprodução de *C. silvestrii*

CONCENTRAÇÕES mg.L ⁻¹	TESTE 1			TESTE 2			TESTE 3		
	MÉDIA	σ	CV (%)	MÉDIA	σ	CV (%)	MÉDIA	σ	CV (%)
Controle	25,40	2,46	9,68	17,00	1,89	11,09	16,20	3,49	21,54
0,05	24,60	3,78	15,35	-	-	-	-	-	-
0,01	25,30	4,35	17,18	15,10	1,97	13,04	13,40	3,13	23,39
0,02	22,20	2,15	9,68	14,00	3,50	24,97	13,00	3,13	24,05
*0,04	20,00	6,43	32,15	11,10	1,20	10,79	10,40	3,50	33,68
0,08	18,60	4,72	25,37	10,40	3,37	32,43	9,50	2,80	29,46
0,16	-	-	-	10,40	1,96	18,80	6,00	2,49	41,57

- não realizado σ = Desvio Padrão, CV = Coeficiente de Variação, * CEO.

FIGURA 14 – Ecotoxicidade crônica (reprodução) de Triclosan (mg.L⁻¹) para *Ceriodaphnia silvestrii*. (Barras representam o desvio padrão e * CEO).

5.1.2.2.2. Efeitos na sobrevivência.

Não foram observados efeitos de Triclosan na sobrevivência de *C. silvestrii* em nenhum dos testes.

5.1.2.2.3. Teratogênese.

Não foram evidenciados efeitos tanto de malformação quanto de mortalidade nos neonatas observados nos três testes de ecotoxicidade crônica.

5.1.2.3. Influência do alimento composto na toxicidade do Triclosan para *C.silvestrii*.

As planilhas dos testes e as análises estatísticas utilizadas para o cálculo do CEO estão no APÊNDICE J.

5.1.2.3.1. Efeito na reprodução.

Houve uma diferença entre os valores de CENO e CEO obtidos para *C.silvestrii* nos testes crônicos. O primeiro e o terceiro teste apresentaram um CENO e CEO de 0,04 e 0,08 mg.L⁻¹ respectivamente e o segundo teste CENO de 0,01 e CEO de 0,02 mg.L⁻¹ (TAB.18 e 19, FIG.15). A diferença entre os resultados pode ser explicada pela variabilidade nas populações testadas. Observa-se que o teste 2 apresentou a menor reprodução tanto no controle quanto nas demais concentrações quando comparados com os outros testes.

TABELA 18 – Valores de CENO e CEO do Triclosan na reprodução de *C. silvestrii*

TESTE	CENO	CEO
1	0,04	0,08
2	0,01	0,02
3	0,04	0,08

TABELA 19 - Efeito do Triclosan na reprodução de *C. silvestrii*

CONCENTRAÇÕES	TESTE 1			TESTE 2			TESTE 3		
mg.L ⁻¹	MÉDIA	σ	CV (%)	MÉDIA	DP	CV (%)	MÉDIA	DP	CV (%)
Controle	23,60	4,14	17,55	21,50	2,46	11,45	22,70	2,67	11,76
0,01	22,88	1,66	7,27	19,30	2,63	13,61	22,40	2,67	11,94
0,02	22,10	2,28	10,33	17,50	2,84	16,22	21,67	2,74	12,64
0,04	20,80	7,36	35,39	16,50	4,48	27,14	19,60	3,75	19,12
0,08	17,70	3,74	21,15	16,40	2,37	14,43	17,80	2,74	15,40
0,16	14,50	3,27	22,58	8,50	3,50	41,22	13,30	3,47	26,06

- não realizado, σ = Desvio Padrão, CV = Coeficiente de Variação.

FIGURA 15 – Ecotoxicidade crônica (reprodução) de Triclosan (mg.L⁻¹) para *Ceriodaphnia silvestrii*. (Barras representam o desvio padrão e * CEO).

Os organismos expostos ao Triclosan com uma dieta a base de ração e alga demonstraram-se mais sensíveis (CEO de 0,04 mg.L⁻¹) que os organismos expostos com uma dieta a base de alga (CEO de 0,08 mg.L⁻¹, 0,02 mg.L⁻¹). Pode-se observar que a dieta influenciou na toxicidade do produto, porém mais estudos

são necessários para identificar se a bactéria presente no alimento composto tem, influência ou não na degradação e toxicidade de Triclosan.

5.1.2.3.2. Efeitos na sobrevivência.

Não foram observados efeitos na sobrevivência de *C. silvestrii* em nenhum dos testes.

5.1.2.3.3. Teratogênese.

Não foram evidenciados efeitos tanto de malformação quanto de mortalidade nos neonatas observados nos três teste de ecotoxicidade crônica.

5.1.3. Desenvolvimento embrionário de *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

5.1.3.1. Estabelecimento de critérios para ensaios de teratogênese.

5.1.3.1.1. Determinação dos estágios do desenvolvimento partenogenético.

Sete estágios foram observados para o desenvolvimento partenogenético de *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii*. Após estágio VII os organismos apresentam movimentos de livre de natação. A duração dos estágios está apresentada na TAB. 20, 21 e 22.

TABELA 20 - Caracterização dos estágios de desenvolvimento embrionário de *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii*.

ESTÁGIO	CARACTERÍSTICAS
I	Ovos homogêneos verdes escuros e uma membrana externa envolvendo os ovos. Após algumas horas, os ovos apresentam uma diferenciação entre a parte mais interna e a mais externa, sendo a parte interna mais clara e a mais externa escura.
II	Ovos com invaginação na região mediana.
III	Diferenciação na região cefálica do corpo e, após algumas horas, a cabeça e as antenas se tornam evidentes, porém pouco desenvolvidas. A membrana externa do ovo se rompe e o ovo apresenta-se envolvido por outra membrana.
IV	Duas manchas marrons surgem na região cefálica indicando o início da formação dos olhos. Embrião com movimentação.
V	Ocorre o rompimento da membrana e liberação das segundas antenas. Os olhos se tornam evidentes devido à pigmentação marrom escura.
VI	Os olhos se fundem formando um olho preto composto.
VII	Rompimento da cutícula que prende o espinho ao corpo da neonata liberando o espinho caudal. Neonata completamente formada.

TABELA 21 - Ilustração dos estágios do desenvolvimento partenogenético de *D. similis*; *C. dubia* e *C. silvestrii*.

ESTÁGIO	<i>D. similis</i>	<i>C. dubia</i>	<i>C. silvestrii</i>
I
II
III
IV
V
VI
VII

TABELA 22 – Duração dos estágios do desenvolvimento embrionário de *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii* (n=3).

ESTÁGIO	<i>D. similis</i>			<i>C. dubia</i>			<i>C. silvestrii</i>		
	MÉDIA (horas)	σ	CV	MÉDIA (horas)	σ	CV	MÉDIA (horas)	σ	CV
I	11	0,82	7%	9	0,00	0%	8	0,00	0%
II	5	0,00	0%	3	0,52	17%	4	0,45	11%
III	14	0,50	4%	9	0,00	0%	9	0,50	5%
IV	5	0,58	12%	5	0,45	9%	5	0,00	0%
V	12	0,58	5%	4	0,58	16%	5	0,55	12%
VI	4	0,58	16%	5	0,00	0%	5	0,58	12%
VII	Liberação das neonatas			Liberação das neonatas			Liberação das neonatas		
Total (horas)	51(±5)			34(±3)			36(±2)		

σ = Desvio Padrão **CV** = Coeficiente de Variação.

5.1.3.1.2. Condições do ensaio de teratogênese.

Baseando-se na ABNT (2004; 2005) e ASTM (1991), nas condições utilizadas para o cultivo dos ovos partenogênicos e na classificação determinada neste trabalho, condições para ensaios de teratogênese com Cladocera foram estabelecidas (TAB.23).

TABELA 23 – Condições do ensaio de teratogênese com Cladocera.

CARACTERÍSTICAS	CONDIÇÃO	
	<i>D. similis</i>	<i>C. dubia</i> e <i>C. silvestrii</i>
TIPO DE ENSAIO	Estático	Estático
TEMPERATURA DA ÁGUA	20°C	25°C
FOTOPERÍODO	16:8 h luz:escuro	16:8 h luz:escuro
ESTÁGIOS	NESTE TRABALHO	NESTE TRABALHO
ESTÁGIO	I	I
POSTURA	A partir da 3ª postura	A partir da 3ª postura
OVOS/RÉPLICA	5 Ovos	5 Ovos
CONCENTRAÇÕES/RÉPLICAS	5/4	5/4
CÂMARA-TESTE	Béqueres de 30 ml/20 ml	Béqueres de 30/20 ml
ALIMENTAÇÃO	Sem	Sem
DURAÇÃO DO TESTE	Neste trabalho 51 horas (±5)	Neste trabalho 34 horas(±3) para <i>C. dubia</i> e 36 horas (±3) para <i>C. silvestrii</i>
EFEITO OBSERVADO	Mortalidade, malformação	Mortalidade, malformação
ACEITABILIDADE DO TESTE	> 90% Sobrevivência e < 10% de malformação no controle, > 90% dos organismos do controle devem ter atingido o último estágio de desenvolvimento (ASTM 1991).	> 90% Sobrevivência e < 10% de malformação no controle, > 90% dos organismos do controle devem ter atingido o último estágio de desenvolvimento (ASTM 1991).
ANÁLISE ESTATÍSTICA	ICP	ICP

5.1.3.1.2.1. Análises estatísticas .

A análise dos resultados, comumente para ensaios de teratogênese é analisada pelo teste Fetax, através do cálculos LC50;96H (mortalidade), EC50 (malformações) e a mínima concentração que inibe o crescimento (MCIG). Um indicativo de teratogênese (TI: “*Teratogenic Index*”) é determinado por meio da divisão de EC50;96H (malformações) pela LC50;96H (mortalidade). Valores obtidos desta divisão maiores que 1,5 indicam grande potencial de malformações.

Para teste de teratogênese com cladóceras optou-se pela análise através do cálculo do ICP.

5.1.4. Ensaio de Teratogênese para *D. similis*.

D. similis foi selecionada como organismo-teste para os ensaios de Teratogenicidade devido o tamanho de seus ovos e por apresentar estruturas maiores que as de *C. dubia* e *C. silvestrii*, como por exemplo, o espinho caudal. Estruturas maiores facilitam a observação de malformações.

5.1.4.1. Malformação.

As concentrações de Triclosan que causaram malformações nas neonatas de acordo com análise IC50 estão representados na TAB. 24, APENDICE L. Observa-se que a concentração que causou malformação nos testes com a exposição direta dos embriões (0,075 mg.L⁻¹) foi maior a que causou malformação nos ensaio de ecotoxicidade crônica (0,0578 mg.L⁻¹).

TABELA 24 – Toxicidade (IC50;51H) de Triclosan para *Daphnia similis* para malformações.

TESTE N°	IC50; 51H mg.L ⁻¹	INTERVALO DE CONFIANÇA
1	0,092	0,069 – 0,081
2	0,075	0,062 – 0,067
3	0,058	0,035 – 0,044
4	0,077	0,071 – 0,073
Média	0,075	
σ	0,014	
CV	18%	

σ = Desvio Padrão CV = Coeficiente de Variação.

A concentração que causou malformação nos ensaios de teratogênese foi maior que a concentração obtida nos ensaios de ecotoxicidade crônica, porém os resultados não apresentaram diferenças significativas (TAB.25).

TABELA 25 - Teste *t* de *Student* para os resultados dos ensaios de teratogênese (IC50) de Triclosan (mg.L⁻¹) para *D. similis* e para os resultados dos ensaios de ecotoxicidade crônica.

Diferença entre as médias	<i>t</i> - <i>Student</i>	Prob > <i>t</i>
-0,0176	4,032	0,08
Em um nível de significância de 0.05 não há diferença estatística significativa nos resultados.		
DF = Diferença entre as médias.		

5.1.4.2. Desenvolvimento tardio e mortalidade.

Além de induzir malformações, Triclosan também interferiu no desenvolvimento normal dos neonatas retardando o período de desenvolvimento partenogenético e foi letal para alguns embriões. O IC50;51H para o desenvolvimento tardio foi calculável apenas no teste 3, sendo de 0,343 mg.L⁻¹. Os valores de IC50;51H para mortalidade estão na TAB.26.

TABELA 26 – Valor médio de IC50;51H de Triclosan para *D. similis* (mortalidade).

TESTE N°	IC50; 51H	INTERVALO DE CONFIANÇA
1	-	-
2	0,162	-
3	0,380	-
4	0,328	0,031 – 0,031
Média	0,29	
σ	0,114	
CV	39%	

- não calculável σ = Desvio Padrão CV = Coeficiente de Variação.

5.2. Teste de sensibilidade.

A faixa de sensibilidade para *D. similis* (2,03 mg.L⁻¹ (0,087 – 3,186)), *C. dubia* (1,58 mg.L⁻¹ (1,076 - 2,084)) e *C.silvestrii* (1,648 mg.L⁻¹ (1,226 – 2,070)) ao Cloreto de Sódio utilizadas neste trabalho, foram estabelecidas pelo Laboratório de Ecotoxicologia IPEN-USP. Os valores de CE(I)50;48H obtidos para *D. similis*; *C. dubia*; *C.silvestrii* nos testes de sensibilidade, demonstraram que os lotes dos organismos estavam qualificados para a realização dos testes de toxicidade aguda, crônica e com embriões (FIG.16, 17 e 18).

FIGURA 16 – Sensibilidade CE(I)50; 48H de *D. similis* ao Cloreto de Sódio.

FIGURA 17 – Sensibilidade CE(I)50; 48H de *C. silvestrii* ao Cloreto de Sódio.

FIGURA 18 – Sensibilidade CE(I)50; 48H de *C. dubia* ao Cloreto de Sódio.

6. DISCUSSÃO

6.1. Toxicidade de Triclosan.

6.1.1. Toxicidade aguda de Triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

A toxicidade do Triclosan para alguns organismos está na TAB.27.

TABELA 27 – Toxicidade de Triclosan para organismos aquáticos.

TAXONOMIA	ENDPOINT	PARÂMETRO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	RESULTADO (mg.L ⁻¹)	REFERÊNCIA
ALGA					
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	CE50	Crescimento	72h	0,0028	ORVOS <i>et al.</i> , (2002)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	CE50	Crescimento	96h	0,0045	ORVOS <i>et al.</i> , (2002)
CRUSTÁCEOS					
<i>C. dubia</i> (água reconstituída sem fotoperíodo)	CE50	Imobilidade	48h	0,08	<u>NESTE TRABALHO</u>
<i>C. silvestrii</i> (água reconstituída sem fotoperíodo)	CE50	Imobilidade	48h	0,09	<u>NESTE TRABALHO</u>
<i>D. similis</i> (água reconstituída sem fotoperíodo)	CE50	Imobilidade	48h	0,22	<u>NESTE TRABALHO</u>
<i>C. silvestrii</i> (água natural sem fotoperíodo)	CE50	Imobilidade	48h	0,13	<u>NESTE TRABALHO</u>
<i>C. silvestrii</i> (água natural com fotoperíodo)	CE50	Imobilidade	48h	0,10	<u>NESTE TRABALHO</u>
<i>D. similis</i> (água natural com fotoperíodo)	CE50	Imobilidade	48h	0,23	<u>NESTE TRABALHO</u>
<i>D. magna</i> (com fotoperíodo)	CE50	Imobilidade	48h	0,39	ORVOS <i>et al.</i> , (2002)
PEIXES					
<i>Poecilia reticulata</i>	LE50	LE50	96h	0,36	Pesticide Ecotoxicity Database (2000)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LE50	LE50	96h	0,36	ADOLFSSON-ERIC <i>et al</i> (2002)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LE50	Mortalidade	96h	0,28	Pesticide Ecotoxicity Database (2000)

De acordo com os dados na Tabela 24 a concentração do Triclosan que causou efeito na população de alga é próxima as concentrações encontradas nos ecossistemas aquáticos, que segundo MCMURRY *et al.* (1998), está na faixa de 0,00005 a 0,0023 mg.L⁻¹. Populações de crustáceos e peixes provavelmente não sofrerão efeitos diretos nesta faixa, porém, poderão sofrer efeitos indiretamente, uma vez que, crustáceos zooplancônicos filtradores, alimentam-se de algas e material em suspensão.

Os crustáceos zooplancônicos, *C. dubia* e *C. silvestrii* apresentam valores de CE(1)50;48H ao Triclosan muito próximos. A similaridade entre a sensibilidade ao Triclosan destes organismos pode estar relacionada ao ciclo de vida e a sensibilidade dos mesmos a substância de referência.

Estudos do ciclo de vida e da sensibilidade à substância de referência, realizados por JACONETTI (2005), indicam que *C. dubia* e *C. silvestrii*

apresentam semelhanças. O valor médio da CE(I)50;48H de Cloreto de Sódio de acordo com a Carta Controle do Laboratório de Ecotoxicologia IPEN/USP para *C. dubia* é de 1,58 mg.L⁻¹, valor próximo ao de *C. silvestrii*, 1,65 mg.L⁻¹.

D. similis é menos sensível ao Triclosan que *C. silvestrii* e *C. dubia*, o mesmo válido para a substância de referência Cloreto de Sódio (CE(I)50;48H: 2,30 mg.L⁻¹), sugerindo uma maior resistência a substâncias químicas.

Apesar das espécies *C. dubia* e *C. silvestrii* apresentarem similaridade tanto no ciclo de vida e na sensibilidade a substâncias químicas, os resultados obtidos para *C. silvestrii*, expressam com maior rigorosidade as condições dos ambientes tropicais e subtropicais. Por isso, são de grande importância para fundamentar Leis e Normas que estabelecem limites de concentrações seguras para o descarte de produtos na água visando a proteção da vida aquática nestes ambientes.

6.1.1.1. Influência da água em ensaios de ecotoxicidade.

O tipo de água de diluição utilizada em testes de ecotoxicidade é um importante fator a ser considerado, uma vez que sua qualidade pode interferir no resultado final do ensaio. De acordo com o manual de EPA (2002), a água de diluição utilizada em testes de toxicidade pode ser de origem sintética ou natural.

Os resultados obtidos por este trabalho demonstraram não existir diferença na toxicidade do Triclosan para os testes realizados com água natural e água sintética (Milli-Q) como água de diluição em 48 horas de ensaio.

O mesmo foi observado por ROSA (2008), no estudo da toxicidade aguda do fármaco Propranolol para *C. silvestrii* nas mesmas condições adotadas neste trabalho. O valor médio da CE(I)50;48H obtido pelo autor com água natural e com água Milli-Q reconstituída como água de diluição foi de 2,63 e 2,87 mg.L⁻¹ respectivamente, não apresentando diferenças estatisticamente significativas.

Apesar de não existir diferença significativa na toxicidade aguda do Triclosan entre os testes realizados com água de diluição natural e Milli-Q reconstituída, a sensibilidade dos organismos foi menor nos testes realizados com água natural (CE(I)50; 48H para *C. silvestrii* em água natural sem fotoperíodo: 0,13 mg.L⁻¹ e CE(I)50; 48H para *C. silvestrii* em água reconstituída sem fotoperíodo: 0,09 mg.L⁻¹)

Resultados semelhantes foram observados por BURATINI-MENDES (2002), que realizou testes de toxicidade crônica com Dicromato de Potássio e Cloreto de Sódio, diluídos com água reconstituída Milli-Q e água natural oriunda do Ribeirão de Pirai. A autora obteve sensibilidade menor quanto à sobrevivência para os organismos testados com a água natural.

A menor sensibilidade obtida nos testes realizados com água natural como água de diluição pode ser explicada pela capacidade que a água natural apresenta em suprir algumas necessidades biológicas dos organismos deixando-os mais resistentes aos tóxicos presentes no meio.

A água sintética apresenta poucos sais em sua composição, o que permite questionar o suprimento das necessidades nutricionais dos organismos (ELENDET & BIAS, 1990).

BURATINI-MENDES (2002), concluiu mediante cultivos de algumas gerações de *C.dubia* em água natural (Ribeirão de Pirai - Salto de Itu) e em água Milli-Q reconstituídas que o uso da água natural mantém as variáveis biológicas dos organismos acima do critério mínimo estabelecido pelas normas (reprodução ≥ 15 e sobrevivência $\geq 80\%$ de fêmeas (EPA 2002)) e o uso da água Milli-Q reconstituída gera a perda progressiva do vigor dos organismos (TAB.28).

TABELA 28 – Resultado do experimento realizado por BURATINI-MENDES (2002) através de análises de gerações.

PARÂMETROS	ÁGUA NATURAL (Ribeirão do Pirai)	ÁGUA DESTILADA RECONSTITUÍDA (Milli-Q)
Sobrevivência	Todas as gerações apresentaram 80% de sobrevivência em 0-7 dias e 7-14 dias	94% das gerações mantiveram-se vivas durante 0-7 dias e 74% das gerações durante 7-14 dias
Reprodução	> 20 jovens por fêmea em 71% das gerações	12 - 20 jovens por fêmea em 68% das gerações

Uma mudança no meio de cultivo em que os organismos estão adaptados, no caso neste trabalho, a água de cultivo natural, pode influenciar também no resultado dos testes.

Para que a variabilidade entre testes com o mesmo agente químico diminua, é necessário que os organismos tenham tempo suficiente para adaptar-

se a um determinado meio, o que pode ser superior a 3 meses (COWGILL, 1985). Portanto, seria recomendável a aclimação dos organismos-testes antes de introduzi-los a uma água de diluição diferente da utilizada normalmente nos cultivos. A aclimação dos organismos resultaria em um maior período de preparo dos organismos-testes na realização de um ensaio de ecotoxicidade, o que não seria viável se fosse requerida uma resposta rápida de análises ecotoxicológicas

Apesar das vantagens do uso da água natural como água de diluição, é importante vincular o tipo da água a ser utilizada em testes de toxicidade com o objetivo do estudo.

Para determinar a toxicidade de produtos químicos, recomenda-se o uso da água sintética, por apresentar composição definida e proporcionar uma maior reprodutibilidade da análise, segundo EPA (2000) e OECD (2006). A matéria orgânica presente na água natural pode interagir com o produto químico e interferir no resultado de toxicidade.

Se o estudo tem como objetivo determinar a toxicidade da substância química e extrapolar os resultados para o ambiente natural, recomenda-se o uso da água natural, uma vez que, proporciona condições adequadas com relação à sobrevivência, reprodução e crescimento dos organismos-testes e representa com maior rigorosidade as interações que podem ocorrer na natureza (EPA, 2002).

6.1.1.2. Influência do fotoperíodo.

Os valores de CE(I)50;48H obtidos nestes trabalho, demonstram que a presença de luz não interfere nos resultados de toxicidade do Triclosan em 48H de ensaio (CE(I)50; 48H para *C.silvestrii* em água natural reconstituída sem fotoperíodo: 0,13 mg.L⁻¹ e CE(I)50; 48H para *C.silvestrii* em água natural reconstituída com fotoperíodo: 0,10 mg.L⁻¹).

Experimentos realizados por SINGER *et al*, (2002) demonstraram que o efeito da luz natural e da luz artificial na fotodegradação do Triclosan difere em apenas 10% dos resultados. Portanto, os resultados obtidos nos testes realizados neste trabalho com o fotoperíodo, apresentam proximidade às condições naturais.

De acordo com TIXER *et al.*, (2002), Triclosan pode ser degradado facilmente na superfície da água por ação da luz e gerar subprodutos. Poucos são os estudos sobre a degradação do Triclosan devido à dificuldade de detecção dos subprodutos derivados, uma vez que estes se apresentam em pequenas concentrações (ARANAMI & READMAN, 2004).

Estudos realizados por SANCHEZ-PRADO *et al.* (2006), demonstram que a concentração do Triclosan diminui com o aumento de irradiação. Após 30 minutos de irradiação, a concentração de Triclosan é menor que 7% da concentração inicial, sendo detectado como subproduto da degradação do Triclosan, o 2,8-diclorodibenzo-*p*-dioxo (2,8-DCDD) que segundo ARANAMI & READMAN (2004), pode apresentar meia vida de 26 dias na água doce.

Apesar destes estudos, os resultados obtidos neste trabalho corroboram a idéia de que tanto a água natural quanto à presença de luz provavelmente não interferem nos resultados de toxicidade do produto em 48H de exposição. Os resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade com Triclosan em água natural com fotoperíodo foram selecionados como os valores de ecotoxicidade aguda para ecossistemas tropicais e subtropicais.

6.1.2. Toxicidade crônica para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

6.1.2.1. Reprodução.

6.1.2.1.1. *Daphnia similis*.

De acordo com estudos de ORVOS *et al.*, (2002), Triclosan induziu efeitos na reprodução de *D. magna* em uma concentração próxima a obtida neste trabalho para *D. similis* (0,1 mg.L⁻¹). O autor obteve um CENO e um CEO para reprodução de 0,05 mg.L⁻¹ e 0,2 mg.L⁻¹, respectivamente para *D. magna*. A proximidade dos resultados entre os organismos pode ser explicada por serem do mesmo gênero e apresentarem ciclo de vida semelhantes.

Neste trabalho, foi observada a ocorrência de machos em apenas 1 dos 3 testes realizados. A ocorrência de machos no ciclo de vida de cladóceros é caracterizada por fatores externos como, por exemplo, alterações na temperatura, suprimento alimentar, ocorrência de superpopulação, ou pela presença de substâncias químicas no meio de cultivo que o torna inadequado.

FLAHERTY & DODSON, (2005), observaram em seus estudos que a exposição crônica de *D. magna* na concentração de 10 mg.L⁻¹ de Triclosan aumentou significativamente a razão de machos na 1ª postura. A autora relacionou estes resultados à presença de uma bactéria conhecida como *Wolbachia pipientis*. De acordo com HUIGENS & STOUTHAMER *apud* BOURTZES *et al.*, (2003), esta bactéria pode induzir a partenogênese, portanto, se a determinação do sexo é direcionada em partes por parasitas, a exposição a um antibiótico pode alterar a razão do sexo por matar esses parasitas reprodutivos.

Neste trabalho a ocorrência de machos foi relacionada à presença do Triclosan, que tornou o ambiente inadequado para os organismos. Neste caso, se a ocorrência de machos fosse devido à ação do Triclosan sobre as bactérias que induzem a partenogênese, a produção de machos provavelmente seria evidente também nas demais concentrações.

Uma hipótese para a presença de machos na primeira postura da primeira concentração e a não ocorrência nas demais posturas poderia ser baseada no fato dos organismos desenvolverem certa adaptação e resistência à substância testada, porém são necessários estudos mais específicos sobre a capacidade de adaptação destes organismos em um meio com substâncias tóxicas.

Além disso, observou-se nos ensaios que grande parte das neonatas mortas era dotada de malformações. Este resultado indica que as malformações adquiridas resultaram na mortalidade dos neonatas uma vez que interferiram na dinâmica e fisiologia dos mesmos.

6.1.2.1.2. *Ceriodaphnia silvestrii*.

Estudos indicam que a degradação biológica do Triclosan pode gerar um subproduto mais tóxico, denominado metil-triclosan (LINDSTRÖM *et al.*, 2002). Segundo SINGER *et al.* (2002), este subproduto apresenta alta solubilidade em lipídios, tendo maior capacidade de se bioacumular que o Triclosan. De modo a avaliar a toxicidade de triclosan na presença ou não de bactérias foram realizados ensaios em duas condições de alimento: somente com algas e algas e alimento composto, ou seja, na presença de bactérias.

A toxicidade de Triclosan para *C. silvestrii* foi maior nos testes realizados com o fornecimento do alimento composto do que nos testes onde só foi oferecida alga como alimento. Provavelmente os resultados possam ser explicados pela interferência das bactérias presentes no alimento composto na toxicidade do Triclosan.

Resultados semelhantes aos deste trabalho foram obtidos por PUSCEDDU *et al.*, (2007) na exposição crônica de *C. dubia* ao Triclosan com o mesmo tratamento oferecido neste trabalho. Os valores de CENO e CEO para *C. dubia* no teste com o fornecimento de alimento composto foram 0,04 mg.L⁻¹ e 0,08 mg.L⁻¹; respectivamente e para os testes com alimentação somente a base de algas, o CENO foi de 0,08 mg.L⁻¹ e o CEO de 0,16 mg.L⁻¹.

Outra hipótese para esta maior toxicidade está relacionada ao fato do alimento composto ser mais uma via de exposição para os organismos.

O pH também pode ser um interferente em ensaios de toxicidade com Triclosan. Estudos realizados por ORVOS *et al.*, (2002), demonstraram que *C. dubia* apresenta menor sensibilidade ao Triclosan em ensaios realizados com pH de 8,5. O autor obteve um CENO de 0,006 mg.L⁻¹ para os testes realizados com pH 7,0 e CENO de 0,182 mg.L⁻¹ para os testes realizados com pH 8,5. Os resultados podem ser explicados pela forma na qual o Triclosan ocorre em condições ácidas e básicas. Em condições ácidas o Triclosan ocorre primariamente em forma fenólica na qual não é facilmente fotodegradada e em pH básico ocorre na forma aniônica, sendo mais fotoreativa (LINDSTRÖM, *et al.*, 2002).

Apesar do Triclosan se apresentar em diferentes formas conforme o pH, estudos realizados por SANCHEZ-PRADO *et al.*, (2006) demonstraram a formação de dioxinas a partir da fotodegradação do Triclosan independente da faixa do pH.

Os valores iniciais e finais de pH, no presente trabalho, foram medidos em todas as trocas de soluções e os valores obtidos, foram próximos (6,98 a 7,7) ao valor neutro, portanto, a toxicidade dos testes não foi alterada pela mudança de pH.

Considerando os resultados (CENO de 0,06 mg.L⁻¹ para *C. dubia*) obtidos por ORVOS *et al.*, (2002), os resultados deste trabalho (CENO de 0,02 para testes realizados com alimentação a base de alga e alimento composto e CENO

de 0,04/0,01 mg.L⁻¹ para testes realizados com alimentação a base somente de alga para *C. silvestrii*), e a faixa de pH (7,0), pode-se observar uma diferença entre as sensibilidades dos organismos testados. Esta diferença pode ter sido gerada pela fisiologia dos organismos (*C. silvestrii* e *C. dubia*) e pelo tipo de tratamento adotado durante o teste, como por exemplo, a dureza da água de diluição de 174 mg.L⁻¹ de CaCO₃, utilizada por ORVOS *et al.*, (2002).

Malformações nas neonatas geradas por *C. silvestrii* expostos ao Triclosan não foram observadas. O mesmo resultado foi observado no estudo de PUSCEDDU *et al.*, (2007) para *C. dubia*.

A ausência de malformações nestes organismos e a ocorrência em *D. similis* pode ser explicadas pelo tempo de incubação dos embriões entre estas espécies: (36±2) para *C. silvestrii* e (51±2) para *D. similis*. Segundo ABE *et al.*, (2001), os cladóceros trocam ativamente o fluido de dentro da câmara de incubação com a água do meio externo, para assim , suprir a demanda de oxigênio. Esta troca entre os fluidos facilita o contato dos embriões com os contaminantes. O período de desenvolvimento embrionário de *D. similis* é maior do que o período requerido para o desenvolvimento dos embriões de *C. silvestrii* e *C. dubia*, portanto, existe maior contato dos embriões de *D. similis* com contaminantes.

6.1.2.2. Sobrevivência.

6.1.2.2.1. *Daphnia similis*.

Neste Trabalho, Triclosan causou efeitos na sobrevivência em *D. similis* em uma concentração menor (0,2 mg.L⁻¹) da obtida por ORVOS *et al.*, (2002) para *D. magna*. O autor obteve uma mortalidade de 100% para *D. magna* exposta as concentrações de 1,0 e 5,0 mg.L⁻¹ em 48 horas de exposição e nenhum efeito foi observado na concentração de 0,2 mg.L⁻¹.

Estes resultados demonstram que *D. similis* é mais sensível ao Triclosan do que *D. magna* quanto a sobrevivência. A diferença entre a sensibilidade desta espécie ao Triclosan podem estar relacionadas às condições dos ensaios como também seu comportamento quanto à presença de um tóxico. Em exposição ao Cloreto de Sódio, substância de referência, *D. magna* apresenta uma maior resistência do que *D. similis*.

6.1.2.2.2. *Ceriodaphnia silvestrii*.

A sobrevivência de *C.silvestrii* não foi afetada por nenhuma concentração de Triclosan testada neste trabalho. PUSCEDDU *et al*, (2007) também não observou efeito na sobrevivência de *C. dubia* nas mesmas concentrações.

D. similis demonstrou-se mais sensível ao Triclosan com relação ao efeito na sobrevivência que *C.silvestrii*. Em ambos os ensaios o tempo de exposição permitiu 3 posturas para ambas as espécies. As causas que fazem com que *C. silvestrii* seja mais resistente quanto a sobrevivência ao Triclosan que *D. similis* não foram ainda investigadas. Estes resultados indicam que é de grande importância o estudo da toxicidade de um produto com diferentes espécies, pois o efeito pode não ser deletério para um organismos, porém pode ser para o outro organismo testado.

6.1.3. Ensaios de teratogênese.

6.1.3.1. Desenvolvimento embrionário.

Na reprodução partenogenética dos cladóceros os ovos são produzidos pelos ovários das fêmeas sem a necessidade de gametas masculinos. Estes ovos são depositados na câmara de incubação das fêmeas e lá permanecem até atingirem o estágio final de seu desenvolvimento que é a formação completa da neonata. Quando estão totalmente formadas as neonatas são liberadas para o meio externo.

Alguns autores como, FOX (1948); ESSLOVÁ (1959); GÜINTZEL, (1990); KAST-HUTCHESON *et al*, (2001); SOBRAL *et al*, (2001), FREITAS & ROCHA, (2006), caracterizam os estágios do desenvolvimento embrionário até a formação completa da neonata enfatizando as divisões celulares e diferenciações ou então nas alterações morfológicas.

O presente estudo adotou como critério para a caracterização do desenvolvimento embrionário as diferenças morfológicas ocorridas até o desenvolvimento completo da neonata.

O momento da deposição do ovo na câmara de incubação foi considerado como o estágio inicial do desenvolvimento embrionário e, o momento da extensão

do espinho caudal, considerado como o estágio final, uma vez que a neonata encontra-se completamente desenvolvida, idêntica ao adulto.

A presença de duas membranas no ovo também foi detectada no estudo do desenvolvimento embrionário de *D. similis* realizado por LEBEDINSKY (1891), que nomeou a membrana mais externa de córion. OBRESHKOVE & FRASER (1940 *apud* GÜINTZEL, 1990) também encontrou duas membranas no desenvolvimento embrionário de *D. magna* e denominou - a de membrana interna vitelínica. Estudos do desenvolvimento embrionário de *Pseudosida ramosa* realizados por FREITAS & ROCHA, (2006), também indicaram a presença de duas membranas nos estágios recentes do desenvolvimento embrionário (Estágio I).

ESSLOVÁ (1959), demonstrou a presença de 3 membranas em *D. pulex*, sendo a mais externa denominada de membrana do ovo, e as duas mais internas, 1° e 2° membranas do embrião. A segunda membrana do embrião observada por ESSLOVÁ (1959), é correspondente à cutícula rompida no V estágio de classificação observada neste trabalho.

Segundo SOBRAL *et al*, (2001) esta cutícula serve para cobrir o aparato alimentar do embrião, prevenindo a entrada de água antes do desenvolvimento embrionário completo.

A classificação do desenvolvimento embrionário apresentada neste trabalho segue um padrão similar a de outros estudos realizados com Cladocera, porém alguns autores adotaram outras classificações.

KAST-HUTCHESON *et al*, (2001) dividiu o desenvolvimento embrionário de *D. magna* a 20°C em 3 fases, clivagem (estágio I), gastrulação (estágio II) e organogênese, subdividida em 4 estágios baseados no desenvolvimento da 2° antena e olhos. O desenvolvimento total da neonata ocorreu em 50 horas, duração próxima à obtida neste trabalho (51±5 horas).

Já SOBRAL *et al*, (2001) dividiu o desenvolvimento embrionário, da mesma espécie em apenas em três fases baseando-se na liberação das membranas e separação do espinho caudal.

FOX (1948) classificou desenvolvimento embrionário de *D. magna* a 20°C de acordo com alterações morfológicas e também de acordo com a pigmentação dos olhos. O autor definiu o número dos primeiros estágios pela ausência de

cabeça. Neste trabalho, optou-se por incluir esta característica no estágio II e assim utilizar como parâmetro inicial do estágio III a formação da cabeça.

Apesar de apresentarem as mesmas alterações morfológicas no desenvolvimento embrionário, *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii* apresentaram diferenças quanto à duração dos estágios e no período final do desenvolvimento embrionário.

D. similis apresentou um maior período de desenvolvimento dos ovos partenogenéticos (51 ± 5 horas) que *C. dubia* ($34 \text{ horas} \pm 3 \text{ horas}$) e *C. silvestrii* (36 ± 2 horas). Esta diferença pode ser explicada devido à influência da temperatura, sendo de $20^{\circ}\text{C} (\pm 2)$ para *D. similis* e $25^{\circ}\text{C} (\pm 2)$ para *C. silvestrii*.

Segundo GELLER (1987), o tempo do desenvolvimento embrionário depende da temperatura do ambiente. Temperaturas altas aceleram os processos fisiológicos dos organismos antecipando algumas fases no ciclo de vida.

De acordo com os estudos de JACONETI (2005), *C. dubia* e *C. silvestrii* apresentam idade da primípara (valores médios) de cinco dias em 25°C . Segundo LAMEIRA (2003) *D. similis* apresenta idade da primípara de oito dias em 20°C e a 25°C quatro dias (PEDROSO, 2003). Observa-se que a temperatura tem influência, acelerando o ciclo de vida, fazendo com que a primípara ocorra antes em 25°C do que em 20°C . O mesmo pode ter ocorrido com o desenvolvimento embrionário.

ROCHA (1990), estudou o período do desenvolvimento embrionário para *D. gessneri* a 18°C e a 25°C e obteve um período de desenvolvimento embrionário de três e dois dias respectivamente. Outro estudo realizado por FREITAS & ROCHA (2006) com *Pseudosida ramosa* a 25°C e 30°C , demonstrou a mesma influência da temperatura. Na temperatura de 25°C esta espécie apresentou 50 horas de desenvolvimento embrionário e 30 horas a 30°C .

VENKATARAMA (1980) estudou o desenvolvimento de *D. carinata* a 15° e a 35°C . O desenvolvimento embrionário foi dividido em 8 estágios, para ambas as temperaturas, porém em tempos diferentes. Na temperatura de 15°C o desenvolvimento durou de 131-133 horas e na temperatura de 35° durou de 23-25 horas. Observa-se que em temperaturas maiores o desenvolvimento foi mais acelerado.

Resultados semelhantes foram observados por ESSLOVÁ (1959) que observou para *D. magna* o desenvolvimento embrionário entre 576-648 horas a 2-4°C e 39 horas a 28°C.

A diferença entre o período do desenvolvimento embrionário obtido neste trabalho para *D. similis* e as duas espécies de *Ceriodaphnia* também pode ter sido influenciada pelo tamanho do ovo. De acordo com MUNRO & WHITE (1975), ovos maiores têm maior período de desenvolvimento.

A partir dos resultados obtidos para o desenvolvimento embrionário, definiram-se as condições para realização dos ensaios de teratogenicidade com Cladocera.

6.1.3.2. Metodologia para ensaios de teratogênese com *Daphnia similis*.

A seleção de um organismo-teste em ensaios de teratogênese com embriões é um fator muito importante uma vez que irá se refletir na sensibilidade, repetitividade e confiabilidade dos resultados.

Segundo ASTM (1991; 1998), o desenvolvimento embrionário de um organismo-teste deve ser de fácil identificação, rápido, confiável e não deve proporcionar altos gastos para o ensaio.

Para ensaios de teratogênese com cladóceros optou-se realizá-los com embriões de *D. similis*, devido à presença de espinho caudal e artículos maiores, regiões que podem ser agredidas por substâncias químicas, facilitando a visualização se malformados.

Os parâmetros, temperatura e fotoperíodo adotados para o ensaio de teratogênese com *D. similis* foram baseados no cultivo dos organismos segundo ABNT (2004; 2005) e EPA (2002).

Recomenda-se a utilização do ovo no 1º estágio de desenvolvimento para a utilização nestes ensaios, porém devem apresentar mais de 3 horas de vida, pois de acordo com OTHA *et al*, (1998), ovos com menos de 2 horas são mais sensíveis ao manejo e freqüentemente param o desenvolvimento.

Os ovos devem ser obtidos a partir da 3ª postura de uma fêmea, de acordo com critérios estabelecido pela ABNT (2004; 2005) e EPA (2002) para testes de toxicidade.

A remoção dos ovos deve ser realizada de acordo procedimento estabelecido neste trabalho. De acordo com SOBRAL (2001), os ovos ao serem retirados da câmara de incubação, devem ser lavados a fim de remover o fluido da câmara de incubação.

Autores como SOBRAL *et al*, (2001) e KAST-HUTCHESON *et al*, (2001) optaram pela exposição individual dos organismos. A fim de otimizar o ensaio, optou-se pela exposição de 5 ovos por réplica, de modo a seguir os mesmos critérios estabelecidos para ensaios para avaliação da toxicidade aguda.

A renovação da solução-teste e alimentação dos embriões não são necessárias, já que o teste tem curta duração, e os organismos apresentam uma cutícula que reveste o aparato alimentar do embrião e é rompida somente no último estágio do desenvolvimento embrionário (SOBRAL, 2001).

OTHA *et al*, (1998), ABE *et al*, (2001), KAST-HUTCHESON *et al*, (2001), SOBRAL *et al*, (2001), e ZHANG *et al*, (2003), observaram os embriões diariamente, porém neste trabalho optou-se pela observação somente no período final do desenvolvimento para não ocorrer danos em razão de manipulação excessiva durante o ensaio. Além disso, o objetivo deste teste é observar a ocorrência ou não de malformações no final do desenvolvimento embrionário, possível de se observar somente no final do ensaio.

Uma única observação no ensaio não comprometerá os resultados se for realizada no período final do desenvolvimento, pois no término do teste as malformações das neonatas poderão ser observadas com maior facilidade do que no embrião.

A aceitabilidade do teste (Sobrevivência > 90%, malformação < 10% e desenvolvimento completo > 90% dos organismos do controle) foi baseada na ASTM 1991 "*Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay – Xenopus*".

Os parâmetros adotados para os testes com *Xenopus* sp são: mortalidade de embriões, inibição do crescimento e malformações, sendo registradas malformações apenas aquelas presentes em embriões vivos. Para os ensaios de teratogênese com cladóceros optou-se pela observação da mortalidade de embriões, malformações e retardamento no desenvolvimento embrionário, sendo os dois últimos registros em embriões vivos. Os organismos foram considerados

mortos quando ocorreu falha no desenvolvimento do ovo e quando o embrião não apresentou movimento.

O retardamento do desenvolvimento embrionário foi considerado um “endpoint” devido a estudos realizados por OTHA *et al*, (1998) que observou um período de desenvolvimento embrionário maior para *D. magna* quando exposta a ETU (Ethylenethiourea) na concentração de 20 mg.L⁻¹.

6.1.3.3. Ensaios de teratogênese com Triclosan para *Daphnia similis*.

Substâncias tóxicas quando em contato com uma fêmea no período de gestação podem causar efeitos irreversíveis aos embriões que resultam em malformações (teratogênese), desenvolvimento tardio ou até a morte (FIG. 19).

FIGURA 19 – resultado da exposição materna a agentes químicos durante o período de gestação. FONTE: SANSEVERINO *et al*, (2001).

As malformações encontradas nos ensaios com Triclosan foram semelhantes às encontradas por outros autores como ABE (2001); KAST-HUTCHESON *et al*, (2001) e ZHANG *et al*, (2003) no estudo da toxicidade de Anilinas, Propiconazole e Nonifenol respectivamente, para embriões de *Daphnia magna*.

Deformidades nas antenas e no espinho terminal indicam a interferência destes tóxicos em estágios tardios do desenvolvimento, uma vez que a formação destas estruturas ocorre a partir dos estágios III (classificação definida neste

trabalho). Portanto, existe a possibilidade de estágios tardios, do desenvolvimento embrionário, apresentarem maior sensibilidade aos tóxicos do que estágios recentes. De acordo com BODAR (1989), as membranas presentes nos ovos (características dos estágios I e II definidos neste trabalho), podem evitar a passagem de químicos e agressores mecânicos para dentro do ovo, tornando estes estágios mais resistentes à ação de tóxicos.

Estágios tardios de desenvolvimento embrionário, como por exemplo, estágios III e IV, são caracterizados pela presença de apenas uma membrana envolvendo o embrião o que possibilita maior entrada de água para dentro do embrião e, conseqüentemente, maior a exposição aos tóxicos.

Alguns embriões expostos ao Triclosan tiveram o desenvolvimento embrionário retardado quando comparados ao período de desenvolvimento dos embriões do controle. OTHA (1998), também observou este retardamento para embriões de *D. magna* expostos a 20 mg.L⁻¹ de ETU (Ethylenethiourea). De acordo com o retardamento no desenvolvimento pode ser uma característica de mudanças na atividade normal de enzimas.

6.1.4. Ensaios agudos, crônicos e de teratogênese com Triclosan.

A TAB.29 sumariza os resultados obtidos nos ensaios realizados com *Daphnia similis* para avaliação da toxicidade.

TABELA 29 – Toxicidade de Triclosan (mg.L⁻¹) para os diferentes ensaios realizados com *Daphnia similis* com água natural como água de diluição.

TESTE AGUDO mg.L ⁻¹	TESTE CRÔNICO mg.L ⁻¹			TESTE COM EMBRIÃO mg.L ⁻¹	
CE50,48H	CEO (Reprodução)	CEO (Sobrevivência)	IC50;51H (Malformação)	IC50;51H (Malformação)	IC50;51H (Mortalidade)
0,23	0,1	0,2	0,058	0,075	0,29

As deformidades encontradas nos testes crônicos (espinho caudal curvado, antenas incompletas) foram às mesmas evidenciadas nos testes com a exposição

direta de embriões. Além disso, a concentração que causou malformação nos ensaios de teratogênese ($0,075 \text{ mg.L}^{-1}$) foi próxima àquela que causou nos ensaios de ecotoxicidade crônicos ($0,57$ e $0,058 \text{ mg.L}^{-1}$), porém neste último, a concentração foi menor. Autores como KAST-HUTCHESON *et al*, (2001) e ZHANG *et al*, (2001), encontraram menor sensibilidade na exposição direta de embriões de *D. magna* do que na exposição materna (ensaio de toxicidade crônica).

ZHANG *et al*, (2001) observou que a exposição materna de *D. magna* ao Nonifenol resultou em mesmas deformidades que a exposição direta do embrião, porém a toxicidade para os embriões foi menor quando comparadas à toxicidade obtida nos testes de toxicidade crônica. O autor obteve CE50 letalidade na concentração de $738 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ e CE50 deformidade em $238 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Noniphenol para embriões expostos diretamente ao produto e CEO de $12,25 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ para mortalidade em testes crônicos.

KAST-HUTCHESON *et al*, (2001) na exposição de *D. magna* ao Propiconazole também encontrou maior toxicidade para embriões mediante exposições maternas. Segundo a autora é possível a ocorrência de uma biotransformação do produto pelo organismo materno dando origem a um produto mais tóxico.

Os resultados obtidos nos testes agudos e nos ensaios de teratogênese com *D. similis* neste trabalho sugerem que os embriões apresentam maior sensibilidade para detectar efeito de contaminantes do que estágios tardios. Resultados semelhantes a este foram também observados por autores como BAIR *et al*, (1991) e ABE *et al*, (2001) com *D. magna*. De acordo com os estudos de ABE *et al*, (2001), embriões de *D. magna* foram mais sensíveis que os juvenis para quase todas as Anilinas testadas.

Estudos realizados por BODAR *et al*, (1989), demonstraram resultados contrários a estes. O autor demonstrou que estágios recentes de vida de *D. magna* são mais tolerantes aos metais pesados (Cádmio e Cobre) que estágios juvenis. O valor de CE50 para Cádmio nos testes agudos observado pelo autor foi de $0,45 \text{ mg.L}^{-1}$, o valor de CEO de $0,30 \text{ mg.L}^{-1}$ e CE50 de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ nos testes com embrião. Estes valores podem ser explicados pela capacidade de proteção

da membrana presente em estágios recente do desenvolvimento embrionário e também pela ação do contaminante testado (metal).

6.1.5. Vantagens do ensaio de teratogênese com *Daphnia similis*.

Metodologias de testes de ecotoxicidade estão sendo desenvolvidas e adaptadas para proporcionar resultados eficazes e mais rápidos sobre efeitos subletais dos contaminantes.

GUILHERMINO *et al*, (1999), adaptou a metodologia dos testes crônicos mediante a diminuição do período de exposição dos organismos (*D. magna*), calculando somente a CEO da primeira postura. O estudo demonstrou que este período é suficiente para prever efeitos crônicos na reprodução para alguns produtos químicos, porém não é eficaz para determinar efeitos de substâncias químicas que apresentam efeito cumulativo e efeito no crescimento dos organismos.

Alguns tóxicos podem influenciar a fecundidade indiretamente por meio da inibição do crescimento da fêmea e com isso, influenciar no tamanho da câmara de incubação. Outros tóxicos podem penetrar na carapaça da mãe e afetar os ovos no ovário ou câmara de incubação gerando absorção pelos ovos (BAIRD *et al*, 1991) ou induzindo malformação. Efeitos como estes últimos não podem ser evidenciados em testes crônicos, pois estes testes analisam somente a viabilidade das neonatas produzidas.

De acordo com os resultados deste trabalho, os testes com embriões de *D.similis* podem prever os efeitos crônicos de um contaminante em menor período, custo e determinar os efeitos subletais não evidenciados em testes crônicos.

Atualmente os ensaios de teratogênese tradicionais, como FETAX, são realizados principalmente para se extrapolar o potencial teratogênico para a espécie humana, uma vez que as fases iniciais de desenvolvimento destes organismos são semelhantes às fases iniciais do desenvolvimento embrionário dos seres humanos. Além disso, um dos mais comuns argumentos para o uso de FETAX em análises de risco ambientais é que existe uma evidência de declínio e extinção de espécies de anfíbios no mundo (BLAUSTEIN & WAKE, 1991), como

também, o aumento da ocorrência de malformações em *Rana sp* no Norte da América (HOKE & ANKLEY, 2005).

A ocorrência de malformações em cladóceros também foi relatada no estudo realizado por BOHRER (1995) nas Lagoas do sistema de tratamento terciário de efluentes no Pólo Petroquímico do Rio Grande do Sul. Malformações na carapaça de *Daphnia magna* também foram observadas por BRENTANO (2006) ao expô-las ao efluente do Aterro Sanitário de Biguaçu, Santa Catarina.

Um animal mal formado no ambiente pode não chegar à fase adulta, não se reproduzir como também, ser uma presa fácil para outros organismos, o que pode acarretar efeitos na dinâmica da população e da comunidade onde vive. Neste contexto destaca-se a importância da aplicação de testes com embriões para aprofundar o conhecimento dos efeitos subletais seja de produtos químicos ou amostras ambientais fornecendo subsídios para avaliações de risco.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novas formulações químicas são produzidas diariamente e muitas vezes entram nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) antes de serem lançadas nos ecossistemas aquáticos ou são lançadas diretamente.

As substâncias que adentram as ETEs, fazem com que o esgoto tanto doméstico quanto industrial, sofram alterações em sua composição e características, o que pode comprometer a eficiência dos Sistemas de Tratamento, muitas vezes não planejado para remover estes produtos.

Dentre as substâncias que não são totalmente removidas pelas ETEs encontram-se os fármacos. Triclosan, como visto anteriormente, na concentração na qual se encontra no ambiente aquático na concentração de 0,00005 – 0,0023 mg.L⁻¹ (MCMURRY *et al*, 1998), pode interferir na qualidade da água para a vida aquática.

De acordo com SODRE *et al*, (2007), há a necessidade de adequação nos sistemas de tratamento de esgotos convencional para contemplar também a remoção dessa classe de contaminantes, considerados emergentes, pois caso presente nos ecossistemas naturais pode ser transferido para a água potável. Este autor observou a presença de produtos como dietilftalato, cafeína, bisfenol A, estradiol, progesterona e colesterol, na água potável distribuída à população de

Campinas, SP e concluiu que estes fármacos podem ter origem no lançamento de esgoto tratado incorporado ao Rio Atibaia na região de Campinas.

JONES *et al*, (2005) comparou o uso do sistema de lagoas e tratamento com lodo ativado durante a remoção do fármaco diclofenaco em lagoas da Suíça e observou que a remoção foi 76% maior no sistema de lagoas. Os sistemas de lagoas de sedimentação são importantes para a degradação de compostos, principalmente quando fotossensíveis. (REIS *et al*, 2007).

Além da adequação dos Sistemas de tratamento de esgoto para remoção de fármacos, existe a necessidade de incluir estes produtos em Legislações ambientais para o descarte seguro destas substâncias, uma vez que estudos ecotoxicológicos estão sendo realizados e compõe uma base de dados consistente para sustentar estas Legislações.

Diante da complexidade dos efeitos das substâncias químicas, cada vez mais análises ecotoxicológicas de resposta rápida e eficiente para detecção de efeitos subletais estão sendo requeridas por indústrias que fabricam novos compostos químicos que terão como disposição final o ambiente. Os ensaios de teratogênese com *Cladocera* podem auxiliar e complementar os ensaios comumente realizados (agudos e crônicos) por preverem efeitos subletais na reprodução. Com isso, apresentam importância e eficácia na aplicação de Análise de risco ambiental.

8. CONCLUSÕES

- *Ceriodaphnia silvestrii* é mais sensível (CE(I)50;48H de 0,10 mg.L⁻¹) ao Triclosan que *D. similis* (CE(I)50;48H de 0,23 mg.L⁻¹) em ensaios de ecotoxicidade aguda realizados em água natural reconstituída com fotoperíodo.

- A toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan para *C. silvestrii* em água natural reconstituída, com e sem fotoperíodo, é de 0,10 e 0,13 mg.L⁻¹, respectivamente. A presença ou não de luz em 48 horas não interfere na toxicidade aguda de Triclosan para *C. silvestrii* em ensaios realizados em água natural reconstituída.

- Não há diferença na toxicidade aguda (CE(I)50;48H) de Triclosan para *C. dubia* (0,08 mg.L⁻¹) e *C. silvestrii* (0,09 mg.L⁻¹) em água Milli-Q reconstituída, sem fotoperíodo.

- *C. dubia* e *C. silvestrii* são mais sensíveis ao Triclosan (0,08 e 0,09 mg.L⁻¹ respectivamente) do que *D. similis* (0,22 mg.L⁻¹) em água Milli-Q reconstituída, sem fotoperíodo.

- A realização de ensaios sem fotoperíodo com água natural ou Milli-Q reconstituídas não interfere na toxicidade aguda de Triclosan para *C. silvestrii*.

- O valor de CENO (Concentração de Efeito Não Observado) e CEO (Concentração de Efeito Observado) de Triclosan para os ensaios ecotoxicidade crônica (reprodução) com *D. similis* foram, respectivamente, de 0,05 e 0,1 mg.L⁻¹. A concentração de Triclosan que causou efeito na sobrevivência nos ensaios ecotoxicidade crônica para *D. similis* foi de 0,2 mg.L⁻¹. Triclosan causa efeitos teratogênicos, como antenas incompletas e espinho posterior da carapaça curvo, em *D. similis* nos ensaios de ecotoxicidade crônica a partir da concentração 0,05 mg.L⁻¹. Também foi observada a ocorrência de neonatas abortos e com desenvolvimento retardado.

- A mortalidade dos neonatas provavelmente está relacionada aos efeitos teratogênicos pelo fato de que a maior mortalidade esteve presente nas concentrações que induziram malformações.
- O valor de CENO (Concentração de Efeito Não Observado) e CEO (Concentração de Efeito Observado) de Triclosan para os ensaios de ecotoxicidade crônica (reprodução) com *C. silvestrii* foram, respectivamente, de 0,02 e 0,04 mg.L⁻¹. Triclosan na concentração de 0,16 mg.L⁻¹ não causa efeitos de teratogênese nem sobre a sobrevivência de *C. silvestrii*.
- O desenvolvimento embrionário de *D. similis*, *C. dubia* e *C. silvestrii* compreende sete estágios. *D. similis* apresentou um maior período de desenvolvimento dos ovos partenogênicos (51 ± 5 horas) que *C. dubia* (34 horas ± 3 horas) e *C. silvestrii* (36 ± 2 horas).
- *D. similis* é recomendado como organismo-teste em ensaios de teratogênese.
- Triclosan causa malformações (IC50;51horas) em *D. similis* na concentração de 0,075 mg.L⁻¹ em ensaios de teratogênese,
- A concentração de Triclosan (IC50;51horas) que causa malformações para *D. similis* nos ensaios de teratogênese, de 0,075 mg.L⁻¹, não difere das estimadas nos ensaios de ecotoxicidade crônica de 0,0578 mg.L⁻¹.
- Triclosan causa mortalidade (IC50;51horas) de neonatas de *D. similis* na concentração de 0,29 mg.L⁻¹ em ensaios de teratogênese.

APÊNDICE A - Planilhas dos ensaios de ecotoxicidade aguda do solvente DMSO para *D. similis* e *C. silvestrii*.

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Daphnia similis*

Início do teste: 12/11/07				Final do teste: 14/11/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
ÁGUA natural	7,02	8,1	137,3	Substância Química	DMSO	1	VANESSA / FÁBIO/ANGÉLICA

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (μS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	7,1	7,0	132,0	138,0	8,6	-
A. 0,062							0	0	0	0	0	0	7,3	6,9	131,0	138,0	8,6	-
B. 0,104							0	0	0	0	0	0	7,3	6,9	132,0	134,0	8,6	-
C. 0,175							0	0	0	0	0	0	7,4	6,7	133,0	134,0	8,6	-
D. 0,290							0	0	0	0	0	0	7,4	6,8	132,0	132,0	8,6	-
E. 0,490							0	0	0	0	0	0	7,4	6,6	133,0	134,0	8,6	-
F.																		
Resultados	EC(I)50:24H:						EC(I)50:48H: 0						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: - não medido

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii*

Início do teste: 12/11/07				Final do teste: 14/11/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
ÁGUA natural	7,02	8,1	137,3	Substância Química	DMSO	1	VANESSA / FÁBIO/ANGÉLICA

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (μS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	7,1	7,0	132,0	134,0	8,6	-
A. 0,031							0	0	0	0	0	0	7,3	6,8	131,0	132,0	8,6	-
B. 0,052							0	0	0	0	0	0	7,3	6,6	132,0	134,0	8,6	-
C. 0,087							0	0	0	0	0	0	7,4	6,8	133,0	138,0	8,6	-
D. 0,147							0	0	0	0	0	0	7,4	6,6	132,0	138,0	8,6	-
E. 0,250							0	0	0	0	0	0	7,4	6,6	133,0	134,0	8,6	-
F.																		
Resultados	EC(I)50:24H:						EC(I)50:48H: 0						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: - não medido

APÊNDICE B-Planilha dos ensaios de ecotoxicidade aguda do Triclosan para *D. similis* com água natural como água de diluição, com fotoperíodo.

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Daphnia similis* TESTE 1

Início do teste: 12/11/07				Final do teste: 14/11/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água natural Com fotoperíodo	7,04	8,6	131,7	Substância Química	Triclosan	1	VANESSA / FÁBIO / ANGÉLICA

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	7,1	7,3	132,0	132,0	8,6	-
A. 0,062							0	0	0	0	0	0	6,7	7,3	135,2	135,2	8,6	-
B. 0,104							0	0	0	0	0	0	7,2	7,3	135,0	135,0	8,6	-
C. 0,175							1	0	1	0	2	10	7,3	7,3	135,0	135,0	8,6	-
D. 0,290							4	4	5	3	17	85	7,3	7,3	135,3	135,3	8,6	-
E. 0,490							5	5	5	5	20	100	7,3	7,3	134,3	136,0	8,6	-
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,23 (0,21 – 0,26)						Método estatístico utilizado: SK					

- NÃO MEDIDO

OBSERVAÇÕES: LOTE 7 – 14 DIAS DE IDADE

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Daphnia similis* **TESTE 2**

Início do teste: 12/11/07				Final do teste: 14/11/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água natural Com fotoperíodo	7,09	8,6	131,7	Substância Química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (μS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	7,1	7,2	132,0	138,0	8,6	-
A. 0,062							0	1	1	0	2	10	6,7	7,3	185,0	135,0	8,6	-
B. 0,104							1	0	1	0	2	10	7,2	7,2	187,0	138,2	8,6	-
C. 0,175							3	1	2	0	6	30	7,3	7,3	137,0	136,0	8,6	-
D. 0,290							5	5	5	3	18	90	7,3	7,2	136,0	136,8	8,6	-
E. 0,490							5	5	5	5	20	100	7,3	7,2	136,0	136,0	8,6	-
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,20 (0,17 – 0,23)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: LOTE 14 – 21 DIAS DE IDADE

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Daphnia similis* TESTE 3

Início do teste: 12/11/07				Final do teste: 14/11/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água natural Com fotoperíodo	7,0	8,2	140,0	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (μS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	1	0	1	5	7,0	7,1	140,0	142,0	8,2	-
A. 0,062							0	0	1	0	1	5	7,0	7,2	170,0	180,0	8,2	-
B. 0,104							1	0	0	0	1	5	7,1	7,1	178,0	172,0	8,2	-
C. 0,175							1	1	1	0	3	15	7,2	7,1	179,0	168,0	8,2	-
D. 0,290							2	3	3	3	11	55	7,3	7,1	179,0	168,0	8,2	-
E. 0,490							5	5	5	5	20	100	7,3	7,1	179,0	170,0	8,2	-
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,26 (0,23 – 0,31)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: LOTE 0 – 7 DIAS DE IDADE

APÊNDICE C-Planilha dos ensaios de ecotoxicidade aguda do Triclosan para *C. silvestrii* com água natural como água de diluição, com fotoperíodo

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii* TESTE 1

Início do teste: 09/11/07				Final do teste: 11/11/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água natural Com fotoperíodo	7,04	8,2	132,0	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							1	1	0	0	2	10	7,0	7,0	132,1	133,9	8,2	8,0
A. 0,031							0	2	0	3	5	25	6,9	9,9	137,4	148,2	8,2	8,1
B. 0,052							1	1	2	3	7	35	7,0	7,0	131,8	132,6	8,2	8,2
C. 0,087							3	2	2	2	9	45	7,0	7,0	132,2	132,7	8,3	8,1
D. 0,147							3	2	2	2	9	45	7,1	7,0	132,1	132,7	8,2	8,1
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,1	7,1	131,7	132,1	8,2	8,1
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,11 (0,07 – 0,16)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: LOTE 0 – 7 DIAS DE IDADE

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii* TESTE 2

Início do teste: 09/11/07				Final do teste: 11/11/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água natural Com fotoperíodo	7,0	8,2	132,1	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L^{-1})	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. ($\mu\text{S/cm}$)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	1	0	1	5	7,0	6,9	132,1	133,9	8,2	8,0
A. 0,031							2	1	2	0	5	25	6,9	6,9	137,4	148,2	8,2	8,1
B. 0,052							1	2	2	1	6	30	7,0	7,1	131,8	132,6	8,2	8,1
C. 0,087							2	1	1	2	6	30	7,0	7,1	132,2	132,7	8,2	8,1
D. 0,147							3	3	2	3	11	55	7,1	7,1	132,1	132,7	8,2	8,1
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,1	7,1	131,7	132,1	8,2	8,1
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,12 (0,08 – 0,17)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: LOTE 7 – 14 DIAS DE IDADE

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii* TESTE 3

Início do teste: 12/11/07				Final do teste: 14/11/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água natural Com fotoperíodo	7,0	8,6	131,7	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	7,1	7,3	132,0	144,2	8,6	-
A. 0,031							1	0	1	0	2	10	7,3	6,9	132,0	145,5	8,6	-
B. 0,052							1	2	3	2	8	40	7,3	6,9	132,0	145,6	8,6	-
C. 0,087							2	2	3	3	10	50	7,3	7,0	132,0	144,4	8,6	-
D. 0,147							5	2	4	3	14	70	7,4	7,0	132,0	144,4	8,6	-
E. 0,250							4	5	5	5	19	95	7,3	7,3	131,0	143,2	8,6	-
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,08 (0,06 – 0,10)						Método estatístico utilizado: SK					

APÊNDICE D - Planilhas dos ensaios de ecotoxicidade aguda do Triclosan para *C. silvestrii* com água natural como água de diluição, sem fotoperíodo

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para Ceriodaphnia silvestrii TESTE 1

Início do teste: 12/11/07				Final do teste: 14/11/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água natural Sem fotoperíodo	7,02	7,2	125,6	Substância química	triclosan	1	VANESSA / FÁBIO

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	7,0	6,7	125,6	130,0	7,2	7,0
A. 0,031							0	1	1	0	2	10	7,1	6,9	133,5	133,2	7,2	7,0
B. 0,052							0	0	0	2	2	10	7,1	6,9	130,6	132,1	7,2	7,0
C. 0,087							2	2	1	1	6	30	7,2	7,0	130,6	130,5	7,3	7,0
D. 0,147							3	2	2	3	10	50	7,3	7,0	129,5	130,6	7,3	7,0
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,4	7,0	128,7	129,6	7,3	7,0
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,13 (0,10 – 0,15)						Método estatístico utilizado: SK					

- NÃO MEDIDO

OBSERVAÇÕES: LOTE 0 – 7 DIAS DE IDADE

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii* TESTE 2

Início do teste: 26/06/07				Final do teste: 28/06/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água natural Sem fotoperíodo	7,02	7,2	125,6	Substância química	triclosan	1	VANESSA / FÁBIO

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	2	2	10	7,0	6,7	125,6	130,0	7,2	7,0
A. 0,031							1	0	1	0	2	10	7,1	6,9	133,2	133,2	7,2	7,0
B. 0,052							1	1	1	2	5	25	7,1	6,9	130,6	132,1	7,2	7,0
C. 0,087							2	1	0	1	4	20	7,2	6,9	130,3	130,5	7,2	7,0
D. 0,147							0	2	2	1	5	25	7,3	7,0	129,5	130,6	7,3	7,0
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,4	7,0	128,7	129,6	7,3	7,0
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,14 (0,12 – 0,18)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: LOTE 7 – 14 DIAS DE IDADE

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii* TESTE 3

Início do teste: 12/11/07				Final do teste: 14/11/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água natural Sem fotoperíodo	7,0	7,5	140,0	Substância química	triclosan	1	VANESSA

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	2	0	0	2	10	7,0	7,4	134,0	133,4	7,5	8,0
A. 0,031							2	1	3	2	8	40	6,9	7,4	135,7	131,4	7,5	8,0
B. 0,052							3	1	3	1	8	40	7,1	7,4	136,0	132,8	7,5	8,0
C. 0,087							1	2	2	4	9	45	7,2	7,4	140,8	133,7	7,4	8,0
D. 0,147							3	4	3	4	14	70	7,2	7,4	141,0	134,0	7,5	8,0
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,2	7,4	139,0	133,4	7,4	8,0
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,09 (0,05 – 0,17)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: LOTE 0 – 7 DIAS DE IDADE

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para Ceriodaphnia silvestrii TESTE 4

Início do teste: 21/08/07				Final do teste: 23/08/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água natural Sem fotoperíodo	6,98	7,5	146,7	Substância química	triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	6,9	7,8	146,7	140,8	7,5	7,4
A. 0,031							0	0	0	0	0	0	7,0	7,2	145,9	140,6	7,5	7,4
B. 0,052							0	0	0	1	1	5	6,8	7,2	146,1	140,5	7,5	7,4
C. 0,087							0	0	0	0	1	5	6,9	7,3	146,2	140,4	7,5	7,3
D. 0,147							1	1	1	1	4	20	6,9	7,2	145,8	140,9	7,5	7,3
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,0	7,1	146,5	141,0	7,4	7,2
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,16 (0,15 – 0,18)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES:

APÊNDICE E - Planilhas dos ensaios de ecotoxicidade aguda do Triclosan para *D. similis* com água reconstituída como água de diluição

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para Daphnia similis TESTE PRELIMINAR

Início do teste: 20/05/07				Final do teste: 22/05/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	7,02	8,1	137,3	Substância química	Triclosan	1	VANESSA / FÁBIO

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,0	7,1	137,3	138,0	8,1	7,7
A. 0,031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,9	7,2	136,6	140,0	8,2	7,5
B. 0,061	0	1	0	0	1	5	0	1	0	0	1	5	6,9	7,3	135,6	145,0	8,2	7,4
C. 0,123	0	0	0	1	1	5	2	0	1	1	3	15	6,9	7,3	136,6	142,0	8,2	7,3
D. 0,250	4	4	3	4	15	75	4	3	4	4	15	75	7,0	7,3	136,3	143,0	8,2	7,3
E. 0,500	5	5	5	5	20	100	5	5	5	5	20	100	7,0	7,3	145,0	145,0	8,3	7,4
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,18 (0,15 – 0,22)						Método estatístico utilizado: SK

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Daphnia similis* **TESTE 1**

Início do teste: 22/05/07				Final do teste: 24/05/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	7,01	7,8	164,0	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	7,0	7,3	164,0	163,9	7,8	8,5
A. 0,062							0	1	0	0	1	5	7,4	7,4	161,6	166,3	7,8	8,5
B. 0,104							0	1	0	0	1	5	7,2	7,4	163,7	167,2	7,8	8,5
C. 0,175							2	0	1	0	3	15	7,2	7,4	164,1	167,6	7,8	8,7
D. 0,290							2	1	3	0	6	30	7,2	7,3	163,2	168,0	7,8	8,6
E. 0,490							5	5	5	5	20	100	7,3	7,4	163,0	168,2	7,8	7,6
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,30 (0,26 – 0,35)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES:

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para Daphnia similis
TESTE 2

Início do teste: 19/06/07				Final do teste: 21/06/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	7,0	7,5	129,0	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	1	0	1	5	7,0	7,0	126,0	126,1	7,5	7,4
A. 0,031							0	0	0	1	1	5	7,2	6,84	125,3	126,9	7,4	7,4
B. 0,052							0	1	1	0	2	10	7,2	6,73	127,3	127,5	7,4	7,4
C. 0,087							1	3	2	1	7	35	7,2	6,71	126,7	127,1	7,4	7,4
D. 0,147							5	5	5	3	18	90	7,3	6,87	127,0	127,3	7,5	7,4
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,2	6,79	126,8	128,3	7,6	7,4
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,19 (016 – 0,22)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES:

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para Daphnia similis TESTE 3

Início do teste: 26/06/07				Final do teste: 28/06/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	6,98	7,3	126,0	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	6,9	7,2	126,0	129,3	7,3	6,9
A. 0,031							0	0	0	0	0	0	7,4	7,2	97,8	129,6	7,3	7,0
B. 0,052							1	0	0	0	1	5	7,4	7,2	101,8	129,7	7,3	7,0
C. 0,087							1	4	0	1	6	30	7,4	7,3	116,0	128,6	7,3	7,0
D. 0,147							5	5	5	3	18	80	7,4	7,3	119,3	128,6	7,3	7,0
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,3	7,3	103,3	127,7	7,3	7,0
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,20 (0,17 – 0,23)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: lote 14 - 21 dias

APÊNDICE F - Planilhas dos ensaios de ecotoxicidade aguda do Triclosan para *C. dubia* com água reconstituída como água de diluição, sem fotoperíodo

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para Ceriodaphnia dubia
TESTE PRELIMINAR

Início do teste: 20/05/07				Final do teste: 22/05/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	7,02	8,1	137,3	Substância química	Triclosan	1	VANESSA / FÁBIO

Concentração o (mg.L^{-1})	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. ($\mu\text{S/cm}$)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,0	7,2	137,3	140,7	8,1	7,7
A. 0,031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	7,0	7,2	136,6	141,0	8,2	7,8
B. 0,063	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	7	35	6,9	7,3	135,6	141,0	8,3	7,7
C. 0,125	3	1	1	4	9	45	3	3	5	5	16	80	6,9	7,3	136,6	148,6	8,3	7,6
D. 0,25	5	5	5	5	20	100	5	5	5	5	20	100	6,9	7,4	136,3	148,9	8,2	7,6
E. 0,50	5	5	5	5	20	100	5	5	5	5	5	100	6,9	7,4	136,4	142,3	8,3	7,5
F.																		
Resultados	EC(I)50:24H:						EC(I)50:48H: 0.08 (0.06 – 0.10)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES:

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia dubia* TESTE 1

Início do teste: 20/05/07				Final do teste: 22/05/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	6,9	8,0	165,7	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	6,9	7,3	127,3	-	7,6	7,0
A. 0,031							0	0	0	0	0	0	6,8	7,3	132,5	-	7,5	7,1
B. 0,052							2	1	0	1	4	20	6,8	7,4	132,4	-	7,5	7,2
C. 0,087							3	5	1	2	11	55	6,9	7,4	132,4	-	7,6	7,2
D. 0,147							5	4	5	5	19	95	6,9	7,3	132,6	-	7,6	7,2
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	6,9	7,4	133,2	-	7,6	7,2
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,07 (0,05 – 0,09)						Método estatístico utilizado: SK					

- NÃO MEDIDO

OBSERVAÇÕES: LOTE 0 – 7 DIAS DE IDADE

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia dubia* TESTE 3

Início do teste: 26/06/07				Final do teste: 28/06/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	6,98	7,4	126,0	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							1	1	0	0	2	10	7,0	7,2	126,0	126,1	7,4	7,4
A. 0,031							0	0	1	0	1	5	7,4	7,1	125,3	126,9	7,5	7,4
B. 0,052							0	0	1	1	2	10	7,4	7,1	127,0	127,3	7,6	7,4
C. 0,087							5	2	3	0	10	50	7,3	7,2	126,8	128,3	7,5	7,4
D. 0,147							5	5	5	4	19	95	7,4	7,2	127,3	127,5	7,4	7,4
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,4	7,2	126,7	127,1	7,4	7,4
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,08 (0,07 – 0,10)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: LOTE 0 – 7 DIAS DE IDADE

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia dubia* TESTE 4

Início do teste: 26/06/07				Final do teste: 28/06/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	6,98	7,4	126,0	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	1	0	0	1	5	6,9	7,2	126,0	126,1	7,4	7,4
A. 0,031							1	0	1	0	2	10	7,4	7,2	125,3	126,9	7,5	7,4
B. 0,052							1	0	2	1	4	20	7,4	7,1	127,0	127,3	7,6	7,7
C. 0,087							2	3	3	2	10	50	7,4	7,2	126,8	128,3	7,5	7,4
D. 0,147							5	5	5	4	19	95	7,4	7,2	127,3	127,3	7,4	7,4
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,4	7,2	126,7	127,1	7,4	7,4
F.																		
Resultados	EC(I)50:24H:						EC(I)50:48H: 0.08 (0.07 – 0.10)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: LOTE 7 – 14 DIAS DE IDADE

APÊNDICE G-Planilha dos ensaios de ecotoxicidade aguda do Triclosan para *C. silvestrii* com água reconstituída como água de diluição, sem fotoperíodo

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii*
TESTE PRELIMINAR

Início do teste: 20/05/07				Final do teste: 22/05/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	7,02	8,1	137,3	Substância química	Triclosan	1	VANESSA / FÁBIO

Concentração o (mg.L^{-1})	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. ($\mu\text{S/cm}$)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,0	7,2	137,3	140,7	8,1	7,7
A. 0,031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	7,0	7,2	136,6	141,0	8,2	7,8
B. 0,063	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	7	35	6,9	7,3	135,6	141,0	8,3	7,7
C. 0,125	3	1	1	4	9	45	3	3	5	5	16	80	6,9	7,3	136,6	148,6	8,3	7,6
D. 0,25	5	5	5	5	20	100	5	5	5	5	20	100	6,9	7,4	136,3	148,9	8,2	7,6
E. 0,50	5	5	5	5	20	100	5	5	5	5	20	100	6,9	7,4	136,4	142,3	8,3	7,5
F.																		
Resultados	EC(I)50:24H:						EC(I)50:48H: 0.08 (0.06 – 0.10)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES:

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii*
TESTE 1

Início do teste: 20/05/07				Final do teste: 22/05/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	6,9	8,0	165,7	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (μS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	6,9	7,3	127,3	-	7,6	7,0
A. 0,031							0	0	0	0	0	0	6,8	7,3	132,5	-	7,5	7,1
B. 0,052							2	1	0	1	4	20	6,8	7,4	132,4	-	7,5	7,2
C. 0,087							3	5	1	2	11	55	6,9	7,4	132,4	-	7,6	7,2
D. 0,147							5	4	5	5	19	95	6,9	7,3	132,6	-	7,6	7,2
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	6,9	7,4	133,2	-	7,6	7,2
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0.08 (0.07 – 0.09)						Método estatístico utilizado: SK					

- NÃO MEDIDO

OBSERVAÇÕES: LOTE 0 – 7 DIAS DE IDADE

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii*
TESTE 2

Início do teste: 26/06/07				Final do teste: 28/06/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	6,98	7,4	126,0	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L^{-1})	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. ($\mu\text{S/cm}$)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							1	1	0	0	2	10	7,0	7,2	126,0	126,1	7,4	7,4
A. 0,031							0	0	1	0	1	5	7,4	7,1	125,3	126,9	7,5	7,4
B. 0,052							0	0	1	1	2	10	7,4	7,1	127,0	127,3	7,6	7,4
C. 0,087							5	2	3	0	10	50	7,3	7,2	126,8	128,3	7,5	7,4
D. 0,147							5	5	5	4	19	95	7,4	7,2	127,3	127,5	7,4	7,4
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,4	7,2	126,7	127,1	7,4	7,4
F.																		
Resultados	EC(I)50;24H:						EC(I)50;48H: 0,08 (0,07 – 0,10)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES: LOTE 0 – 7 DIAS DE IDADE

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii*
TESTE 3

Início do teste: 26/06/07				Final do teste: 28/06/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	6,98	7,4	126,0	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (μS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							0	0	0	0	0	0	7,0	7,0	129,4	125,1	8,5	7,9
A. 0,031							1	1	0	1	3	15	6,8	7,1	127,5	123,5	8,7	7,9
B. 0,052							0	2	1	1	4	20	6,8	7,1	127,5	126,6	8,7	7,8
C. 0,087							4	2	3	3	12	60	6,8	7,1	127,5	121,7	8,7	7,8
D. 0,147							5	5	5	5	20	100	6,9	7,1	127,5	127,5	8,7	7,8
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	6,8	7,1	127,5	127,3	8,6	7,8
F.																		
Resultados	EC(I)50:24H:						EC(I)50:48H: 0,08 (0,06 – 0,09)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES:

Teste de avaliação da Toxicidade aguda para *Ceriodaphnia silvestrii*

TESTE 4

Início do teste: 26/06/07				Final do teste: 28/06/07			
Água de cultivo e/ou de diluição				Amostra			Responsável
Lote	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. (μS cm ⁻¹)	Origem	Tipo	Lote	
Água reconstituída Sem fotoperíodo	7,01	7,8	164,0	Substância química	Triclosan	1	VANESSA

Concentração o (mg.L ⁻¹)	Número de indivíduos imóveis/tubo												pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	24 horas						48 horas											
	1	2	3	4	total	%	1	2	3	4	total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle							1	0	1	0	2	10	7,0	7,2	164,0	163,9	7,8	8,5
A. 0,031							2	0	0	0	2	10	7,3	7,2	165,3	166,3	7,6	8,3
B. 0,052							1	1	0	1	3	15	7,4	7,3	163,1	168,0	7,6	8,3
C. 0,087							3	2	0	1	6	30	7,4	7,4	164,5	165,0	7,8	8,3
D. 0,147							4	3	3	4	14	70	7,4	7,4	163,7	168,0	7,9	8,5
E. 0,250							5	5	5	5	20	100	7,4	7,3	163,7	168,0	7,8	8,6
F.																		
Resultados	EC(I)50:24H:						EC(I)50:48H: 0,11 (0,09 – 0,13)						Método estatístico utilizado: SK					

OBSERVAÇÕES:

APÊNDICE H-Planilha dos ensaios de ecotoxicidade crônica do Triclosan para *D. similis* e análises estatísticas.

TESTE 1 (*D. similis*)

Início do teste 29/08/07				Hora: 12:00				Final do teste:										Hora:			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote:							Origem					Tipo									
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: CONTROLE											Observação de neonatas			
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo				
7,00	7,10	8,00	8,00	143,20	145,60	29/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,91	7,02	7,70	8,20	146,30	143,20	30/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,02	6,95	8,20	8,30	148,60	153,20	31/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,95	7,04	7,00	8,00	145,60	143,20	1/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,04	6,90	7,50	8,10	143,20	146,30	2/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,90	7,08	8,20	7,90	153,20	145,60	3/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,88	7,08	8,60	7,50	143,20	143,20	4/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	5/set	.	4	.	.	10	11	10	.	.	.	10	10			
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	6/set	.	.	4	.	8	.	.	.	13	.	10	10			
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	7/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10			
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	8/set	.	9	.	18	.	13	.	.	16	.	10	10			
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	9/set	.	.	.	.	.	.	.	10	.	.	8	10			
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	10/set	.	.	.	.	14	18	20	.	.	15	.	13			
						11/set	.	15	.	12	.	13	.	.	.	.	.	10			
						TOTAL	.	28	.	34	.	34	.	35	.	41	.	43			
							.	28	.	34	.	34	.	35	.	41	.	18			
							.	28	.	34	.	34	.	35	.	41	.	33			
							.	28	.	34	.	34	.	35	.	41	.	342			

Início do teste 12/09/07				Hora:				Final do teste:										Hora:			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra										Responsável				
Lote:							Origem					Tipo									
pH		OD (mg/L)		Cond.		Data	Ponto: A 0,025											Observação de neonatas			
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo				
7,00	7,10	8,00	8,00	143,20	145,60	29/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,91	7,02	7,70	8,20	145,3	146,30	30/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,02	6,95	8,20	8,30	145,3	148,60	31/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,95	7,04	7,00	8,00	156,3	145,60	1/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,04	6,90	7,50	8,10	178,9	143,20	2/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,90	7,08	8,20	7,90	156,3	153,20	3/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,88	7,08	8,60	7,50	136,00	143,20	4/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,54	7,03	8,20	7,90	145,3	146,30	5/set	.	.	.	.	.	.	.	8	3†	1†	10	NORMAIS			
7,08	7,04	8,10	8,10	156,3	159,20	6/set	8	7	10	9	.	3	.	.	.	.	10	NORMAIS			
7,08	7,00	8,20	7,60	178,9	156,30	7/set	.	.	.	.	.	.	9	.	.	.	10	NORMAIS			
7,03	6,91	7,80	8,20	143,20	136,00	8/set	15	8/3 †	15	8	14	16	.	8/2 †	12	8/2 †	10	NORMAIS			
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	143,20	9/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	10/set	20	.	16	14	17	17	16	2/8†	15	13	10	NORMAIS			
						11/set	.	12	.	.	.	.	16	.	.	.	10	NORMAIS			
						TOTAL	43	27	41	31	31	36	41	18	27	21	316				
							43	30	41	31	31	36	41	28	30	24	335				

Continuação: TESTE 1 (*D. similis*)

Início do teste 12/09/07							Hora:							Final do teste:							Hora:						
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável									
							Origem						Tipo														
pH		OD (mg/L)		Cond.		Data	Ponto: B 0,05											Observação de neonatas n = 10									
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo										
6,88	7,08	8,60	7,50	143,20	143,20	29/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	30/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	31/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	1/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	2/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	3/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	4/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	5/set	9	4	9/1†	8	3	.	2	.	2/1†	.	10	6 COM ESPINHO CURVADO E ANTENAS									
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	6/set	.	.	.	.	1	.	6	.	.	1	10	2 COM ESPINHO CURVADO E ANTENAS									
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	7/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	8/set	13	8	11†	13	15	14	14	13	11/2†	13	10	6 COM ESPINHO CURVADO E ANTENAS									
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	9/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	10/set	17	16/2†	10/2†	11	13	10/2†	14	15	18	16	10	3 COM ESPINHO CURVADO E ANTENAS									
						11/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
						TOTAL	39	28	30	32	32	24	36	28	31	30	310										
							39	30	44	32	32	26	36	28	34	30	331										

Início do teste 12/09/07						Hora:				Final do teste:										Hora:			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra												Responsável				
Lote:							Origem						Tipo										
pH		OD (mg/L)		Cond.		Data	Ponto: C 0,1												Observação de neonatas n=10				
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo						
7,00	7,10	8,00	8,00	143,20	145,60	29/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
6,91	7,02	7,70	8,20	146,30	143,20	30/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
7,02	6,95	8,20	8,30	148,60	153,20	31/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
6,95	7,04	7,00	8,00	145,60	143,20	1/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
7,04	6,90	7,50	8,10	143,20	146,30	2/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
6,90	7,08	8,20	7,90	153,20	145,60	3/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
6,88	7,08	8,60	7,50	143,20	143,20	4/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	5/set	6	2	5/1†	.	.	9	11	6	7/4†	1	10	TODOS: ESPINHO CURVADO E ANTENAS					
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	6/set	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	10	TODOS: ESPINHO CURVADO E ANTENAS					
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	7/set	.	.	.	11	.	.	.	.	.	.	10	TODOS: ESPINHO CURVADO E ANTENAS					
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	8/set	15	5/4†	11	.	9/2†	7	3/2†	11	12	13	10	TODOS: ESPINHO CURVADO E ANTENAS					
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	9/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	10/set	18	7/7†	12	9	7/1†	13/6†	9/2†	6/4†	.	2/4†	10	TODOS: ESPINHO CURVADO E ANTENAS					
						11/set	.	.	.	2	.	.	.	.	.	.	10	TODOS: ESPINHO CURVADO E ANTENAS					
						TOTAL	39	12	28	22	16	29	23	24	19	16	228						

Continuação: TESTE 1 (*D. similis*)

Início do teste 12/09/07							Hora:							Final do teste:							Hora:						
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra														Responsável						
							Origem							Tipo													
Lote:																											
pH		OD (mg/L)		Cond.		Data	Ponto: D 0,2																				
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo										
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	29/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	30/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	31/ago	.	†	.	.	.	.	.	.	.	.	9										
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	1/set	.		.	.	.	.	.	.	†	†	7										
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	2/set	.		.	.	†	†	.	.			5										
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	3/set	.		.				.	.			5										
7,04	8,10	8,10	7,60	159,20	159,20	4/set	.		.	.			.	.			5										
7,00	8,20	7,60	8,20	156,30	156,30	5/set	.		.	.			.	.			5										
6,91	7,80	8,20	8,20	136,00	136,00	6/set	.		.	.			.	.			5										
7,02	7,90	8,20	7,60	143,20	143,20	7/set	.		4				.	.			5	TODOS: ESPINHO CURVADO E ANTENAS									
6,95	7,90	8,20	8,20	159,20	146,30	8/set	.		2 †	4/1†							5	TODOS: ESPINHO CURVADO E ANTENAS									
6,9	8,10	8,20	7,60	156,30	148,60	9/set	†							1			4	LIBERADO NO ESTÁGIO 5									
6,9	8,20	7,80	8,20	136,00	156,50	10/set			.	.			4	.			4	TODOS: ESPINHO CURVADO E ANTENAS									
						11/set			.	.			7†	1/4†			4	TODOS: ESPINHO CURVADO E ANTENAS									
						TOTAL	0	0	4	4	0	0	4	2	0	0	14										
							6		5		11		6				28										

Início do teste 12/09/07							Hora:							Final do teste:							Hora:						
Água de cultivo e/ou de diluição Lote:							Amostra														Responsável						
							Origem							Tipo													
pH		OD (mg/L)		Cond.		Data	Ponto: E0,4														Observação de neonatas n=10						
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo										
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	29/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	30/ago	†	†	†	.	†	†	.	†	†	†	2										
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	31/ago	.			†			†				0										
7,04	8,10	8,10	7,60	159,20	159,20	1/set																					
7,00	8,20	7,60	8,20	156,30	156,30	2/set																					
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	3/set																					
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	4/set																					
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	5/set																					
7,04	8,10	8,10	7,60	159,20	159,20	6/set																					
7,00	8,20	7,60	8,20	156,30	156,30	7/set																					
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	8/set																					
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	9/set																					
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	10/set																					
						11/set																					
						TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											

TESTE 2 (*D. similis*)

Início do teste 12/09/07				Hora: 13:00				Final do teste:										Hora:	
Lote:							Amostra												Responsável
							Origem						Tipo						
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: CONTROLE												Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo		
6,90	7,08	8,20	7,90	153,20	145,60	12/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10		
6,88	7,08	8,60	7,50	143,20	143,20	13/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10		
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	14/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10		
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	15/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10		
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	16/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10		
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	17/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10		
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	18/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10		
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	19/set	.	6	.	.	.	5	.	5	.	.	10		
7,00	7,10	8,00	8,00	143,20	145,60	20/set	2	.	3	5	4	0	10	.	7	6	10		
6,91	7,02	7,70	8,20	146,30	143,20	21/set	.	.	7	.	.	12	.	.	.	.	10		
7,02	6,95	8,20	8,30	148,60	153,20	22/set	.	10	.	.	.	.	.	14	.	.	10		
6,95	7,04	7,00	8,00	145,60	143,20	23/set	6	.	11	12	8	.	12	.	14	13	10		
7,04	6,90	7,50	8,10	143,20	146,30	24/set	.	11	.	.	.	12	.	12	.	.	10		
						25/set	14	.	23	22	10	.	14	0	16	16	10		
						TOTAL	22	27	44	39	22	29	36	31	37	35	322		

Início do teste 12/09/07						Hora:				Final do teste:										Hora:	
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra												Responsável		
Lote:							Origem						Tipo								
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: A 0,025												Observação de neonatas n= 10		
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo				
7,00	7,00	8,00	8,00	143,20	145,60	12/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,95	6,91	7,70	8,20	148,60	146,30	13/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,04	7,02	8,20	8,30	145,60	148,60	14/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,90	6,95	7,00	8,00	143,20	145,60	15/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,08	7,04	7,50	8,10	153,20	143,20	16/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,08	6,90	8,20	7,90	143,20	153,20	17/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,03	7,08	8,60	7,50	146,30	143,20	18/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,04	7,02	8,20	7,90	159,20	146,30	19/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,08	7,04	8,10	8,10	145,3	159,20	20/set	4	5	10	.	3	3	9	5	4	7	10				
7,08	7,08	8,20	7,60	156,3	156,30	21/set	.	.	.	9	.	.	.	.	.	.	10				
7,03	7,04	7,80	8,20	178,9	136,00	22/set	14	14	14	3	10	12	11	7	10	10	10				
7,04	7,08	7,90	8,20	156,3	143,20	23/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,06	7,08	7,90	8,20	136,00	156,50	24/set	.	.	.	7	.	12	.	.	.	.	10				
						25/set	14	18	10	.	15	.	21	18	13	15	10				
						TOTAL	32	37	34	19	28	27	41	30	27	32	307				

Continuação: TESTE 2 (*D. similis*)

Início do teste 12/09/07							Hora:							Final do teste:							Hora:	
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra														Responsável	
Lote:							Origem							Tipo								
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: B 0,05														Observação de neonatas n=10	
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo					
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	12/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	13/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	14/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	15/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	16/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	17/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	18/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	19/set	.	.	.	.	.	.	1	.	.	.	10					
6,88	7,08	8,60	7,50	143,20	143,20	20/set	6	4	4	.	5	.	4	7	.	5	10	NORMAL 2 COM ESPINHO CURVADO E				
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	21/set	.	.	.	11	.	.	.	.	†	.	9	NORMAL				
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	22/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	9					
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	23/set	7	15	10	.	11	.	13	17/3†	.	4/3†	9	7 COM ESPINHO CURVADO E				
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	24/set	14	.	.	11	.	17	15	.	.	19	9	4 COM ESPINHO CURVADO E				
						25/set	.	15	11	.	13	.	.	14	.	.	9	3 COM ESPINHO CURVADO E				
						TOTAL	27	34	25	22	29	17	33	38		47	272					

Início do teste 12/09/07							Hora:							Final do teste:							Hora:	
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra														Responsável	
Lote:							Origem							Tipo								
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: C 0,1														Observação de neonatas n=10	
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo					
6,88	7,08	8,60	7,50	143,20	143,20	12/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	13/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	14/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	15/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	16/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	17/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	18/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	19/set	.	.	.	.	4	.	.	.	.	.	10	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	20/set	†	.	.	.	.	8	.	.	.	3/5†	9	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	21/set	.	.	.	7	12	.	6	4	9	.	9	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	22/set	.	3/3†	.	.	.	.	.	.	.	.	9	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	23/set	.	5	5/3†	1/3†	3/4†	6/1†	2/2†	6/2†	.	14	9	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	24/set	.	5	.	.	.	.	.	.	.	.	9	8 ESPINHO CURVADO E ANTENAS / 2				
						25/set	.	1/5†	14/1†	.	.	.	11	10	.	5†	9	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
							.	.	.	.	.	.	.	.	.	.						
						TOTAL	0	11	17	12	17	11	23	16	15	24	146					

Continuação: TESTE 2 (*D. similis*)

Início do teste 12/09/07							Hora:		Final do teste:											Hora:	
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote:							Origem						Tipo								
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: D 0,2											Observação de neonatas n=10			
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo				
7,00	7,10	8,00	8,00	143,20	145,60	12/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,91	7,02	7,70	8,20	146,30	143,20	13/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,02	6,95	8,20	8,30	148,60	153,20	14/set	.	.	.	.	†	.	.	.	.	.	9				
6,95	7,04	7,00	8,00	145,60	143,20	15/set	.	.	.	.	.	.	†	.	.	.	8				
7,04	6,90	7,50	8,10	143,20	146,30	16/set	.	.	.	†	.	.	.	.	.	.	7				
6,90	7,08	8,20	7,90	153,20	145,60	17/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	†	6				
6,88	7,08	8,60	7,50	143,20	143,20	18/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6				
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	19/set	.	.	.	.	.	.	.	†	.	.	5				
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	20/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5				
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	21/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5				
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	22/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5				
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	23/set	.	4/1†	.	.	3/1†	.	.	.	.	.	4				
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	24/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4	TODOS: ESPINHO CURVADO E			
						25/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	4				
						TOTAL	0	4	0	0	0	3	0	0	0	0	7				

[illegible]

TESTE 3 (*Daphnia similis*)

Início do teste: 25/09/07							Hora: 13:00				Final do teste:										Hora:	
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra												Responsável			
Lote:							Origem						Tipo									
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: CONTROLE												Observação de neonatas			
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo					
7,00	7,10	8,00	8,00	143,20	145,60	25/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
6,91	7,02	7,70	8,20	146,30	143,20	26/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,02	6,95	8,20	8,30	148,60	153,20	27/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
6,95	7,04	7,00	8,00	145,60	143,20	28/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,04	6,90	7,50	8,10	143,20	146,30	29/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
6,90	7,08	8,20	7,90	153,20	145,60	30/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
6,88	7,08	8,60	7,50	143,20	143,20	1/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	2/out	21	16	15	19	17	.	.	18	.	.	10					
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	3/out	.	.	.	.	.	18	17	.	21	16	10					
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	4/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	5/out	15	18	15	14	18	.	.	15	.	.	10					
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	6/out	.	.	.	.	.	18	13	.	18	15	10					
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	7/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
						8/out	23	13	17	14	19	11	13	15	12	10	10					
						TOTAL	59	47	47	47	54	47	43	48	51	41	484					

Início do teste 12/09/07				Hora:				Final do teste:										Hora:			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra												Responsável		
Lote:							Origem						Tipo								
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: A												Observação de neonatas		
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo				
7,00	7,00	8,00	8,00	143,20	145,60	25/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,95	6,91	7,70	8,20	148,60	146,30	26/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,04	7,02	8,20	8,30	145,60	148,60	27/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,90	6,95	7,00	8,00	143,20	145,60	28/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,08	7,04	7,50	8,10	153,20	143,20	29/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,08	6,90	8,20	7,90	143,20	153,20	30/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,03	7,08	8,60	7,50	146,30	143,20	1/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,04	7,02	8,20	7,90	159,20	146,30	2/out	9	6	16	.	10	.	.	6	.	18	10	NORMAIS			
7,08	7,04	8,10	8,10	145,3	159,20	3/out	8	13	.	17	.	18	18	.	18	.	10	NORMAIS			
7,08	7,08	8,20	7,60	156,3	156,30	4/out	.	.	.	.	20	.	.	27	.	.	10	NORMAIS			
7,03	7,04	7,80	8,20	178,9	136,00	5/out	12	16	20	.	.	.	.	.	.	10	10	NORMAIS			
7,04	7,08	7,90	8,20	156,3	143,20	6/out	.	.	.	19	.	12	20	.	12	.	10	NORMAIS			
7,06	7,08	7,90	8,20	136,00	156,50	7/out	.	.	.	.	15	.	.	12	.	.	10	NORMAIS			
						8/out	12	18	13	14	.	20	10	.	20	20	10	NORMAIS			
						TOTAL	41	53	49	50	45	50	48	45	50	48	479				

Continuação: TESTE 3 (*D. similis*)

Início do teste 12/09/07							Hora:				Final do teste:										Hora:	
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra												Responsável			
Lote:							Origem						Tipo									
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: B 0,05													Observação de neonatas n=10		
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo					
7,00	7,10	8,00	8,00	143,20	145,60	25/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
6,91	7,02	7,70	8,20	145,3	146,30	26/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,02	6,95	8,20	8,30	145,3	148,60	27/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
6,95	7,04	7,00	8,00	156,3	145,60	28/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,04	6,90	7,50	8,10	178,9	143,20	29/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
6,90	7,08	8,20	7,90	156,3	153,20	30/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
6,88	7,08	8,60	7,50	136,00	143,20	1/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,54	7,03	8,20	7,90	145,3	146,30	2/out	.	.	18	.	15	.	11	.	14	18	10	3 COM ESPINHO CURVADO E				
7,08	7,04	8,10	8,10	156,3	159,20	3/out	10	14	.	14	.	16	9	14	.	.	10	2 COM ESPINHO CURVADO E				
7,08	7,00	8,20	7,60	178,9	156,30	4/out	.	.	.	11	.	.	.	.	.	.	10					
7,03	6,91	7,80	8,20	143,20	136,00	5/out	.	23	12	15	15	.	10	10	13	10	10	7 COM ESPINHO CURVADO E				
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	143,20	6/out	20	.	.	.	26	.	.	.	.	.	10	3 COM ESPINHO CURVADO E				
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	7/out	.	13	20	.	.	.	20	16	20	20	10	3 COM ESPINHO CURVADO E				
						8/out	20	.	.	20	16	.	.	.	.	.	10	2 COM ESPINHO CURVADO E				
						TOTAL	50	50	50	60	46	42	50	40	47	48	483					
Início do teste 12/09/07							Hora:				Final do teste:										Hora:	
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra												Responsável			
Lote:							Origem						Tipo									
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: C 0,1													Observação de neonatas n=10		
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo					
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	25/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	26/set	.	.	.	.	†	.	.	.	.	.	9					
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	27/set	.	.	.	.	.	.	.	.	†	.	8					
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	28/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8					
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	29/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8					
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	30/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8					
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	1/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8					
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	2/out	.	.	9	1	.	10/2†	12/3†	14	.	14/2†	8	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
6,88	7,08	8,60	7,50	143,20	143,20	3/out	8/5†	11	1	11/4†	.	.	.	.	.	.	8	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	4/out	.	.	.	7	.	.	6	4	.	.	8	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	5/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	6/out	.	11	.	10	15	6	16	.	.	16	8	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	7/out	12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
						8/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8	TODOS: ESPINHO CURVADO E				
						TOTAL	20	22	10	29	0	25	24	34	0	30	194					

Continuação: TESTE 3 (*D. similis*)

Início do teste 12/09/07							Hora:							Final do teste:							Hora:	
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável				
Lote:							Origem						Tipo									
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: D 0,2											Observação de neonatas n=10				
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo					
7,00	7,10	8,00	8,00	143,20	145,60	25/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
6,91	7,02	7,70	8,20	146,30	143,20	26/set	.	†	.	.	.	.	.	.	.	.	10					
7,02	6,95	8,20	8,30	148,60	153,20	27/set	†	.	.	.	†	.	.	.	†	†	6					
6,95	7,04	7,00	8,00	145,60	143,20	28/set	.	.	.	†	.	.	†	.	.	.	3					
7,04	6,90	7,50	8,10	143,20	146,30	29/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3					
6,90	7,08	8,20	7,90	153,20	145,60	30/set	.	.	.	.	.	.	.	†	.	.	2					
6,88	7,08	8,60	7,50	143,20	143,20	1/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2					
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	2/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2					
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	3/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2					
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	4/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2					
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	5/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2					
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	6/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2					
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	7/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2					
						8/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2					
							.	.	.	.	.	.	.	.	.	.						
						TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						

Início do teste 12/09/07							Hora:				Final do teste:								Hora:		
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
							Origem						Tipo								
Lote:																		Observação de neonatas n=10			
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto: E0,4														
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo				
7,00	7,10	8,00	8,00	143,20	145,60	25/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,91	7,02	7,70	8,20	146,30	143,20	26/set	†	†	†	†	.	†	†	.	.	†	3				
7,02	6,95	8,20	8,30	148,60	153,20	27/set	.	.	.	.	†	.	.	†	†	.	0				
6,95	7,04	7,00	8,00	145,60	143,20	28/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0				
7,04	6,90	7,50	8,10	143,20	146,30	29/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0				
6,90	7,08	8,20	7,90	153,20	145,60	30/set	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0				
6,88	7,08	8,60	7,50	143,20	143,20	1/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0				
7,54	7,03	8,20	7,90	146,30	153,20	2/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0				
7,08	7,04	8,10	8,10	159,20	143,20	3/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0				
7,08	7,00	8,20	7,60	156,30	146,30	4/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0				
7,03	6,91	7,80	8,20	136,00	146,30	5/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0				
7,04	7,02	7,90	8,20	143,20	148,60	6/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0				
7,06	6,95	7,90	8,20	146,30	156,50	7/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0				
						8/out	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0				
							.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
						TOTAL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					

TESTE CRÔNICO 1 *Daphnia similis*

FISHER'S

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		
	ALIVE	DEAD	TOTAL ANIMALS
CONTROL	10	0	10
0.025	10	0	10
TOTAL	20	0	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,10) (p=0.05) IS 6. b VALUE IS 10.
Since b is greater than 6 there is **no significant difference**
between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		
	ALIVE	DEAD	TOTAL ANIMALS
CONTROL	10	0	10
0.4	0	10	10
TOTAL	10	10	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,10) <p=0.05> IS 6. b VALUE IS 0.
 Since b is less than or equal to 6 there is a significant difference
 between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS				
GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	SIG <P=.05>
	CONTROL	10	0	
1	.0025	10	0	
2	0.05	10	0	
3	0.1	10	0	
4	0.2	10	6	*
5	0.4	10	10	*

Press any key to continue

HOMOGENIDADE

```
E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE CRONICO 1 DS
File: T Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
```

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	2.680	9.680	15.280	9.680	2.680
OBSERVED	3	10	15	10	2

```
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 0.2370
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.
```

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE CRONICO 1 DS
File: T      Transform: NO TRANSFORMATION
Shapiro - Wilk's test for normality
-----
D = 1931.600
W =      0.984
Critical W (P = 0.05) (n = 40) = 0.940
Critical W (P = 0.01) (n = 40) = 0.919
-----
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE CRONICO 1 DS
File: T      Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Var/min Var) =      4.17
Closest, conservative, Table H statistic =      9.9 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==>      R (# groups) =      4,      df (# reps-1) =      9
Actual values      ==>      R (# groups) =      4,      df (# avg reps-1) =      9.00
-----
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

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

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE CRONICO 1 DS
File: T      Transform: NO TRANSFORMATION

-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 4.59

-----
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

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

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE CRONICO 1 DS
File: T      Transform: NO TRANSFORM

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 2 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION      VARIANCE      SD      SEM      C.U. %
-----
1      CONTROLE          52.622      7.254      2.294      21.21
2      0.025              74.044      8.605      2.721      27.23
3      0.05               17.778      4.216      1.333      13.60
4      0.1                70.178      8.377      2.649      37.74
-----

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE CRONICO 1 DS
File: T Transform: NO TRANSFORM

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	CONTROLE	10			
2	0.025	10	7.043	20.6	2.600
3	0.05	10	7.043	20.6	3.200
4	0.1	10	7.043	20.6	12.000

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE CRONICO 1 DS
File: T Transform: NO TRANSFORM

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	CONTROLE	34.200				
2	0.025	31.600	95.00	77.00	10.00	
3	0.05	31.000	83.00	77.00	10.00	
4	0.1	22.200	68.50	77.00	10.00	*

Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

Press any key to continue or Esc to return to menu

TESTE CRÔNICO 2 *Daphnia similis*

FISHER'S

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		
	ALIVE	DEAD	TOTAL ANIMALS
CONTROL	10	0	10
0.025	10	0	10
TOTAL	20	0	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,10) (p=0.05) IS 6. b VALUE IS 10.
Since b is greater than 6 there is no significant difference
between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

Press any key to continue or Esc to return to menu

CA E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		
	ALIVE	DEAD	TOTAL ANIMALS
CONTROL	10	0	10
0.4	0	10	10
TOTAL	10	10	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,10) (p=0.05) IS 6. b VALUE IS 0.
Since b is less than or equal to 6 there is a significant difference
between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS				
GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	SIG <P=.05>
	CONTROL	10	0	
1	0.025	10	0	
2	0.05	10	1	
3	0.1	10	1	
4	0.2	10	7	*
5	0.4	10	10	*

|| Press any key to continue ||

HOMOGENIDADE

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE CRONICO DS 2
File: TESTES CRONICO DS 2 Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	2.680	9.680	15.280	9.680	2.680
OBSERVED	3	8	17	9	3

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 0.6094
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu

```
E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE CRONICO DS 2
File: TESTES CRONICO DS 2      Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality
-----
D = 2695.700
W =      0.967
Critical W (P = 0.05) (n = 40) = 0.940
Critical W (P = 0.01) (n = 40) = 0.919
-----
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu
```

```
E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE CRONICO DS 2
File: TESTES CRONICO DS 2      Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =      6.46
-----
Table Chi-square value =    11.34 (alpha = 0.01, df =  3)
Table Chi-square value =     7.81 (alpha = 0.05, df =  3)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu
```

```

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE CRONICO DS 2
File: TESTES CRONICO DS 2      Transform: NO TRANSFORMATION

Cochran's test for homogeneity of variance
-----
Calculated G statistic = 0.5444
Table value = 0.57 (alpha = 0.01, df = 4,10)
Table value = 0.50 (alpha = 0.05, df = 4,10)
-----

Data PASS homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
NOTE: Cochran's test is most powerful for detecting one large
deviant variance.

Press any key to continue

```

```

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE CRONICO DS 2
File: TESTES CRONICO DS 2      Transform: NO TRANSFORM

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N    MIN    MAX    MEAN
-----
1    CONTROLE        10    22.000  44.000  32.200
2    0.025            10    19.000  41.000  30.700
3    0.05             10    0.000   47.000  27.200
4    0.1              10    0.000  24.000  14.600
-----

Press any key to continue

```

CA E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE CRONICO DS 2
File: TESTES CRONICO DS 2 Transform: NO TRANSFORM

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	CONTROLE	53.067	7.285	2.304	22.62
2	0.025	36.900	6.075	1.921	19.79
3	0.05	163.067	12.770	4.038	46.95
4	0.1	46.489	6.818	2.156	46.70

Press any key to continue or Esc to return to menu

CA E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE CRONICO DS 2
File: TESTES CRONICO DS 2 Transform: NO TRANSFORM

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	1918.075	639.358	8.538
Within (Error)	36	2695.700	74.881	
Total	39	4613.775		

Critical F value = 2.92 (0.05,3,30)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE CRONICO DS 2
File: TESTES CRONICO DS 2 Transform: NO TRANSFORM

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	CONTROLE	32.200	32.200		
2	0.025	30.700	30.700	0.388	
3	0.05	27.200	27.200	1.292	
4	0.1	14.600	14.600	4.548	*

Dunnett table value = 2.15 (1 Tailed Value, P=0.05, df=30,3)

Press any key to continue

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE CRONICO DS 2
File: TESTES CRONICO DS 2 Transform: NO TRANSFORM

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	CONTROLE	10			
2	0.025	10	8.320	25.8	1.500
3	0.05	10	8.320	25.8	5.000
4	0.1	10	8.320	25.8	17.600

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE CRONICO DS 2
 File: TESTES CRONICO DS 2 Transform: NO TRANSFORM

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	CONTROLE	32.200				
2	0.025	30.700	98.50	77.00	10.00	
3	0.05	27.200	92.00	77.00	10.00	
4	0.1	14.600	59.00	77.00	10.00	*

Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

Press any key to continue or Esc to return to menu

TESTE 3
FISHER'S TEST

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		
	ALIVE	DEAD	TOTAL ANIMALS
CONTROL	10	0	10
0.025	10	0	10
TOTAL	20	0	20

CRITICAL FISHER'S VALUE <10,10,10> <p=0.05> IS 6. b VALUE IS 10.
Since b is greater than 6 there is no significant difference
between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		TOTAL ANIMALS
	ALIVE	DEAD	
CONTROL	10	0	10
0.05	10	0	10
TOTAL	20	0	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,10) (p=0.05) IS 6. b VALUE IS 10.
 Since b is greater than 6 there is **no significant difference**
 between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		TOTAL ANIMALS
	ALIVE	DEAD	
CONTROL	10	0	10
0.1	8	2	10
TOTAL	18	2	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,10) (p=0.05) IS 6. b VALUE IS 8.
 Since b is greater than 6 there is **no significant difference**
 between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

Press any key to continue or Esc to return to menu

FILE E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		
	ALIVE	DEAD	TOTAL ANIMALS
CONTROL	10	0	10
0.2	2	8	10
TOTAL	12	8	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,10) (p=0.05) IS 6. b VALUE IS 2.
 Since b is less than or equal to 6 there is a significant difference
 between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

Press any key to continue or Esc to return to menu

FILE E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

FISHER'S EXACT TEST			
IDENTIFICATION	NUMBER OF		
	ALIVE	DEAD	TOTAL ANIMALS
CONTROL	10	0	10
0.4	0	10	10
TOTAL	10	10	20

CRITICAL FISHER'S VALUE (10,10,10) (p=0.05) IS 6. b VALUE IS 0.
 Since b is less than or equal to 6 there is a significant difference
 between CONTROL and TREATMENT at the 0.05 level.

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS				
GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	SIG (P=.05)
1	CONTROL	10	0	
2	0.025	10	0	
3	0.05	10	0	
4	0.1	10	2	
5	0.2	10	8	*
	0.4	10	10	*

|| Press any key to continue ||

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTES 3 CRONICO D SIMILIS
 File: TESTES E CRONICO DS Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's test for normality

D = 1929.800
 W = 0.937

Critical W (P = 0.05) (n = 40) = 0.940
 Critical W (P = 0.01) (n = 40) = 0.919

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu

```
E:\MAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTES 3 CRONICO D SIMILIS
File: TESTES E CRONICO DS      Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Uar/min Uar) = 12.57
Closest, conservative, Table H statistic = 9.9 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==>      R (# groups) = 4,      df (# reps-1) = 9
Actual values ==>      R (# groups) = 4,      df (# avg reps-1) = 9.00
-----
Data FAIL homogeneity test. Try another transformation.
NOTE: This test requires equal replicate sizes. If they are unequal
      but do not differ greatly, Hartley's test may still be used
      as an approximate test (average df are used).

Press any key to continue or Esc to return to menu
```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTES 3 CRONICO D SIMILIS
File: TESTES E CRONICO DS      Transform: NO TRANSFORMATION

-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 15.58

-----
Table Chi-square value = 11.34 (alpha = 0.01, df = 3)
Table Chi-square value = 7.81 (alpha = 0.05, df = 3)

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

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTES 3 CRONICO D SIMILIS
File: TESTES E CRONICO DS      Transform: NO TRANSFORMATION

Cochran's test for homogeneity of variance
-----
Calculated G statistic = 0.6832
Table value = 0.57 (alpha = 0.01, df = 4,10)
Table value = 0.50 (alpha = 0.05, df = 4,10)

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

NOTE: Cochran's test is most powerful for detecting one large
      deviant variance.

Press any key to continue

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTES 3 CRONICO D SIMILIS
File: TESTES E CRONICO DS Transform: NO TRANSFORM

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	CONTROLE	10	41.000	59.000	48.400
2	0.025	10	41.000	53.000	47.900
3	0.05	10	40.000	60.000	48.300
4	0.1	10	0.000	34.000	19.400

Press any key to continue

GA E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTES 3 CRONICO D SIMILIS
File: TESTES E CRONICO DS Transform: NO TRANSFORM

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	UARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	CONTROLE	26.933	5.190	1.641	10.72
2	0.025	11.656	3.414	1.080	7.13
3	0.05	29.344	5.417	1.713	11.22
4	0.1	146.489	12.103	3.827	62.39

Press any key to continue or Esc to return to menu

GA E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTES 3 CRONICO D SIMILIS
File: TESTES E CRONICO DS Transform: NO TRANSFORM

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	6222.200	2074.067	38.691
Within (Error)	36	1929.800	53.606	
Total	39	8152.000		

Critical F value = 2.92 (0.05,3,30)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTES 3 CRONICO D SIMILIS
File: TESTES E CRONICO DS Transform: NO TRANSFORM

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	CONTROLE	48.400	48.400		
2	0.025	47.900	47.900	0.153	
3	0.05	48.300	48.300	0.031	
4	0.1	19.400	19.400	8.857	*

Dunnett table value = 2.15 <1 Tailed Value, P=0.05, df=30,3>

Press any key to continue

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTES 3 CRONICO D SIMILIS
File: TESTES E CRONICO DS Transform: NO TRANSFORM

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	CONTROLE	10			
2	0.025	10	7.040	14.5	0.500
3	0.05	10	7.040	14.5	0.100
4	0.1	10	7.040	14.5	29.000

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTES 3 CRONICO D SIMILIS
File: TESTES E CRONICO DS Transform: NO TRANSFORM

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	CONTROLE	48.400				
2	0.025	47.900	108.50	77.00	10.00	
3	0.05	48.300	106.50	77.00	10.00	
4	0.1	19.400	55.00	77.00	10.00	*

Critical values use k = 3, are 1 tailed, and alpha = 0.05

Press any key to continue or Esc to return to menu

APÊNDICE I-Planilha dos ensaios de ecotoxicidade crônica do Triclosan para *C. silvestrii* com o fornecimento de alga e ração como alimento e análises estatísticas.

TESTE 1 (*C. silvestrii*) alga + ração

Início do teste: 29/06/07						Hora:						Final do teste: 06/07/07										Hora:					
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra												Responsável								
Lote:							Origem						Tipo														
pH		OD (mg/L)		Cond. (mS25/cm)		Data	Ponto:												Tamanho			Observação de neonatas					
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3							
7,03	7,64	7,8		136,2	134,2	29/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.										
7,04	7,49	8,2	7,9	136,1	140,0	30/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.										
7,03	7,40	7,7	8,0	134,9	138,0	1/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.										
7,03	7,64	7,5		140,4	138,7	2/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.										
7,06	7,08	7,0	7,8	138,9	142,0	3/jul	4	4	4	4	4	4	3	4	4	3											
7,07	7,28	7,9	7,7	126,0	142,8	4/jul	.	11	10	8	8	9	7	6	6	7											
7,05	7,15	8,0	9,1	137,0	140,1	5/jul	7	.	.	.	.	.	.	.	.	.											
						6/jul	16	14	11	14	14	15	15	15	11	12											
						Total	27	29	25	26	26	28	25	25	21	22	254										
Início do teste:						Hora: 15:30						Final do teste:										Hora: 13:30					
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra												Responsável								
Lote: 26							Origem						Tipo														
							Substância Química						Triclosan														
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: A - 0,005 mg/L												Tamanho			Observação de neonatas					
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3							
6,80	7,43	7,7	7,9	147,0	145,6	29/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10										
7,24	7,26	7,4	7,8	144,6	154,6	30/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.											
6,92	7,33	7,8	8,0	146,3	152,0	1/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.											
7,16	7,38	8,1	7,6	145,8	149,6	2/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.											
7,14	7,40	7,6	7,6	146,8	146,3	3/jul	4	3	5	4	3	4	4	5	4	4											
7,35	7,50	7,5	7,5	165,4	148,2	4/jul	8	7	9	10	9	10	10	7	12	10											
7,32	7,08	7,4	7,6	145,3	146,6	5/jul	11	12	.	.	.	.	.	14	†	.											
						6/jul	.	.	14	13	11	15	12	.		12											
						Total	23	22	28	27	23	29	26	26	16	26	246										

Continuação: TESTE 1 (*C. silvestrii*) alga + ração

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem						Tipo								
							Substância Química						Triclosan								
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: B - 0,01 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
6,80	6,92	8,1	7,8	152,0	145,2	29/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,21	7,16	7,6	8,0	149,6	146,3	30/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,92	7,33	7,7	7,6	146,3	145,8	1/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,18	7,38	7,4	7,8	145,3	146,8	2/jul	.	.	.	4	.	.	.	.	.	.					
7,06	7,40	8,1	8,0	145,6	145,3	3/jul	4	4	4	4	4	.	5	4	5	4					
7,35	7,43	7,6	8,0	143,7	150,0	4/jul	10	11	7	7	8	7	10	8	10	8					
7,65	7,26	7,3	8,2	146,2	152,0	5/jul	.	11	12	13	10	9	.	11	.	.					
						6/jul	13	.	.	.	.	.	15	.	13	18					
						Total	27	26	23	28	22	16	30	23	28	30	253				

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem						Tipo								
							Substância Química						Triclosan								
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: C - 0,02 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,08	7,58	8,0		135,6	135,0	29/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,03	7,57	8,0	7,8	136,2	138,8	30/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,08		7,9	7,7	135,4	138,4	1/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,89	7,50	7,9	7,3	139,8	139,9	2/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,19	7,06		7,9	137,8	140,8	3/jul	4	4	5	4	4	4	4	4	4	4					
7,07	7,22	7,9	7,1	140,3	142,5	4/jul	.	8	.	5	5	.	5	6	.	9					
6,99	7,26	8,1	8,9	137,7	139,4	5/jul	8	.	9	.	.	10	.	.	8	.					
						6/jul	12	9	11	12	10	10	10	13	10	11					
						Total	24	21	25	21	19	24	19	23	22	24	222				

Continuação: TESTE 1 (*C. silvestrii*) alga + ração

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: D - 0,04 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,33	7,7	7,6	7,7	146,3	148,4	29/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,38	7,4	7,8	7,4	145,3	144,6	30/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,40	8,1	8,0	7,7	145,6	144,3	1/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,43	7,6	8,0	7,9	143,7	154,2	2/jul	.	.	.	.	.	.	.	6	.	.	.				
7,26	7,3	8,2	7,5	146,2	145,8	3/jul	4	6	4	4	4	4	2	.	.	4	.				
7,5	7,30	8,4	7,6	145,8	146,8	4/jul	8	.	8	6	10	7	7	7	.	8	.				
7,6	7,50	7,9	7,9	146,8	154,2	5/jul	.	9	.	.	9	13	.	10	2	.	.				
						6/jul	12	12	11	8	.	.	11	.	4	.	.				
						Total	24	27	23	18	23	24	20	23	6	12	200				

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem						Tipo								
							Substância Química						Triclosan								
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: E - 0,08 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
6,80	7,43	7,7	7,9	147,0	145,6	29/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,24	7,26	7,4	7,8	144,6	154,6	30/jun	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,92	7,33	7,8	8,0	146,3	152,0	1/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,16	7,38	8,1	7,6	145,8	149,6	2/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,14	7,40	7,6	7,6	146,8	146,3	3/jul	2	1	4	5	4	.	2	4	5	6					
7,35	7,50	7,5	7,5	165,4	148,2	4/jul	6	7	7	.	.	4	.	10	11	10					
7,32	7,08	7,4	7,6	145,3	146,6	5/jul	.	.	.	8	6	.	6	.	.	.					
						6/jul	7	10	12	13	12	5	10	5	4	.					
						Total	15	18	23	26	22	9	18	19	20	16	186				

TESTE 2 (*C. silvestrii*) alga + ração

Início do teste: 05/12/07				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição						Amostra													Responsável		
Lote: 26						Origem						Tipo									
						Substância Química						Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: Controle											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,01	7,49	7,7	8,0	147,9	149,9	5/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,00	7,08	7,8	7,9	149,6	147,5	6/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,06	7,55	7,9	8,1	148,6	147,6	7/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,99	7,40	7,8	8,1	146,9	149,3	8/dez	4	2	4	4	4	4	3	3	2	3					
7,00	6,89	7,0	7,9	156,5	145,3	10/dez	10	11	8	.	5	4	8	3	6	4					
7,04	6,90	7,5	7,7	149,6	156,5	11/dez	.	.	.	5	.	.	3	3	3	8					
7,06	7,12	7,8	7,6	148,4	149,6	12/dez	.	1	.	.	3	3	.	1	.	1					
					178,9	13/dez	4	5	8	8	5	4	3	8	3	1					
						Total	18	19	20	17	17	15	17	18	14	17	172				

Início do teste:				Hora: 15:30				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: A - 0,01 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
6,85	7,49	7,6	7,8	148,1	149,7	5/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,23	7,31	7,9	8,0	144,9	149,3	6/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,89	7,32	7,6	8,1	169,4	147,3	7/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,23	7,37	8,1	7,9	143,7	150,0	8/dez	2	4	4	3	3	2	4	4	2	2					
7,36	7,40	7,9	7,6	146,2	152,0	10/dez	5	.	.	3	.	6	4	9	6	8					
7,30	7,12	8,6	7,5	145,2	150,7	11/dez	.	8	3	2	9	.	.	.	.	.					
7,50	6,89	7,5	7,7	146,3	155,2	12/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
						13/dez	6	4	4	7	4	8	6	5	8	6					
						Total	13	16	11	15	16	16	14	18	16	16	151				

Continuação: TESTE 2 (*C. silvestrii*) alga + ração

Início do teste:						Hora:						Final do teste:						Hora: 13:30					
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra										Responsável						
Lote: 26							Origem					Tipo											
							Substância Química					Triclosan											
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: B - 0,02 mg/L										Tamanho			Observação de neonatas			
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2		3		
6,80	7,43	7,7	7,9	147,0	145,6	5/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
7,24	7,26	7,4	7,8	144,6	154,6	6/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
6,92	7,33	7,8	8,0	146,3	152,0	7/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
7,16	7,38	8,1	7,6	145,8	149,6	8/dez	4	2	4	4	4	2	4	4	4	5							
7,14	7,40	7,6	7,6	146,8	146,3	10/dez	7	8	.	.	.	5	5	8	.	.							
7,35	7,50	7,5	7,5	165,4	148,2	11/dez	.	.	10	5	4	.	.	.	5	8							
7,32	7,08	7,4	7,6	145,3	146,6	12/dez	7	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
						13/dez	.	3	1	1	1	4	5	7	4	5							
						Total	18	13	15	10	9	11	14	19	13	18	140						

Início do teste:						Hora:						Final do teste:						Hora: 13:30					
Lote: 26						Água de cultivo e/ou de diluição						Amostra						Responsável					
						Origem						Tipo											
						Substância Química						Triclosan											
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: C - 0,04 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas		
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3			
6,80	6,92	8,1	7,8	152,0	145,2	5/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
7,21	7,16	7,6	8,0	149,6	146,3	6/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
6,92	7,33	7,7	7,6	146,3	145,8	7/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
7,18	7,38	7,4	7,8	145,3	146,8	8/dez	3	4	5	3	3	2	2	2	4	4							
7,06	7,40	8,1	8,0	145,6	145,3	10/dez	.	.	.	.	6	3	5	9	9	7							
7,35	7,43	7,6	8,0	143,7	150,0	11/dez	6	5	5	4	.	5	.	.	.	.							
7,65	7,26	7,3	8,2	146,2	152,0	12/dez	.	.	.	.	.	.	.	2	.	.							
						13/dez	2	2	1	2	1	1	4	.	†	.							
						Total	11	11	11	9	10	11	11	13	13	11	111						

Continuação: TESTE 2 (*C. silvestrii*) alga + ração

Início do teste:						Hora:						Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra												Responsável						
Lote: 26							Origem						Tipo												
							Substância Química						Triclosan												
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: D - 0,08 mg/L												Tamanho			Observação de neonatas			
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3					
6,80	7,43	7,7	7,9	147,0	145,6	5/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.								
7,24	7,26	7,4	7,8	144,6	154,6	6/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.								
6,92	7,33	7,8	8,0	146,3	152,0	7/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.								
7,16	7,38	8,1	7,6	145,8	149,6	8/dez	4	3	4	4	2	3	4	4	4	2									
7,14	7,40	7,6	7,6	146,8	146,3	10/dez	.	.	.	.	5	.	8	.	.	6									
7,35	7,50	7,5	7,5	165,4	148,2	11/dez	7	4	6	3	.	2	1	9	5	.									
7,32	7,08	7,4	7,6	145,3	146,6	12/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.									
						13/dez	1	.	.	1	5	.	.	.	7	.									
						Total	12	7	10	8	12	5	13	13	16	8	104								

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30				
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra												Responsável			
Lote: 26							Origem						Tipo									
							Substância Química						Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: E - 0,16 mg/L												Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3		
7,33	7,7	7,6	7,7	146,3	148,4	5/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,38	7,4	7,8	7,4	145,3	144,6	6/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,40	8,1	8,0	7,7	145,6	144,3	7/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,43	7,6	8,0	7,9	143,7	154,2	8/dez	2	4	5	3	4	4	4	2	4	2						
7,26	7,3	8,2	7,5	146,2	145,8	10/dez	5	.	.	6	.	5	.	3	.	6						
7,5	7,30	8,4	7,6	145,8	146,8	11/dez	.	6	4	.	2	.	6	.	5	.						
7,6	7,50	7,9	7,9	146,8	154,2	12/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.						
						13/dez	4	2	4	1	2	2	.	3	4	.						
						Total	11	12	13	10	8	11	10	8	13	8	104					

TESTE 3 (*C. silvestrii*) alga + ração

Início do teste: 13/12/07										Hora:					Final do teste:										Hora: 13:30				
Lote: 26							Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra										Responsável					
							Origem					Tipo																	
							Substância Química					Triclosan																	
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: Controle										Tamanho			Observação de neonatas									
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2		3								
7,03	7,64	7,8		136,2	134,2	13/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10												
7,04	7,49	8,2	7,9	136,1	140,0	14/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.													
7,03	7,40	7,7	8,0	134,9	138,0	15/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.													
7,03	7,64	7,5		140,4	138,7	17/dez	.	6	.	4	.	.	2	.	.	6													
7,06	7,08	7,0	7,8	138,9	142,0	18/dez	6	.	5	.	5	4	.	3	4	.													
7,07	7,28	7,9	7,7	126,0	142,8	19/dez	5	6	4	4	5	7	4	3	5	8													
7,05	7,15	8,0	9,1	137,0	140,1	20/dez	4	7	8	4	8	7	6	7	6	9													
						Total	15	19	17	12	18	18	12	13	15	23	162												

Início do teste:				Hora: 15:30				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: A - 0,01 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,10	7,49	8,0		135,7	134,7	13/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,08	7,46	8,0	7,6	135,9	139,0	14/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,06	7,20	7,9	7,6	135,0	138,1	15/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,88	7,50	7,8		140,1	139,7	17/dez	.	4	.	.	.	4	4	.	.	.					
7,19	7,06		7,9	138,3	139,2	18/dez	6	1	6	4	4	1	.	4	5	5					
7,05	7,36	7,9	7,5	140,0	142,1	19/dez	2	4	1	5	3	6	4	3 †	4	4					
6,97	7,34	8,0	8,6	137,3	140,7	20/dez	5	4	6	6	5	7	3		6	8					
						Total	13	13	13	15	12	18	11	7	15	17	134				

Continuação: TESTE 3 (*C. silvestrii*) alga + ração

Início do teste:						Hora:						Final do teste:								Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável					
Lote: 26							Origem					Tipo											
							Substância Química					Triclosan											
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: B - 0,02 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas		
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3			
6,80	7,43	7,7	7,9	147,0	145,6	13/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
7,24	7,26	7,4	7,8	144,6	154,6	14/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
6,92	7,33	7,8	8,0	146,3	152,0	15/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
7,16	7,38	8,1	7,6	145,8	149,6	17/dez	.	.	4	.	6	.	4	.	4	5							
7,14	7,40	7,6	7,6	146,8	146,3	18/dez	4	4	.	.	.	5	.	3	.	.							
7,35	7,50	7,5	7,5	165,4	148,2	19/dez	10	4	2	4	3	2	5	2	4	3							
7,32	7,08	7,4	7,6	145,3	146,6	20/dez	6	7	4	5	4	4	5	6	6	5							
						Total	20	15	10	9	13	11	14	11	14	13	130						

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: C - 0,04 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,07	7,64	8,0	8,0	135,6	136,0	13/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,04	7,50	8,0	7,6	135,7	140,0	14/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,13	7,25	7,8	7,8	135,4	138,1	15/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,88	7,51	7,8	7,5	140,0	140,7	17/dez	4	6	3	.	4	6	.	.	.	.					
7,21	7,06	7,6	7,9	138,0		18/dez	1	.	3	4	.	.	6	6	5	6					
7,06	7,27	7,9	7,4	140,3	140,7	19/dez	.	2	.	4	2	3	.	1	†	2					
6,99	7,40	8,0	8,9	137,0	139,6	20/dez	.	7	4	4	4	5	2	6		4					
						Total	5	15	10	12	10	14	8	13	5	12	104				

Continuação: TESTE 3 (*C. silvestrii*) alga + ração

Comunidade: T25 T25 (C. shirogane) água + Triclosan																							
Início do teste:							Hora:							Final do teste:							Hora: 13:30		
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável					
Lote: 26							Origem					Tipo											
							Substância Química					Triclosan											
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: D - 0,08 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas		
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3			
7,02	7,67	7,9	8,6	135,2	135,1	13/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
7,16	7,25	8,2	7,3	136,9	140,3	14/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
7,25	7,38	7,7	8,0	135,0	141,6	15/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
6,96	7,60	7,7	7,9	139,3	139,5	17/dez	.	.	.	3	.	.	3	.	.	.							
7,37	7,11	7,5	7,8	137,9	142,7	18/dez	4	5	5	3	5	5	.	4	6	2							
6,74	7,18	7,9	7,3	150,5	141,4	19/dez	3	3	3	3	1	4	2	2	2	2							
6,85	7,29	8,0	9,0	137,1	138,1	20/dez	3	2	5	5	1	.	6	5	.	.							
												4											
						Total	10	10	13	11	7	13	8	11	8	4	95						

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição Lote: 26							Amostra											Responsável			
							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: E - 0,16 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,03	7,64	7,8	8,2	136,2	165,2	13/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,04	7,49	7,9	7,9	129,9	140,0	14/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,00	7,40	7,7	8,0	134,9	138,0	15/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,03	7,64	7,5	8,0	140,4	145,2	17/dez	.	.	.	.	.	.	.	.	2	.	.				
7,06	7,08	8,0	7,8	138,9	142,0	18/dez	.	4	4	2	3	2	3	3	5	2	.				
7,00	7,28	7,9	7,7	126,0	142,8	19/dez	3	.	.	2	.	3	1	1	.	1	.				
7,05	7,15	8,0	9,1	137,0	150,2	20/dez	3	1	1	.	2	7	.	.	1	4	.				
						Total	6	5	5	4	5	12	4	4	8	7	60				

TESTE 1 C.S.

```
E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
teste cronico cs
File: triclosan cs racao 1      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
-----
EXPECTED      4.020      14.520      22.920      14.520      4.020
OBSERVED      5      12      23      19      1
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 4.3276
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu
```

```

E:\MAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
teste cronico cs
File: triclosan cs racao 1      Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Var/min Var) =    8.94
Closest, conservative, Table H statistic =   12.1 (alpha = 0.01)

Used for Table H ==>    R (# groups) =    6,    df (# reps-1) =    9
Actual values    ==>    R (# groups) =    6,    df (# avg reps-1) =   9.00
-----

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

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

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\MAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
teste cronico cs
File: triclosan cs racao 1      Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
-----
Calculated B1 statistic =   13.45
-----

Table Chi-square value =   15.09 (alpha = 0.01, df =    5)
Table Chi-square value =   11.07 (alpha = 0.05, df =    5)

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

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
teste cronico cs
File: triclosan cs racao 1      Transform: NO TRANSFORMATION

Cochran's test for homogeneity of variance
-----
Calculated G statistic = 0.3847
Table value = 0.42 (alpha = 0.01, df = 6,10)
Table value = 0.37 (alpha = 0.05, df = 6,10)
-----

Data PASS homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
NOTE: Cochran's test is most powerful for detecting one large
deviant variance.

Press any key to continue

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
teste cronico cs
File: triclosan cs racao 1      Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N    MIN    MAX    MEAN
-----
1      controle      10   21.000  29.000  25.400
2      0.005          10   16.000  29.000  24.600
3      0.01           10   16.000  30.000  25.300
4      0.02           10   19.000  25.000  22.200
5      0.04           10    6.000  27.000  20.000
6      0.08           10    9.000  26.000  18.600
-----

Press any key to continue

```

teste cronico cs
File: triclosan cs racao 1 Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	controle	6.044	2.459	0.777	9.68
2	0.005	14.267	3.777	1.194	15.35
3	0.01	18.900	4.347	1.375	17.18
4	0.02	4.622	2.150	0.680	9.68
5	0.04	41.333	6.429	2.033	32.15
6	0.08	22.267	4.719	1.492	25.37

Press any key to continue or Esc to return to menu

teste cronico cs
File: triclosan cs racao 1 Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	5	420.083	84.017	4.692
Within (Error)	54	966.900	17.906	
Total	59	1386.983		

Critical F value = 2.45 (0.05,5,40)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

Press any key to continue or Esc to return to menu

teste cronico cs
File: triclosan cs racao 1 Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	controle	25.400	25.400		
2	0.005	24.600	24.600	0.423	
3	0.01	25.300	25.300	0.053	
4	0.02	22.200	22.200	1.691	
5	0.04	20.000	20.000	2.854	*
6	0.08	18.600	18.600	3.593	*

Dunnett table value = 2.31 <1 Tailed Value, P=0.05, df=40,5>

Press any key to continue

teste cronico cs
File: triclosan cs racao 1 Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	controle	10			
2	0.005	10	4.371	17.2	0.800
3	0.01	10	4.371	17.2	0.100
4	0.02	10	4.371	17.2	3.200
5	0.04	10	4.371	17.2	5.400
6	0.08	10	4.371	17.2	6.800

Press any key to continue or Esc to return to menu

teste cronico cs
File: triclosan cs racao 1 Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	controle	25.400				
2	0.005	24.600	104.00	75.00	10.00	
3	0.01	25.300	111.00	75.00	10.00	
4	0.02	22.200	69.00	75.00	10.00	*
5	0.04	20.000	72.50	75.00	10.00	*
6	0.08	18.600	64.50	75.00	10.00	*

Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE 2 CS RACAO
File: TESTE CS RACAO      Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
-----
EXPECTED    4.020      14.520      22.920      14.520      4.020
OBSERVED    4          13         28         12          3
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 1.9813
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE 2 CS RACAO
File: TESTE CS RACAO      Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Var/min Var) =    8.53
Closest, conservative, Table H statistic =   12.1 (alpha = 0.01)

Used for Table H ==>    R (# groups) =    6,    df (# reps-1) =    9
Actual values    ==>    R (# groups) =    6,    df (# avg reps-1) =   9.00
-----

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

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

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE 2 CS RACAO
File: TESTE CS RACAO      Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
-----
Calculated B1 statistic =   13.31
-----

Table Chi-square value =   15.09 (alpha = 0.01, df =    5)
Table Chi-square value =   11.07 (alpha = 0.05, df =    5)

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

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE 2 CS RACAO
File: TESTE CS RACAO      Transform: NO TRANSFORMATION

Cochran's test for homogeneity of variance
-----
Calculated G statistic = 0.2776
Table value = 0.42 (alpha = 0.01, df = 6,10)
Table value = 0.37 (alpha = 0.05, df = 6,10)
-----

Data PASS homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
NOTE: Cochran's test is most powerful for detecting one large
deviant variance.

Press any key to continue

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE 2 CS RACAO
File: TESTE CS RACAO      Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N    MIN    MAX    MEAN
-----
1      CONTROLE      10    8.000   20.000  16.200
2      0.01           10   11.000   18.000  15.100
3      0.02           10    9.000   19.000  14.000
4      0.04           10    9.000   13.000  11.100
5      0.08           10    5.000   16.000  10.400
6      0.16           10    8.000   13.000  10.400
-----

Press any key to continue

```

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE 2 CS RACAO
File: TESTE CS RACAO Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	CONTROLE	11.289	3.360	1.062	20.74
2	0.01	3.878	1.969	0.623	13.04
3	0.02	12.222	3.496	1.106	24.97
4	0.04	1.433	1.197	0.379	10.79
5	0.08	11.378	3.373	1.067	32.43
6	0.16	3.822	1.955	0.618	18.80

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE 2 CS RACAO
File: TESTE CS RACAO Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	5	326.733	65.347	8.906
Within (Error)	54	396.200	7.337	
Total	59	722.933		

Critical F value = 2.45 (0.05,5,40)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
 TESTE 2 CS RACAO
 File: TESTE CS RACAO Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	CONTROLE	16.200	16.200		
2	0.01	15.100	15.100	0.908	
3	0.02	14.000	14.000	1.816	
4	0.04	11.100	11.100	4.210	*
5	0.08	10.400	10.400	4.788	*
6	0.16	10.400	10.400	4.788	*

Dunnett table value = 2.31 <1 Tailed Value, P=0.05, df=40.5>

Press any key to continue

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
 TESTE 2 CS RACAO
 File: TESTE CS RACAO Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	CONTROLE	10			
2	0.01	10	2.798	17.3	1.100
3	0.02	10	2.798	17.3	2.200
4	0.04	10	2.798	17.3	5.100
5	0.08	10	2.798	17.3	5.800
6	0.16	10	2.798	17.3	5.800

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE 2 CS RACAO
 File: TESTE CS RACAO Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	CONTROLE	16.200				
2	0.01	15.100	83.50	75.00	10.00	
3	0.02	14.000	87.50	75.00	10.00	
4	0.04	11.100	65.00	75.00	10.00	*
5	0.08	10.400	64.00	75.00	10.00	*
6	0.16	10.400	63.50	75.00	10.00	*

Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05

Press any key to continue or Esc to return to menu


```

E:\MAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE 3 CS RACAO
File: TESTE 3 CS RACAO      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
-----
EXPECTED    4.020      14.520      22.920      14.520      4.020
OBSERVED     4          15          22          16          3
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 0.4626
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE 3 CS RACAO
File: TESTE 3 CS RACAO      Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Var/min Var) =    1.97
Closest, conservative, Table H statistic =   12.1 (alpha = 0.01)

Used for Table H ==>    R (# groups) =    6,    df (# reps-1) =    9
Actual values    ==>    R (# groups) =    6,    df (# avg reps-1) =   9.00
-----

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

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

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE 3 CS RACAO
File: TESTE 3 CS RACAO      Transform: NO TRANSFORMATION

-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =    1.42
-----

Table Chi-square value =   15.09 (alpha = 0.01, df =    5)
Table Chi-square value =   11.07 (alpha = 0.05, df =    5)

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

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE 3 CS RACAO
File: TESTE 3 CS RACAO      Transform: NO TRANSFORMATION

Cochran's test for homogeneity of variance
-----
Calculated G statistic = 0.2111
Table value = 0.42 (alpha = 0.01, df = 6,10)
Table value = 0.37 (alpha = 0.05, df = 6,10)
-----

Data PASS homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
NOTE: Cochran's test is most powerful for detecting one large
deviant variance.

Press any key to continue

```

```

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
TESTE 3 CS RACAO
File: TESTE 3 CS RACAO      Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA  TABLE 1 of 2
-----
GRP  IDENTIFICATION  N  MIN  MAX  MEAN
-----
1    CONTROLE       10  12.000  23.000  16.200
2    0.01           10   7.000  18.000  13.400
3    0.02           10   9.000  20.000  13.000
4    0.04           10   5.000  15.000  10.400
5    0.08           10   4.000  13.000   9.500
6    0.16           10   4.000  12.000   6.000
-----

Press any key to continue

```

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
 TESTE 3 CS RACAO
 File: TESTE 3 CS RACAO Transform: NO TRANSFORMATION
 SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	CONTROLE	12.178	3.490	1.104	21.54
2	0.01	9.822	3.134	0.991	23.39
3	0.02	9.778	3.127	0.989	24.05
4	0.04	12.267	3.502	1.108	33.68
5	0.08	7.833	2.799	0.885	29.46
6	0.16	6.222	2.494	0.789	41.57

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
 TESTE 3 CS RACAO
 File: TESTE 3 CS RACAO Transform: NO TRANSFORMATION
 ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	5	633.683	126.737	13.088
Within (Error)	54	522.900	9.683	
Total	59	1156.583		

Critical F value = 2.45 (0.05,5,40)
 Since $F > \text{Critical } F$ REJECT H_0 : All equal

Press any key to continue or Esc to return to menu

CA E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE 3 CS RACAO
File: TESTE 3 CS RACAO Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	CONTROLE	16.200	16.200		
2	0.01	13.400	13.400	2.012	
3	0.02	13.000	13.000	2.299	
4	0.04	10.400	10.400	4.168	*
5	0.08	9.500	9.500	4.814	*
6	0.16	6.000	6.000	7.329	*

Dunnett table value = 2.31 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,5)

Press any key to continue

CA E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE 3 CS RACAO
File: TESTE 3 CS RACAO Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	CONTROLE	10			
2	0.01	10	3.215	19.8	2.800
3	0.02	10	3.215	19.8	3.200
4	0.04	10	3.215	19.8	5.800
5	0.08	10	3.215	19.8	6.700
6	0.16	10	3.215	19.8	10.200

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

TESTE 3 CS RACAO
File: TESTE 3 CS RACAO Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	CONTROLE	16.200				
2	0.01	13.400	84.00	75.00	10.00	
3	0.02	13.000	79.00	75.00	10.00	
4	0.04	10.400	66.50	75.00	10.00	*
5	0.08	9.500	60.00	75.00	10.00	*
6	0.16	6.000	56.00	75.00	10.00	*

Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05

Press any key to continue or Esc to return to menu

APÊNDICE J-Planilha dos ensaios de ecotoxicidade crônica do Triclosan para *C. silvestrii* com o fornecimento de alga como alimento e análises estatísticas.

TESTE 1 (*C. silvestrii*) alga

Início do teste: 12/07/2007				Hora: 15:30				Final do teste: 19/07/2007										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição						Amostra												Responsável			
Lote: 26						Origem						Tipo									
						Substância Química						Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: Controle											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,03	7,64	7,8		136,2	134,2	12/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,04	7,49	8,2	7,9	136,1	140,0	13/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,03	7,40	7,7	8,0	134,9	138,0	14/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,03	7,64	7,5		140,4	138,7	15/jul	.	.	.	4	.	.	4	.	5	.	10				
7,06	7,08	7,0	7,8	138,9	142,0	16/jul	5	5	4	.	6	4	.	6	.	4	10				
7,07	7,28	7,9	7,7	126,0	142,8	17/jul	10	.	10	8	10	7	.	10	5	9	10				
7,05	7,15	8,0	9,1	137,0	140,1	18/jul	.	10	†	.	.	.	10	.	12	.	9				
						19/jul	10	13		10	12	10	11	10	.	12	9				
						Total	25	28	14	22	28	21	25	26	22	25	236				

Início do teste: 12/07/2007				Hora: 15:30				Final do teste: 19/07/2007										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem						Tipo								
							Substância Química						Triclosan								
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: A - 0,01 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,02	7,67	7,9		135,2	135,1	12/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,16	7,25	8,2	7,3	136,9	140,3	13/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,25	7,38	7,7	8,0	135,0	141,6	14/jul	.	.	.	.	.	.	.	†	.	.	9				
6,96	7,60	7,7	7,9	139,3	139,5	15/jul	4	.	.	.	.	4	4	.	.	.	9				
7,37	7,11	7,5	7,8	137,9	142,7	16/jul	.	3	4	4	4	.	.	.	3	4	9				
6,74	7,18	7,9	7,3	150,5	141,4	17/jul	8	8	8	9	8	8	8	.	9	9	9				
6,85	7,29	8,0	9,0	137,1	138,1	18/jul	.	.	.	.	.	10	7	.	.	.	9				
						19/jul	10	11	11	13	9	.	5	.	9	12	9				
						Total	22	22	23	26	21	22	24	22,8	21	25	228,8				

Continuação TESTE 1 (*C. silvestrii*) alga

Início do teste: 12/07/2007				Hora: 15:30				Final do teste: 19/07/2007										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: B - 0,02 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,06	7,72	7,9		135,6	135,7	12/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,02	7,52	8,2	7,9	135,5	139,3	13/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,14	7,37	7,9	8,0	135,2	137,5	14/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,91	7,56	7,8		139,9	140,0	15/jul	.	.	.	.	.	.	4	3	.	4	10				
7,24	7,21		7,9	138,1	139,4	16/jul	4	4	4	6	3	4	.	.	4	.	10				
6,98	7,19	7,3	7,8	140,5	141,1	17/jul	8	9	7	10	8	8	9	8	.	8	10				
7,03	7,40	8,0	9,1	137,4	140,5	18/jul	.	.	.	.	.	.	12	.	6	12	10				
						19/jul	8	7	9	10	10	11	.	9	12	†	9				
						Total	20	20	20	26	21	23	25	20	22	24	221				

Início do teste: 12/07/2007				Hora: 15:30				Final do teste: 19/07/2007										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem						Tipo								
							Substância Química						Triclosan								
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: C - 0,04 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,07	7,64	8,0		135,6	136,0	12/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,04	7,50	8,0	7,6	135,7	140,0	13/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,13	7,25	7,8	7,8	135,4	138,1	14/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,88	7,51	7,8		140,0	140,7	15/jul	4	.	.	5	.	4	4	.	.	.	10				
7,21	7,06		7,9	138,0		16/jul	.	5	3	.	3	6	.	1	3	4	10				
7,06	7,27	7,9	7,4	140,3	140,7	17/jul	10	10	8	8	8	.	8	8	7	7	10				
6,99	7,40	8,0	8,9	137,0	139,6	18/jul	12	6	.	12	9	9	7	.	.	.	10				
						19/jul	.	11	.	.	.	10	.	.	8	8	10				
						Total	26	32	11	25	20	29	19	9	18	19	208				

Continuação TESTE 1 (*C. silvestrii*) alga

Início do teste: 12/07/2007				Hora: 15:30				Final do teste: 19/07/2007										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: D - 0,08 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,08	7,58	8,0		135,6	135,0	12/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,03	7,57	8,0	7,8	136,2	138,8	13/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,08	7,19	7,9	7,7	135,4	138,4	14/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,89	7,50	7,9		139,8	139,9	15/jul	.	.	.	.	.	4	.	.	.	.	10				
7,19	7,06		7,9	137,8	140,8	16/jul	5	5	3	4	4	.	5	5	4	4	10				
7,07	7,22	7,9	7,1	140,3	142,5	17/jul	6	6	7	8	8	8	6	6	5	3	10				
6,99	7,26	8,1	8,9	137,7	139,4	18/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
						19/jul	8	8	10	7	9	10	6	5	.	8	10				
						Total	19	19	20	19	21	22	17	16	9	15	177				

Início do teste: 12/07/2007				Hora: 15:30				Final do teste: 19/07/2007										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: E - 0,16 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,10	7,49	8,0		135,7	134,7	12/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,08	7,46	8,0	7,6	135,9	139,0	13/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,06	7,20	7,9	7,6	135,0	138,1	14/jul	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
6,88	7,50	7,8		140,1	139,7	15/jul	.	4	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,19	7,06		7,9	138,3	139,2	16/jul	3	.	4	4	.	1	3	4	4	.	10				
7,05	7,36	7,9	7,5	140,0	142,1	17/jul	3	6	6	6	5	6	6	6	.	6	10				
6,97	7,34	8,0	8,6	137,3	140,7	18/jul	.	6	.	.	7	.	.	.	6	.	10				
						19/jul	3	.	3	4	.	7	8	10	8	10	10				
						Total	9	12	13	14	12	14	17	20	18	16	145				

TESTE 2 (*C. silvestrii*) alga

Início do teste: 15/08/07						Hora: 12:00						Final do teste: 22/08/07						Hora: 13:30					
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável					
Lote: 27							Origem					Tipo											
							Substância Química					Triclosan											
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: Controle											Tamanho			Observação de neonatas		
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3			
7,01	7,49	7,7	8,0	147,9	149,9	15/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10						
7,00	7,08	7,8	7,9	149,6	147,5	16/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
7,06	7,55	7,9	8,1	148,6	147,6	17/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.							
6,99	7,40	7,8	8,1	146,9	149,3	18/ago	.	.	4	4	.	.	.	.	.	.							
7,00	6,89	7,0	7,9	156,5	145,3	19/ago	4	6	.	.	6	4	4	4	4	4							
7,04	6,90	7,5	7,7	149,6	156,5	20/ago	10	8	8	6	6	8	9	9	6	8							
7,06	7,12	7,8	7,6	148,4	149,6	21/ago	.	10	11	9	9	.	.	8	.	10							
					178,9	22/ago	8	2	2	.	.	7	7	1	9	.							
						Total	22	26	25	19	21	19	20	22	19	22	215						

Início do teste:				Hora: 15:30				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição						Amostra												Responsável			
Lote: 26						Origem						Tipo									
						Substância Química						Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: A - 0,01 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
6,85	7,49	7,6	7,8	148,1	149,7	15/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,23	7,31	7,9	8,0	144,9	149,3	16/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,89	7,32	7,6	8,1	169,4	147,3	17/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,23	7,37	8,1	7,9	143,7	150,0	18/ago	.	.	.	6	.	.	3	4	.	.					
7,36	7,40	7,9	7,6	146,2	152,0	19/ago	4	4	4	.	4	5	.	.	4	4					
7,30	7,12	8,6	7,5	145,2	150,7	20/ago	10	8	8	7	9	6	10	9	9	9					
7,50	6,89	7,5	7,7	146,3	155,2	21/ago	.	.	.	10	.	.	.	10	.	.					
						22/ago	8	6	8	.	5	5	5	.	6	3					
						Total	22	18	20	23	18	16	18	23	19	16	193				

Continuação:TESTE 2 (*C. silvestrii*) alga

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição						Amostra												Responsável			
Lote: 26						Origem						Tipo									
						Substância Química						Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: B - 0,02 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
6,80	7,43	7,7	7,9	147,0	145,6	15/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,24	7,26	7,4	7,8	144,6	154,6	16/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,92	7,33	7,8	8,0	146,3	152,0	17/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,16	7,38	8,1	7,6	145,8	149,6	18/ago	.														
7,14	7,40	7,6	7,6	146,8	146,3	19/ago	6	4	4	4	4	6	4	4	4	4					
7,35	7,50	7,5	7,5	165,4	148,2	20/ago	.	9	9	9	8	8	10	8	7	7					
7,32	7,08	7,4	7,6	145,3	146,6	21/ago	10	.	.	.	.	.	10	.	.	.					
						22/ago	.	5	3	4	5	6	.	6	4	3					
						Total	16	18	16	17	17	20	24	18	15	14	175				

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: C - 0,04 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
6,80	6,92	8,1	7,8	152,0	145,2	15/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,21	7,16	7,6	8,0	149,6	146,3	16/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,92	7,33	7,7	7,6	146,3	145,8	17/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,18	7,38	7,4	7,8	145,3	146,8	18/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,06	7,40	8,1	8,0	145,6	145,3	19/ago	4	4	2	6	4	4	4	4	5	5					
7,35	7,43	7,6	8,0	143,7	150,0	20/ago	7	5	.	7	7	6	6	7	.	.					
7,65	7,26	7,3	8,2	146,2	152,0	21/ago	.	.	.	.	8	.	.	.	8	8					
						22/ago	4	3	6	8	5	8	8	7	3	2					
						Total	15	12	8	21	24	18	18	18	16	15	165				

Continuação:TESTE 2 (*C. silvestrii*) alga

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: D - 0,08 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
6,80	7,43	7,7	7,9	147,0	145,6	15/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,24	7,26	7,4	7,8	144,6	154,6	16/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,92	7,33	7,8	8,0	146,3	152,0	17/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,16	7,38	8,1	7,6	145,8	149,6	18/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,14	7,40	7,6	7,6	146,8	146,3	19/ago	6	6	4	4	6	6	4	4	6	4					
7,35	7,50	7,5	7,5	165,4	148,2	20/ago	9	7	8	6	7	6	6	6	5	5					
7,32	7,08	7,4	7,6	145,3	146,6	21/ago	.	†	.	.	.	.	.	.	.	.					
						22/ago	5		3	7	6	2	8	6	7	5					
						Total	20	13	15	17	19	14	18	16	18	14	164				

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30				
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra												Responsável			
Lote: 26							Origem						Tipo									
							Substância Química						Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: E - 0,16 mg/L												Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3		
7,33	7,7	7,6	7,7	146,3	148,4	15/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.						
7,38	7,4	7,8	7,4	145,3	144,6	16/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.						
7,40	8,1	8,0	7,7	145,6	144,3	17/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.						
7,43	7,6	8,0	7,9	143,7	154,2	18/ago	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.						
7,26	7,3	8,2	7,5	146,2	145,8	19/ago	4	4	4	4	3	4	4	2	.	3						
7,5	7,30	8,4	7,6	145,8	146,8	20/ago	5	3	2	2	.	2	4	.	.	.						
7,6	7,50	7,9	7,9	146,8	154,2	21/ago	.	.	.	.	.	1	.	.	1	5						
						22/ago	3	3	4	3	4	4	2	2	.	3						
						Total	12	10	10	9	7	11	10	4	1	11	85					

TESTE 3 (*C. silvestrii*) alga

Início do teste: 07/11/07				Hora:				Final do teste: 14/11/07										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: Controle											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,03	7,64	7,8		136,2	134,2	7/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,04	7,49	8,2	7,9	136,1	140,0	8/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,03	7,40	7,7	8,0	134,9	138,0	9/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,03	7,64	7,5		140,4	138,7	10/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,06	7,08	7,0	7,8	138,9	142,0	11/nov	4	5	4	2	4	5	4	5	2	4					
7,07	7,28	7,9	7,7	126,0	142,8	12/nov	8	6	6	10	7	8	8	2	8	3					
7,05	7,15	8,0	9,1	137,0	140,1	13/nov	2	.	.	4	6	.	5	4	2	4					
						14/nov	8	18	12	6	8	10	6	10	8	9					
						Total	22	29	22	22	25	23	23	21	20	20	227				

Início do teste:				Hora: 15:30				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: A - 0,01 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
6,80	7,43	7,7	7,9	147,0	145,6	7/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,24	7,26	7,4	7,8	144,6	154,6	8/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,92	7,33	7,8	8,0	146,3	152,0	9/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,16	7,38	8,1	7,6	145,8	149,6	10/nov	.	4	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,14	7,40	7,6	7,6	146,8	146,3	11/nov	2	.	2	2	.	2	4	5	4	.					
7,35	7,50	7,5	7,5	165,4	148,2	12/nov	4	6	8	8	6	5	5	4	.	8					
7,32	7,08	7,4	7,6	145,3	146,6	13/nov	.	6	12	.	.	3	5	2	5	.					
						14/nov	13	2	.	14	15	14	8	11	17	18					
						Total	19	18	22	24	21	24	22	22	26	26	224				

Continuação: TESTE 3 (*C. silvestrii*) alga

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: B - 0,02 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
6,80	6,92	8,1	7,8	152,0	145,2	7/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,21	7,16	7,6	8,0	149,6	146,3	8/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,92	7,33	7,7	7,6	146,3	145,8	9/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,18	7,38	7,4	7,8	145,3	146,8	10/nov		.	.	.	.	.	.	.	2	.					
7,06	7,40	8,1	8,0	145,6	145,3	11/nov	4	2	4	4	4	6	2	4	.	4					
7,35	7,43	7,6	8,0	143,7	150,0	12/nov	6	9	8	8	8	6	8	4	10	.					
7,65	7,26	7,3	8,2	146,2	152,0	13/nov	.	.	.	.	.	.	2	10	.	6					
						14/nov	8	6	10	12	12	10	12	2	12	12					
						Total	18	17	22	24	24	22	24	20	24	22	217				

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: C - 0,04 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,08	7,58	8,0		135,6	135,0	7/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	10				
7,03	7,57	8,0	7,8	136,2	138,8	8/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,08	7,19	7,9	7,7	135,4	138,4	9/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.					
6,89	7,50	7,9	7,3	139,8	139,9	10/nov	.	6	.	.	.	.	.	.	.	.					
7,19	7,06	-8,0	7,9	137,8	140,8	11/nov	4	.	4	2	3	4	4	2	4	4					
7,07	7,22	7,9	7,1	140,3	142,5	12/nov	8	12	8	.	.	4	4	6	2	8					
6,99	7,26	8,1	8,9	137,7	139,4	13/nov	.	.	.	6	8	.	2	.	.	.					
						14/nov	12	8	8	6	9	12	6	8	12	10					
						Total	24	26	20	14	20	20	16	16	18	22	196				

Continuação: TESTE 3 (*C. silvestrii*) alga

Início do teste:				Hora:				Final do teste:				Hora: 13:30									
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem					Tipo									
							Substância Química					Triclosan									
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: D - 0,08 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
7,33	7,7	7,6	7,7	146,3	148,4	7/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,38	7,4	7,8	7,4	145,3	144,6	8/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,40	8,1	8,0	7,7	145,6	144,3	9/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,43	7,6	8,0	7,9	143,7	154,2	10/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,26	7,3	8,2	7,5	146,2	145,8	11/nov	4	2	6	4	4	2	2	2	4	4					
7,5	7,30	8,4	7,6	145,8	146,8	12/nov	6	8	4	6	10	10	8	6	8	8					
7,6	7,50	7,9	7,9	146,8	154,2	13/nov	.	3	.	.	4	.	.	.	.	.					
						14/nov	8	3	10	8	4	10	6	8	2	4					
						Total	18	16	20	18	22	22	16	16	14	16	178				

Início do teste:				Hora:				Final do teste:										Hora: 13:30			
Água de cultivo e/ou de diluição							Amostra											Responsável			
Lote: 26							Origem						Tipo								
							Substância Química						Triclosan								
pH		OD (mg/L)		Cond. (µS25/cm)		Data	Ponto: E - 0,16 mg/L											Tamanho			Observação de neonatas
ini	fin	ini	fin	ini	fin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Vivo	1	2	3	
6,80	7,43	7,7	7,9	147,0	145,6	7/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,24	7,26	7,4	7,8	144,6	154,6	8/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
6,92	7,33	7,8	8,0	146,3	152,0	9/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,16	7,38	8,1	7,6	145,8	149,6	10/nov	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.				
7,14	7,40	7,6	7,6	146,8	146,3	11/nov	2	4	2	4	2	4	2	.	2	4	.				
7,35	7,50	7,5	7,5	165,4	148,2	12/nov	2	.	2	.	.	.	4	8	.	.	.				
7,32	7,08	7,4	7,6	145,3	146,6	13/nov	.	8	.	6	8	8	4	.	8	6	.				
						14/nov	3	.	8	4	.	4	8	4	8	4	.				
						Total	7	12	12	14	10	16	18	12	18	14	133				


```

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 1 alga      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL    <-1.5    -1.5 to <-0.5    -0.5 to 0.5    >0.5 to 1.5    >1.5
-----
EXPECTED    4.020      14.520      22.920      14.520      4.020
OBSERVED     5          9          28         15          3
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 3.7380
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 1 alga      Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 10.58
Closest, conservative, Table H statistic = 12.1 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 6, df (# reps-1) = 9
Actual values ==> R (# groups) = 6, df (# avg reps-1) = 9.00
-----
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
NOTE: This test requires equal replicate sizes. If they are unequal
but do not differ greatly, Hartley's test may still be used
as an approximate test (average df are used).

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 1 alga      Transform: NO TRANSFORMATION

-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 17.75

-----
Table Chi-square value = 15.09 (alpha = 0.01, df = 5)
Table Chi-square value = 11.07 (alpha = 0.05, df = 5)

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

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 1 alga      Transform: NO TRANSFORMATION

Cochran's test for homogeneity of variance
-----
Calculated G statistic = 0.3526
Table value = 0.42 (alpha = 0.01, df = 6,10)
Table value = 0.37 (alpha = 0.05, df = 6,10)

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

NOTE: Cochran's test is most powerful for detecting one large
deviant variance.

Press any key to continue

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: teste cs 1 alga Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	CONTROLE	10	14.000	28.000	23.600
2	0.01	10	0.000	26.000	20.600
3	0.02	10	20.000	26.000	22.100
4	0.04	10	9.000	32.000	20.800
5	0.08	10	9.000	22.000	17.700
6	0.16	10	9.000	20.000	14.500

Press any key to continue

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: teste cs 1 alga Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	CONTROLE	17.156	4.142	1.310	17.55
2	0.01	55.156	7.427	2.349	36.05
3	0.02	5.211	2.283	0.722	10.33
4	0.04	54.170	7.361	2.320	35.39
5	0.08	14.011	3.743	1.184	21.15
6	0.16	10.722	3.274	1.035	22.58

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 1 alga      Transform: NO TRANSFORMATION

      ANOVA TABLE
-----
SOURCE          DF          SS          MS          F
-----
Between          5          538.283        107.657        4.129
Within (Error)   54          1407.900        26.072
Total            59          1946.183

Critical F value = 2.45 (0.05,5,40)
Since F > Critical F REJECT Ho: all equal

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 1 alga      Transform: NO TRANSFORMATION

      DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2      Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED  MEAN CALCULATED IN  T STAT  SIG
-----
1      CONTROLE        23.600      23.600
2      0.01            20.600      20.600      1.314
3      0.02            22.100      22.100      0.657
4      0.04            20.800      20.800      1.226
5      0.08            17.700      17.700      2.584  *
6      0.16            14.500      14.500      3.985  *

Dunnett table value = 2.31      (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,5)

Press any key to continue

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: teste cs 1 alga Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	CONTROLE	10			
2	0.01	10	5.275	22.4	3.000
3	0.02	10	5.275	22.4	1.500
4	0.04	10	5.275	22.4	2.800
5	0.08	10	5.275	22.4	5.900
6	0.16	10	5.275	22.4	9.100

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: teste cs 1 alga Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	CONTROLE	23.600				
2	0.01	20.600	88.00	75.00	10.00	
3	0.02	22.100	84.50	75.00	10.00	
4	0.04	20.800	92.00	75.00	10.00	
5	0.08	17.700	66.50	75.00	10.00	*
6	0.16	14.500	60.00	75.00	10.00	*

Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05

Press any key to continue or Esc to return to menu

```
E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: TESTE CS 2 ALGA      Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
-----
EXPECTED      4.020      14.520      22.920      14.520      4.020
OBSERVED       2       16       26       12       4
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 2.0172
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu
```

```
E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: TESTE CS 2 ALGA      Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 5.70
-----
Table Chi-square value = 15.09 (alpha = 0.01, df = 5)
Table Chi-square value = 11.07 (alpha = 0.05, df = 5)
Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu
```

```
E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: TESTE CS 2 ALGA      Transform: NO TRANSFORMATION

Cochran's test for homogeneity of variance
-----
Calculated G statistic = 0.3402
Table value = 0.42 (alpha = 0.01, df = 6,10)
Table value = 0.37 (alpha = 0.05, df = 6,10)
-----

Data PASS homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
NOTE: Cochran's test is most powerful for detecting one large
      deviant variance.

Press any key to continue
```


E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: TESTE CS 2 ALGA Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	CONTROLE	10	19.000	26.000	21.500
2	0.01	10	16.000	23.000	19.300
3	0.02	10	14.000	24.000	17.500
4	0.04	10	8.000	24.000	16.500
5	0.08	10	13.000	20.000	16.400
6	0.16	10	1.000	12.000	8.500

Press any key to continue

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: TESTE CS 2 ALGA Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.U. %
1	CONTROLE	6.056	2.461	0.778	11.45
2	0.01	6.900	2.627	0.831	13.61
3	0.02	8.056	2.838	0.898	16.22
4	0.04	20.056	4.478	1.416	27.14
5	0.08	5.600	2.366	0.748	14.43
6	0.16	12.278	3.504	1.100	41.22

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: TESTE CS 2 ALGA Transform: NO TRANSFORMATION

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	5	977.683	195.537	19.904
Within (Error)	54	530.500	9.824	
Total	59	1508.183		

Critical F value = 2.45 (0.05,5,40)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: TESTE CS 2 ALGA Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	CONTROLE	21.500	21.500		
2	0.01	19.300	19.300	1.570	
3	0.02	17.500	17.500	2.854	*
4	0.04	16.500	16.500	3.567	*
5	0.08	16.400	16.400	3.638	*
6	0.16	8.500	8.500	9.274	*

Dunnett table value = 2.31 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,5)

Press any key to continue

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: TESTE CS 2 ALGA Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	CONTROLE	10			
2	0.01	10	3.238	15.1	2.200
3	0.02	10	3.238	15.1	4.000
4	0.04	10	3.238	15.1	5.000
5	0.08	10	3.238	15.1	5.100
6	0.16	10	3.238	15.1	13.000

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\EMAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: TESTE CS 2 ALGA Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	CONTROLE	21.500				
2	0.01	19.300	82.50	75.00	10.00	
3	0.02	17.500	66.50	75.00	10.00	*
4	0.04	16.500	67.50	75.00	10.00	*
5	0.08	16.400	60.00	75.00	10.00	*
6	0.16	8.500	55.00	75.00	10.00	*

Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

E:\MAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 3 alga      Transform: NO TRANSFORMATION
Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----
INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
EXPECTED      4.020      14.520      22.920      14.520      4.020
OBSERVED       4         13         24         16         3
-----
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 0.6198
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277
Data PASS normality test. Continue analysis.

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\MAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 3 alga      Transform: NO TRANSFORMATION
Hartley's test for homogeneity of variance
-----
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 7.52
Closest, conservative, Table H statistic = 12.1 (alpha = 0.01)
Used for Table H ==> R (# groups) = 6, df (# reps-1) = 9
Actual values ==> R (# groups) = 6, df (# avg reps-1) = 9.00
-----
Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
NOTE: This test requires equal replicate sizes. If they are unequal
but do not differ greatly, Hartley's test may still be used
as an approximate test (average df are used).

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 3 alga      Transform: NO TRANSFORMATION

-----
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 15.61

-----
Table Chi-square value = 15.09 (alpha = 0.01, df = 5)
Table Chi-square value = 11.07 (alpha = 0.05, df = 5)

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

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 3 alga      Transform: NO TRANSFORMATION

-----
Cochran's test for homogeneity of variance

-----
Calculated G statistic = 0.5145
Table value = 0.42 (alpha = 0.01, df = 6,10)
Table value = 0.37 (alpha = 0.05, df = 6,10)

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

NOTE: Cochran's test is most powerful for detecting one large
deviant variance.

Press any key to continue

```

E:\MAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: teste cs 3 alga Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	CONTROLE	10	2.000	29.000	20.700
2	0.01	10	18.000	26.000	22.400
3	0.02	10	17.000	24.000	21.700
4	0.04	10	14.000	26.000	19.600
5	0.08	10	14.000	22.000	17.800
6	0.16	10	7.000	18.000	13.300

Press any key to continue

E:\MAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: teste cs 3 alga Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM	C.V. %
1	CONTROLE	50.233	7.088	2.241	34.24
2	0.01	7.156	2.675	0.846	11.94
3	0.02	6.678	2.584	0.817	11.91
4	0.04	14.044	3.748	1.185	19.12
5	0.08	7.511	2.741	0.867	15.40
6	0.16	12.011	3.466	1.096	26.06

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 3 alga      Transform: NO TRANSFORMATION

          ANOVA TABLE
-----
SOURCE           DF           SS           MS           F
-----
Between           5           556.550         111.310         6.840
Within (Error)    54           878.700         16.272
Total             59           1435.250
-----

Critical F value = 2.45 (0.05,5.40)
Since F > Critical F REJECT Ho: All equal

Press any key to continue or Esc to return to menu

```

```

E:\EMAILB-1\Ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE
Teste 1 cs alga
File: teste cs 3 alga      Transform: NO TRANSFORMATION

          DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2          Ho:Control<Treatment
-----
GROUP  IDENTIFICATION  TRANSFORMED  MEAN CALCULATED IN  T STAT  SIG
-----
1      CONTROLE        20.700      20.700
2      0.01            22.400      22.400      -0.942
3      0.02            21.700      21.700      -0.554
4      0.04            19.600      19.600       0.610
5      0.08            17.800      17.800       1.608
6      0.16            13.300      13.300       4.102  *
-----
Dunnett table value = 2.31 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40.5)

Press any key to continue

```

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: teste cs 3 alga Transform: NO TRANSFORMATION

DUNNETT'S TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff <IN ORIG. UNITS>	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	CONTROLE	10			
2	0.01	10	4.167	20.1	-1.700
3	0.02	10	4.167	20.1	-1.000
4	0.04	10	4.167	20.1	1.100
5	0.08	10	4.167	20.1	2.900
6	0.16	10	4.167	20.1	7.400

Press any key to continue or Esc to return to menu

E:\MAILB-1\ecotox\TOXSTAT\TOXSTAT.EXE

Teste 1 cs alga
File: teste cs 3 alga Transform: NO TRANSFORMATION

STEEL'S MANY-ONE RANK TEST - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	df	SIG
1	CONTROLE	20.700				
2	0.01	22.400	109.50	75.00	10.00	
3	0.02	21.700	106.00	75.00	10.00	
4	0.04	19.600	87.00	75.00	10.00	
5	0.08	17.800	74.00	75.00	10.00	*
6	0.16	13.300	65.00	75.00	10.00	*

Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05

Press any key to continue or Esc to return to menu

APÊNDICE L-Planilha dos ensaios de teratogênese do Triclosan para *D. similis* e análises estatísticas

Teste de teratogenicidade 1 com D. similis 20° C

DATA INICIO: 23/09/07		HORA: 10:00		DATA FIM: 25/09/07		HORA: 10:00		
		1	2	3	4	TOTAL	%	
CONTROLE	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	5	5	5		15	100 Normal	
A 0,0125 mg/l	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	5	5	4 1		14	93 Normal	
B 0,025 mg/L	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	5	5	4 1		14	93 Normal 7 Des. incompleto	
C 0,05mg/L	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	5	5	3 1 1		13 1 1	86 Normal 6,6 Des. Inncompleto 6,6 Mortos	
D 0,01 mg/L	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	3 2	2 3	1 4		6 9	40 Normal 60 Malformado	
E 0,02 mg/L	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	5	5	5		15	100 Malformado	
LOTE DA ÁGUA DE DILUIÇÃO:								
	pH		OD		CONDUTIVIDADE		Substância-teste	OBSERVAÇÕES
	inicial	final	inicial	final	inicial	final	Triclosan	
CONTROLE	6,9	7,0	7,2	7,0	146,5	150,0		
A	6,8	7,0	7,4	7,0	158,2	153,0		
B	6,9	7,1	7,4	7,0	146,9	158,0		
C	6,9	7,2	7,4	7,1	146,5	157,0		
D	7,0	7,2	7,3	7,0	146,7	157,0		
E	7,0	7,1	7,2	7,0	146,8	156,0		

Teste de teratogenicidade 2 com D. similis 20° C

DATA INICIO: 29/09/07			HORA: 10:00		DATA FIM: 01/10/07			HORA: 10:00	
			1	2	3	4	TOTAL	%	
CONTROLE	NORMAL	5	5	4	5	19	90 Normal		
	DES. INCOMPLETO			1		1	10 des. incompleto		
	MALFORMAÇÃO								
	MORTALIDADE								
A 0,0125 mg/l	NORMAL	5	5	5	1	16	80 Normal		
	DES. INCOMPLETO								
B 0,025 mg/L	MALFORMAÇÃO				4		20 Mortos		
	MORTALIDADE								
	NORMAL	5	4	3	3	15	75 Normais		
	DES. INCOMPLETO		1		2	3	15 mal formado		
C 0,05 mg/L	MALFORMAÇÃO			2		2	10 mortos		
	MORTALIDADE								
	NORMAL	3	4	4	3	14	70 Normal		
	DES. INCOMPLETO	2	1	1	2	6	30 malformado		
D 0,01 mg/L	MALFORMAÇÃO								
	MORTALIDADE								
	NORMAL	2	2			4	20 Normal		
	DES. INCOMPLETO	3	3	4	4	14	70 Malformado		
E 0,02 mg/L	MALFORMAÇÃO			1	1	2	10 mortos		
	MORTALIDADE								
	NORMAL								
	DES. INCOMPLETO				5	5	25 Malformado		
						15	75 morto		
LOTE DA ÁGUA DE DILUIÇÃO:									
	pH		OD		CONDUTIVIDADE		Substância-teste	OBSERVAÇÕES	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final	Triclosan	5 ORGANISMOS POR RÉPLICA 4 RÉPLICAS	
CONTROLE	7,0	7,1	8,0	8,2	145,4	152,0			
A	7,2	7,1	8,1	8,2	145,5	149,0			
B	7,2	7,2	8,1	8,28,2	145,4	148,0			
C	7,2	7,1	8,1	8,2	145,0	148,0			
D	7,1	7,1	8,0	8,2	145,3	148,9			
E	7,1	7,1	8,1	8,2	145,2	149,0			

Teste de teratogenicidade 3 com D. similis 20° C

DATA INICIO: 11/12/07		HORA: 13:00		DATA FIM: 13/12/07		HORA: 13:00	
		1	2	3	4	TOTAL	%
CONTROLE	NORMAL	5	5	4	5	19	95 Normal
	DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE			1		1	10 des. incompleto
A 0,025 mg/l	NORMAL	5	4	4	2	15	75 Normal
	DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE		1	1	3	3 2	15 malformação 10 Morto
B 0,05 mg/L	NORMAL	4	4	2	2	12	60 Normal
	DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	1	1	3	3	8	40 malformação 10 morto
C 0,01 mg/L	NORMAL	1			1	2	10 Normal
	DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	4	5	5	4	18	90 malformado
D 0,02 mg/L	NORMAL						
	DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	5	5	5	5	20	100 Malformado
E 0,04 mg/L	NORMAL	5	4	5		14	70 Des. incompleto
	DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE		1		5	6	30 morto no estágio V
LOTE DA ÁGUA DE DILUIÇÃO: 31							
	pH		OD		CONDUTIVIDADE		OBSERVAÇÕES
	inicial	final	inicial	final	inicial	final	
CONTROLE	6.99	7.0	7.9	8.0	160.0	168.0	Triclosan
A	7.1	7.2	7.8	8.0	149.0	150.0	
B	7.0	7.1	7.8	7.8	148.0	149.0	
C	7.0	7.1	8.0	7.8	148.0	149.0	
D	7.1	7.2	7.9	7.7	148.0	146.9	
E	7.1	7.2	7.8	7.7	147.0	148.9	

Teste de teratogenicidade 4 com D. similis 20° C

DATA INICIO: 18/12/07		HORA: 13:00		DATA FIM: 20/12/07		HORA: 13:00		
		1	2	3	4	TOTAL	%	
CONTROLE	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	5	5	5	5	20	100 Normal	
A 0,025 mg/l	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	5	5	5	3	18	90 Normal	
B 0,05 mg/L	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	4	4	5	5	18	90 Normais	
						2	10 Morto	
C 0,01 mg/L	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	1	1	1	5	3	15 Normal	
						17	85 Malformado	
D 0,02 mg/L	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	5	4 1	5	4	18 1	90 Malformado 10 Morto	
E 0,04 mg/L	NORMAL DES. INCOMPLETO MALFORMAÇÃO MORTALIDADE	2	1 4	1 4	1 4	5 15	25 Des. incompleto 75 mortos no estágio V	
LOTE DA ÁGUA DE DILUIÇÃO: 31								
	pH		OD		CONDUTIVIDADE		Substância-teste	OBSERVAÇÃO
	inicial	final	inicial	final	inicial	final	Triclosan	
CONTROLE	7.0	7.1	6.8	6.6	149.0	152.0		
A	7.2	7.3	6.9	6.8	148.0	153.0		
B	7.1	7.2	6.9	6.8	148.0	153.0		
C	7.2	7.2	6.9	6.8	148.6	153.2		
D	7.1	7.2	6.9	7.0	148.9	154.2		
E	7.1	7.2	6.9	7.2	149.0	149.7		

TESTE TERATOGENESE 1

MALFORMAÇÃO

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: Triclosan
 Test Start Date: 23 19 07 Test Ending Date: 25 09 07
 Test Species: D.similis
 Test Duration: 51 horas
 DATA FILE: TESTE1MA.icp

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg.L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	3	0.000	100.000	0.000	100.000
2	3	0.013	100.000	0.000	100.000
3	3	0.025	100.000	0.000	100.000
4	3	0.050	100.000	0.000	100.000
5	3	0.100	40.000	20.000	40.000
6	3	0.200	0.000	0.000	0.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.0917 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.0929 Standard Deviation: 0.0076
 Original Confidence Limits: Lower: 0.0813 Upper: 0.1167
 Expanded Confidence Limits: Lower: 0.0698 Upper: 0.1442
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random Seed: 1569815016
 Press Any Key to Continue

MORTALIDADE

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: Triclosan
 Test Start Date: 23 09 07 Test Ending Date: 25 09 07
 Test Species: d.similis
 Test Duration: 51
 DATA FILE: TESTE1M0.icp

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg.L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	3	0.000	100.000	0.000	100.000
2	3	0.013	100.000	0.000	100.000
3	3	0.025	100.000	0.000	100.000
4	3	0.050	93.333	11.547	97.778
5	3	0.100	100.000	0.000	97.778
6	3	0.200	100.000	0.000	97.778

*** No Linear Interpolation Estimate can be calculated from the input data since none of the (possibly pooled) group response means were less than 50% of the control response mean.

Press Any Key to Continue

DESENVOLVIMENTO TARDIO

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: Triclosan
 Test Start Date: 23 09 07 Test Ending Date: 25 09 07
 Test Species: D. similis
 Test Duration: 51 horas
 DATA FILE: TESTE1DI.icp

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg.l	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	3	0.000	100.000	0.000	100.000
2	3	0.013	93.333	11.547	96.000
3	3	0.025	93.333	11.547	96.000
4	3	0.050	93.333	11.547	96.000
5	3	0.100	100.000	0.000	96.000
6	3	0.200	100.000	0.000	96.000

*** No Linear Interpolation Estimate can be calculated from the input data since none of the (possibly pooled) group response means were less than 50% of the control response mean.

Press Any Key to Continue

TESTE TERATOGENESE 2

MALFORMAÇÃO

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: triclosan
 Test Start Date: 29 10 07 Test Ending Date: 01 10 07
 Test Species: d. similis
 Test Duration: 51 horas
 DATA FILE: TESTE2MA.icp

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg.L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	100.000	0.000	100.000
2	4	0.013	100.000	0.000	100.000
3	4	0.025	85.000	19.149	85.000
4	4	0.050	70.000	11.547	70.000
5	4	0.100	30.000	11.547	30.000
6	4	0.200	0.000	0.000	0.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.0750 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.0749 Standard Deviation: 0.0043
 Original Confidence Limits: Lower: 0.0667 Upper: 0.0833
 Expanded Confidence Limits: Lower: 0.0617 Upper: 0.0883
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random Seed: 1582349641

Press Any Key to Continue

MORTALIDADE

E:\EMAILB-1\ecotox\NCP\NCPIN.EXE

Test Species: d.similis

Test Duration: 51

DATA FILE: TESTE2M0.icp

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg.L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	100.000	0.000	100.000
2	4	0.013	80.000	40.000	93.333
3	4	0.025	100.000	0.000	93.333
4	4	0.050	100.000	0.000	93.333
5	4	0.100	90.000	11.547	90.000
6	4	0.200	25.000	50.000	25.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.1615

Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 57 Resamples Generated

Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.

The Bootstrap Estimates Mean: 0.1513 Standard Deviation: 0.0090

No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.

Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -75214622

Press Any Key to Continue_

TESTE 3 MALFORMAÇÃO

```

E:\EMAILB-1\ecotox\ICP\ICPIN.EXE
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: Triclosan
Test Start Date: 11 12 07 Test Ending Date: 13 12 07
Test Species: D. similis
Test Duration: 51 horas
DATA FILE: TESTE3TE.icp

```

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg.L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	100.000	0.000	100.000
2	4	0.025	85.000	30.000	85.000
3	4	0.050	60.000	23.094	60.000
4	4	0.100	10.000	11.547	10.000
5	4	0.200	0.000	0.000	0.000
6	4	0.400	0.000	0.000	0.000

```

The Linear Interpolation Estimate: 0.0600 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.0581 Standard Deviation: 0.0083
Original Confidence Limits: Lower: 0.0444 Upper: 0.0714
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.0351 Upper: 0.0783
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -1240976510
Press Any Key to Continue

```

DESENVOLVIMENTO TARDIO

E:\EMAILB-1\ecotox\ICP\ICPIN.EXE

Test Species: D.similis
Test Duration: 51 horas
DATA FILE: TESTE3.icp

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg.L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	95.000	10.000	99.000
2	4	0.025	100.000	0.000	99.000
3	4	0.050	100.000	0.000	99.000
4	4	0.100	100.000	0.000	99.000
5	4	0.200	100.000	0.000	99.000
6	4	0.400	30.000	47.610	30.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.3435 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 60 Resamples Generated
Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.
The Bootstrap Estimates Mean: 0.3298 Standard Deviation: 0.0182

No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 1914448524
Press Any Key to Continue

MORTALIDADE

E:\EMAILB-1\Ecotox\NCP\NCPIN.EXE

Test Species: D. similis
 Test Duration: 51
 DATA FILE: TESTE3MO.icp

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg.L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	100.000	0.000	100.000
2	4	0.025	90.000	11.547	97.500
3	4	0.050	100.000	0.000	97.500
4	4	0.100	100.000	0.000	97.500
5	4	0.200	100.000	0.000	97.500
6	4	0.400	45.000	52.599	45.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.3810 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 49 Resamples Generated
 Those resamples not used had estimates above the highest concentration/ %Effluent.
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.3417 Standard Deviation: 0.0284

No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -1210911034
 Press Any Key to Continue

ESTE 4
MALFORMAÇÃO

E:\EMAILB-1\Ecotox\NCP\NCPIN.EXE

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: Triclosan
 Test Start Date: 18 12 07 Test Ending Date: 20 12 07
 Test Species: D.similis
 Test Duration: 51 horas
 DATA FILE: TESTE4MA.icp

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg.L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	100.000	0.000	100.000
2	4	0.025	100.000	0.000	100.000
3	4	0.050	90.000	11.547	90.000
4	4	0.100	15.000	10.000	15.000
5	4	0.200	10.000	11.547	10.000
6	4	0.400	0.000	0.000	0.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.0767 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.0769 Standard Deviation: 0.0021
 Original Confidence Limits: Lower: 0.0731 Upper: 0.0800
 Expanded Confidence Limits: Lower: 0.0709 Upper: 0.0820
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: 54459106
 Press Any Key to Continue

DESENVOLVIMENTO TARDIO

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: Triclosan
 Test Start Date: 18 12 07 Test Ending Date: 20 12 07
 Test Species: D. similis
 Test Duration: 51 horas
 DATA FILE: TESTE4DE.icp

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg.L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	100.000	0.000	100.000
2	4	0.025	100.000	0.000	100.000
3	4	0.050	100.000	0.000	100.000
4	4	0.100	100.000	0.000	100.000
5	4	0.200	100.000	0.000	100.000
6	4	0.400	75.000	10.000	75.000

*** No Linear Interpolation Estimate can be calculated from the input data since none of the (possibly pooled) group response means were less than 50% of the control response mean.

Press Any Key to Continue

MORTALIDADE

*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
 Toxicant/Effluent: triclosan
 Test Start Date: 18 12 07 Test Ending Date: 20 12 07
 Test Species: D. similis
 Test Duration: 51 horas
 DATA FILE: TESTE4MO.icp

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg.L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	4	0.000	100.000	0.000	100.000
2	4	0.025	90.000	20.000	96.667
3	4	0.050	100.000	0.000	96.667
4	4	0.100	100.000	0.000	96.667
5	4	0.200	95.000	10.000	95.000
6	4	0.400	25.000	10.000	25.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.3286 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
 The Bootstrap Estimates Mean: 0.3282 Standard Deviation: 0.0089
 Original Confidence Limits: Lower: 0.3143 Upper: 0.3500
 Expanded Confidence Limits: Lower: 0.3057 Upper: 0.3629
 Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -1766978826

Press Any Key to Continue

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T., SAITO, H., NIIKURA, Y., SHIGEOKA, T., NAKANO, Y. **Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives.** Chemosphere 487-495. 2001

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR - 12713: Ecotoxicologia aquática-Toxicidade agudo-Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea). **2 edição. Rio de Janeiro. Brasil. 2004.**

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR - 13373: Ecotoxicologia aquática-Toxicidade Crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Cladocera, Crustacea). **Rio de Janeiro. Brasil. 2005.**

ADOLFSSON-ERIC, M. PETTERSON, M., PARKKONEN, J. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. **Chemosphere, 46, 1485 – 1489. 2002.**

ALLMYR, M., ADOLFSSON-ERIC, M., MCLACHLAN, M. S., SANDBOGH-ENGLUND, G. **Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products.** Sci Total Environ 372:87-93. 2006.

ANDERSON, B.G. & JENKINS, J.C. **A time study of events in the life span of *Daphnia magna*.** Biol. Bull, 83:260-272, 1942.

ANDRADE, E. D. **Terapeutica medicamentosa em odontologia.** São Paulo, SP 2º edição. Artes Médicas. 2002.

ARAGÃO, M. A., BURATINI, S. V. & BERTOLETTI, E. **Total hardness of surface waters in São Paulo State (Brazil).** Acta Limnol. Bras., v 15, n 1, p. 15-18, 2003.

ARMENGOL, J. **Zooplankton crustaceans in Spanish reservoirs.** Ver. Internat. Verein. Limnol., 20,1652-1656. 1978.

ARRAIS, P.S.D., COELHO, H.L.L., BATISTA, M.C.D.S., CARVALHO., M.L., RIGHI, R.E. & ARNAU, J.M. **Perfil da automedicação no Brasil.** Revista de saúde pública. v.31 n°1 p. 71 – 77.1997.

ARANAMI, K & READMAN, J. **Photolytic degradation of Triclosan in freshwater and seawater.** Chemosphere. n°66 p. 1052-1056. 2007.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS: **Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay—*Xenopus* (FETAX).**1991.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard guide for conducting renewal life cycle toxicity tests with *Daphnia magna*.** Philadelphia. 17p. 1988.

AZEVEDO, F. A & CHASIN, A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Paulo, SP. Intertox, Rima. 340p. 2003.

BAIRD, D. J., BARDER, L., CALOW, P. **A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus.** Ecological. Environ. Saf. v. 21, p. 257-265. 1991.

BALMER, M., E., POICER, T., DROZ, C., ROMANUN, K., BERQVIST, P. Q., MÜLLES, M., BUSER, H. R. **Occurrence of Methyl Triclosan, a transformation product of the bactericide Triclosan, in fish from various lakes in Switzerland.** Environ. Sci. Technol. v.38, p. 390 – 395. 2004.

BANTLE, J. A. **FETAX — A developmental toxicity assay using frog embryos** in Rand G. M. Fundamentals in Aquatic Toxicology, Washington, DC, USA, p. 207–230. 1995.

BHARGAVA, H. N. **Special Article: Triclosan: Applications and safety.** AJIC: American Journal of Infection Control. 24(3):209-218, June 1996.

BILA, M.D. & DEZOTTI, M. **Fármacos no meio ambiente.** Quim. Nova. v. 26, nº 4, p. 523-530. 2003.

BLAUSTEIN, A.R., WAKE, D.B. **Declining amphibian populations: A global phenomenon?** Trends Ecol. Evol. V. 5, p. 203-204 1990.

BODAR, C. W. ZEE, A. V., VOOGT, P. A., WYNNE, H., ZANDEE, D. I. **Toxicity of Heavy Metals to Early Life Stages of *Daphnia magna*** Ecotoxicology and Environmental Safety. v.17, nº 3, p. 333-338, June 1989.

BOHRER, M, B. C. **Biomonitoramento das Lagoas de Tratamento Terciário dos Efluentes Líquidos Industriais (SITEL) do Pólo Petroquímico do Sul, Triunfo, RS, através da Comunidade Zooplanctônica.** 470 p. Tese (Doutorado) em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos. 1995.

BOTTRELL, H. H. **Generation time, length of life, instar duration and frequency of moulting and their relationship to temperature in eight species of cladocera from River Thames,** reading Oecologia, nº19 p.129 – 140. 1975.

BURATINI-MENDES, S. V. **Efeitos do meio de cultivo sobre a sobrevivência, produtividade e sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia*.** Dissertação (Mestrado) em Ciências da Engenharia Ambiental - Universidade de São Paulo. 2002.

BRENTANO, D.M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário.** Tese (Doutorado). 99p Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. 2006.

CHENG, S. H., WAL, A.W.K, HUNG SO, C.& WU, R.S.W. **Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos.** Environmental toxicology and chemistry, v.19, n° 12. p. 3024-3031. 2000.

CLARKE, R., KING, J. **O atlas da água."O mapeamento completo do recurso mais precioso do planeta".** Publifolha. São Paulo. 2005.

COWGILL, U. M., KEATING, K. I., TAKAHASHI, T. **Fecundity and longevity of Ceriodaphnia dubia/affinis in relation to dieta t two different temperatures.** Journal of Crustacean Biology. 5 (3): 420 – 429, 1985.

DAUGHTON, C. D. & TERNES, T. A. **Pharmaceuticals and personal care products in Environment: Agents of Subtle Change?.** Environmental Health perspective. v.107. 1999.

DEPIZZOL, F., KELLER, R., GONÇALVES, R. F., CASSINI, S. T. A. **Detecção e isolamento de cepas *Escherichia coli* resistentes a antibióticos presentes em efluentes hospitalar e doméstico da cidade de Vitória-ES.** In 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Campo Grande 2005. **Anais eletrônicos....** Disponível em:<<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes23/VII-018.pdf>> acessado em: 25/03/06.

DEZOTTI, M., BILA, M. D. **Fármacos no ambiente.** Quim. Nova. v..26 n°4. p. 523-530. 2003.

ELENDT, B. P. **Influence of water composition on the chronic toxicity of 3,4 dichloroaniline to *Daphnia magna*.** Water. Res. 24, 1169 – 1172.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. EPA-821-R-02-1: Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5 edição. Washigton.U.S.A 2002.

EPA - MEETING ON PHARMACEUTICALS IN THE ENVIRONMENT. National exposure research laboratory. executive building auditorium Las Vegas. 2005.

ESSLOVA, M. **Embrionic development of partenogenetic eggs of *Daphnia pulex*.** Vest. Esl. Spol. Zool, v.23 p.80-88, 1959.

FETAX - FROG EMBRYO TERATOGENESIS ASSAY – Xenopus (FETAX). Prepared by The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) 2000.

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

FONSECA, A. L. **A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea, Cladocera) e *Poecillia reticulata* (Pisces, Poecillidae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes**

industriais. 210p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo (EESC/USP), São Carlos. 1991.

FONSECA, A. L. **Avaliação da Qualidade da Água na Bacia do Rio Piracicaba Através de Testes de Toxicidade com Invertebrados.** Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997.

FOX, H. M. **The haemoglobin of Daphnia.** Proc. R. Soc.Lond. (Biol.) 135, p.195 - 211. 1948.

FREITAS, C. M. PORTO, M. F. S., PIVETTA, F., MOREIRA., J. C., MACHADO, J. M. H., **Poluição ambiental - Um problema de todos, que afeta uns mais que os outros.** Bahia análise & dados, Salvador n.4 p.260-270, Março 2001.

FREITAS, E. C., ROCHA, O. **The life cycle of Pseudosida ramosa, Daday 1904, na endemic Neotropical caldoceran.** Acta Limnol. 18 (34) p.293-303. 2006.

GELLER, W. **On estimating the age** and the development time of Daphnia as a function of body size and temperature. Journal of Plankton research. v. 9. n° 6 p. 1225. 1987.

GUILHERMINO, L., SOBRAL, O., CHASTINET, C., RIBEIRO, R., GONÇALVES, F., SILVA, M. C., SOARES, A. M. V. M. **A *Daphnia magna* first – brood chronin test: na alternative to the conventional 21-day chronic bioassay?.** **Ecotoxicology and Environmental Safety.** 42, 67 – 74. 1999.

GÜNTZEL, A. M. **Considerações sobre o desenvolvimento do ovo partenogenético de Moina micrura (CLADOCERA – MOINIDAE) nas Lagoas de Estabilização do Petroquímico do sul, Triunfo, RS.** Monografia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1990.

GÜNTZEL, A. M. **Variações espaço-temporais da comunidade zooplanctônica nos reservatórios do Médio e Baixo Rio Tietê/Paraná, SP.** Tese (Doutorado). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos. 2000.

HALLIONG-SORENSEN B., NIELSEN, N. S., LANZKY P.F. *et al.* **Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review.** Chemosphere, v.36, n° 2, p. 357-393. 1998.

HAMILTON, A. L, SAETHER, L. W. O. A. **The occurrence of characteristic deformities in the chironomid larvae of several Canadian lakes.** Can. Entomol. n°103, p.393-368. 1971.

HAMILTON, M. A., RUSSO R. C., THURSTON R. V. **Trimmed Spearman–Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays.** Environ Sci Technol 11:71. 1977.

HEBERER, T & FELDMANN, D. **Removal of pharmaceutical residues from contaminated water sources by membrane filtration.** In: Kümmerer, K. Pharmaceuticals in the environment: source, fate, effects and risks. Springer Berlin, 391-410pp.

HIRCH, R., TERNES, T., HABERER, K., KRATZ, K. **Occurrence of antibiotics in the aquatic environment.** The Science of the total Environment. v.. 225 p.109-118. 1999.

HOKE, R.A. & ANKLEY, G.T. **Application of frog embryo teratogenesis assay – *Xenopus* to ecological risk assessment.** Environmental toxicology and chemistry. V. 24. n° 10. p. 2677-2690. 2005.

HUIGNS, M.E., STOUTHAMER, R. **Parthenogenesis associated with wolbachia.** p. 217-246. In: **INSECT SIMBIOSIS**, BOURTZES, K., MILLER, T.A. 347p. ISBN:0849312868. 2003.

IPCC-INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability.** Working Group II Contribution to the Intergovernmental Panel on Climate Change Fourth Assessment Report Summary for Policymakers. 2007.

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

JEFFREY, D.W. **Biomonitoring of Freshwaters, Estuaries and Shallow Seas: a commentary on requirements for environmental quality control.** 1987.

JONES C.L. *et al*, 1988. *Denst res.* 67 :, 46-50 *apud* SINGER, H., MULLER, S.; TIXIER, C.; PILLOBEL, L. **Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments.** Environ. Sci. Technol. 36(23): 4998-5004. 2002.

JONES, O. A. H., VOLULVOULIS, N., LESTER, J. N. **Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals.** Water res. 36: 5013-5022.

KALYON, B. D. & U. OLGUM. **Controlled release of antimicrobial substances from polymer matrices.** Infect. Control. p.124-125. 2001.

CAST-HUTCHESON, K., RIDER, C V., LEBLANC, G. A. **The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*.** Environ. Toxicol. Chem. 20 (3), 502–509. 2001.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T., THURMMAN, E. M., ZAUGG, S.D., BARBER, L.B., BUXTON, H. T. **Pharmaceuticals, hormones, and other**

organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci.* 36, p.1202-1211. 2002.

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

KWOK, K.W.H. *et al.* **Comparison of tropical and temperate freshwater animal species acute sensitivities to chemicals: Implications for deriving safe extrapolation factors.** *Integrated Environmental assessment and management.* V.3, nº1 p 49-6. 2007.

LAMEIRA, V. **Validação de *Daphnia laevis* (crustacea: branchiopoda) em ensaios de ecotoxicidade.** Monografia apresentada a Faculdade de Biologia. UNISA São Paulo. 2003.

LAMEIRA, V. **Validação de *Daphnia laevis* como organismo-teste em ensaios de toxicidade aguda realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambiente - CQMA do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares -IPEN, sob o escopo da NBR ISO/EIC 17025.** Monografia apresentada ao Curso de Pós-graduação em Gerenciamento ambiental. UNISA. São Paulo. 2005.

LEBEDINSKY, J. **The development of *Daphnia* from summer ovum.** *Zool. Anzeig.* 14: 149, 1891 *apud* GÜNTZEL, A. **Considerações sobre o desenvolvimento do ovo partenogenético de *Moina Micrura* (cladocera-moinidae) nas Lagoas de estabilização do Pólo Petroquímico do Sul, Triunfo, RS.** Dissertação (Bacharel) em Zoologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1990.

LINDSTROM, A., BUERGER, L. J., POIGER, T., BERGQVIST, P. A.; MÜLLER., N. D., BUSER, H. R. **Occurrence and Environmental Behavior of the Bactericide Triclosan and Its Methyl Derivate in Surface Waters and in Wastewater.** *Env.Science & Tech.* 36:2322-2329. 2002.

MATSUMURA-TUNDISI, T., RIETZELER, A. C., ESPINDOLA, E. L. G., & TUNDISI, J. G. **Predation on *C. cornuta* and *Brachionus calyciflorus* by two *Mesocyclops* species coexisting in Barra Bonita reservr (SP, Brazil).** *Hidrobiologia.* 198 p.41 – 155. 1990.

MCMURRY, L.M., OETHINGER, M., LEVY, S. B. **Triclosan targets lipid synthesis,** *Nature* v. 394, nº. 6, p. 531-532. 1998.

MELETTI, P. C. **Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes.** 168p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo. 2003.

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

MUNRO, I. G. & WHITE, W.G. **Comparison of the influence of temperature on the egg development and growth of *Daphnia longispina* (Crustacea, Cladocera)** from two habitats in southern England. *Oecologia*, 20: 157-165. 1975.

NEVES, M. A.; PEREIRA, S. Y. **Gestão dos recursos hídricos subterrâneos no Comitê das Bacias Hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá (SP): um balanço de três anos de atividades do Grupo Técnico de Águas Subterrâneas.** In: SIMPÓSIO DE RECURSOS HÍDRICOS DO SUL, 1., 2005, Santa Maria. *Anais...* Porto Alegre: ABRH, 2005. 1 CD-ROM.

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

NOGUEIRA, P. F. M., SANTOS, M. A. P. F. & MELÃO M. G.G. 2003. **Efeitos da temperatura e alimento sobre as características bionômicas de *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Daphnidae).** In: Congresso Brasileiro de Limnologia, IX, 20-25 julho, 2003, Universidade Federal de Juiz de Fora, *Resumos ...* Juiz de Fora.

OBRESHKOVE, V., FRASER, A. W. **Growth and differentiation of *Daphnia magna* eggs in vitro.** Biol. Bull. v.78 p.426-436. 1940.

OECD - Organization For Economic Co-Operation And Development. Guidelines 202: ***Daphnia* sp., acute immobilization test and reproduction test** -. Paris, 2006.

OHTA, T., TOKISHITA, S., SHIGA, Y., HANAZATO, T., YAMAGATA, H. **Anassay system for detecting environmental toxicants with cultured cladoceran eggs in vitro: Malformation induced by ethylenethiourea.** Environ Res A 77:43-48. 1998.

ORVOS, D. R., VERSTEEG, D.J., INAUEN, J., CAPDEVIELLE, M., ROTHENSTEIN, A., CUNNINGHAM, V. **Aquatic toxicity of Triclosan.** Environmental Toxicology and Chemistry, 21, 1338-1349. 2002.

PEDROZO, C. de S. 2003. **Effects of culture medium and food quantity on the growth, fecundity and longevity of the cladoceran *Daphnia similis* Claus.** Acta Limnologia Brasiliensia vol.15(2). 43-49p.

PESTICIDE ECOTOXICITY DATABASE. **Environmental Fate and Effects Division**, U.S.EPA, Washington, D.C. 2000. Disponível: www.pesticideinfo.gov. Acessado em 25/10/05.

PUSCEDDU, F.H., LAMEIRA, V. BOHRER, M. B. **Efeitos crônicos do fármaco Triclosan sobre *Ceriodaphnia dubia* através de ensaios crônicos de ecotoxicologia.** Livro de Resumos do VIII Congresso SETAC LA. 2007.

RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **O Uso de bioindicadores para Avaliação da Qualidade do Ar em Porto Alegre.** In: ZURITA, M. L. L.; TOLFO, A.M. (Org.) A

Qualidade do Ar em Porto Alegre. Porto Alegre, Secretaria Municipal do Meio Ambiente. p.68-76. 2000.

REGOS, J. & HITZ, H. R. 1974. **Investigations on the mode of action of triclosan, a broad-spectrum antimicrobial agent.** Zentbl. Bakterirol. Parasitenkd. Infektkrankh. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A 226: 390-401.1974.

REIS FILHO, R. W.; BARREIRO, J. C.; E. M.; CASS, Q. B. **Fármacos, ETEs e corpos hídricos.** Revista Ambi-água, Taubaté, v.2 nº 3, p 54 – 61, 2007.

ROCHA, O. & MATSUMURA-TUNDISI, T. M. **Growth rate, longevity and reproductive performance of *Daphnia laevis* Birge, *Daphnia gessneri* Herbst and *Daphnia anbigua* Scourfield in laboratory cultures.** Universidade de São Carlos: Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Laboratório de Limnologia. São Carlos. Rev. Bras. Biol. 50:915-921. 1990.

ROCHA, O. **Perfil do conhecimento de biodiversidade em águas doces do Brasil.** Relatório Final. Avaliação do Estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil. COBIOMMA – GTB/CNPq – NEPAM/UNICAMP. 2000.

ROSA, G.B. **Estudo dos efeitos do fármaco Propranolol para *Ceriodaphnia silvestrii* (CLADOCERA, CRUSTACEA) com ênfase em efeitos nas populações.** Dissertação (Mestrado) IPEN-USP. 2008.

SABALIUNAS, D., WEBB, S. F., HAUKE, A., JACOB, M., ECKHOFF, W. S. **Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK.** water research. p.3145-3154. 2003.

SAMPAIO, E. V. **Composição, abundância e diversidade das comunidades zooplancônicas em reservatórios do sudeste do Brasil (bacia dos rios Paranapanema e Alto São Francisco).** Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos. 2002.

SAMSOE – PETERSEN, L. WITNTHIER-NIELSEN, J. MADSEN. **Fate and effects of Triclosan, environmental project nº861,** Danish Environ. Prot Agency. 2003.

SANCHEZ-PRADO, L. LLOMPART, M. L., GARCIA, C. G. J., BAYONA, J. M., CELA, R. **Monitoring the photochemical degradation of Triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction.** Chemosphere, v. 65, nº8. Novembro. p. 1338-1347. 2006.

SANSEVERINO, M. T. V. *et al.* **Manual de teratogênese.** Editora da Universidade 556p. 2005.

SCBWMI – SNATA CLARA BASIN WATERSHED MANAGEMENT INITIATIVE: **Environmental emergence of Triclosan.** 2006

SCHWEIZER, H. P. **Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics.** FEMS Microbiol. Lett. 202:1-7. 2001.

SMA-SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE. **Gestão participativa das águas.** 96p. 2004.

SHURIN, J.B. DODSON, S.I. **Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonyphenol on environmental sex determination and development in *Daphnia*.** Environ.toxicol. Chem. 16 (6), 1269 – 1276. 1997.

SILVA; A. M. **Avaliação ecotoxicológica do agrotóxico permetrina através de ensaios de toxicidade com invertebrados aquáticos.** 162p. Dissertação (Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo. 2005.

SINGER, H., MULLER, S.; TIXIER, C.; PILLOBEL, L. **Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments.** Environ. Sci. Technol. 36(23): 4998-5004. 2002.

SOBRAL, O., CHASTINET, C., NOGUEIRA, A., SOARES, M. A. M. N., GONÇALVES, F., RIBEIRO, R. **In vitro development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicology test with *Daphnia Magna*?** Ecotoxicology and safety, 174179. 2001.

SODRE, F. F., MONTAGNER, C. C., LOCATELLI, M. A. E., JARDIM, W. F. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil).** J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 2, nº2, p.187 – 196. 2007.

STUMPF, M., TERNES, T.A., ROLF-DIETER W., RODRIGUES, S., V., BAUMANN, W. **Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil.** The Science of the Environment, 22, 135-141. 1999.

TERNES, T.A., STUMPF, M.; MUELLER, J., HABERER, K. WILKEN, R.D. **Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. investigations in Germany, Canada and Brazil.** The science of the total environment . 255. p.81-90 1999.

TIETGE, J., ANKLEY, G.T., DEFOR, D.L., HOLCOMBE, G.W., KATHLEEN, M.J. **Effects of water quality on development of *Xenopus laevis*: A frog embryo teraogenesis assay-Xenopus assessment of surface water associated with malformations in native anurans.** Environmental Teratology and Chemistry. v.. 19. nº 8, 2114-2121. 2000.

TIXTIER, C., SINGER, H. P., CANONICA, S., MÜLLER, S. R. **Phototransformation of Triclosan in surface waters : A relevant elimination process for this widely used biocide-Laboratory studies, field measurements and modeling.** Environ. Sci.Technol. v. 36, p.3482-3489.2002.

TORRES, C. R. G., KUBO, C. H., ANIDO, A., RODRIGUES, J. R. **Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia.** Ver. Fac. Odontol. São José dos Campos v.3 nº2, 43-52pp. 2000.

VENKATARAMAN, K. & JOB, V. **Effect of temperature on the development, growth and egg production in *Daphnia carinata* king (Cladocera – Daphniidae).** *Hydrobiologia*. v..68. n°3, p. 217-224. 1980.

WALDMAM M. **Recursos hídricos e a rede urbana mundial: dimensões globais da escassez.** 2002. Disponível em www.mw.pro.br/mw/p04_03_06.pdf.> Acessado: 25/08/05.

WEST, I. & GULLEY, D. **Western Ecosystems Technology.** TOXTAT 3.4 Computer Program., 1996.

ZHANG, L., GIBBLE, R., BAER, K. N. **The effects of 4-nonyphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development and reproduction in *Daphnia magna*.** *Ecotoxicology and environmental safety*. p. 330-337. 2003.

ZUCCATO, E., CALAMARI, D., NATANGELO, M. **Presence of therapeutic drugs in the environment.** Letters, Research support. *The Lancet*. v. 355. *issue*: 1217. 1789-1790p. 2000.