

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E  
SANEAMENTO

ALINE CHRISTINE BERNEGOSSI

Avaliação da toxicidade do retardador de chamas Tetrabromobisfenol A em  
matriz de efluente doméstico sintético e isolado

São Carlos/SP

2022



ALINE CHRISTINE BERNEGOSSI

Avaliação da toxicidade do retardador de chamas Tetrabromobisfenol  
A em matriz de efluente doméstico sintético e isolado

Tese de doutorado apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências: Área de concentração Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Juliano José Corbi  
Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Rossi

Gorni

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos/SP

2022

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da  
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Bernegossi, Aline Christine  
Avaliação da toxicidade do retardador de chamas  
BB525a Tetrabromobisfenol A em matriz de efluente doméstico  
sintético e isolado / Aline Christine Bernegossi;  
orientador Juliano José Corbi; coorientador Guilherme  
Rossi Gorni. São Carlos, 2022.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de  
Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de  
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,  
2022.

1. Bioensaios. 2. Biota aquática. 3.  
Ecotoxicidade. 4. Monitoramento ambiental. 5. TBBPA. I.  
Título.

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **ALINE CHRISTINE BERNEGOSSI**.

Título da tese: "Avaliação da toxicidade do retardador de chamas Tetrabromobisfenol A em matriz de efluente doméstico sintético e isolado".

Data da defesa: 27/10/2022.

### Comissão Julgadora

### Resultado

Prof. Associado **Juliano Jose Corbi**  
**(Orientador)**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

APROVADA

Prof. Dr. **Felipe André dos Santos**  
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Tupã)

APROVADA

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

APROVADA

Profa. Dra. **Mariana Miguel**  
(Escola Estadual Prof. Dr. Telêmaco Paioli Melges)

APROVADA

Dra. **Ana Letícia Madeira Sanches**  
(Pós-Doutoranda/UDESC)

APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:  
Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**



## AGRADECIMENTOS

À Deus, meu senhor maior, por iluminar e abençoar minha trajetória.  
Aos meus pais, mamis e papis, por sempre apoiarem as minhas decisões e me ajudarem na realização de sonhos e projetos.  
Minhas irmãs, Agda e Aninha, por estarem ao meu lado sempre que necessário.  
Ao esposo Bruno, por ser meu amigo e parceiro, me ajudar sempre que necessário, compartilhar de sonhos e me manter forte durante todos os momentos.  
Ao meu orientador, Prof. Dr. Juliano, pela oportunidade do desenvolvimento do doutorado, pelos conselhos e todo auxílio prestado.  
Ao meu coorientador Prof. Dr. Guilherme pelo direcionamento nas análises estatísticas,  
Ao meu orientador na Holanda, Prof. Dr. Van Gestel, por me acolher na Vrije Universiteit e ser paciente nos momentos de ensinamentos.  
À minha prima Rosane, por estar sempre ao meu lado e me dar o melhor presente do mundo, o Arthur, meu afilhado amado.  
Ao POVO e, em especial, meus migos de sempre: Laurinha, Jacque, Jé, TP (Raul), Plets (Allan), Mimi, Tia (Gabi), por serem meu suporte e família.  
Aos meus amigos de laboratório, Mayara, Bárbara, Bruninha, Cleiton, Daniel, Fernanda, Gabriel, Gleyson, Lidia e Tallyson por me sempre me incentivar, compartilharem a reserva técnica, auxiliar nos experimentos, cuidar e fazer da rotina do laboratório algo mais leve.  
À Laura e Allan que abriram as portas de suas casas para mim quando eu precisei de um lar em São Carlos.  
Aos meus amigos Mara, Liliane, Carina, Vanessa, Dudu, Pedro, Renato por estarem sempre prontos para conversar e me fazer sentir amada.  
Aos meus amigos da dança e teatro Lidi, David, Hillary, João, Gustavo, Andreta que me ajudaram a descontrair durante essa caminhada  
Aos amigos e funcionários da USP São Carlos tia Vânia, Rose, Sá, Pri, Fernanda, Fátima por serem tão prestativos e pelos sorrisos e simpatia  
A Williane Macedo, Carol Sabatini e Rodrigo Carneiro pela parceria e ajuda na etapa de quantificação química.  
À CAPES pelo apoio financeiro por meio da bolsas concedida no Brasil, pela oportunidade de intercâmbio na Holanda (Print-PDSE) e demais suportes financeiros.,  
Aos meus amigos e colegas de trabalho na Holanda, Skylar, Mayara, Saul, Sam, Bart, Andrew, Ruben pelas conversas no café e risadas.  
Aos amigos e funcionários da Vrije Universiteit, Rudo e Riet por serem tão prestativos e pelas conversas.  
A todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse realizado.





## RESUMO

BERNEGOSSI, A.C. **Avaliação da toxicidade do retardador de chamas Tetrabromobisfenol A em matriz de efluente doméstico sintético e isolado.** 2022. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

O Tetrabromobisfenol A (TBBPA), é um retardador de chamas constituinte de eletrônicos, fios elétricos, entre outros produtos que possuem composição inflamável. Esse composto é um contaminante emergente, proveniente de águas residuárias não tratadas e deposição incorreta de resíduos eletrônicos. A presença do TBBPA nos corpos hídricos vem sendo documentada em baixas concentrações (concentração máxima detectada em lagos de  $4,87 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Sua degradação em sistemas de tratamento biológicos ou químicos vêm sendo estudada, visto que o TBBPA pode causar efeitos tóxicos diversos na biota aquática e desregulação endócrina. Portanto, essa pesquisa visou avaliar os efeitos ecotoxicológicos do TBBPA, isolado e em matriz de efluente, pré e pós tratamento em reatores biológicos anaeróbios operando em condições acidogênica (RA) e metanogênica (RM). Os bioensaios do composto em matriz de efluente foram realizados utilizando as espécies *Allonais inaequalis*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli*, *Daphnia magna* e *Pristina longiseti*. Com o composto isolado a espécie *Lymnaea stagnalis* também foi utilizada. O risco ecotoxicológico do TBBPA foi classificado com base na estimativa do coeficiente de risco. De forma geral, o RM reduziu a toxicidade aguda do afluente sintético enriquecido com TBBPA ( $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) de maneira mais eficaz que o RA, apresentando unidade tóxica de 1,62 comparada à 2,93 (efluente RA) e 3,05 (afluente). Com exceção do efluente RM para *A. inaequalis*, ambos tratamentos reduziram a toxicidade crônica, possibilitando um aumento na reprodução de *A. inaequalis*, *P. longiseti* e *C. silvestrii* quando comparados ao afluente dos reatores. Porém, ambos os efluentes permaneceram com potencial de toxicidade aguda e crônica nas espécies, o que confirma a necessidade de tratamentos complementares antes do lançamento no corpo receptor. Ademais, aplicando os bioensaios com o TBBPA padrão (isolado) foi possível determinar a concentração de efeito de toxicidade aguda em 50% dos organismos ( $\text{CE}_{50}$ ), que variou de  $678 \mu\text{g.L}^{-1}$  (crustáceo *C. silvestrii*) a  $1526 \mu\text{g.L}^{-1}$  (inseto *C. sancticaroli*), concentrações superiores àquelas detectadas em ambientes aquáticos de água doce. Ressalta-se que não foi possível calcular  $\text{CE}_{50}$  para o molusco *L. stagnalis* nas concentrações testadas (de até  $3200 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Com relação à toxicidade crônica, apesar da elevada sobrevivência nos teste, houve efeito na reprodução para três espécies com ocorrência no Brasil (*A. inaequalis*, *P. longiseti* e *C. silvestrii*), sendo *P. longiseti* a espécie mais sensível ( $\text{CE}_{50}$  de  $2,49 \mu\text{g.L}^{-1}$ , abaixo da máxima concentração detectada em lagos). O risco ecotoxicológico estimado foi de insignificante à baixo risco para a toxicidade aguda e baixo risco à alto risco para a toxicidade crônica. Os resultados

com os efluentes mostram como os bioensaios podem ser usados como ferramenta no monitoramento da qualidade dos efluentes e na escolha de configurações de tratamentos. Além disso, os ensaios de ecotoxicidade crônica se mostraram um indicador de toxicidade importante, mesmo quando os resultados de toxicidade aguda apontam um baixo risco de toxicidade aguda do composto.

Palavras-chave: Bioensaios. Biota aquática. Ecotoxicidade. Monitoramento ambiental. TBBPA

## ABSTRACT

BERNEGOSSI, A.C. **Toxicity evaluation of the flame retardant Tetrabromobisphenol A isolated and in wastewater matrix.** 2022. Thesis (Doctor degree in Science) – School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2022.

Tetrabromobisphenol A (TBBPA) is a flame retardant present in electronics, electrical wires, paints and other products with flammable composition. In addition, it is an emerging contaminant that arrives in the aquatic environment through untreated wastewater and incorrect disposal of electronic waste. TBBPA presence in water bodies has been documented at low concentrations (the highest documented concentration in a lake is  $4,87 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). TBBPA degradation in biological or chemical treatment systems is still being studied as it can cause diverse toxic effects on aquatic biota and endocrine disruption. Therefore, this research aimed to evaluate the ecotoxicological effects of this compound, isolated and in wastewater matrix, pre and post-treatment in anaerobic biological reactors operating under acidogenic (AR) and methanogenic (RM) conditions. Bioassays with the wastewater matrix were performed using the species *Allonais inaequalis*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli*, *Daphnia magna* and *Pristina longiseta*. For the isolated compound, the species *Lymnaea stagnalis* was also used. The ecotoxicological risk of TBBPA was classified based on the risk coefficient estimate. In general, RM reduced the acute toxicity of synthetic influent enriched with TBBPA ( $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) more effectively than RA, presenting a toxic unit of 1.62 compared to 2.93 (RA effluent) and 3.05 (influent). Excepted for the RM effluent for *A. inaequalis*, both treatments reduced chronic toxicity, allowing an increase in the reproduction of *A. inaequalis*, *P. longiseta* and, *C. silvestrii* when compared to the influent of the reactors. However, both effluents still had the potential for acute and chronic toxicity in the species, which indicates the need for complementary treatments before discharging them into the receiving body. Furthermore, applying the bioassays with the standard TBBPA (isolated) made it possible to determine the concentration of acute toxicity effect in 50% of the organisms ( $\text{EC}_{50}$ ), which ranged from  $678 \mu\text{g.L}^{-1}$  (crustacean *C. silvestrii*) to  $1526 \mu\text{g.L}^{-1}$  (insect *C. sancticaroli*), concentrations higher than those detected in freshwater environments. Moreover, it was not possible to calculate  $\text{EC}_{50}$  for the mollusk *L. stagnalis* at the tested concentrations (up to  $3200 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Regarding chronic toxicity, despite the high survival in the tests, there was an effect on reproduction for three species that exist in Brazil (*A. inaequalis*, *P. longiseta* and *C. silvestrii*), with *P. longiseta* being the most sensitive species (effective concentration of  $2.49 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). The ecotoxicological risk ranged from negligible to low risk for acute toxicity and low to high risk for chronic toxicity. The results with the reactors samples show how bioassays can be used to monitor effluents` quality and choose treatment configurations. Also, chronic bioassays are shown to be an important toxicity indicator even when acute results showed that a compound is a low acute risk.

Keywords: Aquatic biota. Bioassays. Ecotoxicity. Environmental monitoring. TBBPA.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura molecular do Tetrabromobisfenol A (TBBPA) .....	42
Figura 3.2 - Modelo de carta- controle especificando os componentes principais e destacando em azul a área que representa a validação dos testes ecotoxicológicos....	51
Figura 3.3 – <i>Allonais inaequalis</i> : a) indivíduo, b) prostômio, c) cerdas dorsais....	54
Figura 3.4 – <i>Pristina longiseta</i> : a) indivíduo, b) prostômio, c) cerdas dorsais. ....	55
Figura 3.5- Ciclo de vida de <i>Chironomus sancticaroli</i> contemplando as fases aquática (ovos, larvas e pupas) e terrestre (adultos alados). ....	57
Figura 3.6 – Aparelho bucal do gênero <i>Chironomus</i> : a) e b) padrão normal, c) deformidade leve e d) deformidade severa. ....	58
Figura 3.7 – Esquema do ciclo de vida de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> . ....	59
Figura 3.8 – Esquema representativo do ciclo de vida de <i>Daphnia magna</i> , contendo a) embriões já formados na câmara de incubação; b) ovos maduros no ovário; c) primeiro estágio do ovo após ser transferido para a câmara de incubação; d) ovos imaturos no ovário; e) neonatas; f) juvenis. ....	60
Figura 3.9 - Exemplar de microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> a) fêmea após reprodução assexuada e b) fêmea após a reprodução sexuada e formação do efípio. .	61
Figura 3.10 – Esquema do ciclo de vida de <i>Lymnaea stagnalis</i> . ....	62
Figura 4.1: Delineamento experimental .....	65
Figura 4.2 - Reatores de bancada para tratamento de efluente doméstico contendo TBBPA a) Fotografia dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM), b) esquema de funcionamento dos reatores RA e RM, com pontos de alimentação e amostragem. .	68
Figura 4.3 – Exemplo de como é feita a mensuração do comprimento larval de <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	79
Figura 4.4 – Exemplificação da medição do comprimento da asa da fêmea de <i>Chironomus sancticaroli</i> . ....	81
Figura 4.5 – Exemplo de ecdise (muda) de <i>Daphnia magna</i> . ....	83
Figura 4.6 – Contagem das massas de ovos coletados por réplica no teste de ecotoxicidade crônica com <i>Lymnaea stagnalis</i> exposta ao TBBPA padrão. ....	85

Figura 5.1 – Carta-controle para *Allonais inaequalis* contendo os valores de concentração de efeito (imobilidade) em 50% dos indivíduos após teste de sensibilidade (4 d) com cloreto de potássio (KCl), limite superior (+ 2 DP) e limite inferior (-2 DP). ... 91

Figura 5.2 – Carta-controle para *Ceriodaphnia silvestrii* contendo os valores de concentração de efeito (imobilidade) em 50% dos indivíduos após teste de sensibilidade (2 d) com cloreto de sódio (NaCl), limite superior (+ 2 DP) e limite inferior (-2 DP)..... 92

Figura 5.3 – Carta-controle para *Chironomus sancticaroli* contendo os valores de concentração de efeito (mortalidade) em 50% dos indivíduos após teste de sensibilidade (4 d) com cloreto de potássio (KCl), limite superior (+ 2 DP) e limite inferior (-2 DP). ... 93

Figura 5.4 – Carta-controle para *Daphnia magna* contendo os valores de concentração de efeito (imobilidade) em 50% dos indivíduos após teste de sensibilidade (2 d) com sulfato de cobre penta hidratado (CuSO<sub>4</sub>), limite superior (+ 2 DP) e limite inferior (-2 DP). ..... 94

Figura 5.5 – Carta-controle para *Pristina longiseta* contendo os valores de concentração de efeito (imobilidade) em 50% dos indivíduos após teste de sensibilidade (2 d) com cloreto de potássio (KCl), limite superior (+ 2 DP) e limite inferior (-2 DP). ... 95

Figura 5.6 - Mortalidade e imobilidade dos organismos a) *Allonais inaequalis*, b) *Pristina longiseta*, c) *Ceriodaphnia silvestrii* e, d) *Chironomus sancticaroli* após teste de ecotoxicidade aguda com afluente e efluentes do reator acidogênico e metanogênico. Imobilidade dos organismos e) *Daphnia magna* após teste de ecotoxicidade aguda com os efluentes do reator acidogênico e metanogênico..... 100

Figura 5.7 –Número de novos organismos e imobilidade (%) para a) *Allonais inaequalis* (exposição de 10 d), b) *Pristina longiseta* (exposição de 4 d) após teste de ecotoxicidade crônica com afluente e efluentes do reator acidogênico (RA) e metanogênico (RM). ..... 106

Figura 5.8 –Número médio de neonatos e imobilidade (%) para *Ceriodaphnia silvestrii* durante exposição crônica com afluente e efluentes do reator acidogênico (RA) e metanogênico (RM) em a) primeira troca do teste, b) segunda troca do teste e c) final do teste (7 d)..... 110

Figura 5.9 – Mortalidade (%) das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) após exposição de 10 dias de exposição. ....	113
Figura 5.10 – Tamanho médio das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) após exposição de 10 dias. ....	115
Figura 5.11 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> sob exposição ao afluente dos reatores na geração parental (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%. ....	116
Figura 5.12 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> sob exposição ao afluente dos reatores na geração F1 (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%. ....	117
Figura 5.13 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> sob exposição ao efluente do reator acidogênico (RA) na geração parental (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%. ....	118
Figura 5.14 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> sob exposição ao efluente do reator acidogênico (RA) na geração F1 (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%. ....	119
Figura 5.15 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> sob exposição ao efluente do reator metanogênico (RM) na geração parental (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%. ....	120
Figura 5.16 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> sob exposição ao efluente do reator metanogênico (RM) na geração F1 (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%. ....	121
Figura 5.17 – Emergência (%) das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> sobreviventes após 10 dias de exposição na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) durante teste de geração. ....	122
Figura 5.18 – Tempo média de emergência dos adultos de <i>Chironomus sancticaroli</i> na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) durante o teste de geração. ....	124

Figura 5.19 –Tamanho médio das asas das fêmeas na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) após exposição até emergência total das larvas em teste de geração com *Chironomus sancticaroli*..... 125

Figura 5.20 –Fecundidade potencial das fêmeas na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) após exposição até emergência total das larvas em teste de geração com *Chironomus sancticaroli*..... 126

Figura 5.21 - Taxa de imobilidade ou mortalidade para a) *Allonais inaequalis*; b) *Pristina longisetata*; c) *Ceriodaphnia silvestrii*, d) *Daphnia magna*, e) *Chironomus sancticaroli* e f) *Lymnaea stagnalis* quando expostos em teste de toxicidade aguda ao TBBPA padrão..... 137

Figura 5.22 – Curva de distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) de ecossistemas aquáticos expostos ao TBBPA em testes de ecotoxicidade aguda. Em destaque, os resultados da presente pesquisa..... 139

Figura 5.23 – Reprodução (número de novos indivíduos) e imobilidade observados para a) *Allonais inaequalis* (10 d) e b) *Pristina longisetata* (7 d) quando expostos em teste de toxicidade crônica ao TBBPA padrão. .... 141

Figura 5.24 – Mortalidade (a) e comprimento (b) das larvas de *Chironomus sancticaroli* após exposição 10 dias em teste de toxicidade crônica ao TBBPA padrão. .... 142

Figura 5.25 – Tempo de emergência (a) e taxa de emergência (b) das larvas de *Chironomus sancticaroli* sobreviventes após 10 dias expostas ao TBBPA padrão em teste de emergência. .... 143

Figura 5.26 – Tamanho das asas (a) e reprodução potencial (b) das fêmeas de *Chironomus sancticaroli* emergidas durante teste de emergência expostas ao TBBPA padrão..... 143

Figura 5.27 – Reprodução (número médio de neonatos por fêmea) e imobilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* após exposição de a) 3 dias, b) 5 dias e c) 7 dias em teste de toxicidade crônica ao TBBPA padrão. .... 145



Figura 5.28 – Teste de ecotoxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i> a) número de mudas, b) número de neonatos e c) comprimento do corpo ao final da exposição.....	147
Figura 5.29 – Mortalidade de <i>Lymnaea stagnalis</i> durante exposição de toxicidade crônica ao TBBPA: a) média e desvio da mortalidade ao final dos 28 dias e b) número de organismos mortos a cada troca do meio. ....	149
Figura 5.30 – Tamanho médio das conchas de <i>Lymnaea stagnalis</i> após exposição de toxicidade crônica (28 d) ao TBBPA padrão.....	150
Figura 5.31 – Alface não consumido por <i>Lymnaea stagnalis</i> após exposição ao TBBPA padrão. ....	150
Figura 5.32 – Número médio de massas de ovos produzidos por <i>Lymnaea stagnalis</i> ao longo da exposição de toxicidade crônica (28 d) ao TBBPA padrão.....	151



## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Concentrações de TBBPA detectadas em matrizes de água doce e efluentes.....	44
Tabela 3.2 – Efeitos observados para o TBBPA em teste de ecotoxicidade aguda em biota aquática .....	48
Tabela 4.1 - Características químicas do TBBPA padrão.....	67
Tabela 4.2 - Condições de cultivo mantidas no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos e na Vrije Universiteit Amsterdam (VU) .....	70
Tabela 4.3 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de sensibilidade para os organismos-teste .....	73
Tabela 4.4 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com <i>Allonais inaequalis</i> .....	76
Tabela 4.5 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> . .....	77
Tabela 4.6 – Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica (teste de gerações e teste de emergência) com <i>C. sancticaroli</i> .....	78
Tabela 4.7 – Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com <i>Daphnia magna</i> . .....	82
Tabela 4.8 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com <i>Pristina longiseta</i> . .....	84
Tabela 4.9 – Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com <i>Lymnaea stagnalis</i> . .....	85
Tabela 5.1- Relação dos parâmetros químicos mensurados durante os 100 dias de operação do reator acidogênico .....	96
Tabela 5.2- Relação dos parâmetros químicos mensurados durante os 100 dias de operação do reator metanogênico.....	97
Tabela 5.3– Avaliação da conformidade dos efluentes do reator acidogênico (RA) e metanogênico (RM) de acordo com as diretrizes da Resolução CONAMA 430/2011 para o lançamento de efluentes em corpos hídricos Classe 3. ....	98

Tabela 5.4 - Valores de p-valor obtidos pelo teste *Two-Way* ANOVA e Tukey correspondente à comparação das respostas de imobilidade ou mortalidade de *Allonais inaequalis*, *Pristina longiseti*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli* e *Daphnia magna* entre as diluições testadas e o controle (Fator A), entre os tratamentos (sem tratamento -aflu, efluente do reator acidogênico – eflu RA e efluente do reator metanogênico -eflu RM) (Fator B) e a interação dos fatores A e B após bioensaio de toxicidade aguda. Nível de significância de 95%. ..... 102

Tabela 5.5 - Valores de concentrações de efeito (CE) expressas em fração de efluente (afluente ao reator- aflu, efluente do reator acidogênico - RA e efluente do reator metanogênico - RM) que causou efeito (imobilidade ou mortalidade) em 50 e 10% dos indivíduos (CE<sub>50</sub>, CE<sub>10</sub>) para *Allonais inaequalis*, *Pristina longiseti*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli* e *Daphnia magna*. Nível de significância de 95%. ..... 103

Tabela 5.6 - Valores de redução (-) ou aumento (+) de toxicidade entre o afluente (aflu) e os efluentes dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM), baseados na Unidade Tóxica (UT) para *Allonais inaequalis*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli* e *Pristina longiseti*. ..... 104

Tabela 5.7– Relação entre concentração de efeito (CE<sub>50</sub>) e fatores de segurança para assegurar ausência de toxicidade aguda para *Allonais inaequalis*, *Pristina longiseti*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli* e *Daphnia magna*. O fator de segurança na Eq. 5 equivale a 100 enquanto na Eq. 6 equivale a 3. .... 105

Tabela 5.8 - Valores de p-valor obtidos pelo teste *Two-Way* ANOVA e Tukey correspondente à comparação das respostas de reprodução de *Allonais inaequalis* e *Pristina longiseti* entre as diluições testadas e o controle (Fator A), entre as soluções-teste (afluente - aflu, efluente do reator acidogênico – eflu RA e efluente do reator metanogênico -eflu RM) e a interação dos fatores A e B após bioensaio de toxicidade crônica. Nível de significância de 95%. ..... 107

Tabela 5.9 – Concentração de efeito na reprodução e mobilidade expressos como CE<sub>50</sub> considerando nível de significância de 95% para *Allonais inaequalis* e *Pristina longiseti* após exposição crônica ao afluente e efluentes dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM). ..... 108

Tabela 5.10 - Valores de redução (-) ou aumento (+) de toxicidade entre o afluente (aflu) e os efluentes dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM), baseados na Unidade Tóxica (UT) para <i>Allonais inaequalis</i> e <i>Pristina longiseta</i> . ....	108
Tabela 5.11 - Valores de p-valor obtidos pelo teste <i>Two-Way</i> ANOVA e Tukey correspondente à comparação das respostas de reprodução de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> entre as diluições testadas e o controle (Fator A), entre as soluções-teste (afluente - aflu, efluente do reator acidogênico – eflu RA e efluente do reator metanogênico -eflu RM) e a interação dos fatores A e B após bioensaio de toxicidade crônica. Nível de significância de 95%. ....	111
Tabela 5.12 – Concentração de efeito na reprodução (CE50) considerando nível de significância de 95% para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> após exposição de 7 dias ao afluente (Aflu) e efluentes (Eflu) dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM). ....	112
Tabela 5.13 – Concentração de efeito na sobrevivência de <i>Chironomus sancticaroli</i> (CE <sub>10</sub> e CE <sub>50</sub> ) considerando nível de significância de 95% após exposição de 10 dias ao afluente (Aflu) e efluentes (Eflu) dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM) na geração parental (P) e filial (F1). ....	114
Tabela 5.14 - Comparação entre as concentrações de TBBPA e controle pelo teste não-paramétrico Kruskal Wallis e concentrações de TBBPA que foram estatisticamente diferentes do controle (p-valor do teste Dunn). Nível de significância de 95%. ....	138
Tabela 5.15- Valores de concentrações de efeito (CE) que causou efeito em 50 e 10% dos indivíduos (CE <sub>50</sub> , CE <sub>10</sub> ) para <i>A. inaequalis</i> , <i>P. longiseta</i> , <i>C. silvestrii</i> , <i>C. sancticaroli</i> e <i>D. magna</i> e <i>L. stagnalis</i> após bioensaio de toxicidade aguda com TBBPA. ....	140
Tabela 5.16- Índice de inibição ou indução de mudas (%Im) e neonatos (%In) aplicado para teste de ecotoxicidade crônica (21 d) com <i>Daphnia magna</i> . ....	148
Tabela 5.17- Valores de concentrações de efeito que causou de imobilidade ou mortalidade em 50% e dos indivíduos CE <sub>50</sub> M) e em 50% e 10% da reprodução dos indivíduos (CE <sub>10/50</sub> R) para <i>A. inaequalis</i> , <i>P. longiseta</i> , <i>C. silvestrii</i> , <i>C. sancticaroli</i> e <i>D. magna</i> e <i>L. stagnalis</i> após bioensaio de toxicidade crônica com TBBPA. Nível de significância de 95%. ....	152



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas;  
Aflu – afluente aos reatores (antes do tratamento);  
BFR – retardantes de chama bromados;  
BOD – Incubadora *Biochemical Oxygen Demand*;  
CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O – cloreto de cálcio;  
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O – sulfato de cálcio dihidratado;  
CE – Concentração efetiva;  
CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo;  
CL – Concentração letal;  
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente;  
CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O – sulfato de cobre pentahidratado;  
DMSO – Dimetilsulfóxido;  
DP – desvio padrão;  
DQO – Demanda Química de Oxigênio;  
EESC – Escola de Engenharia de São Carlos;  
Eflu – efluente dos reatores (após tratamento);  
ESI - Electrospray;  
HA – Hipótese A;  
HB – Hipótese B;  
HBSCDDs – hexabromociclododecanos;  
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência;  
KCl – cloreto de potássio;  
LEEA – Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos;  
LPB – Laboratório de Processos Biológicos;  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – sulfato de magnésio heptahidratado;  
Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> – selinito de sódio;  
NaCl – cloreto de sódio;  
NaHCO<sub>3</sub> – bicarbonato de sódio;

NBR – Normas Técnicas Brasileiras;  
OECD - *Organization for Economic Cooperation and Development*;  
PBDEs - éteres difenílicos polibromados;  
POPs – poluentes orgânicos persistentes;  
RA – reator acidogênico;  
RM – reator metanogênico;  
TBBPA – Tetrabromobisfenol A;  
TBBPA-BAE – TBBPA bis (éter aliado);  
TBBPA-BHEE – TBBPA bis (2-hidroxietil éter);  
TBBPA-DBPE – TBBPA éter dibromopropílico;  
TBBPA-MAE – TBBPA mono (éter aliado);  
TBBPA-MDBPE – TBBPA mono(2,3-dibromopropílico éter);  
TBBPA-MGE – TBBPA mono (éter glicólico);  
TBBPA-MHEE – TBBPA mono(2-hidroxietil éter);  
USP – Universidade de São Paulo;  
UT – Unidade tóxica;  
VU – Vrije Universiteit Amsterdam.



## LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius;

$\mu\text{g.L}^{-1}$  – micrograma por litro;

$\mu\text{L}$  – microlitro;

$\mu\text{S.cm}^{-1}$  – microSiemens por centímetro;

d – dia;

g – grama;

$\text{g.L}^{-1}$  – grama por litro;

h – hora;

L – litro;

$\text{L.s}^{-1}$  – litros por segundo;

$\text{mg.L}^{-1}$  – miligrama por litro;

min – minuto;

mL – mililitro;

rpm – rotações por minuto.



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	31
2.	HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	35
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	37
3.1.	Recursos hídricos e saneamento básico .....	37
3.2.	Retardantes de chama.....	39
3.3.	Tetrabromobisfenol A.....	42
3.4.	Bioensaios de toxicidade.....	49
5.3.1.	Teste de sensibilidade.....	51
5.3.2.	Organismo-teste.....	52
3.4.1.1.	<i>Allonais inaequalis</i> Stephenson, 1991 .....	53
3.4.1.2.	<i>Pristina longiseta</i> Ehrenberg, 1828.....	54
3.4.1.3.	<i>Chironomus sancticaroli</i> Strixino e Strixino, 1981 .....	56
3.4.1.4.	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i> Daday, 1902.....	58
3.4.1.5.	<i>Daphnia magna</i> Straus, 1820 .....	59
3.5.	Aplicação de bioensaios de toxicidade .....	62
4.	METODOLOGIA.....	65
4.1.	Procedimento experimental.....	65
4.2.	Tetrabromobisfenol A padrão.....	67
4.3.	Reator em escala laboratorial tratando efluente sintético enriquecido com TBBPA	67
4.4.	Cultivo e manutenção dos organismos – teste.....	69
4.5.	Testes de sensibilidade.....	73
4.6.	Ensaios ecotoxicológicos .....	74
4.6.1	<i>Allonais inaequalis</i> .....	75
4.6.2.	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	76
4.6.3.	<i>Chironomus sancticaroli</i> .....	77
4.6.4.	<i>Daphnia magna</i> .....	81
4.6.5.	<i>Pristina longiseta</i> .....	83
4.6.6.	<i>Lymnaea stagnalis</i> .....	84

4.7. Análise de dados .....	85
4.7.1. Testes das hipóteses A e B .....	85
4.7.2. Teste da hipótese A .....	86
4.7.3. Teste da hipótese B .....	88
5. RESULTADOS e discussões .....	91
5.1. Teste de sensibilidade .....	91
5.1.1. <i>Allonais inaequalis</i> .....	91
5.1.2. <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	92
5.1.3. <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	92
5.1.4. <i>Daphnia magna</i> .....	93
5.1.5. <i>Pristina longiseta</i> .....	94
5.2. Teste da Hipótese A – testes de toxicidade aguda .....	95
5.2.1. Parâmetros físico-químicos dos reatores .....	96
5.2.2. Teste de toxicidade aguda .....	98
5.2.3. Teste de toxicidade crônica .....	105
5.2.3.1. <i>Allonais inaequalis</i> e <i>Pristina longiseta</i> .....	105
5.2.3.2. <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	109
5.2.3.3. <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	112
5.2.4. Discussão geral ecotoxicidade dos efluentes .....	127
5.3. Teste da Hipótese B – testes convencionais com TBBPA padrão ....	136
5.3.3. Teste de toxicidade aguda .....	136
5.3.3.1. TBBPA: concentrações de efeito de toxicidade aguda, curva SSD e coeficiente de risco de toxicidade aguda .....	139
5.3.4. Teste de toxicidade crônica .....	140
5.3.4.1. <i>Allonais inaequalis</i> e <i>Pristina longiseta</i> .....	140
5.3.4.2. <i>Chironomus sancticaroli</i> .....	142
5.3.4.3. <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	144
5.3.4.4. <i>Daphnia magna</i> .....	145
5.3.4.5. <i>Lymnaea stagnalis</i> .....	148
5.3.4.6. TBBPA: concentrações de efeito e coeficiente de risco de toxicidade crônica .....	151

5.3.5. Discussão sobre os impactos do TBBPA para a biota .....	152
6. CONCLUSÃO .....	159
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	161
REFERÊNCIAS .....	163
APÊNCICE A - Composição do afluente sintético .....	193
APÊNCICE B - Composição do composto alimentar TetraMin® .....	195
APÊNCICE C – Água reconstituída <i>Daphnia magna</i> .....	197
APÊNCICE D - Água reconstituída <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> .....	199
APÊNCICE E - Preparo do meio L.C. Oligo.....	201
APÊNCICE F - Preparo da suspensão algácea.....	203
APÊNCICE G – Parâmetros das soluções-teste nos bioensaios de toxicidade aguda (teste da Hipótese A).....	205
APÊNCICE H – Parâmetros das soluções-teste nos bioensaios de toxicidade crônica (Teste da Hipótese A).....	207
APÊNCICE I – Parâmetros das soluções-teste nos bioensaios de toxicidade aguda e crônica com o TBBPA padrão (Teste da Hipótese B) .....	209



## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento das cidades e o processo de urbanização mal planejado causa uma pressão negativa sobre os recursos hídricos, devido aos impactos diretos e indiretos da deposição de resíduos e lançamento de águas residuárias, com e sem tratamento (ALMEIDA; WEBER, 2006; EDOKPAYI; ODIYO; DUROWOJU, 2017; FREE *et al.*, 2014; GAVRILESCU *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2022). Os contaminantes emergentes, naturais ou sintéticos, passam a fazer parte da composição do efluente doméstico pelo consumo humano de produtos de cuidado pessoal, uso de surfactantes para limpeza, ingestão e uso de fármacos, degaste de eletroeletrônicos, compostos têxteis, tintas e demais componentes de utensílios e equipamentos (COMEAU *et al.*, 2008; RIVA *et al.*, 2019). Sendo assim, uma das principais fontes de contaminantes emergentes no ambiente são os efluentes domésticos e industriais. Isso acontece porque os efluentes tratados podem conter estes contaminantes, uma vez que as estações foram projetadas para reduzir principalmente a carga orgânica do efluente a partir de processos biológicos (ALMEIDA; WEBER, 2006; CLARA; STRENN; KREUZINGER, 2004; FOCAZIO *et al.*, 2008; LAWRENCE *et al.*, 2005; PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2014; PIVELI, 2012). Portanto, avaliar o comportamento da mistura desses compostos emergentes com os demais constituintes dos efluentes domésticos e industriais é essencial para averiguar o risco associado à eles para a biota, o qual pode ser diferente daquele apresentado por cada composto individualmente (RIVA *et al.*, 2019).

A necessidade de inovações tecnológicas motivam a produção contínua de novos materiais no mercado, entre estes, uma grande variação de polímeros cuja composição é baseada em derivados de petróleo (RESEARCH AND MARKETS, 2022; PELOW, 2016; QU *et al.*, 2016). Devido sua composição inflamável e riscos de acidentes, iniciou-se a utilização de compostos que possuem a capacidade de retardar a propagação das chamas, os chamados retardadores de chama. O consumo global de retardantes de chama vem aumentando com os avanços tecnológicos, e seu uso anual cresceu significativamente entre 2012 e 2018 devido à recuperação da recessão econômica nos

EUA, Japão e Europa Ocidental e às pressões de mercado induzidas pela introdução desses produtos nos países em desenvolvimento (FREEDONIA GROUP, 2015).

Os retardadores de chamas bromados (BFRs) são amplamente utilizados em produtos como têxtil, plásticos e eletrônicos, sendo o Tetrabromobisfenol -A (TBBPA) um dos mais aplicados mundialmente (EFSA, 2022; LIU *et al.*, 2016; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017). Em matrizes de efluentes, o TBBPA foi detectado em Estações de Tratamento de Efluentes (ETE) da Coreia do Sul em concentrações de 0,12 a 13,14 ng.L<sup>-1</sup> (KIM; LEE; OH, 2016), enquanto em efluentes industriais da China a concentração chegou a 20 µg.L<sup>-1</sup> (TBBPA-BAE) (TIAN *et al.*, 2014). O composto também foi detectado em lodos de ETEs da Suíça e da Espanha em concentração de até 220 ng.g<sup>-1</sup> e 1329 ng.g<sup>-1</sup> (peso seco), respectivamente (GUERRA; ELJARRAT; BARCELÓ, 2010; ÖBERG; WARMAN; ÖBERG, 2002). Além disso, o composto vem sendo detectado em ecossistemas lênticos e lóticos, de concentrações de pg.L<sup>-1</sup> a 0,92 µg.L<sup>-1</sup> e 4,87 µg.L<sup>-1</sup> em rios e lagos da China, respectivamente (XIONG *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2012b). Até a presente data, não foi encontrada literatura reportando concentração de TBBPA em rios ou lagos brasileiros.

Os mecanismos de biotransformação do TBBPA e a geração de subprodutos que podem causar toxicidade similar ou superior que o composto (como o bisfenol-A) incentiva a busca por tratamentos de efluentes capazes de reduzir as concentrações deste composto (TAKAYA *et al.*, 2022; WENG *et al.*, 2021). A persistência no meio pode variar de acordo com as características do mesmo, de acordo com Departamento de Saúde da Austrália, o tempo de meia vida em solos aeróbios e solos estéril (sem fauna) é acima de 6 meses, quando exposto à radiação ultravioleta em água o tempo de meia vida varia de 6,6 dias (verão) a 80,7 dias (inverno), já quando presente em efluentes (concentração nominal de TBBPA de 50 µg.L<sup>-1</sup> incubado à 35°C por 120 dias) o tempo de meia vida em sistema aeróbio foi de 22 dias (NICNAS, 2020).

O TBBPA causa diversos efeitos negativos à biota aquática e terrestre, como estresse oxidativo, morte celular, danos neurológicos, entre outros (ORAL *et al.*, 2021). Segundo resultados obtidos com microcrustáceo e peixe, a concentração de efeito na mobilidade e sobrevivência de 50% dos indivíduos expostos ao TBBPA foi abaixo de 1 mg.L<sup>-1</sup> (EU, 2006). Ademais, o TBBPA, assim como outros retardantes de chama pode



bioacumular nos organismos e causar alterações endócrinas (FEITEIRO; MARIANA; CAIRRÃO, 2021; HU *et al.*, 2019; MACÊDO *et al.*, 2020; WHO/IPCS/ILO/UNEP, 2002; YANG *et al.*, 2012b).

No Brasil, a qualidade dos corpos hídricos e toxicidade dos efluentes líquidos são monitorados de acordo com as Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) n. 357 e n. 430, respectivamente (CONAMA, 2005, 2011). Segundo o Art. 27, da Resolução CONAMA n. 357, é vedado o lançamento de efluentes que contenham concentrações de poluentes orgânicos persistentes (POPs) mencionados na Convenção de Estocolmo, como os retardantes de chama bromado (CONAMA, 2005). A ecotoxicologia é uma ferramenta que complementa às análises físico-químicas no monitoramento de qualidade de água, sedimento e efluentes, uma vez que possibilita observar os efeitos tóxicos dessas matrizes complexas na biota (ALEXANDER, 2000; O'HALLORAN, 2006; ZWART; POSTHUMA, 2005). Entre os grupos de animais usados como organismos-teste, os invertebrados aquáticos como os insetos, oligoquetas e crustáceos, são organismos normalmente fáceis de cultivar em laboratório e exercem importante função nos ecossistemas, pois contribuem para a ciclagem de nutrientes e tem relevante papel no equilíbrio ecológico, uma vez que fazem uma ponta na cadeia trófica ao se alimentarem dos produtores (p.e. algas) e servirem de alimentos para os consumidores (p.e. peixe) (KRAUS, 2019; RIBEIRO-BRASIL *et al.*, 2022).

Visto a presença do TBBPA em efluentes e ambientes aquáticos, entender a ecotoxicidade deste composto em invertebrados aquáticos auxiliará na criação de uma base de dado dos possíveis efeitos do TBBPA e em quais condições eles ocorrem. Além disso, a investigação de tecnologias de tratamento de efluentes capazes de remover esse composto podem utilizar os testes ecotoxicológicos para avaliar a eficiência de remoção de toxicidade dos efluentes. O uso de espécies nativas brasileiras para esse monitoramento se faz necessário para trazer uma análise mais representativa do que ocorreria caso esses efluentes fossem lançados nos corpos hídricos brasileiros. Ademais, a aplicação de ensaios de toxicidade aguda e crônica possibilita ter uma visão geral do que ocorreria a curto e longo prazo com a exposição ao contaminante, tanto isolado quanto em matrizes complexa.



## 2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Temos como hipótese geral que o retardador de chama Tetrabromobisfenol A (TBBPA) causa efeitos negativos para espécies de invertebrados aquáticos. Portanto, os objetivos gerais desse projeto foram:

- avaliar o efeito tóxico do TBBPA em matriz de efluente doméstico sintético (concentração nominal inicial de  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), pré e pós-tratamento, por meio das respostas fisiológicas e morfológicas de *Allonais inaequalis*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli*, *Daphnia magna* e *Pristina longiseta*, e
- encontrar a concentração de efeito do TBBPA padrão isolado em 50% dos indivíduos das espécies *Allonais inaequalis*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli*, *Daphnia magna*, *Lymnaea stagnalis* e *Pristina longiseta*.

Para tanto, esse trabalho foi dividido em duas hipóteses e seus respectivos objetivos específicos:

Hipótese A: A aplicação de reatores anaeróbios (condições acidogênica e metanogênica) para o tratamento de efluente sintético contendo TBBPA leva à diminuição dos efeitos tóxicos do composto no ambiente aquático.

Objetivos associados à Hipótese A: Analisar os efeitos de ecotoxicidade aguda e crônica do afluente (afluente sintético enriquecido com TBBPA) e efluentes dos reatores anaeróbios operando em fluxo contínuo em condições acidogênica (RA) e metanogênica (RM) em cinco espécies representativas do Estado de São Paulo: *A. inaequalis*, *C. silvestrii*, *C. sancticaroli* e *P. longiseta* e uma espécie representativa de ambientes temperado *D. magna*;

Avaliar a redução ou aumento de toxicidade aguda e crônica dos efluentes dos reatores RA e RM comparado ao afluente;

Avaliar a conformidade dos efluentes com a Resolução CONAMA n. 430 e com as diretrizes de lançamento de efluentes da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).

Hipótese B: O retardante de chamas Tetrabromobisfenol A (TBBPA) afeta negativamente (p.e. mortalidade, imobilidade, reprodução e desenvolvimento) as espécies *A. inaequalis*, *C. silvestrii*, *C. sancticaroli*, *D. magna*, *L. stagnalis* e *P. longisetata*.

Objetivos associados à Hipótese B: Analisar as respostas de sobrevivência, mobilidade e desenvolvimento dos organismos-teste quando expostos ao TBBPA de forma isolada;

Estabelecer as concentrações de efeito de toxicidade aguda (mortalidade e imobilidade) em 10 e 50% da população (CE<sub>10</sub> e CE<sub>50</sub>, respectivamente);

Construir uma Curva de Distribuição da Sensibilidade das Espécies (SSD) com os resultados dos testes de ecotoxicidade aguda e CE<sub>50</sub> recuperados na literatura;

Estabelecer as concentrações de efeito de toxicidade crônica (i.e. mortalidade ou imobilidade, reprodução e desenvolvimento) em 10 e 50% da população (CE<sub>10</sub> e CE<sub>50</sub>, respectivamente);

Estimar o risco ecotoxicológico do TBBPA em ambientes aquáticos com base no coeficiente de risco (CR).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Recursos hídricos e saneamento básico

O Brasil é um país com elevado volume de água doce distribuída principalmente em rios, lagos, riachos e, aquíferos (ANA, 2019). A água está presente no cotidiano humano em seus multiusos (dessedentação, recreação, irrigação, consumo humano, etc) e manter a qualidade e quantidade de água adequadas é essencial para a segurança da vida humana e bom funcionamento dos ecossistemas (ANA, 2021; CONAMA, 2008). A água vem sendo usada para a diluição de cargas poluidoras e sua capacidade de autodepuração (capacidade do ecossistema equilibrar as fontes de consumo e produção de oxigênio) pode não ser suficiente para manter o equilíbrio ecológico quando essa carga poluidora é elevada (ANA, 2019; VON SPERLING, 2014). Portanto, o tratamento de efluentes é essencial para que o período de tempo e distância para que todos os processos envolvidos na autodepuração (degradação, decomposição ativa, recuperação e águas limpas) sejam completados ao longo dos corpos receptores sejam menores (BRAGA, 2005; MARTINS; ROCHA; SANTANA, 2018).

Portanto, a conexão entre saneamento básico, qualidade ambiental e saúde pública é intrínseca e o aumento das pressões antrópicas sobre os ecossistemas, tais como descarte ou deposição indevida de resíduos sólidos, não tratamento de efluentes domésticos e industriais e alterações nos fluxos naturais de corpos hídricos vêm causando efeitos adversos tanto para a biota quanto aos humanos (ALMEIDA; WEBER, 2006; EDOKPAYI; ODIYO; DUROWOJU, 2017; FREE *et al.*, 2014; GAVRILESCU *et al.*, 2015; NAIK *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2019). Além do aumento direto das ações humanas sobre o meio, adiciona-se as mudanças de padrão de consumo e o aumento da variedade de produtos para cuidado pessoal, limpeza e medicamentos que acabam entrando no meio ambiente (FERGUSON *et al.*, 2013; LOOS *et al.*, 2007; NG *et al.*, 2021; PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2014; SHIN *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2015; WEIGEL; KUHLMANN; HÜHNERFUSS, 2002).

No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), apenas 68,3% dos domicílios possuem esgotamento sanitário com rede geral ou fossa séptica

ligada à rede (IBGE, 2019), sendo que 31% do efluente coletado não é encaminhado para tratamento (ANA, 2017). Os efluentes sanitários, compostos por efluentes domésticos e industriais, representam uma matriz complexa de substâncias orgânicas, inorgânicas, vírus, bactérias e diversos microrganismos (VON SPERLING, 2014). Estes efluentes são uma das principais fontes de contaminantes emergente no meio, já que a maioria das estações de tratamento de efluente (ETEs) foram projetadas para reduzir majoritariamente a carga de matéria orgânica presente no efluente por meio de processos biológicos e a capacidade de remover eficientemente os compostos emergentes é baixa (AMÉRICO *et al.*, 2012; HEBERER, 2002; JELIC *et al.*, 2015; LAWRENCE *et al.*, 2005; MARCHESE *et al.*, 2003; PAXÉUS, 2004; PIVELI, 2012; TERNES; BONERZ; SCHMIDT, 2001).

Somado ao problema sanitário brasileiro e global, têm-se o aumento da presença de compostos emergentes no ambiente (BRADLEY *et al.*, 2007; ENG *et al.*, 2019; FERGUSON *et al.*, 2013; FOCAZIO *et al.*, 2008; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). Os contaminantes de preocupação emergentes são substâncias sintéticas ou naturais que fazem parte do nosso cotidiano por estarem presentes em alimentos, medicamentos, produtos de higiene pessoal, pesticidas, detergentes, produtos de limpeza, equipamentos eletrônicos e que ao entrar no ambiente podem apresentar potencial de efeitos adversos ao ecossistemas e/ou à saúde humana (NG *et al.*, 2021; ROSENFELD; FENG, 2011).

A entrada contínua desses contaminantes nos corpos hídricos pode ser associada à persistência desses compostos nos efluentes brutos e tratados, na água e no sedimento de rios e lagos, dificultando a capacidade de recuperação desses ecossistema por meio da diluição e degradação natural das substâncias orgânicas (CLARA; STRENN; KREUZINGER, 2004; COMEAU *et al.*, 2008; FOCAZIO *et al.*, 2008; PAL *et al.*, 2014; RIVA *et al.*, 2019). Parte dos contaminantes encontrados em efluentes são detectadas em sedimentos de rios (BLAIR *et al.*, 2013; EDOKPAYI; ODIYO; DUROWOJU, 2017; LI *et al.*, 2019; PENG *et al.*, 2018). Ressalta-se que o aumento das pesquisas referentes à contaminação e efeitos dos contaminantes emergentes são reflexo da melhoria das técnicas de detecção e quantificação dos mesmos, que têm possibilitado o monitoramento e a verificação da presença dos contaminantes emergentes nas

diferentes matrizes naturais e antrópicas, encontrados geralmente nas concentrações de  $\text{ng.L}^{-1}$  até  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (FOCAZIO *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2016; QU *et al.*, 2016; RICHARDSON; KIMURA, 2020; WANG *et al.*, 2011).

O risco ecológico desses contaminantes ainda não está totalmente elucidado, havendo necessidade de desenvolvimento de estudos sobre os potenciais efeitos para a biota aquática e terrestre (COVACI *et al.*, 2009; FOCAZIO *et al.*, 2008; PAL *et al.*, 2014; RUHÍ *et al.*, 2016). Além disso, esses compostos podem alterar o sistema endócrino dos seres vivos, causando efeitos adversos à saúde e dificultando a determinação da relação dose-resposta em bioensaios (WHO/IPCS/ILO/UNEP, 2002). Portanto, avaliar o comportamento da mistura desses compostos emergentes com os demais constituintes dos efluentes domésticos e industriais aproxima às reais condições de exposição que espécies aquáticas enfrentam no ambiente aquático natural, e é essencial para averiguar o risco associado à ele para a biota, o qual pode ser diferente daquele apresentado por cada composto individualmente ou fora da matriz aquática (ARISTONE *et al.*, 2022; HAMDHANI; EPPEHIMER; BOGAN, 2020; RIVA *et al.*, 2019). Gosset *et al.* (2021) ao aplicar a análise de risco em dez Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) levando em conta as concentrações de 37 compostos farmacêuticos e 4 agrotóxicos, estimaram risco elevado em 90% das estações analisadas, além de classificarem como de alto risco diversos compostos de maneira isolada.

Um grupo de contaminante de preocupação emergente que vêm crescendo nos últimos anos são os retardantes de chama bromados devido ao aumento do consumo destes compostos para que produtos com potencial de inflamabilidade possam estar em conformidade com as legislações de segurança (RESEARCH AND MARKETS, 2020).

### **3.2. Retardantes de chama**

O uso de retardantes de chama data de antes de Cristo pelos Egípcios e Romanos, que utilizavam o alumínio para reduzir a inflamabilidade da madeira, com o passar dos anos os compostos capazes de reduzir as chamas passaram a ser usados em cortinas

de teatros, roupas, balões, etc (Hindersinn<sup>1</sup> 1990 *apud* WHO, 1997). Em razão do padrão de vida atual, a necessidade de inovações tecnológicas motiva a produção contínua de novos materiais no mercado, entre estes, uma grande variedade de polímeros, cuja composição é baseada em derivados de petróleo (PEPLOW, 2016; QU *et al.*, 2016; RESEARCH AND MARKETS, 2020, 2022). Devido sua composição inflamável e riscos de acidentes, iniciou-se a utilização de compostos com capacidade de retardar a propagação das chamas. Existem dois tipos principais de retardantes de chama: os halogenados (que possuem algum dos halogênicos, como o bromo e o cloro) e os não halogenados. Os retardantes de chamas bromados (BFRs) são amplamente consumidos e sua comercialização vem crescendo devido às pressões de mercado que buscam seguir os códigos de segurança dos produtos, incluindo inovações como carros e pisos residenciais que contenham plástico com retardantes de chamas em suas composições (FREEDONIA GROUP, 2015). Em relatório mais recente, o mercado global de retardantes de chama foi estimado em 8,2 bilhões de dólares em 2021 e 13,6 bilhões em 2021, sendo esperado crescimento de 5,9% entre os anos de 2022 a 2030, sendo esse aumento de demanda relacionado a indústrias de construção, eletrodomésticos, têxtil e transporte (R & M, 2022). Apesar do crescimento desse mercado ser impulsionado pela necessidade de adequação de empresas e construções às regras de segurança contra incêndio, ele ainda é contido pelo fato dos produtos químicos usados nos retardantes de chama serem prejudiciais à saúde humana (R & M, 2020; PR Newswire, 2022).

Apesar do crescente aumento no uso dos BFRs, a expansão desse mercado ainda é contido pelo fato dos produtos químicos usados nos retardantes de chama bromados serem persistentes no ambiente e prejudiciais à saúde humana e da biota (FREEDONIA GROUP, 2015). Na Europa a produção de alguns BFRs (como os éteres difenílicos polibromados - PBDEs) foram banidas e nos E.U.A. descontinuadas, o que levou a busca de alternativas de retardantes de chamas não halogenados e o aumento da produção e consumo de retardantes alternativos, como o Tetrabromobisfenol A (TBBPA) (BETTS, 2007; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017; SHARKEY *et al.*, 2020). Diretrizes como a

---

<sup>1</sup> HIDERSINN, R. R. **Historical aspects of polymer fire retardance**. In: NELSON GL ed. Fire and polymers hazards identification and prevention. New York, American Chemical Society (ACS Symposium Series No. 415), 1990.



2011/65/EU (Restrição de Substâncias Perigosas – RoHS) e 2012/19/EU (Resíduos de Equipamentos Elétricos e Eletrônicos – REEE) estabelecem, além da restrição de alguns BFRs, que plásticos contendo retardantes de chama bromados sejam descartados e coletados separadamente (EU, 2011, 2012). O TBBPA surgiu como uma alternativa não nociva de retardante de chama e um estudo de revisão realizado por Zhou; Yin; Faiola (2020) concluiu que esse composto em baixos níveis de exposição é seguro para a população humana, apesar de ser considerado um contaminante ambiental controverso.

Os retardantes de chamas são detectados nas diversas matrizes (ar, poeira, sedimento, biota e água doce e salgada) (CRISTALE *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2014; LLORCA *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2020; ZUIDERVEEN; SLOOTWEG; DE BOER, 2020). Foi relatado que retardadores de chama halogenados, como o bromado, são altamente tóxicos e também estão relacionados a distúrbios e doenças humanas, como fertilidade reduzida, puberdade avançada, baixo QI, atraso no desenvolvimento físico e mental, problemas de memória e aprendizado e distúrbios da tireoide. Alguns retardadores de chama também podem resultar em doenças fatais, como câncer (PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017).

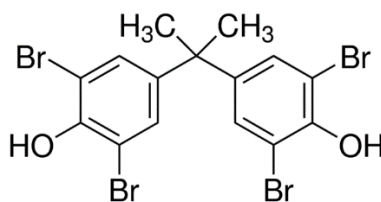
Xu *et al.* (2021) revisaram sobre a presença e o impacto de retardantes de chama halogenados (p.e. TBBPA) presentes em ETEs. Os autores encontraram pesquisas que detectaram BFRs inclusive em áreas remotas, com pouca atividade antrópica como o Ártico e o Planalto Qinghai-Tibet, evidenciando a capacidade desses compostos serem transportados naturalmente (p.e. ventos, chuva, neve, etc.). Além disso, foi observado a alta capacidade dos BFRs serem adsorvidos por sólidos, sendo encontrados, por exemplo, aderidos na biomassa dos reatores ou no lodo (XU *et al.*, 2021). Llorca *et al.* (2017) revisaram sobre a presença de contaminantes orgânicos de preocupação emergente, incluindo os retardantes de chama, na biota de águas continentais da América Latina. Dezesete estudos detectando BFRs em diversas espécies foram recuperados, sendo dez deles realizados no Brasil (p.e. 10.2 ng.g<sup>-1</sup> no fígado peixes e 3,45 ng.g<sup>-1</sup> no fígado de sapos coletados no Rio Paraíba do Sul). Outros estudos observaram o potencial de bioacumulação (no indivíduo) e biomagnificação (na cadeia trófica) de retardantes de chama em diferentes espécies de invertebrados e vertebrados aquáticos (ASHIZUKA *et al.*, 2008; HOU *et al.*, 2021; LAW *et al.*, 2006).

### 3.3. Tetrabromobisfenol A

O Tetrabromobisfenol A (TBBPA) (Figura 3.1), é o terceiro retardador de chamas bromado mais consumidos no mundo, ficando atrás dos éteres difenílicos polibromados (PBDEs) e hexabromociclododecanos (HBSCDDs) (EFSA, 2022). O TBBPA é produzido por meio da bromação do bisfenol A na presença de um solvente, com produção média em 1995 acima de 60.000 toneladas por ano (WHO, 1995). O composto é incorporado a diversos produtos industriais, principalmente derivados de petróleo, com a finalidade de minimizar a propagação de chamas em caso de incêndios (EFSA, 2022; LIU *et al.*, 2016; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017).

Apesar de sua maior aplicação ser na composição de placas de circuito eletrônico e aparelhos eletroeletrônicos (p.e. televisão, aspiradores de pó, máquinas de lavar, computadores, impressoras, etc), esse composto também é aplicado na indústria têxtil, tinturas, dispositivos de transporte, partes de móveis, revestimento de fios, entre outros (EU, 2006). O mercado de TBBPA tem previsão de crescimento de 3,8% entre 2020-2026, sendo o Brasil um dos países da América do Sul com essa expectativa (RESEARCH AND MARKETS, 2022).

Figura 3.1: Estrutura molecular do Tetrabromobisfenol A (TBBPA)



Fonte: EU (2006).

Mesmo que seu uso seja majoritariamente como componente desses produtos, ele pode ser liberado pelo desgaste, limpeza e pelo vapor e pó liberados pelos equipamentos quando aquecidos durante o uso, resultando na contaminação ambiental e sua persistência nos diferentes ecossistemas (BSEF, 2022). Devido a detecção do TBBPA em diferentes matrizes ambientais desde a década de 1980, ele é considerado como um composto onipresente (CHEN *et al.*, 2020; DASO *et al.*, 2017; ENVIRONMENT CANADA, 2016; GOODMAN *et al.*, 1988; OKEKE *et al.*, 2022).

É importante ressaltar que além do TBBPA, há os retardantes de chama derivados dele que podem surgir após a degradação do mesmo, como o TBBPA bis (2-hidroxietil éter) – TBBPA-BHEE, TBBPA éter dibromopropílico – TBBPA-DBPE, TBBPA bis (éter aliado) -TBBPA-BAE, TBBPA mono (éter aliado) – TBBPA-MAE, TBBPA mono(2-hidroxietil éter) – TBBPA-MHEE, TBBPA mono (éter glicólico) – TBBPA-MGE, TBBPA mono(2,3-dibromopropílico éter) – TBBPA-MDBPE, entre outros (LIU *et al.*, 2018a; QU *et al.*, 2016; WHO, 1995).

As concentrações do TBBPA e seus derivados podem ser maiores nos pontos próximos à indústrias produtoras desses compostos (p.e. concentração de TBBPA em efluente industrial de  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  (TIAN *et al.*, 2014)). No sedimento, Qu *et al.* (2013) observaram que a concentração de TBBPA próximo à indústria ( $132 \text{ ng.g}^{-1}$ ) foi decrescendo rapidamente até estar abaixo do limite de detecção ( $0,03 \text{ ng.g}^{-1}$ ) a 7 km do local. Em águas doces, a presença do TBBPA já foi constatada em concentrações de, no máximo,  $4,87 \mu\text{g.L}^{-1}$  em lagos e  $0,92 \mu\text{g.L}^{-1}$  em rios (Tabela 3.1). Não foram recuperadas informações sobre concentrações de TBBPA em matrizes de água doce brasileira.

Tabela 3.1 - Concentrações de TBBPA detectadas em matrizes de água doce e efluentes.

Concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Tipo de amostra	Local	Observação	Referência
0.00014 - 0.0032	Água de lagos	Inglaterra		HARRAD <i>et al.</i> (2009)
Nd – 4,87	Água de lago	China		YANG <i>et al.</i> (2012)
0,07 – 0,30	Água de rio	China	Considera os análogos TBBPA-BHEE, TBBPA-BGE e TBBPA-BAE	TIAN <i>et al.</i> (2014)
Nd – 0,92	Água de rio	China		XIONG <i>et al.</i> (2015)
0.0015 - 0.775	Água de rio	Sul africano		DASO; OKONKWO (2017)
0.0101 $\pm$ 0.00073	Água de rio	China	Considera o análogo TBBPA-BHEE	LIU <i>et al.</i> (2017)
0,00026 – 0,00077	Água de rio	China		CHEN <i>et al.</i> (2020)
0,005 – 0,051	Água de rio	China	Considera os análogos TBBPA-MAE, TBBPA MDBPE, TBBPA-MHEE, TBBA-MGE	GAO <i>et al.</i> (2021)
3,2 – 19,9	Efluente industrial	China	Considera os análogos TBBPA-BHEE, TBBPA-BGE e TBBPA-BAE	TIAN <i>et al.</i> (2014)
0.000035 – 0.013	Efluente sanitário	Coreia do Sul		KIM; LEE; OH, (2016)
< 0,3 – 220 ng.g <sup>-1</sup> (peso seco)	Lodo (efluente)	Suíça		ÖBERG; WARMAN; ÖBERG (2002)
Nd – 1329 ng.g <sup>-1</sup> (peso seco)	Lodo (efluente)	Espanha		GUERRA; ELJARRAT; BARCELÓ, (2010)
Nd – 472 ng.g <sup>-1</sup> (peso seco)	Lodo (efluente)	Espanha		GORGA <i>et al.</i> , (2013)

Fonte: Autoria própria (2022).

O TBBPA além de estar presente em águas doces e efluente, também pode ser presente no ar (chegando à 95 ng.m<sup>3</sup> em um depósito de resíduo eletroeletrônico em Guangdong, China), solo (chegando a 7,7  $\mu\text{g.g}^{-1}$  peso seco em área industrial de Shandong, China), sedimento (chegando a 13  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de TBBPA bis (éter aliado) -TBBPA-BAE, próximo à área industrial, China), biota (concentrações de até 749 ng.g<sup>-1</sup> lipídeo em peixes e 212 ng.g<sup>-1</sup> lipídeo em moluscos) e água salgada (concentração de até 0,46  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , China) (GONG *et al.*, 2021; NI; ZENG, 2013; QU *et al.*, 2016; WANG; ZHANG; CAO, 2014; YANG *et al.*, 2012b, 2022; ZHOU *et al.*, 2014; ZUIDERVEEN; SLOOTWEG; DE BOER, 2020).

Estudos considerando a presença de TBBPA em diferentes matrizes também já foram realizados. Harrad *et al.* (2009), por exemplo, analisaram a concentração de TBBPA em água, sedimento e peixes em lagos ingleses, e detectaram o composto em todos os compartimentos. Yang *et al.* (2012) desenvolveram um estudo parecido na China e reportaram concentração de TBBPA em quatro espécies de peixes variaram de 28,5 a 39,4 ng.g<sup>-1</sup>, além de detectar a maior concentração de TBBPA em lagos (4,87 µg.L<sup>-1</sup>) e afirmarem que o maior repositório do composto é o sedimento (518 ng.g<sup>-1</sup>). Yang *et al.* (2022) chamaram a atenção para a elevada presença do TBBPA em amostras combinadas de sedimento, moluscos e peixes em um local de deposição de resíduo eletrônico na China. Os autores também alertam sobre a biotransformação do TBBPA *in vivo*, ou seja, durante metabolismo dos organismos aquáticos, podendo além de biotransformar, bioacumular ou biomagnificar na cadeia trófica.

Existem poucos estudos sobre a degradação biológica do TBBPA e sobre a necessidade de um pré-tratamento químico para a remoção desse composto. Para compostos recalcitrantes, como o TBBPA, de boa eficiência de degradação em sistemas de tratamento acoplados, ou seja, que associam tratamento químico e biológico com o objetivo de reter contaminantes e minimizar efeitos tóxicos na biota (SARRIA *et al.*, 2002). Avaliar o comportamento da mistura desses compostos emergentes com os demais constituintes dos efluentes domésticos e industriais para averiguar o risco associado é importante, já que o comportamento da mistura pode ser diferente daquele apresentado por cada composto individualmente (RIVA *et al.*, 2019).

Alguns processos de degradação que o TBBPA pode sofrer são volatilização, oxidação, adsorção em partículas, bioacumulação e foto-oxidação, podendo ser formado derivados como o tri-di ou mono-bromobisfenol A e bisfenol-A (PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017; WHO, 1995). Levantamentos realizados por Brenner *et al.* (2006) e McCormick *et al.* (2010) apontam que o TBBPA quando degradado em ambientes anaeróbios pode ser transformado em bisfenol A enquanto em ambientes aeróbios em éter dimetílico de TBBPA (TBBPA DME). Brenner *et al.* (2006), apesar de testarem cinco configurações de tratamento aplicando diferentes fontes de carbono em sistema de lodos ativados, não conseguiram observar a biodegradabilidade do TBBPA ou a formação de bisfenol A, apontando o potencial recalcitrante desse composto. Chang; Yuan; Ren

(2012) avaliaram a degradação aeróbica do TBBPA por microorganismos em sedimento de rio e observaram taxa de degradação de 0,053 a 0,077 d<sup>-1</sup> e tempo de meia vida de 9 a 13 d, os autores indicaram *Bacillus pumilus* e *Rhodococcus ruber* como as bactérias dominantes nesse processo de degradação.

A degradação biológica do TBBPA passou a ser estudada recentemente e alguns apontam a necessidade de um pré-tratamento químico para a remoção desse composto. Para compostos recalcitrantes, como o TBBPA, há indícios de boa eficiência de degradação em sistemas de tratamento acoplados, ou seja, que associam tratamento químico e biológico com o objetivo de remover a carga de contaminantes e minimizar efeitos tóxicos na biota (SARRIA *et al.*, 2002). Qu *et al.* (2015) e Zhang *et al.* (2009) analisaram a remoção do TBBPA por técnicas de ozonização nas concentrações de 50 e 100 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente, e ambos obtiveram eficiência acima de 90%, além de observarem melhores resultados para condições alcalinas. Macêdo; Duarte Oliveira; Zaiat, (2021) avaliaram a remoção do TBBPA (100 µg.L<sup>-1</sup>) em matriz de efluente sintético e também obtiveram eficiência de remoção acima de 90. Os autores apontaram que apesar da sorção do TBBPA na biomassa dos reatores, a elevada remoção do composto ocorreu devido a biodegradação do TBBPA durante o processo de digestão anaeróbia.

Há uma visão controversa sobre o TBBPA ser um contaminante, uma vez que ele foi criado como substituto para retardantes de chamas com maior toxicidade. Porém, devido sua similaridade estrutural com o hormônio da tireoide tiroxina (T3 e T4) o TBBPA pode ser considerado com potencial de disruptor endócrino (DE WIT, 2002). Oral *et al.* (2021) resumiram os possíveis efeitos do TBBPA em 12 categorias: toxicidade reprodutiva e disruptor endócrino; efeitos sobre os hormônios da tireoide; indução de estresse oxidativo e apoptose; efeitos hepatotóxicos; efeitos neurotóxicos, neuroendócrinos e neuromotores; ototoxicidade; efeitos sobre adipogênese, obesidade e osteogênese; efeitos nefrotóxicos; efeitos imunotóxicos e; alterações epigenéticas. Ressalta-se que para a observação dos efeitos adversos, a dose necessária de TBBPA é acima daquela detectada em ambientes aquáticos de água doce, mas serve de alerta para que as concentrações no meio não atinjam as concentrações de efeito para a biota aquática. Portanto, sabendo do potencial tóxico de efluentes e poluentes orgânicos, são necessários novos estudos que avaliem tratamentos para a remoção desse composto

dos corpos hídricos e avaliação de seus possíveis efeitos adversos na biota aquática (LIU *et al.*, 2016; PITTINGER; PECQUET, 2018).

O relatório de avaliação de risco da União Europeia classificou o TBBPA como seguro para os seres humanos, porém ressalta a elevada toxicidade à biota aquática, com LC<sub>50</sub> abaixo de 1 mg.L<sup>-1</sup> para microcrustáceo e peixe e bioacumulação observada em peixes (EU, 2006). Outros estudos identificaram que os retardantes de chama possuem capacidade bioacumulativa na biota e flora tanto em ambiente laboratorial quanto em amostras ambientais (BRAGIGAND *et al.*, 2006; GUSTAFSSON *et al.*, 1999; MANSOURI *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2008; TIAN; ZHU, 2011; WU *et al.*, 2011).

A concentração efetiva de TBBPA que afetou 50% da mobilidade ou sobrevivência (CE<sub>50</sub>) de organismos aquáticos recuperados estão expostos na Tabela 3.2. Alguns exemplos de CE<sub>50</sub> são: *D. magna* em exposição de 48h foi 0,6 mg.L<sup>-1</sup> (WAAIJERS *et al.*, 2013) e *Chironomus tentans* a CE<sub>50</sub> observada para exposição de 14 dias foi 0,13 mg.L<sup>-1</sup> (US-EPA, 2015).

Tabela 3.2 – Efeitos observados para o TBBPA em teste de ecotoxicidade aguda em biota aquática

Biota	Grupo	Efeito observado (mg.L <sup>-1</sup> )	Tempo de exposição	Referência
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Alga	> 5,6	96 h	PITTINGER; PECQUET (2018)*
<i>Rana limnocharis</i>	Anfíbio	1,25	96 h	YANG <i>et al.</i> , (2012)
<i>Vibrio fischeri</i>	Bactéria	56,9	15 min	DEBENEST <i>et al.</i> (2010)
<i>Hyra attenuata</i>	Cnidário	0,2	96 h	DEBENEST <i>et al.</i> (2010)
<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	> 1,8	48 h	PITTINGER; PECQUET (2018)*
<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	1,34	48 h	YANG <i>et al.</i> , (2012)
<i>Macrobrachium nipponense</i>	Crustáceo	1,22	96 h	YANG <i>et al.</i> (2012)
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	Crustáceo	8,3	24 h	DEBENEST <i>et al.</i> (2010)
<i>Daphnia magna</i>	Crustáceo	0,6	48 h	WAAIJERS <i>et al.</i> (2013)
<i>Chironomus plumosus</i>	Inseto	24,57	96 h	YANG <i>et al.</i> (2012)
<i>Crassostrea virginica</i>	Molusco	0,098	96 h	PITTINGER; PECQUET (2018)*
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Molusco	7,4	96 h	JIANG <i>et al.</i> (2019)
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	Oligoqueta	7,85	96 h	YANG <i>et al.</i> (2012)
<i>Pimephales promelas</i>	Peixe	0,54	96 h	PITTINGER; PECQUET (2018)*
<i>Pimephales promelas</i>	Peixe	0,49	144 h	PITTINGER; PECQUET (2018)*
<i>Carassius auratus</i>	Peixe	3,13	96 h	YANG <i>et al.</i> (2012)
<i>Pseudorasbora parva</i>	Peixe	0,86	96 h	YANG <i>et al.</i> (2012)
<i>Danio rerio</i>	Peixe	0,75**	96 h	YANG <i>et al.</i> (2014)
<i>Danio rerio</i>	Peixe	0,85**	8 d	WU <i>et al.</i> (2016)
<i>Channa punctatus</i>	Peixe	10,18	96 h	SHARMA; CHADHA; SAINI (2019)
<i>Danio rerio</i>	Peixe	0,023	122 hpf	LIU <i>et al.</i> (2018b)

Fonte: Autoria própria (2022). \* Artigo de revisão \*\*valor aproximado

Um estudo realizado em 2010 identificou o TBBPA como um composto de prioridade máxima devido ao seu alto volume de produção e propriedades de persistência (HOWARD; MUIR, 2010). Além disso, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (US-EPA) incluiu o TBBPA na lista de retardantes de chama com elevada prioridade pelo potencial de causar efeitos negativos no ambiente e para saúde



pública (US EPA, 2019). O TBBPA também foi incluído na lista de substâncias restritas pela Diretriz de Restrições de Substâncias Perigosas da União Europeia (EU, 2011). Portanto, entender os efeitos ecotoxicológicos deste composto pode auxiliar na construção de diretrizes mais eficazes no controle da contaminação pelo retardante de chama TBBPA.

### **3.4. Bioensaios de toxicidade**

A ecotoxicologia foi definida por René Truhaut em 1995 como uma ciência interdisciplinar que avalia os efeitos de agentes químicos ou biológico sobre aos seres vivos em nível individual, populacional, de comunidade e ecossistema. Deste modo, os testes ecotoxicológicos são uma ferramenta importante para melhorar a compreensão dos efeitos nocivos dos compostos que estão presentes nos corpos hídricos e efluente doméstico (COSTA *et al.*, 2008; HODGSON, 2004). A utilização de testes ecotoxicológicos para o monitoramento ambiental e para a avaliação dos efeitos de substâncias isoladas são realizados em ambientes específicos e com variáveis físico-químicas controladas (temperatura, fotoperíodo, alimentação, pH, oxigênio dissolvido, dureza, entre outros).

O objetivo dos testes ecotoxicológicos ou bioensaios é estimar as relações entre a dose (concentração do contaminante) e a resposta ecotoxicológica dos organismos ao contaminante (mortalidade, imobilidade, crescimento, reprodução, redução da densidade populacional, danos morfológicos e enzimáticos, entre outros). Ao final do teste ecotoxicológico, são comparadas as respostas ecotoxicológicas das amostras contendo o contaminante (orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos) com as respostas ecotoxicológicas das amostras controle, sem a presença do contaminante (US-EPA, 1992).

Dentre os testes de ecotoxicidade, existem os que avaliam os efeitos em uma parte específica do ciclo de vida da biota (toxicidade aguda) e aqueles que avaliam os efeitos em um período de tempo maior, abrangendo grande parte do ciclo de vida (toxicidade crônica). Os testes de ecotoxicidade aguda avaliam a resposta imediata do organismo quando exposto ao contaminante, sendo expressos geralmente em mortalidade e imobilidade. Já nos testes de ecotoxicidade crônica é possível observar respostas

subletais, como crescimento e reprodução (HODGSON, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os bioensaios estimam a toxicidade por meio de ajustes estatísticos e modelos matemáticos e os gráficos geralmente apresentam a resposta biológica de interesse (eixo y) em função da concentração do contaminante (eixo x) (HODGSON, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Um dos parâmetros mais utilizados para tomada de decisões em um teste de ecotoxicidade é a concentração do contaminante que provoca efeito (imobilidade, mortalidade, reprodução, etc) em 50% da população ( $CE_{50}$  – concentração mediana efetiva) (US-EPA, 1992, 2002). Outros parâmetros podem ser estimados, como a concentração de efeito não observado (CENO - maior concentração que não causa efeito aos organismo) e a concentração de efeito observado (CEO – menor concentração que causa efeito estatisticamente significativo aos organismos) (ABNT, 2018).

Atualmente, é discutida a necessidade da aplicação dos bioensaios no monitoramento da qualidade de tratamentos e ambiental, já que esse monitoramento vêm sendo pautado na quantificações químicas dos compostos e comparação com os limites descritos em normativas como a Resolução n° 357 e n° 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (CONAMA, 2006, 2011). Apesar das análises físico-químicas dos efluentes tratados serem importantes e comumente empregadas por serem estabelecidas nas legislações ambientais, percebe-se a ineficiência das mesmas para garantir a preservação da biota aquática à jusante do lançamento, já que não avalia à interação dos compostos no meio (água, sedimento e solo), sua biodisponibilidade e seus efeitos para os seres vivos de diferentes níveis tróficos (ALEXANDER, 2000; CARVALHO *et al.*, 2022; O'HALLORAN, 2006; ZWART; POSTHUMA, 2005). O uso de bioensaios no monitoramento de efluentes está citado na Seção II, artigo 18 da Resolução CONAMA n. 430 que se refere a necessidade de efluentes lançados em corpos hídricos não causarem ou não possuírem potencial de causar toxicidade para os organismos aquáticos (CONAMA, 2011).

Portanto, aplicar diferentes configurações de bioensaios de toxicidade podem auxiliar no entendimento da toxicidade de compostos isolados e matrizes complexas. Os resultados dos testes ecotoxicológicos podem auxiliar tanto na elaboração de diretrizes

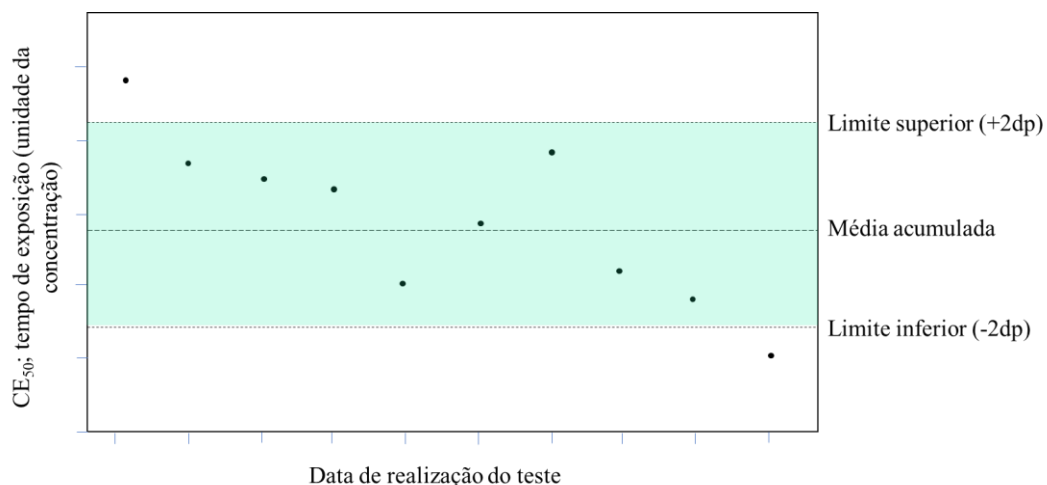
de lançamento e limites da presença dos compostos em ambientes aquáticos, quanto na avaliação e monitoramento de concepções de tratamento para efluentes (AMATO *et al.*, 2016; BERNEGOSSI *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2008; RIZZO, 2011).

### 5.3.1. Teste de sensibilidade

Os testes de sensibilidade analisam a resposta dos organismos-teste quando expostos à substâncias de referência, recomendadas nas normativas ou na literatura que avaliam a saúde da espécie e garantem que o lote de organismos são confiáveis para serem utilizados em bioensaios de toxicidade (DI GIULIO; NEWMAN, 2010; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

São recomendados por diversas normas de bioensaios e são baseados na concentração de efeito (mortalidade ou imobilidade) em testes realizados com substâncias de referência (ABNT, 2016, 2017; OECD, 2004, 2011). Os resultados dos testes de sensibilidade são expressos graficamente em forma de uma carta-controlé, com o eixo X compreendendo as datas da realização dos teste e o eixo Y os valores de  $CE_{50}$  (ASTM, 2021). As linhas presentes na carta-controlé expressam a média dos  $CE_{50}$  dos testes realizados (linha central) e os limites inferior e superior (duas vezes o desvio padrão, DP) (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Modelo de carta- controle especificando os componentes principais e destacando em azul a área que representa a validação dos testes ecotoxicológicos.



Fonte: Adaptado de Zagatto; Bertoletti (2008).

Os resultados dos testes de sensibilidade indicam que o lote está saudável ao estar dentro do limite de confiança de 95% (limites inferior e superior), sendo necessário atenção quando houver dois resultados consecutivos além dos limites ou sete resultados de um mesmo lado da linha de tendência (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

### 5.3.2. Organismo-teste

Para a realização dos testes ecotoxicológicos são utilizados organismos de diferentes espécies, sendo que a seleção adequada dos organismos-teste é importante para que se obtenha representatividade efetiva dos efeitos ecotoxicológicos para a biota que está sendo analisada (RAND, 1995). Para a realização de bioensaios, os organismos-teste selecionados devem apresentar características como: ser de fácil obtenção e manutenção em laboratório, possuir ciclo de vida curto, representatividade de seu nível trófico e estabilidade genética (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008). Dentre os organismos-teste para água doce recomenda-se o uso das espécies de alga *Scenedesmus subscapicatus*, *Raphidocelis subcapitata*; de microcrustáceos *Daphnia magna*, *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, de insetos *Chironomus* sp. e de peixes *Danio rerio* e *Poecilia reticulada* (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008).

A seleção dos organismos-testes no Brasil e na Holanda levaram em consideração a existência do cultivo estabelecida nos laboratórios, presença e importância das espécies nas respectivas regiões e possibilidade do uso das espécies como bioindicadores de toxicidade. *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911, *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino 1981, *Daphnia magna* Straus 1820, *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828 e *Lymnaea stagnalis* Linnaeus, 1758 são espécies representativas de invertebrados aquáticos de água doce contemplando espécies de coluna de água e do bento.

Os invertebrados aquáticos *C. sancticaroli* (Diptera: Chironomidae), *A. inaequalis* (Oligochaeta: Naididae) e *P. longiseta* (Oligochaeta: Naididae) são espécies nativas do Brasil e amplamente utilizados em bioensaios por possuírem tolerância à diferentes condições do meio, desde os mais impactados até os mais preservados e, por serem de fácil obtenção e manutenção, além de suas presenças nos corpos hídricos da região

(CASTRO *et al.*, 2020a; COLOMBO-CORBI *et al.*, 2017; DE LIMA E SILVA *et al.*, 2022; FELIPE *et al.*, 2021; ROCHA *et al.*, 2018; SMITH; KENNEDY; DICKSON, 1991)

Os microcústáceos filtradores *D. magna* e *C. silvestrii* (Cladocera: Daphnidae) são representativos do zooplâncton de região temperada e dos subtropicais, respectivamente e, são recomendado para avaliação da qualidade da água por possuírem sensibilidade à pequenas mudanças de qualidade da água além de apresentarem estabilidade genética (CASTRO *et al.*, 2020a; COLOMER *et al.*, 2019; DA COSTA *et al.*, 2014; GRZESIUK *et al.*, 2018; MOREIRA *et al.*, 2014; NOVELLI *et al.*, 2012; SANTOS; VICENSOTTI; MONTEIRO, 2007). Por último, o molusco de ambientes temperados conhecido como o grande caracol da lagoa, *L. stagnalis*, é uma espécie padrão para testes ecotoxicológicos e de fácil cultivo em laboratório, com respostas rápidas à poluição ambiental (AMORIM *et al.*, 2019; KURODA; ABE, 2020).

#### **3.4.1.1. *Allonais inaequalis* Stephenson, 1991**

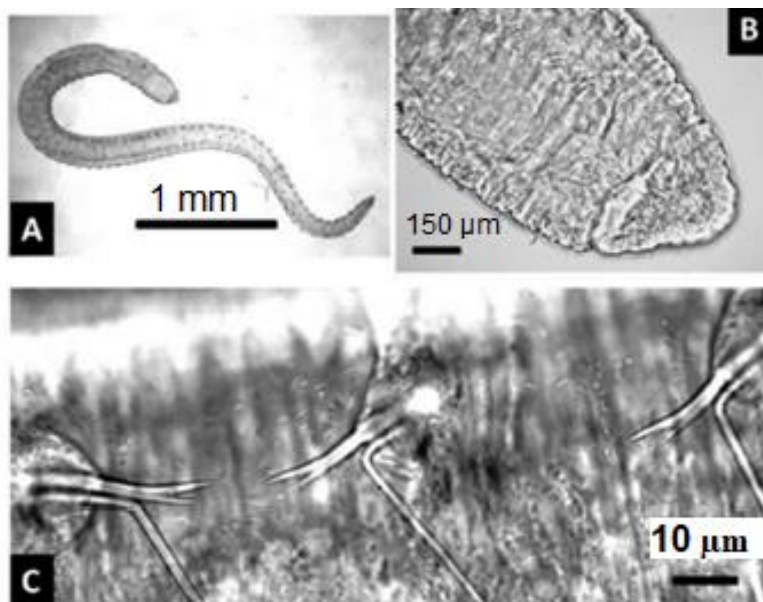
Os Naididae, pertencente à classe Oligochaeta, é uma família constituída por espécies de grande movimentação e de vida livre, ou seja, que conseguem viver tanto na coluna d'água quanto em substratos e se alimento de dendritos e matéria orgânica, sendo importantes para ciclagem de nutrientes (GORNI *et al.*, 2018; GORNI; ALVES, 2007; GOULART, M. D. C.; CALLISTO, 2003; VERDONSCHOT; DIDDEREN; VERDONSCHOT, 2012).

Pertencentes ao gênero *Allonais*, os indivíduos da espécie *Allonais inaequalis* vivem em águas doces de ambientes tropicais, com elevada distribuição em corpos hídricos urbanos, tendo sido catalogados em águas superficiais do Estado de São Paulo e Mato Grosso, e áreas de barragem em Rondônia (ALVES; MARCHESE; ESCARPINATI, 2006; GOMES *et al.*, 2017; GORNI *et al.*, 2018; SANCHES *et al.*, 2016). Além do Brasil, sua ocorrência também foi registrada no Equador, Colômbia e Argentina (América do Sul); Panamá, Guatemala, Cuba e Porto Rico (América Central); Estados Unidos da América (América do Norte); e alguns países da África, Ásia e Oceania (GBIF,

2022a; HOWMILLER, 1974; NAIDU, 1966; OUTRIDGE, 1987; PATHIRATNE; WEERASUNDARA, 2004; PINDER, 2010).

*Allonais inaequalis* (Figura 3.3) possuem corpo delgado com bordas segmentadas, são despigmentados e seu comprimento varia de 3 a 9 mm (NESEMANN; SHARMA; SINHA, 2004). Sua reprodução é majoritariamente assexuada por fissão ou fragmentação, porém em casos de estresse ambiental os indivíduos podem optar pela reprodução sexuada como estratégia de obtenção de variabilidade genética (BELY; WRAY, 2001, 2004).

Figura 3.3 – *Allonais inaequalis*: a) indivíduo, b) prostômio, c) cerdas dorsais.



Fonte: Modificada de Corbi *et al.* (2015).

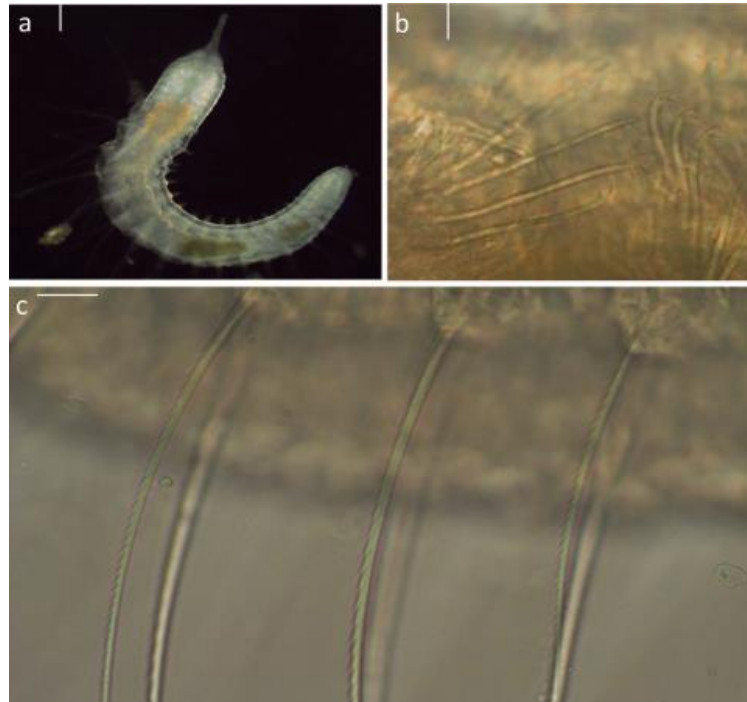
#### 3.4.1.2. *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828

A classe Oligochaeta, mais especificamente as espécies que habitam ambientes aquáticos, auxilia na ciclagem de nutrientes e consumo de matéria orgânica e podem ter contato com os poluentes por meio da alimentação de detritos contaminados ou pela pele (LOBO; ESPINDOLA, 2014; OECD, 2008). Pertencente ao gênero *Pristina*, a espécie *Pristina longiseta* é amplamente encontrada em ecossistemas de águas doces lântico e lótico ao redor do mundo, sendo já documentada na América do Sul, Central e do Norte,

Ásia, África e Europa (CASTRO *et al.*, 2020c; GBIF, 2022b; HARMAN; BRINKHURST; MARCHESE, 1988; HOWMILLER, 1974; PATHIRATNE; WEERASUNDARA, 2004; PINDER, 2010).

Apesar do uso do gênero para fins ecotoxicológicos na década de 1990 por Smith; Kennedy; Dickson (1991) (*Pristina leidy* Smith 1986), os protocolos de teste eram voltados para regiões temperadas e os protocolos só foram atualizados para o ambiente subtropical em 2020 (CASTRO *et al.*, 2020c; SOUZA *et al.*, 2022). Os indivíduos de *P. longiseta* possuem entre 3 e 6 mm de comprimento, com coloração amarelada e cerdas na parte ventral e dorsal (Figura 3.4) (CASTRO *et al.*, 2020c). A reprodução da espécie é majoritariamente assexuada, ocorrendo por fissão paratômica, onde ocorre a formação de nova cabeça e cauda (ZATTARA; BELY, 2011; ZATTARA; TURLINGTON; BELY, 2016). Assim como para *A. inaequalis* a reprodução sexuada pode acontecer quando expostos a situações adversas nas quais a variabilidade genética é vantajosa (BRINKHURST; GELDER, 2001; ÖZPOLAT *et al.*, 2016; VAN CLEAVE, 1937).

Figura 3.4 – *Pristina longiseta*: a) indivíduo, b) prostômio, c) cerdas dorsais.



Fonte: Castro *et al.* (2020c).

### 3.4.1.3. *Chironomus sancticaroli* Strixino e Strixino, 1981

A família Chironomidae, pertencente à classe Insecta e ordem Diptera, pode ser encontrada em diferentes ambientes aquáticos pelo mundo pois se adaptam bem à diferentes condições ambientais, como variação de temperatura, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, diferentes profundidades e matas ciliares impactadas (ARMITAGE; CRANSTON; PINDER, 1995; CORTESE *et al.*, 2019). O que auxilia as larvas a sobreviverem às baixas concentrações de oxigênio dissolvido é um mecanismo de respiração que possui hemoglobina na hemolinfa dando as larvas uma coloração avermelhada (FONSECA, 1997).

Por estar presente em ambientes antropologicamente impactados, Chironomidae são usados como espécie indicadora de impacto ambiental (CORBI; TRIVINHO-STRIXINO, 2008). Possuem importante papel na ciclagem de nutrientes e consumo matéria orgânica com diferentes modelos de alimentação em sua fase larval (coletores, coletores-filtradores, raspadores, trituradores, engolidores e sugadores) e ocupam papel intermediário entre produtos e consumidores secundários (BERG, 1995; PORINCHU; MACDONALD, 2003).

Apesar de *Chironomus sancticaroli* ser considerado sinonímia júnior de *Chironomus xanthus* Rempel (1939) (SPIES; REISS, 1994), a ausência de holótipo ou parátipos preservados não possibilita a comparação pormenorizada entre esses dois *Chironomus*, e segundo a pesquisadora que descreveu o exemplar de macroinvertebrado coletados no município de São Carlos (São Paulo, Brasil), Trivinho-Strixino & Strixino, a sinonímia é inválida (TRIVINHO-STRIXINO, 2011).

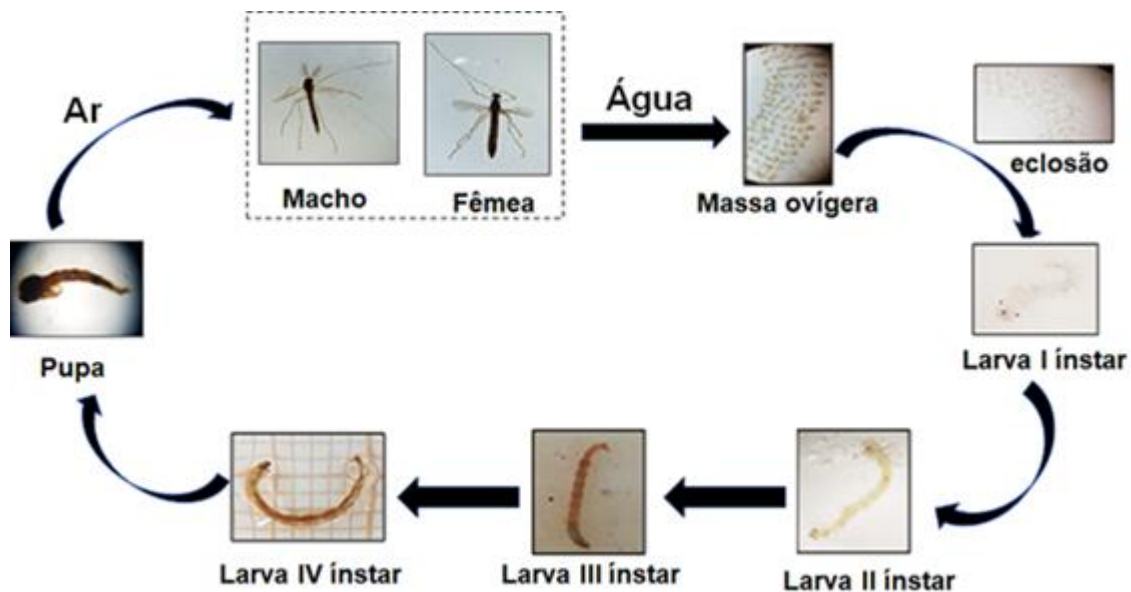
Indivíduos da espécie *C. sancticaroli* possuem metamorfose completa e ciclo de vida curto composto por quatro estágios (ovo; instares larvais - I instar, II instar, III instar e IV instar; pupa e adulto) (Figura 3.5). O período larval é predominante, nos primeiros instares as larvas possuem comportamento planctônico (habitam o sedimento e a coluna d'água), enquanto nos demais instares passam a ter hábitos bentônicos (FONSECA, 1997). As larvas possuem cabeça prognata (com aparelho bucal voltado para frente) e se locomovem por projeções (MUGNAI; NESSIMIAN; BAPTISTA, 2010), sendo comum a construção de casulos a partir do substrato e secreção salivar. As larvas se alimentam



por meio de partículas (massa ovígera, algas, detritos como matéria orgânica e bactérias) que ficam aprisionadas dentro do casulo ou pela obtenção direta quando se impulsionam para fora dele (MEZGEBU *et al.*, 2019; OLIVER, 1971; TRIVINHO-STRIXINO, 1980).

Durante o período de pupa ocorre grande gasto energético para que a transformação de morfometria do inseto ocorra, quando a pupa está pronta, ela se desloca até a superfície para a eclosão dos adultos e aguarda até que as asas estejam secas para voar. Quando adulto, o inseto se caracteriza por duas asas, antena com diformetria sexual (machos possuem antenas plumosas), corpo amarelo-esverdeado com abdômen afinado nos machos e corpo com coloração castanha e abdômen encorpado para as fêmeas (BERG, 1995; OLIVER, 1971; TRIVINHO-STRIXINO, 1980). Os adultos possuem peça bucal encurtada e não se alimentam, possuindo função reprodutiva. Os ovos são depositados como uma massa ovígera gelatinosa com formato espiral em substratos ou na beira dos corpos hídricos e demoram entre 44 e 48 horas para eclodirem em larvas (FONSECA; ROCHA, 2004a).

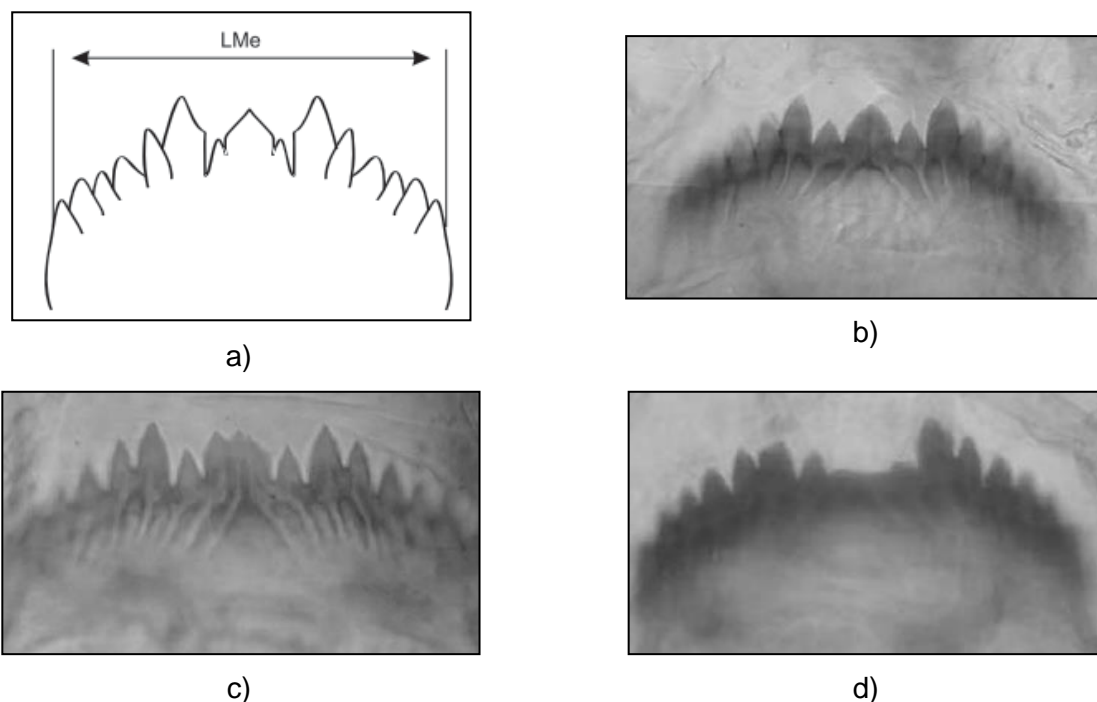
Figura 3.5- Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* contemplando as fases aquática (ovos, larvas e pupas) e terrestre (adultos alados).



Fonte: (BERNEGOSSI *et al.*, 2021)

A dentição da espécie pode ser analisado para avaliar a qualidade ambiental, uma vez que pode apresentar deformidade leves ou severas (Figura 3.6) (redução ou adição de um ou mais dentes, presença de espaços vazios entre os dentes ou presença de dentes quebrados ou tortos) em contato com partículas contaminadas (BIASI; RESTELLO, 2010; RICHARDI *et al.*, 2013).

Figura 3.6 – Aparelho bucal do gênero *Chironomus*: a) e b) padrão normal, c) deformidade leve e d) deformidade severa.



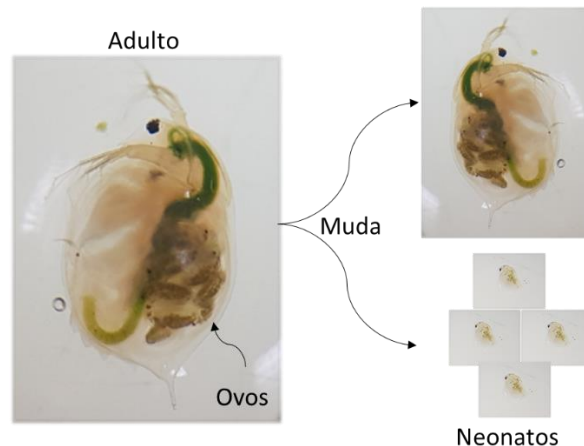
Fonte: Adaptado de Biasi e Restello (2010); Richardi et al. (2013).

#### 3.4.1.4. *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902

A família Daphnidae pertence à classe Crustacea, ordem Cladocera e é representada por espécies de corpo transparente ou com pouca pigmentação, carapaça composta por quitina (polissacarídeo) e que nadam por pulsos, o que faz com que sejam conhecidas como “pulga d’água” (EBERT, 2005). São importantes por serem consumidores de fitoplânctons e servirem de alimento para consumidores secundários (EBERT, 2005; GEBARA *et al.*, 2020).

*Ceriodaphnia silvestrii* (Figura 3.7) é uma espécie cujo uso na ecotoxicologia é recomendado por ser representativa de ambientes neotropicais, com breve tempo de exposição (não ultrapassando oito dias) e baixo volume de solução-teste requerido (ABNT, 2022b). Seus neonatos medem cerca de 0.37 mm e os indivíduos adultos cerca de 1 mm, seu ciclo de vida é de aproximadamente  $29,8 \pm 5,80$  dias e são indivíduos de corpo ovalado e acentuado sinus cervical (ABNT, 2022b; FONSECA; ROCHA, 2004b). A espécie possui quatro estágios de vida: ovo, neonato (indivíduo recém-nascido), juvenil (fase de crescimento que contempla até o desenvolvimento dos ovos) e adulto. A alimentação da espécie se dá pela filtração da água e se baseia no consumo de algas, bactérias e matéria orgânica (FORRÓ *et al.*, 2008; KARUTHAPANDI; RAO, 2016).

Figura 3.7 – Esquema do ciclo de vida de *Ceriodaphnia silvestrii*.



Fonte: Autoria própria (2022).

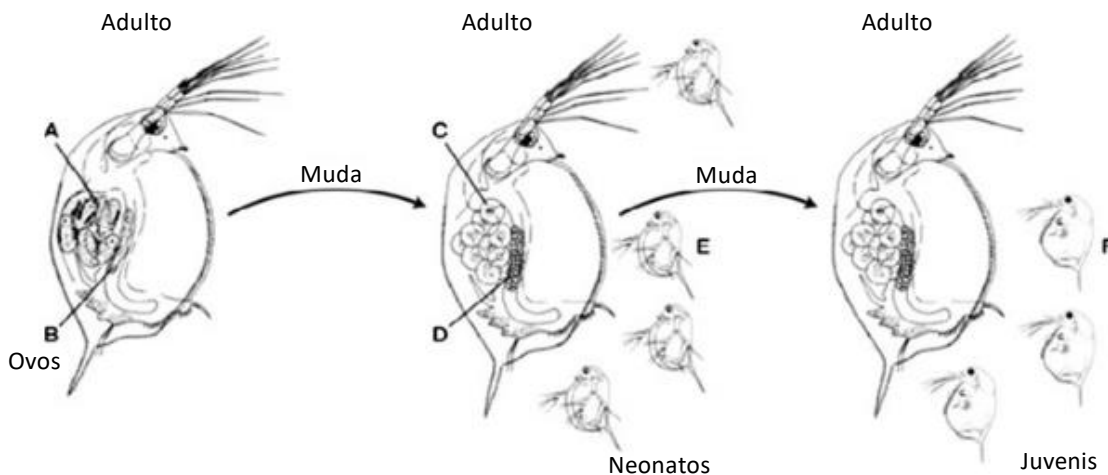
#### 3.4.1.5. *Daphnia magna* Straus, 1820

O gênero *Daphnia* possuem ampla distribuição geográfica, sendo mais adaptadas à ambientes com temperaturas entre 18 e 22°C e elevada dureza (ABNT, 2022a). O crustáceo *Daphnia magna* (Cladocera: Daphnidae), representativo do zooplâncton possui como características serem pequenos ( $\leq 5$  mm), de fácil cultivo em laboratório e ciclo de vida curto (BIESINGER; CHRISTENSEN, 1972; MÜLLER, 1980; TERRA; FEIDEN,

2003). *Daphnia magna* é uma espécie que realiza partenogênese (reprodução assexuada de baixa variabilidade genética) possui quatro estágios de vida (Figura 3.8): ovo, neonato (*Daphnia* recém nascida com máximo de 24 horas de vida), juvenil (fase que contempla até o desenvolvimento dos ovos) e adulto (quando realiza a primeira postura) (MIGUEL, 2016).

É um organismo-teste que vem sendo utilizada como bioindicador desde a década de 1940, quando Anderson (1944) apresentou as vantagens do uso dessa espécie, com importante função na cadeia trófica por serem consumidores de algas e bactérias e servirem de alimento para consumidores invertebrados e vertebrados (ANDERSON, 1944; DODSON; CÁCERES; ROGERS, 2001).

Figura 3.8 – Esquema representativo do ciclo de vida de *Daphnia magna*, contendo a) embriões já formados na câmara de incubação; b) ovos maduros no ovário; c) primeiro estágio do ovo após ser transferido para a câmara de incubação; d) ovos imaturos no ovário; e) neonatas; f) juvenis.

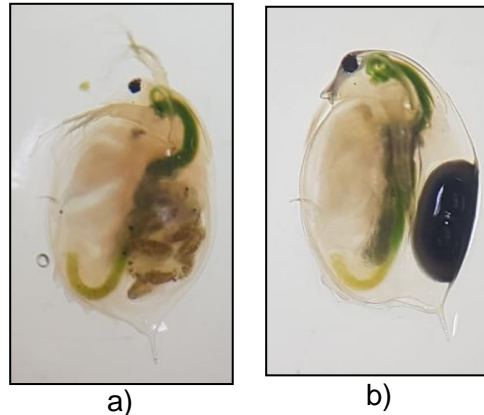


Fonte: Adaptado de Dodson; Cáceres; Rogers, 2010.

Apesar da reprodução ser majoritariamente assexuada (Figura 3.9.a), na qual as fêmeas alocam energia na produção e incubação dos ovos (DODSON; CÁCERES; ROGERS, 2001), a espécie pode mudar sua estratégia de reprodução de acordo com os sinais ambientais (HARRIS; BARTLETT; LLOYD, 2012). No caso da reprodução sexuada, o corpo do organismo sofre alteração, os machos são muito menores que as fêmeas, de coloração mais alaranjada e que ao fecundar a fêmea dão origem aos efípios (ovos de resistência) (Figura 3.9.b). Os efípios possuem uma camada protetora rígida

com interior nutritivo e que podem permanecer em estado de dormência até que as condições ambientais se tornem favoráveis.

Figura 3.9 - Exemplar de microcrustáceo *Daphnia magna* a) fêmea após reprodução assexuada e b) fêmea após a reprodução sexuada e formação do efípio.



Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).

Para o crescimento e a liberação dos neonatos a espécie faz a troca de muda. Essa troca da carapaça de quitina é controlada pelos hormônios ecdisteróides e pode sofrer influências de compostos emergentes como hormônios e substâncias endócrinas (GIRAUDO *et al.*, 2017; MARTIN-CREUZBURG; WESTERLUND; HOFFMANN, 2007; SUMIYA *et al.*, 2014).

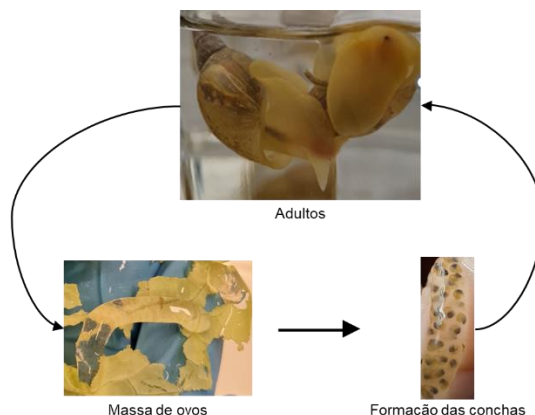
#### **3.4.1.6. *Lymnaea stagnalis* Linnaeus, 1758**

*Lymnaea stagnalis*, pertencente à ordem Gastropoda e família Lymnaeidae, é um molusco comum em ecossistemas lântico na Europa, no norte da Ásia e na América do Norte, se alimentam majoritariamente de vegetais e detritos nos primeiros estágios de vida e de plantas quando adultos (CABI, 2022).

*Lymnaea stagnalis* (Figura 3.10) possui ciclo de vida entre um e dois anos e os adultos possuem comprimento da concha entre 2 e 6 cm (OECD, 2016). A espécie é hermafrodita simultâneo e durante o acasalamento podem apresentar a parte masculina ou feminina, se autofertilizar ou fazer a fertilização cruzada, armazenando o esperma por até três meses (LOOSE; KOENE, 2008). O número de ovos por massa varia de 50 a 120

dependendo do tamanho do adulto e possui taxa de eclosão superior a 70% em ecossistemas favoráveis (COUTELLEC; LAGADIC, 2006).

Figura 3.10 – Esquema do ciclo de vida de *Lymnaea stagnalis*.



Fonte: Autoria própria (2022).

### 3.5. Aplicação de bioensaios de toxicidade

A aplicação dos bioensaios de toxicidade com os organismos-testes normalmente seguem metodologias padronizadas por órgãos nacionais como Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) ou internacionais como a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD). Porém, o uso de metodologias propostas na literatura também é comumente usadas, principalmente para espécies nativas cuja metodologia padronizada ainda não foi publicada.

Geralmente é necessário o uso de cinco soluções testes contendo o contaminante, além do controle (sem a presença do contaminante), assim aumenta a probabilidade de uma análise estatística adequada. Para possibilitar a análise de resultado, normalmente é utilizado um fator de diluição para a determinação do intervalo de concentrações a ser testado (p.e. Fator 2 – 0, 50, 100, 200, 400 e 800 mg.L<sup>-1</sup>). No caso de efluentes líquidos, esse intervalo de “concentração” a ser testado passa a ser um intervalo de “diluição”, por exemplo, aplicando o fator de diluição 2 teríamos: a amostra bruta (100%), fração 50% (v:v, 50% efluente e 50% meio de teste não contaminado), fração 25% (v:v, 25% efluente e 75% meio de teste não contaminado), fração 12,5% (v:v, 12,5% efluente e 87,5% meio

de teste não contaminado) e fração 6,25% (v:v, 6,25% efluente e 93,75% meio de teste não contaminado).

Porém, além das recomendações da literatura, é importante elaborar um delineamento experimental adequado para responder a afirmação feita no estudo.



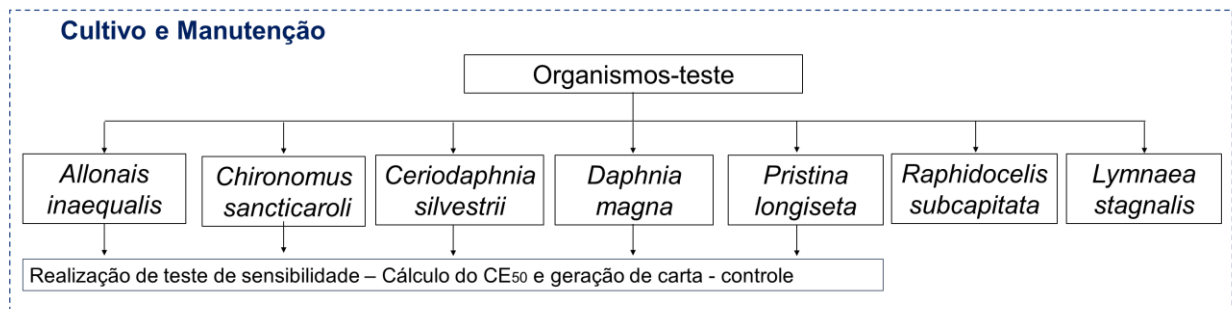


## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Procedimento experimental

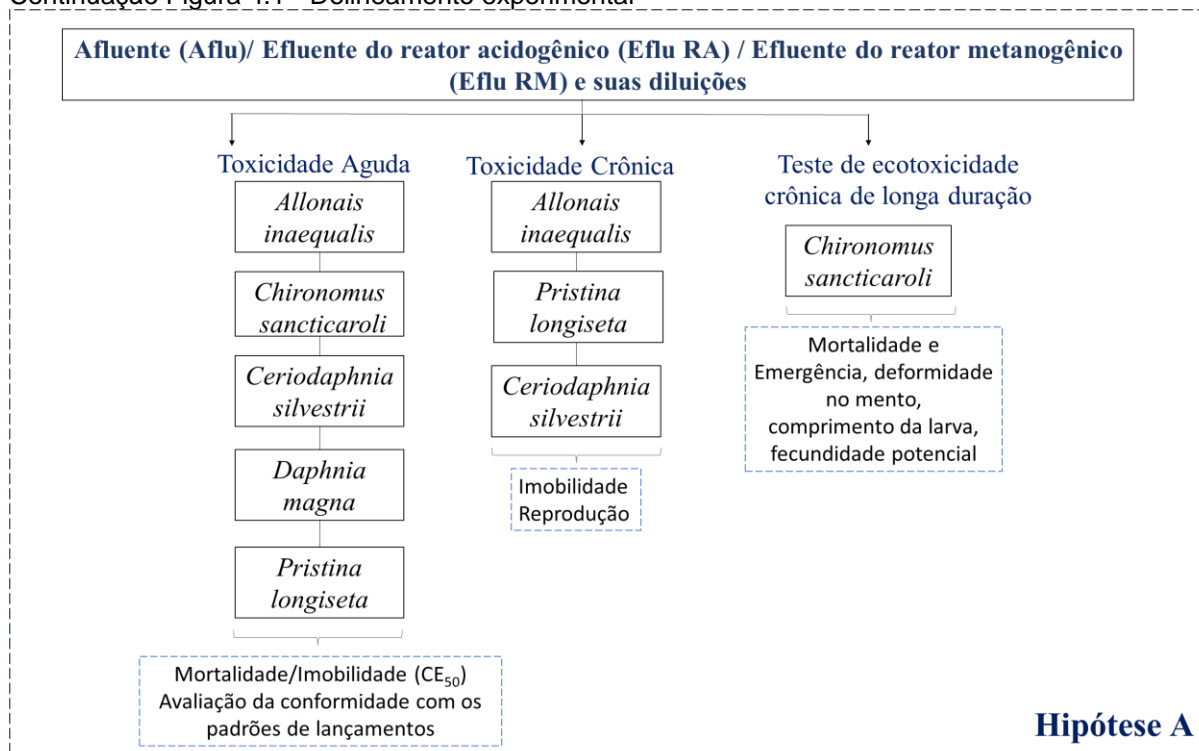
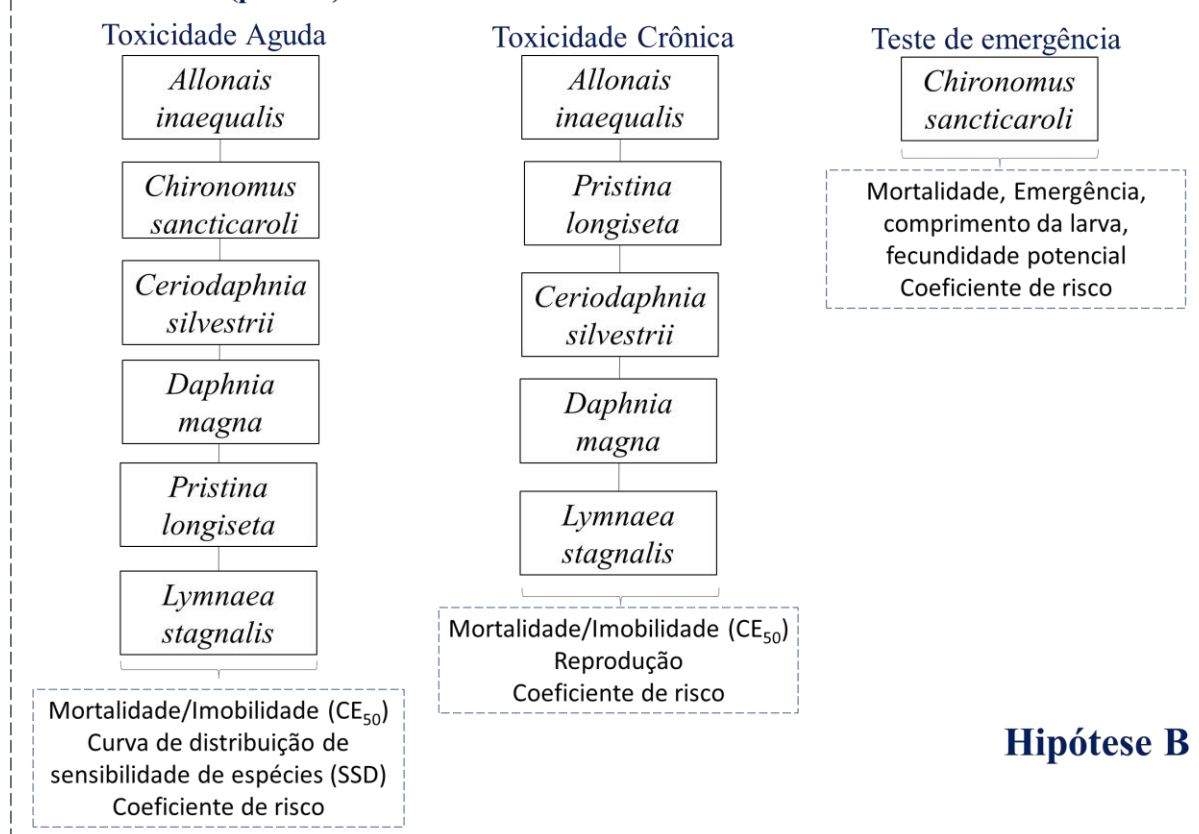
Os organismos-teste foram escolhidos devido à disponibilidade dos cultivos e vidrarias necessárias em laboratório e a importância ecológica das espécies de invertebrados aquáticos. Para testar a Hipótese A, foram realizados ensaios de ecotoxicidade aguda e crônica com os organismos-teste para avaliar se os reatores foram capazes de reduzir a toxicidade do efluente para a biota aquática. Além disso, com os resultados foi possível indicar qual a melhor configuração de tratamento para de efluente contendo o retardante de chamas TBBPA do ponto de vista de menor toxicidade. Para testar a Hipótese B (o TBBPA causa toxicidade para a biota aquática), foram realizados ensaios de ecotoxicidade aguda e crônica para avaliar a toxicidade do composto isolado (padrão) em cada organismo-teste. Ressalta-se que o delineamento experimental desse projeto (Figura 4.1) sofreu ajustes e algumas etapas foram prejudicadas em decorrência da pandemia do vírus SARS-COV-2.

Figura 4.1: Delineamento experimental



(Continua)

Continuação Figura 4.1 - Delineamento experimental

**TBBPA isolado (padrão)**

Fonte: Autoria própria (2022).

## 4.2. Tetrabromobisfenol A padrão

O retardante de chama Tetrabromobisfenol A (TBBPA, CAS # 79-94-7) adquiridos para a realização dos testes foram da marca Sigma-Aldrich® (Brasil) e da marca Alfa Aesar (Holanda). Em ambos os casos, o composto foi estocado ao abrigo da luz. As principais características do produto comercial em pó estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Características químicas do TBBPA padrão

<b>Característica</b>	<b>Descrição</b>
<b>Fórmula empírica</b>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
<b>Nomenclatura</b>	3,3',5,5' - Tetrabromobisfenol A
<b>Porcentagem de TBBPA no produto comercial (grau de pureza)</b>	97%
<b>Peso molecular</b>	543,87 g.mol <sup>-1</sup>

Fonte: Sigma - Aldrich® (2022).

O TBBPA possui baixa solubilidade em água (0,063 mg.L<sup>-1</sup> a 21°C e 0,24 mg.L<sup>-1</sup> a 25°C), sendo que esta aumenta junto com o pH, chegando a 1,26 mg.L<sup>-1</sup> em pH 7 e 2,34 mg.L<sup>-1</sup> em pH 9 (EU, 2006). Devido a baixa solubilidade do TBBPA em meio aquoso foi utilizado solvente para diluí-lo nas amostras de água. Para manter o padrão que era utilizado pela Dra. Williane Macêdo na operação dos reatores, para testar a Hipótese A, foi utilizado o solvente metanol (concentração 0,1% v:v). Para testar a Hipótese B foi utilizado o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (concentração de 0,01% v:v) por ser indicado para auxiliar na solubilidade de composto em ensaios de toxicidade em meio aquoso (OECD, 2019). O metanol (Baker HPLC, J.T. Baker™, CAS # 67-56-1, com 99,8% pureza) e o DMSO (CAS # 67-68-5, com 99.9% pureza) foram mantidos ao abrigo da luz.

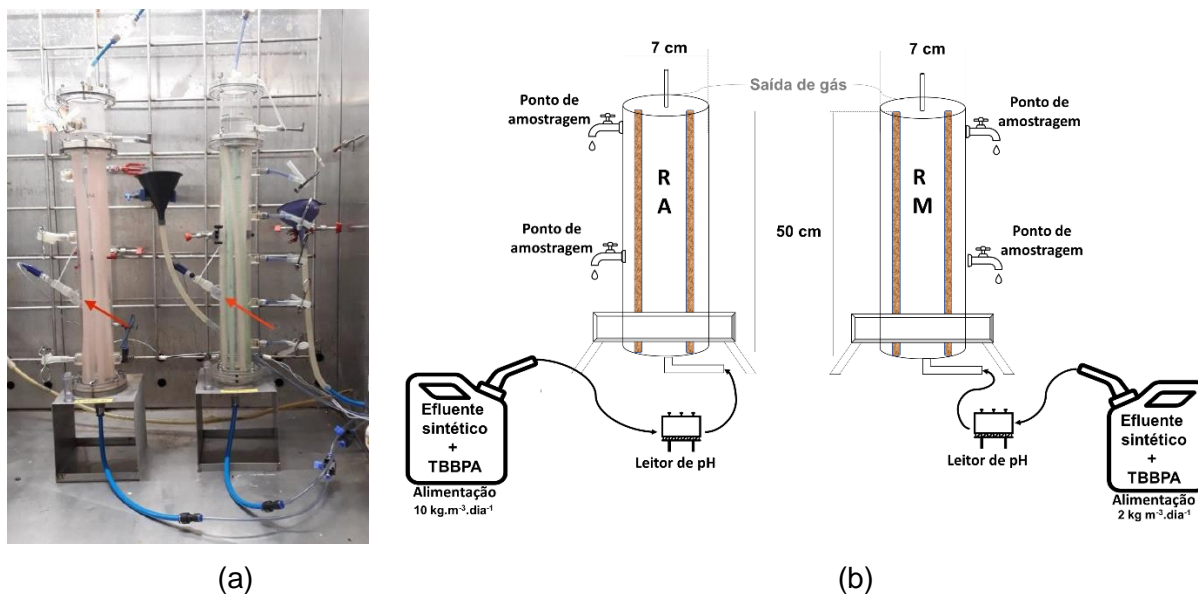
## 4.3. Reator em escala laboratorial tratando efluente sintético enriquecido com TBBPA

Os efluentes utilizados para testar a Hipótese A foram coletados dos reatores operados pela Dra. Williane V. Macêdo, cujo objetivo de pesquisa foi otimizar e avaliar o processo de remoção do TBBPA quando presente na matriz efluente (MACÊDO, 2022). As análises físico-químicas realizadas pela operante do reator constituíram na medição do pH, Demanda Química de Oxigênio (DQO), carboidratos, fenóis e ácidos. A

quantificação do TBBPA também foi feita pela operante do reator por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) seguida por espectrometria de massas sequenciais acoplados por meio de uma interface electrospray (ESI).

O afluente do reator foi composto por efluente doméstico sintético fortificado com  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  de TBBPA (MACÊDO; DUARTE OLIVEIRA; ZAIAT, 2021), concentração próxima de configurações ambientais reais. A composição do afluente do reator está descrita no Apêndice A. Os reatores foram construídos em escala laboratorial usando os tratamentos em condições acidogênico (RA) e metanogênico (RM) e operaram separadamente (Figura 4.2). Os reatores RA e RM, de diâmetro interno de 7 cm e altura do leito de 50 cm, foram operados com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 1,2 e 6 horas, respectivamente, correspondendo a vazões de  $1,25$  e  $0,25 \text{ L.h}^{-1}$ . A carga orgânica volumétrica (COV) aplicada aos reatores foi de  $10 \text{ kg m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$  (RA) e  $2 \text{ kg m}^{-3}.\text{dia}^{-1}$  (RM). Os bioensaios foram realizados após a estabilização dos reatores.

Figura 4.2 - Reatores de bancada para tratamento de efluente doméstico contendo TBBPA a) Fotografia dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM), b) esquema de funcionamento dos reatores RA e RM, com pontos de alimentação e amostragem.



Fonte: a) Cedida por Williane Macêdo b) Elaborado pela autora

#### 4.4. Cultivo e manutenção dos organismos – teste

Para o desenvolvimento dessa pesquisa foram utilizados seis organismos-teste: *Allonais inaequalis*, *Chironomus sancticaroli*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Daphnia magna*, *Lymnaea stagnalis* e *Pristina longisetata*. As algas da espécie *Raphidocelis subcapitata* foram cultivadas por servirem de alimento para as espécies *D. magna* e *C. silvestrii*.

Os cultivos dos organismos *A. inaequalis*, *C. sancticaroli*, *C. silvestrii*, *P. longisetata* e *R. subcapitata* são mantidos no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA), do Departamento de Hidráulica e Saneamento, da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. O cultivo da espécie *D. magna* foi mantido no LEAA até abril de 2019 e foi utilizado para os testes com os efluentes dos reatores RA e RM (Hipótese A). Para testar a Hipótese B, os cultivos de *D. magna* e *L. stagnalis* foram mantidos na Vrije Universiteit Amsterdam (VU), Holanda.

As metodologias e principais características dos cultivos estão apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Condições de cultivo mantidas no Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos e na Vrije Universiteit Amsterdam (VU)

	Temperatura	Fotoperíodo	Composição do meio	Alimentação	Metodologia
<i>Allonais inaequalis</i>	23 a 27 °C	12 h luz/12 h escuro	Areia, água filtrada sem cloro, alimento	Tetramin®	CORBI; GORNI; CORREA, 2015; FELIPE et al., 2020
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	23 a 27 °C	12 h luz/12 h escuro	Água reconstituída	Aditivo alimentar e suspensão algácea	ABNT, 2022b
<i>Chironomus sancticaroli</i>	23 a 27 °C	12 h luz/12 h escuro	Areia, água filtrada sem cloro, alimento	Tetramin®	FONSECA; ROCHA, 2004; OECD 235, 2011; DORNFELD et al., 2019
<i>Daphnia magna</i> *	18 a 22 °C	16 h luz/8 h escuro	Água reconstituída	Aditivo alimentar e suspensão algácea	ABNT, 2022a, OECD 202:2004; OECD 211: 2012
<i>Daphnia magna</i> **	18 a 22 °C	16 h luz/8 h escuro	Água reconstituída	Suspensão algácea	OECD 202:2004; OECD 211: 2012
<i>Pristina longiseta</i>	23 a 27 °C	12 h luz/12 h escuro	Areia, água filtrada sem cloro, alimento	Tetramin®	CASTRO et al., 2020b; SOUZA et al., 2022
<i>Lymnaea stagnalis</i>	19 a 21 °C	16 h luz/8 h escuro	Água filtrada sem cobre	Ração de peixe e alface	VU***
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	23 a 27 °C	12 h luz/12 h escuro	Meio L.C. Oligo	-	ABNT, 2018

Fonte: Autoria própria (2022). \*mantidas no Brasil, \*\* mantidas na Holanda, \*\*\* padrões mantidos pela VU por aproximadamente 50 anos

Os primeiros indivíduos de *A. inaequalis* foram obtidos em corpos d'água localizados no Parque Ecológico de São Carlos Dr. Antônio Teixeira Vianna (São Paulo, Brasil). Já os primeiros indivíduos de *C. sancticaroli* e *P. longiseta* foram obtidos a partir de amostras de água e sedimento coletados em lagoas de estabilização de um matadouro de frango (BR-Aves) localizado em São Carlos (São Paulo, Brasil).

O cultivo de *A. inaequalis* foi realizado em bandejas plásticas de 1 L contendo sedimento esterilizado (mantido em mufla por 4 h à 550°C), água filtrada sem cloro, aeração constante (aproximadamente 1 bolha de ar por segundo) e alimentação uma vez por semana com  $25 \pm 1$  mg de composto alimentar de peixe (Tetramin®) triturada. Os parâmetros químicos da água de cultivo foram mantidos nas condições de pH entre 6,0 e 7,8; condutividade elétrica entre 25 e 80  $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$  e dureza total entre 12 e 36  $\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ . O cultivo de *C. sancticaroli* foi realizado em bandejas de plástico

(dimensões 38 cm de comprimento x 33 cm de largura x 6 cm de altura) com aeração constante (aproximadamente 2 bolhas por segundo) e alimentação duas vezes por semana com  $35 \pm 1$  mg Tetramin® triturada. As bandejas foram cobertas por gaiolas de nylon, dimensões 42 cm de comprimento x 36 cm de largura x 38 cm de altura, para evitar a evasão dos organismos adultos. As condições de cultivo foram mantidas em pH entre 6,0 e 8,0; condutividade entre 25 - 140  $\mu\text{S cm}^{-1}$  e dureza entre 12 e 36  $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ . Os cultivos de *P. longiseta* foram mantidos em bandejas plásticas de 500 mL contendo sedimento esterilizado, água filtrada sem cloro, aeração constante e alimentação uma vez por semana com  $15 \pm 1$  mg de composto alimentar para peixe (Tetramin®) triturada. Os parâmetros químicos da água de cultivo foram mantidos nas condições de pH entre 5,0 e 7,4; condutividade elétrica entre 40 e 150  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  e dureza total entre 12 e 36  $\text{mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ . Para estas espécies, sempre que necessário, o nível da água era preenchido com água filtrada sem cloro. Ressalta-se que o composto alimentar Tetramin® é geralmente usado em criações de peixes e sua composição é rica em nutrientes e minerais (Apêndice B).

Os primeiros indivíduos de *D. magna* e *C. silvestrii* foram obtidos a partir do inóculo cedido pelo Laboratório de Limnologia e Ecotoxicologia Aquática, do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, em São Carlos, SP e pelo Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEAA), Universidade de São Paulo, em São Carlos, SP. No Brasil, o cultivo de *D. magna* foi feito em béqueres de vidro de 2 litros (40 organismos por béquer) e mantido em incubadora BOD (modelo SL-224, do fabricante SOLAB) com temperatura e fotoperíodo controlados. O pH do meio de cultivo foi controlado na faixa entre 7,6 e 8,0 e a dureza total entre 175 e 225  $\text{mg CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ . Para suplementação dos organismos foram adicionadas a vitamina FishtaChen® (4 gotas a cada 2 L de água reconstituída) e o condicionador de meio Seachem Prime® (3 gotas a cada 2 L de água reconstituída). A troca total do meio (água reconstituída feita de acordo com a norma técnica ABNT 12.713 (2022a) (Apêndice C) era realizada três vezes na semana seguida da alimentação do cultivo. A alimentação foi constituída por suspensão algácea de *Raphidocelis subcaptata* ( $3 \times 10^5$  células. $\text{mL}^{-1}$ ) e aditivo alimentar ( $1 \text{ mL.L}^{-1}$ ). O aditivo alimentar era preparado com 50 mL de solução fermentada (0,25 g de fermento biológico a cada 50 mL de água deionizada) e 50 mL de solução de ração

de peixe (5 g de diluídos em um litro de água deionizada. O cultivo de *D. magna* na Vrije Universiteit Amsterdam foi realizado em aquários de 4 litros contendo cerca de 100 organismos em cada, os quais eram mantidos em câmara fria com temperatura e fotoperíodo controlados. A troca do meio era realizada uma vez na semana mantendo 2 litros do meio antigo e adicionando 2 litros de meio novo, os organismos foram alimentados duas vezes na semana com um mix de solução algácea de *R. subcaptata* e *Chlorella sp.*, mantendo a carga de carbono necessária para reprodução (OECD, 2012).

O cultivo de *Ceriodaphnia silvestrii* foi feito em béqueres de vidro de 1 litro (80 organismos por béquer) e mantido em sala climatizada. O pH do meio de cultivo foi controlado na faixa entre 7,0 e 8,0 e a dureza total na faixa de 40 a 48 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>. O meio de cultivo foi trocado três vezes por semana, sendo composto por água reconstituída preparada de acordo com a norma técnica ABNT 13373 (2022b) (Apêndice D). Para suplementação do cultivo foi adicionado 1 gota de FishTamin® a cada litro de água reconstituída e o cultivo era alimentado a cada troca do meio com suspensão algácea de *R. subcaptata* (1 x 10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup>) e aditivo alimentar (1 mL.L<sup>-1</sup>). Para evitar a entrada de bolhas de ar na carapaça dos organismos, o novo meio de cultivo foi mantido sem agitação por 15 minutos antes da colocação dos organismos. Os indivíduos foram cuidadosamente retirados do meio antigo por pipeta Pasteur de ponta larga e colocados diretamente abaixo da superfície da água no béquer contendo o novo meio.

O cultivo de *L. stagnalis* na Vrije Universiteit Amsterdam foi realizado em tanques de água filtrada com baixo teor de cobre contendo organismos em estágios de vida sincronizados, com a separação das massas de ovos sempre que havia necessidade de se iniciar um novo cultivo. A alimentação foi feita com ração de peixe e alface nos primeiros dias após a eclosão dos ovos e mantida com apenas alface após o crescimento dos indivíduos. A alface era comprada de produtores agrícolas credenciados para o fornecimento de folhas sem agrotóxicos.

O cultivo da alga *R. subcaptata* foi realizado em frasco de Erlenmeyer de 2 litros com aeração contínua, sendo mantidos dois inóculos em frasco de Erlenmeyer de 500 mL. O meio de cultivo utilizado para essa espécie foi o meio L.C. Oligo (Apêndice E) (ABNT, 2018) e a cada 15 dias foi realizado uma nova inoculação (mais detalhes podem ser encontrados no Apêndice F).



#### 4.5. Testes de sensibilidade

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com as substâncias de referência sugeridas pela literatura para cada organismo, mantendo uma solução estoque para cada uma, armazenadas em frascos âmbar e refrigeradas a 5°C. Ressalta-se que a frequência dos testes de sensibilidade foi prejudicada durante o período de março/2020 a outubro/2021 devido à pandemia do coronavírus.

Tabela 4.3 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de sensibilidade para os organismos-teste

	<i>A. inaequalis</i>	<i>C. sancticaroli</i>	<i>C. silvestrii</i>	<i>D. magna</i>	<i>P. longiseta</i>
<b>Substância de referência</b>	KCl	KCl	NaCl	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	KCl
<b>Tipo de teste</b>	Estático	Estático	Estático	Estático	Estático
<b>Volume</b>	60 mL	250 mL	30 mL	100 mL	60 mL
<b>Sedimento</b>	10 g	50 g	-	-	10 g
<b>Quantidade de indivíduos</b>	6	6 larvas III ou IV instar	10 neonatos com menos de 24 h de vida	10 neonatos com menos de 24 h de vida	6
<b>Exposição</b>	96 h	96 h	48 h	48 h	48 h
<b>Número de réplicas</b>	3	3	3	3	3
<b>Aeração</b>	-	-	-	-	-
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	20 ± 2 °C	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h L: 12h E	12h L: 12h E	12h L: 12h E	16h L: 8h E	12h L: 12h E
<b>Resposta</b>	Mortalidade	Mortalidade	Imobilidade	Imobilidade	Mortalidade
<b>Metodologia</b>	CORBI; GORNI; CORREA, (2015); FELIPE et al., (2020)	OECD (2011); CORBI et al., (2019) DORNFELD et al. (2019)	ABNT (2022b)	ABNT (2022a); OECD (2004)	CASTRO et al. (2020b)

Fonte: Autoria própria (2022).

Os oligoquetos *A. inaequalis* e *P. longiseta* e as larvas de inseto de III - IV instar de *C. sancticaroli* foram expostos à solução-teste de cloreto de potássio (KCl) diluída em água filtrada sem cloro. O intervalo de concentrações usado foi 0 (experimento controle – contendo apenas água deionizada e alimento), 1,5; 2,25; 3,5; 5,0 e 7,5 g.L<sup>-1</sup> para *A. inaequalis*; 0; 0,6; 0,9; 1,3; 2,0 e 3,0 g.L<sup>-1</sup> para *P. longiseta* e 0; 2; 4; 6; 8 e 10 g.L<sup>-1</sup> para *C. sancticaroli*. Para realização do teste foi preparada uma solução-estoque em água deionizada na concentração de 100 g KCl.L<sup>-1</sup>. Os neonatos com menos de 24 h de

*D. magna* foram expostos ao sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) nas concentrações 0 (controle), 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de água reconstituída. Os neonatos com menos de 24 h de *C. silvestrii* foram expostas ao cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) nas concentrações 0 (controle), 0,25; 0,6; 1,1; 1,5; 1,8  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de água reconstituída. Para realização do teste com os crustáceos, foram preparadas uma solução-estoque na concentração de 100  $\text{mg} \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \cdot \text{L}^{-1}$  de água deionizada, e uma solução-estoque na concentração de 10  $\text{g} \text{NaCl} \cdot \text{L}^{-1}$  de água deionizada, a partir das quais foram feitas as diluições necessárias.

Adicionalmente, ao final de cada teste, foi contabilizado os números de organismos mortos e/ou imóveis e calculadas as concentrações das substâncias de referência que causaram efeito (mortalidade ou imobilidade) em 50% dos organismos ( $\text{CE}_{50}$ ). Para essa estimativa foi realizado o estudo estatístico de concentração de efeito com o auxílio de um algoritmo programado no *software* R versão 4.1.2 utilizando as extensões MASS e DRC. Os resultados para cada organismos foram plotados em uma carta-controle, o que auxiliou na verificação da saúde do cultivo. Ressalta-se que os ensaios de sensibilidade foram realizados ao longo dos anos 2019 - 2022 pelos frequentadores do LEAA, sendo a carta-controle comum a todos os membros do laboratório.

#### **4.6. Ensaio ecotoxicológicos**

Os testes de ecotoxicidade aguda e crônica foram realizados nas mesmas condições do cultivo para todas as espécies. Foram monitoradas as variáveis pH, temperatura e condutividade elétrica no início e ao final dos bioensaios. O alimento e as soluções-testes foram mantidos em temperatura ambiente e deixados em repouso por, pelo menos, 15 minutos visando a aclimação das soluções à temperatura do cultivo. Além disso, todos os béqueres foram cobertos com plástico filme para reduzir a evaporação do meio e evitar a contaminação por partículas externas.

Para testar a Hipótese A foram realizados testes de ecotoxicidade aguda e crônica com o afluente e os efluentes tratados nos dois reatores anaeróbios de leito fixo estruturado, reator acidogênico (RA) e reator metanogênico (RM). Para isto, foram utilizadas as seguintes soluções-teste: afluente e efluente bruto (100%) e, afluente e

efluentes diluídos conforme proposto por Bertolletti (2013). As diluições foram realizadas em série nas porcentagens de 6; 12; 25; 50% com água filtrada sem cloro (para as espécies *A. inaequalis*, *C. sancticaroli* e *P. longiseta*) ou água reconstituída (para as espécies *C. silvestrii* e *D. magna*).

Para testar a Hipótese B foram realizados testes de toxicidade aguda para avaliar os efeitos de letalidade/imobilidade dos organismos para soluções de TBBPA padrão. O intervalo de concentração para os bioensaios foram determinados a partir de testes preliminares, sendo os ensaios de toxicidade crônica dependentes das respostas obtidas nos ensaios de toxicidade aguda e em testes preliminares. Os bioensaios preliminares consistiram no uso de concentrações de TBBPA variadas para cada espécie para que fosse possível avaliar as concentrações em que não havia efeito ou concentrações com mortalidade ou imobilidade total. O critério de escolha do intervalo de concentrações foi abranger concentrações com baixo e elevado efeito, respeitando o limite máximo de diluição do TBBPA sem haver a necessidade de aumentar a concentração de solvente de 0,01% (DMSO). Foram utilizados dois controles para testar a Hipótese B, o controle negativo: constituído de meio de teste não contaminado e controle positivo: constituído de meio de teste não contaminado adicionado de 0,01% de solvente (v:v).

#### **4.6.1 *Allonais inaequalis***

Os testes de ecotoxicidade com o organismo *A. inaequalis* foram realizados conforme as recomendações de Corbi *et al.* (2015) e Felipe *et al.* (2020) (Tabela 4.4). Para isto, foram utilizados béqueres de 100 mL contendo 80 mL de solução-teste e 10 g de sedimento esterilizado em mufla (4 h à 550°C). Para cada réplica, foram adicionados 6 organismos de tamanho médio de 5 mm abaixo da superfície da água. As concentrações de TBBPA padrão foram estabelecidas com base em testes preliminares e o intervalo de concentrações para o teste de ecotoxicidade aguda foi 0, 0,01%DMSO, 150, 300, 600, 1200 e 2400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  enquanto para o teste de ecotoxicidade crônica o intervalo de concentrações foi 0, 0,01%DMSO, 3,75, 7,5, 15, 30, 60, 120, 240  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Tabela 4.4 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com *Allonais inaequalis*

	<b>Teste de ecotoxicidade aguda</b>	<b>Teste de ecotoxicidade crônica</b>
<b>Solução-teste</b>	TBBPA padrão, afluente, efluente e diluições	TBBPA padrão, afluente, efluente e diluições
<b>Volume</b>	80 mL	80 mL
<b>Sedimento</b>	10 g	10 g
<b>Quantidade de organismos/réplica</b>	6	6
<b>Exposição</b>	96 h	10 d
<b>Número de réplicas</b>	3	3
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h L: 12h E	12h L: 12h E
<b>Alimentação</b>	2 mg apenas no início	2 mg no início do teste e após 5 d
<b>Aeração</b>	Ausente	Ausente
<b>Resposta</b>	Mortalidade	Mortalidade, Reprodução

Fonte: Autoria própria (2022).

#### **4.6.2. *Ceriodaphnia silvestrii***

Os bioensaios de toxicidade aguda e crônica com *C. silvestrii* foram realizados de acordo com a NBR 13373 (2017) (Tabela 4.5), sendo utilizados béqueres de 50 mL contendo 30 mL de solução-teste. No caso dos ensaios de ecotoxicidade crônica, as soluções-testes foram renovadas a cada 2 dias e a cada troca foram adicionados 10 µL de aditivo alimentar e solução algácea. Em ambos os testes, os neonatos (< 24h de vida) foram colocados abaixo da superfície da água para evitar a entrada de ar na carapaça. As concentrações de TBBPA padrão foram estabelecidas com base em testes preliminares e o intervalo de concentrações para o teste de ecotoxicidade aguda foi 0, 0,01%DMSO, 75, 150, 300, 600 e 1200 µg.L<sup>-1</sup> enquanto para o teste de ecotoxicidade crônica o intervalo de concentrações foi 0, 0,01%DMSO, 3,75, 7,5, 15, 30, 60, 120, 240 e 480 µg.L<sup>-1</sup>.

Tabela 4.5 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com *Ceriodaphnia silvestrii*.

	<b>Teste de ecotoxicidade aguda</b>	<b>Teste de ecotoxicidade crônica</b>
<b>Solução-teste</b>	TBBPA padrão, afluente, efluente e diluições	TBBPA padrão, afluente, efluente e diluições
<b>Volume</b>	30 mL	15 mL
<b>Sedimento</b>	Ausente	Ausente
<b>Quantidade de organismos/réplica</b>	5 neonatos com menos de 24 h de vida	1 neonato com menos de 24 h de vida
<b>Exposição</b>	48 h	7 d
<b>Número de réplicas</b>	3	10
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h L: 12h E	12h L: 12h E
<b>Alimentação</b>	Ausente	A cada 2 dias
<b>Aeração</b>	Ausente	Ausente
<b>Resposta</b>	Imobilidade	Imobilidade, reprodução

Fonte: Autoria própria (2022)

#### **4.6.3. *Chironomus sancticaroli***

Os testes com a espécie *C. sancticaroli* foram realizados de acordo com metodologia adaptada de Fonseca e Rocha (2004); OECD (2011) e Dornfeld et al. (2019) (Tabela 4.6), sendo utilizados béqueres de 500 mL e sedimento esterilizado em mufla (4 h à 550°C). Na preparação dos testes, os béqueres foram preenchidos com 50 g de sedimento, alimento e 250 mL de soluções-testes. As concentrações de TBBPA padrão foram estabelecidas com base em testes preliminares e o intervalo de concentrações para o teste de ecotoxicidade aguda foi 0, 0,01% DMSO, 150, 300, 600, 1200 e 2400 µg.L<sup>-1</sup> enquanto para o teste de ecotoxicidade crônica o intervalo de concentrações foi 0, 0,01% DMSO, 7,5, 15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 µg.L<sup>-1</sup>.

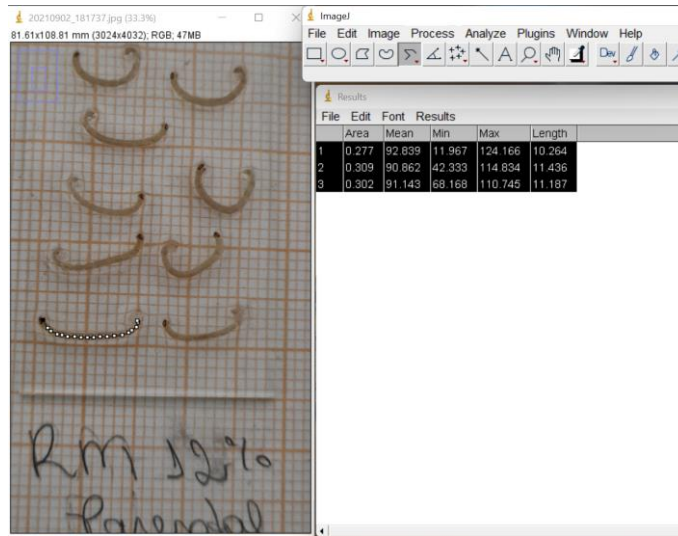
Tabela 4.6 – Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica (teste de gerações e teste de emergência) com *C. sancticaroli*.

	<b>Teste de ecotoxicidade aguda</b>	<b>Teste de gerações</b>	<b>Teste de emergência</b>
<b>Solução-teste</b>	TBBPA padrão, afluente, efluente e diluições	Afluente, efluente e diluições	TBBPA padrão
<b>Volume</b>	250 mL	250 mL	250 mL
<b>Sedimento</b>	50 g	50 g	50 g
<b>Quantidade de organismos/réplica</b>	6 larvas III ou IV instar	10 larvas I instar	10 larvas I instar
<b>Exposição</b>	96 h	Indefinido, amostragem no dia 10	Indefinido, amostragem no dia 10
<b>Número de réplicas</b>	3	4	4
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h L: 12h E	12h L: 12h E	12h L: 12h E
<b>Alimentação</b>	2 mg apenas no início	2 mg no início do teste e a cada 5 d	2 mg no início do teste e a cada 5 d
<b>Aeração</b>	Ausente	Presente	Presente
<b>Resposta</b>	Mortalidade	Mortalidade, crescimento corporal, análise do mento, potencial reprodutivo*	Mortalidade, crescimento corporal, análise do mento, potencial reprodutivo*

Fonte: Autoria própria (2022). \* o potencial reprodutivo das fêmeas adultas foi estimado a partir de uma relação matemática baseada na medição das asas

Para testar a Hipótese A, foram realizados teste de geração com a espécie para o afluente e os efluentes dos reatores acidogênico e metanogênico seguindo metodologia adaptada de Bernegossi *et al.* (2019). Esse teste consistiu na exposição de 10 larvas de primeiro instar (geração parental, GP) em quatro réplicas. Ao final de 10 dias, foi realizada a contagem do número de larvas sobreviventes em cada réplica e três réplicas permaneceram sob exposição para dar continuidade ao teste. A quarta réplica foi desmontada e usada para amostragem de larvas para posterior medição do comprimento corporal e observação de deformidade do mento. Essas larvas foram fixadas em álcool isopropílico (99.8% de pureza), dispostos em lâminas sob folha milimetrada para obtenção de imagens fotográficas. As fotos foram analisadas no programa ImageJ 1.52a (RASBAND, 2018) e a escala determinada de acordo com a milimetragem da folha (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Exemplo de como é feita a mensuração do comprimento larval de *Chironomus sancticaroli*



Fonte: Autoria própria (2022).

Para analisar se há deformidade no mento, as cápsulas cefálicas dos organismos foram dispostas na posição dorso-ventral em lâminas semi-permanentes. As cápsulas foram dispostas em Bálsamo do Canadá (Laboratório Vetec Química Fina, adquirido por meio da empresa Sigma-Aldrich®), cobertas por lamínulas e mantidas em estufa para a secagem do meio (72 h em 55°C). As lâminas foram fotografadas por meio da captura de imagem no *software* TSView com câmera digital acoplada ao microscópio óptico da marca Nikon Eclipse E200. Foram consideradas deformidade do mento, a falta e a adição de dentes.

A partir das três réplicas remanescente foi observada a emergência de adultos. Quando iniciada a emergência, as fêmeas e os machos da geração P foram manejados para que fosse possível a copulação e obtenção de novas desovas para dar início à geração filial 1 (F1). As desovas de cada diluição foram acondicionadas em placas de Petri contendo o meio correspondente de cada exposição e aeradas até a eclosão de larvas de I instar. A partir das larvas de I instar de cada diluição, a exposição da geração F1 foi iniciada seguindo as mesmas configurações da geração P (4 réplicas, com amostragem de larvas da quarta réplica no dia 10 e amostragem dos adultos após emergência). Os testes foram considerados finalizados para ambas as gerações quando todas as larvas emergiram ou morreram.

Todas as fêmeas emergidas foram coletadas com o auxílio de um canudo e fixadas em álcool isopropílico em tubos de 1,5 mL para posterior fixação e medição do tamanho das asas. Para facilitar a medição das asas, os indivíduos foram imersos em KOH 10% por 1 hora, lavados com solução de ácido acético e emergidos no corante fucsina ácida (Marca Synth, adquirido por meio da empresa Sigma-Aldrich®, C.I. 42685 – utilizada para coloração de seções histológicas) por, pelo menos, 24 horas. As asas coradas (direita e esquerda) foram lavadas em álcool 70% e mantidas em álcool absoluto para serem desanexadas com o auxílio de agulhas. As asas foram então dispostas sobre lâminas, fixadas com Bálsamo do Canadá e cobertas por lamínula. A estimativa da fecundidade potencial das fêmeas seguiu a equação 1, estabelecida por Trivinho-Strixino (1980) para essa espécie.

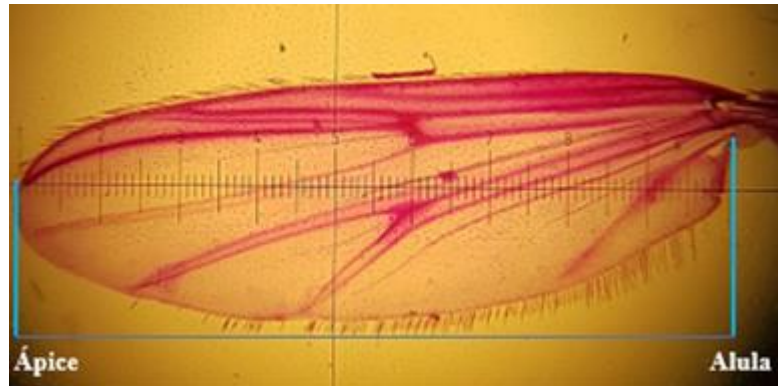
$$F = (k * L) - m \quad \text{(Equação 1)}$$

Sendo, “F” fecundidade potencial, “k” uma constante (471,64), “L” o comprimento da asa (medido com o auxílio de uma lente graduada acoplada a um microscópio óptico da marca Quimis® e considerando a distância entre a alula e a ápice – Figura 4.4) e “m” uma constante (707,41).

Para testar a Hipótese B foi realizado o teste de emergência, que consistiu na exposição de 10 larvas de I instar em quatro réplicas. Assim como para a Hipótese A, as larvas da quarta réplica foram amostradas no décimo dia para posterior medição do comprimento corporal. Para obtenção da taxa de emergência e das medidas das asas da fêmea, as outras três réplicas foram mantidas até que todas as larvas emergissem ou morressem. Os procedimentos de medição do comprimento larval e cálculo da fecundidade potencial das fêmeas seguiram a mesma metodologia descrita para o teste de gerações.



Figura 4.4 – Exemplificação da medição do comprimento da asa da fêmea de *Chironomus sancticaroli*.



Fonte: BERNEGOSI *et al.*, 2021.

#### **4.6.4. *Daphnia magna***

Para os bioensaios com o crustáceo *D. magna* realizados no Brasil e na Holanda, foram empregadas as normas técnicas ABNT 12713 (2022a) e OECD 202 (2004) (Tabela 4.7), sendo utilizados béqueres de 100 mL. No caso dos ensaios crônicos, os organismos foram alimentados com solução algácea ( $3 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>). Em ambos os testes, os neonatos foram colocados abaixo da superfície da água para evitar a entrada de ar na carapaça. As concentrações de TBBPA padrão previamente estabelecidas, foram: 0, 0,01% DMSO, 819, 1024, 1280, 1600 e 2000 µg.L<sup>-1</sup> e 0, 0,01% DMSO, 50, 100, 200, 400 e 800 µg.L<sup>-1</sup> para os bioensaios de toxicidade aguda e crônica, respectivamente.

Tabela 4.7 – Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com *Daphnia magna*.

	<b>Teste de ecotoxicidade aguda</b>	<b>Teste de ecotoxicidade crônica</b>
<b>Solução-teste</b>	TBBPA padrão, efluente e diluições	TBBPA padrão, eflu RM 100%
<b>Volume</b>	30 mL	25 mL
<b>Sedimento</b>	Ausente	Ausente
<b>Quantidade de organismos/réplica</b>	5 neonatos com menos de 24 h de vida	1 neonato com menos de 24 h de vida
<b>Exposição</b>	48 h	21 d
<b>Número de réplicas</b>	3	10
<b>Temperatura</b>	20 ± 2 °C	20 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	16h L: 8h E	16h L: 8h E
<b>Alimentação</b>	Ausente	A cada troca do meio
<b>Aeração</b>	Ausente	Ausente
<b>Resposta</b>	Imobilidade	Imobilidade, reprodução, produção de mudas

Fonte: Autoria própria (2022)

Os efeitos na reprodução e na produção de muda foram analisados considerando os índices de indução ou inibição (%In e %Im, respectivamente), levando em consideração os resultados obtidos para geração de neonatos ou produção de mudas na condição controle e nos tratamentos testados. Os índices %In e %Im foram calculados adaptando de Lima e Silva *et al.* (2022), conforme a Equação 2:

$$\%Im/n = [(A2_{\text{tratamento}} - A2_{\text{controle}}) / A2_{\text{controle}}] \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde,  $A2_{\text{tratamento}}$  refere-se à produção média de muda ou geração de neonatos para cada tratamento testado;  $A2_{\text{controle}}$  refere-se à produção média de muda ou geração de neonatos para a condição controle. O resultado foi analisado conforme a classificação: %Im/n entre -20% e 20% significa que não houve indução ou inibição significativa, %Im/n maior que 20% houve indução; %Im/n menor que -20% houve inibição (DE LIMA E SILVA *et al.*, 2022).

Ressalta-se que a contagem dos neonatos foi feita durante a troca do meio de teste e que foi considerado como muda quando o indivíduo estava totalmente fora da carapaça (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Exemplo de ecdise (muda) de *Daphnia magna*.



Fonte: Acervo pessoal da autora.

#### **4.6.5. *Pristina longiset***

Os testes com o oligoqueta *P. longiset* seguiram as recomendações descritas por Castro *et al.* (2020c) e Souza *et al.* (2022) (Tabela 4.8), sendo utilizados béqueres de 100 mL e 10 g de sedimento esterilizado em mufla (4 h à 550°C). Na preparação dos testes, os béqueres foram preenchidos com sedimento, alimento e as soluções-testes em temperatura ambiente. Os testes de ecotoxicidade crônica com o afluente e efluentes foram realizados antes da publicação do método de ensaio e, portanto, possui tempo de duração diferente do teste realizado com o TBBPA padrão. As concentrações de TBBPA padrão previamente estabelecidas, foram: 0, 0,01% DMSO, 75, 150, 300, 600, 1200, 2400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e 0, 0,01% DMSO, 3,75, 7,5, 15, 30, 60 e 120  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para os bioensaios de toxicidade aguda e crônica, respectivamente.

Tabela 4.8 - Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com *Pristina longiseta*.

	<b>Teste de ecotoxicidade aguda</b>	<b>Teste de ecotoxicidade crônica</b>	<b>Teste de ecotoxicidade crônica</b>
<b>Solução-teste</b>	TBBPA padrão, afluente, efluente e diluições	Afluente, efluentes e diluições	TBBPA padrão
<b>Volume</b>	60 mL	60 mL	60 mL
<b>Sedimento</b>	10 g	10 g	10 g
<b>Quantidade de organismos/réplica</b>	6	6	6
<b>Exposição</b>	48 h	4 d	7 d
<b>Número de réplicas</b>	3	3	3
<b>Temperatura</b>	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	12h L: 12h E	12h L: 12h E	12h L: 12h E
<b>Alimentação</b>	2 mg apenas no início	2 mg apenas no início	2 mg apenas no início
<b>Aeração</b>	Ausente	Ausente	Ausente
<b>Resposta</b>	Imobilidade	Imobilidade, reprodução	Imobilidade, reprodução

Fonte: Autoria própria (2022)

#### 4.6.6. *Lymnaea stagnalis*

Os bioensaios com o molusco *L. stagnalis* foram realizados apenas para testar a Hipótese B, com as soluções de TBBPA padrão, adaptando a metodologia de OECD 243 (2016) (Tabela 4.9). Foram utilizados potes de vidro de 800 mL para a realização dos testes e água filtrada com baixo teor de cobre para fazer as soluções. Os indivíduos tiveram suas conchas medidas antes do início dos testes e apenas os adultos com comprimento de concha entre 2,5 e 3,0 cm foram adicionados. Durante o experimento de toxicidade crônica foram realizadas duas trocas do meio de teste semanalmente, na qual além da substituição da solução-teste, as massas de ovos foram contadas (Figura 4.6). A alimentação foi feita exclusivamente com alface seguindo a proporção de peso recomendada pela OECD 243 (3,5 g por indivíduo por semana). As concentrações de TBBPA padrão foram: 0, 0,01% DMSO, 200, 400, 800, 1600 e 3200 µg.L<sup>-1</sup> e 0, 0,01% DMSO, 200, 400, 800, 1600 e 3200 µg.L<sup>-1</sup> para os bioensaios de toxicidade aguda e crônica, respectivamente.

Tabela 4.9 – Parâmetros utilizados para a realização dos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com *Lymnaea stagnalis*.

	Teste de ecotoxicidade aguda	Teste de ecotoxicidade crônica
<b>Volume</b>	500 mL	600 mL
<b>Quantidade de organismos/réplica</b>	5	4
<b>Exposição</b>	4 d	28 d
<b>Número de réplicas</b>	2	8
<b>Temperatura</b>	20 ± 2 °C	20 ± 2 °C
<b>Fotoperíodo</b>	16h L: 8h E	16h L: 8h E
<b>Alimentação</b>	Ausente	Alface a cada troca do meio
<b>Aeração</b>	Ausente	Contínua
<b>Resposta</b>	Mortalidade	Mortalidade, reprodução

Fonte: Autoria própria (2022)

Figura 4.6 – Contagem das massas de ovos coletados por réplica no teste de ecotoxicidade crônica com *Lymnaea stagnalis* exposta ao TBBPA padrão.



Fonte: Autoria própria (2022).

## 4.7. Análise de dados

### 4.7.1. Testes das hipóteses A e B

Inicialmente foram realizadas as análises descritivas dos dados, com o desenvolvimento de tabelas e gráficos de barra contendo as médias e os desvios-padrão dos resultados referentes as respostas de toxicidade (mortalidade, imobilidade, desenvolvimento, reprodução).

A concentração de efeito, CEx, representa a concentração da amostra que causa efeito a uma porcentagem  $x = 10, 50\%$  dos organismos-teste, e foi estimada com auxílio

do *software R* versão 4.1.2 e pacotes MASS e DRC (R CORE TEAM, 2018), considerando 95% de intervalo de confiança.

#### 4.7.2. Teste da hipótese A

A partir dos resultados para cada resposta (letalidade, imobilidade, crescimento, tamanho das asas, etc), foi verificado se os dados seguiam distribuição normal pelo Teste de Shapiro- Wilk. Para comparar as respostas entre a afluyente e os efluentes (RA e RM) foi aplicado o teste *Two-Way* ANOVA, no qual avaliou-se se os fatores diluições testadas (0, 6%, 12%, 25%, 50% e 100% v:v) e tipo de tratamento (não tratado, tratado em RA ou tratado em RM) influenciaram as respostas ecotoxicológicas. Além disso, no teste de geração com *C. sancticaroli* para cada solução-teste (aflu, efla RA e eflu RM) foi aplicado o teste *Two-Way* ANOVA avaliando se os fatores diluições testadas (0, 6%, 12%, 25%, 50% e 100% v:v) e geração (parental ou filial) influenciaram as respostas ecotoxicológicas.

Todas as análises estatísticas consideraram 95% de intervalo de confiança e foram realizadas no *software Past*<sup>®</sup> (*Paleontological Statistics*) versão 3.21 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

Com o objetivo de avaliar se os tratamentos conseguiram melhorar a qualidade dos efluentes após passagem pelos reatores, foram estimadas a redução ou aumento da toxicidade (%) (Equação 3). A comparação foi feita com base na Unidade Tóxica (UT), que representa o fator 100/CE<sub>50</sub>, e avalia se os efluentes dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM) reduziram ou aumentaram a toxicidade do afluyente para as espécies estudadas. Quanto maior o valor numérico da UT, maior a toxicidade da amostra.

$$\text{Redução ou aumento da toxicidade (\%)} = \frac{UT_{eflu} - UT_{aflu}}{UT_{aflu}} * 100 \quad \text{Equação 3}$$

Para a estimativa de conformidade com as diretrizes ambientais Federal (CONAMA n. 430) ou do Estado de São Paulo (CETESB), sabendo que o efluente do município de São Carlos (SP) é lançado diretamente no corpo receptor, as Equações 4 e

5 (BERTOLETTI, 2013) e 6 (CONAMA, 2011) foram adaptadas para as condições testadas nessa pesquisa:

$$D. E. R = \frac{Q_{eflu}}{Q_{eflu} + Q_{min}} * 100 \quad \text{Equação 4}$$

Sendo, D.E.R. a diluição do efluente no corpo receptor,  $Q_{eflu}$  a vazão média do efluente e  $Q_{min}$  a vazão mínima do corpo receptor.

$$D. E. R (\%) \leq \frac{CE50}{100} \quad \text{Equação 5}$$

Sendo,  $CE_{50}$  a concentração do efluente que causa efeito de toxicidade aguda a 50% dos indivíduos e CENO a concentração de efluente que não causa efeito de toxicidade crônica observável à população testada. Para garantir a ausência de efeitos tóxicos crônicos, a  $CE_{50}$  é dividida pelo fator 100 ou a CENO dividida pelo fator 10 (BERTOLETTI, 2013).

$$D. E. R (\%) \leq \frac{CE50}{3} \quad \text{Equação 6}$$

Sendo,  $CE_{50}$  a concentração do efluente que causa efeito de toxicidade aguda a 50% dos indivíduos e 3 fator de divisão para garantir ausência de efeitos na biota (CONAMA, 2011).

Essas estimativas foram feitas com o objetivo de avaliar se as configurações de tratamento dos reatores de bancada seriam capazes de deixar o efluentes em conformidade com as legislações sobre lançamento de efluentes caso as eficiências de tratamento dos reatores RA e RM se mantivessem as mesmas funcionando em escala real. Para a criação desse cenário hipotético de lançamento, foram considerados que a vazão média do efluente corresponde à  $600 \text{ L.s}^{-1}$  (vazão média do efluente da ETE Monjolinho, principal ETE do município de São Carlos, SP-Brasil) (SAAE, 2022). A vazão mínima do Córrego do Monjolinho (enquadrado na Classe 3) foi estimada em  $2002 \text{ L.s}^{-1}$

(média das vazões mínimas disponíveis para a Estação fluviométrica n.62768500, estação com dados mais próxima ao lançamento) (ANA, 2022).

#### **4.7.3. Teste da hipótese B**

Primeiramente foi feita a comparação entre os resultados para o controle negativo (sem contaminante e sem solvente) e o controle positivo (cm solvente) por meio do Teste T. Se os resultados fossem estatisticamente similares ( $p > 0,05$ ), a média entre as respostas de ambos controles foi usada para a elaboração dos gráficos e para fazer as comparações com as amostras contaminadas. Caso os controles negativo e positivo fossem estatisticamente diferentes, a elaboração do gráfico e as comparações com as amostras contaminadas seriam feitas usando apenas as respostas para o controle positivo. Nesse caso, o controle negativo serviria apenas para garantir que o lote de indivíduos estão aptos para validar o teste (p.e. imobilidade abaixo de 20%).

Com o objetivo de identificar as concentrações de TBBPA que alteraram o padrão de resposta em comparação com o controle (imobilidade, mortalidade, reprodução, crescimento) foram aplicados os testes *One-Way* ANOVA e o teste à *posteriori* Tukey's quando os dados seguiam distribuição normal. Caso contrário, de não normalidade, foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e o teste à *posteriori* Dunn's.

Para avaliar e comparar a sensibilidade dos organismos ao TBBPA, foi produzido uma curva de Distribuição de Sensibilidade das Espécies (SSD). A partir da curva SSD, foi determinado a concentração HC<sub>50</sub>, que corresponde à concentração de TBBPA com potencial de causar efeito em 50% da população das espécies aquáticas estudadas. Essa análise foi realizada no *software online SSDtools* (SEB-DALGARNO, 2018). Outras espécies aquáticas recuperadas durante o desenvolvimento dessa pesquisa também foram incluídas na curva SSD (Tabela 3.3).

Por fim, foi calculado o coeficiente de risco (CR) de maneira similar à Gosset *et al.* (2021), seguindo as Equações 7 e 8:

$$CENO = \frac{CE_{50}}{FA} \text{ ou } \frac{CE_{10}}{FA}$$

Equação 7



Sendo, CENO a maior concentração de efeito não observado, CE<sub>50</sub> a concentração da substância que induziu efeito em 50% dos organismos (bioensaio de toxicidade aguda), CE<sub>10</sub> a concentração da substância que induziu efeito em 10% dos organismos (bioensaio de toxicidade crônica), e FA o fator de avaliação (igual a 1000 e 100 para testes de toxicidade aguda e crônica, respectivamente) (ECHA, 2003).

$$CR = \frac{CMA}{PNEC}$$

Equação 8

Sendo, CMA a concentração máxima de TBBPA mensurada em corpos hídricos de água doce; A classificação de risco ecotoxicológico segundo GOSSET *et al.* (2021) é: Sem risco (CR < 0.1); Risco insignificante (0.1 < CR < 1); Baixo risco (1 < CR < 10); Médio risco (10 < CR < 100); Alto risco (CR > 100).



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

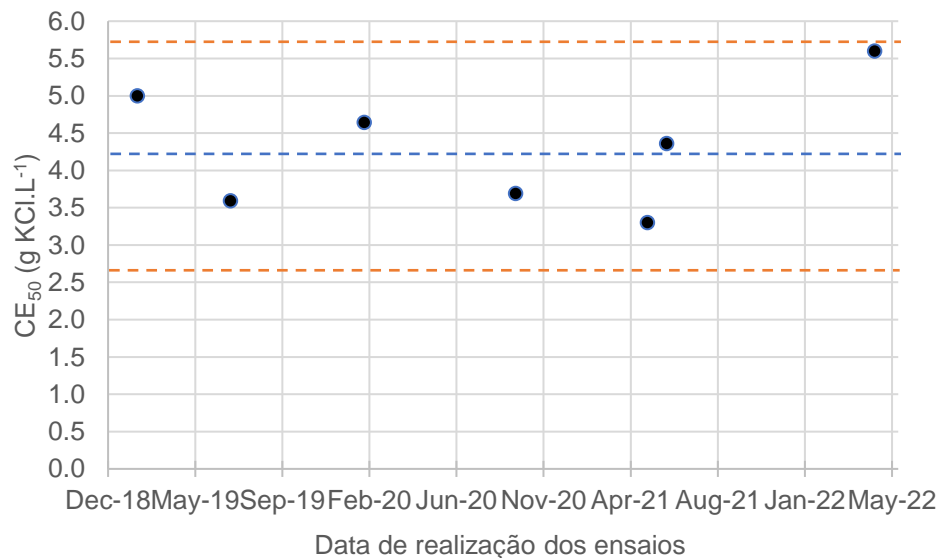
### 5.1. Teste de sensibilidade

Os resultados dos testes de sensibilidade com as espécies estavam dentro dos limites máximos e mínimos definidos na carta-controlé do laboratório (2019 a 2022), validando o uso dos indivíduos nos testes ecotoxicológicos.

#### 5.1.1. *Allonais inaequalis*

Para *A. inaequalis* os resultados de concentração de efeito (96h-CE<sub>50</sub>) para as exposições ao KCl variaram entre 3,30 e 5,60 g.L<sup>-1</sup>, com valor médio de 4,26 g.L<sup>-1</sup> (Figura 5.1), valor médio próximo ao determinado por Corbi *et al.* (2015) e Castro *et al.* (2020b) de 3,50 e 3,70 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Figura 5.1 – Carta-controlé para *Allonais inaequalis* contendo os valores de concentração de efeito (imobilidade) em 50% dos indivíduos após teste de sensibilidade (4 d) com cloreto de potássio (KCl), limite superior (+ 2 DP) e limite inferior (-2 DP).

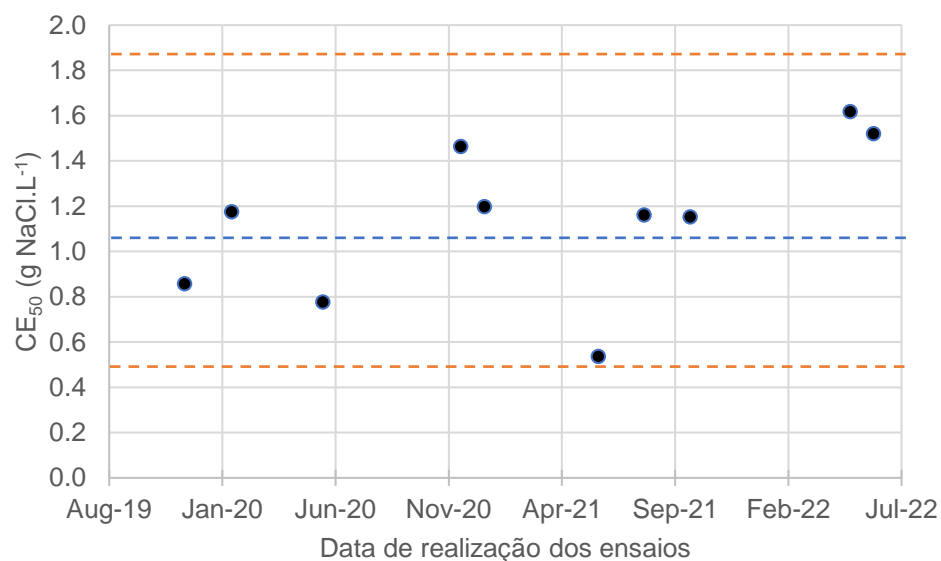


Fonte: Autoria própria (2022).

### 5.1.2. *Ceriodaphnia silvestrii*

Para *C. silvestrii* os resultados de concentração de efeito (48h-CE<sub>50</sub>) para as exposições ao NaCl variaram entre 0,54 e 1,62 g.L<sup>-1</sup>, com CE<sub>50</sub> médio de 1,15 g.L<sup>-1</sup> (Figura 5.2). A faixa de sensibilidade se encontra dentro da faixa encontrada por outros autores: da Costa *et al.* (2014) de 0,77 a 1,79 g.L<sup>-1</sup> e Leite *et al.* (2022) 1,35 ± 0,23 g.L<sup>-1</sup>.

Figura 5.2 – Carta-controle para *Ceriodaphnia silvestrii* contendo os valores de concentração de efeito (imobilidade) em 50% dos indivíduos após teste de sensibilidade (2 d) com cloreto de sódio (NaCl), limite superior (+ 2 DP) e limite inferior (-2 DP).

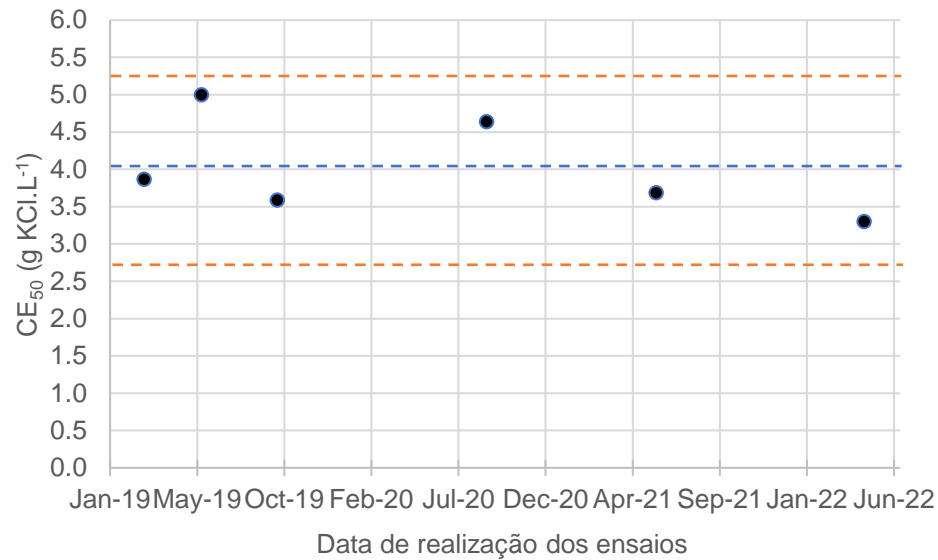


Fonte: Autoria própria (2022).

### 5.1.3. *Chironomus sancticaroli*

Para *C. sancticaroli* os resultados da concentração de efeito (96h-CE<sub>50</sub>) para as exposições ao KCl variaram de 3,30 e 5,00 g.L<sup>-1</sup>, com valor médio de 4,02 g.L<sup>-1</sup> (Figura 5.3). Os resultados estão próximos aos determinados por outros autores: Novelli *et al.* (2012) de 2,6 a 6,3 g.L<sup>-1</sup>, da Costa *et al.* (2014) de 2,38 a 5,51 g.L<sup>-1</sup> e Dornfeld *et al.* (2019) de 4,1 g.L<sup>-1</sup>.

Figura 5.3 – Carta-control para *Chironomus sancticaroli* contendo os valores de concentração de efeito (mortalidade) em 50% dos indivíduos após teste de sensibilidade (4 d) com cloreto de potássio (KCl), limite superior (+ 2 DP) e limite inferior (-2 DP).

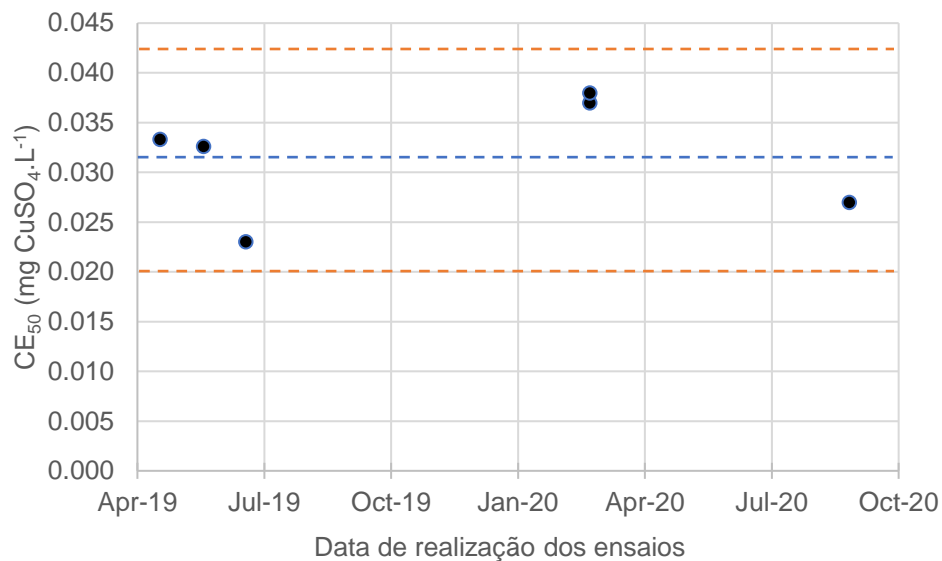


Fonte: Autoria própria (2022).

### 5.1.1. *Daphnia magna*

Para *D. magna* os resultados de concentração de efeito (48h-CE<sub>50</sub>) para as exposições ao CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O oscilaram entre 0,027 e 0,038 mg.L<sup>-1</sup>, com valor médio de 0,031 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 5.4). Os valores de CE<sub>50</sub> encontrados nessa pesquisa estão próximos aos determinados na literatura: 0,045 mg.L<sup>-1</sup> (ARAUCO; CRUZ; MACHADO NETO, 2005); 0,034 mg.L<sup>-1</sup> (BASTOS, 2013) e de 0,03 a 0,06 mg.L<sup>-1</sup> (CASTRO *et al.*, 2020a).

Figura 5.4 – Carta-control para *Daphnia magna* contendo os valores de concentração de efeito (imobilidade) em 50% dos indivíduos após teste de sensibilidade (2 d) com sulfato de cobre penta hidratado ( $\text{CuSO}_4$ ), limite superior (+ 2 DP) e limite inferior (-2 DP).

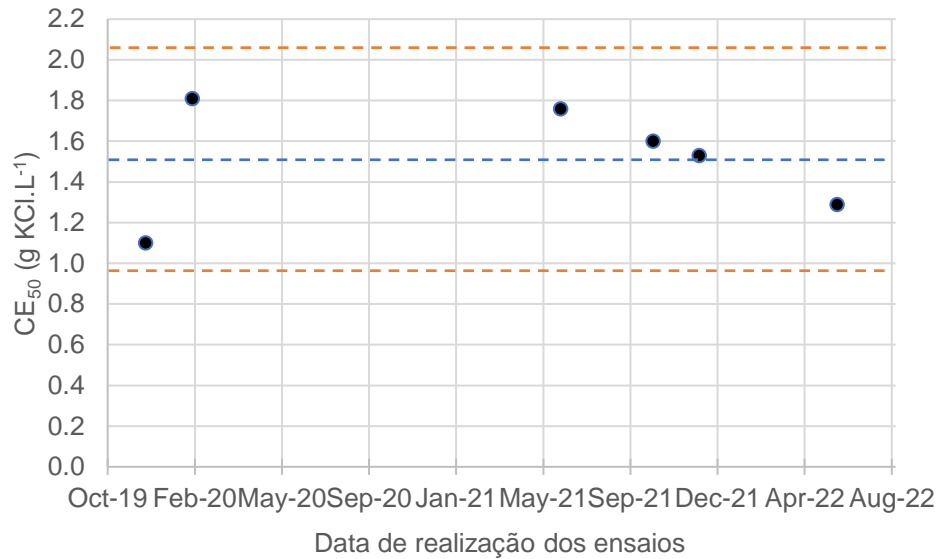


Fonte: Autoria própria (2022).

#### 5.1.4. *Pristina longiseta*

Para *P. longiseta* os resultados (48h- $\text{CE}_{50}$ ) para as exposições ao KCl ficaram entre 1,10 e 1,81  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  (Figura 5.5), com valor médio de 1,52  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , próximo ao calculado por Castro *et al.* (2020c) de 1,76  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Figura 5.5 – Carta-control para *Pristina longiseta* contendo os valores de concentração de efeito (imobilidade) em 50% dos indivíduos após teste de sensibilidade (2 d) com cloreto de potássio (KCl), limite superior (+ 2 DP) e limite inferior (-2 DP).



Fonte: Autoria própria (2022).

## 5.2. Teste da Hipótese A – testes de toxicidade aguda

No teste da Hipótese A avaliou-se a toxicidade de efluente sintético enriquecido com TBBPA antes e após tratamento em reatores biológicos operando em condições acidogênico e metanogênico. Os bioensaios foram aplicados com o intuito de analisar a eficiência dos tratamentos em reduzir os efeitos tóxicos agudos ou crônicos. Os testes ecotoxicológicos foram realizados com efluentes coletados entre abril a maio de 2020 provenientes da primeira fase de operação da Dra. Williane Macêdo, correspondentes aos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM). Os efluentes foram armazenados em frascos de vidro em geladeira a 4°C. Os testes de ecotoxicidade aguda com o afluente dos reatores (efluente sintético enriquecido com 100 µg.L<sup>-1</sup> TBBPA) foram realizados para comparar a eficiência dos reatores em minimizar os impactos do efluente à biota. As atividades laboratoriais referentes aos ensaios ecotoxicológicos necessitaram ser interrompidas em meados de maio 2020 e foram retornadas em agosto de 2021 por conta da pandemia mundial (COVID-19) e conseguinte determinação do período de quarentena por parte do estado de São Paulo e recomendações da USP.

### 5.2.1. Parâmetros físico-químicos dos reatores

Os parâmetros monitorados pela Dra. Williane Macêdo ao longo dos 100 dias de operação para os reatores RA e RM foram cedidos e estão apresentados a seguir. O monitoramento de operação do reator RA mostrou que a remoção do TBBPA variou de 67 a 99% (Tabela 5.1) e a redução de DQO variou de 16,7 a 46,7. O pH do efluente foi de  $5,60 \pm 0,34$ , e foram detectados nos efluentes  $56,35 \pm 40,37 \mu\text{g.L}^{-1}$  de fenóis e  $88,53 \pm 72,86 \text{mg.L}^{-1}$  de ácidos totais.

Tabela 5.1- Relação dos parâmetros químicos mensurados durante os 100 dias de operação do reator acidogênico

	pH aflu	pH eflu	pH leito	TBBPA aflu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	TBBPA eflu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Remoção de TBBPA (%)
<b>Mín</b>	5,90	5,13	5,41	15,70	0,88	67,04
<b>Máx</b>	7,80	6,75	6,75	110,40	13,94	99,20
<b>Média</b>	6,90	5,60	6,00	46,54	4,01	90,89
<b>DP</b>	0,40	0,34	0,32	16,32	2,79	6,10
	DQO aflu ( $\text{mgO}_2 \text{L}^{-1}$ )	DQO eflu ( $\text{mgO}_2 \text{L}^{-1}$ )	Remoção de DQO (%)	Carbo aflu ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Carbo eflu ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Remoção de carbo (%)
<b>Mín</b>	470,00	279,00	16,70	200,00	47,00	58,33
<b>Máx</b>	629,00	480,00	46,75	315,00	100,00	84,13
<b>Média</b>	530,06	378,57	28,49	261,09	69,40	72,96
<b>DP</b>	40,16	42,72	6,92	26,40	15,58	7,48
	Fenóis ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ácido láctico	Ácido fórmico	Ácido acético	Ácido levulínico	Ácido propanoico
<b>Mín</b>	0,00	0,00	4,09	46,18	34,49	0,00
<b>Máx</b>	108,00	169,21	17,58	111,46	76,49	44,18
<b>Média</b>	56,35	64,15	12,06	72,91	56,08	28,26
<b>DP</b>	40,37	39,52	3,14	17,27	11,58	8,89
	Ácido butírico	Ácido isovalérico	Ácido valérico	Ácido isobutírico	Ácidos Totais ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
<b>Mín</b>	14,44	0,00	0,00	0,00	0,00	
<b>Máx</b>	52,91	42,52	107,69	29,61	217,30	
<b>Média</b>	27,60	17,24	21,53	10,73	88,53	
<b>DP</b>	11,50	15,51	29,18	7,05	72,86	

Fonte: Dados cedidos por Williane V. Macêdo. aflu = afluente, eflu = efluente, DQO= demanda química de oxigênio, carbo = carboidratos, , mín = mínimo, máx=máximo, DP = desvio padrão.



Já o monitoramento da operação do efluente do reator metanogênico (eflu RM) mostrou que a remoção do TBBPA variou de 92 a 99% (Tabela 5.2) e a remoção de DQO oscilou de 30 a 94%. O pH do efluente foi em média de  $7,94 \pm 0,12$ , e foram detectados  $9,56 \pm 11,57 \mu\text{g.L}^{-1}$  de fenóis e  $13,81 \pm 13,69 \text{mg.L}^{-1}$  de ácidos totais.

Tabela 5.2- Relação dos parâmetros químicos mensurados durante os 100 dias de operação do reator metanogênico

	pH aflu	pH eflu	pH leite	TBBPA aflu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	TBBPA eflu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Remoção de TBBPA (%)	Fenóis ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
<b>Mín</b>	7,75	6,75	6,75	70,11	0,64	92,86	1,33
<b>Máx</b>	8,26	7,53	6,95	118,86	6,53	99,17	44,67
<b>Média</b>	7,94	6,90	6,89	90,53	2,33	97,37	9,56
<b>DP</b>	0,12	0,15	0,04	19,22	1,54	1,72	11,57
	DQO Aflu ( $\text{mgO}_2 \text{L}^{-1}$ )	DQO Eflu ( $\text{mgO}_2 \text{L}^{-1}$ )	Remoção de DQO (%)	Ácido fórmico ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Ácido acético ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Ácido propanoico ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Ácidos Totais ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<b>Mín</b>	480,00	27,10	30,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Máx</b>	607,00	326,00	94,63	33,91	48,93	10,85	48,93
<b>Média</b>	531,61	62,53	86,39	3,88	9,47	0,45	13,81
<b>DP</b>	29,12	59,07	15,50	7,41	11,92	2,21	13,69

Fonte: Dados cedidos por Williane V. Macêdo. Sendo, aflu = afluente, eflu = efluente, DQO= demanda química de oxigênio, mín = mínimo, máx=máximo, DP = desvio padrão.

Os resultados da degradação de TBBPA foram satisfatórios nos dois tratamentos e segundo descrito por Macêdo; Duarte Oliveira; Zaiat (2021), essa biodegradação ocorre durante a acidogênese e se correlaciona com a produção de ácido acético e remoção de carboidratos. Para verificar a conformidade dos efluentes com a Resolução CONAMA n. 430 (2011), foi feita a conversão da DQO para DBO usando o fator 2,05, que corresponde ao valor médio do intervalo da relação DQO/DBO comumente encontrado para águas residuárias de origem doméstica (relação DQO/DBO entre 1,7 e 2,4) (VON SPERLING, 2014). Então, a DBO média estimada do efluente do reator acidogênico (eflu RA) foi  $185,57 \text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$  e do eflu RM foi  $30,65 \text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$ . Conforme esperado, o RA não atingiu eficiência mínima de remoção de DBO, já que sistemas de tratamento acidogênico

servem principalmente para a redução da concentração de contaminantes e estão sempre acompanhados por uma etapa complementar de tratamento (Tabela 5.3).

Tabela 5.3– Avaliação da conformidade dos efluentes do reator acidogênico (RA) e metanogênico (RM) de acordo com as diretrizes da Resolução CONAMA 430/2011 para o lançamento de efluentes em corpos hídricos Classe 3.

	Condição de lançamento	Eflu RA	Eflu RM
<b>pH</b>	5 – 9	Em conformidade	Em conformidade
<b>Materiais flutuantes</b>	Ausente	Em conformidade	Em conformidade
<b>Remoção de DBO</b>	Mínima de 60%	Não conformidade	Em conformidade
<b>DBO máxima*</b>	120 mg.L <sup>-1</sup>	Não conformidade	Em conformidade
<b>Fenóis totais</b>	0,5 mg.L <sup>-1</sup>	Em conformidade	Em conformidade
<b>Resolução CONAMA 430/2011</b>		Não conformidade	Em conformidade

Fonte: Autoria própria (2022). \*apesar de ser permitido DBO acima do limite de 120 mg.L<sup>-1</sup>, esse limite só pode ser ultrapassado quando houver eficiência mínima de 60%.

Para avaliar se as análises químicas e físicas dos reatores podem prever o impacto ambiental da liberação desses efluentes no meio ambiente, foram realizados os testes de ecotoxicidade. A aplicação de testes de ecotoxicidade aguda e crônica (itens 5.2.2 e 5.2.3) no monitoramento dos tratamentos de efluente doméstico permite avaliar se o efluente tratado possui ou não potencial de efeito nocivo à biota aquática.

### 5.2.2. Teste de toxicidade aguda

Os resultados das medições dos parâmetros do afluente, efluente RA, efluente RM e suas diluições estão apresentados no Apêndice G, Tabelas S.2, S.3 e S.4 respectivamente. A temperatura dos ensaios se manteve na faixa de 22,5 a 25°C para todas as espécies de ambiente tropical e de 18,5 a 20°C para *D. magna*. No controle o pH variou de 6,9 a 7,6, a condutividade elétrica (CE) variou de 37 a 58  $\mu\text{s.cm}^{-1}$  para as espécies *A. inaequalis*, *C. sancticaroli* e *P. longiseta* (água filtrada), variou de 151 a 158  $\mu\text{s.cm}^{-1}$  para *C. silvestrii* (água reconstituída) e foi de 620  $\mu\text{s.cm}^{-1}$  para *D. magna* (água reconstituída). O oxigênio dissolvido (OD) no controle se manteve acima de 4,6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. Para o aflu o pH variou de 6,2 a 8,2; CE variou de 47 a 1196  $\mu\text{s.cm}^{-1}$  e o OD variou de 1 a 4,7 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. Para o eflu RA o pH variou de 5,6 a 7,7; CE variou de 108 a 1803  $\mu\text{s.cm}^{-1}$  e o OD variou de 1,1 a 6,8 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. Para o eflu RM o pH variou de 6,2 a 8,3; CE variou de 131 a 1683  $\mu\text{s.cm}^{-1}$  e o OD variou de 2,8 a 6,8 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.

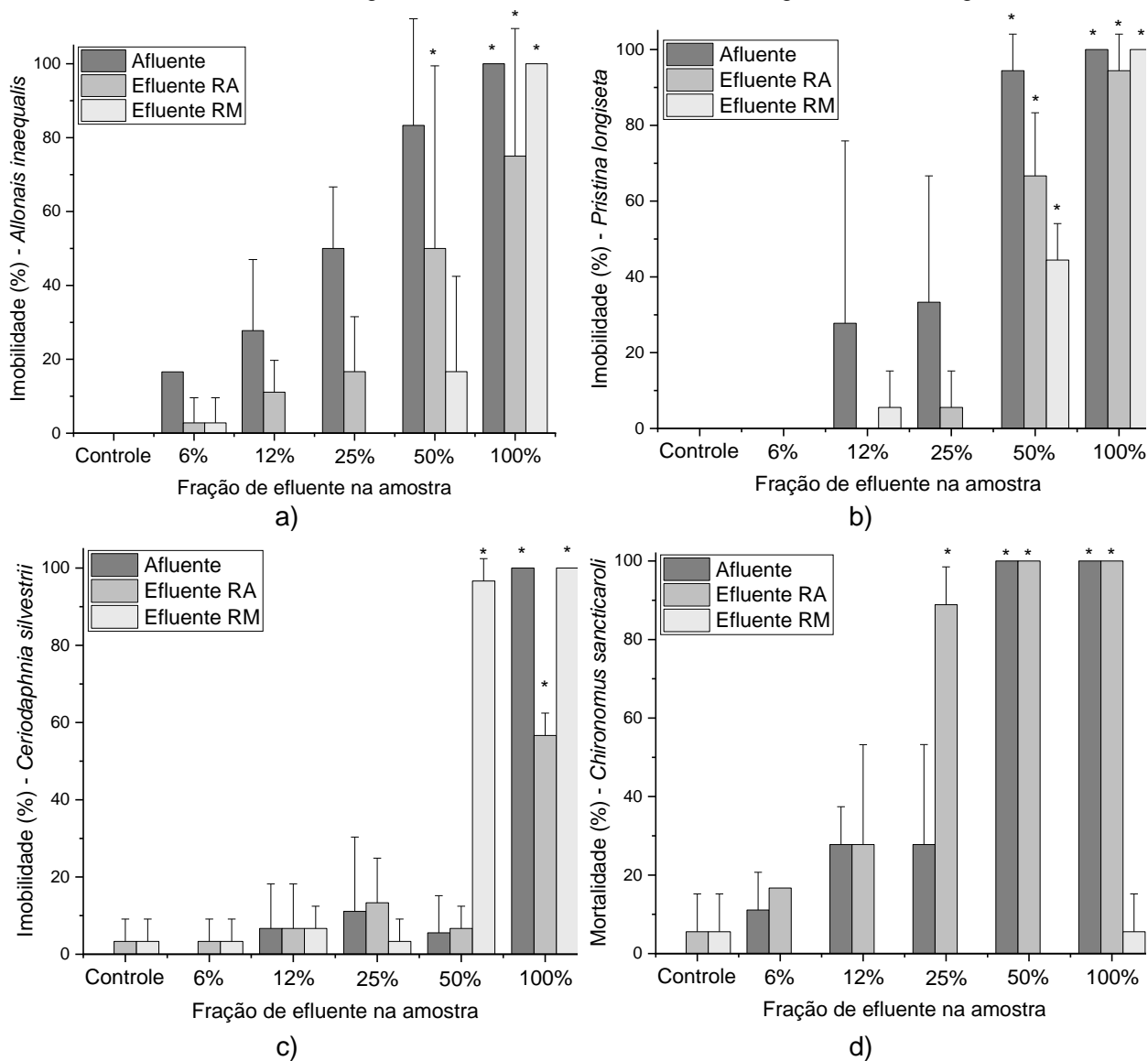
Quando exposto ao afluente (afllu) dos reatores, o oligoqueta *A. inaequalis* apresentou imobilidade acima de 40% e 80% na fração de amostra de 25% e 50% respectivamente (Figura 5.6.a), sendo observada uma redução na imobilidade nas réplicas expostas aos efluentes (eflu RA e eflu RM). Tanto o afluente bruto quanto os efluentes brutos dos reatores resultaram em elevada toxicidade (100% de imobilidade quando expostos ao afllu e eflu RM e 75% quando exposto ao eflu RA). Como as respostas ecotoxicológicas de *A. inaequalis* apresentaram elevado desvio padrão para os testes com as amostras dos reatores, estes testes foram repetidos, porém continuaram apresentando elevado desvio padrão para as amostras de efluentes enquanto os resultados no controle foram dentro do esperado. Para *P. longiseta* o afluente causou imobilidade acima de 20% nas frações 12 e 25% e acima de 80% nas frações de 50 e 100% (Figura 5.6.b), por outro lado nos efluentes RA e RM a imobilidade foi abaixo de 80% e 60% na fração 50% respectivamente.

Para o crustáceo *C. silvestrii*, o afluente bruto causou 100% de imobilidade, enquanto nas diluições a imobilidade foi abaixo de 20%. O eflu RM foi mais tóxico que o afllu na fração de 50% (imobilidade acima de 90% comparado com abaixo de 10% no afllu), enquanto o efluente RA causou toxicidade abaixo de 60% na fração 100% (Figura 5.6.c). Por outro lado, o efluente RA se mostrou mais tóxico ou igualmente tóxico quando comparado ao afluente para o inseto *C. sancticaroli*, com mortalidade acima de 80% na fração 25% e 100% nas frações 50% e 100% (Figura 5.6.d). O eflu RM não causou toxicidade aguda para a população de *C. sancticaroli*. Similarmente, o eflu RM não causou imobilidade em *D. magna* em nenhuma das frações usadas, enquanto o eflu RA resultou em imobilidade acima de 70% e 100% nas frações de 50% e 100% respectivamente (Figura 5.6.e). Os testes de ecotoxicidade aguda com o afluente não foi realizado com a espécie *D. magna* pois após o retorno ao Brasil em maio de 2022 e pós pandemia COVID-19 os cultivos dessas espécies não estavam mais sendo mantidos no laboratório.

De maneira geral os tratamentos foram capazes de reduzir a toxicidade do afluente em diluições de até 50% com exceção do eflu RM para *C. silvestrii* (fração 50%) e do eflu RA para *C. sancticaroli* (frações 25% e 50%). O efluente RA bruto (100%) foi menos

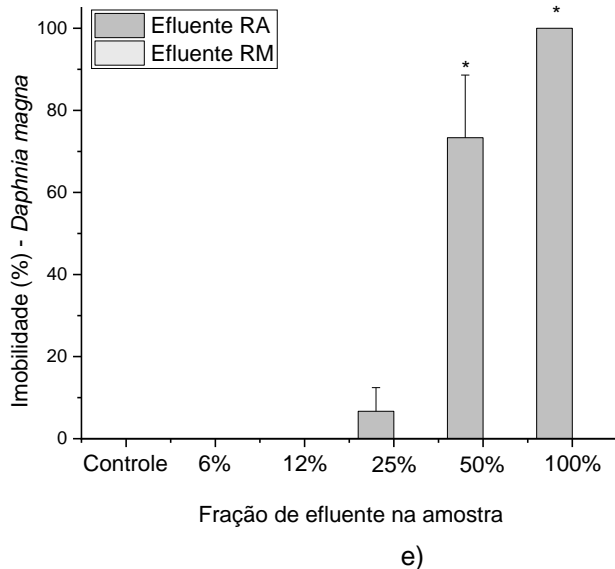
tóxico que o aflu e o eflu RM para *A. inaequalis*, *P. longiseta* e *C. silvestrii*, enquanto o eflu RM foi menos tóxico que o aflu e o eflu RA para *C. sancticaroli*.

Figura 5.6 - Mortalidade e imobilidade dos organismos a) *Allonais inaequalis*, b) *Pristina longiseta*, c) *Ceriodaphnia silvestrii* e, d) *Chironomus sancticaroli* após teste de ecotoxicidade aguda com afluente e efluentes do reator acidogênico e metanogênico. Imobilidade dos organismos e) *Daphnia magna* após teste de ecotoxicidade aguda com os efluentes do reator acidogênico e metanogênico.



Continua

Continuação Figura 5.6.



Fonte: Autoria própria (2022). \* representa as diluições que se apresentaram estatisticamente diferente do controle (interação dos fatores, *Two-Way* ANOVA, Tabela 5.1 f-i). Os testes de ecotoxicidade aguda com o efluente e a espécie *D. magna* não foram realizados devido à perda do cultivo em decorrência às restrições da pandemia de COVID-19.

Os resultados do teste *Two-Way* ANOVA corroboram com a discussão descritiva dos dados. Para todas espécies, pelo menos uma fração de diluição (Fator A) usada influenciou na imobilidade ou mortalidade dos indivíduos (Tabela 5.4.a). O tipo de tratamento (Fator B) também mostrou influenciar na resposta dos indivíduos, com exceção de *A. inaequalis* (p-valor de 0,1826) (Tabela 5.4.b). Por último, a interação entre os fatores diluição e tipo de tratamento (sem tratamento, tratado no RA e tratado no RM) influenciou a resposta ecotoxicológica em todas as espécies com exceção de *P. longiseta* (p-valor de 0,1321) (Tabela 5.4.c). Duas das cinco espécies tiveram respostas estatisticamente diferentes de imobilidade e mortalidade entre o aflu e eflu RA (*P. longiseta* e *C. sancticaroli*) (Tabela 5.4.e), sendo que para *P. longiseta* uma queda na imobilidade foi observada no eflu RA e para *C. sancticaroli* um aumento na mortalidade foi observado no eflu RA. Com relação à comparação entre aflu e eflu RM, três espécies (*P. longiseta*, *C. silvestrii* e *C. sancticaroli*) mostraram diferenças estatisticamente significativas nas respostas ecotoxicológicas (Tabela 5.4.f) e, dentre elas, apenas para *C. silvestrii* houve um aumento da imobilidade no eflu RM. Importante observar que as diferenças estatísticas entre os eflu RA e RM (Tabela 5.4.g) ocorreram em espécies onde

um desses tratamentos aumentou significativamente a imobilidade ou mortalidade enquanto o outro tratamento diminuiu significativamente essa resposta ecotoxicológica.

Tabela 5.4 - Valores de p-valor obtidos pelo teste *Two-Way* ANOVA e Tukey correspondente à comparação das respostas de imobilidade ou mortalidade de *Allonais inaequalis*, *Pristina longiseta*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli* e *Daphnia magna* entre as diluições testadas e o controle (Fator A), entre os tratamentos (sem tratamento -afllu, efluente do reator acidogênico – eflu RA e efluente do reator metanogênico -eflu RM) (Fator B) e a interação dos fatores A e B após bioensaio de toxicidade aguda. Nível de significância de 95%.

	<b>A.</b> <i>inaequalis</i>	<b>P.</b> <i>longiseta</i>	<b>C.</b> <i>silvestrii</i>	<i>D. magna</i>	<b>C.</b> <i>Sancticaroli</i>
a) <b>Fator A (Diluições)</b>	<b>1,39 10<sup>-20</sup></b>	<b>3,58 10<sup>-17</sup></b>	<b>4,36 10<sup>-23</sup></b>	<b>9,04 10<sup>-17</sup></b>	<b>1,27 10<sup>-17</sup></b>
b) <b>Fator B (tipo de tratamento)</b>	0,1826	<b>0,0028</b>	<b>1,23 10<sup>-8</sup></b>	<b>5,12 10<sup>-16</sup></b>	<b>6,62 10<sup>-18</sup></b>
c) <b>Interação entre Fator A e B</b>	<b>0,0494</b>	0,1321	<b>2,41 10<sup>-13</sup></b>	<b>9,04 10<sup>-17</sup></b>	<b>1,90 10<sup>-12</sup></b>
d) <b>Diluições diferentes do controle</b>	50% (4,82 10 <sup>-5</sup> ), 100% (0)	50% (3,05 10 <sup>-10</sup> ), 100% (0)	50% (1,44 10 <sup>-9</sup> ), 100% (0)	50% (1,57 10 <sup>-11</sup> ), 100% (3,29 10 <sup>-14</sup> )	12% (0,0413), 25% (1,69 10 <sup>-7</sup> ), 50% e 100% (0)
e) <b>Relação entre afllu e eflu RA</b>	0,7743	<b>0,0161</b>	0,1097	*	<b>0,003</b>
f) <b>Relação entre afllu e eflu RM</b>	0,1787	<b>0,0038</b>	<b>7,04 10<sup>-6</sup></b>	*	<b>0</b>
g) <b>Relação entre eflu RA e eflu RM</b>	0,3877	0,8483	<b>1,31 10<sup>-8</sup></b>	<b>1,46 10<sup>-14</sup></b>	<b>0</b>
h) <b>Diluições de afllu diferentes do controle</b>	100% (7,98 10 <sup>-5</sup> )	50% (3,33 10 <sup>-7</sup> ), 100% (9,02 10 <sup>-8</sup> )	100% (0)	*	50% (1,80 10 <sup>-12</sup> ), 100% (1,80 10 <sup>-12</sup> )
i) <b>Diluições de eflu RA diferentes do controle</b>	50% (0,0015), 100% (2,31 10 <sup>-7</sup> )	50% (0,0002), 100% (3,33 10 <sup>-7</sup> )	100% (7,22 10 <sup>-8</sup> )	50% (3,24 10 <sup>-14</sup> ), 100% (1,42 10 <sup>-14</sup> )	25% (3,42 10 <sup>-10</sup> ), 50% (1,04 10 <sup>-11</sup> ), 100% (1,04 10 <sup>-11</sup> )
j) <b>Diluições de eflu RM diferentes do controle</b>	100% (0)	50% (0,0404), 100% (9,02 10 <sup>-8</sup> )	50% (0) e 100% (0)	-	-

Fonte: Autoria própria (2022). Em negrito p-valores estatisticamente significativos. \*não há resultados de exposição ao afllu para *D. magna* devido à perda do cultivo em decorrência às restrições da pandemia de COVID-19.

As concentrações de efeito de imobilidade ou mortalidade em 50% dos indivíduos (CE<sub>50</sub>) (Tabela 5.5) variaram entre 55,6% (*C. silvestrii*) e 26,5% (*P. longiseta*) para o afllu; de 93,39% (*C. silvestrii*) a 15,4% (*C. sancticaroli*) para o eflu RA e de 58,85% (*A. inaequalis*) a 35,3% (*C. silvestrii*) para o eflu RM. Não foi possível calcular CE<sub>10/50</sub> para *C. sancticaroli* e *D. magna* quando expostos ao eflu RM devido à baixa mortalidade ou

imobilidade mesmo no efluentes brutos. O CE<sub>10</sub> do eflu RM mostra que para *A. inaequalis* e *P. longisetata* é necessária uma presença acima de 40% de efluente para causar toxicidade em 10% dos indivíduos enquanto para o eflu RA 15% e 27% de efluente já causou o mesmo efeito.

Tabela 5.5 - Valores de concentrações de efeito (CE) expressas em fração de efluente (afluente ao reator- afllu, efluente do reator acidogênico - RA e efluente do reator metanogênico - RM) que causou efeito (imobilidade ou mortalidade) em 50 e 10% dos indivíduos (CE<sub>50</sub>, CE<sub>10</sub>) para *Allonais inaequalis*, *Pristina longisetata*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli* e *Daphnia magna*. Nível de significância de 95%.

		<b>A.</b>	<b>P.</b>	<b>C.</b>	<b>C.</b>	<b>D.</b>
		<i>inaequalis</i>	<i>longisetata</i>	<i>silvestrii</i>	<i>Sancticaroli</i>	<i>magna</i>
<b>Afluente</b>	<b>CE<sub>50</sub> (%)</b>	45,51	26,55	55,61	29,12	n.r.
	<b>CE<sub>10</sub> (%)</b>	13,06	10,53	51,20	23,33	n.r.
<b>Efluente RA</b>	<b>CE<sub>50</sub> (%)</b>	52,67	43,49	93,39*	15,44	41,28
	<b>CE<sub>10</sub> (%)</b>	15,32	27,46	51,31	8,54	27,28
<b>Efluente RM</b>	<b>CE<sub>50</sub> (%)</b>	58,85	51,16	35,35	n.a.	n.a.
	<b>CE<sub>10</sub> (%)</b>	48,36	40,76	28,19	n.a.	n.a.

Fonte: Autoria própria (2022). n.r. = testes não realizados com a amostra, n.a = não se aplica devido à ausência de toxicidade, \*limite superior acima de 100%.

Para avaliar quantitativamente como os tratamento nos RA e RM alteraram a toxicidade aguda (imobilidade ou mortalidade), foram calculadas a redução ou aumento de toxicidade comparando as CE<sub>50</sub> após o tratamento (eflu RA e eflu RM) com as de antes do tratamento (afllu) (Tabela 5.6). O reator RA foi capaz de reduzir a toxicidade para três das quatro espécies, chegando a 40% de redução para *C. silvestrii*. Por outro lado, houve um aumento de 88% na toxicidade para *C. sancticaroli*. Da mesma forma, o reator RM reduziu a toxicidade para três das quatro espécies e aumentou a toxicidade para *C. silvestrii*. As menores reduções de toxicidade ocorreram para a oligoqueta *A. inaequalis* (- 13,6% e - 22,7% para os efluentes RA e RM respectivamente). O aumento da toxicidade do efluente pode estar relacionado com a formação de subprodutos dos quais afetam distintamente cada uma das espécies avaliadas, descrevendo assim espécies mais sensíveis ou mais resistentes ao tratamento utilizado (DA COSTA *et al.*, 2014; LEITE *et al.*, 2022).

Tabela 5.6 - Valores de redução (-) ou aumento (+) de toxicidade entre o afluente (afllu) e os efluentes dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM), baseados na Unidade Tóxica (UT) para *Allonais inaequalis*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli* e *Pristina longiseta*.

Espécie	Afluente		Efluente RA		Efluente RM	
	UT	UT	Redução ou Aumento (%)	UT	Redução ou Aumento (%)	UT
<i>A. inaequalis</i>	2,20	1,90	- 13,64	1,70	- 22,72	
<i>C. silvestrii</i>	1,79	1,07	- 40,22	2,83	+ 58,10	
<i>C. sancticaroli</i>	3,43	6,48	+ 88,92	n.a.	- 100*	
<i>P. longiseta</i>	3,77	2,30	- 38,99	1,95	- 48,27	
<b>UT médio</b>	<b>3,05</b>	<b>2,93</b>		<b>1,62</b>		

Fonte: Autoria própria (2022). n.a. não aplicável; \*como não houve mortalidade para *C. sancticaroli* no efluente RM foi considerado 100% de redução de toxicidade.

A partir da avaliação quantitativa da toxicidade do afluente e efluentes RA e RM conclui-se que, de maneira geral, houve redução na toxicidade independente do tratamento empregado. Entretanto é imprescindível avaliar se essas reduções são suficientes para o lançamento em corpos hídricos, e com esse objetivo, foram aplicadas as equações sugeridas pelas normativas conforme apresentado no item 4.7.2. Para estimar a D.E.R. (Equação 4) foram considerados que a vazão média do efluente do município de São Carlos é de  $600 \text{ L.s}^{-1}$  (SAAE, 2022). Os dados para a vazão mínima foram obtidos pelo Sistema Nacional de Informações de Recursos Hídricos (SNIRH) para o rio Ribeirão Monjolinho, localizado dentro da sub-bacia 62 (Rios Paraná, Tietê e outros) na Bacia Hidrográfica 6 (Rio Paraná). A Estação Fluviométrica sob código 62768500 e nome Sítio do Swami era localizada no Município de São Carlos, São Paulo, Brasil e operada pela Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA). Os dados de vazão mínima recuperados no sistema vão até o ano de 1991 e a vazão mínima média calculada para o cenário de lançamento de efluente no Córrego do Monjolinho (Classe 3) foi de  $2002 \text{ L.s}^{-1}$  (ANA, 2022).

$$D.E.R = \frac{600 (\text{L.s}^{-1})}{600 (\text{L.s}^{-1}) + 2002 (\text{L.s}^{-1})} * 100 = 23,06\% \text{ (Eq. 4)}$$

Portanto, o valor estimado da diluição do efluente no corpo receptor (D.E.R.) é de aproximadamente 23%. Segundo a normativa do Estado de São Paulo (Eq. 5) a D.E.R deve ser  $\leq CE_{50}/100$ , e, para nenhuma das espécies estudadas, os efluentes estariam em conformidade, mesmo no melhor cenário de tratamento (p.e.  $CE_{50} 94\%/100 = 0,94\% < D.E.R.$ ) (Tabela 5.7). Já aplicando a normativa Federal (Eq. 6), apenas para *C. silvestrii*



o eflu RA poderia ser lançado em rio Classe 3 e apenas para *C. sancticaroli* e *D. magna* o eflu RM poderia ser lançado em rio Classe 3 (Tabela 5.7). Para as demais espécies não seria permitido o lançamento em rio Classe 3 pela Resolução CONAMA n. 430 (CONAMA, 2011).

Tabela 5.7– Relação entre concentração de efeito ( $CE_{50}$ ) e fatores de segurança para assegurar ausência de toxicidade aguda para *Allonais inaequalis*, *Pristina longiseta*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Chironomus sancticaroli* e *Daphnia magna*. O fator de segurança na Eq. 5 equivale a 100 enquanto na Eq. 6 equivale a 3.

	Fórmula aplicada	A. <i>inaequalis</i>	P. <i>longiseta</i>	C. <i>silvestrii</i>	C. <i>sancticaroli</i>	D. <i>magna</i>
Afluente	Eq. 5	0,45	0,26	0,55	0,29	n.a.
	Eq. 6	15,17	8,85	18,5	9,71	n.a.
Efluente RA	Eq. 5	0,52	0,43	0,93	0,15	0,41
	Eq. 6	17,56	14,49	31,12	5,15	13,76
Efluente RM	Eq. 5	0,58	0,51	0,35	1 *	1*
	Eq. 6	19,62	17,05	11,78	33,33*	33,33*

Fonte: Autoria própria (2022). n.a. = não aplicável \* $CE_{50}$  considerado como 100% pois não houve toxicidade.

### 5.2.3. Teste de toxicidade crônica

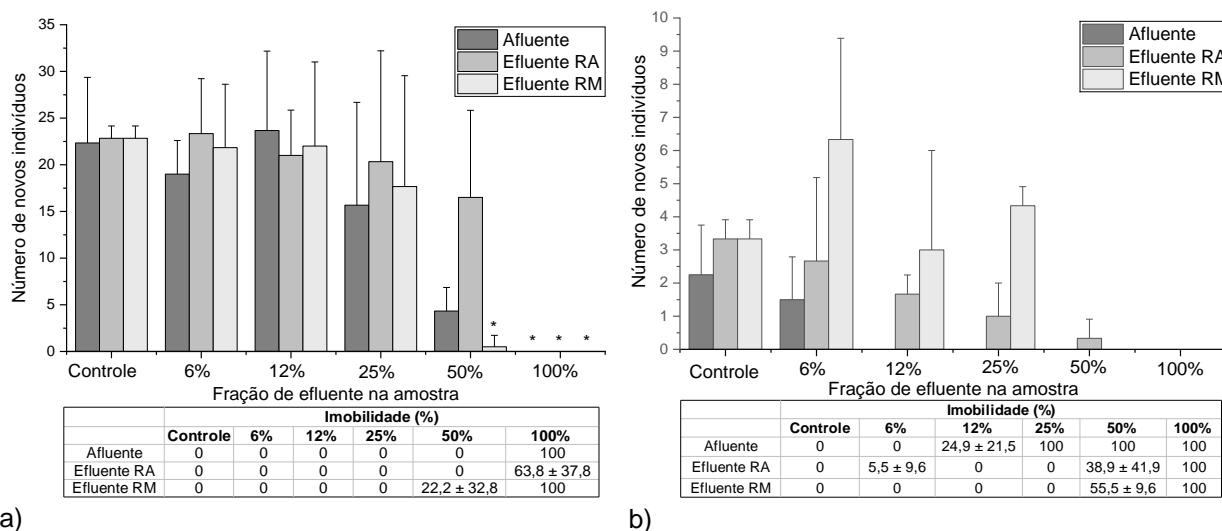
Os resultados das medições dos parâmetros do afluente, efluente RA, efluente RM e suas diluições estão apresentados no Apêndice H, Tabelas S.5, S.6 e S.7 respectivamente. No controle, o pH variou de 6,7 a 8,1, a condutividade elétrica (CE) variou de 42 a 92  $\mu\text{s}.\text{cm}^{-1}$  para as espécies *A. inaequalis*, *C. sancticaroli* e *P. longiseta* (água filtrada) e foi de 190  $\mu\text{s}.\text{cm}^{-1}$  para *C. silvestrii* (água reconstituída). O oxigênio dissolvido (OD) no controle se manteve acima de 4,2. Para o aflu o pH variou de 6,2 a 8,4; CE variou de 82 a 630  $\mu\text{s}.\text{cm}^{-1}$  Para o eflu RA o pH variou de 6,7 a 7,9; CE variou de 108 a 1759  $\mu\text{s}.\text{cm}^{-1}$  e o OD variou de 2,1 a 5,7  $\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$ . Para o eflu RM o pH variou de 6,7 a 8,8; CE variou de 133 a 1754  $\mu\text{s}.\text{cm}^{-1}$  e o OD variou de 3,2 a 5,7  $\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$ .

#### 5.2.3.1. *Allonais inaequalis* e *Pristina longiseta*

O número médio de novos indivíduos para *A. inaequalis* após 10 dias de exposição foi acima de 15 organismos para o aflu, eflu RA e eflu RM no controle e frações 6, 12 e

25%. Na fração de 50% do aflu não foi observada imobilidade, porém uma redução na reprodução (número médio de novos indivíduos abaixo de 2). Uma queda na reprodução também foi constatado para o eflu RM na fração de 50%, que apresentou imobilidade de  $22,2 \pm 32,8\%$ . Foi observado 100% de imobilidade para o aflu 100% e eflu RM100% e imobilidade de  $63,8 \pm 37,8\%$  para o eflu RA. Apesar do menor período de exposição (7 d), o aflu na fração de 12% causou  $24,9 \pm 21,5\%$  de imobilidade e 100% de inibição na reprodução de *P. longiseta*. Os efluentes RA e RM reduziram os efeitos na imobilidade e reprodução da espécie, sendo observada imobilidade apenas nas frações de 50 e 100%. A reprodução durante a exposição ao eflu RM foi superior ao aflu e eflu RA nas frações 6%, 12% e 25%.

Figura 5.7 –Número de novos organismos e imobilidade (%) para a) *Allonais inaequalis* (exposição de 10 d), b) *Pristina longiseta* (exposição de 4 d) após teste de ecotoxicidade crônica com afluente e efluentes do reator acidogênico (RA) e metanogênico (RM).



Fonte: Autoria própria (2022). \* representa as diluições que se apresentaram estatisticamente diferente do controle (interação dos fatores, *Two-Way ANOVA*, Tabela 5.1 g-j).

Os valores da estatística obtidos para o fator A (diluições) no teste *Two-Way ANOVA* influenciaram na reprodução de *A. inaequalis* e *P. longiseta* ( $p < 0,05$ , Tabela 5.8.a). O teste *posteriori* de Tukey apontou que as diluições 50% e 100% são estatisticamente diferentes do controle para ambas as espécies (Tabela 5.8.d). Por outro lado, apenas para *P. longiseta* o tipo de solução-teste influenciou na reprodução (Tabela 5.8.b), sendo todas as comparações (aflu e eflu RA, aflu e eflu RM e eflu RA e eflu RM)

diferentes estatisticamente entre si (Tabela 5.8.e-g), com um aumento do número de novos indivíduos no eflu RM. Apesar do indicativo de diferença estatística considerando ambos fatores para *P. longiseta* (Tabela 5.8.c), no teste *posteriori* de Tukey essas diferenças foram observadas nas comparações entre as diluições e não entre as diluições e o controle.

Tabela 5.8 - Valores de p-valor obtidos pelo teste *Two-Way* ANOVA e Tukey correspondente à comparação das respostas de reprodução de *Allonais inaequalis* e *Pristina longiseta* entre as diluições testadas e o controle (Fator A), entre as soluções-teste (afluente - afllu, efluente do reator acidogênico – eflu RA e efluente do reator metanogênico -eflu RM) e a interação dos fatores A e B após bioensaio de toxicidade crônica. Nível de significância de 95%.

	<i>A. inaequalis</i>	<i>P. longiseta</i>
a) Fator A (Diluições)	6,28 10 <sup>-16</sup>	3,30 10 <sup>-7</sup>
b) Fator B (tipo de solução-teste)	0,0707	7,31 10 <sup>-6</sup>
c) Interação entre Fator A e B	0,1436	0,0098
d) Diluições diferentes do controle	50% (1,86 10 <sup>-6</sup> ), 100% (0)	50% (0,0001), 100% (8,93 10 <sup>-5</sup> )
e) Relação entre afllu e eflu RA	0,126	0,0755
f) Relação entre afllu e eflu RM	0,9577	3,60 10 <sup>-6</sup>
g) Relação entre eflu RA e eflu RM	0,1159	0,0076
h) Diluições do afllu diferentes do controle	100% (0,0399)	-
i) Diluições do eflu RA diferentes do controle	100% (7,46 10 <sup>-6</sup> )	-
j) Diluições do eflu RM diferentes do controle	50% (1,25 10 <sup>-5</sup> ), 100% (7,46 10 <sup>-6</sup> )	-

Fonte: Autoria própria (2022).

Analisando a Tabela 5.9 é interessante observar que para os efluentes RA e RM a fração de eflu necessária para causar efeito na imobilidade dos indivíduos é superior àquela necessária para causar efeito na reprodução, ou seja, mesmo que houvesse indivíduos móveis na amostra, estes não estavam alocando energia para a reprodução. Conforme observado na Tabela 5.9, o eflu RA foi capaz de reduzir a toxicidade do afllu em 41% e 50% para *A. inaequalis* e *P. longiseta* respectivamente. O eflu RM causou um

aumento de toxicidade de 11% quando comparado ao afluente para *A. inaequalis* enquanto para a *P. longiseta* uma redução de 80% de toxicidade foi observada.

Tabela 5.9 – Concentração de efeito na reprodução e mobilidade expressos como CE<sub>50</sub> considerando nível de significância de 95% para *Allonais inaequalis* e *Pristina longiseta* após exposição crônica ao afluente e efluentes dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM).

		<i>A. inaequalis</i>	<i>P. longiseta</i>
Afluente	CE <sub>50</sub> Reprodução(%)	33,37	6,47
	CE <sub>50</sub> Imobilidade(%)	14,52	14,25
Efluente RA	CE <sub>50</sub> Reprodução(%)	57,04	13,08
	CE <sub>50</sub> Imobilidade(%)	93,89	52,56
Efluente RM	CE <sub>50</sub> Reprodução(%)	30,09	32,66
	CE <sub>50</sub> Imobilidade(%)	56,35	39,37

Fonte: Autoria própria (2022).

Apesar do melhor desempenho do eflu RM em reduzir a imobilidade de *A. inaequalis* comparado ao aflu em bioensaios de toxicidade aguda (-22%), ele causou um aumento de toxicidade nos bioensaios de toxicidade crônica (+11%) (Tabela 5.10). O eflu RA proporcionou aumento de mobilidade e reprodução quando comparado ao aflu. Para *P. longiseta* foi observado um padrão da redução de toxicidade quando comparado os eflus RA e RM e o aflu tanto no bioensaio de toxicidade aguda quanto na crônica, sendo que o eflu RM possuiu melhores resultados em ambos.

Tabela 5.10 - Valores de redução (-) ou aumento (+) de toxicidade entre o afluente (aflu) e os efluentes dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM), baseados na Unidade Tóxica (UT) para *Allonais inaequalis* e *Pristina longiseta*.

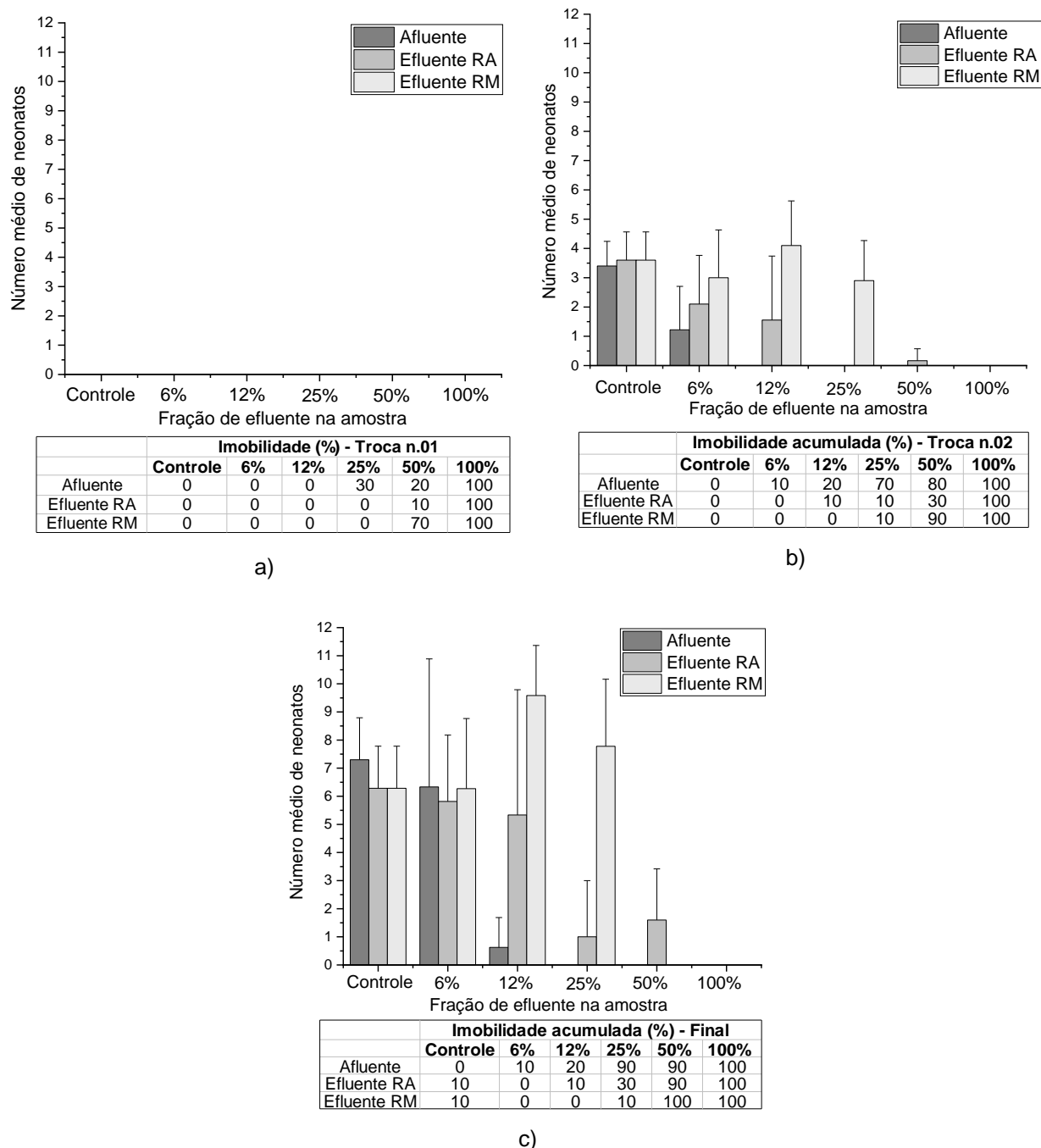
Espécie	Aflu		Efluente RA		Efluente RM		
	UT	UT	Redução ou Aumento (%)	Mudança comparada ao aflu	UT	Redução ou Aumento (%)	Mudança comparada ao aflu
<i>A. inaequalis</i>	2,99	1,75	- 41,47	Aumento na reprodução	3,32	+ 11,04	Diminuição na reprodução
<i>P. longiseta</i>	15,45	7,64	- 50,55	Aumento na reprodução	3,06	- 80,19	Aumento na reprodução

Fonte: Autoria própria (2022).

### 5.2.3.2. *Ceriodaphnia silvestrii*

Durante os experimentos analisando a toxicidade crônica, a imobilidade dos organismos na primeira troca do meio foi de 100% para as amostras brutas (100%) do aflu, eflu RA e eflu RM (Figura 5.8.a). Na primeira troca, também foram observados que as frações aflu 25% e aflu 50% causaram imobilidade de 30 e 20% respectivamente, e a fração eflu RM 50% causou 70% de imobilidade (Figura 5.8.a). Na segunda troca do meio, o número médio de neonatos por fêmea no controle foi de aproximadamente 3, na fração 6% houve um aumento na produção de neonatos (eflu RM > eflu RA > aflu), em 12% o eflu RM produziu em média 4 neonatos enquanto o eflu RA produziu em média 1 neonato (Figura 5.8.b). Apesar da baixa imobilidade nos eflu RA e RM, na fração de efluente 25% apenas o eflu RM produziu neonatos (média de 3 por fêmea) e, não houve reprodução na fração 50% (Figura 5.8.b). No intervalo entre a segunda troca do meio e o final do teste, como esperado para a espécie, o número de neonatos produzidas (média de 6 neonatos) foram superiores aos da segunda troca (média de 3 neonatos) (FONSECA; ROCHA, 2004b). No controle foram produzidos em média 7 neonatos no aflu e 6 neonatos no eflu RA e RM, a média de 6 neonatos também foi observado para a fração 6% de todas as soluções-teste (Figura 5.8.c). Apesar da imobilidade em aflu 12% seja de 20%, a produção de neonatos foi quase nula, enquanto no eflu RA subiu para 5 neonatos e no eflu RM para 10 neonatos.

Figura 5.8 –Número médio de neonatos e imobilidade (%) para *Ceriodaphnia silvestrii* durante exposição crônica com afluente e efluentes do reator acidogênico (RA) e metanogênico (RM) em a) primeira troca do teste, b) segunda troca do teste e c) final do teste (7 d).



Fonte: Autoria própria (2022)

A análise estatística mostrou que as diluições, os tipos de soluções-teste e a interação entre esses fatores influenciaram significativamente a reprodução (número total de neonatos ao final do teste) de *C. silvestrii* ( $p$ -valor < 0,05, *Two-Way ANOVA*) (Tabela

5.11.a-c). De forma geral, a reprodução observada nas diluições 12%, 25%, 50% e 100% e as comparações entre as soluções-testes (aflu, eflu RA e eflu RM) se mostraram estatisticamente diferentes do controle (Tabela 5.11.d, Tukey Fator A e Tabela 5.11e-g, Tukey Fator B respectivamente). Quando analisada a interação entre os fatores foi observado que a reprodução foi significativamente diferente quando comparada a dos indivíduos no experimento controle, apesar da baixa imobilidade em 12% (20%) (Tabela 5.11.h). O mesmo é observado para o eflu RA, apesar da fração 25% apresentar 30% de imobilidade ela já causou efeito significativo na reprodução (Tabela 5.11.i). Para o eflu RM apenas as diluições com 100% de imobilidade ao final do teste (50% e 100%) apresentaram reprodução estatisticamente diferentes do controle (Tabela 5.11.j).

Tabela 5.11 - Valores de p-valor obtidos pelo teste *Two-Way* ANOVA e Tukey correspondente à comparação das respostas de reprodução de *Ceriodaphnia silvestrii* entre as diluições testadas e o controle (Fator A), entre as soluções-teste (afluente - aflu, efluente do reator acidogênico – eflu RA e efluente do reator metanogênico -eflu RM) e a interação dos fatores A e B após bioensaio de toxicidade crônica. Nível de significância de 95%.

	<b>Comparação</b>	<b>p-valor</b>
a)	<b>Fator A (Diluições)</b>	<b>2,78 10<sup>-37</sup></b>
b)	<b>Fator B (tipo de solução-teste)</b>	<b>3,79 10<sup>-13</sup></b>
c)	<b>Interação entre Fator A e B</b>	<b>7,93 10<sup>-16</sup></b>
d)	<b>Diluições diferentes do controle</b>	12% (0,0001), 25% (0), 50% (0), 100% (0)
e)	<b>Relação entre aflu e eflu RA</b>	<b>0,0284</b>
f)	<b>Relação entre aflu e eflu RM</b>	<b>2,61 10<sup>-13</sup></b>
g)	<b>Relação entre eflu RA e eflu RM</b>	<b>3,91 10<sup>-7</sup></b>
h)	<b>Diluições do aflu diferentes do controle</b>	12% (1,71 10 <sup>-11</sup> ), 25% (1,71 10 <sup>-12</sup> ), 50% (1,71 10 <sup>-12</sup> ), 100% (1,71 10 <sup>-12</sup> )
i)	<b>Diluições do eflu RA diferentes do controle</b>	25% (3,46 10 <sup>-9</sup> ), 50% (3,46 10 <sup>-9</sup> ), 100% (6,65 10 <sup>-11</sup> )
j)	<b>Diluições do eflu RM diferentes do controle</b>	50% (6,65 10 <sup>-11</sup> ), 100% (6,65 10 <sup>-11</sup> )

Fonte: Autoria própria (2022).

A diluição que causou efeito na reprodução em 50% dos indivíduos foi de 6,7%, 13,2% e 29,1% para o aflu, eflu RA e eflu RM respectivamente. Ambos os tratamentos foram capazes de reduzir a toxicidade do afluente, sendo constatado uma redução de aproximadamente 50% para o eflu RA e 77% para o eflu RM (Tabela 5.12). O reator acidogênico também se mostrou eficaz em reduzir os efeitos de toxicidade aguda para a espécie (- 40%). Apesar do melhor desempenho do reator metanogênico em aumentar a

reprodução de *C. silvestrii* em frações de efluente baixas, no teste de ecotoxicidade aguda o eflu RM aumentou em 58% os efeitos na imobilidade.

Tabela 5.12 – Concentração de efeito na reprodução (CE50) considerando nível de significância de 95% para *Ceriodaphnia silvestrii* após exposição de 7 dias ao afluente (Aflu) e efluentes (Eflu) dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM).

	Aflu	Eflu RA	Eflu RM
<b>CE<sub>50</sub></b>	6,68	13,25	29,12
<b>UT</b>	14,97	7,55	3,43
<b>Redução ou aumento (%)</b>		- 49,56	- 77,09
<b>Mudança comparada ao aflu</b>		Aumento na reprodução	Aumento na reprodução

Fonte: Autoria própria (2022).

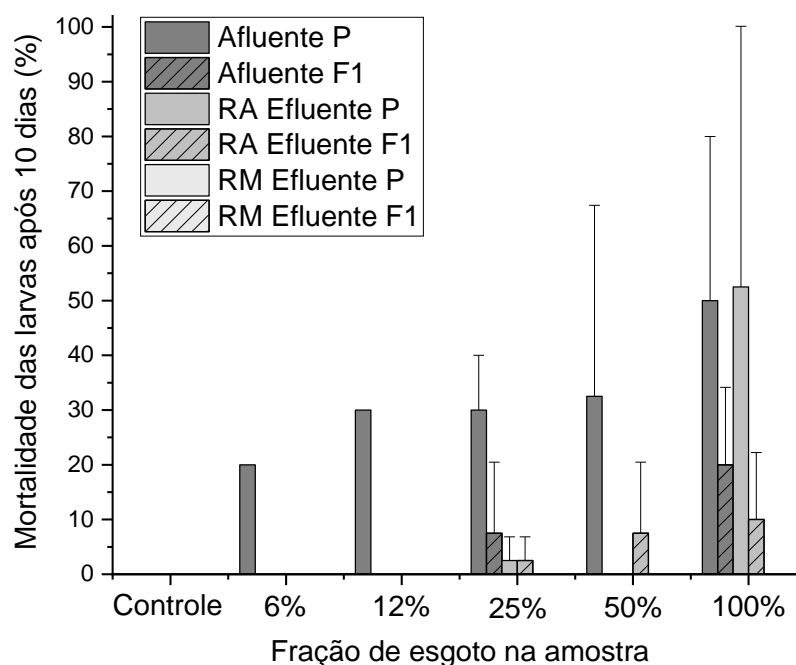
### 5.2.3.3. *Chironomus sancticaroli*

Após exposição por 10 dias às soluções-teste (afluente e efluentes do reator acidogênico – eflu RA e metanogênico – eflu RM), os indivíduos de *C. sancticaroli* foram contados e as larvas de uma das quatro réplicas foram amostradas para posterior análise do comprimento e deformidade do mento. De forma geral, houve maior mortalidade no afluente comparado aos efluentes e a mortalidade na geração filial (F1) foi menor que a observada na geração parental (P) (Figura 5.9). As maiores mortalidades foram observadas para a fração de 100% na geração P (aproximadamente 50% de mortalidade). Para o eflu RM não foram observadas mortalidade em nenhuma diluição testada. Pela análise estatística, as diluições usadas e o tipo de solução teste foram fatores que influenciaram significativamente a mortalidade dos indivíduos na geração P (p-valor *Two-Way* ANOVA de 0,0048 e 0,0001 respectivamente). A diluição que se mostrou estatisticamente diferente do controle foi a de 100% (Tukey's p-valor de 0,0022). Os dois tratamentos, eflu RA e eflu RM, foram estatisticamente diferentes do aflu (Tukeys's p-valor de 0,0089 e  $9,36 \cdot 10^{-5}$  respectivamente). Essa diferença pode estar relacionada à redução da mortalidade dos indivíduos expostos ao eflu RA e eflu RM em comparação ao aflu (Figura 5.9). A interação entre diluições e soluções-teste não



influenciaram na mortalidade das larvas nas gerações P e F1 (p-valor *Two-Way* ANOVA > 0,05).

Figura 5.9 – Mortalidade (%) das larvas de *Chironomus sancticaroli* na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) após exposição de 10 dias de exposição.



Fonte: Autoria própria (2022).

A concentração de efeito (mortalidade) em 50% ( $CE_{50}$ ) dos indivíduos só foi possível de ser calculada para o eflu RA na geração P e foi estimada em aproximadamente 99%. Comparando os valores da  $CE_{10}$  é possível evidenciar que a fração de efluente necessária para causar a mortalidade em 10% dos indivíduos aumenta entre as gerações P e F1, o que pode indicar uma adaptação ao meio de exposição (Tabela 5.13).

Tabela 5.13 – Concentração de efeito na sobrevivência de *Chironomus sancticaroli* (CE<sub>10</sub> e CE<sub>50</sub>) considerando nível de significância de 95% após exposição de 10 dias ao afluente (Aflu) e efluentes (Eflu) dos reatores acidogênico (RA) e metanogênico (RM) na geração parental (P) e filial (F1).

	Aflu		Eflu RA		Eflu RM	
	P	F1	P	F1	P	F1
CE <sub>10</sub>	0,81	86,35	74,85	92,37	n.a.	n.a.
CE <sub>50</sub>	n.a.	n.a.	98,75	n.a.	n.a.	n.a.

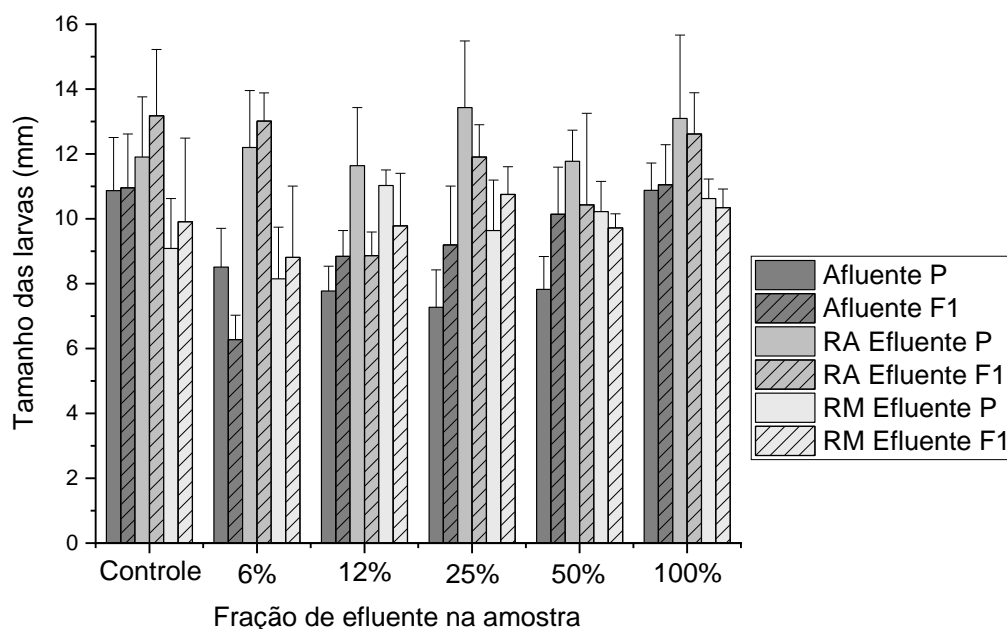
Fonte: Autoria própria (2022). n.a. não aplicável pois a mortalidade foi baixa, inexistente ou com elevados desvios.

Dentre as larvas amostradas, o comprimento larval no eflu RA foram superiores ao observado para o aflu e o eflu RM (Figura 5.10). O comprimento larval médio no controle do teste realizado com o aflu foi de 10,87 mm e 10,96 mm para as gerações P e F1 respectivamente. Na exposição ao eflu RA, o comprimento médio no controle foi de 11,91 mm e 13,16 mm para as gerações P e F1 respectivamente. Já durante a exposição ao eflu RM o comprimento médio larval no controle foi de 9,08 mm e 9,91 mm para as gerações P e F1 respectivamente. No afluente, o comprimento larval para a geração P variou de 7,72 mm (aflu 25%) a 7,88 mm (aflu 100%), enquanto na geração F1 variou de 6,27 mm (aflu 6%) a 11,05 mm (aflu 100%). O comprimento larval na geração P exposta ao efluente RA variou de 11,63 mm (eflu RA 12%) a 13,43 mm (eflu RA 25%), enquanto na geração F1 variou de 8,87 mm (eflu RA 6%) a 11,02 mm (eflu RA 12%). Já para a geração P exposta ao efluente RM, o comprimento larval variou entre 8,15 mm (eflu RM 6%) e 11,03 mm (eflu RM 12%) e na geração F1 de 8,80 mm (eflu RM 6%) a 10,75 mm (eflu RM 25%).

O desenvolvimento larval variou significativamente entre a geração parental e a geração F1 para o aflu (Tukey's p-valor de 0,0266) e eflu RA (Tukey's p-valor de 0,0399), enquanto o comprimento larval da geração P e F1 para o eflu RM foram estatisticamente similares (Tukey's p-valor de 0,7169). Não foi observada nenhuma padrão entre a fração de efluente na amostra e a diminuição ou aumento do comprimento larval. Por exemplo, para o aflu P, não houve diferença no tamanho larval entre o controle e o aflu100% (p-valor > 0,05, Tukey), enquanto nas demais diluições o comprimento larval foi estatisticamente diferente do controle. Já para o aflu F1 apenas as frações 6% e 12% apresentaram comprimento larval estatisticamente diferentes do controle (p-valor de 4,67 10<sup>-10</sup> e 0,0103 respectivamente, Tukey). Para o eflu RA todas as diluições apresentaram

larvas da geração P com comprimento corporais estatisticamente semelhantes ao comprimento larval do controle ( $p$ -valor  $> 0,05$ , Tukey), enquanto na geração F1 a fração 12% e 50% foram estatisticamente diferentes do controle ( $p$ -valor de  $1,09 \cdot 10^{-5}$  e  $0,0198$  respectivamente, Tukey).

Figura 5.10 – Tamanho médio das larvas de *Chironomus sancticaroli* na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) após exposição de 10 dias.



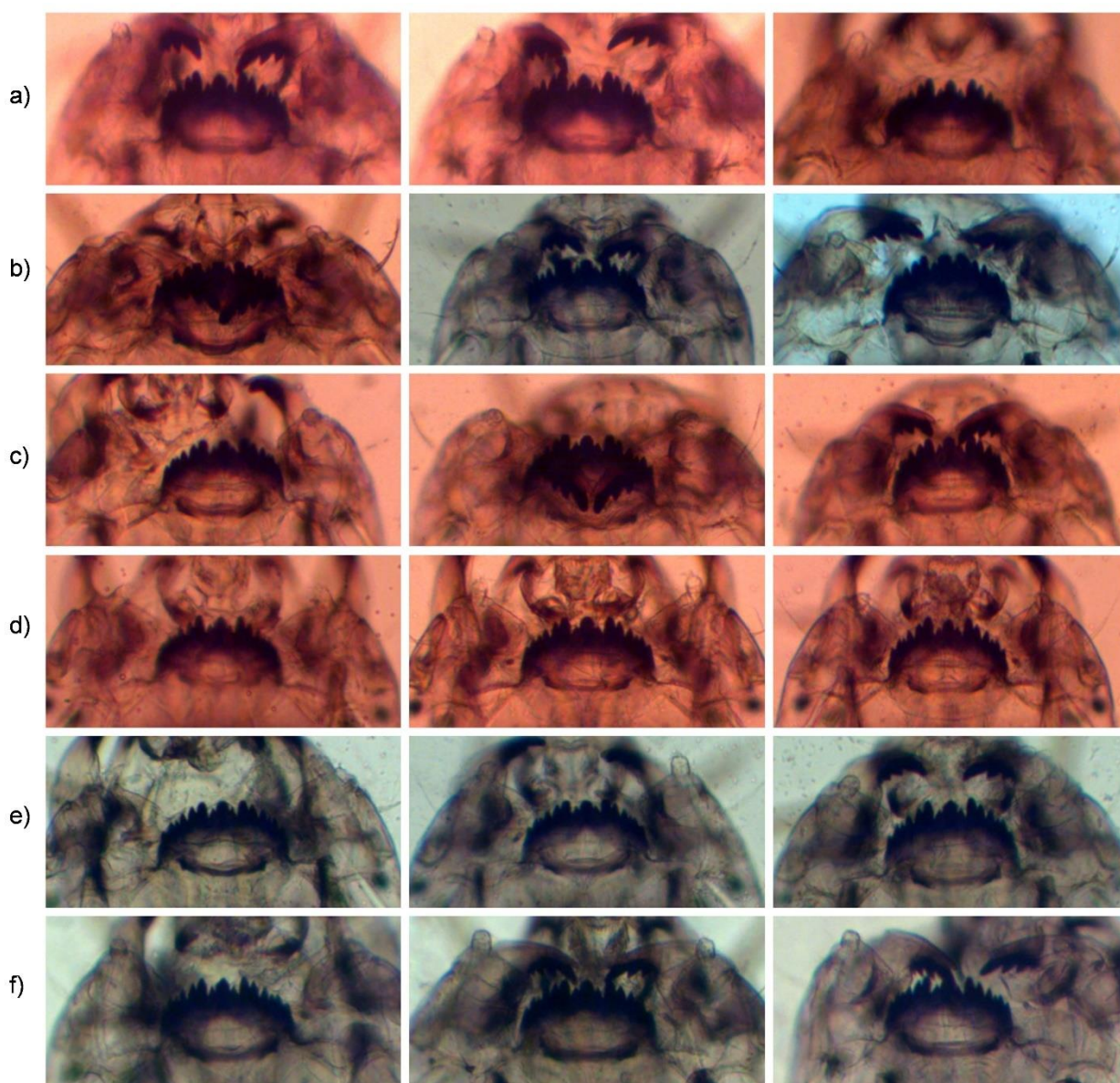
Fonte: Autoria própria (2022).

Zilli *et al.* (2008) apontou que fatores como filogenia, estabilidade do habitat, disponibilidade de recursos podem afetar o desenvolvimento das larvas de *Chironomus*. Esse atraso no desenvolvimento larval pode implicar em fêmeas com menor produção de ovos e essa redução na fecundidade potencial de fêmeas adultas pode afetar o tamanho populacional desse inseto (NOLTE, 1993).

Ao avaliar o mento (aparelho bucal) dos indivíduos expostos por 10 dias às soluções-teste, casos pontuais de deformidades (falta ou excesso de dentes e dentes quebrados) foram observadas (Figuras 5.11 a 5.16). Um dente a mais pode ser observado na última foto do aflu 6%, geração P (Figura 5.11.b) e na última foto do controle do eflu RA, geração P (Figura 5.13.b). Ademais, foram observados um arredondamento

nos dentes da espécie quando expostos ao aflu P (Figura 5.11 - b, d, e), aflu F1 (Figura 5.12 - b, c, e, f), eflu RA P (Figura 5.13 - a, b, c, d, e, f), eflu RA F1 (Figura 5.14 - b, c, d, e, f), eflu RM P (Figura 5.15 - b, d, e, f) e, eflu RM F1 (Figura 5.16 - a, b, d, e, f). Como houve casos isolados de deformidade no mento, inclusive no controle, não é possível afirmar que o afluente ou os efluentes dos reatores possuíram efeitos nocivos nos dentes de *C. sancticaroli*.

Figura 5.11 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de *Chironomus sancticaroli* sob exposição ao afluente dos reatores na geração parental (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%.



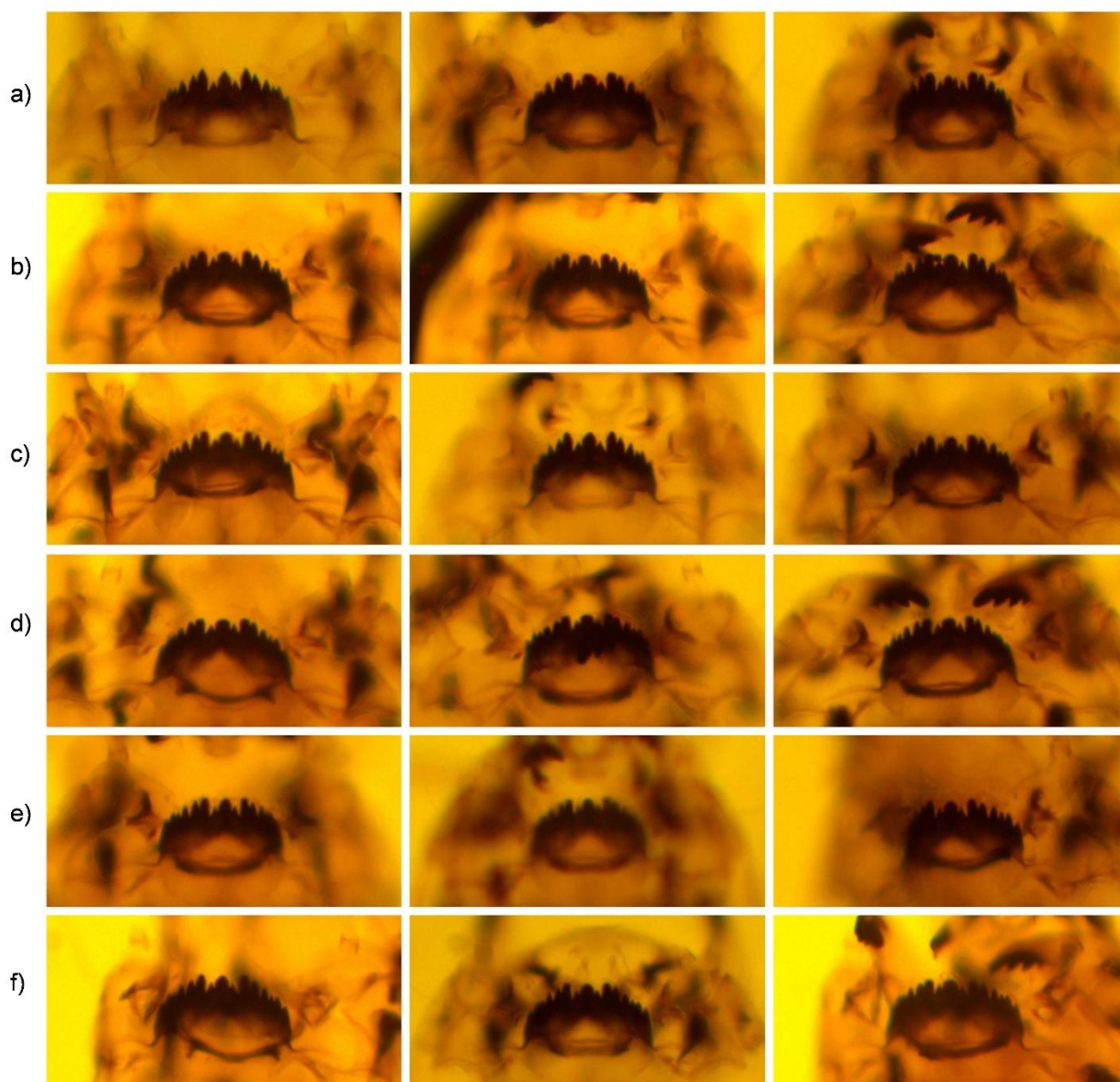
Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 5.12 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de *Chironomus sancticaroli* sob exposição ao afluente dos reatores na geração F1 (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%.



Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 5.13 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de *Chironomus sancticaroli* sob exposição ao efluente do reator acidogênico (RA) na geração parental (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%.



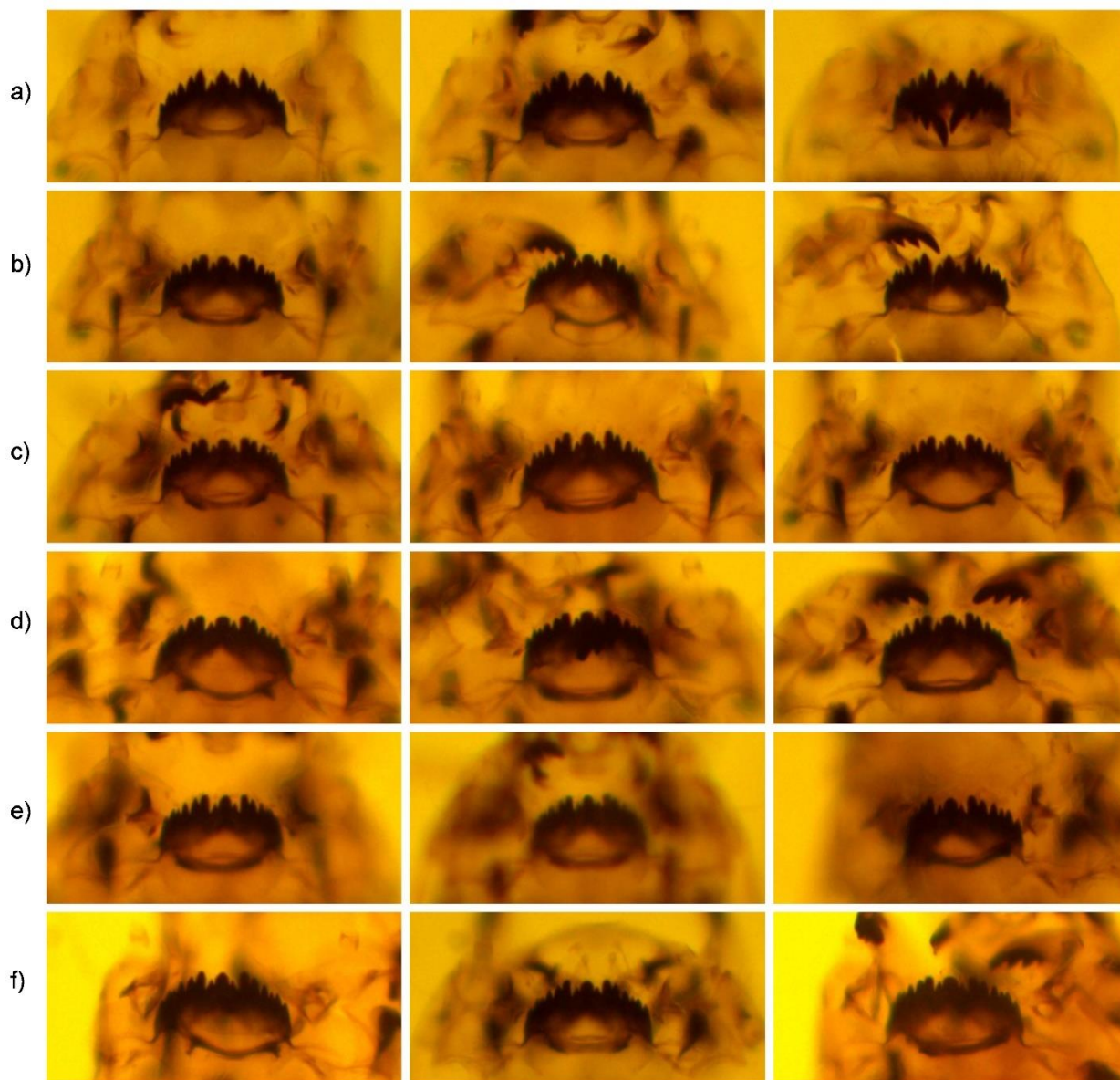
Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 5.14 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de *Chironomus sancticaroli* sob exposição ao efluente do reator acidogênico (RA) na geração F1 (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%.



Fonte: Autoria própria (2022).

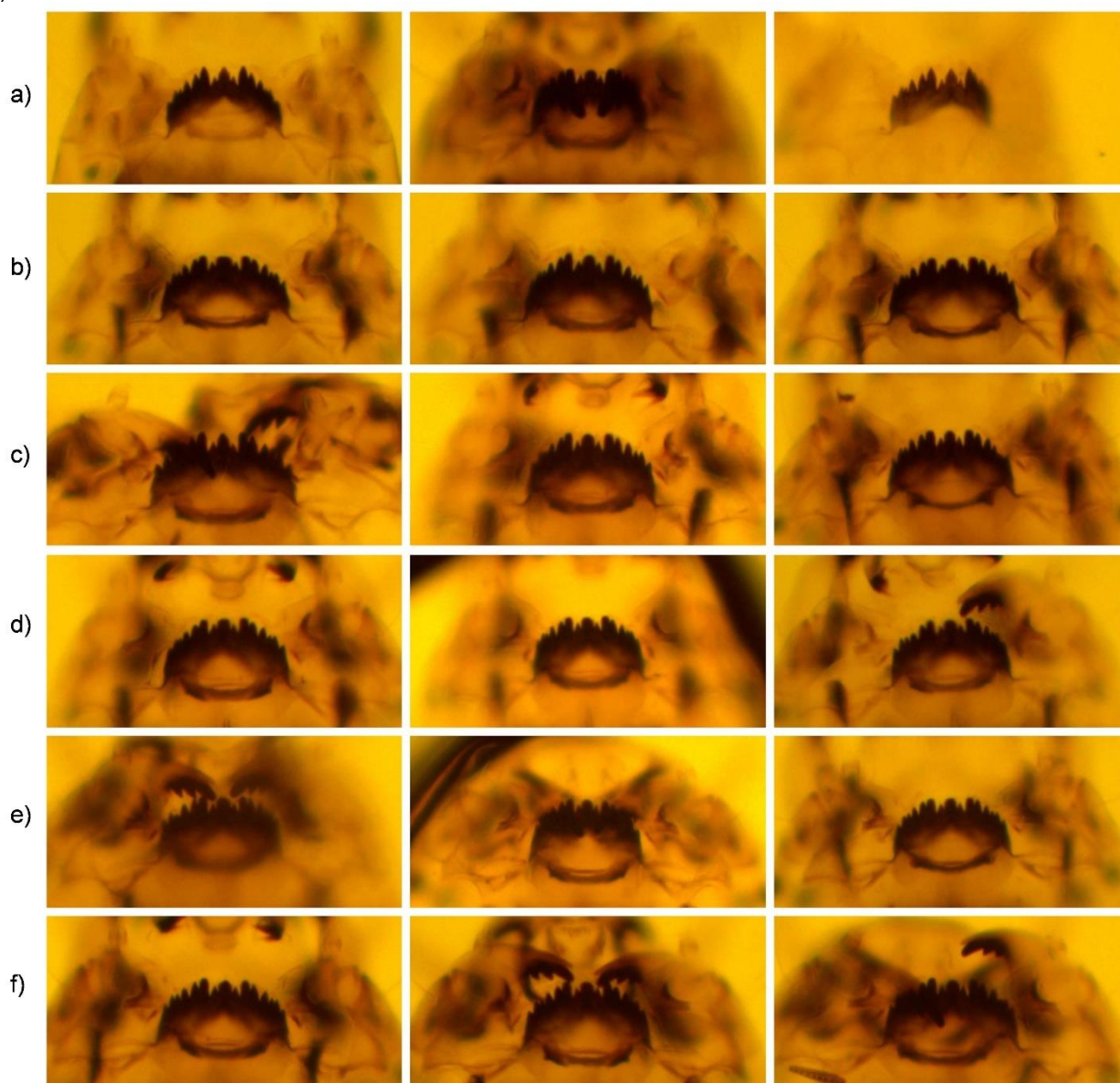
Figura 5.15 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de *Chironomus sancticaroli* sob exposição ao efluente do reator metanogênico (RM) na geração parental (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%.



Fonte: Autoria própria (2022).



Figura 5.16 – Exemplos de aparelho bucal das larvas de *Chironomus sancticarloi* sob exposição ao efluente do reator metanogênico (RM) na geração F1 (10 d). a) controle; b) 6% c) 12%, d) 25%, e) 50% e f) 100%.

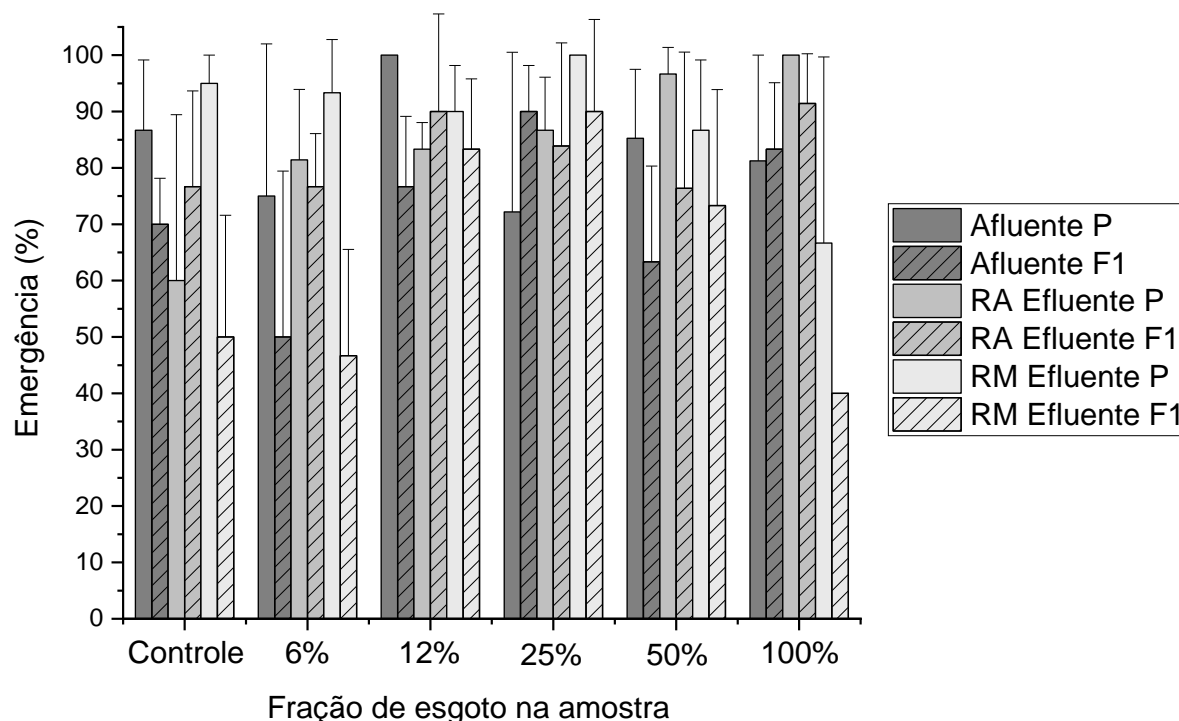


Fonte: Autoria própria (2022).

A taxa de emergência de adultos foi calculada considerando a relação entre número de adultos e número de larvas sobreviventes após os 10 dias, que permaneceram expostas às soluções-teste até que todas as larvas emergissem ou morressem. Com exceção ao aflu 25% e 100%, controle eflu RA e eflu RA12%, a emergência de adultos na geração F1 foi menor quando comparada às mesma soluções-teste na geração P. A

taxa média de emergência para a geração P no controle foi de  $86\% \pm 12\%$ ,  $60\% \pm 29\%$  e  $95\% \pm 5\%$  para aflu, eflu RA e eflu RM respectivamente, enquanto na geração F1 foi de  $70\% \pm 8\%$ ,  $77\% \pm 17\%$  e  $50\% \pm 22\%$ . Não há evidências de que as diferenças na emergência de adultos seja significativa entre as diluições testadas, o tipo de solução-teste e a interação desses fatores nas gerações P e F1 ( $p$ -valor  $> 0,05$ , *Two-Way ANOVA*).

Figura 5.17 – Emergência (%) das larvas de *Chironomus sancticarloi* sobreviventes após 10 dias de exposição na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) durante teste de geração.



Fonte: Autoria própria (2022).

Apesar da evidência de uma adaptação das larvas ao afluente e efluentes RA e RM (queda na mortalidade na geração filial), a taxa de emergência de mosquitos adultos foi majoritariamente inferior na geração F1. Isso indica que, mesmo apresentando maior número de larvas sobreviventes após 10 dias, essas larvas e pupas sofreram algum impacto que as impossibilitaram de emergir para a fase adulta (Figuras 5.9 e 5.17). A taxa de emergência de *C. sancticarloi* inferior à de sobrevivência das larvas (após 10 dias

de exposição) também foi observado por Carneiro *et al.* (2021) para os efluentes de reator tratando efluente sintético sem e com adição de fármacos.

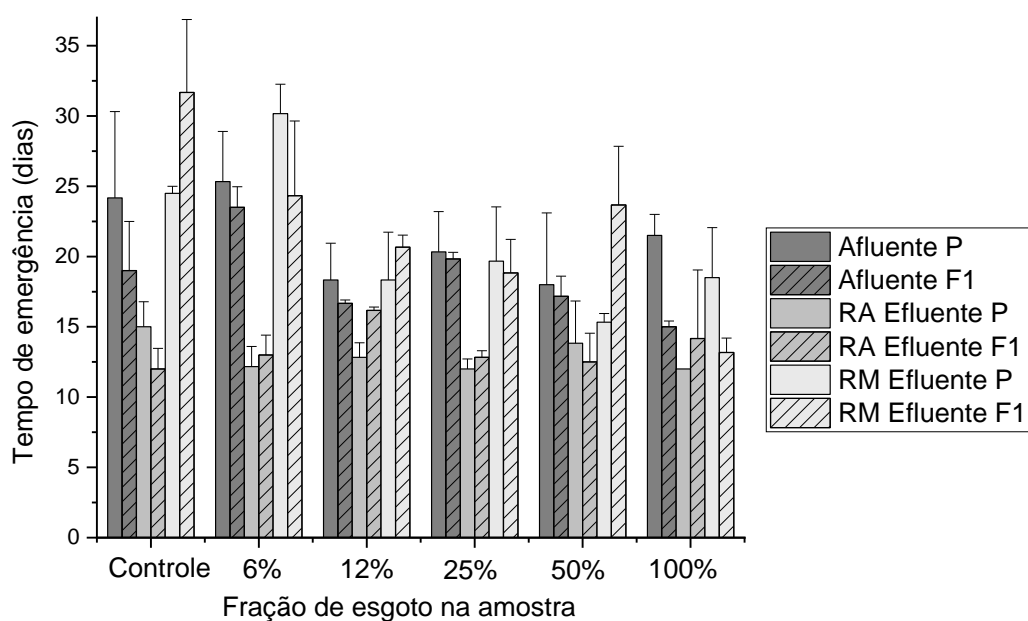
O tempo médio de emergência dos adultos esteve próximo ao período esperado para a espécie (ciclo de vida total entre 14 e 28 dias, Figura 5.18) e a diminuição do tempo de emergência nas amostras de acordo com maior fração de efluente pode estar relacionado a maior presença de matéria orgânica que possibilita um tempo do desenvolvimento larval menor (TRIVINHO-STRIXINO, 1980). Durante a exposição ao afluente, o tempo médio de emergência na geração parental (P) foi superior ao da geração F1, sendo os maiores períodos observados para geração P no controle (24 dias) e aflu 6% (25 dias) e para geração F1 no aflu 6% (23 dias), aflu 25% (20 dias) e controle (19 dias).

Durante a exposição ao eflu RA foram observados os menores tempos médios de emergência tanto no controle quanto nas diluições testadas (entre 12 e 16 dias). O período médio mínimo de 12 dias foi observado para eflu RA 6%, eflu RA 12%, eflu RA 25% e eflu RA 100% (geração P) e controle, eflu RA 25% e eflu RA 50% (geração F1), enquanto o maior tempo médio de emergência de emergência de 16 dias para eflu RA 12% em F1. O tempo médio de emergência no teste realizado com o eflu RM foram os maiores observados no controle, eflu RA 6% e eflu RA 12%, chegando a 31 dias (controle P) e 30 dias (eflu RA 6% F1). O período mínimo de emergência de 15 e 13 dias foi observado para eflu RA 50% (P) e eflu RA 100% (F1) respectivamente.

De maneira geral, na geração P houve diferença estatísticas no período de emergência entre as diluições testadas e o tipo de solução- (p-valor < 0,05, *Two-Way* ANOVA), sendo apontada a fração 50% como diferente do controle (p-valor de 0,034, Tukey). O período de emergência no eflu RA foi estatisticamente diferente do observado para o aflu e eflu RM (p-valores de  $5,93 \cdot 10^{-7}$  e  $9,37 \cdot 10^{-7}$  respectivamente, Tukey), com tempo de emergência normalmente inferiores. Por outro lado, além das diluições e tipo de soluções-teste, a interação entre esses fatores influenciou estatisticamente o período de emergência (p-valor < 0,05, *Two-Way* ANOVA). No teste *posteriori* Tukey, a diluição 100% foi estatisticamente diferente do controle (p-valor de 0,001) e ambos efluentes foram estatisticamente diferentes do afluente (p-valores de 0,0001 e 0,0064 para eflu RA e eflu RM respectivamente). Os resultados do teste Tukey para a interação entre os

fatores apontaram que o controle RM foi diferente dos controles aflu e eflu RA (p-valor de 0,0014 e  $5,1 \cdot 10^{-7}$ , respectivamente). Além disso, as frações 12%, 25% e 100% apresentaram tempo de emergência estatisticamente diferente do controle para o eflu RM (p-valores de 0,0086, 0,0012 e  $1,9 \cdot 10^{-6}$  respectivamente), com período de emergência mais curto.

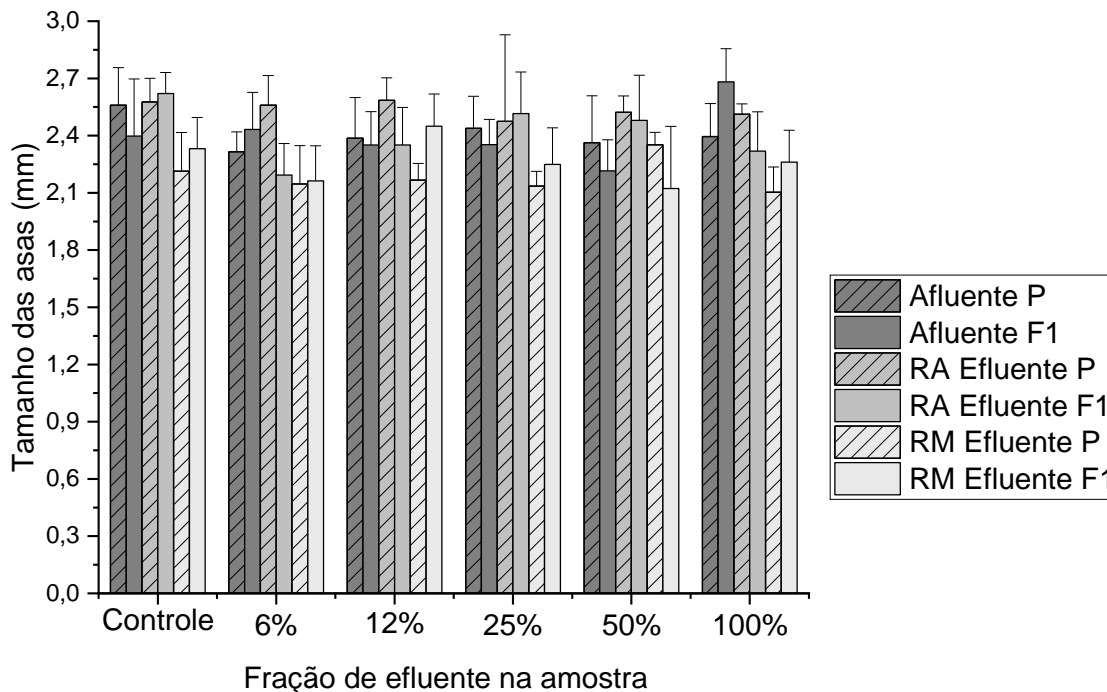
Figura 5.18 – Tempo média de emergência dos adultos de *Chironomus sancticaroli* na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) durante o teste de geração.



Fonte: Autoria própria (2022).

Na geração parental, o tamanho médio das asas variou entre 2,31 mm (aflu 6%) e 2,56 mm (aflu controle), de 2,47 mm (eflu RA 25%) a 2,58 mm (eflu RA controle) e de 2,10 mm (eflu RM 100%) a 2,35 mm (eflu RM 50%) (Figura 5.19). O tamanho médio das asas reduziu entre a geração parental (P) e filial 1 (F1) em 2 das 6 diluições testadas (aflu 6% - 0,12 mm e aflu 100% - 0,29 mm). Assim como para o aflu, no eflu RA, em apenas 2 das 6 condições testadas houve redução no tamanho médio das asas (controle - 0,04 mm e 25% - 0,04 mm), já na exposição ao eflu RM a redução no tamanho das asas foi observado apenas no eflu 50% (- 0,22 mm).

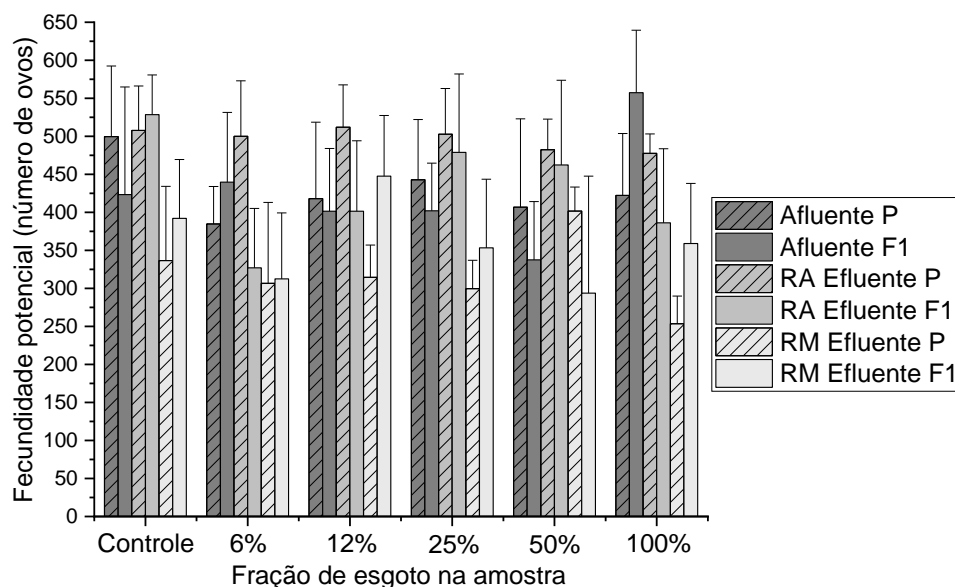
Figura 5.19 – Tamanho médio das asas das fêmeas na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) após exposição até emergência total das larvas em teste de geração com *Chironomus sancticaroli*.



Fonte: Autoria própria (2022).

Calculada com base no tamanho das asas, a fecundidade potencial das fêmeas variou de 337 ovos (aflu 50%, geração F1) a 557 ovos (aflu 100% geração F1), de 327 ovos (eflu RA 6% geração F1) a 528 ovos (eflu RA controle geração F1) e de 253 ovos (eflu RM 100% geração P) a 447 ovos (eflu RM 12% geração F1) (Figura 5.20). De forma geral, o número de ovos estimados mínimos e máximos foram observados para a geração F1. Para o aflu F1, o maior aumento de números de ovos estimado (+135 ovos) foi para o aflu 100% enquanto a maior queda no número e ovos foi estimada para o controle (- 76 ovos). Para o eflu RA, há estimativa de aumento de fecundidade apenas para o controle (+ 20 ovos), enquanto a queda foi estimada variando de -20 ovos (eflu RA 50%) a -172% (eflu RA 6%). Na exposição ao eflu RM, houve aumento no número estimado de ovos para as diferentes frações variando de 6 ovos (eflu RM 6%) a 133 ovos (eflu RM 12%), com queda observada apenas para o eflu RM 50% (- 108 ovos).

Figura 5.20 –Fecundidade potencial das fêmeas na geração parental (P) e filial (F1) expostas ao afluente, efluente reator acidogênico (RA), efluente do reator metanogênico (RM) após exposição até emergência total das larvas em teste de geração com *Chironomus sancticaroli*.



Fonte: Autoria própria (2022).

Primeiramente foi feita a análise estatística com o objetivo de comparar os resultados entre as soluções-teste separadamente na geração P e na F1. Os resultados para a geração P foi de que o tipo de solução-teste e a interação entre as diluições e tipo de solução-teste influenciaram na fecundidade potencial das fêmeas (p-valores de  $2,86 \cdot 10^{-25}$  e  $0,0202$  respectivamente, *Two-Way ANOVA*). O teste *posteriori* Tukey apontou que as amostras aflu, eflu RA e eflu RM são diferentes entre si (p-valor  $< 0,05$ , Tukey). Porém, quando analisadas as combinações entre diluição e tipo de solução-teste foi observado que os controles do aflu e do eflu RA se diferem do controle do eflu RM ( $8,46 \cdot 10^{-6}$  e  $3,15 \cdot 10^{-5}$  respectivamente, Tukey). Essa diferença pode ser observada na Figura 5.20, uma vez que o número médio de ovos estimados no eflu RM é inferior às demais. Na geração F1, por outro lado, apenas o controle do eflu RA se mostrou estatisticamente diferente do controle do eflu RM (p-valor de  $0,043$ , Tukey), já que o controle do eflu RA apresentou estimativa de fecundidade potencial superior ao eflu RM.

Visto a diferença estatística entre os controles do teste de geração com *C. sancticaroli*, foi realizada uma nova análise estatística comparando os efeitos das

gerações para cada solução-teste aplicando como fatores as diluições usadas e a geração (P ou F1). Para o aflu, as diluições mostraram influenciar a fecundidade potencial (p-valor 0,0009, *Two-Way* ANOVA), sendo a fração 50% diferente do controle (p-valor 0,0022, Tukey). No eflu RA, as frações 6%,12% e 100% obtiveram respostas de fecundidade potencial estatisticamente diferentes do controle (p-valor de 0,0008, 0,0111 e  $9,06 \cdot 10^{-5}$  respectivamente, Tukey). Além disso, o número médio de ovos estimados variou significativamente entre as gerações (p-valor  $2,57 \cdot 10^{-6}$ , Tukey). Para o eflu RM, o teste *posteriori* Tukey evidenciou que a fecundidade potencial variou significativamente entre a geração P e F1 (p-valor de 0,0233) e, apesar do fator diluição e a interação entre diluição e geração influenciarem no número médio de ovos estimados (p-valor  $< 0,05$ , *Two-Way* ANOVA), no teste *posteriori* essas diferenças não se encontram entre o controle e as diluições.

Ressalta-se que as análises comparando a eficiência dos reatores em reduzirem a toxicidade da amostra não foram realizadas para o desenvolvimento e reprodução devida as diferenças estatísticas apresentadas para a comparação do controle.

#### **5.2.4. Discussão geral ecotoxicidade dos efluentes**

O aumento demográfico e o aumento da geração de efluentes domésticos e industriais causaram uma redução da qualidade dos corpos receptores, o que motivou os primeiros estudos no Brasil para o monitoramento dos efeitos desses lançamentos na década de 1980 (DE MORAIS *et al.*, 2018; PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2014; SANCHEZ *et al.*, 1988; ZAGATTO; GOLDSTEIN; BERTOLETTI, 1988). A toxicidade de efluentes industriais e domésticos foi investigada na década de 1980 na região do ABC paulista e Barueri (SP, Brasil), sendo detectada toxicidade em 75% corpos receptores analisados no ABC e 50% dos corpos receptores analisados em Barueri (SANCHEZ *et al.*, 1988). Por se tratar de amostras complexas, fazer a identificação das substâncias ou compostos que causam a toxicidade nos efluentes também é complexo, porém, os ensaios ecotoxicológicos conseguem indicar genericamente os efeitos interativos (aditivos, sinérgicos e antagônicos) dos compostos presentes nessas amostras (ZAGATTO *et al.*, 1992).

Essa pesquisa analisou os efluentes de dois sistemas de tratamento anaeróbios (reatores de bancada em condição acidogênica e metanogênica - RA e RM respectivamente). É importante ressaltar que sistemas de tratamento acidogênico não são aplicados isoladamente e são normalmente utilizados para otimizar o tratamento geral, como por exemplo para aumentar a remoção de micronutrientes (MACÊDO, 2022). Caso apenas os parâmetros requeridos pela Resolução CONAMA n. 430 (2011) fossem analisados, os efluentes dos reatores acidogênico e metanogênico (RA e RM respectivamente) estavam dentro dos limites estabelecidos para parâmetros pH e temperatura exigidos pela legislação brasileira para lançamento em corpos d'água classe 3 (CONAMA, 2011). Apesar da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) não ter sido monitorada, os resultados para a DQO foram considerados como indicativo pela relação que possui com a DBO (VON SPERLING, 2014). Conforme esperado para sistemas anaeróbios acidogênico, a remoção de DBO no reator acidogênico provavelmente não atingirá a mínima de 60% exigido pela Resolução CONAMA 430, enquanto o reator anaeróbio metanogênico atingirá. A remoção do TBBPA foi de em média 90% (67 – 99%) no RA e 97% (92 – 99%) no RM, resultados superiores ao encontrado por Kim; Lee; Oh, (2016), no qual a remoção de TBBPA em efluentes sanitários variou de 34 a 79% tratados em sistemas de lodo ativado.

Apesar da elevada eficiências dos reatores em removerem o TBBPA, ainda há uma concentração remanescente que não poderia ser detectada em corpos de água doce segundo a Resolução CONAMA n. 357 (2005). Embora o reator acidogênico possui menor tempo de retenção hidráulico (1,2 h) comparado ao reator metanogênico (6 h), ele atingiu as expectativas no que diz respeito à diminuição de micropoluentes e, com exceção de *C. sancticaroli*, reduziu a toxicidade do afluente. O reator metanogênico também reduziu a toxicidade do afluente para as espécies testadas, com exceção de *C. silvestrii*. Apesar dessa redução, ambos ainda possuíram toxicidade aguda e crônica o que indica necessidade de tratamentos complementares antes do lançamento em corpos hídricos, além disso, por se tratarem de tratamentos anaeróbios, seria necessária a aeração dos efluentes antes do lançamento.

Existem legislações brasileiras e internacionais que indicam a avaliação da toxicidade de efluentes e métodos padronizados para medir a toxicidade aguda de



efluentes a fim de prevenir os efeitos negativos sobre a biota aquática (BERTOLETTI, 2013; CONAMA, 2005, 2011; US-EPA, 2002b). Segundo a Resolução CONAMA n. 357 (2005), para que rios sejam enquadrados nas classes 1 e 2, suas águas devem apresentar ausência de toxicidade crônica; para serem enquadrados em rios classe 3 devem apresentar ausência de toxicidade aguda. Porém, esta a Resolução CONAMA n. 357 não especifica os tipos de espécies a serem utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos e qual tipo de método ou diretriz nacional ou internacional a ser utilizada. A Resolução CONAMA n. 430 (2011) é mais detalhada que a CONAMA 357 no que diz respeito à toxicidade de efluente nas diferentes classes de rios e segue critérios baseados na diluição do efluente no corpo receptor e respostas de ecotoxicidade aguda ( $CE_{50}$ ) e crônica (CENO), porém também não é indicado qual tipo de espécie a ser usada ou metodologias aceitas. O documento “Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no Estado de São Paulo” que traz as diretrizes aplicadas pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é mais detalhado. Nele, a CETESB afirma que a realização de ensaios de ecotoxicidade aguda com *Daphnia similis* e ecotoxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* seriam suficientes para garantir que o efluente não apresentará efeitos adversos sobre a biota aquática (BERTOLETTI, 2013). Porém, como observado na Tabela 3.2 e Figura 5.22, os crustáceos sugeridos pela CETESB não foram os organismos mais sensíveis ao TBBPA e para efluentes que contenham esse composto seria interessante o uso de outros grupos de espécies como os peixes e os oligoquetas.

Apesar da ausência de especificações, o fato da legislação apontar para a necessidade do efluente não apresentar nenhum efeito adverso sobre os organismos dos corpos hídricos receptores em exposição aguda ou crônica ressalta a importância do uso desta ferramenta (bioensaios) para monitorar a qualidade dos tratamentos. Zagatto; Goldstein; Bertolletti (1988) aplicando bioensaios com *Daphnia similis* conseguiu mostrar que duas das dez indústrias avaliadas por eles deveriam melhorar o tratamento de seus efluentes antes do lançamento nos corpos receptores para evitar tanto os efeitos agudos quanto crônicos na biota. Os estudos de ecotoxicidade na análise de efluentes vêm aumentando nos últimos anos e é uma das formas eficientes de avaliar a aplicação de diferentes tipos de tratamentos e garantir a qualidade da água dos corpos hídricos receptores.

Se aprofundarmos nas diversas maneiras de se classificar a toxicidade dos efluentes, é possível encontrar divergências entre as classificações. Segundo a classificação proposta por Persoone *et al.* (2003), baseada no valor médio da UT, os eflus RA e RM são classificados como com potencial de toxicidade aguda e, portanto, poderiam ser lançados apenas em rios classe 3. No que diz respeito à toxicidade aguda de efluentes lançados em água doce, a diretriz da CETESB diz que a diluição do efluente no corpo receptor (D.E.R.) deve ser menor ou igual a concentração de efeito dividido por um fator de segurança (100) (BERTOLETTI, 2013). Portanto, apesar do Córrego do Monjolinho ser Classe 3, segundo Bertolotti (2013), os efluentes possuem potencial para causar efeitos adversos aos organismos aquáticos e não deveriam ser lançados. Por último, a CONAMA 430 (2011) também usa a D.E.R. para avaliar a toxicidade de efluentes, porém o fator de divisão é diferente do aplicado pela CETESB. Aplicando o fator de divisão proposto para rio Classe 3 na CONAMA 430 (2011) (concentração de efeito dividido por três), apesar dos eflu RA e RM não evidenciarem risco para espécies específicas, para a maioria dos invertebrados analisados, o lançamento não seria indicado pensando na segurança da biota aquática. Esses resultados mostram a importância do uso de ensaios ecotoxicológicos com mais de uma espécie para garantir que os efluentes lançados nos corpos hídricos não causem toxicidade para a biota.

A UT pode auxiliar nas comparações entre a toxicidade de amostras diferentes, sendo que quanto maior a UT, mais tóxica é a amostra. A UT foi aplicada por um estudo realizado com efluente hospitalar (EH), doméstico (ED) e a mistura de ambos (M), antes e após tratamento em sistema biológico (lodos ativados), e mostrou que para *D. magna* (24 h) a toxicidade foi EH (4,72) > M (2,53) > ED (0,8), não sendo observado toxicidade nas amostras tratadas (LAQUAZ *et al.*, 2018). No presente estudo, fazendo a média entre as UT calculadas para as espécies após exposição de toxicidade aguda temos aflu (3,05) > eflu RA (2,93) > eflu RM (1,62). Uma explicação para a maior toxicidade do eflu RA em comparação ao eflu RM é a maior concentração de DQO, motivo que também foi apontado como possível causador de toxicidade por Sponza e Demirden (2010) para efluente tratado em reator anaeróbico. A relação entre demanda química de oxigênio (DQO) e imobilidade foi observada para *D. magna* por Gholami-Borujeni; Nejat-zadeh-Barandozi; Aghdasi, (2018) e, apesar dos autores observarem um aumento na UT ao

longo dos dias de teste (UT-24 h de 0,168 e UT-96 h de 0,306), o efluente de Urmia (Irã) foi classificado como não tóxico.

Considerar a zona de mistura e diluição do efluente no corpo receptor é um importante fator pois além de diluir a carga poluidora, ele cria uma zona de aeração que pode influenciar positivamente na redução de toxicidade. Os efeitos de um efluente hospitalar bruto e após diluição no corpo receptor foram estudados por Mazzitelli *et al.* (2018), que observaram que os corpos receptores não apresentaram nenhuma resposta de toxicidade enquanto o efluente bruto influenciou no desempenho reprodutivo das espécies (planária *Schmidtea polychroa*, molusco *Radix balthica* e o peixe *Oryzias latipes*). Para amostras coletadas no corpo receptor após lançamento de efluente de uma ETE na África do Sul, foi observada diminuição da inibição de crescimento do protozoário *Tetrahymena thermophila* e da imobilidade de *D. magna* de acordo com o aumento da diluição do efluente e dependendo da época do ano, com classificação ecotoxicológica variando de presença de toxicidade aguda a presença elevada toxicidade aguda (PEREAO; AKHARAME; OPEOLU, 2021). Ademais, a aeração aumenta a oxigenação de efluentes e deixa a atividade autodepurativa mais eficiente após o lançamento em corpos receptores (HAMDHANI; EPPEHIMER; BOGAN, 2020; MARTINS; ROCHA; SANTANA, 2018). Oliveira *et al.* (2020) avaliaram o efeito da aeração em biorreatores de bancada na biodegradação de compostos e redução de toxicidade para *D. magna*, constatando redução na imobilidade (de 100% para 11% e de 100% para 10%) para as diluições de 10% e 25% após tratamento com quatro ciclos de oxigenação.

Mesmo com a redução da toxicidade entre o aflu e os eflus RA e RM, os efluentes dos reatores ainda possuíam potencial de toxicidade. Assim como observado no presente estudo, Zagatto *et al.* (1992) constataram redução de 47% a 78% da toxicidade aguda em *D. similis* após tratamento na ETE Suzano (SP, Brasil), porém o efluente final ainda apresentou CE<sub>50</sub> entre 22,6% a 48,4% para a espécie. Ademais, ao aplicar a relação entre a D.E.R. e a CE<sub>50</sub>, os autores constataram que esse efluente possui potencial de toxicidade crônica para o corpo receptor classe 3 e indicaram a necessidade de tratamentos complementares principalmente porque a ETE recebe efluentes industriais (ZAGATTO *et al.*, 1992). Por outro lado, a toxicidade das amostras de efluentes após tratamento em três municípios do interior de São Paulo foram menos tóxicas para três

espécies de invertebrados aquáticos (*C. sancticaroli* > *D. magna* > *A. inaequalis*) (ISSA, 2019).

O monitoramento de efluentes deve ser contínuo e específico para cada caso, uma vez que a composição dos efluentes industriais e domésticos variam ao longo do tempo (LAQUAZ *et al.*, 2018; PEREAO; AKHARAME; OPEOLU, 2021; SUNDHA *et al.*, 2022). Sabe-se que os efluentes contêm uma complexa mistura de tensoativos, pesticidas, farmacêuticos, microplásticos e outras substâncias além do TBBPA (BAKARAKI TURAN; SARI ERKAN; ONKAL ENGIN, 2021; BISOGNIN *et al.*, 2021; STYSZKO *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2021). Mazzitelli *et al.* (2018) observaram que a riqueza da comunidade de macroinvertebrados foi afetada pelo lançamento de efluentes de águas residuárias no corpo receptor, sendo 90% dos organismos coletados bioindicadores de áreas poluídas, como Oligochaeta e Diptera. Estudos usando amostras de água doce de áreas sem e com poluição por esgoto (Minas Gerais, Brasil) mostraram que a taxa de mortalidade da prole de insetos *Drosophila melanogaster* variou entre 10% em áreas não contaminadas e 80% em áreas contaminadas (DE MORAIS *et al.*, 2018). Esses resultados mostram que apesar dos esforços, a entrada de efluentes no rio está impactando negativamente a biota e é um indicativo da necessidade de melhorias no tratamento e controle da entrada clandestina de efluentes.

A redução de matéria orgânica, sólidos e compostos de interesse podem ser insuficiente para eliminar a toxicidade das amostras, como observado para *C. silvestrii* para o eflu RM e para *C. sancticaroli* para o eflu RA. Zagatto *et al.* (1992), por exemplo, observaram que mesmo com reduções satisfatórias dos parâmetros químicos como DBO (> 60%), carbono (10 – 95%) e nitrogênio (33 – 99,8%), os efluentes sanitários permaneceram tóxicos para *Daphnia similis*. Carneiro *et al.* (2021) constatou que, apesar da remoção de 88% de DQO e acima de 80% para os antibióticos de interesse, o tratamento em reator biológico não foi capaz de reduzir a toxicidade para *A. inaequalis* enquanto após o tratamento foi observado 100% de sobrevivência das larvas de *C. sancticaroli*.

A elevada mortalidade no teste de ecotoxicidade aguda com *C. sancticaroli* no aflu e eflu RA foi inesperada, uma vez que o gênero *Chironomus* é conhecido por sua presença em ambientes rico de matéria orgânica como ETes. A capacidade das larvas

em auxiliar no tratamento de efluentes e reduzir o volume de lodo produzido já foi evidenciada (ZHANG *et al.*, 2015, 2017). Por outro lado, a espécie de microcrustáceo *C. silvestrii* ter sido menos afetadas na imobilidade e reprodução pelo eflu RA também chamou atenção, já que espécies de crustáceos são conhecidas por ser mais sensível às cargas poluidoras (ISSA, 2019; MAZZITELLI *et al.*, 2018).

Além de poder ser aplicado como monitoramento de efluentes, a ferramenta da ecotoxicologia pode ser utilizada durante o desenvolvimento de tecnologias de tratamento, conforme feito nessa pesquisa. Avaliar a melhor tecnologia e configuração de tratamento de efluentes industriais específicos, baseados em estudos de identificação e avaliação ecotoxicológica, apresentam tratamentos mais eficazes na remoção da toxicidade (RAND, 1995). Rizzo (2011) revisaram o uso de bioensaios na avaliação de processos oxidativos avançados como tratamento de água e efluentes e concluíram que os resultados dos bioensaios foram úteis para determinar a melhor condição de operação. Os autores também destacaram a importância das escolhas dos organismos-teste de acordo com o efluente a ser monitorado e da aplicação de testes de ecotoxicidade crônica uma vez que os testes de ecotoxicidade aguda podem ser insuficientes (RIZZO, 2011), como observado nessa pesquisa para o eflu RM *C. sancticaroli* e *D. magna* (mortalidade < 10% e sem imobilidade no 100%, respectivamente).

Da Costa *et al.* (2014) avaliaram a implicação de diferentes tipos de desinfecção (cloro, ácido peracético, ozônio e radiação UV) na toxicidade de efluentes e observaram que o efluente sem desinfecção não causou toxicidade nos organismos testados (*C. silvestrii*, *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* e *Danio rerio*) enquanto todos os efluentes após a desinfecção causaram efeitos negativos às espécies (*C. silvestrii* > *D. rerio* > *D. similis* > *C. xanthus*). Aplicando bioensaios na avaliação de duas configurações de reatores de cama fluidizada (tempos de detenção hidráulico distinto) no tratamento de efluente de lavanderia, Andrade *et al.* (2017) observaram redução satisfatórias da toxicidade das amostras para *Chironomus xanthus* para as duas configurações, com redução de mortalidade de 100% (aflu) a 20% (eflu - 8 h) e de 100%(aflu) a 10% (eflu - 12 h). Han *et al.* (2018) avaliaram a ecotoxicidade de três sistemas de lodos ativados modificados usando como organismo-teste o nematoide *Caenorhabditis elegans* e

observaram que pelos parâmetros físico-químicos, os tratamentos atingiram desempenho satisfatório. Porém, os autores apontaram que apesar da elevada sobrevivência de *C. elegans*, a alteração na frequência respiratória dos indivíduos expostos indicaram uma resposta de sensibilidade aos efluentes.

Oliveira *et al.* (2020), por exemplo, usaram *D. magna* para avaliar duas configurações de tratamento de efluente têxtil e registrou 100% de mortalidade no afluente e efluentes brutos (100%). A taxa de mortalidade nos efluentes tratados começou a diminuir na fração 75% ( $V_{\text{efluente}}$  : Vágua diluição) na primeira configuração e na fração 25% na segunda configuração, concluindo que a primeira configuração uma melhor opção na redução da toxicidade. Da mesma maneira, a aplicação das diluições e comparação entre as configurações de tratamento possibilitou indicar o reator metanogênico como mais adequado na redução da toxicidade no presente estudo. Carvalho *et al.* (2022) avaliaram a qualidade dos efluentes tratados em três sistemas diferentes, um com tratamento secundário (A), um com tratamento terciário por luz UV (B) e outro com tratamento terciário por ozonização (C) por meio das análises físicas e químicas padrões e da ecotoxicidade. Os autores classificaram os efluentes como de boa qualidade e apesar de apenas o efluente A apresentar toxicidade para *D. magna*, para o protozoário *Tetrahymena thermophila* e a microalga *Raphidocelis subcapitata* todos os efluentes causaram inibição de crescimento.

É importante ressaltar que em efluentes domésticos e sanitários reais existe a presença de outros compostos orgânicos e inorgânicos que podem alterar a toxicidade das amostras para a biota aquática e que o tratamento desses efluentes dependem da qualidade inicial dos mesmos (CHEN; LI; WEN, 2017). Além disso, efluentes industriais contêm maiores concentrações de compostos com potencial de toxicidade na biota aquática. Um estudo realizado na Índia com foco na presença de metais no lodo de ETEs, revelou que o potencial de risco ecológico de efluentes de áreas industriais é aproximadamente 30 vezes maior que o de áreas não industriais (SUNDHA *et al.*, 2022).

Assim como os retardantes de chamas, os micro poluentes orgânicos (MPO) também ocorrem em concentrações extremamente baixas e a principal fonte de contaminação ambiental provêm de efluentes. Chen; Li; Wen (2017) analisaram diferentes processos de remoção de MPO e a eficiência de redução da toxicidade aguda

para a bactéria *Vibrio fischeri*. Os autores concluíram que a ozonização foi a tecnologia mais eficiente em remover os MPOs, e apesar de não encontrarem toxicidade aguda nos efluentes após os tratamentos, detectaram presença de atividade estrogênica e genotoxicidade. Apesar da dificuldade de avaliar os efeitos dos compostos presentes nos efluentes na biota aquática, já se sabe da possibilidade dos organismos sofrerem com o potencial de disfunção endócrina desses compostos (mesmo que em baixas concentrações). Markman *et al.* (2007) detectaram quatro disruptores endócrinos, incluindo o bisfenol A ( $< 5 \text{ ng.g}^{-1}$ ) presentes em amostras de oligoquetas terrestre (*Eisenia fetida*) coletadas em biofilmes de ETEs. Os autores também observaram os efeitos dos compostos presentes nos efluentes nos organismos (p.e. produção de hormônio E2, não natural às espécies).

Portanto, ao se falar em toxicidade de efluentes é importante avaliar os fatores: tipo de efluente, qual a melhor tecnologia para redução da toxicidade, quais organismos-teste usar (dando preferência para espécies nativas da região) e frequência do monitoramento. Ressalta-se que cada país deve criar normativas adequadas às características de seus efluentes e que apenas as características físicas, químicas e biológicas podem ser insuficientes para avaliar a qualidade dos efluentes uma vez que essa é uma amostra complexa (CARVALHO *et al.*, 2022; PEREAO; AKHARAME; OPEOLU, 2021). Além disso, há necessidade de se estabelecer limites para os micro poluentes presentes nos efluentes, como fármacos, pesticidas, produtos de higiene e retardante de chamas (CARVALHO *et al.*, 2022).

### 5.3. Teste da Hipótese B – testes convencionais com TBBPA padrão

Os bioensaios foram realizados no LEAA (USP São Carlos) e na Vrije Universiteit - VU (Amsterdam, Holanda). As concentrações das soluções-mãe de TBBPA feitas no LEAA foram quantificadas aplicado a técnica de microextração líquida-líquida com uso de ultrassom-dispersivo, seguido pela separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplado ao método de ionização por *electrospray* e detecção por espectrometria de massa em tandem (MACÊDO *et al.*, 2020). A partir da recuperação das concentrações de TBBPA de  $74,1\% \pm 25,9\%$ , foi realizado um ajuste do intervalo nominal de concentrações proposto. Até o presente momento não foi obtido os resultados das quantificações dos testes realizados na VU cujas amostras foram congeladas e enviadas para o Departamento de Química da VU e, portanto, para *D. magna* e *L. stagnalis* foram consideradas as concentrações nominais.

Os valores dos parâmetros pH e condutividade elétrica para *A. inaequalis*, *P. longisetata*, *C. silvestrii*, *C. sancticaroli*, *D. magna* e *L. stagnalis* estão dispostos no Apêndice I, nas Tabelas S.8, S.9, S.10, S.11, S.12 e S.13 respectivamente.

#### 5.3.3. Teste de toxicidade aguda

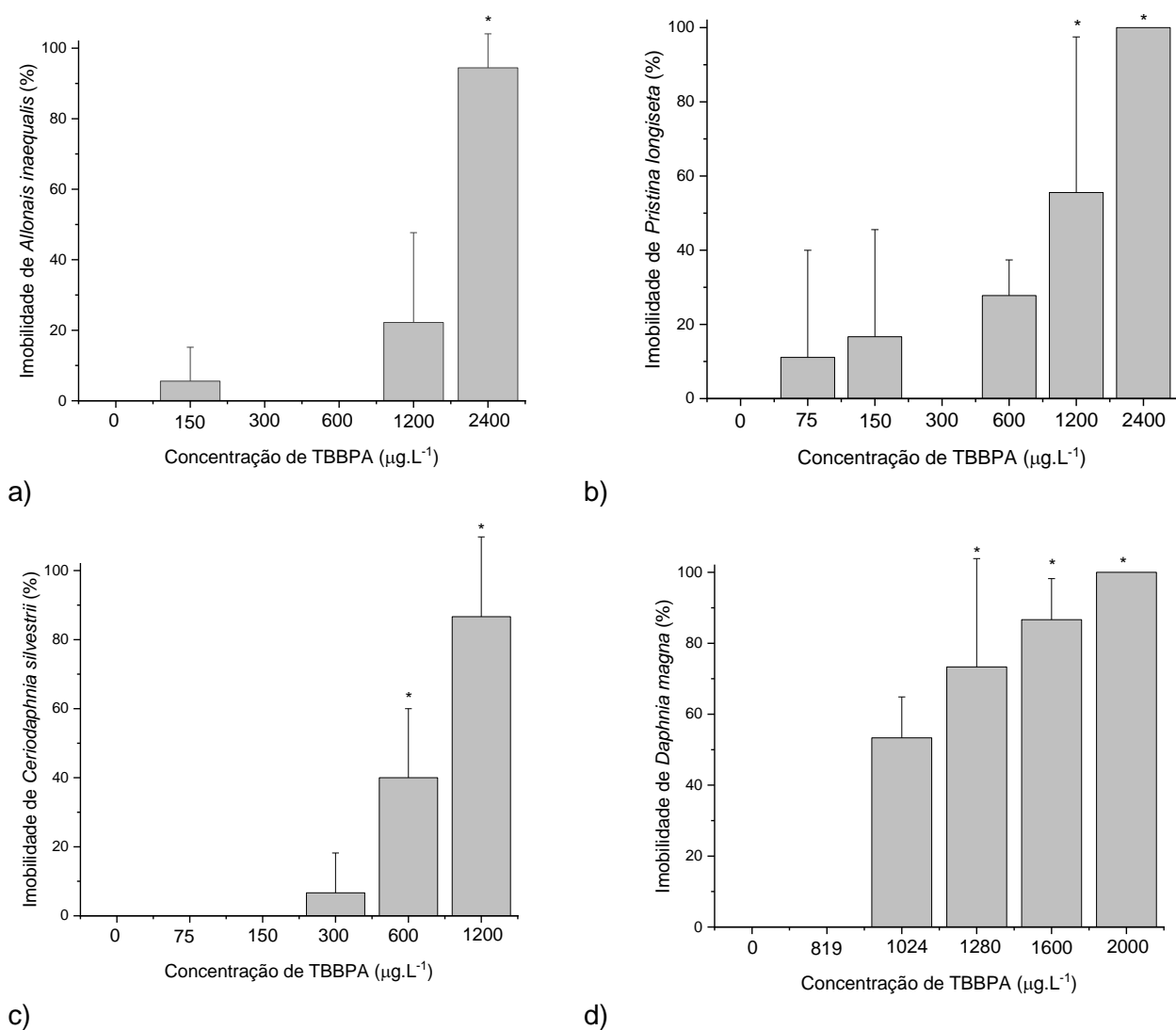
Para todos os bioensaios de toxicidade aguda realizados com TBBPA, o controle positivo (contendo 0,01% de solvente) possuiu resultados estatisticamente similares ao controle negativo (apenas o meio de teste) para todas as espécies ( $p > 0,05$ , Teste T). Portanto, os resultados apresentados nos gráficos e tabelas de comparação estatísticas consideraram como controle a média dos resultados do controle positivo e do controle negativo.

Os resultados dos bioensaios de toxicidade aguda mostrou que para *A. inaequalis* até a concentração de  $1200 \mu\text{g.L}^{-1}$  a imobilidade foi abaixo de 30%, enquanto para  $2400 \mu\text{g.L}^{-1}$  ela sobre acima de 90% (Figura 5.21.a). O outro oligoqueta analisado, *P. longisetata*, se mostrou mais sensível ao TBBPA, com imobilidade acima de 50% na concentração  $1200 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 5.21.b). O microcrustáceo *C. silvestrii* apresentou imobilidade média de 40% na concentração  $600 \mu\text{g.L}^{-1}$  e de 100% em  $1200 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 5.21.c). Já para o crustáceo *D. magna* não foi observada imobilidade na



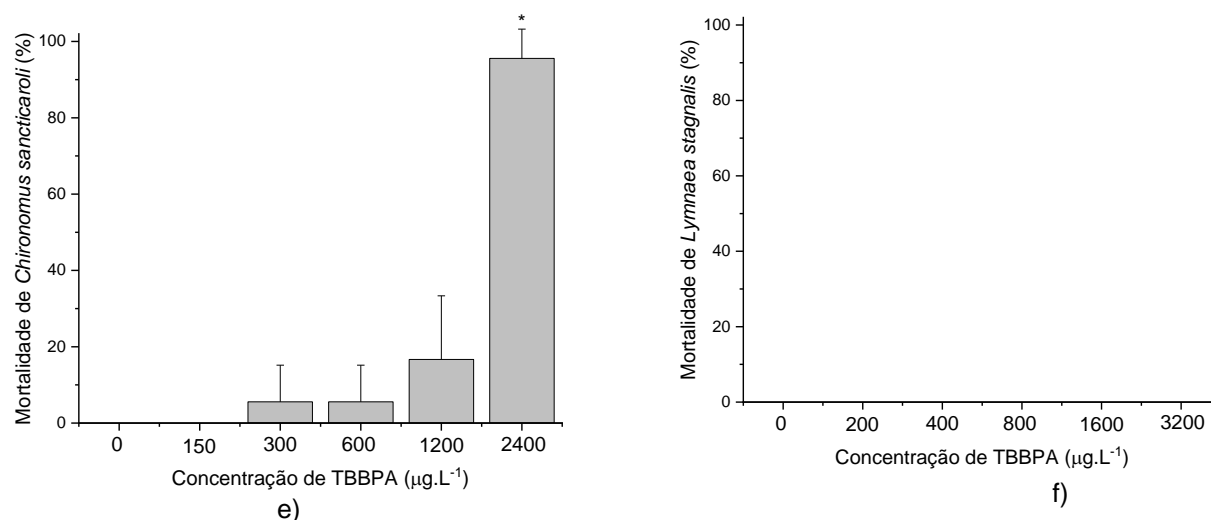
concentração de 819  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e a partir de 1024  $\mu\text{g.L}^{-1}$  mais de 40% dos indivíduos ficaram imóveis (Figura 5.21.d). Assim como para *A. inaequalis*, as larvas do inseto *C. sancticaroli* apresentaram elevada mortalidade (acima de 90%) apenas na concentração de 2400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 5.21.e). não foi observada mortalidade para *L. stagnalis* no intervalo de concentrações testadas (Figura 5.21.f). Não foi possível dissolver TBBPA em concentração acima de 3200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  respeitando a concentração máxima de solvente de 0,01%.

Figura 5.21 - Taxa de imobilidade ou mortalidade para a) *Allonais inaequalis*; b) *Pristina longiseta*; c) *Ceriodaphnia silvestrii*, d) *Daphnia magna*, e) *Chironomus sancticaroli* e f) *Lymnaea stagnalis* quando expostos em teste de toxicidade aguda ao TBBPA padrão.



continua

Continuação Tabela 5.21



Fonte: Autoria própria (2022). \* representa as diluições que se apresentaram estatisticamente diferente do controle.

Os resultados do Teste Kruskal-Wallis mostraram que para todas as espécies, com exceção de *L. stagnalis*, houve diferença estatisticamente significativa nas respostas de imobilidade ou mortalidade entre as concentrações de TBBPA testadas e o controle (p-valor < 0,05) (Tabela 5.14). O teste à *posteriori* Dunn confirmou que para as espécies *A. inaequalis* e *C. sancticarloi* apenas a maior concentração testada causou imobilidade ou mortalidade significativamente superior à observada para o controle, enquanto nas demais espécies mais de uma concentração foi significativamente diferente do controle (p-valor < 0,05) (Tabela 5.14).

Tabela 5.14 - Comparação entre as concentrações de TBBPA e controle pelo teste não-paramétrico Kruskal Wallis e concentrações de TBBPA que foram estatisticamente diferentes do controle (p-valor do teste Dunn). Nível de significância de 95%.

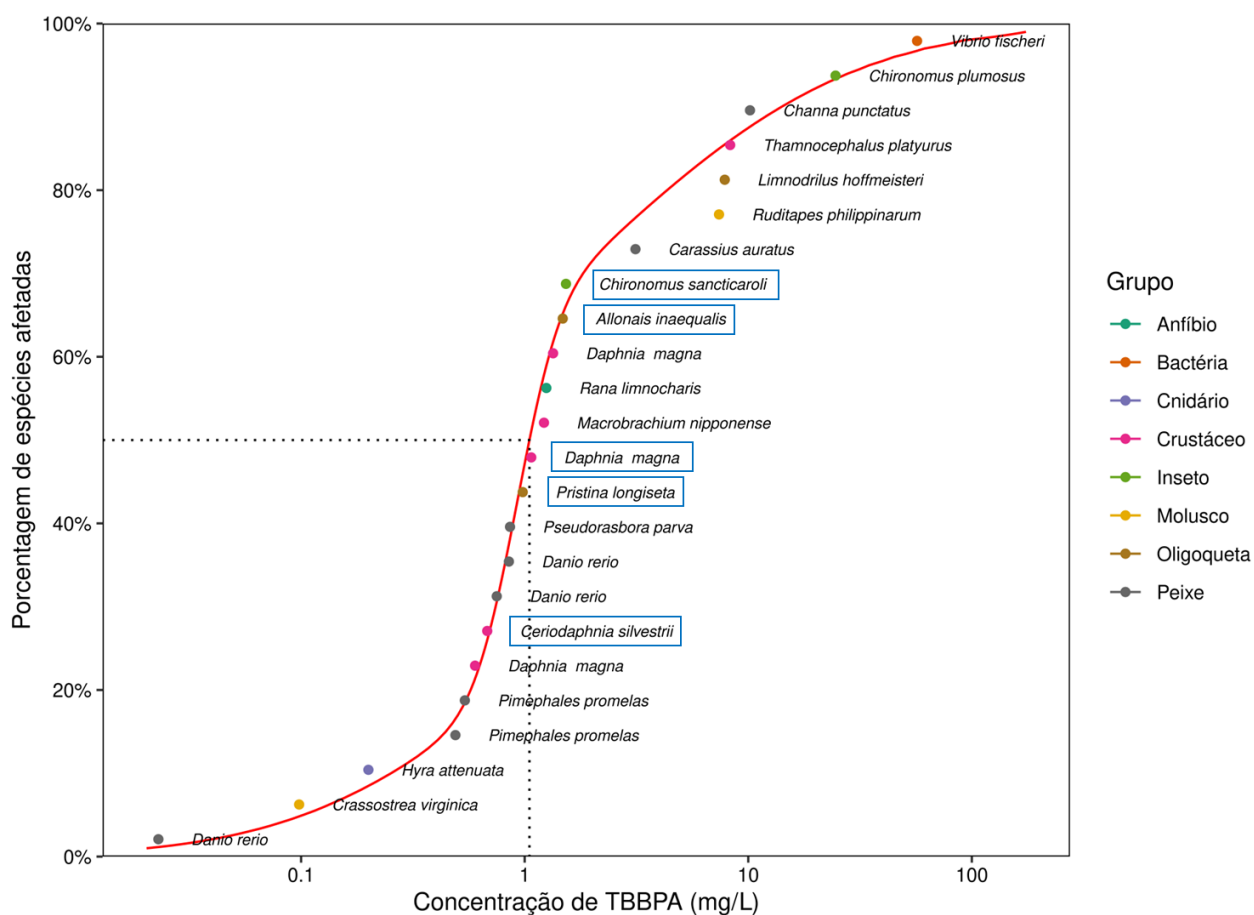
	<i>A. inaequalis</i>	<i>P. longiseta</i>	<i>C. silvestrii</i>	<i>D. magna</i>	<i>C. sancticarloi</i>	<i>L. stagnalis</i>
<b>p-valor Kruskal Wallis</b>	0,0214	0,0148	0,0088	0,0097	0,0466	n.a.
<b>Concentrações diferentes do controle</b>	2400 µg.L <sup>-1</sup> (0,0041)	1200 µg.L <sup>-1</sup> (0,0230) e 2400 µg.L <sup>-1</sup> (0,0027)	600 µg.L <sup>-1</sup> (0,0364) e 1200 µg.L <sup>-1</sup> (0,0046)	1280 µg.L <sup>-1</sup> (0,0483), 1600 µg.L <sup>-1</sup> (0,0198) e 2000 µg.L <sup>-1</sup> (0,0030)	2400 µg.L <sup>-1</sup> (0,0033)	n.a.

Fonte: Autoria própria (2022). n.a = não se aplica devido à ausência de toxicidade

### 5.3.3.1. TBBPA: concentrações de efeito de toxicidade aguda, curva SSD e coeficiente de risco de toxicidade aguda

As concentrações de efeito na imobilidade e mortalidade em 50% dos indivíduos variou entre 678  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 1526  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e seguiram a ordem *C. silvestrii* > *P. longiseta* > *D. magna* > *A. inaequalis* > *C. sancticaroli* >>> *L. stagnalis* (Tabela 5.15). A curva de distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) foi feita com as informações descritas na Tabela 3.2 e Tabela 5.15. A curva que mais se adequou a distribuição dos dados foi a Inormal\_Inormal (Figura 5.22) e a concentração de efeito em 5% e 50% das espécies ( $\text{HC}_{50}$ ) foram 0,10  $\text{mg.L}^{-1}$  (100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e 1,05  $\text{mg.L}^{-1}$  (1050  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), respectivamente.

Figura 5.22 – Curva de distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) de ecossistemas aquáticos expostos ao TBBPA em testes de ecotoxicidade aguda. Em destaque, os resultados da presente pesquisa.



Fonte: Autoria própria (2022).

Para a estimativa do coeficiente de risco foram utilizadas as concentrações máximas detectadas em ecossistemas lêntico (lagos – 4,87  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e lótico (rios – 0,92  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). O risco ecotoxicológico para as espécies estudadas considerando a concentração máxima detectada em lagos foi baixo, com coeficiente de risco variando de 3,19 (*C. sancticaroli*) a 7,18 (*C. silvestrii*) (Tabela 5.15). Ao considerar a concentração máxima detectada em rios, o risco ecotoxicológico foi insignificante para todas as espécies (CR < 1), com exceção de *C. silvestrii*, que apresentou baixo risco (CR de 1,36).

Tabela 5.15- Valores de concentrações de efeito (CE) que causou efeito em 50 e 10% dos indivíduos ( $\text{CE}_{50}$ ,  $\text{CE}_{10}$ ) para *A. inaequalis*, *P. longiseta*, *C. silvestrii*, *C. sancticaroli* e *D. magna* e *L. stagnalis* após bioensaio de toxicidade aguda com TBBPA.

	<i>A. inaequalis</i>	<i>P. longiseta</i>	<i>C. silvestrii</i>	<i>D. magna</i>	<i>C. sancticaroli</i>	<i>L. stagnalis</i>
<b>CE<sub>50</sub> (%)</b>	1483,83	976,72	678,55	1070,47	1526,01	n.a.
<b>CE<sub>10</sub> (%)</b>	1023,01	401,50	347,15	782,02	1096,63	n.a.
<b>CRlagos</b>	3,29	4,98	7,18	4,55	3,19	n.a.
<b>Risco</b>	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	Baixo risco	n.a.
<b>CRrios</b>	0,62	0,94	1,36	0,86	0,60	n.a.
<b>Risco</b>	Risco insignificante	Risco insignificante	Baixo risco	Risco insignificante	Risco insignificante	n.a.

Fonte: Autoria própria (2022). n.a = não se aplica devido à ausência de toxicidade

#### 5.3.4. Teste de toxicidade crônica

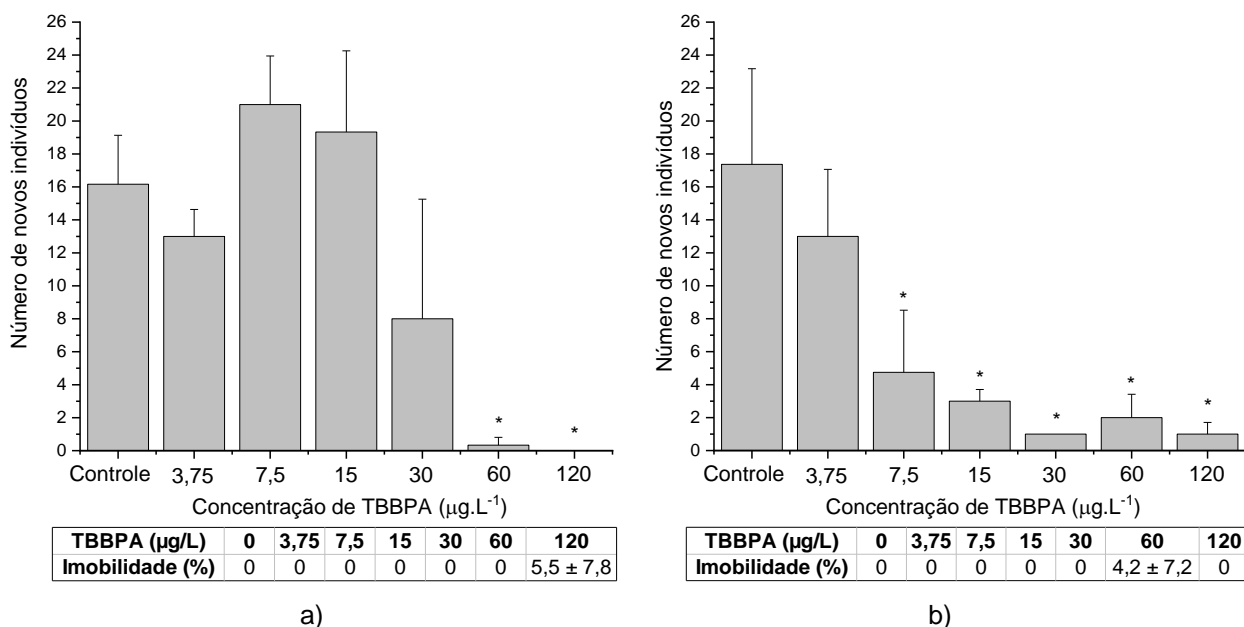
Para todos os bioensaios de toxicidade crônica realizados com TBBPA, o controle positivo (contendo 0,01% de solvente) possuiu resultados estatisticamente similares ao controle negativo (apenas o meio de teste) para todas as espécies. Portanto, os resultados apresentados a seguir consideraram como controle a média dos resultados do controle positivo e do controle negativo.

##### 5.3.4.1. *Allonais inaequalis* e *Pristina longiseta*

Não foi observada imobilidade acima de 10% para *A. inaequalis* e *P. longiseta* durante o bioensaio de toxicidade crônica (Figura 5.23.a e b). Comparado ao número médio de novos indivíduos no controle (16 novos), houve um aumento na reprodução de

*A. inaequalis* nas concentrações 7,5 e 15  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (21 e 19 novos organismos respectivamente) e uma queda brusca em 30  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (8 novos organismos) seguida pela ausência de novos indivíduos em 60 e 120  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 5.23a). Para *P. longiseta* houve queda na reprodução com o aumento da concentração de TBBPA, sendo observada queda de número médio de novos organismos de 17 (controle) para 5 (7,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Figura 5.23b). O teste estatístico Kruskal-Wallis indicou que houve diferença estatisticamente significativa entre o número de novos organismos entre as concentrações testadas (p-valor de 0,0014 e 0,0008 para *A. inaequalis* e *P. longiseta*, respectivamente). As concentrações cuja reprodução foi estatisticamente diferente do controle para *A. inaequalis* foram 60 e 1205  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (p-valor do Dunns` teste de 0,0118), enquanto para *P. longiseta*, apenas a concentração 3,75  $\mu\text{g.L}^{-1}$  teve número de novo indivíduos similar ao controle (p-valor do Dunn`s teste de 0,6495).

Figura 5.23 – Reprodução (número de novos indivíduos) e imobilidade observados para a) *Allonais inaequalis* (10 d) e b) *Pristina longiseta* (7 d) quando expostos em teste de toxicidade crônica ao TBBPA padrão.

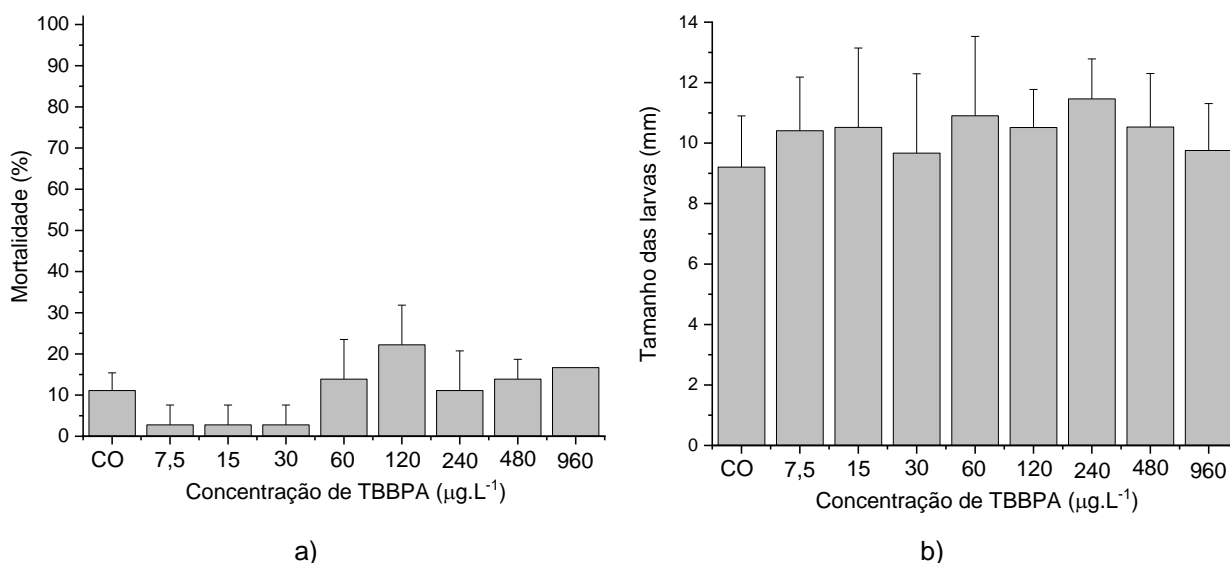


Fonte: Autoria própria (2022). \* representa as concentrações que se apresentaram estatisticamente diferente do controle.

### 5.3.4.2. *Chironomus sancticaroli*

Com relação ao teste de emergência com *C. sancticaroli*, não foi observada mortalidade significativa nas concentrações testadas (< 23%) ou diferenças significativas entre o controle e as concentrações testadas (p-valor > 0,05, Dunn`s teste) (Figura 5.24.a). O comprimento médio das larvas variou de 9,2 mm (controle) a 11,5 mm (240  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Figura 5.24.b), comprimentos próximos ao esperado para a espécie (TRIVINHO-STRIXINO, 1980) e sem diferença estatisticamente significativa entre as medições (p-valor de 0,1249, *One-Way ANOVA*).

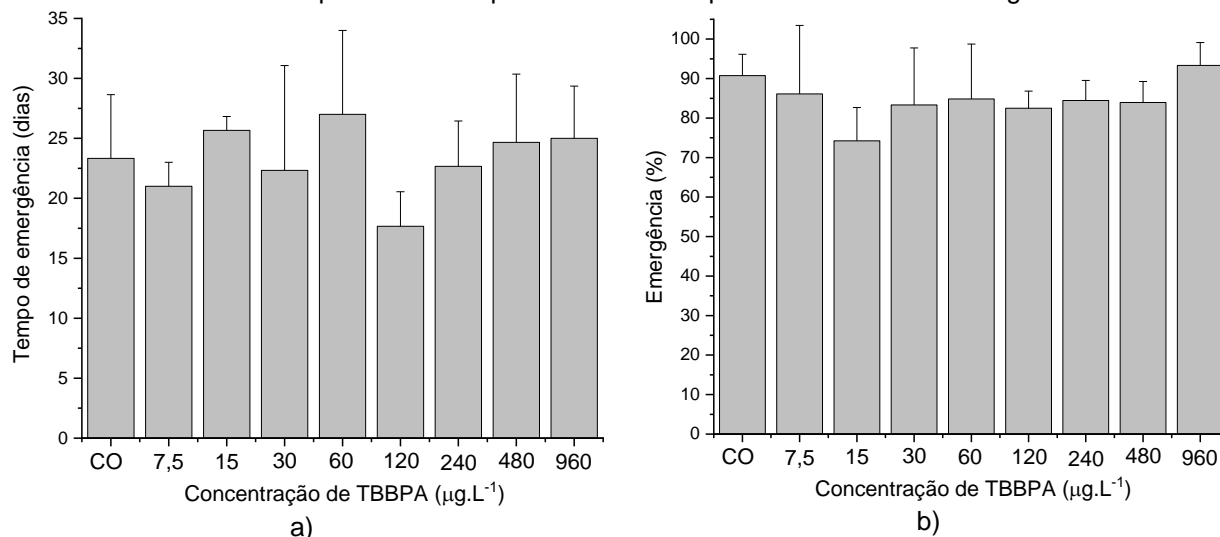
Figura 5.24 – Mortalidade (a) e comprimento (b) das larvas de *Chironomus sancticaroli* após exposição 10 dias em teste de toxicidade crônica ao TBBPA padrão.



Fonte: Autoria própria (2022).

O tempo de emergência dos adultos variou entre 17 dias (120  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e 26 dias (60  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Figura 5.25.a) e nenhuma concentração apresentou tempo de emergência estatisticamente diferente do controle (p-valor de 0,5278 *One-Way ANOVA*). Não foi observada diferença significativa entre a taxa de emergência das amostras expostas ao TBBPA e o controle (p-valor de 0,4204 *One-Way ANOVA*), sendo a taxa mínima de reprodução de 74% em 15  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 5.25.b)

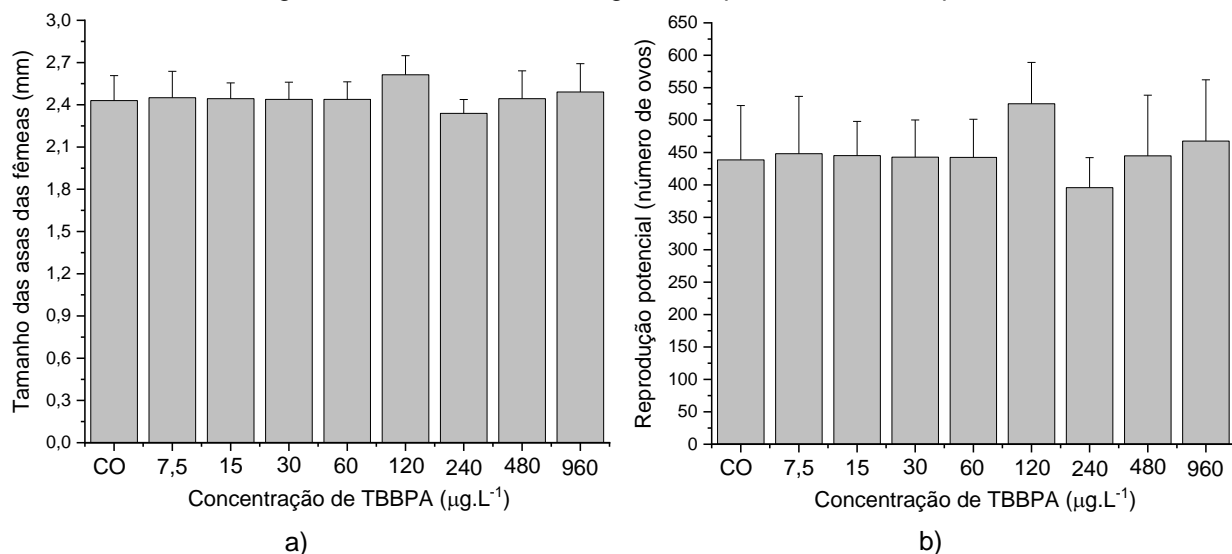
Figura 5.25 – Tempo de emergência (a) e taxa de emergência (b) das larvas de *Chironomus sancticaroli* sobreviventes após 10 dias expostas ao TBBPA padrão em teste de emergência.



Fonte: Autoria própria (2022).

O tamanho médio das asas foram estatisticamente similares entre si ( $p$ -valor de 0,0645, *One-Way ANOVA*) e variou de 2,34 mm (240 µg.L<sup>-1</sup>) a 2,61 mm (120 µg.L<sup>-1</sup>) (Figura 5.26.a). A fecundidade potencial das fêmeas variou de 395 ovos a 525 ovos (240 µg.L<sup>-1</sup>), com média geral para todas as concentrações usadas de 450 ovos (Figura 5.26.b).

Figura 5.26 – Tamanho das asas (a) e reprodução potencial (b) das fêmeas de *Chironomus sancticaroli* emergidas durante teste de emergência expostas ao TBBPA padrão.



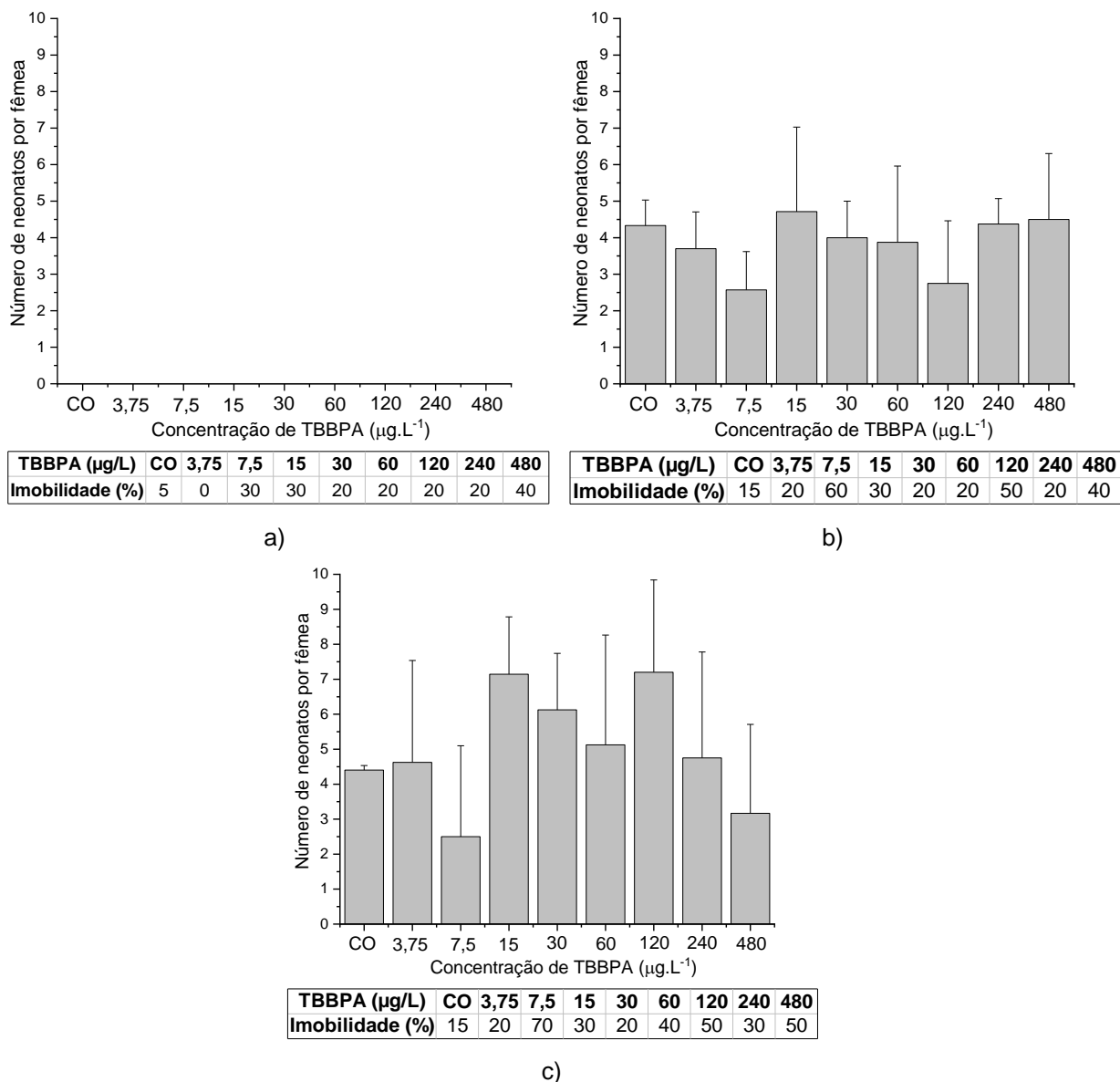
Fonte: Autoria própria (2022).

### 5.3.4.3. *Ceriodaphnia silvestrii*

Foram observadas imobilidades de 20% para as concentrações 30, 60, 120 e 240  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , de 30% para 7,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e de 40% para 480  $\mu\text{g.L}^{-1}$  no dia da primeira troca do meio (Figura 5.27.a). Na segunda troca do meio, o número médio de neonatos por fêmea variou de 2,7 (120  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) a 4,7 (15  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Figura 5.27.b). A imobilidade no controle foi de 15% e a maior imobilidade foi na concentração 7,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 5.27.b). Ao final do teste não foi possível fazer uma relação direta entre a imobilidade e as concentrações de TBBPA, já que a maior imobilidade foi observada em 7,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (70%), enquanto nas duas maiores concentrações a imobilidade foi de 30% (240  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e 50% (480  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Figura 5.27.c). Com exceção das concentrações 7,5 e 480  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , a reprodução nos béqueres expostos ao TBBPA foi superior à observada no controle (média de 4,4 novos indivíduos) (Figura 5.27.c). Apesar do teste *One-Way ANOVA* apontar diferença significativa no número total de neonatos ao final do teste entre as concentrações usadas (p-valor de 0,0052), o teste *posteriori* Dunn mostrou que essa diferença não está na comparação entre controle e TBBPA (p-valor > 0,05).



Figura 5.27 – Reprodução (número médio de neonatos por fêmea) e imobilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* após exposição de a) 3 dias, b) 5 dias e c) 7 dias em teste de toxicidade crônica ao TBBPA padrão.



Fonte: Autoria própria (2022).

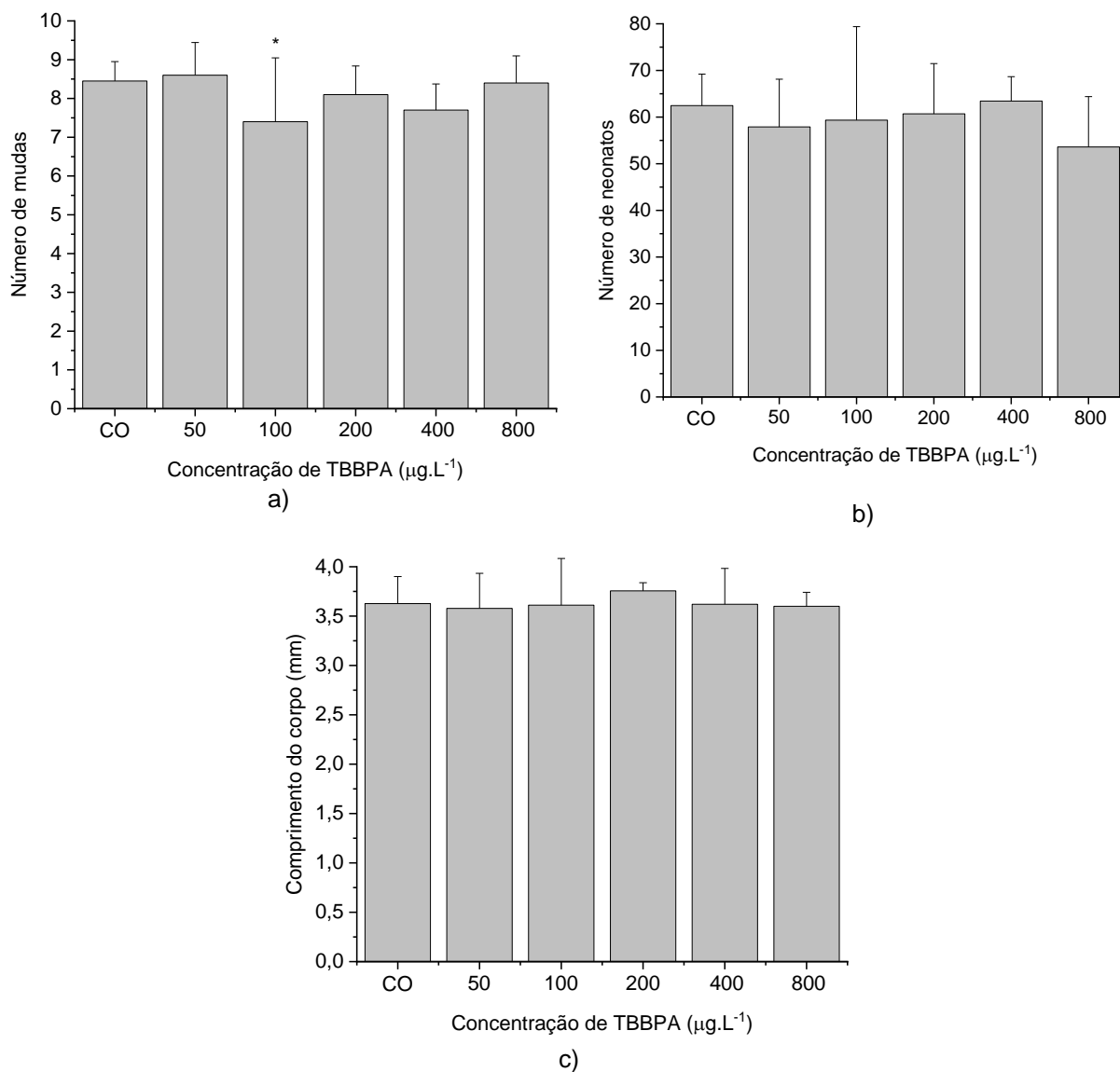
#### 5.3.4.4. *Daphnia magna*

Para a exposição de toxicidade crônica para *D. magna* foi observada imobilidade de 10% no dia 21 para controle, dia 9 para 100 µg.L<sup>-1</sup> e dia 19 para 50 µg.L<sup>-1</sup>. Além disso, foi contabilizada a presença de machos em no máximo 10% das réplicas nas

concentrações controle, 50, 100, 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . A imobilidade de 10% em 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  nos primeiros dias de teste impactou significativamente no número médio de mudas ao final do teste (caindo de 8,45 mudas no controle para 7,4 mudas em 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , p-valor de 0,0333 no teste *posteriori* Tukey) (Figura 5.28.a).

Para a construção do gráfico referente à reprodução foram excluídas as réplicas dos machos (zero neonatos gerados). O número médio de neonatos produzidas foram estatisticamente similares em todas as concentrações testadas (p-valor de 0,3663, *One-Way ANOVA*) e variaram de 54 (800  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) a 63 (400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Figura 5.28.b). O tamanho das mães ao final do teste também foi similar entre as concentrações testadas (p-valor de 0,877, *One-Way ANOVA*), variando de 3,58 mm (50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) a 3,75 mm (200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Figura 5.28.c).

Figura 5.28 – Teste de ecotoxicidade crônica com *Daphnia magna* a) número de mudas, b) número de neonatos e c) comprimento do corpo ao final da exposição.



Fonte: Autoria própria (2022).

Apesar das oscilações entre o número total médio de mudas (Figura 5.28.a) e neonatos (Figura 5.28.b) nas concentrações testadas, segundo classificação proposta por De Lima e Silva *et al.* (2022) nenhuma das concentrações investigadas causaram efeito de indução ou inibição (% $I_M$  e % $I_N$  entre -14,2% e +1,8%) (Tabela 5.16).

Tabela 5.16- Índice de inibição ou indução de mudas (%Im) e neonatos (%In) aplicado para teste de ecotoxicidade crônica (21 d) com *Daphnia magna*.

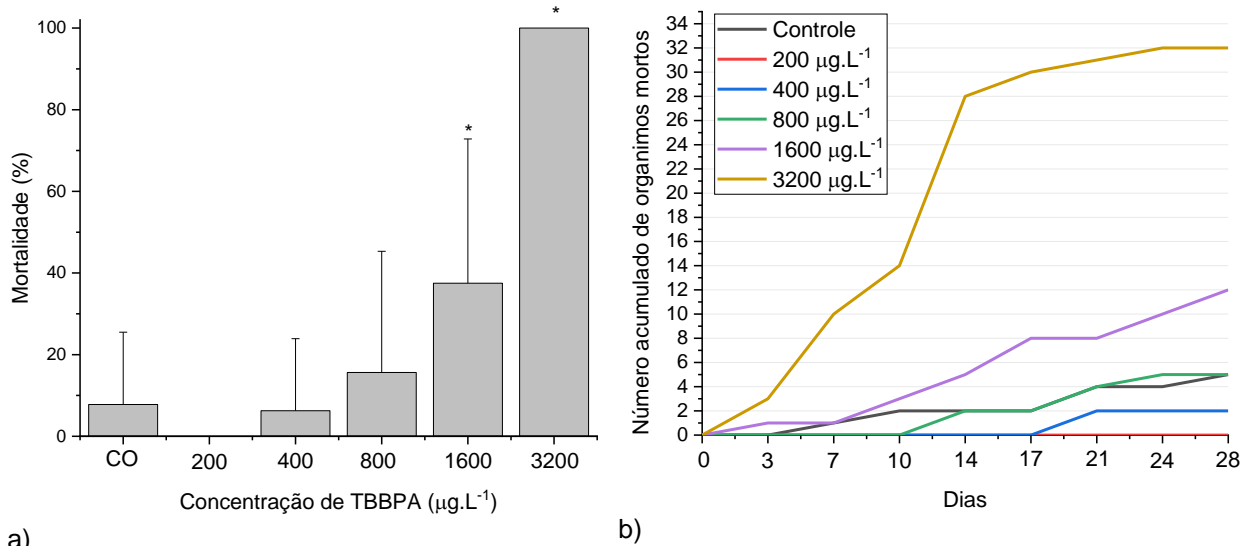
	C	50	100	200	400	800
<b>A2 Mudanças</b>	8,45	8,6	7,4	8,1	7,7	8,4
<b>%I</b>		+1,8%	-12,4%	-4,1%	-8,9%	-0,6%
<b>A2 Neonatos</b>	63,11	52,1	53,4	60,7	57,1	53,6
<b>%I</b>		-7,3%	-5,0	-2,8%	+1,6%	-14,2%

Fonte: Autoria própria (2022).

#### 5.3.4.5. *Lymnaea stagnalis*

Para o molusco *L. stagnalis*, a partir da concentração 800  $\mu\text{g.L}^{-1}$  é possível ver aumento da mortalidade com relação ao aumento da concentração de TBBPA, chegando a 100% de mortalidade em 3200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 5.29.a). Acompanhando a mortalidade ao longo do bioensaio é possível perceber que em 3200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  este foi brusco nos primeiros 14 dias de teste, enquanto para 1600  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , há um aumento entre os dias 7 e 17 e após o dia 21 (Figura 5.29.b). Segundo resultados do teste Kruskal-Wallis, as concentrações de TBBPA influenciaram na sobrevivência dos indivíduos (p-valor de  $1,409 \cdot 10^{-1}$ ), e o teste *posteriori* Dunn indicou que as concentrações 1600 e 3200 apresentaram taxa de sobrevivência diferente do controle ( p-valor de  $0,0171$  e  $1,11 \cdot 10^{-6}$ ).

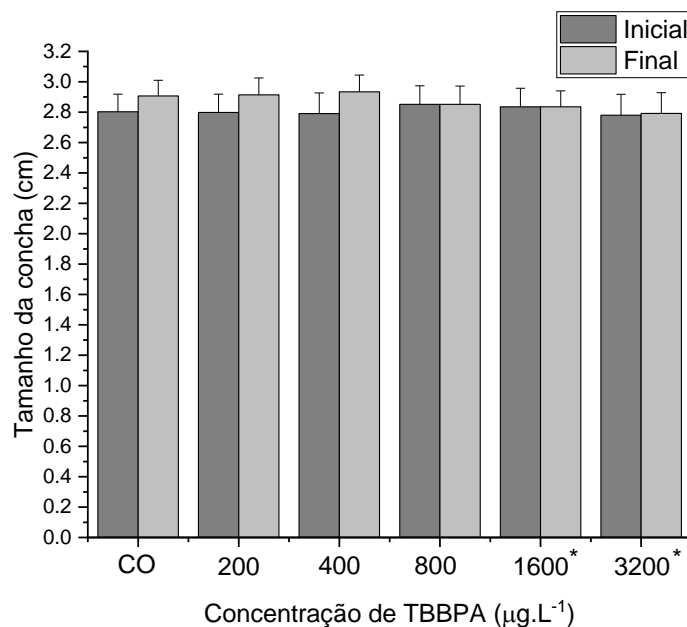
Figura 5.29 – Mortalidade de *Lymnaea stagnalis* durante exposição de toxicidade crônica ao TBBPA: a) média e desvio da mortalidade ao final dos 28 dias e b) número de organismos mortos a cada troca do meio.



Fonte: Autoria própria (2022). \* significa diferença estatística entre a concentração de TBBPA e o controle

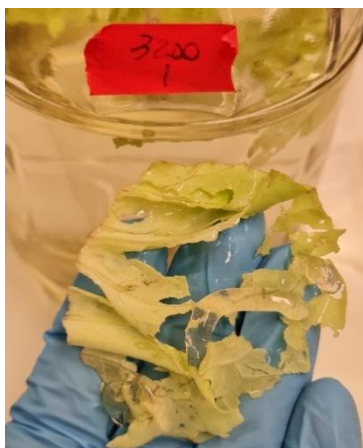
Observando a Figura 5.30 é possível notar que no controle, 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 400  $\mu\text{g.L}^{-1}$  há presença de crescimento dos organismos entre o início e final do teste, enquanto nas concentrações maiores isso não foi constatado. Aplicando o teste *Two-Way* ANOVA é possível observar que o tamanho médio das conchas foi influenciado pela concentração de TBBPA ( $p$ -valor de  $6,44 \cdot 10^{-6}$ ), sendo o comprimento final estatisticamente diferente do inicial ( $p$ -valor de  $1,15 \cdot 10^{-16}$ ). Aplicando o teste *posteriori* Tukey, o tamanho final das conchas nas concentrações 1600 e 3200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  foram estatisticamente diferente do controle ( $p$ -valor dde  $0,0129$  e  $2,27 \cdot 10^{-6}$ , respectivamente). No controle e nas concentrações 200, 400 e 800  $\mu\text{g.L}^{-1}$  o crescimento significativo dos indivíduos foi confirmado pelo teste *posteriori* Tukey ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). Além da diminuição do crescimento, foi observada a diminuição do consumo de alface adicionado no teste em 3200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 5.31).

Figura 5.30 – Tamanho médio das conchas de *Lymnaea stagnalis* após exposição de toxicidade crônica (28 d) ao TBBPA padrão.



Fonte: Autoria própria (2022). \* significa diferente estatisticamente do controle ( $p < 0,05$ , *Two-Way ANOVA*, interação)

Figura 5.31 – Alface não consumido por *Lymnaea stagnalis* após exposição ao TBBPA padrão.

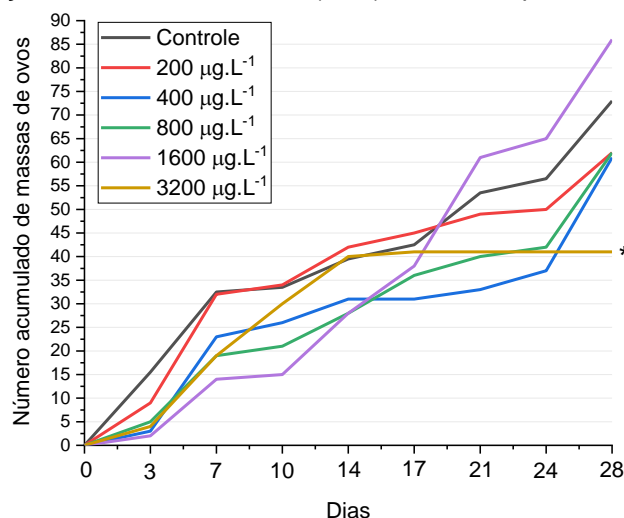


Fonte: Autoria própria (2022).

Por último, a capacidade reprodutiva dos organismos foi avaliada por meio da contagem das massas de ovos produzidos por réplica e, apesar da queda no número de massas de ovos produzidas na concentração  $3200 \mu\text{g.L}^{-1}$ , houve uma maior produção de massas ovígeras pelos indivíduos exposto à  $1600 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 5.32). O teste *One-Way ANOVA* evidenciou que a quantidade de massas de ovos produzidas nas concentrações

testadas foram estatisticamente diferentes (p-valor de 0,0047). O teste de Tukey apontou que a concentração  $3200 \mu\text{g.L}^{-1}$  foi estatisticamente diferente do controle (p-valor de 0,0096).

Figura 5.32 – Número médio de massas de ovos produzidos por *Lymnaea stagnalis* ao longo da exposição de toxicidade crônica (28 d) ao TBBPA padrão.



Fonte: Autoria própria (2022). \* significa diferença estatística entre a concentração de TBBPA e o controle

#### 5.3.4.6. TBBPA: concentrações de efeito e coeficiente de risco de toxicidade crônica

A concentração de efeito na imobilidade e mortalidade em 50% dos indivíduos só foi possível de ser calculada para *L. stagnalis* ( $1742 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), para as demais espécies a  $CE_{50}$  é superior a maior concentração utilizada nos bioensaios. Foi possível calcular a concentração de efeito na reprodução para três das seis espécies e a ordem de toxicidade seguiu a ordem *P. longiseta* ( $5,03 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) > *C. silvestrii* ( $9,27 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) > *A. inaequalis* ( $29,73 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Tabela 5.17).

O coeficiente de risco de toxicidade crônica foi calculado usando a Equação 3.8 para o efeito reprodução e, portanto, pode ser calculado para *A. inaequalis*, *P. longiseta* e *C. silvestrii* (Tabela 5.17). O risco ecotoxicológico para as espécies estudadas considerando a concentração máxima detectada em lagos foi baixo, com coeficiente de risco variando de 3,19 (*C. sancticaroli*) a 7,18 (*C. silvestrii*). Ao considerar a concentração

máxima detectada em rios, o risco ecotoxicológico foi insignificante para todas as espécies ( $CR < 1$ ), com exceção de *C. silvestrii*, que apresentou baixo risco ( $CR$  de 1,36).

Tabela 5.17- Valores de concentrações de efeito que causou de imobilidade ou mortalidade em 50% e dos indivíduos  $CE_{50}$  M) e em 50% e 10% da reprodução dos indivíduos ( $CE_{10/50}$  R) para *A. inaequalis*, *P. longiseta*, *C. silvestrii*, *C. sancticaroli* e *D. magna* e *L. stagnalis* após bioensaio de toxicidade crônica com TBBPA. Nível de significância de 95%.

	<i>A. inaequalis</i>	<i>P. longiseta</i>	<i>C. silvestrii</i>	<i>D. magna</i>	<i>C. sancticaroli</i>	<i>L. stagnalis</i>
$CE_{50}$ M ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	> 640	> 160.	n.a.	n.a.	> 960	1741,9
$CE_{50}$ R ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	29,73	5,03	9,27	> 800	> 960	> 3200
$CE_{10}$ R ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	25,58	2,49	8,44	> 800	> 960	> 3200
<b>CRlago</b>	19,04	195,58	57,70	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Risco</b>	Médio risco	Alto risco	Médio risco	n.a.	n.a.	n.a.
<b>CRrios</b>	3,59	36,95	10,90	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Risco</b>	Baixo risco	Médio risco	Médio risco	n.a.	n.a.	n.a.

Fonte: Autoria própria (2022). n.a = não se aplica.

### 5.3.5. Discussão sobre os impactos do TBBPA para a biota

Apesar do TBBPA ser um dos retardantes de chama mais consumidos no mundo (RESEARCH AND MARKETS, 2022), há poucos estudos focados na detecção desse composto em águas doces e a maioria desses estudos se concentram na China (Tabela 3.1, item 3.3). Um dos empecilhos que dificultam os estudos envolvendo o TBBPA é a necessidade de tecnologias e metodologias específicas (métodos analíticos como cromatografia líquida, espectrometria de massa, cromatografia gasosa, entre outros) para a identificação e quantificação desse composto, que podem variar para cada tipo de matriz (biótica ou abiótica) (OKEKE *et al.*, 2022; QU *et al.*, 2016). Outra dificuldade encontrada para as espécies mais resistentes ao TBBPA foi a diluição do composto respeitando o limite de solvente de 0,01% (v:v), mantendo o pH da solução-teste em no máximo 10, o que ocasionou a limitação do intervalo de concentrações testadas. Na revisão realizada por Pittinger e Pecquet (2018) a adição do solvente para a realização dos bioensaios não causou toxicidade nas espécies, porém os autores chamaram a atenção para o surgimento da precipitação do TBBPA em testes com intervalo de concentrações acima do limite de solubilidade.



De forma geral, foi observado um aumento da imobilidade ou mortalidade junto com o aumento das concentrações de TBBPA, sendo essa relação entre dose de TBBPA e resposta tóxica observada por outros autores, como em Hu *et al.* (2015a,b) e Yang *et al.* (2012a,b). Foi recuperado apenas um estudo utilizando oligoqueta da família Naididae (*Limnodrilus hoffmeisteri*), que aplicou o intervalo de concentrações de 500 a 17920  $\mu\text{g.L}^{-1}$  usando o etanol como solvente (YANG *et al.*, 2012a). A concentração de efeito calculada pelos autores foi de  $\text{CE}_{50}$  (96 h - 7852  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), aproximadamente 7,5 vezes maior comparado ao de *A. inaequalis* (96 h - 1483  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e 8 vezes maior que o calculado para *P. longiseta* (48 h - 976  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

Cinco estudos recuperados avaliaram a toxicidade do TBBPA em crustáceos com intervalos de concentrações diferentes entre si e variando de 50 a 6400  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . A  $\text{CE}_{50}$  calculada para *C. silvestrii* de 678  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (48 h) foi muito próxima da calculada por Waaijers *et al.* (2013) para *D. magna* de 600  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (48 h). Já a  $\text{CE}_{50}$  calculada para *D. magna* (48 h - 1070  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) ficou acima da encontrada por Waaijers *et al.* (2013) e abaixo da calculada por Yang *et al.* (2012a) (48 h - 1336  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Pittinger e Pecquet (2018) não observaram imobilidade de *D. magna* nas concentrações testadas (1200 e 1800  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). A espécie de camarão *Macrobrachium nipponense* possui sensibilidade próxima à *D. magna* com  $\text{CE}_{50}$  calculado de 1216  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para exposição de 96 h. As larvas de *C. sancticaroli* se mostraram extremamente mais sensíveis ao TBBPA quando comparado com *Chironomus plumosus*, com  $\text{CE}_{50}$  16 vezes menor do que à encontrada por Yang *et al.* (2012a). Vale ressaltar que o intervalo de concentrações usados no teste realizado por Yang *et al.* (2012a) foi de 1,6 a 102,4  $\text{mg.L}^{-1}$ , muito superior a capacidade de diluição do composto e que não foi informado a concentração de solvente usado, apenas que não foi observada mortalidade no controle positivo.

Outros efeitos não relacionados à mortalidade foram observados para o peixe *Danio rerio* em exposição de toxicidade aguda (96 h), como a má formação na desova e edema pericárdio (concentração > 500  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e alteração no fluxo sanguíneo (concentração > 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (YANG *et al.*, 2014). Os autores também observaram genotoxicidade em concentrações a partir de 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , com acréscimo de P53 (gene que desempenha um papel importante no controle do ciclo celular, reparação de DNA e indução de morte celular) e decréscimo em Bcl2 (gene relacionado ao controle de morte

celular), TBx1, Raldh2 e Bmp2b (genes que possuem papel importante no desenvolvimento cardíaco). Outra pesquisa realizada com peixe *D. rerio* também observou má formação, edema pericárdico, deficiência cerebral, cardíaca e sanguínea induzidas pelo TBBPA (WU *et al.*, 2015). Outros efeitos comportamentais foram observados para a espécie de peixe *Chana punctatus* como hiperatividade, perda de equilíbrio e natação, alteração na pigmentação e secreção do muco (SHARMA; CHADHA; SAINI, 2018).

Observando a curva SSD, não foi possível evidenciar uma tendência entre os grupos de organismos mais sensíveis, apesar da espécie de peixe *Danio rerio* ser o mais sensível ao composto. Pensando na distribuição da sensibilidade das espécies, se considerarmos a proteção a 95% da biota aquática e o HC<sub>5</sub> de 0,102 mg.L<sup>-1</sup> como o limite máximo de concentração a ser tolerado em corpos hídricos, todas as espécies estudadas nesta pesquisa estariam fora de perigo no que diz respeito a mortalidade/imobilidade. Nesse caso, a concentração do TBBPA presente nos efluentes dos reatores RA e RM testados na Hipótese A não seriam capazes de causar efeito agudo isoladamente, o que indica que a toxicidade observada nos bioensaios com os efluentes é proveniente da mistura dos compostos presentes nos mesmos. Se o limite máximo de TBBPA permitido em corpos hídricos se referisse à HC<sub>50</sub>, as espécies *P. longiseta*, *C. silvestrii* e *D. magna* poderiam ter sua densidade populacional diminuídas. Ressalta-se que mesmo utilizando o HC<sub>5</sub> e garantindo a ausência de toxicidade aguda à 95% das espécies, a concentração de TBBPA de 102 µg.L<sup>-1</sup> poderia causar efeitos de toxicidade crônica para *A. inaequalis*, *P. longiseta* e *C. silvestrii*.

A necessidade de estudos ecotoxicológicos e de detecção de compostos de preocupação emergentes, como os retardantes de chama, é urgente. Nesse estudo, por exemplo, o coeficiente de risco foi calculado com base em concentrações de TBBPA detectadas em outros países pela ausência de dados para esse composto em águas ou efluentes do território brasileiro. Cristale *et al.* (2021) discutiram o fato do coeficiente de risco da classe de retardantes de chama éster fosfatos ser calculado com base em poucos estudos ecotoxicológicos e para águas coletadas em áreas próximas à indústria. Os autores deixaram como sugestão a necessidade das normativas incluírem mais compostos no monitoramento de qualidade e de mais estudos de toxicidade aguda e

crônica para melhor entendimento dos efeitos e riscos desses compostos em corpos hídricos.

A  $CE_{10}$  obtida nos bioensaios de toxicidade aguda na ecotoxicologia pode ser utilizada para guiar o intervalo de concentração a ser usado nos bioensaios de toxicidade crônica, por exemplo, sendo a concentração mais alta do intervalo. Porém, essa tática não funcionou para as espécies estudadas nessa pesquisa. Para as espécies *D. magna*, *C. sancticaroli* e *L. stagnalis* o intervalo de concentrações foi insuficiente para efeito na reprodução. Por outro lado, para *A. inaequalis* e *P. longiseta* o intervalo de concentrações que causaram efeito na reprodução ( $CE_{50}$  de 29 e 5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  respectivamente) das espécies foram muito abaixo da  $CE_{10}$  obtidos nos bioensaios de toxicidade aguda (1023 e 401  $\mu\text{g.L}^{-1}$  respectivamente).

É interessante observar que as concentrações de TBBPA testadas em bioensaios de toxicidade crônica não alterou a taxa de mortalidade, porém, demonstrou efeito na reprodução para *A. inaequalis*, *P. longiseta* e *C. silvestrii*. Apesar de não ser possível fazer uma relação direta, estudos com peixe *D. rerio* indicaram que o TBBPA e seus metabólitos podem alterar a transcrição de genes ao longo das vias, e como o *A. inaequalis* e *P. longiseta* dependem da divisão celular para a reprodução assexuada pode ser que para essas espécies o TBBPA também influencia as rotas de transcrição genética (Liu et al. 2018).

Dentre as duas espécies de crustáceos usadas, *C. silvestrii* se mostrou mais sensível ao TBBPA do que *D. magna*. As respostas de *C. silvestrii* não seguiram uma relação com a dose do composto, sendo a maior taxa de imobilidade observada nas concentrações mais baixas. Outro fato, é que a coloração dos indivíduos estava mais esbranquiçada que o normal.

No presente estudo, não foram observados efeitos na longevidade e reprodução de *D. magna*, que apresentou baixa taxa de imobilidade inclusive na maior concentração testada (800  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Corroborando com esses resultados, Pittinger e Pecquet (2018) não encontraram efeito na mobilidade ou crescimento dessa espécie em concentração de até 980  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e não conseguiram calcular o  $EC_{50}$  para reprodução. Controversamente, efeitos na longevidade dos indivíduos foram observados por Yang et al. (2012a) com

CE<sub>10</sub> de 47 µg.L<sup>-1</sup>, os autores também relataram alteração no número de ninhadas com CE<sub>10</sub> de 139 µg.L<sup>-1</sup>.

Com relação ao inseto *C. sancticaroli*, as respostas à exposição crônica ao TBBPA foram mais próximas ao encontrado na literatura para *Chironomus tentans*. A concentração de efeito na sobrevivência da espécie foi de CE<sub>50-10d</sub> de 1526 µg.L<sup>-1</sup> enquanto o CE<sub>50-14 d</sub> para *C. tentans* foi 1300 µg.L<sup>-1</sup> (PITTINGER; PECQUET, 2018). Por outro lado, os autores conseguiram determinar que a menor concentração que causou efeito no crescimento da espécie *C. tentans* foi de 70 µg.L<sup>-1</sup>, enquanto para *C. sancticaroli* não houve diferença entre o tamanho larval dos organismos expostos até a concentração 960 µg.L<sup>-1</sup>.

Durante a exposição para avaliação de toxicidade crônica (28-d), o molusco *L. stagnalis* teve sua sobrevivência afetada apenas em concentrações superiores a 800 µg.L<sup>-1</sup> e apresentou diminuição de apetite na maior concentração testada (3200 µg.L<sup>-1</sup>). Hu *et al.* (2015a) evidenciaram o efeito endócrino do TBBPA em bivalves de água salgada (*Chlamys farreri*), além de 439 genes envolvidos na imunidade, de ação antioxidante e resposta ao estresse, presentes em células do tecido digestivo, significativamente regulados positivamente ou negativamente. Corroborando com a ausência de mortalidade em baixas concentrações, após 70 d de exposição ao TBBPA em concentrações variando de 17 a 226 µg.L<sup>-1</sup>, a espécie *Mytilus edulis* não teve sua sobrevivência afetada (PITTINGER; PECQUET, 2018). Entretanto, os autores relataram que no estudo com o molusco foram observadas diferenças no comprimento da concha e peso do tecido seco a partir da concentração 32 µg.L<sup>-1</sup> e 126 µg.L<sup>-1</sup> respectivamente. A redução no crescimento das conchas também foi observada para *L. stagnalis*, porém em concentrações mais elevadas (> 800 µg.L<sup>-1</sup>) e próximas às que reduziram o crescimento da concha do molusco *Ruditapes philippinarum* em quatro vezes (1000 µg.L<sup>-1</sup>) (JIANG *et al.*, 2019). Ji *et al.* (2016) também observaram efeito de desregulação endócrina no molusco marinho *Mytilus galloprovincialis* após 30 dias de exposição ao TBBPA (10 µg.L<sup>-1</sup>). Miglioli *et al.* (2021) avaliaram a toxicidade do TBBPA (1 e 10 µg.L<sup>-1</sup>) em larvas do molusco marinho *Mytilus galloprovincialis* e observaram calcificação irregular e má formação dos órgãos. Estudos com o primeiro estágio de vida de *L. stagnalis* podem

ser interessantes para a verificação da má formação das conchas e outras características de desenvolvimento.

Em testes com espécies de outros grupos, McCormick *et al.* (2010) observaram para embriões de peixe *D. rerio* mortalidade em 100% dos organismos na concentração  $800 \mu\text{g.L}^{-1}$ , sendo observado diminuição da frequência cardíaca, edema do tronco e má-formação na cauda em  $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Além disso, o TBBPA afetou a longevidade de 10% dos peixes *Carassius auratus* e dos anfíbios *Rana limnolocharis* com  $\text{CE}_{10-30\text{d}}$  de 522 e  $49 \mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente (YANG *et al.*, 2012a). A espécie de alga *Raphidocelis subcaptata* se mostrou muito resistente ao TBBPA, não sendo observado efeitos negativos em concentrações de até  $250 \text{mg.L}^{-1}$  (DEBENEST *et al.*, 2010).

A partir dos resultados para as espécies analisadas nessa pesquisa, para as que apresentaram efeito na reprodução, o risco ecotoxicológico referente à toxicidade crônica foi mais crítico do que para o de toxicidade aguda. Para *A. inaequalis* e *C. silvestrii* considerando a maior concentração detectada em lagos, foi evidenciado médio risco enquanto para *P. longiseta* alto risco. Considerando a maior concentração detectada em rios, o risco ecotoxicológico variou de baixo risco (*A. inaequalis*) à médio risco (*P. longiseta* e *C. silvestrii*). De forma geral, as espécies de ambiente tropical foram mais sensíveis ao TBBPA que as espécies de ambiente temperado (*D. magna* e *L. stagnalis*), o que reforça a importância do uso de espécies representativas da fauna local nos estudos e avaliação ecotoxicológica. Zhang *et al.* (2022) usaram como critério de avaliação de risco ecológico a concentração sem efeito previsto na reprodução ( $0,306 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e verificaram alto nível de risco ecológico em três dos setes locais analisados por eles (China). Os autores calcularam os coeficientes de risco a partir dos resultados obtidos na SSD, e obtiveram CR máximos de 3 e 15,9 para rio e lago, respectivamente. Os valores máximos de risco estimados por Zhang *et al.* (2022) são próximos ao calculado para *A. inaequalis* na presente pesquisa e inferiores aos calculados para *P. longiseta* e *C. silvestrii*.

Devido ao elevado potencial tóxico de retardantes de chama halogenados, há estudos que vem buscando compostos não halogenados alternativos. Por exemplo, o retardante de chama *aluminum diethylphosphinate* (ALPI), cuja exposição em teste de

ecotoxicidade crônica em concentrações de até 30 mg.L<sup>-1</sup> não causaram efeitos tóxicos nos embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*) (ABE *et al.*, 2021).

## 6. CONCLUSÃO

Hipótese A: Aceita, ambos reatores conseguiram reduzir a toxicidade do afluente.

- Os resultados dos bioensaios de toxicidade com efluente enriquecido com TBBPA antes (aflu) e após tratamento em reator acidogênico (eflu RA) e reator metanogênico (eflu RM) para as espécies, foram:
  - Teste de ecotoxicidade aguda – imobilidade ou mortalidade
    - Aflu: *P. longiseta* > *C. sancticaroli* >> *A. inaequalis* > *C. silvestrii*
    - Eflu RA: *C. sancticaroli* >> *D. magna* > *P. longiseta* > *A. inaequalis* > *C. silvestrii*
    - Eflu RM: *C. silvestrii* >> *P. longiseta* > *A. inaequalis* >>> *C. sancticaroli* = *D. magna*
  - Teste de ecotoxicidade crônica – reprodução
    - Aflu: *P. longiseta* > *C. silvestrii* >> *A. inaequalis*
    - Eflu RA: *P. longiseta* > *C. silvestrii* >> *A. inaequalis*
    - Eflu RM: *C. silvestrii* > *A. inaequalis* > *P. longiseta*
- Houve diferença entre as eficiências dos reatores RA e RM em reduzir a toxicidade do afluente, apresentando unidade tóxica média da mais tóxica a menos tóxica:
  - Teste de ecotoxicidade aguda: afluente (3,05) > efluente RA (2,93) > efluente RM (1,62)
  - Teste de ecotoxicidade crônica: afluente (11,13) > efluente RA (5,65) > efluente RM (3,27)
- Não conformidade de acordo com a recomendação de ausência de toxicidade aguda;
- Os bioensaios se mostraram eficiente ferramenta para o monitoramento de efluentes domésticos e para avaliação de novas tecnologias de tratamento.

Hipótese B: Parcialmente aceita. Apesar de afetar negativamente a biota, os efeitos de toxicidade aguda requerem elevadas concentrações do TBBPA.

- O TBBPA influenciou negativamente a sobrevivência/ mobilidade das espécies em concentrações a partir de  $600 \mu\text{g.L}^{-1}$ , não sendo possível estimar a concentração de efeito em *L. stagnalis*;
- Para as condições de concentrações testadas, o risco ecotoxicológico do TBBPA (baseado no coeficiente de risco) indicou baixo risco de toxicidade aguda se as espécies estudadas estivessem habitando lagos e risco de toxicidade aguda insignificante caso estivessem habitando rios;
- O TBBPA se mostrou extremamente tóxico para *P. longiseta*, afetando significativamente a reprodução a espécie em concentração abaixo de  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ . *Allonais inaequalis* e *C. silvestrii* também tiveram sua reprodução afetada em teste de ecotoxicidade aguda;
- Apesar de não afetar a reprodução (número de massas de ovos), o TBBPA se mostrou tóxico para a sobrevivência de *L. stagnalis* ao longo de 28 dias com  $\text{CE}_{50}$  de  $1742 \mu\text{g.L}^{-1}$ ;
- O risco ecotoxicológico do TBBPA (baseado no coeficiente de risco) indicou médio risco de toxicidade crônica se as espécies estudadas estivessem habitando lagos ou rios.



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados e discussões apresentadas para testar a Hipótese A, referente ao uso de ecotoxicologia no monitoramento de efluentes, destaca-se alguns pontos que podem ser trabalhados:

- Delineamento experimental: apesar de para a maioria das espécies ter sido possível fazer a comparação entre o afluente e os efluentes, seria interessante revisar o número de diluições utilizadas ou número de réplicas para ser possível a realização de todas as amostras testadas (no caso dessa pesquisa, afluente, efluente RA e efluente RM) simultaneamente. Dessa forma, o mesmo lote de indivíduos será utilizado para avaliar as diferentes amostras, e a comparação entre elas excluem a variabilidade de lotes;
- Estudos com peixes: conforme observado na Curva de Distribuição de Sensibilidade de Espécies para o TBBPA, espécies de peixes se mostraram sensíveis à menores concentrações do composto. Seria interessante adicionar embriões de *Danio rerio*, por exemplo, para avaliar a toxicidade dos efluentes uma vez que requerem baixo volume de efluentes para realização dos testes;
- Estudos multi-espécies: para investigar a interação das amostras com as espécies, a aplicação de ensaios de multi-espécies como os microcosmos poderiam ser aplicados;
- Expandir as análises dos subprodutos: devido a observação do aumento de toxicidade para algumas espécies no efluente tratado, sugiro que sejam expandidas as análises de quantificação químicas para os possíveis subprodutos de decomposição do TBBPA (p.e. bisfenol A), para tentar expandir o entendimento sobre a toxicidade dessa mistura complexa;
- Expandir as análises para cenários reais: na presente pesquisa foi realizada uma tentativa de expandir os resultados que foram encontrados para os efluentes sintéticos tratados em reatores de bancada para um cenário de lançamento desse efluente em corpos hídricos. Porém, há uma dificuldade em se obter os dados atualizados de corpos hídricos que normalmente recebem esses efluentes além de se obter a vazão de efluente média gerada em um município. Parcerias entre

Universidade e agências responsáveis pelo serviço de tratamento de efluentes podem auxiliar na criação de cenários mais realistas de lançamentos.

Além disso, diante dos resultados e discussões apresentadas para testar a Hipótese B, referente à avaliação da toxicidade do TBBPA isolado, destaca-se alguns pontos que podem ser trabalhados:

- Expandir os grupos de espécies: na presente pesquisa foi utilizada diferentes espécies de invertebrados aquáticos. Para obter uma visão mais sistêmica dos efeitos do TBBPA no equilíbrio ecológico, seria interessante adicionar estudos com espécies produtoras e consumidores secundários;
- Avaliação da biomagnificação: a bioacumulação do TBBPA em espécies animais vem sendo reportada na literatura, a realização de um teste no qual algas fosses expostas ao TBBPA e depois servissem de alimento para crustáceos possibilitaria analisar se o TBBPA pode ser ingerido junto ao alimento. Esses crustáceos poderiam então ser usado de alimento para peixes. Assim, seria possível avaliar a biomagnificação do TBBPA ao longo da cadeia trófica.
- Ensaio de sedimento: além da presença em água, o TBBPA já foi detectado em sedimentos e lodos. A realização de testes ecotoxicológicos com a contaminação do sedimento poderia trazer maior clareza das formas de interação entre espécies epibentônicas ou bentônicas e o composto.

## REFERÊNCIAS

- ABE, F. R.; DE OLIVEIRA, A. Á. S.; MARINO, R. V.; RIALTO, T. C. R.; OLIVEIRA, D. P.; DORTA, D. J. **A comparison of developmental toxicity of brominated and halogen-free flame retardant on zebrafish**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 208, 2021.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Atlas Águas Segurança Hídrica do Abastecimento Urbano**. Brasília:ANA, 329 p. 2021
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Atlas Esgotos - Despoluição de bacias hidrográficas**. 88 p. 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **ODS 6 no Brasil: visão da ANA sobre os indicadores**. 94 p, 2019.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). **Séries Históricas de Estações Fluviométricas**. Hidroweb – Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos (SNIRH), 2022 Disponível em: <<https://www.snirh.gov.br/hidroweb/serieshistoricas?codigoEstacao=2247002>>. Acesso em: Junho 2022.
- ALEXANDER, M. **Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants**. *Environmental Science and Technology*, v. 34, n. 20, p. 4259–4265, 2000.
- ALMEIDA, G. A. D.; WEBER, R. R. **Fármacos na represa Billings**. *Revista Saúde e Ambiente*, v. 6, n. 2, p. 7–13, 2006.
- ALVES, R. da G.; MARCHESI, M. R.; ESCARPINATI, S. C. **Oligochaeta (Annelida, Clitellata) in lotic environments in the state of São Paulo, Brazil**. *Iheringia. Série Zoologia*, v. 96, n. 4, p. 431–435, dez. 2006.
- AMATO, D. W.; BISHOP, J. M.; GLENN, C. R.; DULAI, H.; SMITH, C. M. **Impact of submarine groundwater discharge on marine water quality and reef biota of Maui**. *PLoS ONE*, v. 11, n. 11, p. 1–28, 2016.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **ASTM E2587-16 - Standard practice for use of control-charts in statistical process control**. 2021.
- AMÉRICO, J. H. P.; ISIQUE, W. D.; MINILLO, A.; CARVALHO, S. L. de. **Fármacos em uma estação de tratamento de esgoto na região Centro-este do Brasil e os riscos aos recursos hídricos**. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 17, p. 61–67, 2012.
- AMORIM, J.; ABREU, I.; RODRIGUES, P.; PEIXOTO, D.; PINHEIRO, C.; SARAIVA, A.; CARVALHO, A. P.; GUIMARÃES, L.; OLIVA-TELES, L. ***Lymnaea stagnalis* as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies**. *Science of the Total*

Environment, v. 669, p. 11–28, 2019. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.035>>.

ANDERSON, B. G. **The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as wetermined by the use of *Daphnia magna***. Sewage Works Journal, v. 16, n. 6, p. 1156–1165, 1944.

ANDRADE, M. V. F.; SAKAMOTO, I. K.; CORBI, J. J.; SILVA, E. L.; VARESCHE, M. B. A. **Effects of hydraulic retention time, co-substrate and nitrogen source on laundry wastewater anionic surfactant degradation in fluidized bed reactors**. Bioresource Technology, v. 224, p. 246–254, 2017.

ARAUCO, L. R. R.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J. G. **Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia***. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 15, p. 55–64, dez. 2005.

ARISTONE, C.; MEHDI, H.; HAMILTON, J.; BOWEN, K. L.; CURRIE, W. J. S.; KIDD, K. A.; BALSHINE, S. **Impacts of wastewater treatment plants on benthic macroinvertebrate communities in summer and winter**. Science of the Total Environment, v. 820, p. 153224, 2022. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153224>>.

ARMITAGE, P. D.; CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. **The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges**. Chapman & Hall, 1995. 572 p.

ASHIZUKA, Y.; NAKAGAWA, R.; HORI, T.; YASUTAKE, D.; TOBIISHI, K.; SASAKI, K. **Determination of brominated flame retardants and brominated dioxins in fish collected from three regions of Japan**. Molecular Nutrition and Food Research, v. 52, n. 2, p. 273–283, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12648: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2018. 27 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (*Crustacea, Cladocera*)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2022a. 27 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 13373 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (*Crustacea, Cladocera*)**. Rio de Janeiro: ABNT, 2022b.

AZNAR-ALEMANY, Ò.; ELJARRAT, E. **Food contamination on flame retardants**. In: OH, J. Emerging Halogenated Flame Retardants in the Environment, 5. Ed., p. 141–189, 2020.

BAKARAKI TURAN, N.; SARI ERKAN, H.; ONKAL ENGIN, G. **Microplastics in wastewater treatment plants: Occurrence, fate and identification**. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 146, p. 77–84, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.08.039>>.

BASTOS, D. N. **Toxicidade do herbicida glifosato em *Daphnia magna* e pós-larvas de *Rhamdia quelen***. 2013. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2013.

BELY, A. E.; WRAY, G. A. **Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from engrailed- and orthodenticle-class gene expression**. *Development* (Cambridge, England), v. 128, n. 14, p. 2781–2791, 2001.

BELY, A. E.; WRAY, G. A. **Molecular phylogeny of naidid worms (Annelida: Clitellata) based on cytochrome oxidase I**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 30, n. 1, p. 50–63, 2004.

BERG, M. B. Larval food and feeding behaviour. In: ARMITAGE, P.; CRANSTON, P. S.; PINDER, L. C. V. **The Chironomidae**. London: Chaptan & Hall, 1995. p. 572.

BERNEGOSSI, A. C.; CARDOSO, B. N. P.; FELIPE, M. C.; DE LIMA E SILVA, M. R.; CORBI, J. J. ***Chironomus sancticaroli* generation test: A new methodology with a Brazilian endemic insect**. *MethodsX*, v. 6, 2019.

BERNEGOSSI, A. C.; FELIPE, M. C.; PINHEIRO, F. R.; CASTRO, G. B.; GORNI, G. R.; CARDOSO-SILVA, B. N.; CARRASCOSSI, M. H. V.; SOUZA, T. T. C. de; ABRAHÃO, D. P.; CORBI, J. J. Coleta, aclimatação e manutenção laboratorial de invertebrados aquáticos. In: CORBI, J. J. **Indicadores biológicos de qualidade em ambientes aquáticos continentais**. RFB Editora, 2021. p. 14–36.

BERNEGOSSI, A. C.; FREITAS, B. L. S.; CASTRO, G. B.; MARQUES, J. P.; TRINDADE, L. F.; DE LIMA E SILVA, M. R.; FELIPE, M. C.; OGURA, A. P. **A systematic review of the water treatment sludge toxicity to terrestrial and aquatic biota: state of the art and management challenges**. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 57, n. 4, p. 282–297, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10934529.2022.2060021>>.

BERTOLETTI, E. **Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). 44 p, 2013.

BETTS, K. S. **Formulating green flame retardants**. *Environmental Science & Technology*, p. 7201–7202, 2007.

BIASI, C.; RESTELLO, R. M. **Incidência de deformidades morfológicas em larvas de Chironomidae (Insecta: Diptera) como ferramenta de avaliação da qualidade de**

**água em riachos de Erechem - RS.** Revista Eletrônica de Extensão da URI, Vivências 6 (9), p. 136–148, 2010.

BIESINGER, K. E.; CHRISTENSEN, G. M. **Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*.** Journal of the Fisheries Research Board of Canada, v. 29, n. 12, p. 1691–1700, dez. 1972.

BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. **Occurrence and fate of pharmaceuticals in effluent and sludge from a wastewater treatment plant in Brazil.** Environmental Technology (United Kingdom), v. 42, n. 15, p. 2292–2303, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1701561>>.

BLAIR, B. D.; CRAGO, J. P.; HEDMAN, C. J.; KLAPER, R. D. **Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern.** Chemosphere, v. 93, n. 9, p. 2116–2123, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.057>>.

BRADLEY, P. M.; BARBER, L. B.; KOLPIN, D. W.; MCMAHON, P. B.; CHAPELLE, F. H. **Biotransformation of caffeine, cotinine, and nicotine in stream sediments: implications for use as wastewater indicators.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 26, n. 6, p. 1116, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1897/06-483R.1>>.

BRAGA, B. **Introdução à Engenharia Ambiental.** São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BRAGIGAND, V.; AMIARD-TRIQUET, C.; PARLIER, E.; BOURY, P.; MARCHAND, P.; EL HOURCH, M. **Influence of biological and ecological factors on the bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers in aquatic food webs from French estuaries.** Science of the Total Environment, v. 368, n. 2–3, p. 615–626, 2006.

BRENNER, A.; MUKMENEV, I.; ABELIOVICH, A.; KUSHMARO, A. **Biodegradability of tetrabromobisphenol A and tribromophenol by activated sludge.** Ecotoxicology, v. 15, n. 4, p. 399–402, 2006.

BRINKHURST, R. O.; GELDER, S. R. **Annelida: Oligochaeta, Including Branchiobdellidae.** ACADEMIC PRESS, 2001. 431–463 p.

BSEF. **TBBPA information.** Disponível em: <<https://www.bsef.com/about-us/about-bsef/>>. Acesso em: maio 2022.

CABI. **Lymnaea stagnalis.** Invasive Species Compendium. Disponível em: <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/75943>>. Acesso em: Agosto 2022.

CARNEIRO, R. B.; POZZI, E.; CORBI, J. J.; ZAIAT, M. **Ecotoxicity and antimicrobial inhibition assessment of effluent from an anaerobic bioreactor applied to the removal of Sulfamethoxazole and Ciprofloxacin antibiotics from domestic sewage.** Water, Air, and Soil Pollution, v. 232, n. 143, p. 1–13, 2021.

- CARVALHO, A. R.; PÉREZ-PEREIRA, A. I.; COUTO, C. M. C.; TIRITAN, M. E.; RIBEIRO, C. M. R. **Assessment of effluents quality through ecotoxicological assays: evaluation of three wastewater treatment plants with different technologies.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, n. 1, p. 963–976, 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s11356-021-15671-y>>.
- CASTRO, G. B.; BERNEGOSSI, A. C.; FELIPE, M. C.; CORBI, J. J. **Is the development of *Daphnia magna* neonates affected by short-term exposure to polyethylene microplastics?** *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 55, n. 8, p. 935–946, 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1756656>>.
- CASTRO, G. B.; BERNEGOSSI, A. C.; PINHEIRO, F. R.; FELIPE, M. C.; CORBI, J. J. **Effects of polyethylene microplastics on freshwater *Oligochaeta Allonais inaequalis* (Stephenson, 1911) under conventional and stressful exposures.** *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 231, n. 9, 2020b.
- CASTRO, G. B.; PINHEIRO, F. R.; FELIPE, M. C.; BERNEGOSSI, A. C.; GIROLI, D.; GORNI, G. R.; CORBI, J. J. **Update on the use of *Pristina longiseta* Ehrenberg, 1828 (*Oligochaeta: Naididae*) as a toxicity test organism.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 1828, n. Guideline 315, 2020c.
- CHANG, B. V.; YUAN, S. Y.; REN, Y. L. **Aerobic degradation of tetrabromobisphenol-A by microbes in river sediment.** *Chemosphere*, v. 87, n. 5, p. 535–541, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.057>>.
- CHEN, P.; ZHONG, Y.; CHEN, K.; GUO, C.; GONG, J.; WANG, D.; YANG, Y.; MA, S.; YU, Y. **The impact of discharge reduction activities on the occurrence of contaminants of emerging concern in surface water from the Pearl River.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 24, p. 30378–30389, 2020.
- CHEN, Z.; LI, M.; WEN, Q. **Comprehensive evaluation of three sets of advanced wastewater treatment trains for treating secondary effluent: Organic micro-pollutants and bio-toxicity.** *Chemosphere*, v. 189, p. 426–434, 2017.
- CLARA, M.; STRENN, B.; KREUZINGER, N. **Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: Investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration.** *Water Research*, v. 38, n. 4, p. 947–954, 2004.
- COLOMBO-CORBI, V.; GORNI, G. R.; SANZOVO-FALCOSKI, T.; COSTA, P. I.; CORBI, J. J. **Genetic diversity loss in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) exposed to pyrimethanil fungicide: an analysis using RAPD technique.** *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 228, n. 10, 2017.
- COLOMER, J.; MÜLLER, M. F.; BARCELONA, A.; SERRA, T. **Mediated food and hydrodynamics on the ingestion of microplastics by *Daphnia magna*.**

Environmental Pollution, v. 251, p. 434–441, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.034>>.

COMEAU, F.; SURETTE, C.; BRUN, G. L.; LOSIER, R. **The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada.** Science of the Total Environment, v. 396, n. 2–3, p. 132–146, 2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução CONAMA n. 357.** Diário Oficial da União n. 53. Brasília: Brasil, 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução CONAMA n. 396.** Diário Oficial da União n. 66. Brasil. 2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução CONAMA n. 430.** Diário Oficial da União n. 92. Brasília: Brasil, 2011.

CORBI, J. J.; BERNEGOSI, A. C.; MOURA, L.; FELIPE, M. C.; ISSA, C. G.; SILVA, M. R. de L.; GORNI, G. R. **Chironomus sancticaroli (Diptera, Chironomidae) as a sensitive test species: Can we rely on its use after repeated generations, under laboratory conditions?** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 103, n. 2, p. 213–217, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00128-019-02644-8>>.

CORBI, J. J.; GORNI, G. R.; CORREA, R. C. **An evaluation of *Allonais inaequalis* Stephenson, 1911 (Oligochaeta: Naididae) as a toxicity test organism.** Ecotoxicology and Environmental Contamination, v. 10, n. 1, p. 7–11, 2015. Disponível em: <[http://ecotoxbrasil.org.br/index.php?option=com\\_rokdownloads&view=file&task=download&id=595:an-evaluation-of-allonais-inaequalis-stephenson-1911-oligochaeta-naididae-as-a-toxicity-test-organism&Itemid=177](http://ecotoxbrasil.org.br/index.php?option=com_rokdownloads&view=file&task=download&id=595:an-evaluation-of-allonais-inaequalis-stephenson-1911-oligochaeta-naididae-as-a-toxicity-test-organism&Itemid=177)>.

CORBI, J. J.; TRIVINHO-STRIXINO, S. **Relationship between sugar cane cultivation and stream macroinvertebrate communities.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 51, n. 4, p. 769–779, 2008.

CORTESE, B.; ZANOTTO ARPELLINO, J. P.; PAGGI, A. C.; RODRIGUES CAPÍTULO, A. **Chironomid genera distribution related to environmental characteristics of a highly impacted basin (Argentina, South America).** Environmental Science and Pollution Research, v. 26, n. 8, p. 8087–8097, 2019.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. **A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação.** Quimica Nova, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.



- COUTELLE, M. A.; LAGADIC, L. **Effects of self-fertilization, environmental stress and exposure to xenobiotics on fitness-related traits of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis***. *Ecotoxicology*, v. 15, n. 2, p. 199–213, 2006.
- COVACI, A.; VOORSPOELS, S.; ABDALLAH, M. A. E.; GEENS, T.; HARRAD, S.; LAW, R. J. **Analytical and environmental aspects of the flame retardant tetrabromobisphenol-A and its derivatives**. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 3, p. 346–363, 2009.
- CRISTALE, J.; ARAGÃO BELÉ, T. G.; LACORTE, S.; RODRIGUES DE MARCHI, M. R. **Occurrence and human exposure to brominated and organophosphorus flame retardants via indoor dust in a Brazilian city**. *Environmental Pollution*, v. 237, p. 695–703, 2018.
- CRISTALE, J.; OLIVEIRA SANTOS, I.; UMBUZEIRO, G. de A.; FAGNANI, E. **Occurrence and risk assessment of organophosphate esters in urban rivers from Piracicaba watershed (Brazil)**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 42, p. 59244–59255, 2021.
- DA COSTA, J. B.; RODGHER, S.; DANIEL, L. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G. **Toxicity on aquatic organisms exposed to secondary effluent disinfected with chlorine, peracetic acid, ozone and UV radiation**. *Ecotoxicology*, v. 23, n. 9, p. 1803–1813, 2014.
- DASO, A. P.; OKONKWO, J. O. **Evidence of gross contamination of surface water from Jukskei River, South Africa with hexabromocyclododecane (HBCDD) and tetrabromobisphenol A (TBBPA) flame retardants**. Conference paper, p. 1–4, 2017.
- DASO, A. P.; ROHWER, E. R.; KOOT, D. J.; OKONKWO, J. O. **Preliminary screening of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), hexabromocyclododecane (HBCDD) and tetrabromobisphenol A (TBBPA) flame retardants in landfill leachate**. *Environmental Monitoring and Assessment*, p. 189–418, 2017.
- DE LIMA E SILVA, M. R.; BERNEGOSSI, A. C.; CASTRO, G. B.; OGURA, A. P.; CORBI, J. J.; FELIPE, M. C. **Assessing Caffeine and Linear Alkylbenzene Sulfonate effects on molting and reproduction of *Daphnia magna* by quantitative and qualitative approaches**. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 233, n. 3, p. 1–17, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11270-022-05554-4>>.
- DE MORAIS, C. R.; BONETTI, A. M.; MOTA, A. A.; CAMPOS, C. F.; SOUTO, H. N.; CARVALHO NAVES, M. P.; VIEIRA SANTOS, V. S.; OLEGÁRIO DE CAMPOS JÚNIOR, E.; PAVANIN, L. A.; ALVES DE REZENDE, A. A.; SPANÓ, M. A.; PEREIRA, B. B. **Evaluation of toxicity, mutagenicity and carcinogenicity of samples from domestic and industrial sewage**. *Chemosphere*, v. 201, p. 342–350, jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653518304211>>.

DE WIT, C. A. **An overview of brominated flame retardants in the environment.** Chemosphere, v. 46, n. 5, p. 583–624, 2002.

DEBENEST, T.; GAGNÉ, F.; PETIT, A. N.; ANDRÉ, C.; KOHLI, M.; BLAISE, C. **Ecotoxicity of a brominated flame retardant (Tetrabromobisphenol A) and its derivatives to aquatic organisms.** Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology, v. 152, n. 4, p. 407–412, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.06.009>>.

DI GIULIO, R. T.; NEWMAN, M. **Ecotoxicology.** In: KLAASSEN, C. D.; WATKINSIII, J. B. Casarett & Doull's : Essentials of Toxicology. 1. ed. Lange, 2010.

DODSON, S. L.; CÁCERES, C. E.; ROGERS, D. C. Cladocera and Other Branchiopoda. In: JAMES H. THORP, A. P. C. **Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates.** 2. ed. Academic Press, 2001. p. 1008–1013.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.** 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008.

DORNFELD, C. B.; RODGHER, S.; NEGRI, R. G.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; DAAM, M. A. **Chironomus sancticaroli (Diptera, Chironomidae) as a sensitive tropical test species in laboratory bioassays evaluating metals (copper and cadmium) and field testing.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 76, n. 1, p. 42–50, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00244-018-0575-1>>.

EBERT, D. Introduction to Daphnia Biology. In: EBERT, D. **Ecology, Epidemiology, and Parasitism in Daphnia.** National Center for Biotechnology Information (US), p. 1–25, 2005.

EDOKPAYI, J. N.; ODIYO, J. O.; DUROWOJU, O. S. **Impact of Wastewater on Surface Water Quality in Developing Countries: A Case Study of South Africa.** Water Quality, p. 401–416, 2017. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/water-quality/impact-of-wastewater-on-surface-water-quality-in-developing-countries-a-case-study-of-south-africa>>.

ENG, M. L.; WILLIAMS, T. D.; FERNIE, K. J.; KAROUNA RENIER, N. K.; HENRY, P. F. P.; LETCHER, R. J.; ELLIOTT, J. E. **In ovo exposure to brominated flame retardants Part I: Assessment of effects of TBBPA-BDBPE on survival, morphometric and physiological endpoints in zebra finches.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 179, n. April, p. 104–110, 2019.

ENVIRONMENT CANADA. Canadian Environmental Protection Act, 1999 Federal Environmental Quality Guidelines Tetrabromobisphenol A (TBBPA). 2016.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Brominated flame retardants**. 2022. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/brominated-flame-retardants>>. Acesso em: Agosto 2022.

EUROPEAN UNION (EU). Directive 2011/65/EU of the European Parliament and of the Council of 8 June 2011 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment. Official Journal of the European Union, 2011.

EUROPEAN UNION (EU). Diretiva 2012/19/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 4 de julho de 2012, relativa aos resíduos de equipamentos elétricos e eletrônicos (REEE). Official Journal of the European Union, 2012.

EUROPEAN UNION (EU). European Union Risk Assessment Report - 2,2',6,6'-tetrabromo-4,4'-isopropylidenediphenol (tetrabromobisphenol-A or TBBPA). Part II - human health. European Communities/Joint Research Centre, v. 63, 170 p. 2006. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/documents/10162/32b000fe-b4fe-4828-b3d3-93c24c1cdd51>>.

FEITEIRO, J.; MARIANA, M.; CAIRRÃO, E. **Health toxicity effects of brominated flame retardants: From environmental to human exposure**. Environmental Pollution, v. 285, n. April, 2021.

FELIPE, M. C.; BERNEGOSSI, A. C.; CARDOSO-SILVA, B. N.; DELL'ACQUA, M. M.; CORBI, J. J. **Chironomus sancticaroli generation test applied to chemical contaminants and freshwater sediment samples**. Environmental Science and Pollution Research, v. 28, n. 29, p. 39282–39295, 2021.

FELIPE, M. C.; BERNEGOSSI, A. C.; CASTRO, G. B.; PINHEIRO, F. R.; NADAI, B. L.; CARDOSO-SILVA, B. N.; CORBI, J. J. **The use of an *Allonais inaequalis* reproduction test as an ecotoxicological bioassay**. Ecotoxicology, v. 29, n. 5, p. 634–638, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10646-020-02232-1>>.

FERGUSON, P. J.; BERNOT, M. J.; DOLL, J. C.; LAUER, T. E. **Detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in near-shore habitats of southern Lake Michigan**. Science of the Total Environment, v. 458-460, p. 187-196, 2013.

FOCAZIO, M. J.; KOLPIN, D. W.; BARNES, K. K.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; THURMAN, M. E. **A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources**. Science of the Total Environment, v. 402, n. 2–3, p. 201–216, 2008.

FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água na Bacia do Rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados**. 1997. 220 p. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 1997.

FONSECA, A. L.; ROCHA, O. **Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel, 1939 (Diptera-Chironomidae).** Acta Limnologica Brasiliensia, v. 16, n. 2, p. 153–161, 2004a.

FONSECA; ROCHA, A. L. **The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae).** Acta Limnol. Bras, v. 16, n. 4, p. 319–328, 2004b.

FORRÓ, L.; KOROVCHINSKY, N. M.; KOTOV, A. A.; PETRUSEK, A. **Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater.** Hydrobiologia, v. 595, n. 1, p. 177–184, 2008.

FREE, C. M.; JENSEN, O. P.; MASON, S. A.; ERIKSEN, M.; WILLIAMSON, N. J.; BOLDGIV, B. **High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake.** Marine Pollution Bulletin, v. 85, n. 1, p. 156–163, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.001>>.

FREEDONIA GROUP. **World Flame Retardants.** Industry Study with Forecasts for 2016 & 2021. 2015.

GAO, W.; LI, M.; FA, Y.; ZHAO, Z.; CAI, Y.; LIANG, X.; YU, Y.; JIANG, G. **Porous covalent organic frameworks-improved solid phase microextraction ambient mass spectrometry for ultrasensitive analysis of tetrabromobisphenol-A analogs.** Chinese Chemical Letters, v. 33, n. 8, p. 3849–3852, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2021.10.030>>.

GAVRILESCU, M.; DEMNEROVÁ, K.; AAMAND, J.; AGATHOS, S.; FAVA, F. **Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation.** New Biotechnology, v. 32, n. 1, 2015.

GBIF, G. B. I. F. Occurrence of *Allonais inaequalis*. Disponível em: <[https://www.gbif.org/occurrence/search?q=allonais inaequalis](https://www.gbif.org/occurrence/search?q=allonais+inaequalis)>. Acesso em: Julho 2022.

GBIF, G. B. I. F. Occurrence of *Pristina longiseta*. Disponível em: <[https://www.gbif.org/occurrence/search?q=pristina longiseta](https://www.gbif.org/occurrence/search?q=pristina+longiseta)>. Acesso em: Julho 2022.

GEBARA, R. C.; ROCHA, G. S.; SARMENTO, H.; MELÃO, M. da G. G. **Resource competition among the *Anostraca Dendrocephalus brasiliensis* and three Neotropical cladocerans: implications on population dynamics and secondary production.** Hydrobiologia, v. 847, n. 5, p. 1269–1280, 2020.

GHOLAMI-BORUJENI, F.; NEJATZADEH-BARANDOZI, F.; AGHDASI, H. **Data on effluent toxicity and physicochemical parameters of municipal wastewater treatment plant using *Daphnia Magna*.** Data in Brief, v. 19, p. 1837–1843, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2018.06.076>>.

GIRAUDO, M.; DOUVILLE, M.; COTTIN, G.; HOUDE, M. **Transcriptomic, cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles: Endocrine-disrupting potential and molting effects.** PLOS ONE, v. 12, n. 2, p. e0171763, fev. 2017.

GOMES, D. F.; SANCHES, N. A. O.; SAHM, L. H.; GORNI, G. R. **Oligoquetos aquáticos (Annelida: Clitellata) na reserva extrativista Lago do Cuniã, Amazônia Ocidental Brasileira.** Biota Neotropica, v. 17, n. 1, p. 1–7, 2017.

GONG, W.; WANG, J.; CUI, W.; ZHU, L. **Distribution characteristics and risk assessment of TBBPA in seawater and zooplankton in northern sea areas, China.** Environmental Geochemistry and Health, v. 43, n. 11, p. 4759–4769, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10653-021-00948-5>>.

GOODMAN, L. R.; CRIFE, G. M.; MOODY, P. H.; HALSELL, D. G. **Acute toxicity of malathion, tetrabromobisphenol-A, and tributyltin chloride to mysids (*Mysidopsis bahia*) of three ages.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 41, n. 4–6, p. 746–753, 1988.

GORGA, M.; MARTÍNEZ, E.; GINEBREDA, A.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. **Determination of PBDEs, HBB, PBEB, DBDPE, HBCD, TBBPA and related compounds in sewage sludge from Catalonia (Spain).** Science of the Total Environment, v. 444, p. 51–59, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.066>>.

GORNI, G. R.; ALVES, R. D. G. **Naididae (Annelida, Oligochaeta) associated with briophytes in Brotas, State of São Paulo, Brazil.** Revista Brasileira de Zoologia, v. 24, n. 2, p. 518–519, 2007.

GORNI, G. R.; SANCHES, N. A. de O.; COLOMBO-CORBI, V.; CORBI, J. J. **Oligochaeta (Annelida: Clitellata) in the Juruena River, MT, Brazil: Species indicators of substrate types.** Biota Neotropica, v. 18, n. 4, 2018.

GOSSET, A.; WIEST, L.; FILDIER, A.; LIBERT, C.; GIROUD, B.; HAMMADA, M.; HERVÉ, M.; SIBEUD, E.; VULLIET, E.; POLOMÉ, P.; PERRODIN, Y. **Ecotoxicological risk assessment of contaminants of emerging concern identified by “suspect screening” from urban wastewater treatment plant effluents at a territorial scale.** Science of the Total Environment, v. 778, 2021.

GOULART, M. D. C.; CALLISTO, M. **Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental.** Revista da FAPAM, v. 2, n. 1, 2003.

GRZESIUK, M.; SPIJKERMAN, E.; LACHMANN, S. C.; WACKER, A. **Environmental concentrations of pharmaceuticals directly affect phytoplankton and effects propagate through trophic interactions.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 156, n. October 2017, p. 271–278, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.019>>.

- GUERRA, P.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D. **Simultaneous determination of hexabromocyclododecane, tetrabromobisphenol A, and related compounds in sewage sludge and sediment samples from Ebro River basin (Spain)**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, n. 7, p. 2817–2824, 2010.
- GUSTAFSSON, K.; BJÖRK, M.; BURREAU, S.; GILEK, M. **Bioaccumulation kinetics of brominated flame retardants (polybrominated diphenyl ethers) in blue mussels (*Mytilus edulis*)**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 18, n. 6, p. 1218–1224, 1999.
- HAMDHANI, H.; EPPEHIMER, D. E.; BOGAN, M. T. **Release of treated effluent into streams: A global review of ecological impacts with a consideration of its potential use for environmental flows**. *Freshwater Biology*, v. 65, n. 9, p. 1657–1670, 2020.
- HAMMER; HARPER, D.; RYAN, P. **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis**. *Palaeontologia Electronica*, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.
- HAN, X.; ZUO, Y. T.; HU, Y.; ZHANG, J.; ZHOU, M. X.; CHEN, M.; TANG, F.; LU, W. Q.; LIU, A. L. **Investigating the performance of three modified activated sludge processes treating municipal wastewater in organic pollutants removal and toxicity reduction**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 148, n. November 2017, p. 729–737, 2018.
- HARMAN, W. J.; BRINKHURST, R. O.; MARCHESE, M. **A contribution to the taxonomy of the aquatic Oligochaeta (Naididae) of South America**. *Canadian Journal of Zoology*, v. 66, n. 10, p. 2233–2242, 1988.
- HARRAD, S.; ABDALLAH, M. A.-E.; ROSE, N. L.; TURNER, S. D.; DAVIDSON, T. A. **Current-use brominated flame retardants in water, sediment, and fish from English Lakes**. *Environmental Science & Technology*, v. 43, n. 24, p. 9077–9083, 2009. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es902185u>>.
- HARRIS, K. D. M.; BARTLETT, N. J.; LLOYD, V. K. **Daphnia as an emerging epigenetic model organism**. *Genetics Research International*, 2012.
- HEBERER, T. **Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water**. *Journal of Hydrology*, v. 266, n. 3–4, p. 175–189, 2002.
- HODGSON, E. Introduction to toxicology. In: HODGSON, E. **A textbook of modern toxicology**. 3. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p. 2–11.
- HOU, R.; LIN, L.; LI, H.; LIU, S.; XU, X.; XU, Y.; JIN, X.; YUAN, Y.; WANG, Z. **Occurrence, bioaccumulation, fate, and risk assessment of novel brominated flame retardants (NBFRs) in aquatic environments — A critical review**. *Water*

Research, v. 198, p. 117168, jun. 2021. Disponível em:  
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135421003663>>.

HOWARD, P. H.; MUIR, D. C. G. **Identifying new persistent and bioaccumulative organics among chemicals in commerce.** Environmental Science & Technology, v. 44, n. 7, p. 2277–2285, 2010. Disponível em:  
<<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es903383a>>.

HOWMILLER, R. P. **Some Naididae and Tubificidae from Central Africa.** Hydrobiologia, v. 44, n. 1, p. 1–12, 1974.

HU, F.; PAN, L.; CAI, Y.; LIU, T.; JIN, Q. **Deep sequencing of the scallop *Chlamys farreri* transcriptome response to tetrabromobisphenol A (TBBPA) stress.** Marine Genomics, v. 19, p. 31–38, 2015a. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2014.09.004>>.

HU, F.; PAN, L.; XIU, M.; JIN, Q.; WANG, G.; WANG, C. **Bioaccumulation and detoxification responses in the scallop *Chlamys farreri* exposed to tetrabromobisphenol A (TBBPA).** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 39, n. 3, p. 997–1007, 2015b. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.03.006>>.

HU, L.; ZHOU, T.; LUO, D.; FENG, J.; TAO, Y.; ZHOU, Y.; MEI, S. **Bioaccumulation of tetrabromobisphenol A in a laboratory-based fish–water system based on selective magnetic molecularly imprinted solid-phase extraction.** Science of the Total Environment, v. 650, p. 1356–1362, 2019. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.002>>.

ISSA, C. G. **Testes ecotoxicológicos para avaliação do potencial impacto ambiental em corpos receptores por efluente de Estação de Tratamento de Esgoto.** 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2019.

JELIC, A.; MOZAZ, S. R.-; BARCELÓ, D.; GUTIERREZ, O. **Impact of in-sewer transformation on 43 pharmaceuticals in a pressurized sewer under anaerobic conditions.** Water research, v. 8, p. 98–108, 2015.

JI, C.; LI, F.; WANG, Q.; ZHAO, J.; SUN, Z.; WU, H. **An integrated proteomic and metabolomic study on the gender-specific responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* to tetrabromobisphenol A (TBBPA).** Chemosphere, v. 144, p. 527–539, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.052>>.

JIANG, S.; MIAO, J.; WANG, X.; LIU, P.; PAN, L. **Inhibition of growth in juvenile manila clam *Ruditapes philippinarum*: Potential adverse outcome pathway of TBBPA.** Chemosphere, v. 224, p. 588–596, 2019. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.157>>.

KARUTHAPANDI, M.; RAO, D. V. **Cladoceran diversity, distribution and ecological significance**. In: CHAKRAVARTHY, A. and SRIDHARA, S. Arthropod Diversity and Conservation in the Tropics and Sub-tropics. Singapore: Springer Singapore, p. 183–196, 2016.

KIM, U.-J.; LEE, I.-S.; OH, J.-E. **Occurrence, removal and release characteristics of dissolved brominated flame retardants and their potential metabolites in various kinds of wastewater**. Environmental Pollution, v. 218, p. 551–557, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026974911630611X>>.

KRAUS, J. M. **Applying the ecology of aquatic–terrestrial linkages to freshwater and riparian management**. Freshwater Science, v. 38, n. 4, p. 917–918, dez. 2019. Disponível em: <<https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/705994>>.

KURODA, R.; ABE, M. **The pond snail *Lymnaea stagnalis***. EvoDevo, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13227-020-00169-4>>.

LAQUAZ, M.; DAGOT, C.; BAZIN, C.; BASTIDE, T.; GASCHET, M.; PLOY, M. C.; PERRODIN, Y. **Ecotoxicity and antibiotic resistance of a mixture of hospital and urban sewage in a wastewater treatment plant**. Environmental Science and Pollution Research, v. 25, n. 10, p. 9243–9253, 2018.

LAW, K.; HALLDORSON, T.; DANELL, R.; STERN, G.; GEWURTZ, S.; ALAEE, M.; MARVIN, C.; WHITTLE, M.; TOMY, G. **Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a Lake Winnipeg (Canada) food web**. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 25, n. 8, p. 2177–2186, 2006.

LAWRENCE, J. R.; SWERHONE, G. D. .; WASSENAAR, L. I.; NEU, T. R. **Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities**. Canadian Journal of Microbiology, v. 51, n. 8, p. 655–669, 2005. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/w05-047>>.

LEITE, L. de S.; OGURA, A. P.; DOS SANTOS, D. V.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; DANIEL, L. A. **Acute toxicity of disinfection by-products from chlorination of algal organic matter to the cladocerans *Ceriodaphnia silvestrii* and *Daphnia similis*: influence of bromide and quenching agent**. Environmental Science and Pollution Research, v. 29, n. 24, p. 35800–35810, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-022-18752-8>>.

LI, L.; GENG, S.; WU, C.; SONG, K.; SUN, F.; VISVANATHAN, C.; XIE, F.; WANG, Q. **Microplastics contamination in different trophic state lakes along the middle and lower reaches of Yangtze River Basin**. Environmental Pollution, v. 254, 2019.

LIU, A.; ZHAO, Z.; QU, G.; SHEN, Z.; SHI, J.; JIANG, G. **Transformation/degradation of tetrabromobisphenol A and its derivatives: A review of the metabolism and metabolites**. Environmental Pollution, v. 243, p. 1141–1153, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.068>>.



LIU, H. H.; HU, Y. J.; LUO, P.; BAO, L. J.; QIU, J. W.; LEUNG, K. M. Y.; ZENG, E. Y. **Occurrence of halogenated flame retardants in sediment off an urbanized coastal zone: Association with urbanization and industrialization.** *Environmental Science and Technology*, v. 48, n. 15, p. 8465–8473, 2014.

LIU, H.; MA, Z.; ZHANG, T.; YU, N.; SU, G.; GIESY, J. P.; YU, H. **Pharmacokinetics and effects of tetrabromobisphenol a (TBBPA) to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*).** *Chemosphere*, v. 190, p. 243–252, 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.137>>.

LIU, K.; LI, J.; YAN, S.; ZHANG, W.; LI, Y.; HAN, D. **A review of status of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in China.** *Chemosphere*, v. 148, p. 8–20, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.023>>.

LIU, L.; LIU, A.; ZHANG, Q.; SHI, J.; HE, B.; YUN, Z.; JIANG, G. **Determination of tetrabromobisphenol-A/S and their main derivatives in water samples by high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 1497, p. 81–86, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.040>>.

LLORCA, M.; FARRÉ, M.; ELJARRAT, E.; DÍAZ-CRUZ, S.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; WUNDERLIN, D.; BARCELO, D. **Review of emerging contaminants in aquatic biota from Latin America: 2002–2016.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 36, n. 7, p. 1716–1727, 2017.

LOBO, H.; ESPINDOLA, E. L. G. ***Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892 (Oligochaeta: Naididae) as a test species in ecotoxicology bioassays: a review.** *Zoosymposia*, v. 9, n. 1, p. 59–69, 2014.

LOOS, R.; WOLLGAST, J.; HUBER, T.; HANKE, G. **Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 387, n. 4, p. 1469–1478, 2007.

LOOSE, M. J.; KOENE, J. M. **Sperm transfer is affected by mating history in the simultaneously hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*.** *Invertebrate Biology*, v. 127, n. 2, p. 162–167, 2008.

MACÊDO, W. V.; BERNEGOSI, A. C.; SABATINI, C. A.; CORBI, J. J.; ZAIAT, M. **Application of dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC/MS-MS analysis to determine Tetrabromobisphenol A in complex matrices.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/etc.4837>>.

MACÊDO, W. V.; DUARTE OLIVEIRA, G. H.; ZAIAT, M. **Tetrabromobisphenol A (TBBPA) anaerobic biodegradation occurs during acidogenesis.** *Chemosphere*, v. 282, 2021.

- MACÊDO, W. V. **Tetrabromobisphenol A (TBBPA) degradation in anaerobic biosystems: from bioengineering to meta-omics**. 2022. Tese de doutorado. Programa de Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, 2022. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-08082022-164154/publico/ThesisMacedoWillianeVieiraCorrected.pdf>>.
- MANSOURI, K.; CONSONNI, V.; DURJAVA, M. K.; KOLAR, B.; ÖBERG, T.; TODESCHINI, R. **Assessing bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers for aquatic species by QSAR modeling**. *Chemosphere*, v. 89, n. 4, p. 433–444, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.081>>.
- MARCHESE, S.; PERRET, D.; GENTILI, A.; CURINI, R.; PASTORI, F. **Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in surface water and wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. *Chromatographia*, v. 58, n. 5, p. 263–269, 2003.
- MARKMAN, S.; GUSCHINA, I. A.; BARNESLEY, S.; BUCHANAN, K. L.; PASCOE, D.; MÜLLER, C. T. **Endocrine disrupting chemicals accumulate in earthworms exposed to sewage effluent**. *Chemosphere*, v. 70, n. 1, p. 119–125, 2007.
- MARTIN-CREUZBURG, D.; WESTERLUND, S. A.; HOFFMANN, K. H. **Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle: Determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS)**. *General and Comparative Endocrinology*, v. 151, n. 1, p. 66–71, 2007.
- MARTINS, A. B. C.; ROCHA, J. P.; SANTANA, C. G. de. **Análise dos impactos causados pelo lançamento de efluentes domésticos não tratados e sua relação com a capacidade de autodepuração de um corpo hídrico**. p. 1–15, 2018. Disponível em: <<http://sou.undb.edu.br/public/publicacoes/analise-dos-impactos-causados-pelo-lancamento-de-efluentes-domesticos-nao-tratados-e-sua-relacao-com-a-capacidade-de-autodepuracao-de-um-corpo-hidrico-ana-beatriz-jhogenes-pereira-e-claudemir-gomes.pdf>>.
- MAZZITELLI, J. Y.; BUDZINSKI, H.; CACHOT, J.; GEFFARD, O.; MARTY, P.; CHIFFRE, A.; FRANÇOIS, A.; BONNAFE, E.; GERET, F. **Evaluation of psychiatric hospital wastewater toxicity: what is its impact on aquatic organisms?** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 26, p. 26090–26102, 2018.
- MCCORMICK, J. M.; PAIVA, M. S.; HÄGGBLÖM, M. M.; COOPER, K. R.; WHITE, L. A. **Embryonic exposure to tetrabromobisphenol A and its metabolites, bisphenol A and tetrabromobisphenol A dimethyl ether disrupts normal zebrafish (*Danio rerio*) development and matrix metalloproteinase expression**. *Aquatic Toxicology*, v. 100, n. 3, p. 255–262, 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X10002675>>.

- MEZGEBU, A.; LAKEW, A.; LEMMA, B.; BENEBERU, G. **The potential use of chironomids (Insecta: Diptera) as bioindicators in streams and rivers around Sebeta, Ethiopia.** African Journal of Aquatic Science, v. 44, n. 4, p. 369–376, 2019.
- MIGLIOLI, A.; BALBI, T.; MONTAGNA, M.; DUMOLLARD, R.; CANESI, L. **Tetrabromobisphenol A acts a neurodevelopmental disruptor in early larval stages of *Mytilus galloprovincialis*.** Science of the Total Environment, v. 793, p. 148596, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148596>>.
- MIGUEL, M. **Efeito do hormônio sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol no invertebrado aquático *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera).** 2016. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo 2016.
- MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. **Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios.** Quimica Nova, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 11 jul. 2017. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia\\_pdf.asp?aid2=6640&nomeArquivo=RV20170146.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6640&nomeArquivo=RV20170146.pdf)>.
- MOREIRA, R. A.; MANSANO, A. da S.; SILVA, L. C. da; ROCHA, O. **A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*.** Acta Limnologica Brasiliensia, v. 26, n. 1, p. 1–8, 2014.
- MUGNAI, Ri.; NESSIMIAN, J. L.; BAPTISTA, D. F. **Manual de Identificação de Macroinvertebrados Aquáticos do Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 2010.
- MÜLLER, H. G. **Experiences with test systems using *Daphnia magna*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 4, n. 1, p. 21–25, mar. 1980.
- NAIDU, K. V. **Check-list of fresh-water Oligochaeta of the Indian Sub-continent and Tibet.** Hydrobiologia, v. 27, p. 208–226, 1966.
- NAIK, P. K.; TAMBE, J. A.; DEHURY, B. N.; TIWARI, A. N. **Impact of urbanization on the groundwater regime in a fast growing city in central India.** Environmental Monitoring and Assessment, v. 146, n. 1–3, p. 339–373, 2008.
- NESEMANN, H.; SHARMA, S.; SINHA, R. K. **Aquatic Annelida (Polychaeta, Oligochaeta, Hirudinea) of the Ganga River and adjacent water bodies in Patna (India: Bihar), with description of a new leech species (Family Salifidae).** Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, Serie B, v. 105, p. 139–187, 2004.
- NG, B.; QUINETE, N.; MALDONADO, S.; LUGO, K.; PURRINOS, J.; BRICEÑO, H.; GARDINALI, P. **Understanding the occurrence and distribution of emerging pollutants and endocrine disruptors in sensitive coastal South Florida**

**Ecosystems.** Science of the Total Environment, v. 757, p. 143720, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143720>>.

NI, H. G.; ZENG, H. **HBCD and TBBPA in particulate phase of indoor air in Shenzhen, China.** Science of the Total Environment, v. 458–460, p. 15–19, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.003>>.

NATIONAL INDUSTRIAL CHEMICALS NOTIFICATION AND ASSESSMENT SCHEME (NICNAS). **Tetrabromobisphenol A - Priority Existing Chemical Assessment Report n. 42.** Department of Health, Australian Government. 2020.

NOLTE, U. **Egg masses of Chironomidae (Diptera). A review, including new observations and a preliminary key.** Entomologica Scandinavica, v. 431, 75 p, 1993.

NOVELLI, A.; VIEIRA, B. H.; CORDEIRO, D.; CAPPELINI, L. T. D.; VIEIRA, E. M.; ESPÍNDOLA, E. L. G. **Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*.** Chemosphere, v. 86, n. 1, p. 36–40, 2012.

ÖBERG, K.; WARMAN, K.; ÖBERG, T. **Distribution and levels of brominated flame retardants in sewage sludge.** Chemosphere, v. 48, p. 805–809, 2002.

O'HALLORAN, K. **Toxicological considerations of contaminants in the terrestrial environment for ecological risk assessment.** Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, v. 12, n. 1, p. 74–83, 2006.

OKEKE, E. S.; HUANG, B.; MAO, G.; CHEN, Y.; ZHENGJIA, Z.; QIAN, X.; WU, X.; FENG, W. **Review of the environmental occurrence, analytical techniques, degradation and toxicity of TBBPA and its derivatives.** Environmental Research, v. 206, p. 112594, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112594>>.

OLIVEIRA, J. M. S.; DE LIMA E SILVA, M. R.; ISSA, C. G.; CORBI, J. J.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; FORESTI, E. **Intermittent aeration strategy for azo dye biodegradation: A suitable alternative to conventional biological treatments?** Journal of Hazardous Materials, v. 385, 2019, p. 121558, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121558>>.

OLIVER, D. **Life history of the Chironomidae.** Annual Review of Entomology, v. 16, n. 1, p. 211–230, 1971.

ORAL, D.; BALCI, A.; CHAO, M.-W.; ERKEKOGLU, P. **Toxic effects of Tetrabromobisphenol A: Focus on endocrine disruption.** Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, v. 40, n. 3, p. 1–23, 2021.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures.** OECD Publishing. Disponível em: <<https://www.oecd-ilibrary.org/environment/detailed-review-paper-drp-on-molluscs-life-cycle-toxicity->

testing\_9789264221468-en%0Ahttps://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on-aquatic-toxicity-testing-of-difficult-substances-and-mixtures\_0ed>.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD).  
**Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* reproduction test.** OECD Guideline for the Testing of Chemicals. OECD Publishing, p. 1–31, 2016. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-243-lymnaea-stagnalis-reproduction-test\_9789264264335-en%0Ahttp://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-243-lymnaea-stagnalis-reproduction-test\_9789264264335-en>.

ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD).  
**Test No 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test.** OECD Publishing, 2004. 1–12 p, 2004.

ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD).  
**Test No 235: *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test.** OECD Publishing, 2011. 1–4 p.

ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD).  
**Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test.** OECD Publishing, 1–21 p, 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMY CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD).  
**Test No 315: Bioaccumulation in sediment-dwelling benthic oligochaetes.** OECD Publishing, p. 33, 2008.

OUTRIDGE, P. M. **Possible causes of high species diversity in tropical Australian freshwater macrobenthic communities.** Hydrobiologia, v. 150, n. 2, p. 95–107, 1987.

ÖZPOLAT, B. D.; SLOANE, E. S.; ZATTARA, E. E.; BELY, A. E. **Plasticity and regeneration of gonads in the annelid *Pristina leidyi*.** EvoDevo, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2016.

PAL, A.; HE, Y.; JEKEL, M.; REINHARD, M.; GIN, K. Y. H. **Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle.** Environment International, v. 71, p. 46–62, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.025>.

PATHIRATNE, A.; WEERASUNDARA, A. **Bioassessment of selected inland water bodies in Sri Lanka using benthic oligochaetes with consideration of temporal variations.** International Review of Hydrobiology, v. 89, n. 3, p. 305–316, 2004.

PAXÉUS, N. **Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), Gemfibrozil, Carbamazepine,  $\beta$ -blockers, Trimethoprim and Triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment.** Water Science & Technology, 2004.

PENG, F. J.; DIEPENS, N. J.; PAN, C. G.; BRACEWELL, S. A.; YING, G. G.; SALVITO, D.; SELCK, H.; VAN DEN BRINK, P. J. **Fate and effects of sediment-associated**

**triclosan in subtropical freshwater microcosms.** *Aquatic Toxicology*, v. 202, n. May, p. 117–125, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.07.008>>.

PEPLOW, M. **Fantastic Plastics - Polymers have infiltrated almost every aspect of modern life. Now they are being stretched to their limits.** *Nature magazine*, v. 536, p. 266–268, 2016.

PEREAO, O.; AKHARAME, M. O.; OPEOLU, B. **Effects of municipal wastewater treatment plant effluent quality on aquatic ecosystem organisms.** *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 56, n. 14, p. 1480–1489, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10934529.2021.2009730>>.

PERSOONE, G.; MARSALEK, B.; BLINOVA, I.; TÖRÖKNE, A.; ZARINA, D.; MANUSADZIANAS, L.; NALECZ-JAWECKI, G.; TOFAN, L.; STEPANOVA, N.; TOTHOVA, L.; KOLAR, B. **A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters.** *Environmental Toxicology*, v. 18, n. 6, p. 395–402, 2003.

PETLAND. **Ração Tetra TetraMin Flakes em Flocos.** Disponível em: <<https://www.geracaopet.com.br/racao-tetra-tetramin-flakes-em-flocos#:~:text=arroz integral%2C extrato de levedura,bixina%2C corantes artificiais amarelo crepúsculo%2C>>. Acesso em: Maio 2022.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. **A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring.** *Water Research*, v. 72, p. 3–27, 2014.

PIERONI, M. C.; LEONEL, J.; FILLMANN, G. **Retardantes de chama bromados: uma revisão.** *Química Nova*, v. 40, n. 3, 2017. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia\\_pdf.asp?aid2=6530&nomeArquivo=RV20160247.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6530&nomeArquivo=RV20160247.pdf)>.

PINDER, A. **Tools for identifying selected Australian aquatic oligochaetes (Clitellata: Annelida).** *Museum Victoria Science Reports*, v. 13, p. 1–26, 2010.

PITTINGER, C. A.; PECQUET, A. M. **Review of historical aquatic toxicity and bioconcentration data for the brominated flame retardant tetrabromobisphenol A (TBBPA): effects to fish, invertebrates, algae, and microbial communities.** *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 15, p. 14361–14372, 2018.

PIVELI, R. P. **Aula 8 - Ferro, Manganês e Metais Pesados.** Curso Qualidade das águas e poluição: Aspectos físico-químicos. 2012. Disponível em: <[http://www.leb.esalq.usp.br/disciplinas/Fernando/leb360/Fasciculo 8 - Ferro e Manganês e Metais Pesados.pdf](http://www.leb.esalq.usp.br/disciplinas/Fernando/leb360/Fasciculo%208%20-%20Ferro%20e%20Manganes%20e%20Metais%20Pesados.pdf)>.

PORINCHU, D. F.; MACDONALD, G. M. **The use and application of freshwater midges (Chironomidae: Insecta: Diptera) in geographical research.** Progress in Physical Geography, v. 27, n. 3, p. 378–422, 2003.

QU, G.; LIU, A.; HU, L.; LIU, S.; SHI, J.; JIANG, G. **Recent advances in the analysis of TBBPA/TBBPS, TBBPA/TBBPS derivatives and their transformation products.** TrAC - Trends in Analytical Chemistry, v. 83, p. 14–24, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.021>>.

QU, G.; LIU, A.; WANG, T.; ZHANG, C.; FU, J.; YU, M.; SUN, J.; ZHU, N.; LI, Z.; WEI, G.; DU, Y.; SHI, J.; LIU, S.; JIANG, G. **Identification of tetrabromobisphenol A allyl ether and tetrabromobisphenol A 2,3-dibromopropyl ether in the ambient environment near a manufacturing site and in mollusks at a coastal region.** Environmental Science and Technology, v. 47, n. 9, p. 4760–4767, 2013.

QU, R.; FENG, M.; WANG, X.; HUANG, Q.; LU, J.; WANG, L.; WANG, Z. **Rapid removal of tetrabromobisphenol a by ozonation in water: Oxidation products, reaction pathways and toxicity assessment.** PLoS ONE, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2015.

R CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>.

RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.** 2nd. ed. 1082 p.

RASBAND, W. **ImageJ.** 2018. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/>>.

RESEARCH AND MARKETS (R&M). **Global Flame Retardants Markets Report 2022-2030 : Focus on Brominated Flame Retardants, Alumina Trihydrate, Antimony Trioxide, & Phosphorus Flame Retardants.** 2022. Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/global-flame-retardants-markets-report-2022-2030-focus-on-brominated-flame-retardants-alumina-trihydrate-antimony-trioxide--phosphorus-flame-retardants-301592261.html>>. Acesso em Agosto 2022.

RESEARCH AND MARKETS (R&M). **Global Flame Retardant Market Size, Share Report, 2020-2027.** 2020. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/flame-retardant-market>>. Acesso em: Agosto 2022.

RIBEIRO-BRASIL, D. R. G.; BRASIL, L. S.; VELOSO, G. K. O.; MATOS, T. P. de; LIMA, E. S. de; DIAS-SILVA, K. **The impacts of plastics on aquatic insects.** Science of The Total Environment, v. 813, p. 152436, mar. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969721075148>>.

RICHARDI, V. S.; REBECHI, D.; ARANHA, J. M. R.; NAVARRO-SILVA, M. A. **Determination of larval instar in *Chironomus sancticaroli* using novel head capsule structures.** Zoologia, v. 30, n. 2, p. 211–216, 2013.

RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. **Water analysis: Emerging contaminants and current issues**. Analytical Chemistry, v. 92, n. 1, p. 473–505, 2020.

RIVA, F.; ZUCCATO, E.; DAVOLI, E.; FATTORE, E.; CASTIGLIONI, S. **Risk assessment of a mixture of emerging contaminants in surface water in a highly urbanized area in Italy**. Journal of Hazardous Materials, v. 361, p. 103–110, 2019.

RIZZO, L. **Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment**. Water Research, v. 45, p. 4311–4340, 2011.

ROCHA, O.; NETO, A. J. G.; DOS SANTOS LIMA, J. C.; FREITAS, E. C.; MIGUEL, M.; DA SILVA MANSANO, A.; MOREIRA, R. A.; DAAM, M. A. **Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations**. Ecotoxicology, v. 27, n. 7, p. 834–844, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10646-018-1921-9>>.

ROSENFELD, P. E.; FENG, L. G. H. **Emerging Contaminants**. In: Risks of Hazardous Wastes. Elsevier, 2011. p. 215–222.

RUHÍ, A.; ACUÑA, V.; BARCELÓ, D.; HUERTA, B.; MOR, J. R.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; SABATER, S. **Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web**. Science of the Total Environment, v. 540, p. 250–259, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.009>>.

SANCHES, N. A. de O.; SAHM, L. H.; GOMES, D. F.; CORBI, J. J.; ROBEIRO, M. L.; GORNI, G. R. **Inventário de Oligochaeta (Annelida:Clitellata) em córregos urbanos de Bocaina -SP, Brasil**. Revista Brasileira Multidisciplinar, v. 19, n. 1, p. 14, 18 jan. 2016. Disponível em: <<http://revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/364>>.

SANCHEZ, P. S.; SATO, M. I. Z.; PASCHOAL, C. M. R. B.; ALVES, M. N.; FURLAN, E. V.; MARTINS, M. T. **Toxicity assessment of industrial effluents from São Paulo state, Brazil, using short-term microbial assays**. Toxicity Assessment, v. 3, n. 1, p. 55–80, 1988.

SANTOS, M. A. P. F.; VICENSOTTI, J.; MONTEIRO, R. T. R. **Sensitivity of four test organisms (*Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) to NaCl: an alternative reference toxicant**. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, v. 2, n. 3, p. 229–236, 2007.

SÃO CARLOS, Serviço Autônomo de Água e Esgoto de São Carlos (SAAE) **Qualidade do Esgoto Tratado**. Disponível em: <<https://www.saaesaocarlos.com.br/saaesc/index.php/esgoto/qualidade-do-esgoto-tratado>>.



SARRIA, V.; PARRA, S.; ADLER, N.; PÉRINGER, P.; BENITEZ, N.; PULGARIN, C. **Recent developments in the coupling of photoassisted and aerobic biological processes for the treatment of biorecalcitrant compounds.** *Catalysis Today*, v. 76, n. 2–4, p. 301–315, 2002.

SEB-DALGARNO. **A shiny web app to analyse species sensitivity distributions.** Poisson Consulting for the Ministry of the Environment, British Columbia. Disponível em: <<https://bcgov-env.shinyapps.io/ssdtools/>>.

SHARKEY, M.; HARRAD, S.; ABOU-ELWafa ABDALLAH, M.; DRAGE, D. S.; BERRESHEIM, H. **Phasing-out of legacy brominated flame retardants: The UNEP Stockholm Convention and other legislative action worldwide.** *Environment International*, v. 144, n. July, p. 106041, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106041>>.

SHARMA, B. M.; BEČANOVA, J.; SCHERINGER, M.; SHARMA, A.; BHARAT, G. K.; WHITEHEAD, P. G.; KLÁNOVÁ, J.; NIZZETTO, L. **Health and ecological risk assessment of emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, and artificial sweeteners) in surface and groundwater (drinking water) in the Ganges River Basin, India.** *Science of the Total Environment*, v. 646, 2019.

SHARMA, P.; CHADHA, P.; SAINI, H. S. **Tetrabromobisphenol A induced oxidative stress and genotoxicity in fish *Channa punctatus*.** *Drug and Chemical Toxicology*, v. 42, n. 6, p. 559–564, 2 nov. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1441864>>.

SHIN, E. su; JEONG, Y.; BARGHI, M.; SEO, S. H.; KWON, S. Y.; CHANG, Y. S. **Internal distribution and fate of persistent organic contaminants (PCDD/Fs, DL-PCBs, HBCDs, TBBPA, and PFASs) in a Bos Taurus.** *Environmental Pollution*, v. 267, p. 115306, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115306>>.

SIGMA - ALDRICH®. **3,3',5,5'-Tetrabromobisphenol A.** Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/330396?lang=pt&region=BR>>. Acesso em Janeiro 2022.

SMITH, D. P.; KENNEDY, J. H.; DICKSON, K. L. **An evaluation of a naidid oligochaete as a toxicity test organism.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 10, n. 11, p. 1459–1465, 1991.

SOUZA, T. T. C. de; BERNEGOSI, A. C.; CASTRO, G. B.; PINHEIRO, F. R.; CORBI, V. C.; FELIPE, M. C.; GIROLI, D. A.; GORNI, G. R.; CORBI, J. J. ***Pristina longiseta* reproduction test: chronic exposure to environmental contaminants.** *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1–21, 2022.

SPIES, M.; REISS, F. **Catalog ad bibliography of Neotropical and Mexican Chironomidae (Insecta, Diptera).** In: BAEHR, M. Spixiana: Zeitschrift für Zoologie, Supplement. München: The State Zoological Collections München, p. 61–119. 1994.

- SPONZA, D. T.; DEMIRDEN, P. **Relationships between chemical oxygen demand (COD) components and toxicity in a sequential anaerobic baffled reactor/aerobic completely stirred reactor system treating Kemicetine.** Journal of Hazardous Materials, v. 176, n. 1–3, p. 64–75, 2010.
- STYSZKO, K.; PROCTOR, K.; CASTRIGNANÒ, E.; KASPRZYK-HORDERN, B. **Occurrence of pharmaceutical residues, personal care products, lifestyle chemicals, illicit drugs and metabolites in wastewater and receiving surface waters of Krakow agglomeration in South Poland.** Science of the Total Environment, v. 768, 2021.
- SUMIYA, E.; OGINO, Y.; MIYAKAWA, H.; HIRUTA, C.; TOYOTA, K.; MIYAGAWA, S.; IGUCHI, T. **Roles of ecdysteroids for progression of reproductive cycle in the fresh water crustacean *Daphnia magna*.** Frontiers in Zoology, v. 11, n. 1, p. 60, dez. 2014.
- SUN, J.; LUO, Q.; WANG, D.; WANG, Z. **Occurrences of pharmaceuticals in drinking water sources of major river watersheds, China.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 117, 2015.
- SUN, Y.; GUO, H.; YU, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. **Bioaccumulation and physiological effects of tetrabromobisphenol A in coontail *Ceratophyllum demersum* L.** Chemosphere, v. 70, n. 10, p. 1787–1795, 2008.
- SUNDHA, P.; BASAK, N.; RAI, A. K.; CHANDRA, P.; BEDWAL, S.; YADAV, G.; YADAV, R. K.; SHARMA, P. C. **Characterization and ecotoxicological risk assessment of sewage sludge from industrial and non-industrial cities.** Environmental Science and Pollution Research, n. Eureau 2021, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-022-21648-2>>.
- TAKAYA, Y.; XIAO, Y.; TSUNAZAWA, Y.; CÓRDOVA, M.; TOKORO, C. **Mechanochemical degradation treatment of TBBPA: A kinetic approach for predicting the degradation rate constant.** Advanced Powder Technology, v. 33, n. 3, p. 103469, Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921883122000462>>.
- TANG, J.; FENG, J.; LI, X.; LI, G. **Levels of flame retardants HBCD, TBBPA and TBC in surface soils from an industrialized region of East China.** Environmental Sciences: Processes and Impacts, v. 16, n. 5, p. 1015–1021, 2014.
- TERNES, T.; BONERZ, M.; SCHMIDT, T. **Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography, v. 938, n. 1–2, p. 175–185, 2001.
- TERRA, N. .; FEIDEN, I. **Reproduction and survival of *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea : Cladocera) under different hardness.** Acta Limnologica Brasiliensia, v. 15, n. 2, p. 51–55, 2003.

TIAN, S.; ZHU, L. **Bioaccumulation kinetics of sediment-associated DE-83 in benthic invertebrates (*Nereis succinea*, polychaete)**. *Chemosphere*, v. 84, n. 1, p. 160–165, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.005>>.

TIAN, Y.; CHEN, J.; OUYANG, Y. ZHONG; QU, G. BO; LIU, A. FENG; WANG, X. MEI; LIU, C. XIAO; SHI, J. B.; CHEN, H. WEN; JIANG, G. BIN. **Reactive extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry for sensitive detection of tetrabromobisphenol A derivatives**. *Analytica Chimica Acta*, v. 814, p. 49–54, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.035>>.

TRIVINHO-STRIXINO, S. **Chironomidae (Insecta, Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil**. *Biota Neotropica*, v. 11, p. 676–684, 2011.

TRIVINHO-STRIXINO, S. **Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlensis* sp. (Diptera: Chironomidae)**. 1980. 182 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1980.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Finalizes list of next 20 chemicals to undergo risk evaluation under TSCA**. 2019. Disponível em: <<https://www.epa.gov/newsreleases/epa-finalizes-list-next-20-chemicals-undergo-risk-evaluation-under-tsca>>.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**. p. 1–350, 2002a.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. p. 1–275, 2002b.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Technical support document for water quality-based toxics control**. v. 57, 1992.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **TSCA work plan chemical problem formulation and initial assessment: Tetrabromobisfenol A and related chemicals cluster flame retardants**. 2015.

VAN CLEAVE, C. D. **A study of the process of fission in the Naid *Pristina longiseta***. *Physiological Zoology*, v. 10, n. 3, p. 299–314, 1937.

VERDONSCHOT, R. C. M.; DIDDEREN, K.; VERDONSCHOT, P. F. M. **Importance of habitat structure as a determinant of the taxonomic and functional composition of lentic macroinvertebrate assemblages**. *Limnologica*, v. 42, n. 1, p. 31–42, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2011.07.004>>.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 4. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 472 p, 2014.

WAAIJERS, S. L.; HARTMANN, J.; SOETER, A. M.; HELMUS, R.; KOOLS, S. A. E.; DE VOOGT, P.; ADMIRAAL, W.; PARSONS, J. R.; KRAAK, M. H. S. **Toxicity of new generation flame retardants to *Daphnia magna***. *Science of the Total Environment*, v. 463–464, p. 1042–1048, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.110>>.

WANG, C.; SHI, H.; ADAMS, C. D.; GAMAGEDARA, S.; STAYTON, I.; TIMMONS, T.; MA, Y. **Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry**. *Water Research*, v. 45, n. 4, p. 1818–1828, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.043>>.

WANG, Y.; ZHANG, H.; CAO, J. **Exploring the interactions of decabrominated diphenyl ether and tetrabromobisphenol A with human**. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 38, n. 2, p. 595–606, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.08.009>>.

WATANABE, I.; KASIMOTO, T. **The flame retardant tetrabromobisphenol-A and its metabolite found in river and marina sediments in Japan**. *Chemosphere*, v. 12, p. 1533–1539, 1983.

WEIGEL, S.; KUHLMANN, J.; HÜHNERFUSS, H. **Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: Occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea**. *Science of the Total Environment*, v. 295, n. 1–3, p. 131–141, 2002.

WENG, R.; TIAN, F.; YU, Z.; MA, J.; LV, Y.; XI, B. **Efficient mineralization of TBBPA via an integrated photocatalytic reduction/oxidation process mediated by MoS<sub>2</sub>/SnIn<sub>4</sub>S<sub>8</sub> photocatalyst**. *Chemosphere*, v. 285, p. 131542, dez. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653521020142>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Environmental Health Criteria, 172 - Tetrabromobisphenol A and Derivatives**. Geneva: WHO, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Environmental Health Criteria 192 – Flame retardants: A general Introduction**. Geneva: WHO, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Assessment of the State-of-the Science of Endocrine Disruptors**. WHO/IPCS/ILO/UNEP, 133 p., 2002.

WU, J. P.; GUAN, Y. T.; ZHANG, Y.; LUO, X. J.; ZHI, H.; CHEN, S. J.; MAI, B. X. **Several current-use, non-PBDE brominated flame retardants are highly bioaccumulative: Evidence from field determined bioaccumulation factors**. *Environment International*, v. 37, n. 1, p. 210–215, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.09.006>>.

WU, S.; JI, G.; LIU, J.; ZHANG, S.; GONG, Y.; SHI, L. **TBBPA induces developmental toxicity, oxidative stress, and apoptosis in embryos and zebrafish larvae (*Danio rerio*)**. *Environmental Toxicology*, v. 31, n. 10, p. 1241–1249, out. 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.22131>>.

XIONG, J.; AN, T.; ZHANG, C.; LI, G. **Pollution profiles and risk assessment of PBDEs and phenolic brominated flame retardants in water environments within a typical electronic waste dismantling region**. *Environmental Geochemistry and Health*, v. 37, n. 3, p. 457–473, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10653-014-9658-8>>.

XU, G.; ZHAO, X.; ZHAO, S.; CHEN, C.; ROGERS, M. J.; RAMASWAMY, R.; HE, J. **Insights into the occurrence, fate, and impacts of halogenated flame retardants in Municipal Wastewater Treatment Plants**. *Environmental Science and Technology*, v. 55, n. 8, p. 4205–4226, 2021.

YANG, S. W.; YAN, Z. G.; XU, F. F.; WANG, S. R.; WU, F. C. **Development of freshwater aquatic life criteria for Tetrabromobisphenol A in China**. *Environmental Pollution*, v. 169, p. 59–63, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.05.023>>.

YANG, S.; WANG, S.; LIU, H.; YAN, Z. **Tetrabromobisphenol A: tissue distribution in fish, and seasonal variation in water and sediment of Lake Chaohu, China**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 19, n. 9, p. 4090–4096, 24 nov. 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.081>>.

YANG, S.; WANG, S.; SUN, F.; ZHANG, M.; WU, F.; XU, F.; DING, Z. **Protective effects of puerarin against tetrabromobisphenol a-induced apoptosis and cardiac developmental toxicity in zebrafish embryo-larvae**. *Environmental Toxicology*, v. 30, n. 9, p. 1014–1023, set. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.21975>>.

YANG, Y.; ZHANG, M.; GAO, Y.; CHEN, H.; CUI, J.; YU, Y.; MA, S. **Identification and occurrence of TBBPA and its debromination and O-methylation transformation products in sediment, fish and whelks from a typical e-waste dismantling site**. *Science of the Total Environment*, v. 833, p. 155249, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155249>>.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 486 p, 2008.

ZAGATTO, P. A.; GOLDSTEIN, E. G.; BERTOLETTI, E. **Toxicidade de efluentes industriais da bacia do rio Piracicaba**. *Ambiente: revista CETESB de tecnologia*, v. 2, p. 39–42, 1988.

ZAGATTO, P.; BERTOLETTI, E.; GOLDSTEIN, E.; SOUZA, H. **Avaliação de toxicidade em sistema de tratamento biológico de afluentes líquidos**. *Revista SABESP*, n. 166,

p. 1–6, 1992. Disponível em: <<http://revistadae.com.br/site/artigo/34-Avaliacao-de-toxidade-em-sistema-de-tratamento-biologico-de-afluentes-liquidos>>.

ZATTARA, E. E.; BELY, A. E. **Evolution of a novel developmental trajectory: Fission is distinct from regeneration in the annelid *Pristina leidy***. *Evolution and Development*, v. 13, n. 1, p. 80–95, 2011.

ZATTARA, E. E.; TURLINGTON, K. W.; BELY, A. E. **Long-term time-lapse live imaging reveals extensive cell migration during annelid regeneration**. *BMC Developmental Biology*, v. 16, n. 1, p. 1–21, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12861-016-0104-2>>.

ZHANG, J.; HE, S.; REN, H.; WANG, L.; TIAN, L.; SHI-LONG, H.; HAI-XIA, R.; LI-PING, W.; LI-JIANG, T. **Removal of tetrabromobisphenol-A from wastewater by ozonation**. *Procedia Earth and Planetary Science*, v. 1, n. 1, p. 1263–1267, 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878522009001969>>.

ZHANG, J.; SHI, J.; GE, H.; TAO, H.; GUO, W.; YU, X.; ZHANG, M.; LI, B.; XIAO, R.; XU, Z.; LI, X. **Tiered ecological risk assessment of nonylphenol and tetrabromobisphenol A in the surface waters of China based on the augmented species sensitivity distribution models**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 236, n. December 2021, p. 113446, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113446>>.

ZHANG, Q.; WANG, S.; WANG, W.; BAO, P.; LI, B.; PENG, Y. **Achieving one-stage sludge reduction by adding Chironomid larvae in wastewater treatment systems**. *Ecological Engineering*, v. 83, p. 291–295, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.06.016>>.

ZHANG, Q.; WANG, S.; YANG, J.; PENG, Y. **Influence of Chironomid larvae on activated sludge and nitrogen removal in domestic wastewater treatment**. *CLEAN - Soil, Air, Water*, v. 45, n. 9, p. 1700040, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/clen.201700040>>.

ZHAO, J.; WANG, P.; WANG, C.; FU, M.; LI, Y.; YANG, R.; FU, J.; HAO, Y.; MATSIKO, J.; ZHANG, Q.; JIANG, G. **Novel brominated flame retardants in West Antarctic atmosphere (2011–2018): Temporal trends, sources and chiral signature**. *Science of the Total Environment*, v. 720, p. 137557, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137557>>.

ZHOU, H.; YIN, N.; FAIOLA, F. **Tetrabromobisphenol A (TBBPA): A controversial environmental pollutant**. *Journal of Environmental Sciences (China)*, v. 97, p. 54–66, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.04.039>>.

ZHOU, X.; GUO, J.; ZHANG, W.; ZHOU, P.; DENG, J.; LIN, K. **Tetrabromobisphenol A contamination and emission in printed circuit board production and implications**

**for human exposure.** Journal of Hazardous Materials, v. 273, p. 27–35, 2014.  
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.003>>.

ZILLI, F. L.; MONTALTO, L.; PAGGI, A. C.; MARCHESE, M. R. **Biometry and life cycle of *Chironomus calligraphus* Goeldi 1905 (Diptera, Chironomidae) in laboratory conditions.** Interciencia, v. 33, n. 10, p. 767–770, 2008.

ZUIDERVEEN, E. A. R.; SLOOTWEG, J. C.; DE BOER, J. **Novel brominated flame retardants - A review of their occurrence in indoor air, dust, consumer goods and food.** Chemosphere, v. 255, p. 126816, 2020. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126816>>.

ZWART, D. de; POSTHUMA, L. **Complex mixture toxicity for single and multile species: proposed methodologies.** Environmental Toxicology and Chemistry, v. 24, n. 10, p. 2665–2676, 2005.





## **APÊNCICE A - COMPOSIÇÃO DO AFLUENTE SINTÉTICO**

Para o preparo do afluente seguiu-se o protocolo descrito por Macêdo et al. (2020). Assim, o afluente sintético foi feito por meio da adição de 260 mg.L<sup>-1</sup> de extrato de carne, 500 mg.L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), 45 mg.L<sup>-1</sup> de sacarose e 142,5 mg.L<sup>-1</sup> de amido. O amido foi autoclavado em Autoclave Vertical CS, da marca Primatec, por 15 minutos a 120 °C e pressão de 1,0 atm para completa diluição. Para evitar a limitação do processo anaeróbio foi adicionada 1 mL.L<sup>-1</sup> de solução de micronutrientes na mistura.



## APÊNCICE B - COMPOSIÇÃO DO COMPOSTO ALIMENTAR TETRAMIN®

Conforme descrito na embalagem, a composição básica da ração TetraMin® é: arroz integral, extrato de levedura, farelo de aveia, farelo de soja, algas marinhas calcárias, farinha de camarão, farinha de peixe, fosfato de cálcio, glúten de trigo, lecitina de soja refinado, proteína de batata, vitamina C, etoxiquin, sorbitol, beta caroteno, bixina, corantes artificiais amarelo crepúsculo, amarelo tartrazina, azul indigotina e vermelho eritrozina.

Figura S 1 – Foto ilustrativa do composto usado para alimentação dos organismos.



Fonte: PETLAND (2022)



## **APÊNCICE C – ÁGUA RECONSTITUÍDA *DAPHNIA MAGNA***

A água reconstituída preparada no Brasil e na Holanda foram utilizadas no cultivo dos organismos e como solução para diluição na realização dos testes ecotoxicológicos.

### **Água reconstituída *Daphnia magna* feita no Brasil**

Para o preparo da água reconstituída de *D. magna* no Brasil foram utilizada quatro soluções, sendo elas: 1) cloreto de cálcio ( concentração de  $73,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 2) sulfato de magnésio (concentração de  $123,3 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 3) cloreto de potássio (concentração de  $5,8 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KCl}$ ) e 4) bicarbonato de sódio (concentração de  $64,8 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ ). Todas as soluções foram feitas de acordo com as normas da ABNT (ABNT, 2022a), dissolvendo as substâncias em 1 L de água deionizada. Para o preparo de 20 L de água reconstituída foram adicionados 64 mL da solução 1 e 16 mL das soluções 2, 3 e 4.

### **Água reconstituída *Daphnia magna* feita na Holanda**

Para o preparo de 10 litros de água reconstituída de *D. magna* na Vrije Universiteit Amsterdam foram utilizadas três soluções, sendo elas: 10 mL de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 10 mL de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e 100  $\mu\text{L}$  de selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). Além disso, foi adicionado 3.33 g de sal marinho, previamente dissolvido em água Milli-Q por 5 minutos em  $50^\circ\text{C}$ .



#### **APÊNCICE D - ÁGUA RECONSTITUÍDA *CERIODAPHNIA SILVESTRII***

Para o preparo da água reconstituída de *C. silvestrii* foram utilizadas duas soluções, sendo elas: 1) sulfato de cálcio dihidratado ( concentração de  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e 2) sulfato de magnésio heptahidratado (concentração de  $6,1 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de potássio (concentração de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KCl}$ ) e bicarbonato de sódio (concentração de  $4,8 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ ). Todas as soluções foram feitas de acordo com as normas da (ABNT, 2022b), dissolvendo as substâncias em 1 L de água deionizada. Para o preparo de 20 L de água reconstituída foram adicionados 400 mL da solução 1 e 200 mL da solução 2.





## APÊNCICE E - PREPARO DO MEIO L.C. OLIGO

Para o cultivo da alga *Raphidocelis subcapitata* foi utilizado o meio L.C. Oligo (ABNT, 2018). Esse meio foi preparado a partir de sete soluções (Tabela S1). As soluções foram armazenadas sob refrigeração em frascos de vidro.

Tabela S 1 - Soluções para preparo do meio L.C.Oligo.

	Descrição	Peso (mg)	Modo de preparo	Volume para preparo de 1000 mL do meio L.C. Oligo (mL)
<b>Solução 1</b>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	4000	Dissolver em 100 mL de água deionizada	1,0
<b>Solução 2</b>	KNO <sub>3</sub>	10000		1,0
<b>Solução 3</b>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3000		1,0
<b>Solução 4</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4000		1,0
<b>Solução 5</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	30	Dissolver em 1000 mL de água deionizada	0,5
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	60		
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	60		
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	60		
	Mn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	60		
	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	60		
<b>Solução 6</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60		0,5
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> .5H <sub>2</sub> O	1625		
	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	625		
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	625		
<b>Solução 7</b>	NaHCO <sub>3</sub>	15000		1,0

Fonte: ABNT, 2018.

O preparo do meio L.C. Oligo seguiu as seguintes etapas:

- Adicionou-se 500 mL de água deionizada em um balão volumétrico de 1000 mL;
- Foi adicionado 1 mL das soluções 1, 2, 3, 4 e 7 e 0,5 mL das soluções 5 e 6;
- O volume do balão foi completado com água deionizada até atingir o menisco;
- A solução foi agitada por 1 hora antes de ser autoclavada em agitador da marca Corning, modelo PC-420D sem aquecimento;

- O volume da solução agitada foi dividido em dois Erlenmeyer de 250 mL preenchidos com 100 mL e um Erlenmeyer de 2 L preenchido com 800 mL;
- Todos os frascos foram tampados com um tampão composto por gaze e algodão, cobertos com papel filme e esterilizado por 15 minutos a 120°C e pressão de 1,0 atm em autoclave vertical, da marca Primatec. Também foram autoclavados uma pipeta de 10 mL (utilizada para a entrada do oxigênio) e os tubos tipo Falcon (usados posteriormente na centrifugação).

A inoculação da alga ocorreu em bancada esterilizada com álcool 70% com o auxílio do bico de Bunsen para manter a esterilização. Cada frasco de 250 mL recebeu cerca de 75 mL de inóculo e o frasco de 2 L recebeu cerca de 850 mL de inóculo.

Todos os frascos permanecerão em sala aclimatada com fotoperíodo de 16h luz/8h escuro. Os novos inóculos (Erlenmeyer menores) foram mantidos nessas condições por 15 dias até nova inoculação. O frasco maior foi conectado à aeração por meio de uma pipeta e permaneceu nessas condições por 7 dias (fase exponencial de crescimento), quando a solução é encaminhada para centrifugação (Figura S.2).

Figura S 2 -- Cultivo de *Raphidocelis subcapitata*.

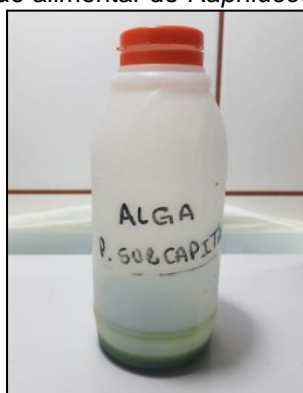


Fonte: Acervo pessoal da autora (2019).

## APÊNDICE F - PREPARO DA SUSPENSÃO ALGÁCEA

O conteúdo do Erlenmeyer de 2L descrito no Anexo E, foi centrifugado em Centrífuga modelo 206 BL Excelsa® II, marca FANEM por 10 minutos com rotação de 3000 rpm para seu adensamento. As algas sedimentadas foram ressuspensas e armazenadas em um frasco plástico tampado em geladeira à 4-7°C e o sobrenadante descartado (Figura S.3).

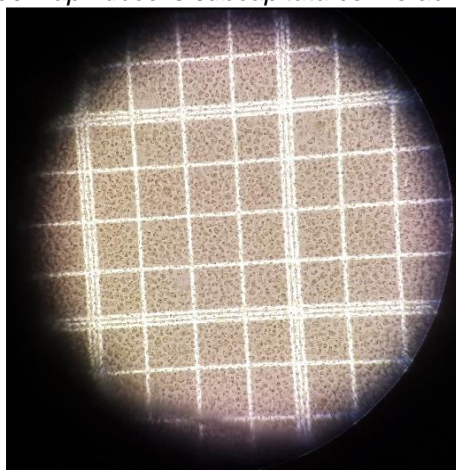
Figura S 3 – Suspensão alimentar de *Raphidocelis subcapitata*.



Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).

Para determinar a densidade de alga na solução era feita a contagem das células por meio da câmara de Neubauer (Figura S.4).

Figura S 4 – Contagem de células de *Raphidocelis subcapitata* com o auxílio da câmara de Neubauer.



Fonte: Acervo pessoal da autora (2018).



## APÊNCICE G – PARÂMETROS DAS SOLUÇÕES-TESTE NOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA (TESTE DA HIPÓTESE A)

A média e o desvio-padrão dos parâmetros das soluções -teste medidos com o auxílio da sonda multiparâmetro (modelo AKLA 32761) para os ensaios realizados com o afluente e os efluentes do reator acidogênico (RA) e do reator metanogênico (RM) estão nas Tabelas S2 a S4.

Tabela S 2 – Relação dos parâmetros oxigênio dissolvido (OD, mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), condutividade elétrica (CE, µs.cm<sup>-1</sup>) e pH mensurados nos testes de ecotoxicidade aguda com o afluente dos reatores (efluente sintético enriquecido com 100 µg TBBPA.L<sup>-1</sup>)

		CO	6%	12%	25%	50%	100%
<b>A. inaequalis</b>	OD	5,4 ± 0,2	4,10 ± 2,7	3,4 ± 3,1	2,6 ± 2,3	1,6 ± 1,4	1,00 ± 0,7
	CE	47,5 ± 1,9	97,30 ± 1,3	164,3 ± 6,8	325,5 ± 4,9	619 ± 4,2	1196 ± 0,0
	pH	7,6 ± 0,1	6,4 ± 0,2	6,3 ± 0,1	6,6 ± 0,1	7,2 ± 0,3	8,2 ± 0,1
<b>C. silvestrii</b>	OD	4,8 ± 0,8	4,7 ± 0,6	4,5 ± 1,1	4,7 ± 0,8	4,7 ± 1,0	3,4 ± 3,0
	CE	158,3 ± 3,2	183,2 ± 6,9	194,0 ± 8,5	258,5 ± 0,7	349,5 ± 23,3	559,0 ± 19,8
	pH	7,3 ± 0,1	7,2 ± 0,3	6,9 ± 0,3	7,2 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,4 ± 0,1
<b>C. sancticaroli</b>	OD	4,6 ± 0,3	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,6	4,3 ± 0,4	3,5 ± 0,3	3,1 ± 0,6
	CE	56,4 ± 4,1	95,1 ± 2,1	130,2 ± 2,9	203,1 ± 6,8	316,7 ± 30,4	621,8 ± 6,4
	pH	7,2 ± 0,2	6,3 ± 0,1	6,3 ± 0,1	6,8 ± 0,4	7,2 ± 0,3	8,0 ± 0,2
<b>P. longiseta</b>	OD	4,8 ± 0,3	4,3 ± 0,3	4,1 ± 0,7	3,5 ± 0,2	3,3 ± 0,1	2,7 ± 0,4
	CE	57,7 ± 2,8	90,5 ± 1,7	124,1 ± 2,3	195,4 ± 3,0	302,7 ± 37,9	601,8 ± 8,6
	pH	7,4 ± 0,4	6,2 ± 0,1	6,2 ± 0,1	6,5 ± 0,1	6,8 ± 0,2	7,5 ± 0,1

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela S 3 – Relação dos parâmetros oxigênio dissolvido (OD, mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), condutividade elétrica (CE, µs.cm<sup>-1</sup>) e pH mensurados nos testes de ecotoxicidade aguda com o efluente do reator acidogênico (RA)

		CO	6%	12%	25%	50%	100%
<b>A. inaequalis</b>	OD	5,8 ± 0,2	4,8 ± 0,6	3,8 ± 0,4	3,7 ± 1,1	2,6 ± 1,0	1,85 ± 0,8
	CE	41,5 ± 3,7	108,3 ± 11	174,7 ± 10,4	341,7 ± 16,2	643,0 ± 24,0	1211 ± 15
	pH	7,6 ± 0,4	6,8 ± 1,2	6,7 ± 0,9	6,6 ± 0,8	6,6 ± 0,7	6,7 ± 0,6
<b>C. silvestrii</b>	OD	7,0 ± 0,2	6,8 ± 0,4	6,9 ± 0,1	6,7 ± 0,7	6,1 ± 0,7	6,0 ± 0,8
	CE	151,1 ± 15,4	269,5 ± 11	401,7 ± 7	581,3 ± 14	936,7 ± 106	1802,7 ± 24
	pH	7,6 ± 0,2	7,5 ± 0,1	7,5 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,7 ± 0,2	7,7 ± 0,4
<b>C. sancticaroli</b>	OD	5,7 ± 0,3	3,1 ± 1,3	2,3 ± 1,6	1,8 ± 1,1	1,1 ± 0,7	0,7 ± 0,4
	CE	36,4 ± 2,0	96,8 ± 0,6	161,9 ± 3,4	327,2 ± 2,5	620,5 ± 2,1	1196 ± 0
	pH	7,1 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,8 ± 0,1	6,0 ± 0
<b>D. magna</b>	OD	5,6*	4,3*	1,6*	1,6*	1,2*	1,1*
	CE	620*	650*	676*	756*	901*	1193*
	pH	7,56*	7,33*	7,16*	7,08*	6,98*	6,92*
<b>P. longiseta</b>	OD	2,9 ± 0,2	3,9 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,2 ± 0,2	3,8 ± 0,1	3,0 ± 0,3
	CE	53,9 ± 0,6	165,5 ± 2,8	212,2 ± 2,5	335,5 ± 7,1	636,2 ± 15,9	1227,2 ± 19,4
	pH	6,9 ± 0,1	6,3 ± 0,1	6,2 ± 0,2	6,3 ± 0,1	6,6 ± 0,4	7,5 ± 0,2

Fonte: Autoria própria (2022). \*valores referentes apenas ao início do teste

Tabela S 4 – Relação dos parâmetros oxigênio dissolvido (OD, mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), condutividade elétrica (CE, μs.cm<sup>-1</sup>) e pH mensurados nos testes de ecotoxicidade aguda com o efluente do reator metanogênico (RM)

		CO	6%	12%	25%	50%	100%
<b><i>A. inaequalis</i></b>	<b>OD</b>	5,8 ± 0,2	5,3 ± 0,1	4,8 ± 0,7	4,4 ± 0,7	3,7 ± 0,4	3,7 ± 0,7
	<b>CE</b>	37,0 ± 8,6	131,9 ± 5,7	247,5 ± 4,5	458,3 ± 7,8	871,3 ± 12,8	1683,3 ± 10,3
	<b>pH</b>	7,6 ± 0,5	7,0 ± 0,8	6,8 ± 0,6	7,0 ± 0,6	7,5 ± 0,6	8,0 ± 0,3
<b><i>C. silvestrii</i></b>	<b>OD</b>	7,0 ± 0,2	6,0 ± 0,7	6,3 ± 0,5	6,6 ± 0,4	6,4 ± 0,6	6,8 ± 0,7
	<b>CE</b>	151,1 ± 15,4	203,2 ± 24	270 ± 8,5	549,3 ± 17	935,5 ± 11	1686,2 ± 31
	<b>pH</b>	7,6 ± 0,2	7,6 ± 0,1	7,8 ± 0,2	8,0 ± 0,3	8,2 ± 0,3	8,3 ± 0,4
<b><i>C. sancticaroli</i></b>	<b>OD</b>	5,73 ± 0,3	4,8 ± 0,8	4,05 ± 2	3,65 ± 2	2,85 ± 1,8	2,85 ± 2,2
	<b>CE</b>	36,43 ± 2,0	130,7 ± 9	246,5 ± 8	459 ± 9,9	871,5 ± 18	1668,5 ± 6,4
	<b>pH</b>	7,12 ± 0,1	6,77 ± 1,4	6,63 ± 1,1	6,86 ± 1	7,41 ± 0,97	7,91 ± 0,55
<b><i>D. magna</i></b>	<b>OD</b>	5,6*	3,5*	4,3*	3,5*	3,8*	2,8*
	<b>CE</b>	620*	663*	734*	870*	1112*	1586*
	<b>pH</b>	7,11*	6,57*	6,40*	6,55*	7,43*	8,01*
<b><i>P. longiseta</i></b>	<b>OD</b>	2,9 ± 0,2	3,9 ± 0,2	3,8 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1	3,6 ± 0,0
	<b>CE</b>	53,9 ± 0,6	168,3 ± 1,4	250,2 ± 3,9	455,7 ± 10,2	862,2 ± 15,2	1656,5 ± 6,4
	<b>pH</b>	7,2 ± 0,0	6,2 ± 0,1	6,6 ± 0,2	7,2 ± 0,7	7,6 ± 0,4	8,3 ± 0,2

Fonte: Autoria própria (2022). \*valores referentes apenas ao início do teste

## APÊNCICE H – PARÂMETROS DAS SOLUÇÕES-TESTE NOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA (TESTE DA HIPÓTESE A)

A média e o desvio-padrão dos parâmetros das soluções -teste medidos com o auxílio da sonda multiparâmetro (modelo AKLA 32761) para os ensaios realizados com o afluente e os efluentes do reator acidogênico (RA) e do reator metanogênico (RM) estão nas Tabelas S5 a S7.

Tabela S 5 – Relação dos parâmetros oxigênio dissolvido (OD, mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), condutividade elétrica (CE, µs.cm<sup>-1</sup>) e pH mensurados nos testes de ecotoxicidade crônica com o afluente dos reatores (enriquecido com 100 µg TBBPA.L<sup>-1</sup>)

		CO	6%	12%	25%	50%	100%
<b>A.</b> <i>inaequalis</i>	OD	4,2 ± 0,1	4,4 ± 0,6	3,5 ± 2,3	4,1 ± 0,7	3,8 ± 0,6	3,5 ± 1,1
	CE	49,2 ± 21	87,9 ± 25	122,9 ± 28	200,2 ± 32	330 ± 49	596 ± 70
	pH	6,7 ± 0,9	6,4 ± 0,4	6,3 ± 0,0	7,3 ± 0,9	7,3 ± 0,7	7,4 ± 0,2
<b>C.</b> <i>silvestrii</i>	OD	-	-	-	-	-	-
	CE	190,5 ± 36	188,5 ± 11	202 ± 22,6	231,5 ± 44	355,5 ± 28	540,5 ± 35
	pH	8,1 ± 0,3	8,2 ± 0,2	8,2 ± 0,2	8,2 ± 0,2	8,3 ± 0,2	8,4 ± 0,1
<b>C.</b> <i>sancticaroli</i>	OD	5,7 ± 0,2	5,0 ± 0,5	4,5 ± 0,5	441 ± 0,3	4,5 ± 1,1	4,8 ± 1,1
	CE	49,8 ± 11,6	82,1 ± 16	114,5 ± 18	195,5 ± 20	321 ± 53,7	605,5 ± 108
	pH	6,9 ± 0,4	6,2 ± 0,5	5,8 ± 0,8	6,6 ± 0,0	6,9 ± 0,7	7,6 ± 0,9
<b>P.</b> <i>longiseta</i>	OD	4,2 ± 0,2	4,1 ± 1,0	4,7 ± 0,6	4,1 ± 0,8	3,9 ± 0,6	3,2 ± 1,6
	CE	57,2 ± 32,5	98,6 ± 40	129,8 ± 37	205,2 ± 39	338 ± 60,8	630,5 ± 118
	pH	6,8 ± 1,1	6,6 ± 0,6	6,6 ± 0,3	7,5 ± 0,6	7,6 ± 0,3	7,7 ± 0,2

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela S 6 – Relação dos parâmetros oxigênio dissolvido (OD, mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), condutividade elétrica (CE, µs.cm<sup>-1</sup>) e pH mensurados nos testes de ecotoxicidade crônica com o efluente do reator acidogênico (RA)

		CO	6%	12%	25%	50%	100%
<b>A.</b> <i>inaequalis</i>	OD	6,0 ± 0,6	5,7 ± 0,4	4,6 ± 0,5	4,5 ± 0,4	3,1 ± 0,7	2,1 ± 0,8
	CE	43 ± 3,2	108,7 ± 15	177,1 ± 11	340 ± 25	641,5 ± 36	1211 ± 21
	pH	7,7 ± 0,5	6,8 ± 1,7	6,8 ± 1,2	6,8 ± 0,9	6,7 ± 0,9	6,7 ± 0,9
<b>C.</b> <i>sancticaroli</i>	OD	4,3 ± 0,4	4,3 ± 0,2	4,5 ± 0,6	4,2 ± 0,2	4,7 ± 0,2	4,1 ± 0,4
	CE	91,7 ± 15	190 ± 10	277 ± 11	501 ± 8	876 ± 35	1759 ± 100
	pH	7,2 ± 0,1	6,9 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,9 ± 0,1	7,1 ± 0,2	7,3 ± 0,3
<b>P.</b> <i>longiseta</i>	OD	4,65 ± 0,0	4,7 ± 0,1	4,2 ± 0,0	3,6 ± 0,0	4,1 ± 0,1	3,2 ± 0,3
	CE	56,5 ± 1,0	166,9 ± 2,2	219,7 ± 3,2	340 ± 3,5	641,5 ± 16,9	1222,2 ± 30,7
	pH	7,6 ± 0,0	7,1 ± 0,1	6,9 ± 0,1	7,0 ± 0,1	7,3 ± 0,3	7,9 ± 0,2

Fonte: Autoria própria (2022). Não foram realizadas as medições dos parâmetros para *C. silvestrii*

Tabela S 7 – Relação dos parâmetros oxigênio dissolvido (OD, mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), condutividade elétrica (CE, μs.cm<sup>-1</sup>) e pH mensurados nos testes de ecotoxicidade crônica com o efluente do reator metanogênico (RM)

	CO	6%	12%	25%	50%	100%	
<b><i>A. inaequalis</i></b>	<b>OD</b>	5,8 ± 0,2	5,7 ± 0,5	5,5 ± 0,0	5,2 ± 0,1	4,5 ± 0,6	4,4 ± 0,1
	<b>CE</b>	42,9 ± 3,2	133 ± 6,4	248,5 ± 4,9	457,5 ± 12	871 ± 18	1698 ± 35
	<b>pH</b>	7,7 ± 0,5	7,1 ± 0,8	6,9 ± 0,6	7,2 ± 0,5	7,7 ± 0,6	8,0 ± 0,4
<b><i>C. sancticaroli</i></b>	<b>OD</b>	4,93 ± 0,2	4,7 ± 0,1	4,56 ± 0,2	4,56 ± 0,2	4,86 ± 0,3	4,3 ± 0,1
	<b>CE</b>	52,2 ± 1	163,6 ± 2	251,9 ± 3	482,6 ± 14	913 ± 11	1754 ± 25
	<b>pH</b>	6,9 ± 0,1	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,2	7,13 ± 0,4	7,9 ± 0,5	8,8 ± 0,2
<b><i>P. longiseta</i></b>	<b>OD</b>	4,6 ± 0,1	4,7 ± 0,1	4,2 ± 0,1	3,6 ± 0,1	4,1 ± 0,1	3,2 ± 0,3
	<b>CE</b>	56,5 ± 5	169,5 ± 2,4	241,2 ± 14	400 ± 67	765 ± 128	1441 ± 251
	<b>pH</b>	7,6 ± 0,4	7,0 ± 0,9	7,3 ± 0,8	7,8 ± 0,8	8,3 ± 0,5	8,8 ± 0,5

Fonte: Autoria própria (2022). Não foram realizadas as medições dos parâmetros para *C. silvestrii*



## APÊNCICE I – PARÂMETROS DAS SOLUÇÕES-TESTE NOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA COM O TBBPA PADRÃO (TESTE DA HIPÓTESE B)

A média e o desvio-padrão dos parâmetros das soluções -teste medidos com o auxílio de um condutivímetro digital portátil (marca IonLab, modelo Con-300) e um medidor de pH portátil (marca IonLab, modelo pH-300) para os ensaios de toxicidade aguda e crônica realizados com o TBBPA padrão (isolado).

Tabela S 8 – Relação dos parâmetros pH e condutividade elétrica (CE,  $\mu\text{s.cm}^{-1}$ ) mensurados nos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com TBBPA isolado para *Allonais inaequalis*.

Teste de toxicidade aguda	pH	CE	Teste de toxicidade crônica	pH	CE
<b>0</b>	8,86 ± 0,12	185,7 ± 30	<b>0</b>	7,94 ± 0,07	60,7 ± 3
<b>150</b>	8,99 ± 1,33	231,5 ± 13	<b>3,75</b>	7,98 ± 0,69	57,5 ± 19
<b>300</b>	8,99 ± 1,06	239,5 ± 13	<b>7,5</b>	7,90 ± 0,64	58,0 ± 18
<b>600</b>	9,02 ± 1,06	238,5 ± 11	<b>15</b>	8,00 ± 0,76	53,5 ± 13
<b>1200</b>	8,97 ± 1,09	242,5 ± 20	<b>30</b>	7,98 ± 0,79	58,5 ± 13
<b>2400</b>	8,77 ± 0,87	155 ± 6	<b>60</b>	8,02 ± 0,81	57,0 ± 19
			<b>120</b>	8,44 ± 0,09	76,5 ± 16

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela S 9 – Relação dos parâmetros pH e condutividade elétrica (CE,  $\mu\text{s.cm}^{-1}$ ) mensurados nos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com TBBPA isolado para *Pristina longiseta*.

Teste de toxicidade aguda	pH	CE	Teste de toxicidade crônica	pH	CE
<b>0</b>	8,52 ± 0,20	168,2 ± 50	<b>0</b>	7,78 ± 0,00	62,2 ± 1,5
<b>75</b>	8,65 ± 1,55	217,5 ± 22	<b>3,75</b>	7,66 ± 0,24	61,0 ± 24
<b>150</b>	8,79 ± 1,56	222 ± 27	<b>7,5</b>	7,43 ± 0,02	63,5 ± 26
<b>300</b>	8,75 ± 1,60	226 ± 32	<b>15</b>	7,53 ± 0,11	63,5 ± 27
<b>600</b>	8,75 ± 1,40	224,5 ± 30	<b>30</b>	7,49 ± 0,11	64,0 ± 27
<b>1200</b>	8,80 ± 1,44	228,5 ± 40	<b>60</b>	7,56 ± 0,16	63,5 ± 26
<b>2400</b>	8,45 ± 1,32	144,0 ± 10	<b>120</b>	8,08 ± 0,42	77,0 ± 20

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela S 10 – Relação dos parâmetros pH e condutividade elétrica (CE,  $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) mensurados nos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com TBBPA isolado para *Ceriodaphnia silvestrii*.

Teste de toxicidade aguda	pH	CE	Teste de toxicidade crônica	pH	CE
<b>0</b>	7,86 ± 0,05	154,7 ± 7,5	<b>0</b>	8,03 ± 0,07	155 ± 7
<b>37,5</b>	7,84 ± 0,27	156 ± 14,1	<b>3,75</b>	8,04 ± 0,15	154 ± 11
<b>75</b>	7,94 ± 0,10	156 ± 7,07	<b>7,5</b>	8,08 ± 0,11	157 ± 4
<b>150</b>	7,90 ± 0,09	160 ± 4,2	<b>15</b>	8,08 ± 0,11	158 ± 0,3
<b>300</b>	8,13 ± 0,20	173,5 ± 10,6	<b>30</b>	8,09 ± 0,12	158 ± 3
<b>600</b>	8,47 ± 0,61	184 ± 4,2	<b>60</b>	8,06 ± 0,13	161 ± 2
<b>1200</b>	8,50 ± 0,60	189,5 ± 4,9	<b>120</b>	8,07 ± 0,09	161 ± 3
			<b>240</b>	8,09 ± 0,09	161 ± 4
			<b>480</b>	8,09 ± 0,09	162 ± 7

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela S 11 – Relação dos parâmetros pH e condutividade elétrica (CE,  $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) mensurados nos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com TBBPA isolado para *Chironomus sancti-caroli*.

Teste de toxicidade aguda	pH	CE	Teste de toxicidade crônica	pH	CE
<b>0</b>	8,73 ± 1,52	188,7 ± 24	<b>0</b>	8,96 ± 0,05	67,0 ± 15
<b>37,5</b>	8,85 ± 1,28	225,5 ± 0,7	<b>7,5</b>	8,34 ± 0,93	103,5 ± 67
<b>75</b>	8,84 ± 1,31	233 ± 10,6	<b>15</b>	8,76 ± 0,34	87 ± 37
<b>150</b>	8,91 ± 1,44	233 ± 0	<b>30</b>	8,50 ± 0,65	101,5 ± 59
<b>300</b>	8,84 ± 1,29	237 ± 17	<b>60</b>	8,55 ± 0,53	88,0 ± 40
<b>600</b>	8,85 ± 1,30	235 ± 16	<b>120</b>	8,9 ± 0,07	93,5 ± 47
<b>1200</b>	8,77 ± 1,38	245 ± 17	<b>240</b>	8,56 ± 0,56	100,0 ± 54
<b>2400</b>	8,61 ± 1,09	155 ± 6	<b>480</b>	8,36 ± 0,80	102,5 ± 57
			<b>960</b>	7,82 ± 1,52	115,5 ± 81

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela S 12 – Medidas de pH nos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com TBBPA isolado para *Daphnia magna*.

Teste de toxicidade aguda	pH	Teste de toxicidade crônica	pH
<b>0</b>	7,12 ± 0,05	<b>0</b>	7,44 ± 0,02
<b>819</b>	7,17 ± 0,04	<b>50</b>	7,48 ± 0,02
<b>1024</b>	7,18 ± 0,014	<b>100</b>	7,51 ± 0,01
<b>1280</b>	7,20 ± 0,02	<b>200</b>	7,53 ± 0,02
<b>1600</b>	7,21 ± 0,03	<b>400</b>	7,55 ± 0,01
<b>2000</b>	7,22 ± 0,02	<b>800</b>	7,55 ± 0,04

Fonte: Autoria própria (2022).

Tabela S 13 – Medidas de pH nos testes de ecotoxicidade aguda e crônica com TBBPA isolado para *Lymnaea stagnalis*.

<b>Teste de toxicidade aguda</b>	<b>pH</b>	<b>Teste de toxicidade crônica</b>	<b>pH</b>
<b>0</b>	7,98 ± 0,24	<b>0</b>	8,06 ± 0,11
<b>200</b>	8,06 ± 0,16	<b>200</b>	7,98 ± 0,3
<b>400</b>	8,04 ± 0,21	<b>400</b>	7,96 ± 0,3
<b>800</b>	8,03 ± 0,24	<b>800</b>	8,05 ± 0,18
<b>1600</b>	7,99 ± 0,29	<b>1600</b>	8,07 ± 0,19
<b>3200</b>	7,92 ± 0,35	<b>3200</b>	8,09 ± 0,19

Fonte: Aatoria própria (2022).