

Rui Miguel Sanches Linhares de Andrade

**Efeitos da exposição de peixe zebra, *Danio rerio*,  
a um efluente têxtil**



Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto  
para obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada

Departamento de Zoologia e Antropologia  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto  
Porto, 2004

RUI MIGUEL SANCHES LINHARES DE ANDRADE

MESTRADO EM ECOLOGIA APLICADA

**Efeitos da exposição de peixe zebra, *Danio rerio*,  
a um efluente têxtil**

Dissertação de Mestrado em Ecologia  
Aplicada apresentada à Faculdade de  
Ciências da Universidade do Porto

Porto, 2004

## RESUMO

O principal objectivo deste estudo, foi determinar a toxicidade de um efluente têxtil, e tentar prever o seu possível impacto no ambiente natural, analisando os efeitos letais e sub-letais provocados em duas fases do ciclo de vida (embriões e adultos) do peixe zebra, *Danio rerio*.

Tendo em vista a consecução dos objectivos, foram realizados testes de toxicidade agudos e crónicos, assim como biomonitorização online com Multispecies Freshwater Biomonitor<sup>®</sup>.

A exposição ao efluente têxtil verificou-se ser mais tóxica em fases de desenvolvimento embrionário de *Danio rerio* do que em indivíduos adultos.

Constatou-se que o efluente têxtil, embora não tenha demonstrado um impacto significativo na sobrevivência de indivíduos adultos de *Danio rerio*, provocou alterações comportamentais, especificamente na locomoção e ventilação.

Nos testes com larvas e embriões, verificou-se uma variabilidade da toxicidade e dos efeitos entre os testes realizados.

Através deste estudo foi possível verificar que, efluentes com parâmetros físico-químicos de acordo com os limites estabelecidos pela legislação actual, são promotores de impactos em espécies animais, especificamente em fases mais sensíveis do seu ciclo de vida. Comprovou-se, assim, a maior sensibilidade da avaliação biológica da qualidade da água relativamente às análises físico-químicas.

Sugerem-se medidas de melhoramento e apoio às indústrias têxteis, de modo a incentivar a prevenção de impactos no meio ambiente.

## ABSTRACT

The first objective of this study was to assess the toxicity of a textile effluent, and to try to understand the possible impact in natural environment, analysing the lethal and sub-lethal effects induced in two life stages (adults and embryo) of zebra fish, *Danio rerio*.

Acute and chronic toxicity tests, and online biomonitoring with Multispecies Freshwater Biomonitor<sup>®</sup> were carry out.

Results showed that textile effluent exposure with *Danio rerio* was more toxic in early life stages than adult stages.

We could identify some behavioural changes, namely on locomotion and ventilation, beside there was not detected a significative impact of the textile effluent on the survive of *Danio rerio* adults.

During the early life stage toxicity tests, we observed some effects variability.

With this study we could verify that, effluents with phisico-chemical parameters according with regulamentations, are deleterious to animal species, specially to the early life stages. This confirm the highest sensibility of biological assesemnt in water quality, comparing to phisico-chemical analyses.

Then, we suggest some improvement and support actions to textile industries, to develop and incite the environmental impact prevention.

## RÉSUMÉ

Le principal objectif de cette étude, fut déterminer la toxicité d'un effluent textile et essayer de prévoir son possible impact dans l'environnement, en analysant les effets mortels et sub mortels provoqués dans les deux phases du cycle de vie (embryons et adultes) du poisson zébre.

Des tests de toxicité aigus et chroniques et de la biomonitorage online avec Multispecies Freshwater Biomonitor<sup>®</sup> ont été faits.

On a vérifié que l'exposition à l'effluent textile est plus toxique en périodes du développement embryonnaire du *Danio rerio* que chez les adultes.

On a constaté que l'effluent textile, bien qu'il n'ait pas démontré une influence significative dans la survie de *Danio rerio* adultes, il a provoqué des altérations au niveau du comportement, notamment dans la locomotion et ventilation.

En ce que concerne les tests embryo-larvaires, on a constaté une variabilité de la toxicité et des effets parmi les tests réalisés.

Cette étude a permis de vérifier que des effluents avec des paramètres physico-chimiques selon les limites établis par la loi, provoquent des effets chez les espèces animales, surtout en périodes plus sensibles de leur cycle de vie. On a ainsi prouvé que l'évaluation biologique de la qualité de l'eau est plus efficace que les analyses physico-chimiques.

On suggère des mesures d'amélioration et d'appui aux industries textiles pour inciter la prévention des effets dans l'environnement.

*“Se às vezes digo que as flores sorriem  
E se eu disser que os rios cantam,  
Não é porque eu julgue que há sorrisos nas flores  
E cantos no correr dos rios...  
É porque assim faço mais sentir aos homens falsos  
A existência verdadeiramente real das flores e dos rios. (...)”*

*Alberto Caeiro*

*Aos meus pais,*

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio e a colaboração de muitas pessoas e instituições, a quem quero expressar o meu agradecimento:

À professora Doutora Maria Leonor Fidalgo, minha orientadora, pela sugestão do tema, pelo apoio científico, pela disponibilidade, pelo acompanhamento interessado, pela confiança demonstrada. Agradeço-lhe ainda a minuciosa e atenta correcção deste trabalho.

À Paula e à Carla, com quem partilhei o laboratório, as dúvidas e as ideias, as angústias e as alegrias, pelo auxílio indispensável em todas as fases deste trabalho.

Ao professor Doutor António Paulo, pela disponibilidade e pelo apoio demonstrado para a manutenção da espécie teste deste trabalho, o peixe zebra, e no fornecimento dos ovos para os testes. Agradeço também à Leonor, sua orientanda, pela amabilidade e disponibilidade em ceder os ovos de peixe zebra utilizados nos testes de toxicidade.

Aos professores Doutores Filipe Oliva Teles e Nuno Formigo, pelas sugestões no tratamento estatístico dos dados.

À Dr.<sup>a</sup> Anabela Viana e ao Sr. Baldaia, pela simpatia e pelos esclarecimentos e condições que me proporcionaram na recolha das amostras.

À Diana, pela ajuda prestada no trabalho laboratorial.

Aos Amigos, sempre. Obrigado por entenderem a minha ausência em determinadas alturas, e por me receberem sempre com o mesmo carinho.

À minha família, por me acompanhar em todos os momentos, por todo o apoio, pela compreensão, pelos incentivos.

# ÍNDICE GERAL

## 1. Introdução

1.1. Introdução Geral	1
1.2. Testes de Toxicidade	3
1.3. Biomonitorização Online	7
1.4. Caracterização do peixe zebra, <i>Danio rerio</i>	9
1.5. Impacto dos Efluentes Industriais Têxteis	10
1.6. Objectivos	
1.6.1. Enquadramento geral	12
1.6.2. Objectivos específicos	12

## 2. Material e Métodos

2.1. Organismo teste	13
2.2. Efluente e água de diluição	13
2.3. Parâmetros físico-químicos	14
2.4. Plano experimental	16
2.4.1. Teste agudo com adultos de <i>Danio rerio</i>	16
2.4.2. Teste crónico com adultos de <i>Danio rerio</i>	17
2.4.3. Teste crónico com embriões e larvas de <i>Danio rerio</i>	18
2.5. Análise estatística	19

## 3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização do efluente têxtil utilizado nos diferentes testes	22
3.2. Testes agudos com indivíduos adultos de <i>Danio rerio</i>	23
3.2.1. Oxigénio, pH, temperatura e condutividade	23
3.2.2. Sobrevivência de adultos de <i>Danio rerio</i>	24
3.3. Testes crónicos com indivíduos adultos de <i>Danio rerio</i>	25

3.3.1. Oxigénio, pH, temperatura e condutividade	26
3.3.2. Sobrevivência de adultos de <i>Danio rerio</i>	26
3.3.3. Respostas comportamentais (locomoção e ventilação)	27
3.3.3.1. Comportamentos registados na primeira semana de exposição	27
3.3.3.2. Comportamentos registados na segunda semana de exposição	29
3.3.3.3. Comportamentos registados na terceira semana de exposição	31
3.3.3.4. Comportamentos registados nas três semanas de exposição	33
3.3.3.5. Apreciação global dos comportamentos de <i>Danio rerio</i> registados	35
3.3.3.6. Análise de respostas comportamentais a partir de dados fornecidos pelo Biomonitor MFB <sup>®</sup>	37
3.4. Testes crónicos com embriões e larvas de <i>Danio rerio</i>	39
3.4.1. Oxigénio, pH, temperatura e condutividade	40
3.4.2. Sobrevivência de embriões e larvas de <i>Danio rerio</i>	40
3.4.3. Eclosão de larvas de <i>Danio rerio</i>	43
3.4.4. Deformações ocorridas em larvas de <i>Danio rerio</i>	46
3.4.5. Crescimento das larvas de <i>Danio rerio</i>	50
3.4.5.1. Comprimento das larvas sobreviventes	50
3.4.5.2. Peso das larvas sobreviventes	52
3.4.6. Batimentos cardíacos de embriões e larvas de <i>Danio rerio</i>	53
3.4.7. Apreciação global dos efeitos em embriões e larvas de <i>Danio rerio</i>	55
3.4.8. Relação dos parâmetros físico-químicos do efluente com os efeitos detectados em embriões e larvas de <i>Danio rerio</i>	61
<b>4. Considerações Finais</b>	<b>63</b>
<b>5. Referências Bibliográficas</b>	<b>69</b>
<b>6. Anexos</b>	<b>75</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aspecto geral de <i>Danio rerio</i> adulto. _____	9
<b>Figura 2.</b> Valores percentuais de sobrevivência obtidos nos testes agudos com adultos de <i>D. rerio</i> . _____	24
<b>Figura 3.</b> Valores percentuais de sobreviventes de adultos de <i>D. rerio</i> , ao longo dos tratamentos nos dois testes crônicos efectuados. _____	26
<b>Figura 4.</b> Comportamentos (locomoção e ventilação) registados em adultos de <i>D. rerio</i> na primeira semana de exposição em cada teste crónico. _____	28
<b>Figura 5.</b> Comportamentos (locomoção e ventilação) registados em adultos de <i>D. rerio</i> na segunda semana de exposição em cada teste crónico. _____	30
<b>Figura 6.</b> Comportamentos (locomoção e ventilação) registados em adultos de <i>D. rerio</i> na terceira semana de exposição em cada teste crónico. _____	32
<b>Figura 7.</b> Comportamentos (locomoção e ventilação) registados em adultos de <i>D. rerio</i> nas três semanas de exposição em cada teste crónico. _____	34
<b>Figura 8.</b> Gráficos de longo-termo e histogramas apresentados pelo biomonitor MFB <sup>®</sup> , representativos da locomoção e ventilação de adultos de <i>D. rerio</i> expostos ao tratamento controlo e ao tratamento com 100% de efluente, na primeira semana do teste I. _____	38
<b>Figura 9.</b> Sobrevivência de embriões e larvas de <i>D. rerio</i> nos três testes crônicos efectuados. _____	41
<b>Figura 10.</b> Evolução da sobrevivência de embriões e larvas de <i>D. rerio</i> durante o teste II e o teste III. _____	42
<b>Figura 11.</b> Valores percentuais e tempo da eclosão das larvas de <i>D. rerio</i> em cada teste crónico. _____	44

<b>Figura 12.</b> Evolução das deformações ocorridas nas larvas de <i>D. rerio</i> , durante o teste II e o teste III. _____	46
<b>Figura 13.</b> Sinais de toxicidade em larvas de <i>Danio rerio</i> após 168 horas de exposição ao efluente têxtil. _____	48
<b>Figura 14.</b> Deformações identificadas em larvas de <i>D. rerio</i> após 168 horas de exposição ao efluente têxtil. _____	49
<b>Figura 15.</b> Comprimento das larvas de <i>D. rerio</i> no fim dos testes II e III. _____	51
<b>Figura 16.</b> Valores médios do peso das larvas de <i>D. rerio</i> no fim dos testes II e III. _____	52
<b>Figura 17.</b> Batimentos cardíacos de embriões e larvas de <i>Danio rerio</i> nos testes II e III, às 48 horas e 96 horas de exposição. _____	54

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros físico-químicos analisados em diversas fases deste trabalho, com as respectivas unidades e métodos analíticos. _____	15
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros físico-químicos analisados pela indústria têxtil, com as respectivas unidades e métodos analíticos. _____	15
<b>Tabela 3.</b> Valores médios dos parâmetros físico-químicos do efluente têxtil, analisados durante o período de amostragem. _____	22
<b>Tabela 4.</b> Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste agudo I, com adultos de <i>D. rerio</i> . _____	23
<b>Tabela 5.</b> Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste agudo II, com adultos de <i>D. rerio</i> . _____	23
<b>Tabela 6.</b> Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste crónico I, com adultos de <i>D. rerio</i> . _____	25
<b>Tabela 7.</b> Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste crónico II, com adultos de <i>D. rerio</i> . _____	25
<b>Tabela 8.</b> Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste crónico preliminar (teste I), com embriões e larvas de <i>D. rerio</i> . _____	40
<b>Tabela 9.</b> Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste crónico II, com embriões e larvas de <i>D. rerio</i> . _____	40
<b>Tabela 10.</b> Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste crónico III, com embriões e larvas de <i>D. rerio</i> . _____	40
<b>Tabela 11.</b> Síntese dos resultados obtidos no teste crónico preliminar (teste I), efectuado com embriões e larvas de <i>D. rerio</i> , após exposição a um gradiente de concentração de efluente têxtil. _____	56

**Tabela 12.** Síntese dos resultados obtidos no teste crônico II, efectuado com embriões e larvas de *D. rerio*, após exposição a um gradiente de concentração de efluente têxtil. \_\_\_\_\_ 57

**Tabela 13.** Síntese dos resultados obtidos no teste crônico III, efectuado com embriões e larvas de *D. rerio*, após exposição a um gradiente de concentração de efluente têxtil. \_\_\_\_\_ 58

**Tabela 14.** Valores de CL<sub>50</sub> ou CI<sub>50</sub>, CL<sub>1</sub> ou CI<sub>1</sub> e CMA para a sobrevivência, eclosão e deformações ocorridas nas larvas de *D. rerio*, nos testes crônicos II e III. \_\_\_\_\_ 60

## 1. Introdução

### 1.1. Introdução Geral

A água é um meio por onde nutrientes e organismos se movimentam, por isso os cursos de água são frequentemente considerados como as “veias da natureza”. Os cursos de água são ecossistemas abertos e, conseqüentemente, bastante vulneráveis a agressões exteriores (Scheneiders *et al.*, 1993).

Com o aumento da população humana, com a sua concentração em grandes centros urbanos e com o desenvolvimento industrial, tem aumentado a necessidade de água para consumo, bem como os níveis de poluição dos recursos hídricos.

Na verdade, a degradação da qualidade das águas levanta graves problemas ecológicos. De modo a evitar ou a minimizar a ocorrência desses problemas, é necessário determinar a toxicidade de milhares de substâncias químicas (e dos seus produtos de degradação) utilizadas para fins industriais, agrícolas e domésticos, frequentemente descarregadas nos cursos de água. Os programas de monitorização da qualidade da água podem ser uma grande ajuda neste campo.

Um importante objectivo da maioria dos programas de monitorização da qualidade da água é a preservação da vida aquática, não só pelo seu valor intrínseco, mas também porque a água que sustenta biocenoses ricas e diversificadas revela mais qualidade, tornando-se útil também assim para o ser humano.

O controlo e vigilância das descargas de efluentes baseiam-se sobretudo em análises físico-químicas que, devido a descontinuidades de amostragem, nem sempre detectam atempadamente descargas nocivas de efluentes. A análise biológica é referida por Gerhardt (1999a) como sendo um bom complemento à monitorização química, visto que os organismos integram ao longo do tempo os potenciais efeitos tóxicos de diferentes compostos químicos e seus produtos de degradação, indicando igualmente os efeitos globais nos ecossistemas aquáticos.

Gerhardt (1995) refere ainda que os resultados da biomonitorização permitem uma integração temporal dos efeitos da exposição aos diferentes poluentes durante todo o ciclo de vida de um organismo, sendo mais relevantes que as análises químicas na vigilância contínua de poluentes no meio aquático.

Os produtos tóxicos podem revelar os seus efeitos adversos de diversas maneiras, dependendo das características do poluente, do curso de água receptor e das respectivas comunidades biológicas (Abel, 1998). É necessário, portanto, que as análises físico-químicas sejam complementadas com análises biológicas relativas à estrutura das biocenoses e à avaliação da toxicidade dos poluentes (Rand, 1995).

A toxicidade de produtos químicos pode ser detectada em animais através da análise das suas respostas à exposição ao tóxico, isto é, analisando determinados biomarcadores. Um biomarcador é uma resposta bioquímica, fisiológica, celular, morfológica ou comportamental ao nível do organismo exposto a concentrações subletais de poluentes (Hellowell, 1986).

Geralmente, os efeitos tóxicos directos na sobrevivência, crescimento ou reprodução dos organismos, são determinados usando bactérias, algas ou perifiton, invertebrados e peixes (Fent, 2003). De entre os animais de água doce, os peixes são os organismos que mais se assemelham fisiologicamente aos seres humanos e, frequentemente, observam-se alterações no seu comportamento como, por exemplo, perda de orientação e lesões nas brânquias ou na pele, podendo ser por isso utilizados como biomonitores da qualidade da água (Gerhardt, 1999a).

Cleveland *et al.* (1999) sublinham o importante papel que o desenvolvimento e a standardização dos testes de toxicidade e de bioacumulação, os estudos químicos, os ensaios laboratoriais e os testes efectuados no campo com peixes, tiveram na manutenção e melhoria da qualidade ambiental. Estes autores indicam várias razões que justificam a utilização dos peixes como excelentes instrumentos para a monitorização ecotoxicológica:

- algumas espécies têm o seu ciclo de vida bem documentado;
- as fases iniciais do seu ciclo de vida são extremamente sensíveis a contaminantes;
- mantêm um contacto íntimo com o seu habitat e portanto é muito difícil evitarem a exposição a poluentes;
- têm sido standardizados numerosos métodos para testes de toxicidade com peixes;
- podem agir como “sistemas biológicos sentinelas” para detecção de exposições tóxicas.

A maioria das aplicações de “sistemas biológicos sentinelas”, de acordo com Kramer *et al.* (1991), podem ter vários objectivos:

- monitorização da qualidade da água utilizada para diversos fins (humanos ou industriais), onde um alarme pode levar ao encerramento dos canais de distribuição da água para consumo;

- monitorização de potenciais derramamentos de modo a prevenir danos no ambiente natural, onde um alarme pode levar à identificação da fonte poluidora e consequente acção judicial;

- monitorização de potenciais derramamentos tendo em vista a detecção de danos ou problemas de funcionamento de fábricas, onde um alarme pode conduzir à detecção antecipada de erros num processo de produção e, quando possível, armazenamento temporário de efluentes numa bacia de emergência.

Desta forma, a biomonitorização pode ser utilizada também para orientar os processos industriais.

A utilização dos peixes nos testes de ecotoxicidade, tem vindo a tornar-se num esforço multi-disciplinar. A integração de características de organismos, populacionais e comunitárias, associadas a protocolos de avaliação estatística dos riscos e impactos, promete aumentar no futuro o grau de certeza e a previsibilidade das capacidades da biomonitorização e da ecotoxicologia.

## 1.2. Testes de Toxicidade

A toxicologia aquática tem sido definida como o estudo dos efeitos de químicos ou outros agentes tóxicos em organismos aquáticos, com especial ênfase nos efeitos nocivos ou adversos (ASTM, 1998).

Utilizam-se testes de toxicidade para estimar as concentrações do químico e a duração da exposição requeridas para produzir efeitos críticos, como alterações na mortalidade, crescimento, reprodução, patologias, comportamento, fisiologia e bioquímica dos organismos. Estes testes proporcionam uma base de dados que pode ser utilizada para avaliar o risco associado a uma situação onde estão definidos o agente químico, o organismo e as condições de exposição (Rand, 1995).

A maior parte dos testes de toxicidade são conduzidos em laboratório, fornecendo resultados a partir dos quais se tentam extrapolar prováveis situações adversas para o meio natural. As relações de causa-e-efeito são facilmente estabelecidas a partir destes testes, devido ao elevado grau de controlo das condições do teste (e.g. qualidade da água, fotoperíodo, temperatura). Além disso, estes testes são muito claros e relativamente simples de conduzir, muitos estão estandardizados e podem ser reproduzidos.

Uma variedade de métodos estandardizados pode ser consultada em várias publicações de entidades como, por exemplo, American Public Health Association (APHA), U. S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), American Society for testing and Materials (ASTM), International Standardization Organization (ISO) e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).

Os actuais testes de toxicidade são levados a cabo com espécies que são consideradas representativas da maioria das classes de organismos, de modo a que os resultados proporcionem informações sobre a toxicidade de químicos específicos para diferentes tipos de organismos, sob determinadas condições (Rand, 1995).

Vários critérios são utilizados para a selecção de organismos para os testes de toxicidade:

- a. espécies abundantes e vastamente disponíveis (facilmente obtidas através de uma fonte comercial ao longo do ano);
- b. espécies fáceis de utilizar e manter em laboratório, com técnicas de cultura bem conhecidas;
- c. espécies com informação científica disponível (sobre a sua fisiologia, genética, comportamento, entre outras), facilitando a interpretação dos resultados.

A determinação da toxicidade através de bioensaios segue, normalmente, uma linha evolutiva a partir de testes mais simples e de curta duração, para testes mais complexos e de longa duração.

Apesar de existirem algumas diferenças, todos eles se regem por um plano experimental idêntico, isto é, os organismos são expostos a diferentes concentrações da solução teste (tóxico individual ou efluente), os critérios para determinar os efeitos são estabelecidos previamente (e.g. sobrevivência, crescimento, deformações) e são depois

avaliados por comparação com os organismos expostos à solução controlo (água utilizada na diluição das diferentes concentrações do efluente).

A exposição dos organismos à solução teste também é definida previamente e pode ser de 3 tipos:

- a) Estática – não existe renovação da solução durante todo o teste;
- b) Estática com renovação – a solução é renovada periodicamente (geralmente a cada 24 horas);
- c) Renovação contínua – a solução circula para dentro e para fora das câmaras teste, podendo ser renovada de forma contínua ou intermitente.

Os testes de toxicidade podem ser considerados agudos ou crónicos, conforme a sua duração, apesar de existirem outras interpretações para esta classificação, designadamente no que respeita aos efeitos serem mais ou menos severos, ou ocorrerem em concentrações de efluente mais elevadas ou mais baixas.

Os testes agudos realizam-se em curtos períodos de tempo (geralmente entre 48 horas a 96 horas) e têm um plano experimental relativamente simples, onde os efeitos críticos analisados são normalmente a mortalidade ou a imobilização dos organismos. Devido à facilidade de realização e aos custos baixos que acarretam, uma grande parte da informação já existente no que diz respeito à avaliação da toxicidade de efluentes é proporcionada por este tipo de testes.

O objectivo de um teste de toxicidade aguda, consiste na determinação da concentração de uma substância (químico ou efluente) ou a intensidade de um agente (e.g. temperatura, pH) que produz um efeito prejudicial num grupo de organismos durante uma exposição curta, efectuada em condições controladas (Ward *et al.*, 1982). A toxicidade expressa-se pelo valor da concentração letal a 50% (CL<sub>50</sub>) ou da concentração inibitória a 50% (CI<sub>50</sub>). Estes parâmetros indicam a concentração de tóxico no meio, que provoca, respectivamente a morte ou a inibição (e.g. do crescimento) de metade dos indivíduos da população considerada nas condições experimentais utilizadas (ASTM, 1998).

Os testes crónicos têm como objectivo detectar efeitos sub-letais e realizam-se em períodos de tempo mais longos, podendo ter a duração de anos no caso de

abrangerem o ciclo de vida completo de certas espécies. Por este motivo, acarretam maiores dificuldades para a sua execução, quer a nível económico quer a nível prático.

Contudo, em resposta às necessidades de regulamentação rápida dos parâmetros dos efluentes promotores de toxicidade crónica, têm sido apresentados pela U. S. EPA alguns testes de curta duração (4 a 7 dias), que permitem estimar os efeitos crónicos dos efluentes.

O objectivo dos testes crónicos com efluentes ou compostos químicos é estimar a concentração “de segurança”, ou seja, a concentração das substâncias tóxicas que permite uma propagação normal dos peixes e outros organismos aquáticos nos cursos de água receptores (EPA, 2002).

A toxicidade crónica é expressa em termos da concentração mais elevada que estatisticamente não teve efeito observado significativo (CENO) nas suas respostas em comparação com as do controlo. Também se pode expressar em termos da concentração mais baixa, que estatisticamente provocou um efeito observado significativo (CEO) nas suas respostas em comparação com as do controlo.

Os efeitos críticos geralmente analisados nestes testes incluem a mortalidade e a sobrevivência, a reprodução e o crescimento, a locomoção, a ventilação, os batimentos cardíacos, as análises sanguíneas, a histopatologia, a actividade enzimática, a função olfactiva e a ocorrência de deformações. Como não é praticável detectar ou medir todos estes efeitos (e outros ainda possíveis) num teste de rotina, as observações estão normalmente confinadas a alguns desses efeitos.

A maior limitação destes estudos diz respeito às dificuldades de extrapolação dos resultados laboratoriais para o ambiente natural, visto que os efeitos observados em laboratório podem não ocorrer da mesma forma ou com o mesmo nível e intensidade, que concentrações similares em ambiente natural.

Geralmente em laboratório, não se tem em consideração a capacidade de adaptação das populações de organismos. Portanto, os efeitos observados em laboratório poderão parecer mais nocivos do que de facto serão no ambiente natural. Além disso, os estudos laboratoriais não conseguem simular as complexas e variadas interacções entre espécies, assim como as influências e alterações do meio ambiente que ocorrem espontaneamente nos sistemas naturais.

Para Abel (1998), uma das grandes dificuldades em estudar os efeitos da poluição no campo, consiste em comparar o que está a acontecer no rio poluído com o que poderia ter acontecido se o rio não fosse poluído. Comparando com outras zonas do mesmo rio não poluídas, sabe-se também que, num ambiente natural, as suas características variam bastante de acordo com as condições físicas e químicas prevalentes em cada local.

Como vemos, é bastante difícil distinguir as consequências da poluição, a partir das respostas da comunidade biológica às variações naturais do ambiente físico, devido ao facto destas relações não serem ainda bem compreendidas.

A variabilidade dos testes de toxicidade e as diferenças nas espécies originam também incertezas na interpretação dos resultados. Mas apesar destes testes possuírem limitações, dão sugestões importantes sobre o potencial ecotoxicológico de locais contaminados. Fent (2003) afirma que os testes de toxicidade realizados em laboratório são uma ferramenta viável na caracterização da acção tóxica dos químicos e na compreensão da toxicidade associada.

Mas para além dos testes de toxicidade, existem outros instrumentos que auxiliam a biomonitorização, nomeadamente a monitorização online.

### 1.3. Biomonitorização Online

Têm sido desenvolvidos inúmeros monitores para peixes baseados em diferentes técnicas, tais como ultrasons, vídeo, condutividade, sinais bioeléctricos e reotaxia (Gerhardt, 1998).

Um novo biomonitor, Multispecies Freshwater Biomonitor (MFB<sup>®</sup>), tem sido utilizado em vários trabalhos, comprovando a sua eficácia na detecção online de alterações comportamentais em resposta à exposição a poluentes em vários organismos aquáticos, designadamente em *Gammarus pulex* (Gerhardt *et al.*, 1994; Gerhardt, 1995; Gerhardt, 1996; Gerhardt *et al.*, 1998), *Oncorhynchus mykiss* (Gerhardt, 1998), *Oryzias latipes* e *Macrobrachium nipponense* (Gerhardt *et al.*, 2002) ou em *Gasterosteus aculeatus* (Craig *et al.*, 2004).

Apesar das alterações de comportamento induzidas por substâncias tóxicas terem um interesse biológico intrínseco, podem ser também muito úteis para detecção e/ou

monitorização da presença de poluentes na água (Pascoe *et al.*, 1991). Estes autores defendem que desde que as modificações no comportamento dos animais possam ser detectadas de forma relativamente rápida e em concentrações inferiores às que provocam mortalidade, consegue-se garantir uma indicação mais sensível da fraca qualidade da água comparativamente aos convencionais testes letais de toxicidade.

Contudo, as modificações do comportamento são frequentemente bastante variáveis e difíceis de registar, pelo que devem ser escolhidas aquelas que oferecem maiores condições para investigações futuras e eventual incorporação em programas de monitorização.

O princípio utilizado pelo MFB<sup>®</sup> no registo do comportamento animal, baseia-se na análise de alterações num campo eléctrico de corrente alternada (técnica de conversão de impedância), onde os sinais produzidos pelo comportamento natural dos diferentes organismos aquáticos podem ser observados e registados em software adequado (Gerhardt *et al.*, 1994).

Deste modo, comportamentos animais específicos são traduzidos em termos das alterações à resistência geradas pelos movimentos dos organismos dentro de um campo eléctrico, consequentemente descrito em termos de frequência e amplitude. Por exemplo, movimentos amplos de locomoção correspondem a amplitudes elevadas e a baixas frequências (<2 Hz) e movimentos rítmicos de ventilação correspondem a baixas amplitudes e altas frequências (>2 Hz) (Gerhardt, 1999b).

Gerhardt *et al.* (1994) distinguiram com o conversor de impedância diferentes tipos de comportamento em *Gammarus pulex*, como locomoção e ventilação, e concluíram que o conversor de impedância é uma ferramenta apropriada para estudos comportamentais e ecológicos, já que registam padrões comportamentais de espécies aquáticas de forma sensível e quantitativa.

Diferenças entre comportamentos específicos entre diferentes espécies, podem assim ser quantificadas (frequência, amplitude) e relacionadas com diferentes adaptações das espécies aos seus habitats especiais. Tal conhecimento é uma ferramenta bastante útil em estudos ecológicos.

#### 1.4. Caracterização do peixe zebra, *Danio rerio*

O peixe zebra, *Danio rerio*, é um pequeno peixe tropical bem conhecido dos entusiastas por aquários. Os factores que o tornaram extremamente popular na aquariofilia foram os mesmos que o converteram numa das espécies mais utilizadas em investigação.

É uma espécie bentopelágica de água doce (Temperatura: 18-24°C; pH: 6-8), pertencente à família dos CYPRINIDAE e à ordem dos CYPRINIFORMES, com distribuição pela Ásia (Westerfield, 2000).



**Figura 1.** Aspecto geral de *Danio rerio* adulto.

(Fonte: [www.luc.edu/depts/biology/grande.htm](http://www.luc.edu/depts/biology/grande.htm))

Esta espécie mede cerca de 3 a 5 cm em adulto. É uma espécie simples de obter, económica, de fácil manutenção e, sob condições apropriadas, consegue proporcionar um grande número de ovos transparentes e não aderentes e de fácil manuseamento. Uma fêmea tem posturas de aproximadamente 50 a 200 ovos por dia.

Numa perspectiva biotecnológica, uma das suas grandes vantagens é o pouco espaço necessário e baixos custos de manutenção relativamente ao investimento inicial. Um grupo de peixes zebra pode manter-se numa fracção do espaço necessário para manter um grupo equiparável de trutas ou salmões, que são modelos biológicos em investigação (Lele *et al.*, 1996).

Devido às suas características, o *D. rerio* tem sido utilizado como modelo em inúmeros estudos no campo da genética molecular, da biologia dos vertebrados, bem como em neurobiologia e na investigação genética (Kimmel *et al.*, 1995; Lele *et al.*, 1996; Westerfield, 2000).

O seu desenvolvimento embrionário foi descrito em vários estudos (e.g. Kimmel *et al.*, 1995) e é uma base para a interpretação dos efeitos provocados por poluentes ambientais. As fases de desenvolvimento iniciais dos peixes são estádios bastante

sensíveis do seu ciclo de vida, devido aos vários acontecimentos críticos e essenciais que ocorrem num curto espaço de tempo (de duas células iniciais, torna-se rapidamente num organismo funcional com sistemas de órgãos bem desenvolvidos). Se em qualquer altura desta fase de desenvolvimento um stress ambiental, originado por um poluente, induz alguma alteração nesse desenvolvimento, as hipóteses de sobrevivência são imediatamente reduzidas.

Os testes com embriões de *D. rerio* são recomendados por Nagel (2002) como modelo em ecotoxicologia e toxicologia. Esta é uma espécie também recomendada pela Environmental Protection Agency para testes de toxicidade aguda com peixes adultos (EPA, 1996a) e para testes de toxicidade com embriões (EPA, 1996b).

### 1.5. Impacto dos Efluentes Industriais Têxteis

Uma das maiores fontes de poluição das águas superficiais é a descarga de efluentes industriais. Cerca de vinte por cento do consumo global da água são gastos na actividade industrial. Na Península Ibérica, os processos industriais geradores de volumes significativos de águas residuais incluem a indústria petroquímica, a síntese química, a farmacêutica, a agroquímica, as alimentares, a pasta de papel e os têxteis (Faria, 2002).

A indústria têxtil é uma das maiores do mundo em termos de produção de águas residuais, gerando um efluente altamente poluído proveniente principalmente dos sectores de engomagem, tinturaria e acabamento. Stern *et al.* (2003) indicam que estas operações, além de exigirem grandes quantidades de água (cerca de cento e cinquenta litros por cada quilograma de tecido tingido), são também caracterizadas por um uso massivo de sais inorgânicos, bases, ácidos e sulfatos, bem como por tintas que podem variar de dia para dia quanto ao tipo de estrutura química. Rosa *et al.* (1999), caracterizam os efluentes têxteis não tratados como contendo numerosas populações bacterianas, elevada carga orgânica, elevada volatilidade, elevada salinidade, elevada reactividade química, e possuindo também valores de pH elevados.

Figueiredo *et al.* (2000) indicam também que nas indústrias onde os processos industriais são descontínuos, os despejos lançados na estação de tratamento de efluentes apresentam geralmente grande variação de carga, o que acarreta um baixo desempenho no tratamento e compromete a qualidade do efluente final lançado no corpo receptor.

Os produtos contaminantes do meio ambiente, como os produzidos pelas indústrias têxteis, partilham muitas propriedades críticas como a toxicidade, elevada persistência ambiental, grande mobilidade (facilitando a infiltração no solo e a posterior contaminação de águas subterrâneas), entre outras. Deste modo, adquirem grande importância as interações entre compostos tóxicos individuais (Fent, 2003).

As interações entre os diferentes tóxicos dos efluentes podem ser aditivas, sinérgicas (com maior impacto que as interações aditivas) ou antagonistas (com menor impacto que as aditivas). Assim sendo, um efluente pode ser considerado não tóxico, ainda que as concentrações dos seus componentes sejam consideradas tóxicas individualmente, e vice-versa. Apenas por intermédio dos ensaios de toxicidade com efluentes, é possível obter uma avaliação efectiva dos efeitos combinados das substâncias tóxicas.

Existem vários estudos de toxicidade com a espécie *Danio rerio*, tanto com indivíduos adultos (e.g. Smolders, 2003), como com embriões e larvas (e.g. Lange *et al.*, 1995). No entanto, de uma forma geral, os testes realizam-se expondo os organismos a tóxicos individuais, sendo muito mais raros os que avaliam a toxicidade de efluentes contendo misturas de poluentes, devido à complexidade de interpretação dos efeitos decorrentes.

Relativamente à avaliação de toxicidade de efluentes têxteis, existem alguns trabalhos efectuados com *Daphnia magna* (Galassi *et al.*, 2000; Villegas-Navarro *et al.*, 2001), *Orzyas latipes* e *Oreochromis mossambicus* (Chen *et al.*, 2001) *Spirillum volutans* e *Scenedesmus spinosus* (Gómez *et al.*, 2001), mas não foram encontrados na literatura consultada, estudos sobre o impacto desses efluentes em *Danio rerio*.

## 1.6. Objectivos

### 1.6.1. Enquadramento Geral

No Norte de Portugal, principalmente no Vale do Ave, o sector têxtil tem ainda uma forte presença, apesar da sua produção não atravessar os melhores dias. Esta presença reflecte-se no impacto que os seus efluentes induzem nos cursos de água da região, nomeadamente nos rios Ave e Leça, que perderam já grande parte da sua vida aquática. Têm-se desenvolvido nos últimos anos, todavia, alguns projectos com o objectivo de recuperar estes ambientes (e.g. Projecto de despoluição do Vale do Ave).

O estudo aqui efectuado procurou ir ao encontro desta tendência actual de maior preocupação ecológica na região. Pretendeu-se inferir dos efeitos provocados pelas descargas de efluentes industriais têxteis, em espécies piscícolas.

Assim sendo, realizaram-se diferentes testes de toxicidade e bioensaios com a espécie piscícola *Danio rerio*, utilizando amostras de efluente têxtil tratado, obtidas numa estação de tratamento privada do Vale do Ave antes da descarga para o meio receptor natural (neste caso, o rio Leça).

### 1.6.2. Objectivos específicos

Neste trabalho, procurou-se avaliar a toxicidade aguda e/ou crónica de um efluente têxtil em embriões e conseqüente desenvolvimento larvar e em indivíduos adultos de *D. rerio*.

O principal objectivo deste estudo consistiu em determinar a concentração de efluente que produzia efeito letal e sub-letal (eclosão, deformações, crescimento, batimento cardíaco, locomoção e ventilação) em *D. rerio*, tendo em vista a avaliação da sensibilidade do organismo teste em duas fases do seu ciclo de vida (embriões e adultos).

Pretendia-se ainda obter valores de toxicidade, que pudessem servir de referência para a determinação do impacto do efluente têxtil tratado, quando descarregado no meio hídrico receptor.

Visando a consecução destes objectivos, realizaram-se testes de toxicidade agudos e crónicos e fez-se a biomonitorização online do comportamento de *D. rerio*, através de um biomonitor (MFB®).

## 2. Material e métodos

### 2.1. Organismo teste

Os organismos adultos de *D. rerio*, foram obtidos a partir de uma fonte comercial. À chegada ao laboratório, os animais eram sujeitos a uma fase de transição, durante a qual eram adicionados ao saco de transporte 250ml da água dos aquários experimentais, de 15 em 15 minutos até estabilizar a temperatura. Após esta primeira aclimação, os peixes eram mantidos durante uma semana em aquários de vidro ou de plástico, com filtragem e arejamento, com água da rede pública do Município do Porto, previamente sujeita a um tratamento desclorificante e anti-stress com Sera Aquatan. Era igualmente feita uma prevenção anti-bacteriana e anti-fúngica com Terramicina (cloridrato de oxitetraciclina). O volume de água utilizado em cada aquário era equivalente a um grama de peixe por litro. A temperatura da água era de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e o fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas de obscuridade. Os peixes eram alimentados três vezes por dia com alimento comercial (Sera, Vipar). A limpeza dos aquários era efectuada diariamente, retirando-se os mortos de imediato, e após a limpeza era renovado um quarto da água do aquário.

Ovos fertilizados da espécie piscícola *D. rerio* foram obtidos a partir de reprodução natural de indivíduos adultos sob condições laboratoriais controladas. Pares de macho/fêmea eram individualizados em aquários num sistema de água corrente purificada através de filtro biológico, à temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas de obscuridade, sendo alimentados três vezes por dia. As posturas ocorriam no início do ciclo de luz, os ovos eram recolhidos até cerca de quatro horas após a postura. Seguidamente eram utilizados nos testes de toxicidade (ainda na fase de blástula).

### 2.2. Efluente e água de diluição

A água utilizada no tratamento controlo, manutenção dos organismos teste e diluição do efluente, era água da rede pública do Município do Porto com um

tratamento desclorificante e anti-stress efectuado no laboratório, através da adição de uma solução acondicionadora (Sera Aquatan).

As amostras de efluente eram recolhidas sempre no período da manhã (por volta das 10 horas e 30 min), numa estação de tratamento têxtil privada, que efectua as suas descargas no rio Leça e se localiza a cerca de 30 Km da cidade do Porto. O efluente utilizado provinha de um reservatório que armazenava o efluente, imediatamente antes da sua descarga para o meio receptor. O efluente era transportado em bidões de plástico, sendo que a viagem até ao laboratório demorava cerca de 30 minutos. Uma vez no laboratório, fazia-se a caracterização físico-química do efluente recolhido através da determinação dos seguintes parâmetros: Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO<sub>5</sub>), Carência Química de Oxigénio (CQO), Sólidos Suspensos Totais (SST), pH, Temperatura, Oxigénio Dissolvido (O.D.), Percentagem de Saturação de Oxigénio, Condutividade, Azoto Amoniacal, Nitritos, Nitratos e Fosfatos.

### 2.3. Parâmetros físico-químicos

Neste estudo, não se procedeu à identificação de substâncias específicas tóxicas presentes em efluentes têxteis, tais como sais inorgânicos, bases, ácidos, sulfatos ou corantes sintéticos. Em vez disso, analisou-se a sua toxicidade como uma mistura de substâncias. Procurou-se, contudo, efectuar uma caracterização do efluente relativamente aos parâmetros físico-químicos convencionais.

Além da caracterização geral do efluente recolhido, analisaram-se também os parâmetros físico-químicos em todos os tratamentos, no início e no fim de cada teste e a cada renovação. A tabela 1 indica os métodos a que se recorreu para analisar esses parâmetros.

Além da caracterização físico-química do efluente realizada no nosso laboratório, foram-nos facultados ainda alguns valores das análises físico-químicas que periodicamente a indústria têxtil realiza ao seu efluente. Os efluentes analisados no nosso laboratório compreenderam uma amostragem entre Agosto de 2003 e Dezembro de 2003, enquanto que os dados fornecidos pela indústria têxtil abrangeram o período de Junho de 2003 a Março de 2004. A tabela 2 indica os métodos referenciados pela indústria têxtil para analisar os respectivos parâmetros.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos analisados em diversas fases deste trabalho, com as respectivas unidades e métodos analíticos. (<sup>1</sup>Carência Bioquímica de Oxigênio; <sup>2</sup>Carência Química de Oxigênio; <sup>3</sup>Sólidos Suspensos Totais)

Parâmetros	Unidade	Método Analítico
CBO <sub>5</sub> <sup>1</sup>	mg oxigênio/l	De acordo com o descrito em APHA (1992).
CQO <sup>2</sup>	mg oxigênio/l	De acordo com o descrito em APHA (1992).
SST <sup>3</sup>	mg/l	De acordo com o descrito em APHA (1992).
Oxigênio Dissolvido	mg oxigênio/l	Através de medidor WTW Multiline.
Saturação de Oxigênio	%	Através de medidor WTW Multiline.
Temperatura	°C	Através de medidor WTW Multiline.
Condutividade	μS/cm	Através de medidor WTW Multiline.
pH	Escala Sorensen	Através de medidor WTW Multiline.
Azoto Amoniacal	mg N-NH <sub>4</sub> /l	Método colorimétrico (0,2-8 mg/l; Microquant <sup>®</sup> ).
Nitritos	mg N-NO <sub>2</sub> /l	Método colorimétrico (0,1-2,0 mg/l Aquaquant <sup>®</sup> ).
Nitratos	mg N-NO <sub>3</sub> /l	Método colorimétrico (0-10 mg/l; Hach).
Fosfatos	mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /l	Método colorimétrico (1-10 mg/l; Aquamerck <sup>®</sup> ).

**Tabela 2.** Parâmetros físico-químicos analisados pela indústria têxtil, com as respectivas unidades e métodos analíticos. (<sup>1</sup>Carência Bioquímica de Oxigênio; <sup>2</sup>Carência Química de Oxigênio; <sup>3</sup>Sólidos Suspensos Totais)

Parâmetros	Unidade	Método Analítico
CBO <sub>5</sub> <sup>1</sup>	mg oxigênio/l	Determinação do O <sub>2</sub> dissolvido antes e depois de 5 dias de incubação a 20°C no escuro.
CQO <sup>2</sup>	mg oxigênio/l	Método do dicromato de potássio.
SST <sup>3</sup>	mg/l	Filtração através de membrana filtrante (porosidade 0,45μm), secagem a 105°C e pesagem.
pH	Escala Sorensen	Electrometria (a 25°C).
Cor	mg/l escala Pt/Co	Método fotométrico com Padrões de escala Pt/Co.
Detergentes	mg/l sulfato de laurilo e sódio	Espectrometria de absorção molecular.

## 2.4. Plano experimental

Neste trabalho, apesar de se ter procedido a algumas adaptações pontuais, de uma forma geral eram seguidas as recomendações propostas pela U. S. EPA (1996a; 2002) para os diferentes testes de toxicidade.

Para as diluições de efluente utilizadas nos testes, optou-se pela seguinte série: 100%, 71,4%, 51%, 36,4%, 26% e 0% de efluente (v/v). Esta opção deveu-se à grande variabilidade na composição dos efluentes têxteis. E, de modo a obter uma maior gama de informação nos resultados, era necessário abranger várias possibilidades de diluição do efluente.

No sentido de uma confirmação dos resultados, os testes agudos e crónicos com adultos de *D. rerio* realizaram-se em duplicado. Nos testes crónicos com embriões de *D. rerio* realizaram-se um teste preliminar (teste I) e dois testes definitivos (teste II e III).

### 2.4.1. Teste agudo com adultos de *Danio rerio*

Os indivíduos de *D. rerio* eram expostos a cinco tratamentos de efluente têxtil (100%, 71,4%, 51%, 36,4% e 26% de efluente) e a um tratamento controlo (0%) por um período de 96 horas num sistema semi-estático. Cada tratamento foi efectuado em triplicado, sendo que em cada réplica foram colocados sete organismos teste.

Os testes realizaram-se em aquários de plástico contendo 5L de cada solução teste, a uma temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas obscuridade. Um terço de cada solução teste era renovado diariamente. O efluente para a renovação era armazenado a  $4^\circ\text{C}$ , sendo restituído à temperatura do teste aquando da sua utilização. Durante a realização do teste e vinte e quatro horas antes do seu início, não era fornecido alimento aos organismos teste.

Efectuaram-se observações diárias em todos os tratamentos e registou-se o número de mortos, que eram retirados dos respectivos aquários.

No início e fim do teste e a cada renovação, eram determinados em cada aquário os seguintes parâmetros físico-químicos: Oxigénio Dissolvido, % Saturação de Oxigénio, Condutividade, Temperatura e pH.

O primeiro teste (teste I) realizou-se no início do mês de Agosto de 2003, e a repetição (teste II) ocorreu um mês depois.

#### 2.4.2. Teste crônico com adultos de *Danio rerio*

Relativamente aos testes de toxicidade, os indivíduos de *D. rerio* eram expostos a quatro tratamentos de efluente têxtil (referidos a seguir) e a um tratamento controlo (0% de efluente) por um período de vinte e dois dias num sistema semi-estático.

No teste I a sequência de tratamentos era a seguinte: 100%, 71,4%, 51% e 36,4%. No teste II, ocorreu a morte de todos os animais no tratamento 100%, num período inferior a uma hora de exposição. Assim sendo, era necessário inserir um novo tratamento na parte inferior da sequência: 71,4%, 51%, 36,4% e 26%.

Para cada tratamento utilizaram-se duas réplicas, cada uma contendo dez organismos teste. Os testes realizaram-se em aquários de plástico contendo 10L de solução teste, a uma temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e com fotoperíodo natural. A solução teste era renovada por completo semanalmente, com efluente recolhido no dia da renovação. Os peixes eram alimentados com alimento comercial (Sera, Vipar) três vezes por dia, com exceção dos domingos que eram alimentados apenas duas vezes.

Efectuaram-se observações diárias em todos os tratamentos e registaram-se os organismos mortos, que eram retirados dos respectivos aquários.

No início e no fim do teste e a cada renovação, determinaram-se em cada solução teste os seguintes parâmetros físico-químicos: Oxigénio Dissolvido, Percentagem de Saturação de Oxigénio, Condutividade, Temperatura e pH. Além disso, a Percentagem de Saturação de Oxigénio era ainda registada de dois em dois dias, sendo os aquários arejados quando este parâmetro atingia valores inferiores a 70%.

Para se proceder à monitorização online do comportamento dos animais com biomonitor (MFB<sup>®</sup>), eram retirados aleatoriamente sete organismos de cada tratamento, no início de cada teste crônico e após cada renovação semanal da solução teste.

Os organismos eram colocados individualmente em câmaras teste, que por sua vez eram imersas num aquário de plástico com a solução teste correspondente. Após vinte minutos de aclimação, os padrões comportamentais de cada organismo (locomção e ventilação), eram registados durante duas horas (12 leituras de 10 minutos). Deste modo, em cada semana obtiveram-se duas horas de registo com sete réplicas para cada tratamento. No teste II registaram-se duas horas adicionais, logo a seguir ao primeiro registo. Nesta situação, os organismos depois de devolvidos aos

respectivos tratamentos, eram de novo retirados aleatoriamente e colocados individualmente nas câmaras teste para se proceder a novo registo de duas horas (o teste IIA corresponde à primeira leitura e o teste IIB à segunda).

O primeiro teste (teste I) realizou-se durante o mês de Setembro de 2003. A repetição do teste (teste II) realizou-se durante o mês de Novembro de 2003.

### 2.4.3. Teste crónico com embriões e larvas de *D. rerio*

Os embriões de *D. rerio* eram expostos a cinco tratamentos de efluente têxtil (100%, 71,4%, 51%, 36,4% e 26% de efluente) e a um tratamento controlo (0%) durante sete dias (168 horas) num sistema semi-estático. Para cada tratamento utilizaram-se quatro réplicas, contendo cada réplica dez organismos. Os testes realizaram-se em caixas plásticas que continham 250 ml de solução teste, caixas essas colocadas numa câmara refrigeradora a uma temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas obscuridade. A solução teste era renovada por completo diariamente.

O efluente era armazenado a  $-18^\circ\text{C}$ , sendo restituído à temperatura do teste aquando da sua utilização para a renovação. As larvas eram alimentadas após cada renovação com alimento líquido (Liquid Small Fry<sup>®</sup>.Baby Fish Food. Egglayer Formula. Wardley<sup>®</sup>).

Efectuaram-se observações diárias em todos os tratamentos e registou-se o número de mortos (que eram retirados dos respectivos aquários) e o número de eclosões. O número de deformações ocorridas registou-se a partir da eclosão das larvas. Por um lado, devido à dificuldade em observar as anormalidades em embriões e, por outro lado, devido ao facto do córion do ovo, na maioria dos casos, fornecer uma protecção ao embrião que só é abandonada aquando da eclosão, expondo então a larva ao impacto total do efluente.

O número de batimentos cardíacos registou-se às 48 horas e às 96 horas de exposição. De cada réplica, seleccionou-se aleatoriamente uma larva ou embrião, que se observou ao microscópio óptico composto (NIKON SE) para contagem do número de batimentos cardíacos por minuto. Por vezes, era impossível efectuar a contagem em tratamentos com concentrações mais elevadas, devido, quer à posição do embrião no

interior do ovo, quer aos depósitos residuais do efluente que cercavam o ovo, impedindo a visualização do coração e sistema circulatório do animal.

No final do teste, pesaram-se as larvas sobreviventes de cada tratamento e tiraram-se fotografias digitais com uma lupa (LEICA MZ75), com o intuito de registrar as deformações larvares existentes e determinar o comprimento das larvas. Não se conseguiram obter valores do peso e comprimento das larvas de *D. rerio* para os tratamentos com 71,4% e 100% de efluente, devido à inexistência de larvas sobreviventes no final dos testes.

No início e fim do teste e a cada renovação, determinaram-se, em cada solução, os seguintes parâmetros físico-químicos: Oxigénio Dissolvido, Percentagem de Saturação de Oxigénio, Condutividade, Temperatura e pH.

Durante o mês de Agosto de 2003, realizou-se um primeiro teste preliminar (teste I) onde se analisaram a sobrevivência, a eclosão e as deformações ocorridas nas larvas. Posteriormente, foram realizados dois testes definitivos (teste II, em Novembro de 2003, e teste III, em Dezembro de 2003), nos quais se analisaram o crescimento e os batimentos cardíacos das larvas de *D. rerio*, para além dos critérios indicativos de toxicidade analisados no teste preliminar (teste I).

## 2.5. Análise estatística

Relativamente aos parâmetros físico-químicos do efluente, determinou-se em cada tratamento a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação, o máximo e o mínimo. O coeficiente de variação apresentou-se como percentagem, tendo sido calculado multiplicando por 100 o quociente entre o desvio padrão e a respectiva média de cada parâmetro.

Os critérios indicativos de toxicidade em *D. rerio* variaram consoante os testes realizados. Nos testes com adultos o critério utilizado era a sobrevivência de *D. rerio*, sendo também analisado o comportamento (locomoção e ventilação) dos organismos adultos nos testes crónicos. Os critérios nos testes crónicos com embriões e larvas eram a sobrevivência, a eclosão, o número de deformações ocorridas, o crescimento (peso fresco e comprimento) e o número de batimentos cardíacos.

A existência de diferenças significativas entre os vários tratamentos de efluente relativamente ao controlo, para os diferentes critérios estudados, era avaliada através de uma análise de variância (ANOVA) unifactorial. Os pressupostos da ANOVA eram testados utilizando o Teste Shapiro-Wilk para a normalidade e o Teste de Bartlett, Levene e Brown-Forsythe para a homogeneidade de variâncias. Os dados, sempre que necessário, eram transformados utilizando o arcoseno ( $\arcsen\sqrt{x}$ ) ou a raiz quadrada, de forma a garantir a homogeneidade das variâncias.

Quando as diferenças se revelavam significativas ( $p < 0,05$ ), utilizava-se o Teste de Tukey (Zar, 1996) para identificar os tratamentos de efluente que diferiam significativamente do tratamento controlo. Quando não se verificavam os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias, era utilizado um teste não paramétrico, neste caso o teste U de Mann-Whitney (Zar, 1996).

Efectuaram-se análises separadas para estimar a maior concentração de efeito não observável (CENO) e a menor concentração de efeito observável (CEO), assim como para estimar os valores da concentração letal (CL) e concentração inibitória (CI).

As concentrações onde não existiam sobreviventes em nenhuma das réplicas, eram excluídas da análise estatística de CENO e CEO, mas incluídas no cálculo de  $CL_{50}$  e  $CL_1$  (respectivamente, concentração que causa um decréscimo de 50% e 1% na sobrevivência do organismo teste em relação ao controlo), bem como de  $CI_{50}$  e  $CI_1$  (respectivamente, concentração que causa um efeito inibitório de 50% e 1% num determinado critério, por exemplo na eclosão, em relação ao controlo).

A determinação de CENO e de CEO era baseada nas diferenças significativas nos tratamentos de efluente ( $p < 0,05$ ) em diversos critérios, quando comparadas com o tratamento controlo. Utilizou-se também o teste Dunnett para uma determinação mais segura da CENO e CEO, verificando-se previamente os pressupostos de normalidade e homogeneidade. Se algum desses pressupostos falhava, recorria-se então ao teste não paramétrico Steel Many-one Rank (EPA, 2002).

Os valores de  $CL_{50}$  e  $CL_1$ , assim como os valores de  $CI_{50}$  e  $CI_1$  (para a eclosão e n.º de deformações ocorridas) e os seus limites de confiança (a 95%), eram calculados utilizando a análise "Probit" (EPA, 2002). Se não era possível realizar a análise

“Probit”, então utilizava-se o método Trimmed Spearman-Kärber para a determinação de  $CL_{50}$  ou  $CI_{50}$ .

Os testes estatísticos eram efectuados utilizando o programa informático STATISTICA 6.1 (StatSoft, 2003) ou seguindo os protocolos da EPA (2002).

Apresentam-se em anexo a síntese das diferentes análises estatísticas realizadas para determinação de CEO e CENO.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Caracterização do efluente têxtil utilizado nos diferentes testes

Foram efectuadas análises físico-químicas ao efluente, quer durante o nosso trabalho, quer pela indústria têxtil em análise. A tabela 3 apresenta os valores médios dessas análises.

**Tabela 3.** Valores médios dos parâmetros físico-químicos do efluente têxtil, analisados durante o período de amostragem. (n= número de observações; c.v.= coeficiente de variação, em percentagem)

Parâmetro	Presente Trabalho					Indústria Têxtil				
	n	média ± d. padrão	c.v.	min.	máx.	n	média ± d. padrão	c.v.	min.	máx.
O. D. (mg oxigénio/l)	10	6,3 ±0,82	13,1	4,6	7,1	0				
Saturação O <sub>2</sub> (%)	10	72,9 ±6,2	8,5	66,0	84,4	0				
Condutividade (µS/cm)	10	1103,9 ±447,8	40,6	629,0	1737,0	0				
Temperatura (°C)	10	21,0 ±4,5	21,6	14,0	26,2	0				
pH (escala Sorensen)	10	7,2 ±0,3	4,7	6,5	7,5	8	7,2 ±0,5	6,4	6,6	7,7
CBO <sub>5</sub> (mg oxigénio/l)	8	62,2 ±33,0	53,2	7,4	112,0	8	16,4 ±2,7	16,3	15,0	22,0
COD (mg oxigénio/l)	8	78,9 ±25,7	32,6	53,3	129,1	8	58,5 ±25,1	42,9	20,0	85,0
SST (mg/l)	7	1,0 ±2,6	261,8	0,0	7,0	8	7,5 ±3,6	47,3	3,0	12,0
Cor (mg/l escala Pt/Co)	0					8	não visível na diluição 1:40			
Detergentes (mg/l sulfato de laurilo e sódio)	0					7	0,3 ±0,2	75,6	0,1	0,6
Azoto Amoniacal (mg N-NH <sub>4</sub> /l)	10	4,9 ±1,8		3,0	8,0	0				
Nitritos (mg N-NO <sub>2</sub> /l)	10	7,6 ±12,6	165,9	0,0	40,0	0				
Nitratos (mg N-NO <sub>3</sub> /l)	10	3,9 ±4,4	115,3	0,0	12,0	0				
Fosfatos (mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /l)	10	<1,0	37,0	<1,0	<1,0	0				

Examinando os parâmetros físico-químicos analisados no presente trabalho, constatamos um valor médio bastante elevado de condutividade (1103,9 µS/cm), para além da presença de nitratos, nitritos e azoto amoniacal. Os valores de CBO<sub>5</sub> e de CQO mostraram-se bastante variáveis, com mínimos de 7,4 e 53,3 mg oxigénio/l e máximos de 112,0 e 129,1 mg oxigénio/l, respectivamente.

As análises fornecidas pela indústria têxtil revelaram uma pequena quantidade de detergentes. Estes produtos têm, provavelmente, proveniência na lavandaria da indústria têxtil, contribuindo ainda mais para a complexidade do efluente.

Comparando os valores obtidos neste trabalho com os valores fornecidos pela indústria têxtil, verifica-se a coincidência dos valores médios de pH em ambas as análises (7,2 unidades na escala de Sorensen).

Os valores médios de CBO<sub>5</sub> e CQO obtidos neste trabalho eram superiores aos fornecidos pela indústria têxtil (e.g. valores de CQO de 78,9 mg oxigénio/l no presente trabalho contra 58,5 mg oxigénio/l fornecido pela indústria têxtil).

O valor dos sólidos suspensos totais apresenta também alguma discrepância entre as duas análises (1,0 mg/l e 7,5 mg/l).

Os valores médios de ambas as análises encontram-se de acordo com os limites (pH: 5,5-9,0; COB<sub>5</sub>: 100 mg oxigénio/l e CQO: 250 mg oxigénio/l) estabelecidos pela portaria n.º 423/97 de 25 de Junho, que estabelece as normas de descarga das águas residuais para o sector dos têxteis. A cor não visível na diluição 1:40 também está de acordo com os requisitos legais.

Mas, nas análises efectuadas no presente trabalho, detectaram-se valores máximos de CBO<sub>5</sub> que ultrapassavam os valores recomendados pela legislação (112,0 mg oxigénio/l).

### 3.2. Testes agudos com indivíduos adultos de *Danio rerio*

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos de cada tratamento, bem como os coeficientes de variação, mínimos, máximos e respectivos desvios padrão, analisados ao longo dos testes agudos I e II com *D. rerio*, constam das tabelas 4 e 5 (em anexo), respectivamente.

#### 3.2.1. Oxigénio, pH, temperatura e condutividade

A temperatura no teste I teve uma média compreendida entre os 22°C e os 23°C, e no teste II teve uma média compreendida entre os 21°C e os 22°C.

Verificou-se um incremento da condutividade de acordo com o aumento da concentração de efluente, tendo os valores médios aumentado de 285,3 µS/cm para 1706,8 µS/cm no teste II. Isto poderá ser explicado pela elevada condutividade

apresentada pelo efluente têxtil, com um valor médio de 1060,7  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Esta situação verificou-se sempre ao longo de todos os testes realizados.

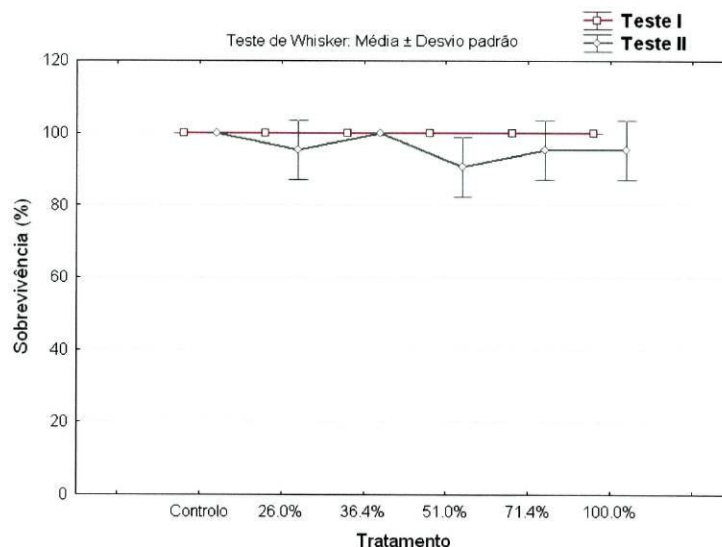
A mesma relação verificou-se na presença de azoto amoniacal no efluente, tendo os valores médios aumentado, no teste I, de 0,4 mg N-NH<sub>4</sub>/l no tratamento controlo para 4,4 mg N-NH<sub>4</sub>/l no tratamento com 100% de efluente (v/v).

### 3.2.2. Sobrevivência de adultos de *D. rerio*

Os resultados da sobrevivência de adultos de *D. rerio* relativos aos testes agudos I e II, estão representados na figura 2.

Ao longo do teste I, a sobrevivência dos organismos em todos os tratamentos permaneceu inalterável, mantendo-se sempre nos 100%.

No teste II, verificaram-se já algumas variações, nomeadamente nos tratamentos com concentrações mais elevadas, que se apresentam com valores de sobrevivência inferiores ao tratamento controlo e mesmo ao tratamento com 36,4% de efluente. Contudo, estas variações não foram identificadas estatisticamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Valores percentuais de sobrevivência obtidos nos testes agudos com adultos de *D. rerio*.

Em ambos os testes, durante as 96 horas de exposição ao efluente têxtil, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com efluente e o

tratamento controlo ( $p < 0,05$ ), no que diz respeito à sobrevivência de indivíduos adultos de *D. rerio*.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Rosa *et al.* (2001), uma vez que estes autores também não detectaram efeitos letais de toxicidade na sobrevivência da espécie piscícola *Poecilia reticulata*, quando exposta durante 48 horas a um efluente têxtil tratado. Contudo, nesse mesmo estudo, em bioensaios com a bactéria *Vibrio fischeri* e a alga *Scenedesmus subspicatus*, foram atribuídas 3 e 4 unidades de toxicidade aos respectivos efluentes têxteis tratados.

Salienta-se a dificuldade em comparar resultados de bioensaios com efluentes têxteis, devido à variabilidade e complexidade da composição dos efluentes.

Outros autores têm observado igualmente uma ausência de toxicidade aguda em efluentes têxteis utilizados em diversos bioensaios. Por exemplo, Sponza (2002) investigou a toxicidade de efluentes têxteis usando diferentes organismos, como as bactérias *Floc* e *Coliform*, a alga *Chlorella* sp., o peixe *Lepistes* sp. e o protozoário *Vorticella* sp., considerando que 10 efluentes, dos 23 analisados ao longo de 240 dias, não possuíam toxicidade aguda.

Walsh *et al.* (1980), determinou a toxicidade de efluentes têxteis após tratamento secundário, em algas, crustáceos e peixes estuarinos e de água doce, constatando também que nenhum dos animais foi afectado letalmente por todos os efluentes. No entanto, esses autores observaram que todos os efluentes provocavam efeitos no crescimento das algas *S. capricornutum* e *S. costatum*.

### 3.3. Testes crónicos com indivíduos adultos de *Danio rerio*

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos de cada tratamento, bem como os coeficientes de variação, mínimos, máximos e respectivos desvios padrão, analisados ao longo dos testes crónicos I e II com *D. rerio*, são apresentados nas tabelas 6 e 7 (em anexo), respectivamente.

### 3.3.1. Oxigénio, pH, temperatura e condutividade

Os valores de pH registados nos tratamentos em ambos os testes, não variaram mais do que 1,4 %, tendo oscilado entre um valor mínimo de 7,4 e um máximo de 7,9 no teste I, e um valor mínimo de 6,8 e um máximo de 7,6 no teste II.

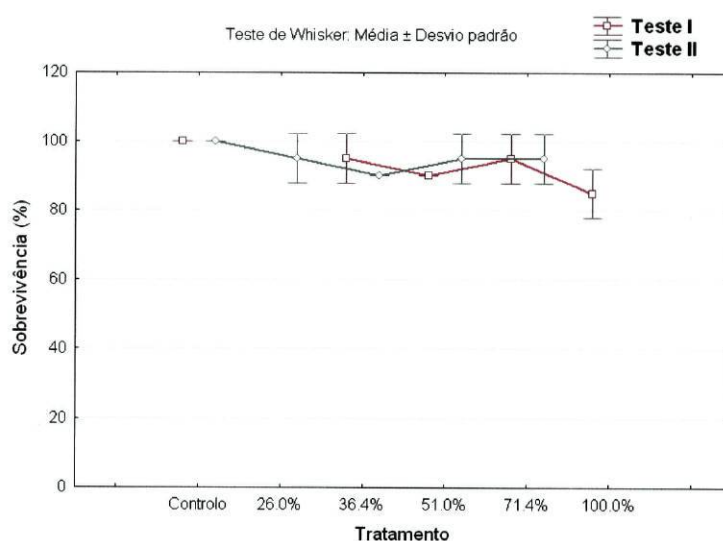
Em todos os tratamentos, a temperatura teve uma média compreendida entre 23,5 °C e 25,5 °C no teste I, e entre 18°C e 20°C no teste II. Estas diferenças entre os dois testes podem explicar-se devido à época do ano em que cada um se realizou, respectivamente em Setembro e em Novembro de 2003 para o teste I e II.

### 3.3.2. Sobrevivência de adultos de *D. rerio*

Os resultados de sobrevivência de adultos de *D. rerio* relativos aos testes crónicos I e II, estão representados na figura 3.

No teste I, observou-se até ao tratamento 51%, um decréscimo na sobrevivência de adultos de *D. rerio*, em função do aumento da concentração de efluente nos tratamentos, apesar de isso não ter sido comprovado estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

No teste II, notou-se uma pequena diminuição da sobrevivência de adultos de *D. rerio* entre o tratamento controlo e os tratamentos com efluente. Contudo, Ao longo dos tratamentos com efluente, não se observaram grandes variações.



**Figura 3.** Valores percentuais de sobreviventes de adultos de *D. rerio*, ao longo dos tratamentos nos dois testes crónicos efectuados.

Em ambos os testes, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e o controlo ( $p < 0,05$ ), na sobrevivência de indivíduos adultos de *D. rerio* durante os 22 dias de exposição ao efluente têxtil.

Salienta-se, contudo, o impacto verificado no início do teste II nos adultos de *D. rerio* do tratamento com efluente a 100%, onde todos os organismos morreram ao fim de uma hora de exposição. Da análise físico-química efectuada ao efluente não se detectou nenhum valor anormal em relação às análises realizadas nos outros testes.

### 3.3.3. Respostas comportamentais (locomoção e ventilação)

O facto de não se terem detectado efeitos significativos da exposição ao efluente têxtil, na sobrevivência de indivíduos adultos de *D. rerio*, levou-nos a averiguar da possibilidade de existirem efeitos sub-letais, particularmente ao nível do comportamento dos animais. Assim, fez-se uma análise da evolução semanal das respostas comportamentais de locomoção e ventilação dos indivíduos adultos de *D. rerio* expostos aos tratamentos utilizados no teste crónico, a partir de dados registados online por um biomonitor (MFB<sup>®</sup>) (figuras 4, 5 e 6). As respostas dos animais estão representadas na forma de tempo gasto em cada comportamento.

#### 3.3.3.1. Comportamentos registados na primeira semana de exposição

A figura 4 representa os comportamentos (locomoção e ventilação) registados em adultos de *D. rerio* na primeira semana de exposição em cada teste crónico.

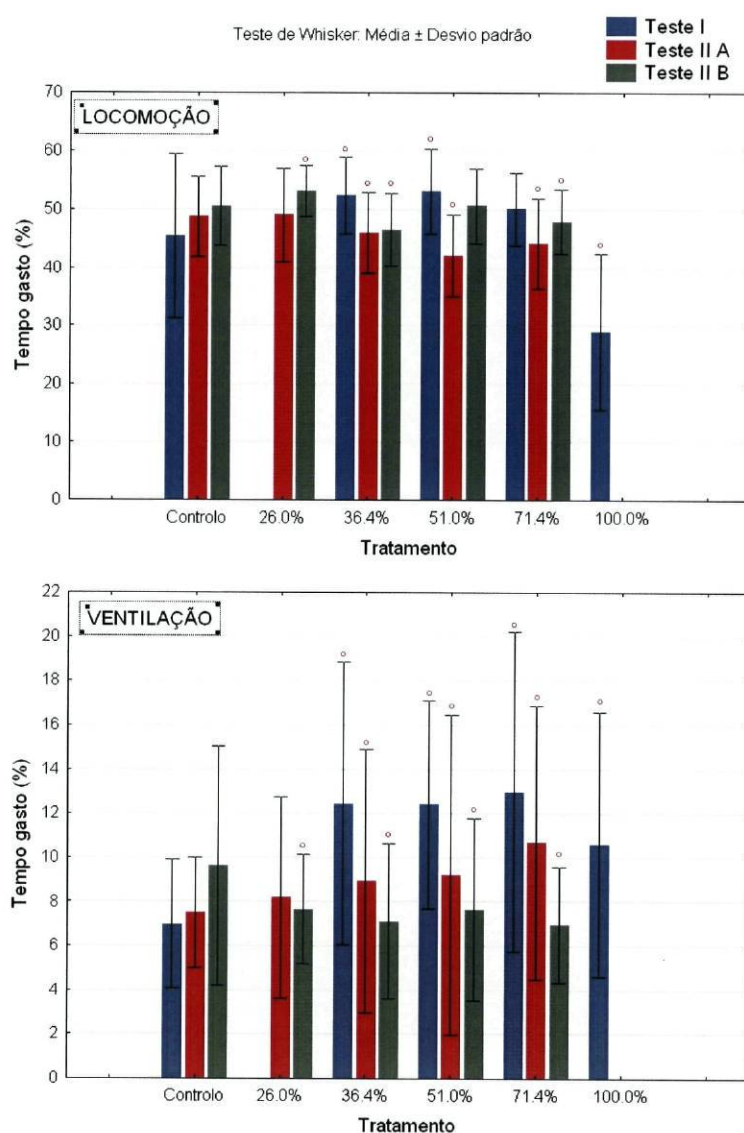
Relativamente à locomoção dos adultos de *D. rerio* observou-se que, em cada teste, existia apenas um tratamento que não diferia significativamente do controlo, respectivamente, tratamento 71,4%, 26% e 51% de efluente para o teste I, IIA e IIB.

Nos tratamentos controlo, os adultos de *D. rerio* do teste I revelaram os valores mais baixos dos três testes, tanto na ventilação como na locomoção. Logo na primeira semana registaram-se, nos tratamentos com efluente, valores de locomoção e ventilação de adultos de *D. rerio* mais elevados no teste I (excepto no tratamento com 100% de efluente) do que nos testes IIA e IIB.

No teste I verificou-se um aumento da locomoção dos adultos de *D. rerio* em relação ao controlo nos tratamentos com 36,4%, 51% e 71,4% de efluente, no entanto,

apenas os dois primeiros foram significativos ( $p < 0,05$ ). Quanto à ventilação no teste I, verificou-se que todos os tratamentos tiveram valores significativamente superiores aos do controlo ( $p < 0,05$ ). Todavia observou-se um decréscimo dos valores de locomoção e ventilação nos organismos expostos ao tratamento com 100% de efluente, comparativamente aos restantes tratamentos.

Entre os testes IIA e IIB, os valores de locomoção neste último teste revelaram-se mais elevados que os do teste IIA. No entanto, para a ventilação dos peixes verificou-se a situação inversa.



**Figura 4.** Comportamentos (locomoção e ventilação) registados em adultos de *D. rerio* na primeira semana de exposição em cada teste crónico. Os círculos a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ).

No teste IIA, observou-se que a locomoção dos organismos expostos a tratamentos com concentrações de efluente superiores ou iguais a 36,4%, sofreu um decréscimo significativo em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ). Os organismos do tratamento com 26% de efluente no teste IIB apresentaram um aumento significativo na locomoção relativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ), mas verificou-se um decréscimo na locomoção dos adultos de *D. rerio* expostos a tratamentos com maior concentração de efluente.

Na primeira semana dos testes, a ventilação na maioria dos adultos de *D. rerio* expostos aos tratamentos com efluente diferia significativamente da ventilação do tratamento controlo ( $p < 0,05$ ). A única exceção correspondia aos organismos do tratamento com 26% de efluente do teste IIA.

Notou-se ainda no teste IIA a existência de um aumento da ventilação dos adultos de *D. rerio* em função do gradiente de concentração do efluente no tratamento. Mas no teste IIB, observou-se um decréscimo significativo da ventilação dos organismos em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).

Constatou-se, portanto, que existiu um impacto comportamental em adultos de *D. rerio*, logo na primeira semana de exposição ao efluente têxtil, caracterizado por alterações na ventilação e locomoção dos organismos.

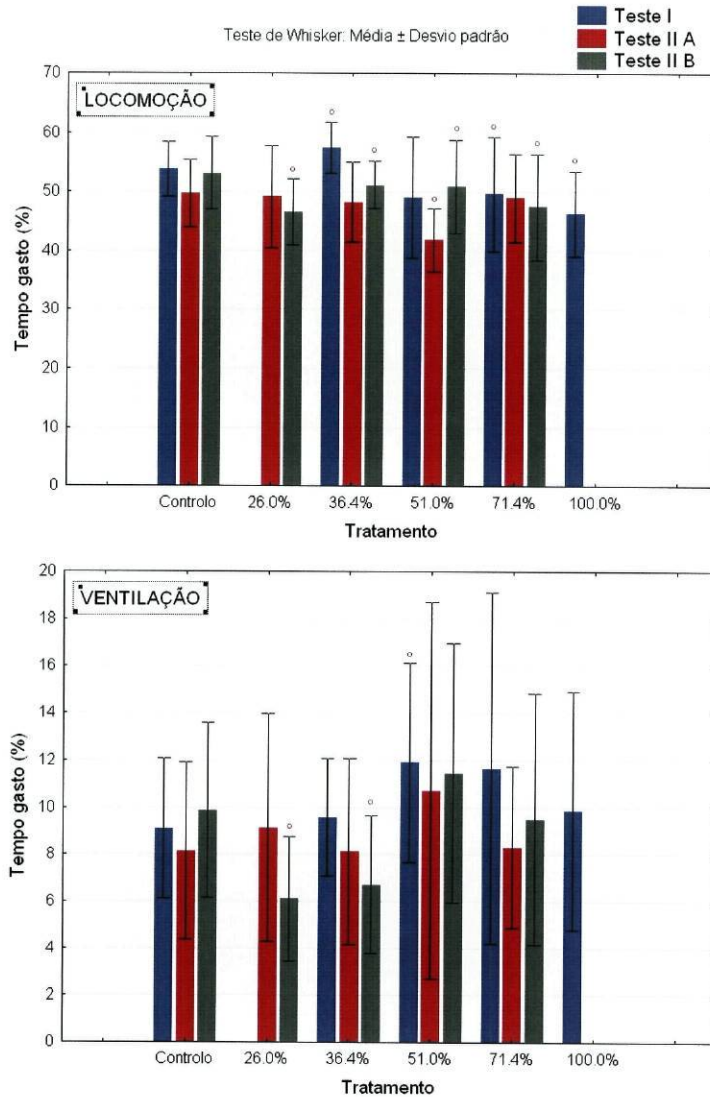
### 3.3.3.2. Comportamentos registados na segunda semana de exposição

A figura 5 representa os comportamentos (locomoção e ventilação) registados em adultos de *D. rerio* na segunda semana de exposição em cada teste crónico.

No teste I continuaram a verificar-se baixos valores de locomoção de adultos de *D. rerio* no tratamento com 100% de efluente, em relação ao controlo. Além deste tratamento, também o tratamento com 74,1% de efluente apresentou um decréscimo significativo na locomoção dos organismos em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ). No tratamento com 36,4% de efluente observou-se um aumento significativo da locomoção dos organismos relativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ), mas nos tratamentos com 26% e 51% de efluente os organismos comportaram-se de forma semelhante ao controlo.

A locomoção dos adultos de *D. rerio* no teste IIA apenas se revelou significativamente diferente do tratamento controlo ( $p < 0,05$ ) no tratamento com 51% de efluente, apresentando valores inferiores. No teste IIB, todos os tratamentos com efluente apresentaram valores de locomoção dos organismos significativamente

inferiores aos do tratamento controlo ( $p < 0,05$ ). No tratamento com efluente a 51% do teste IIB observaram-se valores de locomoção superiores aos outros dois testes (I e IIA).



**Figura 5.** Comportamentos (locomoção e ventilação) registados em adultos de *D. rerio* na segunda semana de exposição em cada teste crónico. Os círculos a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ).

Os valores de ventilação de adultos de *D. rerio* nos tratamentos com efluente, na segunda semana de teste mantiveram-se mais elevados no teste I do que nos testes IIA e IIB.

A ventilação no teste I apresentou valores superiores em todos os tratamentos comparativamente ao controlo, mas essas diferenças apenas se revelaram significativas ( $p < 0,05$ ) no tratamento com 51% de efluente.

No teste IIA observou-se um aumento da ventilação nos tratamentos com 26% e 51% para com o tratamento controlo, mas que não foi detectado estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Verificou-se que apenas existiram diferenças significativas relativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos com 26% e 36,4% de efluente do teste IIB, caracterizadas por valores bastante inferiores de ventilação dos organismos.

Conseguiu-se perceber a partir dos resultados obtidos na locomoção dos animais do teste IIA e na ventilação na maioria dos tratamentos, que poderá ter havido alguma habituação aos efeitos do efluente por parte dos adultos de *D. rerio*. Constatou-se que, apesar de se verificarem impactos comportamentais, estes eram de menor amplitude do que os verificados na primeira semana.

### 3.3.3.3. Comportamentos registados na terceira semana de exposição

Analisando o gráfico da figura 6 relativo aos valores de locomoção dos adultos de *D. rerio* registados na terceira semana de teste, verificamos que os animais expostos ao efluente do teste I voltaram a demonstrar valores superiores aos dos testes IIA e IIB.

Verificou-se no teste I um aumento significativo na locomoção e ventilação dos animais expostos ao tratamento com 100% de efluente, comparativamente aos valores do tratamento controlo ( $p < 0,05$ ). Isto revela uma alteração no comportamento dos adultos de *D. rerio* deste tratamento relativamente aos registados nas duas semanas anteriores.

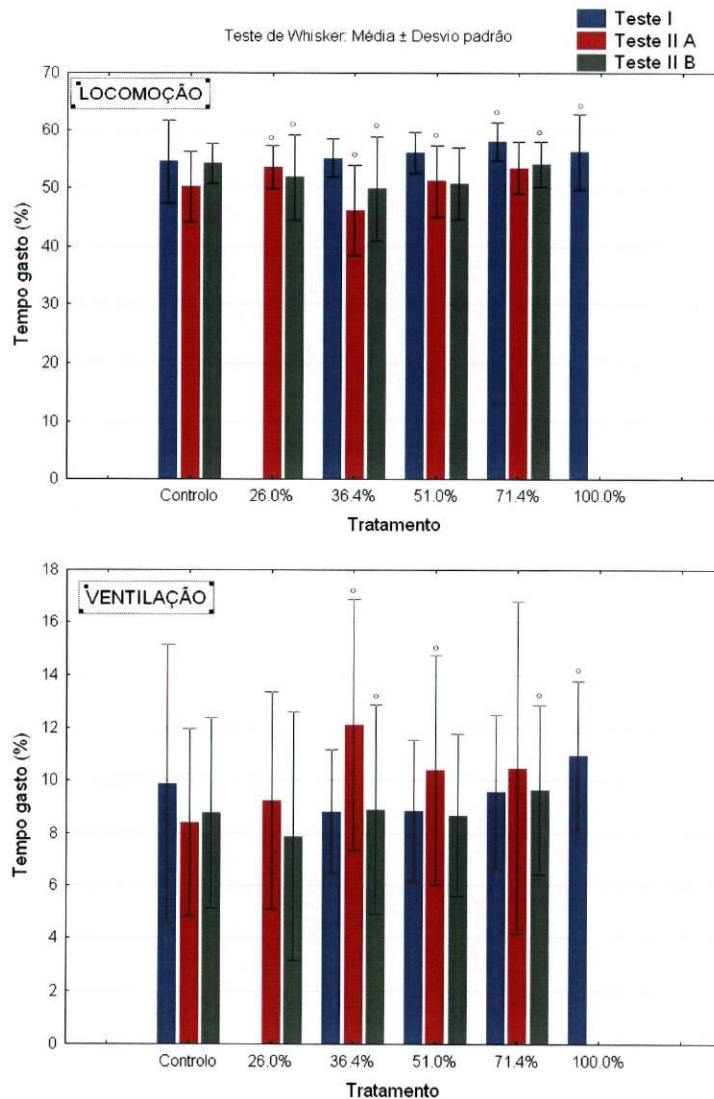
Registaram-se também no teste I, valores superiores de locomoção dos organismos expostos aos tratamentos com efluente, em relação ao tratamento controlo, mas apenas comprovados estatisticamente ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos 71,4% e 100%.

No tratamento controlo do teste I, os valores de locomoção dos adultos de *D. rerio* registados, indicaram uma subida nesta última semana de teste.

No teste IIA registaram-se valores de locomoção de adultos de *D. rerio* significativamente superiores aos do tratamento controlo nos tratamentos com 26% e 51% de efluente. O tratamento com 71,4% de efluente, apesar de não apresentar diferença significativa para o controlo ( $p < 0,05$ ), revela um ligeiro acréscimo na locomoção dos organismos. Verificou-se ainda que o tratamento com 36,4% de efluente

diferia significativamente do tratamento controlo ( $p < 0,05$ ), apresentando valores inferiores na locomoção de adultos de *D. rerio*.

No teste IIB, todos os tratamentos com efluente apresentaram um decréscimo na locomoção de adultos de *D. rerio* em relação ao tratamento controlo, sendo esta apenas não identificada estatisticamente no tratamento com 51% de efluente.



**Figura 6.** Comportamentos (locomoção e ventilação) registados em adultos de *D. rerio* na terceira semana de exposição em cada teste crónico. Os círculos a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ).

Quanto à ventilação dos adultos de *D. rerio* na terceira semana (figura 6), à excepção do tratamento com 100% de efluente já evidenciado, todos os tratamentos no

teste I revelaram-se com valores inferiores ao tratamento controlo, mas esta diferença não foi detectada estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

Os organismos expostos aos tratamentos com efluente do teste IIA apresentaram valores de ventilação superiores aos do tratamento controlo, contudo, estes apenas foram significativos ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos com 36,4% e 51% de efluente.

No teste IIB, verificou-se que a ventilação de adultos de *D. rerio* era superior ao tratamento controlo de forma significativa ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos com 36,4% e 71,4%. Nos tratamentos com 26% e 51% de efluente, observou-se um decréscimo na ventilação dos organismos em relação ao tratamento controlo, mas este não foi significativo ( $p < 0,05$ ).

Na terceira semana de exposição ao efluente têxtil, os indivíduos adultos de *D. rerio* demonstraram, de uma forma geral, maior impacto a nível da locomoção do que da ventilação.

Constatou-se uma reacção positiva dos adultos de *D. rerio* expostos ao tratamento de 100% de efluente do teste I, o que traduz alguma adaptação aos efeitos do efluente, ou alguma resposta a um possível “stress” induzido pela exposição ao efluente.

#### 3.3.3.4. Comportamentos registados nas três semanas de exposição

A figura 7 ilustra a locomoção e a ventilação dos adultos de *D. rerio* nas três semanas em que decorreram os testes crónicos.

Verificou-se que nas três semanas de exposição ao efluente têxtil, os adultos de *D. rerio* apresentaram valores mais elevados de locomoção e ventilação nos tratamentos com efluente do teste I, relativamente aos outros dois testes. Contudo, nos tratamentos controlo registaram-se valores de ventilação mais elevados no teste IIB.

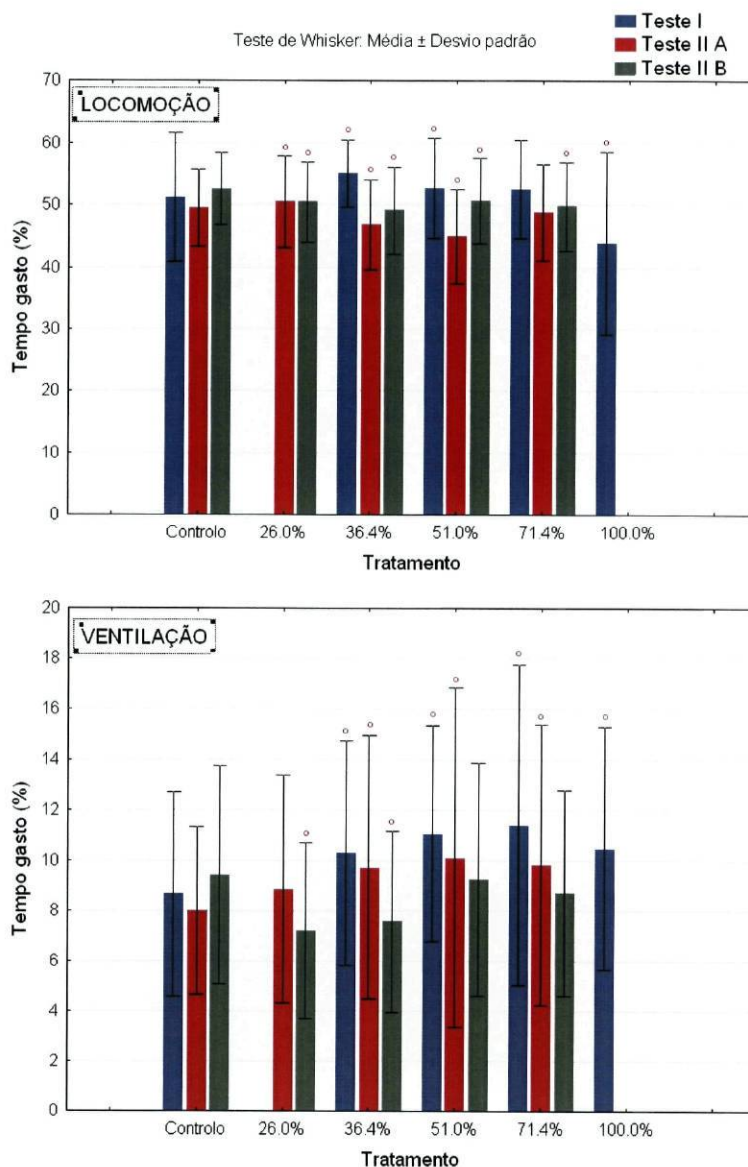
Ao nível da locomoção, apenas os organismos do tratamento com 71,4% de efluente do teste I e IIA, não diferiram significativamente relativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ).

No teste I, a maioria dos organismos expostos aos tratamentos apresentou locomoção superior ao controlo, excepção feita ao tratamento com 100% de efluente

(v/v). O tratamento com 71,4% de efluente foi o único que estatisticamente não revelou esse aumento em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).

No teste IIA, observou-se um aumento da locomoção de adultos de *D. rerio* no tratamento com 26% de efluente, mas para tratamentos com maior concentração de efluente registou-se o contrário, apesar dessa diminuição não ser significativa ( $p < 0,05$ ) no tratamento com 71,4% de efluente (v/v).

No teste IIB, os organismos expostos aos tratamentos com efluente apresentaram uma diminuição significativa na locomoção em relação ao tratamento controlo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7.** Comportamentos (locomoção e ventilação) registados em adultos de *D. rerio* nas três semanas de exposição em cada teste crónico. Os círculos a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ).

Relativamente à ventilação de adultos de *D. rerio* no teste I, verificou-se em todos os tratamentos um aumento significativo em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).

A resposta dos organismos do teste IIA expostos aos diferentes tratamentos, ao nível da ventilação, consistiu num aumento em relação ao tratamento controlo, não sendo significativo ( $p < 0,05$ ) no tratamento com 26% de efluente.

Na ventilação dos adultos de *D. rerio* do teste IIB, observou-se uma diminuição que não foi significativa ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos com maior concentração de efluente (51% e 71,4%).

### 3.3.3.5. Apreciação global dos comportamentos de *Danio rerio* registados

Numa análise geral, podemos constatar que, apesar de não se observarem efeitos significativos do efluente têxtil ao nível da sobrevivência de indivíduos adultos de *D. rerio*, existiram efeitos na locomoção e ventilação dos mesmos, durante todo o teste.

As respostas dos animais ao nível da locomoção e da ventilação, revelaram-se bastante variáveis ao longo das três semanas em que decorreram os testes. Contudo, não se verificou uma relação directa entre os efeitos registados e o gradiente de concentração do efluente.

Verificaram-se vários aumentos e decréscimos nos valores comportamentais dos organismos expostos aos tratamentos com efluente, comparativamente aos expostos ao tratamento controlo. Mas não existiu um comportamento padrão como resposta aos efeitos induzidos pelo efluente.

Ao longo dos testes realizados, constataram-se maiores variações na locomoção de adultos de *D. rerio* expostos aos tratamentos com efluente em relação ao controlo, comparativamente às verificadas na ventilação.

Os efeitos na ventilação dos indivíduos adultos de *D. rerio* foram mais significativos na primeira semana do teste. Estes resultados poderão sugerir uma ligeira adaptação dos organismos expostos aos tratamentos com efluente têxtil ao longo das três semanas.

Poderíamos interpretar a partir destes resultados que os efeitos tóxicos do efluente afectaram o comportamento locomotor com maior intensidade que o ventilatório. Todavia, Gerhardt *et al.* (2002) sugerem que as variações na locomoção poderão ser interpretadas como um reflexo de fuga, pois os peixes sendo espécies

pelágicas, podem ter sido induzidos a um stress adicional ao serem colocados dentro das câmaras do MFB<sup>®</sup>, causando variações comportamentais mais amplas. Apesar de tudo, os vinte minutos proporcionados aos animais para adaptação às câmaras, antes de iniciar o registo online, foram iguais ou superiores ao tempo referido pela bibliografia consultada, como por exemplo os dez minutos sugeridos por Gerhardt (1998). Uma outra explicação para o facto poderá ser a movimentação de pessoal e ruídos anexos ao laboratório, induzindo os peixes em stress e provocando interferências no registo.

Analisando os comportamentos de adultos de *D. rerio* nas três semanas de teste, observou-se no teste I um aumento da locomoção dos organismos nos tratamentos com efluente, relativamente aos do tratamento controlo. No teste IIA, esse aumento na locomoção dos organismos também se verificou para o tratamento com 26% de efluente, contudo, para concentrações superiores de efluente observou-se um decréscimo em relação ao tratamento controlo. Este decréscimo também foi observado em todos os organismos expostos aos tratamentos com efluente no teste IIB.

Gerhardt *et al.* (2002) observaram um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) na locomoção de *Oryzias latipes*, em função da variação da concentração de águas residuais municipais e farmacêuticas, às quais os peixes estavam expostos.

Sneddon (2003) não encontrou diferenças na actividade natatória de *Oncorhynchus mykiss*, comparando indivíduos controlo com indivíduos expostos a um tratamento tóxico.

Num estudo onde foi feito o registo online do comportamento de *Atyaephyra desmarestii* com o mesmo Biomonitor durante 48 horas, Gerhardt *et al.* (2004) verificaram uma diminuição na actividade geral dos camarões com o aumento da toxicidade.

Relativamente à ventilação dos adultos de *D. rerio* verificou-se um aumento em relação ao tratamento controlo, nos organismos expostos aos tratamentos com efluente do teste I e IIA. No teste IIB, a resposta dos organismos revelou-se contrária, visto todos os tratamentos com efluente terem induzido a um decréscimo na ventilação de adultos de *D. rerio*.

Gerhardt *et al.* (2002) registaram online respostas de curta-duração de *Oryzias latipes* e observaram, após sete horas de exposição a águas residuais municipais, um aumento da ventilação dos peixes expostos às concentrações mais elevadas.

Relativamente a um estudo da taxa de batimentos operculares (taxa ventilatória ou branquial) de *Oncorhynchus mykiss*, Sneddon (2003) verificou que existia um aumento dessa taxa quase para o dobro após o tratamento com tóxico, enquanto que os indivíduos controlo apenas apresentavam um aumento de 30%.

Noutro estudo também com *Oncorhynchus mykiss*, Gerhardt (1998) mencionou reacções opostas na ventilação dos peixes após quatro horas de exposição a um efluente de indústria mineira, registando um aumento nas concentrações com 10% de efluente e um decréscimo nas concentrações com 50% de efluente.

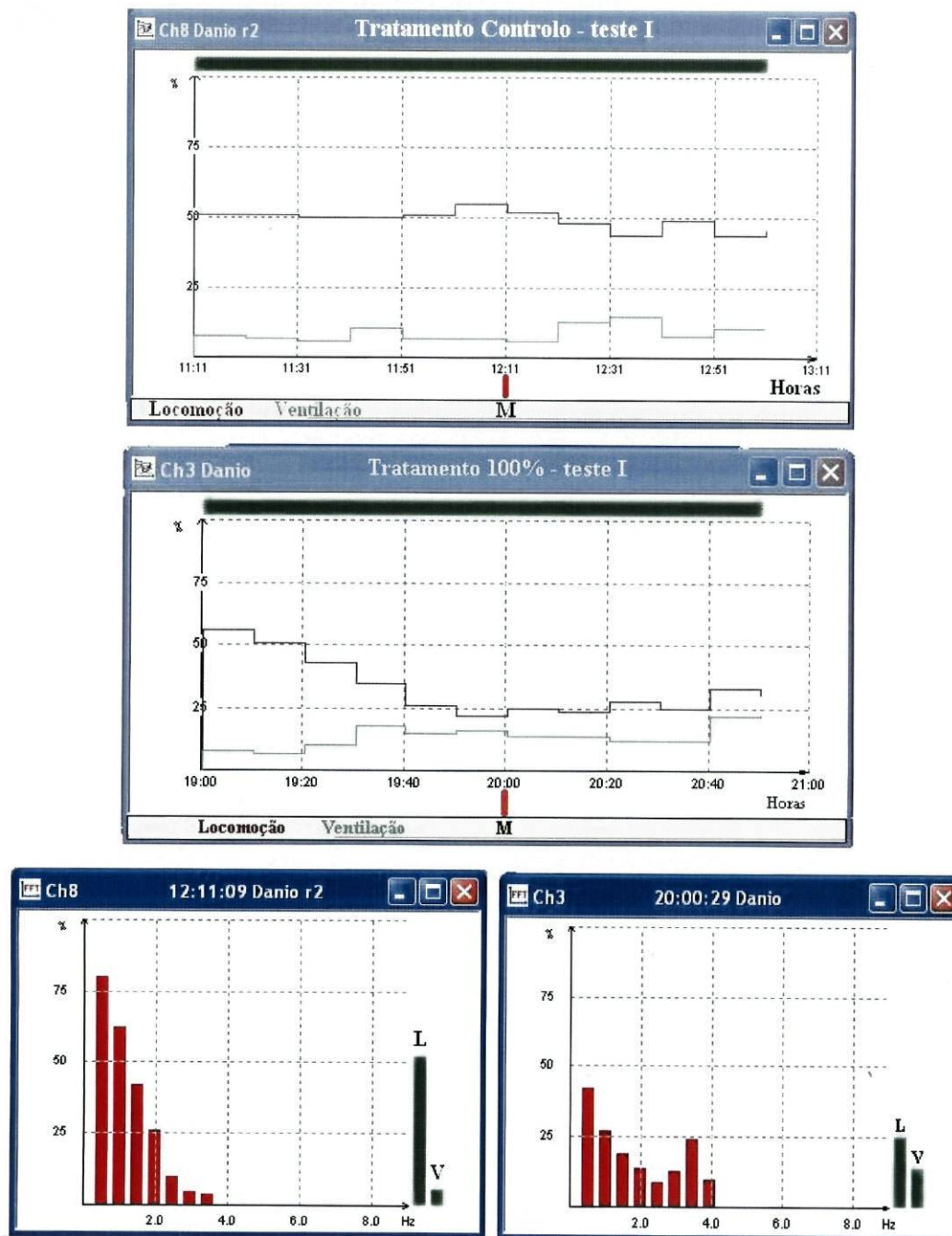
*Gammarus pulex* (Crustacea) reagiu, apresentando respostas de stress inicial com um aumento na ventilação, após exposição de trinta minutos a Cobre e de uma hora a Chumbo (Gerhardt, 1995).

Por outro lado, alguns estudos referem um decréscimo na ventilação de indivíduos devido a exposições tóxicas. Por exemplo, Gerhardt (1996) observou, usando a técnica da conversão da impedância, um decréscimo no tempo gasto na ventilação de *Hydropsyche angustipennis* (Insecta), durante uma hora de exposição a um efluente industrial complexo.

Esta variabilidade de respostas dos organismos expostos a diferentes concentrações de tóxico, pode ser devida a diferentes mecanismos. Como refere, por exemplo, Gerhardt (1998), um aumento da locomoção em organismos expostos a baixas concentrações pode significar uma reacção para evitar o agente agressor, enquanto que um decréscimo na actividade natatória de peixes expostos a concentrações elevadas de tóxico pode corresponder a uma aclimação ao stress.

#### 3.3.3.6. Análise de respostas comportamentais a partir de dados fornecidos pelo Biomonitor MFB<sup>®</sup>

A figura 8 apresenta algumas das “ferramentas” que o biomonitor MFB<sup>®</sup> disponibiliza para analisar os resultados registados online.



**Figura 8.** Gráficos de longo-termo e histogramas apresentados pelo biomonitor MFB<sup>®</sup>, representativos da locomoção e ventilação de adultos de *D. rerio* expostos ao tratamento controlo e ao tratamento com 100% de efluente, na primeira semana do teste I. (L= média dos valores de locomoção; V= média dos valores de ventilação; M= registo analisado no histograma)

Neste caso, apresentam-se gráficos de “longo-termo” e histogramas com frequências e percentagem de tempo gasto em cada comportamento (locomoção e

ventilação), de indivíduos adultos de *D. rerio* expostos ao tratamento controlo e ao tratamento com 100% de efluente do teste I.

A partir dos gráficos apresentados na figura 8 podemos constatar ao longo das duas horas de registo, um decréscimo da locomoção de adultos de *D. rerio* expostos ao tratamento com 100% de efluente, comparativamente à locomoção registada no tratamento controlo.

Ao nível da ventilação de adultos de *D. rerio*, verificou-se um aumento no tratamento com 100% de efluente, que acompanhou o decréscimo da locomoção dos organismos ao longo do tempo de registo.

No histograma obtido do tratamento controlo observou-se, às 12:11 horas, uma prevalência dos registos nas frequências de menor amplitude (<2Hz) correspondentes à locomoção, chegando inclusive a ultrapassar o 75% de tempo gasto na frequência mais baixa. No histograma obtido às 20:00 horas no tratamento com 100% de efluente, verificou-se um aumento dos valores nas frequências de maior amplitude (entre 2 e 4 Hz), correspondentes à percentagem de tempo gasto na ventilação.

### 3.4. Testes crónicos com embriões e larvas de *Danio rerio*

As larvas dos peixes possuem uma fisiologia e uma ecologia únicas e, portanto, estão sujeitas a maiores e diferentes pressões selectivas comparativamente aos peixes adultos. Durante o desenvolvimento larvar, as suas tolerâncias térmicas são bastante reduzidas e as concentrações letais (CL<sub>50</sub>) relativamente a químicos tóxicos encontram-se nos seus níveis mais baixos (Rombough, 1996).

Face aos resultados obtidos neste trabalho, em relação à exposição de indivíduos adultos de *Danio rerio* ao efluente têxtil estudado, sentiu-se necessidade de averiguar qual o impacto das descargas desse efluente, em fases de vida mais sensíveis e mais susceptíveis a maiores pressões ambientais. Desse modo, realizaram-se testes de toxicidade com ovos fertilizados de *Danio rerio* expostos a diferentes tratamentos de efluente têxtil, analisando não só os efeitos letais, mas tendo também especial atenção para com os efeitos sub-letais.

### 3.4.1. Oxigénio, pH, temperatura e condutividade

As tabelas 8, 9 e 10 (em anexo), apresentam os valores médios dos parâmetros físico-químicos de cada tratamento, bem como os coeficientes de variação, mínimos, máximos e respectivos desvios padrão, analisados ao longo dos testes crónicos realizados com embriões e larvas de *D. rerio*.

A percentagem de saturação de oxigénio medida em todos os tratamentos registou-se sempre com valores superiores a 60 % nos três testes realizados.

Os valores de temperatura registados nos tratamentos, apresentaram coeficientes de variação inferiores a 5 %.

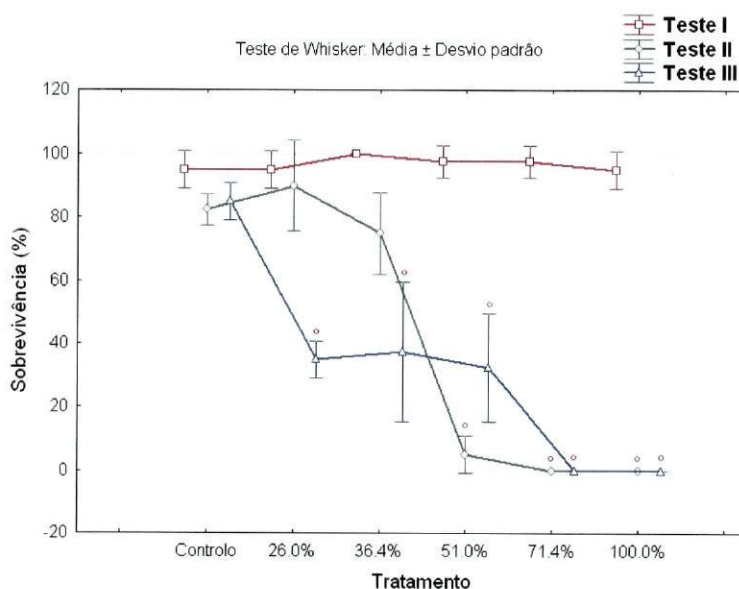
Os valores médios de condutividade aumentaram do tratamento controlo para o tratamento com 100% de efluente (v/v), de 271  $\mu\text{S/cm}$  para 726  $\mu\text{S/cm}$ , de 241,3  $\mu\text{S/cm}$  para 886,6  $\mu\text{S/cm}$  e de 224,4  $\mu\text{S/cm}$  para 637,9  $\mu\text{S/cm}$ , no teste I, II e III, respectivamente. Constatou-se, tal como anteriormente, um aumento da condutividade em função do aumento de concentração de efluente.

### 3.4.2. Sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio*

Os resultados de sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio* relativos aos testes crónicos I, II e III, estão representados na figura 9.

No teste preliminar (teste I), a sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio* em todos os tratamentos, manteve-se próxima dos 100%. Inclusivamente, no tratamento controlo e no tratamento com 26% de efluente (v/v), observaram-se valores mais baixos de sobrevivência do que os verificados em tratamentos com concentrações mais elevadas de efluente.

No teste II, nos tratamentos com concentrações acima de 36,4%, verificou-se um decréscimo acentuado na sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio*. De salientar que o tratamento com 26% de efluente (v/v) apresentou maior sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio*, em relação ao tratamento controlo.



**Figura 9.** Sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio* nos três testes crônicos efectuados. Os círculos a vermelho indicam diferença significativa em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).

No teste III, ocorreu uma diminuição na sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio* em todos os tratamentos de efluente. No entanto, para os tratamentos com concentrações iguais ou inferiores a 51%, essa diminuição não se verificou tão acentuada quanto a do teste II.

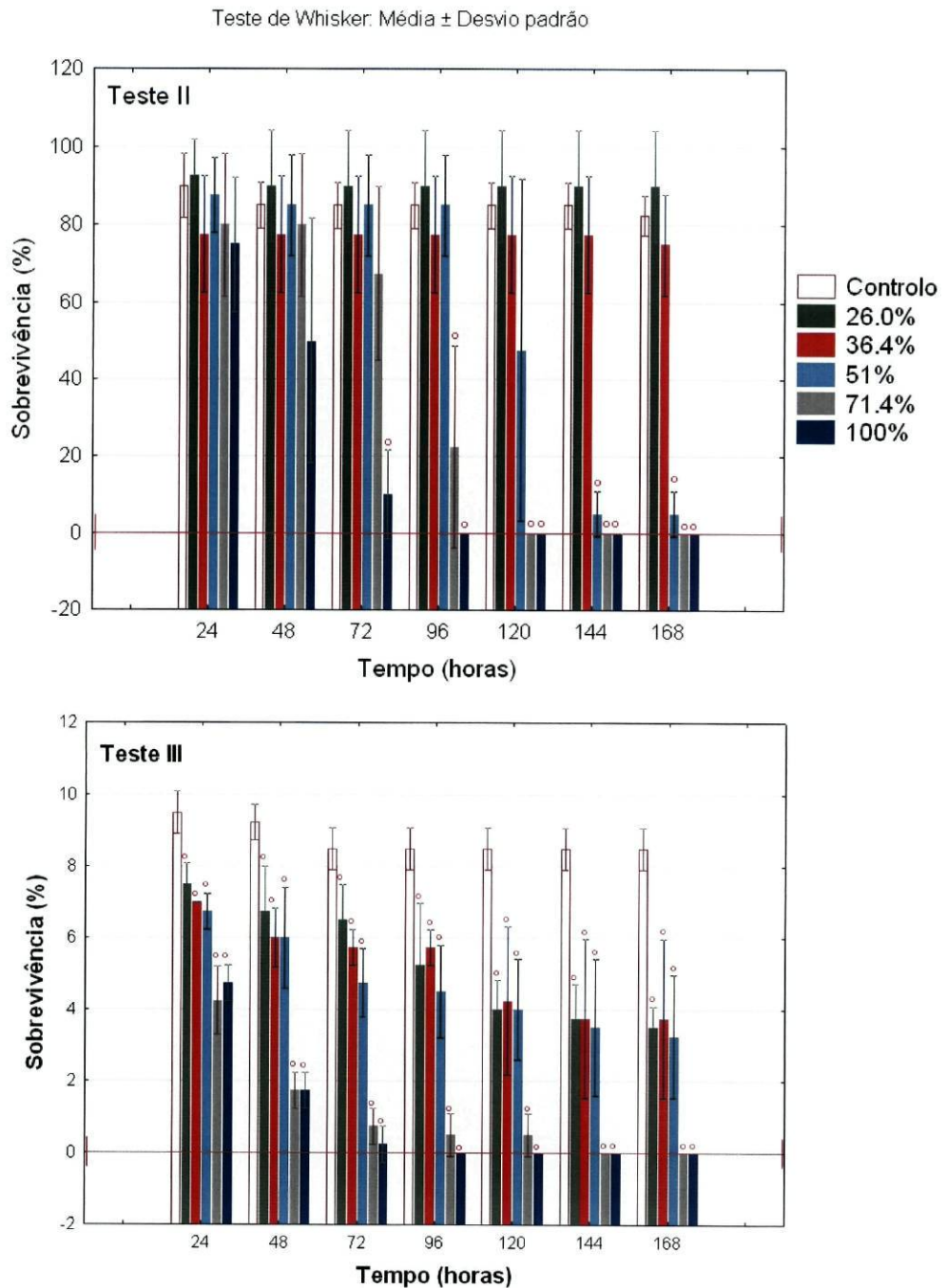
Nos testes II e III, não se registou sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio* nos tratamentos com 71,4% e 100% de efluente (v/v).

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e o controlo ( $p < 0,05$ ), na sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio*, expostos ao efluente têxtil durante os 7 dias do teste preliminar (teste I), como se pode constatar na figura 9.

Todavia, testes crônicos de toxicidade com resultados negativos não excluem a presença de toxicidade. Além disso, devido à potencial e muito provável variabilidade temporal da toxicidade dos efluentes, um teste negativo não exclui a possibilidade de amostras recolhidas em momentos diferentes poderem exibir toxicidade crónica (EPA, 2002).

De facto, após analisar os resultados dos testes definitivos (testes II e III), realizados 3 meses após o teste preliminar, constatou-se que a sobrevivência na maioria dos tratamentos com efluente diferia significativamente do controlo ( $p < 0,05$ ).

A figura 10 representa a evolução da sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio*, durante as 168 horas de duração dos testes II e III.



**Figura 10.** Evolução da sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio* durante o teste II e o teste III. Os círculos a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ).

Nos tratamentos com concentrações superiores a 51%, todos os embriões morreram após 120 e 144 horas de exposição no teste II e teste III, respectivamente.

Setenta e duas horas após o início do teste II (último registo com sobreviventes em todas as concentrações), o único tratamento que diferia significativamente do controlo ( $p < 0,05$ ) era o que continha 100% de efluente. Verificou-se, de seguida, respectivamente 96 e 144 horas após o início do teste, diferenças significativas do tratamento 71,4% e 51% em relação ao controlo ( $p < 0,05$ ).

Os tratamentos com concentrações mais baixas de efluente (26% e 36,4%), não diferiram significativamente do controlo ( $p < 0,05$ ).

No teste III, vinte e quatro horas após o início do teste, os resultados revelavam já que todos os tratamentos com efluente eram significativamente diferentes do controlo ( $p < 0,05$ ) no que diz respeito à sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio*.

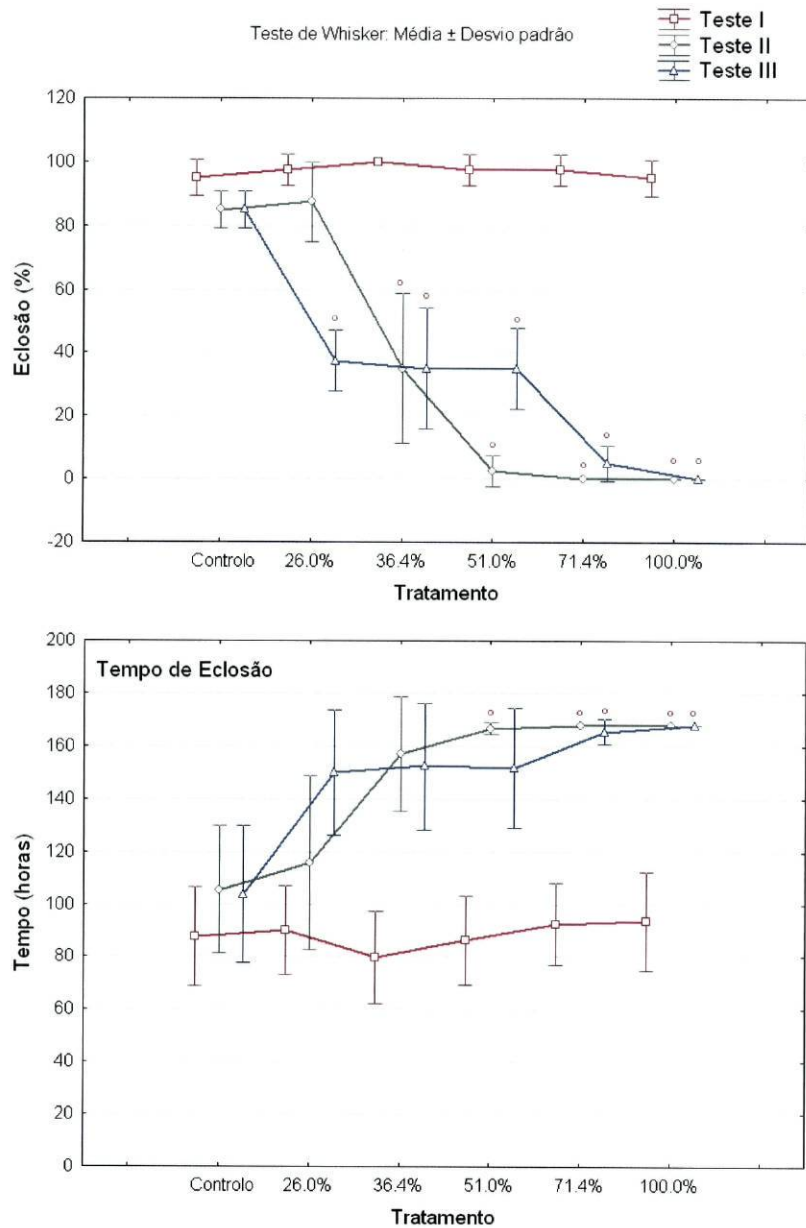
Contudo, analisando a evolução dos efeitos do efluente ao longo do tempo, é possível observar dois grupos distintos entre os tratamentos de efluente. Um grupo constituído pelos tratamentos com menor concentração de efluente, onde se inserem o tratamento 26%, 36,4% e 51%. E um outro grupo onde se inserem os tratamentos com 71,4% e 100% de efluente, no qual se registaram, quarenta e oito horas após o início do teste, valores de sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio* bastante inferiores aos registados para o primeiro grupo.

Comparando os resultados dos testes II e III, relativos à sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio*, constatamos que os efeitos do efluente têxtil utilizado no teste II se revelaram mais tardiamente (por volta das 72 horas), e essencialmente nas concentrações mais elevadas. Por outro lado, os resultados do teste III indicam um registo gradual dos efeitos de toxicidade, notando-se um decréscimo progressivo na sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio* ao longo do tempo, com maior intensidade nos tratamentos com concentrações mais elevadas (71,4% e 100%).

### 3.4.3. Eclosão das larvas de *D. rerio*

Na figura 11, podemos observar os valores percentuais e o tempo de eclosão das larvas de *D. rerio*, nos três testes realizados.

A eclosão das larvas de *D. rerio* nos seis tratamentos do teste I, igualou ou excedeu os 90% e não se observaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos de efluente e o tratamento controlo.



**Figura 11.** Valores percentuais e tempo da eclosão das larvas de *D. rerio* em cada teste crônico. Os círculos a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ).

No teste II, a eclosão das larvas de *D. rerio* no tratamento com 26% de efluente superou os valores de eclosão no tratamento controlo.

O tratamento com 36% de efluente evidenciou uma redução acentuada na eclosão das larvas de *D. rerio*, enquanto que o tratamento com 51% de efluente registou uma percentagem mínima de eclosão. Nos tratamentos com maior percentagem de efluente (71,4% e 100%) não ocorreu eclosão de larvas de *D. rerio*.

No teste III, identificou-se um grupo de tratamentos com cerca de 30 a 40% de eclosão de larvas de *D. rerio*, onde se inserem os tratamentos com 26%, 36,4% e 51% de efluente.

No tratamento com 100% de efluente não ocorreu nenhuma eclosão de larvas de *D. rerio*, mas no tratamento com 71,4% de efluente registou-se uma percentagem mínima de eclosão.

Nos dois testes definitivos, só o tratamento 26% do teste II não apresentou diferenças significativas relativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ) quanto à eclosão larvar.

Relativamente ao tempo de eclosão das larvas de *D. rerio*, isto é, o tempo que vai desde a fertilização até à eclosão completa, verificou-se que as larvas de todos os tratamentos do teste I eclodiram mais cedo do que as larvas de qualquer outro tratamento dos testes II e III.

No teste I, a eclosão ocorreu antes das cem horas após o início do teste e não se verificaram atrasos significativos ( $p < 0,05$ ), entre os tratamentos com efluente e o tratamento controlo.

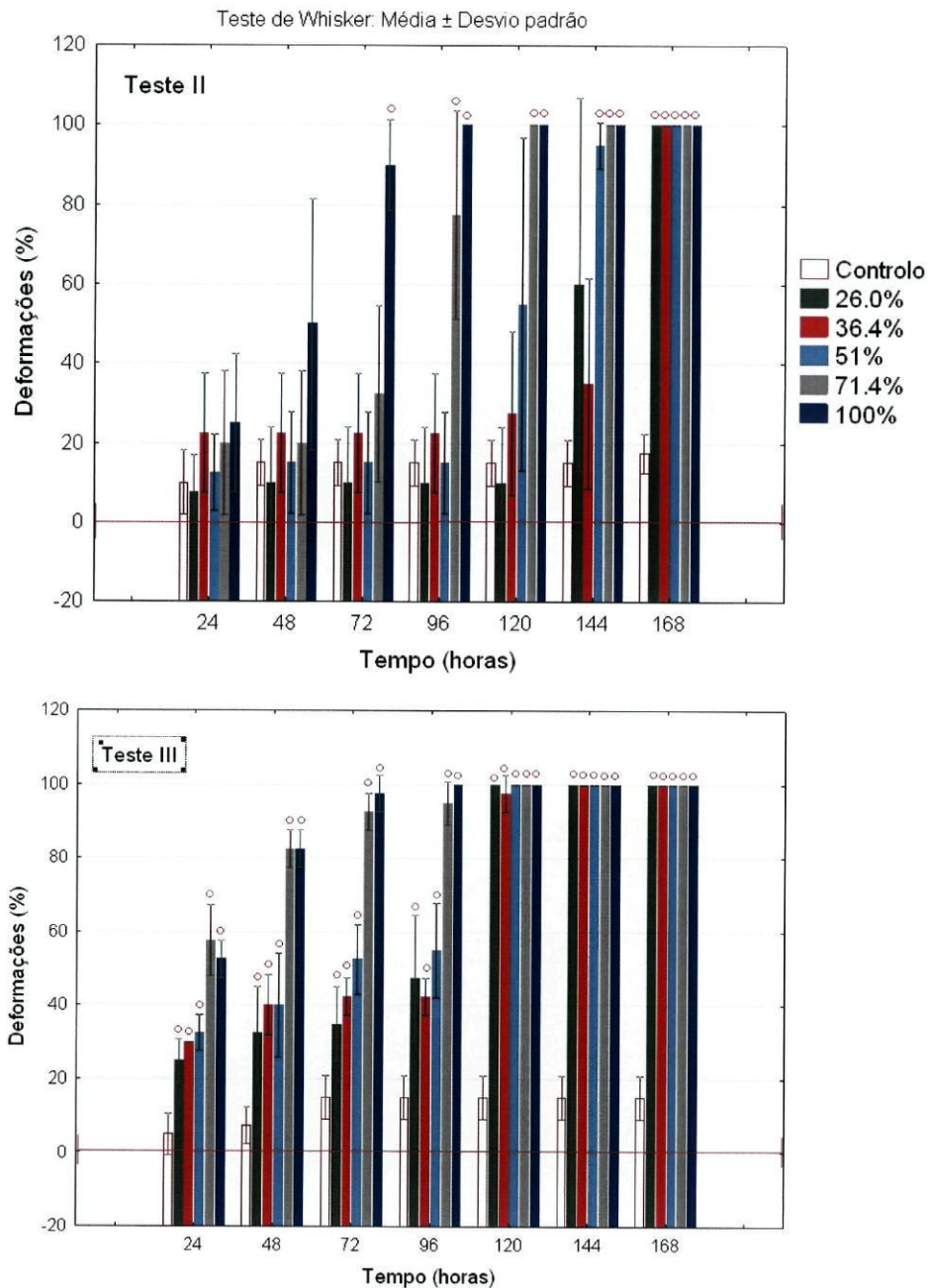
No teste II, as larvas de *D. rerio* do tratamento com 26% de efluente tiveram um tempo de eclosão próximo do tempo de eclosão das larvas do tratamento controlo. No tratamento com 36,4% de efluente, as larvas de *D. rerio* apresentaram um ligeiro atraso na eclosão em relação às do tratamento controlo, mas esse atraso não foi significativo ( $p < 0,05$ ).

No teste III, observou-se algum atraso na eclosão das larvas de *D. rerio* nos tratamentos com 26%, 36,4% e 51% de efluente, contudo não foi significativo estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

A partir dos tratamentos com 71,4% de efluente, o tempo de eclosão nos dois testes definitivos sofreu um atraso significativo relativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ), chegando a atingir as 168 horas de duração do teste. Além disso, no teste II, o tratamento com 51% de efluente também se revelou significativamente diferente ( $p < 0,05$ ).

### 3.4.4. Deformações ocorridas em larvas de *D. rerio*

A figura 12 apresenta o número de deformações ocorridas nas larvas de *D. rerio*, ao longo das 168 horas de duração dos testes crônicos II e III. Durante o teste I, não foram observadas deformações nas larvas de *D. rerio* expostas ao efluente têxtil.



**Figura 12.** Evolução das deformações ocorridas nas larvas de *D. rerio*, durante o teste II e o teste III. Os círculos a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ).

No teste II, verificou-se, no tratamento com 100% de efluente, um aumento percentual das deformações larvares a partir das quarenta e oito horas após o início do teste. Contudo, este aumento só foi significativo vinte e quatro horas depois, observando-se posteriormente também um acréscimo das deformações larvares no tratamento com 71,4% de efluente.

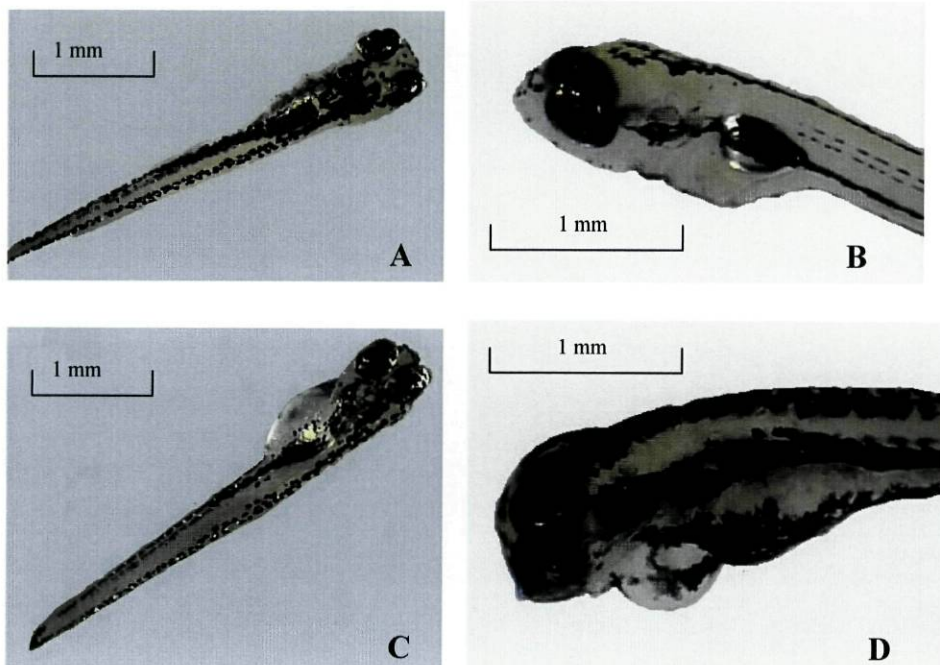
Os restantes tratamentos com efluente (26%, 36,4% e 51%) demonstraram um incremento das deformações ocorridas nas larvas de *D. rerio*, só a partir das 120 horas de teste.

No teste III, observou-se que o número de deformações nas larvas de *D. rerio* em todos os tratamentos com efluente, aumentou logo vinte e quatro horas após o início do teste. Salienta-se o facto do tratamento com 71,4% de efluente (v/v) apresentar, nesta altura, uma percentagem superior de deformações larvares, em relação a todos os outros tratamentos. Este incremento nas deformações larvares do teste III, decorreu progressivamente e em função da concentração de efluente no tratamento, até às 120 horas após o início do teste.

No período de tempo desde as 96 horas até às 120 horas após o início do teste II, verificou-se uma diferença significativa em relação ao tratamento controlo ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos com 71,4% e 100% de efluente (v/v). Às 144 horas essa diferença foi também notada no tratamento com 51% de efluente e, quando o teste terminou, todos os tratamentos diferiam do controlo.

Vinte e quatro horas após o início do teste III, todos os tratamentos com efluente diferiam já significativamente do controlo ( $p < 0,05$ ). Este facto sugere uma maior toxicidade do efluente utilizado no teste III, porque produziu efeitos adversos em todos os tratamentos e mais precocemente do que acontecera no teste II.

Constatou-se, portanto, um efeito adverso do efluente têxtil, provocando várias deformações nas larvas expostas. A figura 13 compara larvas normais, desenvolvidas no tratamento controlo, com larvas que apresentam algumas dessas deformações.



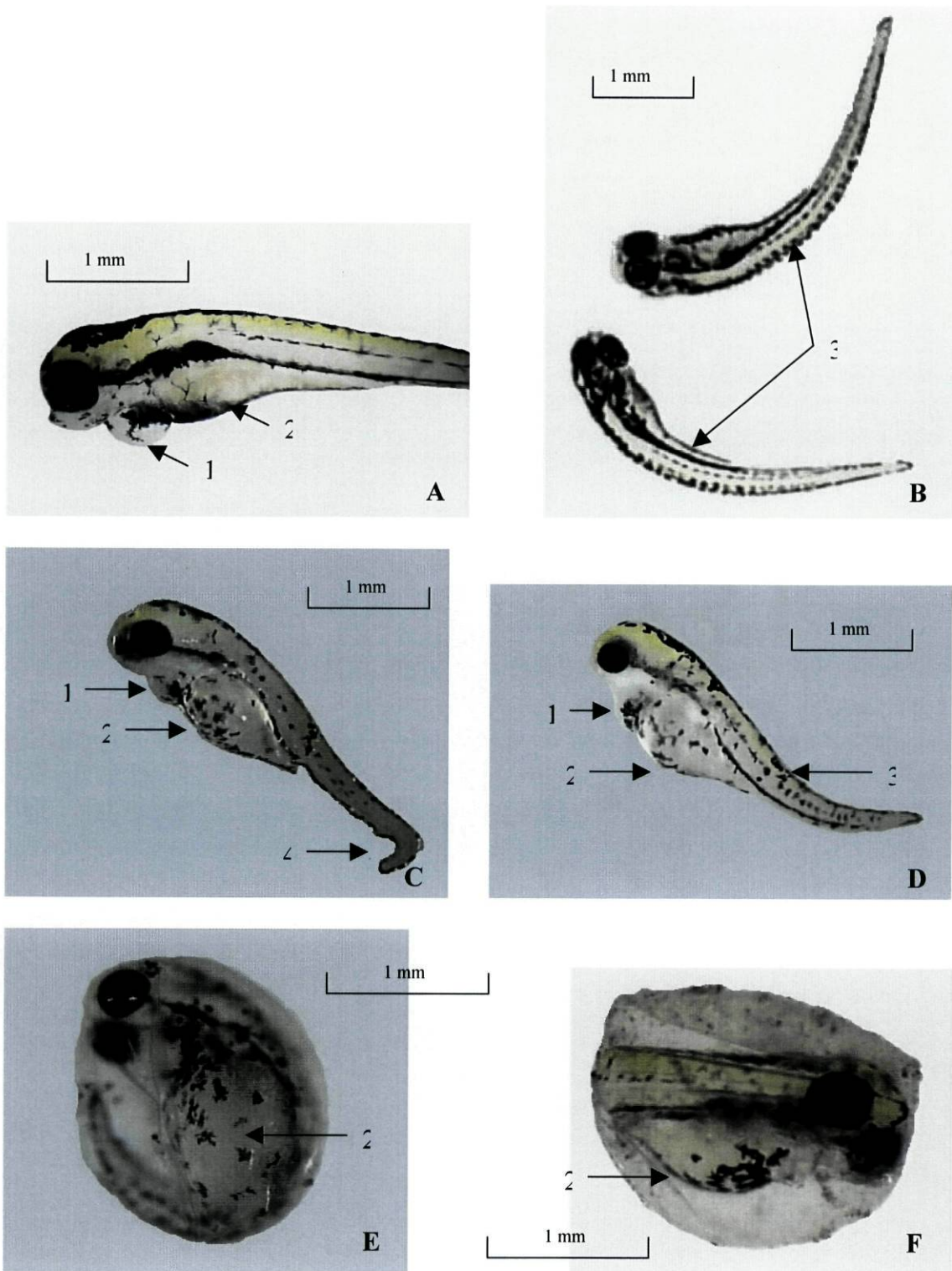
**Figura 13.** Sinais de toxicidade em larvas de *Danio rerio* após 168 horas de exposição ao efluente têxtil. **A, B.** Tratamento controlo. **C, D.** Tratamento 26% de efluente.

Os efeitos teratogénicos, devidos à exposição ao efluente têxtil, estão bem patentes na figura 14.

Os sinais mais vulgares de toxicidade identificados em larvas de *D. rerio* na bibliografia consultada, como por exemplo Henry *et al.* (1997), Elonen *et al.* (1998). (1998), Bisthoven (1999) ou Keil *et al.* (2002), consistiram em edemas (cranial, pericardial e abdominal), hemorragias, curvatura da cauda, anormalidades na boca e deformações na cabeça e na espinal medula (escoliose acentuada). A maioria desses sinais também foram observados no presente trabalho.

Elonen *et al.* (1998). (1998) referem ainda que estes efeitos nocivos ao organismo, têm influência negativa em algumas das suas actividades vitais, como a natação e a alimentação.

Outros efeitos comuns após a eclosão, durante as fases de desenvolvimento larvar, são a redução no crescimento e a pouca utilização do saco embrionário (Billiard *et al.*, 1999).



**Figura 14.** Algumas deformações identificadas em larvas de *D. rerio* após 168 horas de exposição ao efluente têxtil. **A, B, C.** Larvas em Tratamento 26% **D.** Larva em Tratamento 51%. **E, F.** Larvas no interior do ovo em Tratamento 36,4%. **1**-edema pericardial. **2**-edema abdominal. **3**-escoliose acentuada. **4**-curvatura da cauda.

Estas deformações a nível corporal são indicativas de efeitos metabólicos mais subtis, possivelmente a nível dos sistemas enzimáticos, que são vulgarmente observados em ensaios de toxicidade em larvas. A intensidade destes efeitos está, geralmente, em relação directa com a concentração do tóxico (Rand, 1995).

### 3.4.5. Crescimento das larvas de *D. rerio*

Este parâmetro tem gerado alguma controvérsia quanto à sua sensibilidade para detectar efeitos tóxicos em efluentes. Ward *et al.* (1980) examinaram a literatura relativa a testes efectuados nas fases iniciais do ciclo de vida de *Cyprinodon variegatus*, e verificaram que o crescimento não era um indicador estatisticamente sensível à toxicidade em 16 de 18 testes analisados.

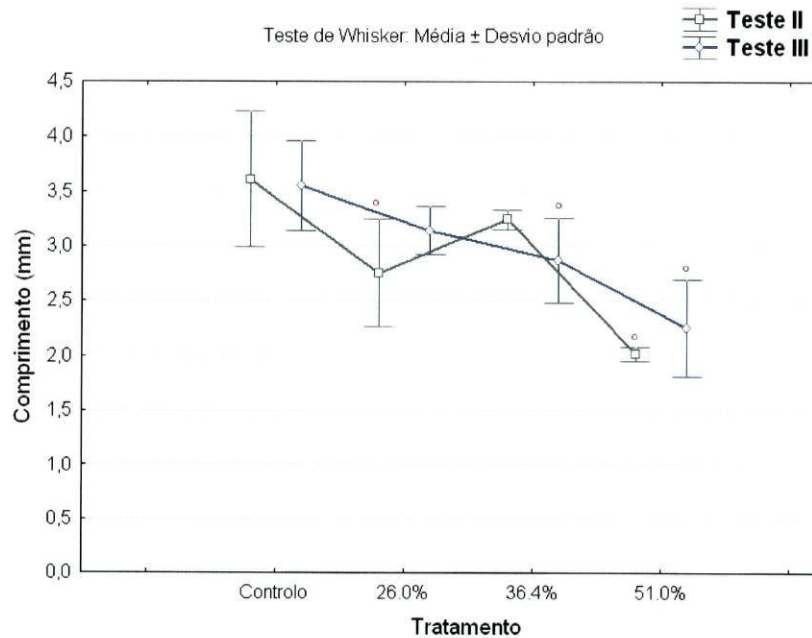
Por outro lado, Benoit *et al.* (1982) verificaram que o crescimento larvar era a medição mais significativa de efeitos de toxicidade e, em testes com fases iniciais do ciclo de vida da espécie piscícola *Pimephales promelas* expostas a 4 químicos orgânicos, verificaram que a sobrevivência era tão ou menos sensível que o crescimento.

#### 3.4.5.1. Comprimento das larvas sobreviventes

Na figura 15, podemos observar o comprimento das larvas de *D. rerio* no fim dos testes II e III.

No teste II, verificou-se um decréscimo no comprimento das larvas de *D. rerio* nos tratamentos com efluente. O tratamento com 36,4% de efluente revelou um comprimento das larvas superior aos restantes tratamentos com efluente, mas manteve-se abaixo dos valores obtidos no tratamento controlo.

No teste III, observou-se um decréscimo mais marcado no comprimento das larvas de *D. rerio* à medida que aumentava a concentração de efluente nos tratamentos.



**Figura 15.** Comprimento das larvas de *D. rerio* no fim dos testes II e III. Os círculos a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ). Não são apresentados valores para os tratamentos com 71,4% e 100% de efluente devido à ausência de larvas sobreviventes no final dos testes.

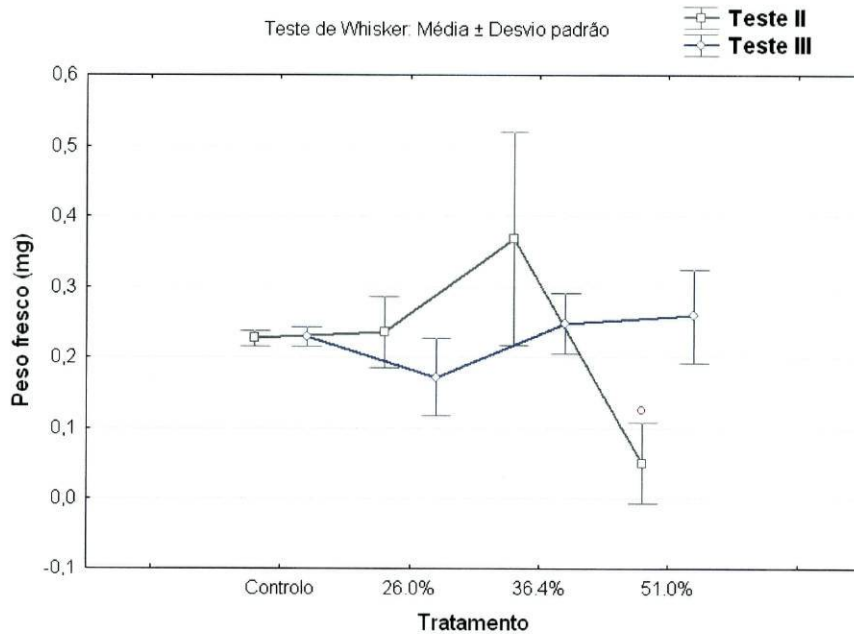
De uma forma geral, notou-se um decréscimo significativo comparativamente ao controlo ( $p < 0,05$ ) no comprimento dos organismos teste expostos aos tratamentos com 26% e 51% de efluente do teste II, e aos tratamentos com 36,4% e 51% de efluente do teste III.

Bachmann (2002) citado por Nagel (2002), também registou um atraso no crescimento de larvas de *D. rerio* expostas durante 120 horas a éter dimetil glicol dietileno.

Elonen *et al.* (1998) sugerem que a redução no comprimento das larvas, parece estar relacionada com a formação de edemas que devido à pressão que exercem nos vasos sanguíneos, impedem a circulação do sangue, levando por isso a uma diminuição da absorção de nutrientes pelo corpo do animal. Rajan *et al.* (1988) observaram também uma inibição no crescimento de adultos de *Cyprinus carpio* em resultado da sua exposição a águas residuais de uma indústria têxtil.

## 3.4.5.2. Peso das larvas sobreviventes

A figura 16 indica os valores médios do peso das larvas de *D. rerio* no fim dos testes II e III.



**Figura 16.** Valores médios do peso das larvas de *D. rerio* no fim dos testes II e III. Os círculos a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ). Não são apresentados valores para os tratamentos com 71,4% e 100% de efluente devido à inexistência de larvas sobreviventes no final dos testes.

No teste II, observou-se um ganho de peso nas larvas de *D. rerio* dos tratamentos com concentrações de efluente mais baixas (26% e 36,4%), em relação ao tratamento controlo. Contudo, registou-se uma acentuada diminuição no peso das larvas expostas ao tratamento com 51% de efluente (v/v).

No teste III, não se verificaram variações de peso das larvas tão marcadas, mas notou-se uma tendência para valores superiores aos do controlo nos tratamentos com concentrações de efluente mais elevadas (36,4% e 51%). No tratamento com 26% de efluente observou-se uma ligeira descida no peso das larvas de *D. rerio* em relação às do tratamento controlo.

O peso das larvas de *D. rerio* apenas manifestou um efeito significativo, comparativamente ao tratamento controlo, no tratamento com 51% de efluente do teste II ( $p < 0,05$ ).

Nos restantes tratamentos deste teste e em todos os tratamentos do teste III, não foram registadas diferenças significativas entre o peso das larvas provenientes dos tratamentos com efluente e o peso das larvas do tratamento controlo ( $p < 0,05$ ).

Este parâmetro não mostrou grande sensibilidade relativamente à toxicidade do efluente testado. Uma explicação para este facto poderá encontrar-se no aparecimento de edemas nas larvas expostas aos diferentes tratamentos, o que faz com que as perdas de peso devidas ao menor crescimento dos animais, possam ser compensadas pela acumulação de líquido aquando do desenvolvimento dos edemas. Este ganho de peso, associado ao edema, foi já referenciado por Elonen *et al.* (1998).

Mesmo no tratamento 51% do teste II, poderá justificar-se a diferença significativa para o controlo ( $p < 0,05$ ), devido ao facto de os únicos organismos sobreviventes serem larvas por eclodir, que obviamente, têm um peso diferente do das larvas já eclodidas e, como estão mais protegidas do exterior, podem não apresentar edemas tão desenvolvidos.

#### 3.4.6. Batimentos Cardíacos de embriões e larvas de *D. rerio*

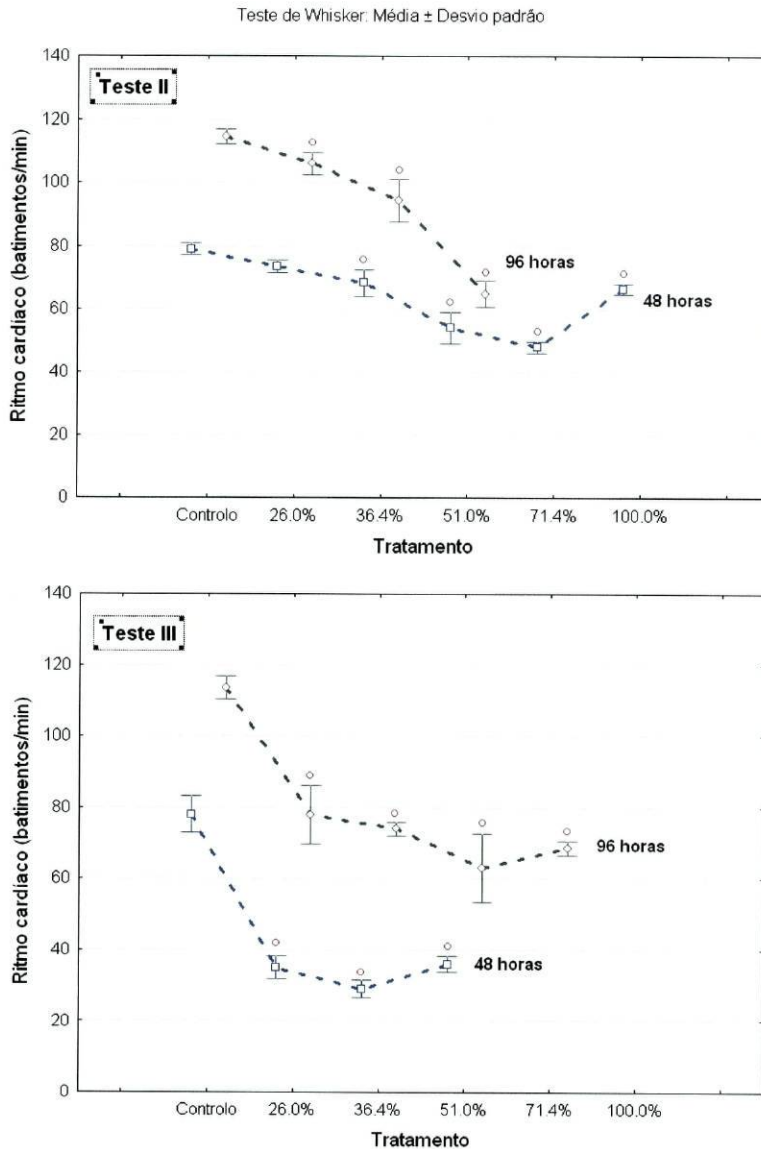
A figura 17 apresenta os batimentos cardíacos das larvas de *D. rerio*, medidos quarenta e oito horas e noventa e seis horas depois do início dos testes II e III.

No teste II, o número de batimentos cardíacos das larvas registado ao fim de 48 e de 96 horas de exposição demonstrou uma diminuição, em função do aumento da concentração de efluente nos tratamentos. Apesar disso, registou-se um acréscimo dos batimentos cardíacos das larvas às 48 horas de exposição no tratamento com 100% de efluente (v/v), em relação aos outros tratamentos com efluente.

Quarenta e oito horas após o início do teste, verificou-se que, com excepção do tratamento com 26% de efluente (v/v), os batimentos cardíacos dos embriões de *D. rerio* em todos os tratamentos diferiam significativamente do controlo ( $p < 0,05$ ). Quando se efectuou a contagem dos batimentos cardíacos às 96 horas de exposição, constatou-se que todos os tratamentos, sem excepção, diferiam significativamente do controlo ( $p < 0,05$ ).

Quer no teste II, como no teste III, registou-se em todos os tratamentos um aumento do número de batimentos cardíacos das larvas de *D. rerio* das 48 horas para as

96 horas de exposição. Isto deve-se, provavelmente, à morfogênese do coração estar apenas completa por volta das 60 horas após a fertilização (Kimmel *et al.*, 1995).



**Figura 17.** Batimentos cardíacos de embriões e larvas de *Danio rerio* nos testes II e III, às 48 horas e 96 horas de exposição. Os círculos a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ). Não foi possível determinar os batimentos cardíacos em alguns tratamentos devido à dificuldade na visualização do sistema cardíaco de alguns embriões e larvas.

No teste III, relativamente ao número de batimentos cardíacos das larvas de *D. rerio* dos tratamentos com efluente, em comparação com o tratamento controlo, observou-se uma diminuição mais drástica que no teste II. Depois de quarenta e oito

horas de exposição, as larvas dos tratamentos com efluente apresentavam valores inferiores a 40 batimentos cardíacos por minuto.

Às 48 horas de exposição já todos os tratamentos apresentavam larvas com batimentos cardíacos significativamente diferentes do controlo ( $p < 0,05$ ), continuando a verificar-se o mesmo às 96 horas de exposição.

De uma forma geral, a exposição das larvas de *D. rerio* ao efluente têxtil induziu um decréscimo no seu batimento cardíaco.

Samson *et al.* (2001) também observaram um enfraquecimento ao nível dos batimentos cardíacos de embriões de *D. rerio* após cinco dias de exposição a MeHg.

Nagel (2002) observou este efeito em *Danio rerio* com 48 horas de desenvolvimento, quando exposto durante uma e oito horas a propanol. Entretanto, reconheceu que a redução dos batimentos cardíacos dependia do tempo de exposição e da concentração da substância teste.

No nosso estudo, foi possível deduzir no teste II essa dependência em relação ao tempo de exposição e à concentração do efluente. Existiu, no entanto, um registo um pouco mais elevado no tratamento com 100% de efluente às 48h (mas significativamente diferente em relação ao controlo), que poderá ser explicado por uma situação de stress dos animais. No teste III essa dependência aparece mais esbatida, provavelmente pela maior toxicidade do efluente que terá originado um impacto mais forte.

Henry *et al.* (1997) observaram igualmente uma diminuição no batimento cardíaco em larvas de *Danio rerio* expostas a um tratamento tóxico com 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-*p*-dioxina, em comparação ao verificado no controlo.

#### **3.4.7. Apreciação global dos efeitos em embriões e larvas de *D. rerio***

No teste I não se verificaram efeitos adversos significativos do efluente têxtil em indivíduos de *D. rerio* em fase de desenvolvimento inicial, como mostra a tabela 11.

Não foram observadas deformações nas larvas de *D. rerio* expostas a todos os tratamentos.

Relativamente ao tempo de eclosão, verificou-se um ligeiro atraso, apesar de não ser significativo ( $p < 0,05$ ), nas larvas de *D. rerio* expostas aos tratamentos com maior concentração de efluente (71,4% e 100%).

**Tabela 11.** Síntese dos resultados obtidos no teste crónico preliminar (teste I), efectuado com embriões e larvas de *D. rerio*, após exposição a um gradiente de concentração de efluente têxtil. Os valores apresentados são acompanhados pelo respectivo desvio padrão.

Parâmetro	Controlo	26%	36,4%	51%	71,4%	100%
Sobrev. -168h (%)	95 ±5,8	95 ±5,8	100 ±0,0	97,5 ±5,0	97,5 ±5,0	95 ±5,8
Eclosão (%)	95 ±5,8	97,5 ±5,0	100 ±0,0	97,5 ±5,0	97,5 ±5,0	95 ±5,8
Tempo de eclosão (h)	87,6 ±18,9	90 ±17,1	79,8 ±17,7	86,4 ±17,1	92,4 ±15,9	93,6 ±18,9
Deform. -168h (%)	0	0	0	0	0	0

Uma explicação para estes resultados, poderá residir na data de recolha do efluente, que ocorreu em Agosto de 2003. Ora, neste mês a fábrica esteve praticamente parada devido a férias do pessoal e, por conseguinte, a produção teve certamente uma quebra acentuada, o que implicou um volume de efluente menor, com concentrações inferiores de corantes e outros produtos tóxicos típicos desta indústria. Além disso, estando o efluente mais tempo nos reservatórios, terá sido constituído um meio propício ao desenvolvimento de bactérias, que terão facilitado o processo de degradação biológica dos compostos químicos, habitualmente presentes neste tipo de efluente.

No teste II (tabela 12), salientam-se os efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) provocados pelo tratamento com 26% de efluente (v/v) no comprimento das larvas, nas deformações ocorridas após 168 horas de exposição e nos batimentos cardíacos às 96 horas de duração do teste, já que é uma concentração relativamente baixa de efluente.

O número de batimentos cardíacos de cada larva ou embrião revelou ser um parâmetro que reage precocemente (96 horas de exposição) à toxicidade do efluente têxtil. Billiard *et al.* (1999) reconheceram as manifestações da toxicidade cardiovascular, como sendo o primeiro alvo do peixe zebra e da truta arco-íris em relação à exposição a dioxinas.

**Tabela 12.** Síntese dos resultados obtidos no teste crónico II, efectuado com embriões e larvas de *D. rerio*, após exposição a um gradiente de concentração de efluente têxtil. Os valores apresentados são acompanhados pelo respectivo desvio padrão.

Parâmetro	Controlo	26%	36,4%	51%	71,4%	100%	CMA <sup>1</sup>
Sobrev. -168h (%)	82,5 ±5,0	90 ±14,1	75 ±12,9	5 ±5,8	0,0	0,0	36,4% - 51%
Sobrev. -144h (%)	85 ±5,8	90 ±14,1	77,5 ±15,0	5 ±5,8	0,0	0,0	36,4% - 51%
Sobrev. -120h (%)	85 ±5,8	90 ±14,1	77,5 ±15,0	47,5 ±44,3	0,0	0,0	51% - 71,4%
Sobrev. -96h (%)	85 ±5,8	90 ±14,1	77,5 ±15,0	85 ±12,9	22,5 ±26,3	0,0	51% - 71,4%
Sobrev. -72h (%)	85 ±5,8	90 ±14,1	77,5 ±15,0	85 ±12,9	67,5 ±22,2	10 ±11,5	71,4% - 100%
Eclosão (%)	85 ±5,8	87,5 ±12,6	35 ±23,8	2,5 ±5,0	0,0	0,0	26% - 36,4%
Tempo de eclosão (h)	105,6 ±24,2	115,8 ±33,2	157,2 ±21,6	166,8 ±2,4	168 ±0,0	168 ±0,0	36,4% - 51%
Deform. -168h (%)	17,5 ±5,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	0% - 26%
Deform. -144h (%)	15 ±5,8	60 ±46,9	35 ±26,5	95 ±5,8	100 ±0,0	100 ±0,0	36,4% - 51%
Deform. -120h (%)	15 ±5,8	10 ±14,1	27,5 ±20,6	55 ±42,0	100 ±0,0	100 ±0,0	51% - 71,4%
Deform. -96h (%)	15 ±5,8	10 ±14,1	22,5 ±15,0	15 ±12,9	77,5 ±26,3	100 ±0,0	51% - 71,4%
Comprimento (mm)	3,61 ±0,62	2,76 ±0,49	3,25 ±0,09	2,02 ±0,06	n.d.	n.d.	0% - 26%
Peso fresco (mg)	0,23 ±0,01	0,24 ±0,05	0,37 ±0,15	0,05 ±0,06	n.d.	n.d.	36,4% - 51%
Bat. card. -48h (/min)	79 ±1,8	73,5 ±2,1	68,5 ±4,2	54 ±5,0	48 ±1,8	66,5 ±1,7	26% - 36,4%
Bat. card. -96h (/min)	114,5 ±2,4	106 ±3,7	94,5 ±6,8	65 ±4,2	n.d.	n.d.	0% - 26%

Nota: Os valores assinalados a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> CMA – Concentração Máxima Admitida. n.d.: valor não determinado.

Para facilitar a discussão e a interpretação dos resultados calculou-se a Concentração Máxima Admitida (CMA), que é o intervalo hipotético entre a concentração testada mais baixa onde se observou efeito (CEO) e a concentração testada mais elevada onde não foi observado nenhum efeito (CENO) (Rand, 1995).

A menor concentração de efeito observável (CEO) a nível letal, no teste II, foi de 51% de efluente. Analisando os valores de CMA para a sobrevivência de embriões e larvas de *D. rerio*, verificamos que ao longo do tempo de exposição, a tolerância dos organismos foi diminuindo de um valor de concentração de efluente de 71,4% sem efeito observado às setenta e duas horas, para um valor de 36,4% no fim do teste.

Os atrasos na eclosão das larvas de *D. rerio* apenas foram afectados significativamente ( $p < 0,05$ ) por concentrações (51% de efluente) superiores aqueles que produziram efeitos na sua percentagem de eclosão (36,4% de efluente).

As larvas de *D. rerio* expostas ao efluente têxtil durante 168 horas, revelaram-se mais sensíveis ao nível das deformações ocorridas (efeito observado no tratamento com 26% de efluente) do que ao nível da sobrevivência (efeito observado no tratamento com 51% de efluente).

Os resultados obtidos no teste II confirmam a convicção de que os efeitos letais são o resultado de uma acção conjunta, provocada por efeitos sub-letais que progressivamente vão afectando o indivíduo, debilitando-o e privando-o de certas actividades vitais.

Analisando a tabela 13, referente aos resultados obtidos no teste III, verifica-se que a menor concentração de efeito observável (CEO) a nível letal, foi de 26% de efluente.

**Tabela 13.** Síntese dos resultados obtidos no teste crónico III, efectuado com embriões e larvas de *D. rerio*, após exposição a um gradiente de concentração de efluente têxtil. Os valores apresentados referem-se a percentagens, com o respectivo desvio padrão.

Parâmetro	Controlo	26%	36,4%	51%	71,4%	100%	CMA <sup>1</sup>
Sobrev. -168h (%)	85 ±5,8	35 ±5,8	37,5 ±22,2	32,5 ±17,1	0,0	0,0	0% - 26%
Sobrev. -72h (%)	85 ±5,8	65 ±10,0	57,5 ±5,0	47,5 ±9,6	7,5 ±5,0	2,5 ±5,0	0% - 26%
Eclosão (%)	85 ±5,8	37,5 ±9,6	35 ±19,1	35 ±12,9	5 ±5,8	0,0	0% - 26%
Tempo de eclosão (h)	103,8 ±26,1	150 ±23,9	152,4 ±23,9	151,8 ±22,6	165,6 ±4,8	168 ±0,0	51% - 71,4%
Deform. -168h (%)	15 ±5,8	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	0% - 26%
Deform. -144h (%)	15 ±5,8	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	0% - 26%
Deform. -120h (%)	15 ±5,8	100 ±0,0	97,5 ±5,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	0% - 26%
Deform. -96h (%)	15 ±5,8	47,5 ±17,1	42,5 ±5,0	55 ±12,9	95 ±5,8	100 ±0,0	0% - 26%
Comprimento (mm)	3,55 ±0,40	3,14 ±0,22	2,87 ±0,39	2,26 ±0,44	n.d.	n.d.	26% - 36,4%
Peso fresco (mg)	0,23 ±0,01	0,17 ±0,05	0,25 ±0,04	0,26 ±0,07	n.d.	n.d.	51%
Bat. card. -48h (/min)	78 ±5,2	35 ±3,3	29 ±2,6	36 ±2,2	n.d.	n.d.	0% - 26%
Bat. card. -96h (/min)	113,5 ±3,1	78 ±8,2	74 ±1,8	63 ±9,6	68,5 ±2,1	n.d.	0% - 26%

Nota: Os valores assinalados a vermelho indicam diferença significativa para com o controlo ( $p < 0,05$ ).

<sup>1</sup> CMA – Concentração Máxima Admitida. n.d.: valor não determinado.

Os efeitos provocados em embriões e larvas de *D. rerio* pela exposição ao efluente têxtil neste teste revelaram-se prematuramente. Por exemplo, setenta e duas horas após o início do teste a concentração de efluente que provocava nos organismos

um efeito letal observado era já a de 26% de efluente (v/v). O mesmo se pode dizer em relação aos batimentos cardíacos das larvas de *D. rerio*, para os efeitos observados quarenta e oito horas após o início do teste.

No teste III verificaram-se efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) no tratamento com 26% de efluente, em grande parte dos parâmetros analisados. Como excepção surgiram o tempo de eclosão (efeito observado no tratamento com 71,4% de efluente), o comprimento (efeito observado no tratamento com 36,4%) e o peso (sem diferenças significativas em nenhum dos tratamentos em relação ao controlo) das larvas de *D. rerio*.

Nesta tabela vê-se um aumento do tempo de eclosão das larvas expostas aos tratamentos, comparativamente às expostas ao controlo. É claro que esse aumento apenas é significativo nos tratamentos com 71,4% e 100% de efluente (v/v).

Talvez devido à protecção do embrião pelo córion, que funciona como uma barreira de protecção semi-permeável, o tempo de eclosão pode não ser tão afectado pelas agressões exteriores. Ishibashi *et al.* (2004) justificam as diferenças encontradas nos mecanismos tóxicos entre embriões e larvas precisamente pela existência dessa protecção.

É possível que tivessem ocorrido efeitos induzidos por concentrações de efluente inferiores àquelas seleccionadas para o teste, ou seja, abaixo dos 26%. No entanto, devido à variabilidade da composição dos efluentes têxteis, tomámos a opção de escolher uma sequência com uma gama de concentrações abrangente. Como não tínhamos detectado impacto significativo quer em indivíduos adultos, quer em embriões e larvas no teste preliminar (teste I), a nossa escolha recaiu em concentrações mais elevadas. Esta mesma justificação serve para a utilização deste gradiente de concentrações no teste II.

Na tabela 14 são apresentados os valores de Concentração Letal, Concentração Inibitória e Concentração Máxima Admitida para a sobrevivência, eclosão e deformações ocorridas nas larvas de *D. rerio*, nos testes crónicos II e III.

Encontraram-se valores de  $CL_{50}$  para o teste II de 82,14% às 72 horas de exposição e de 41,90% às 168 horas de exposição. Este valor obtido no fim do teste

encontra-se dentro dos limites de concentração máxima admitida, que é o intervalo de 36,4% a 51% de efluente.

Neste teste, para as deformações ocorridas nas larvas após 96 horas de exposição, o valor de  $CI_{50}$  calculado foi de 62,71% de efluente.

Verifica-se também que os valores que induzem um efeito inibitório (eclosão ou deformações ocorridas) em 50% da população de *Danio rerio* do teste II, são iguais ou inferiores aos valores letais.

**Tabela 14.** Valores de  $CL_{50}$  ou  $CI_{50}$ ,  $CL_1$  ou  $CI_1$  e CMA para a sobrevivência, eclosão e deformações ocorridas nas larvas de *D. rerio*, nos testes crônicos II e III.

Teste	Parâmetro	Horas	Interval. de conf.		Interval. de conf.		CMA <sup>1</sup>
			$CL_{50}$ ou $CI_{50}$	(95%)	$CL_1$ ou $CI_1$	(95%)	
II	Sobrevivência	168	41,90%	38,38 - 44,76	31,327%	24,70 - 35,09	36,4% - 51%
		144	42,12%	38,61 - 44,95	31,776%	25,21 - 35,51	36,4% - 51%
		120	49,78%	46,74 - 53,01	n.d.	n.d.	51% - 71,4%
		96	62,71%	59,02 - 66,63	n.d.	n.d.	51% - 71,4%
		72	82,14%	74,75 - 88,21	55,80%	40,141 - 64,385	71,4% - 100%
	Eclosão		35,34%	31,19 - 38,04	0,234%	14,69 - 27,83	26% - 36,4%
	Deformações	144	39,08%	36,30 - 42,07	n.d.	n.d.	36,4% - 51%
	96	62,71%	59,02 - 66,63	n.d.	n.d.	51% - 71,4%	
III	Sobrevivência	168	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0% - 26%
		144	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0% - 26%
		120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		96	55,25%	47,21 - 60,59	36,20%	20,95 - 43,76	n.d.
		72	47,60%	38,275 - 54,85	18,05%	8,72 - 25,54	n.d.
		48	49,11%	39,10 - 59,07	8,11%	2,56 - 14,00	n.d.
		24	85,87%	61,855 - 187,91	3,26%	0,04 - 9,92	n.d.
	Eclosão		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0% - 26%
Deformações	144	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0% - 26%	
	96	55,25%	47,21 - 60,59	36,20%	20,95 - 43,76	0% - 26%	

<sup>1</sup> CMA – Concentração Máxima Admitida. n.d.: valor não determinado.

No teste III, verificou-se um valor de  $CL_{50}$  às 24 horas de exposição de 85,87% e às 96 horas de exposição este valor era já de 55,25%.

Para as deformações ocorridas nas larvas após 96 horas de exposição, o valor de  $CI_{50}$  calculado foi de 55,25% de efluente.

Detecta-se uma toxicidade superior no teste III comparativamente ao teste II, como se comprova pelos valores de CL<sub>50</sub> setenta e duas horas após o início do teste: 47,60% e 82,14% de efluente, respectivamente.

Os resultados obtidos nos testes crónicos efectuados com embriões e larvas de *D. rerio* indicam uma toxicidade do efluente têxtil e vão de encontro aos resultados apresentados por Laughton *et al.* (1994), que efectuando testes de toxicidade utilizando *Salmo gairdneri* e *Daphnia magna*, demonstraram que o efluente têxtil permaneceu tóxico mesmo após tratamento.

Estes resultados sugerem também uma grande variabilidade na toxicidade do efluente têxtil, visto ter ocorrido no primeiro teste um impacto praticamente nulo, no segundo teste um impacto relativamente mais acentuado no período final (efeitos crónicos) e no terceiro teste um impacto bastante elevado. Comprovando esta variabilidade neste tipo de efluentes, Gómez *et al.* (2001), apresentaram resultados de testes de toxicidade com três amostras de efluentes têxteis utilizando como espécies teste *Daphnia magna*, *Spirillum volutans*, *Scenedesmus spinosus*. Os efluentes foram classificados de acordo com a sua toxicidade através de unidades de toxicidade aguda estabelecidas pelo CETESB (1987) citado por Gómez *et al.* (2001), obtendo um efluente não tóxico, um outro efluente moderadamente tóxico e um terceiro efluente tóxico.

Rosa *et al.* (2001), ao efectuarem um estudo comparativo de bioensaios com várias espécies representativas de diferentes grupos taxonómicos (e.g. bactérias, algas e peixes), referem também a enorme variabilidade na composição dos efluentes têxteis como explicação, em parte, da variabilidade encontrada nos seus resultados.

#### **3.4.8. Relação dos parâmetros físico-químicos do efluente com os efeitos detectados em embriões e larvas de *D. rerio***

Rand (1995) afirma que os efeitos de um químico podem ser de menor significado se o organismo aquático for capaz de continuar normalmente as suas funções e se um efeito induzido quimicamente for apenas detectado sob condições de stress adicional (e.g., alterações de pH, baixo teor em oxigénio dissolvido e temperatura elevada).

Verificou-se que os parâmetros físico-químicos do efluente têxtil em estudo estavam de acordo com as recomendações da legislação nacional. Contudo, observaram-se alguns efeitos adversos em embriões e larvas de *D. rerio*, provocados pela exposição a esse mesmo efluente. No que se refere aos testes com adultos de *D. rerio*, reconheceu-se que não houve implicações significativas na sobrevivência dos organismos, mas detectaram-se alterações no seu comportamento (locomoção e ventilação).

Na verdade, convém salientar a este propósito que a verificação físico-química da conformidade de um efluente face aos limites legalmente estabelecidos, não garante a ausência de efeitos tóxicos ao nível dos organismos.

Como os valores físico-químicos convencionais (pH, oxigénio dissolvido e temperatura) analisados nos testes II e III de embriões e larvas parecem estar dentro dos limites suportados pela espécie teste (*D. rerio*), não se pode estabelecer nenhuma relação próxima entre esses parâmetros e os efeitos tóxicos letais e sub-letais observados nos testes crónicos efectuados com embriões e larvas. Deste modo, a toxicidade evidenciada nesses testes deverá ser atribuída aos produtos tóxicos que ainda persistem nos efluentes têxteis tratados.

Para além dos corantes já citados anteriormente, Farré *et al.* (2001) referem que, em alguns casos os tratamentos efectuados aos efluentes têxteis não são suficientes, deixando ainda alguma toxicidade no efluente devido a compostos como fenóis, que não são removidos pelo tratamento. Este ponto tem especial interesse, afirmam ainda os mesmos autores, porque alguns destes compostos estão relacionados com efeitos de disrupções endócrinas em diferentes espécies de peixes.

As características toxicológicas dos efluentes têxteis são referidas com algumas variações, de autor para autor. Walsh *et al.* (1980) justificam o impacto dos efluentes têxteis, devido à acção combinada de elevados valores de carência bioquímica de oxigénio (CBO<sub>5</sub>), sólidos em suspensão, substâncias dissolvidas, pH, cor e toxicidade.

Por exemplo, Faria (2002) afirma que as águas residuais têxteis, normalmente não possuem elevados teores de carência bioquímica de oxigénio (CBO<sub>5</sub>). Refere ainda que são extremamente diversificadas, com uma gama de pH muito larga e com uma variabilidade de cor enorme, e o facto de possuírem outros compostos químicos dissolvidos, que são usados nos processos têxteis, contribui para valores significativos de CQO.

#### 4. Considerações Finais

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o efluente têxtil, embora não tendo demonstrado efeitos letais significativos em indivíduos adultos da espécie *Danio rerio*, provocou algumas alterações comportamentais, nomeadamente a nível da locomoção e ventilação, durante todo o teste. Contudo, não se verificou uma relação directa entre os efeitos registados e o gradiente de concentração do efluente.

Apesar da variabilidade dos resultados obtidos nos testes, foi possível detectar efeitos na locomoção e ventilação de adultos de *D. rerio* expostos a tratamentos com concentrações iguais ou superiores a 26% de efluente.

Verificaram-se aumentos e decréscimos nos valores comportamentais de locomoção e ventilação dos organismos expostos aos tratamentos com efluente, comparativamente aos expostos ao tratamento controlo. No entanto, não se identificou um comportamento padrão como resposta aos efeitos induzidos pelo efluente.

Ao longo das três semanas de teste, constataram-se maiores diferenças significativas na locomoção de adultos de *D. rerio* expostos aos tratamentos com efluente, comparativamente às verificadas na ventilação desses mesmos indivíduos.

Os efeitos na ventilação foram mais significativos na primeira semana do teste. Estes resultados poderão sugerir uma ligeira adaptação, no que respeita à ventilação, dos indivíduos adultos de *D. rerio* expostos aos tratamentos com efluente têxtil ao longo das três semanas.

A exposição ao efluente têxtil revelou-se mais tóxica em fases de desenvolvimento embrionário de *D. rerio* do que em indivíduos adultos. Os nossos resultados estão de acordo com os referidos por Lange *et al.* (1995), uma vez que estes autores também constataram que o teste com embriões do peixe zebra era mais sensível, na maioria dos casos, do que o teste agudo com indivíduos adultos.

Nos testes com embriões e larvas de *D. rerio*, constatou-se alguma variabilidade dos efeitos entre os testes realizados, pois o teste I não apresentou efeitos significativos, quer a nível letal, quer a nível sub-letal. Já os testes II e III revelaram alguns resultados indicativos da toxicidade do efluente, nomeadamente, uma diminuição na sobrevivência

e na eclosão das larvas de *D. rerio*, ou a ocorrência de deformações larvares, sendo que no teste III os efeitos observados foram mais acentuados e, por conseguinte, o efluente seria mais tóxico neste teste do que no teste II.

Isto deverá ter acontecido devido à época do ano em que foram efectuadas as recolhas dos efluentes, o que terá influenciado a composição e o potencial tóxico dos efluentes testados.

O teste I realizou-se durante o mês de Agosto de 2003, numa altura em que a fábrica estava praticamente parada o que, por consequência, implica um efluente com menor carga de corantes e outras substâncias típicas da produção têxtil. Além do mais, o tempo de retenção do efluente seria provavelmente maior, favorecendo a degradação microbiológica dos compostos químicos.

Os testes II e III realizaram-se em Novembro e em Dezembro de 2003, respectivamente, com a fábrica já em pleno funcionamento. As diferenças na toxicidade entre eles poderão ser explicadas pelo tipo de produção que a fábrica estaria a efectuar na altura, que induz uma variação no tipo de corantes descarregados. Mas também poderá ter sido devido a uma diluição do efluente pelas águas das chuvas, já que os reservatórios durante o processo de tratamento estão a céu aberto.

Nos testes com embriões e larvas, a menor concentração de efeito observável (CEO) a nível letal foi, respectivamente, 51% e 26% de efluente no teste II e III.

Obtiveram-se valores de  $CL_{50}$  para o teste II de 82,14% às 72 horas de exposição e de 41,90% às 168 horas de exposição. Para o teste III, verificaram-se logo a 24 horas após o início do teste, valores de  $CL_{50}$  de 85,87% e às 96 horas de exposição este valor era já de 55,25%.

Quanto aos efeitos sub-letais, a CEO correspondeu a 26% de efluente, no teste II para o comprimento das larvas, deformações ocorridas após 168 horas de exposição e batimentos cardíacos às 96 horas de duração do teste, e no teste III para a eclosão das larvas, deformações ocorridas após 96 horas de exposição e batimentos cardíacos às 48 horas de duração do teste.

Para as deformações ocorridas nas larvas após 96 horas de exposição, os valores de  $CI_{50}$  calculados foram de 62,71% e 55,25% de efluente para o teste II e teste III, respectivamente.

Os resultados obtidos no teste II confirmam a convicção de que os efeitos letais são o resultado de uma acção conjunta, provocada por efeitos sub-letais que progressivamente vão afectando o indivíduo, debilitando-o e privando-o de certas actividades vitais.

É provável que, os valores referidos anteriormente indicando a toxicidade do efluente e os seus efeitos potenciais em duas fases de vida de *D. rerio*, não correspondam ao verdadeiro impacto do efluente quando descarregado no meio hídrico receptor. Por um lado, devido às características físico-químicas particulares de cada meio que variam consoante a época do ano, e por outro lado, devido à capacidade de adaptação das populações naturais de organismos.

No entanto, neste estudo verificaram-se efeitos sub-letais nos organismos teste expostos a concentrações de 26% de efluente, o que significa já uma diluição considerável do mesmo, alertando assim para eventuais situações agressivas ao ecossistema.

Examinando as análises físico-químicas efectuadas no presente trabalho, em conjunto com as fornecidas pela indústria têxtil em questão, reconheceu-se que os parâmetros analíticos estavam de acordo com as normas de descarga das águas residuais para o sector têxtil, exigidas pela Portaria n.º 423/97 de 25 de Junho (Ministério do Ambiente, 1997).

Gómez *et al.* (2001) também demonstraram que 25% de amostras de efluentes industriais (provenientes de indústrias têxteis e de papel), exibindo parâmetros físico-químicos dentro das orientações estabelecidas na Argentina, foram consideradas moderada a altamente tóxicas em testes agudos de 48 horas com *Daphnia magna*, *Spirillum volutans* e *Scenedesmus spinosus* quando classificadas com base em Unidades de Toxicidade.

Os nossos resultados permitem verificar que, efluentes com parâmetros físico-químicos dentro dos limites estabelecidos pela legislação actual, são promotores de alguns impactos, especificamente em fases mais sensíveis do ciclo de vida dos organismos testados. E o que, aos olhos da população em geral e dos menos avisados, poderia parecer inofensivo para o meio ambiente, pode revelar-se prejudicial.

Apesar de não serem detectados efeitos letais nos animais expostos, podem contudo manifestar-se na descendência, que pode ser afectada durante várias gerações, levando em casos extremos à extinção da espécie. Isto mesmo poderia acontecer caso os resultados laboratoriais obtidos com *D. rerio*, ocorressem no meio receptor natural em relação a uma espécie autóctone.

Sem uma avaliação biológica, as autoridades reguladoras poderão concluir errada e precipitadamente que estações de tratamento existentes estarão adequadas para tratar e controlar descargas de efluentes tóxicos. Esta conclusão conduz certamente a uma poluição significativa dos cursos de água receptores.

Os resultados obtidos com *D. rerio*, apenas permitem estimar eventuais implicações toxicológicas associadas às descargas de efluentes têxteis em ambientes aquáticos. A toxicidade assinalada pelos testes com embriões e larvas, embora exibindo vários graus (desde um nível não detectável até níveis elevados), sugere um risco ecológico potencial e ressalta a necessidade de tratamentos adequados, de modo a evitar a poluição dos meios hídricos receptores.

Geralmente em laboratório não se tem em consideração a capacidade de adaptação das populações naturais de organismos. Portanto, os efeitos observados em laboratório poderão parecer mais nocivos do que de facto serão no ambiente natural, mas servem como um alerta, ou seja, são uma chamada de atenção para a insuficiência da verificação da conformidade das descargas tomando como base apenas as suas características físico-químicas.

Convém então salientar a este propósito que a verificação físico-química da conformidade de um efluente face aos limites legalmente estabelecidos, não garante a ausência de efeitos tóxicos ao nível dos organismos. Seria útil, por isso, inserir uma avaliação da qualidade biológica na análise dos parâmetros de descarga das águas residuais.

Para além do acto de fiscalização, exige-se das autoridades competentes o fornecimento dos meios e dos apoios às indústrias do sector, imprescindíveis ao desenvolvimento de novas tecnologias de defesa ambiental. Pelo contacto que efectuámos no terreno, verificámos que são fundamentais estímulos (essencialmente económicos), no sentido de consciencializar as empresas para os impactos ambientais. É óbvio que, se as indústrias não obtiverem contrapartidas pelo investimento feito no

tratamento de efluentes (ou outro tipo de acção ecológica), dificilmente será possível conseguir resultados efectivos e satisfatórios, porque haverá sempre tendência para evitar ou contornar situações de prejuízo para a empresa.

Também é verdade que temos que apelar à consciência de cada um e há que saber educar para o Ambiente, mas quando falamos de empresas que têm um orçamento anual para gerir e que delas dependem muitas famílias, não podemos exigir grandes esforços financeiros para além de determinados limites aceitáveis.

Num futuro próximo, por exemplo, pretende-se que todas as indústrias da região do Vale do Ave estejam ligadas a um colector geral intermunicipal, que irá conduzir os efluentes industriais para uma estação de tratamento única. A ideia subjacente a este projecto parece ser bastante benéfica, em virtude de permitir um melhor controlo do tratamento de efluentes industriais e uma gestão mais cuidada das descargas. No entanto, cada indústria terá que pagar uma taxa por volume de efluente descarregado, o que tornará mais dispendiosa a descarga dos seus efluentes para esse colector geral do que se ela própria procedesse ao tratamento privado dos seus efluentes.

Seria talvez proveitoso realizar o tratamento dos efluentes têxteis fase por fase, dando especial atenção aos diferentes produtos de cada etapa de produção, designadamente tintas, corantes e detergentes, entre outros, em vez de se tratar uma mistura complexa de produtos tóxicos desconhecidos. Mas se já é bastante complicado realizar o tratamento do efluente total, prevemos ainda muito mais dificuldades para este tipo de alternativa.

Sabe-se que a ozonização tem sido altamente efectiva na remoção da cor dos efluentes têxteis, com a completa clarificação das águas residuais (Rosa *et al.*, 2001). E segundo estes autores a toxicidade pode ser altamente reduzida se este método for conjugado com outros, como por exemplo a coagulação inorgânica e os processos de lamas activadas. Outros métodos são também aconselhados na bibliografia, como por exemplo o tratamento anaeróbio (Stern, *et al.*, 2003) ou a oxidação fotoquímica (Faria, 2002).

Os custos são compensados por um melhoramento considerável na qualidade dos efluentes tratados (Lin *et al.*, 1994). A questão é saber se devemos aumentar os custos inerentes ao tratamento ou “deixar os custos para o Ambiente”.

A área das novas tecnologias implica grandes investimentos financeiros e aqui poderá entrar o apoio da investigação científica, através de parcerias entre os meios científico e empresarial. No mundo actual, impõe-se um trabalho lado a lado entre estes dois ramos da sociedade, onde a investigação científica poderá canalizar os seus estudos para a solução de problemas que a comunidade industrial enfrenta. Quanto às empresas, poderão facultar os acessos e as instalações necessárias ao trabalho científico sem receio de virem a ser penalizadas.

O trabalho aqui realizado veio ao encontro desta necessidade, em que, com o intuito de obter uma informação complementar às análises químicas já efectuadas regularmente pela indústria têxtil em questão, foram-nos concedidas pela mesma várias facilidades. Referem-se, nomeadamente, o acesso às suas instalações, a recolha de amostras de efluente em diferentes etapas do tratamento na quantidade e data desejadas e o acesso às suas análises regulares dos parâmetros físico-químicos.

## 5. Referências Bibliográficas

- ABEL, P. D., 1998. *Water Pollution Biology*. Second Edition. Taylor & Francis, London.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS, 1998. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. *Annual Book of ASTM Standards. Water and Environmental Technology*. Section 11. E 729-96 : 218-238.
- APHA, 1992. *Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewater*. 18th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. Washington DC. USA.
- BENOIT, D. A., PUGLISI, F. A. & OLSON, D. L., 1982. A fathead minnow, *Pimephales promelas*, early life stage toxicity test method evaluation and exposure to four organic chemicals. *Environmental Pollution (Series A)*. **28**: 189-197.
- BILLIARD, S. M., QUERBACH, K. & HODSON, P. V., 1999. Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **18**(9): 2070-2077.
- BISTHOVEN, L. J., 1999. Biomonitoring with Morphological Deformities in Aquatic Organisms. *Environmental Science Fórum*. **96**: 65-94.
- CHEN, C. M., SHIH, M. L., LEE, S. Z. & WANG, J. S., 2001. Increase toxicity effluents by a chlorination process using sodium hypochlorite. *Water Science and Technology*. **43**. (2): 1-8.
- CLEVELAND, L., FAIRCHILD J.F. & LITTLE E. E., 1999. Biomonitoring and Ecotoxicology: Fish as Indicators of Pollution-Induced Stress in aquatic systems. *Environmental Science Forum*. **96**: 195-232.
- CRAIG, S. & LAMING, P., 2004. Behaviour of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (Gasterosteidae, Teleostei) in the multispecies freshwater biomonitor: a validation of automated recordings at three levels of ammonia pollution. *Water Research*. **38**: 2144-2154.
- ELONEN, G. E., SPEHAR, R. L., HOLCOMBE, G. W., JOHNSON, R. D., FERNANDEZ, J. D., ERICKSON, R. J., TIETGE, J. E. & COOK, P. M., 1998. Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to seven

- freshwater fish species during early life-stage development. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **17**. (3): 472-483.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U. S., 1996a. Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine. *Ecological effects Test Guidelines*. EPA 712-C-96-118.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U. S., 1996b. Fish Early-Life Stage Toxicity Test. *Ecological effects Test Guidelines*. EPA 712-C-96-121.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U. S., 2002. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. Fourth Edition. EPA 821-R-02-013.
- FARIA, J. L., 2002. Oxidação por via húmida catalítica e fotocatalítica no tratamento químico de águas residuais. *Ecotoxicologia e Remoção de Poluentes – Estudos na Península Ibérica*. Instituto Piaget: 195-203.
- FARRÉ, M. A., GARCÍA, M. A., TIRAPU, L. B., GINEBREDÀ, A. B. & BARCELÓ D. A., 2001. Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by Toxalert® and Microtox® bioluminescence inhibition assays. *Analytica Chimica Acta*. **427**: 181–189.
- FENT, K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*. **140-141**: 353-365.
- FIGUEIREDO, M. G., SANTOS, M. S. & FERRARI, L. R., 2000. Estação de tratamento de efluentes das indústrias têxteis – otimização através da implantação de medidas de prevenção à poluição. *XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*. ABES, Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental: 1-3.
- GALASSI, S. & BENFENATI, E., 2000. Fractionation and toxicity evaluation of waste waters. *Journal of Chromatography*. **889**: 149–154.
- GERHARDT, A., 1995. Monitoring Behavioral Responses to Metals in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea) with Impedance Conversion. *Environmental Science & Pollution Research*. **2**. (1): 15-23.
- GERHARDT, A., 1996. Behavioural Early Warning Responses to Polluted Water: Performance of *Gammarus pulex* L. (Crustacea) and *Hydropsyche angustipennis* (Curtis) (Insecta) to a Complex Industrial Effluent. *Environmental Science & Pollution Research*. **3**. (2): 63-70.

- GERHARDT, A., 1998. Whole Effluent Toxicity Testing with *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792): Survival and Behavioral Responses to a Dilution Series of a Mining Effluent in South Africa. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **35**: 309-316.
- GERHARDT, A., 1999a. Biomonitoring for the 21st Century. In: Gerhardt, A. (Ed.), *Biomonitoring of Polluted Water. Reviews on Actual Topics*. Trans. Tech. Publications Ltd. Zurich. Switzerland: 1-13.
- GERHARDT, A., 1999b. Recent trends in online biomonitoring for water quality control. In: Gerhardt, A. (Ed.), *Biomonitoring of Polluted Water. Reviews on Actual Topics*. Trans. Tech. Publications Ltd. Zurich. Switzerland: 95-119.
- GERHARDT, A., CARLSSON, A., RESSEMANN, C. & STICH, K. P., 1998. New Online Biomonitoring System for *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea): *In Situ* Test Below a Copper Effluent in South Sweden. *Environmental Science & Technology*. **32**. (1): 150-156.
- GERHARDT, A., JANSSENS DE BISTHOVEN, L. & SOARES, A.M.V.M, 2004. Macroinvertebrate response to acid mine drainage: community metrics and online behavioural toxicity bioassay. *Environmental Pollution*. Artigo em publicação.
- GERHARDT, A., JANSSENS DE BISTHOVEN, L., MO, Z., WANG, C., YANG, M. & WANG, Z., 2002. Short-term responses of *Oryzias latipes* (Pisces: Adrianichthyidae) and *Macrobrachium nipponense* (Crustacea: Palaemonidae) to municipal and pharmaceutical waste water in Beijing, China: survival, behaviour, biochemical biomarkers. *Chemosphere*. **47**: 35-47.
- GERHARDT, A., SVENSSON, E., CLOSTERMANN, M. & FRIDLUND, B., 1994. Monitoring of behavioral patterns of aquatic organisms with an impedance conversion technique. *Environment International*. **20**. (2): 209-219.
- GÓMEZ, C. E., CONTENTO, L. & CARSEN, A. E., 2001. Toxicity Tests to Assess Pollutants Removal During Wastewater Treatment and the Quality of Receiving Waters in Argentina. *Environmental Toxicology*. **16**: 217-224.
- HELLAWELL, J. M., 1986. Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management. *Polution monitoring series*. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.

- HENRY, T. R., SPITSBERGEN, J. M., HORNUNG, M. W., ABNET, C. C. & PETERSON, R. E., 1997. Early Life Stage Toxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and applied pharmacology*. **142**: 56-68.
- ISHIBASHI, H., MATSUMURA, N., HIRANO, M., MATSUOKA, M., SHIRATSUCHI, H., ISHIBASHI, Y., TAKAO, Y. & ARIZONO, K., 2004. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic Toxicology*. **67**: 167-179.
- KEIL, C., FORCHERT, A., FASTNER, J., SZEWZYK, U., ROTARD, W., CHORUS, I. & KRATKE, R., 2002. Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains. *Water Research*. **36**: 2133-2139.
- KIMMEL, C., BALLARD, W., KIMMEL, S., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Development Dynamics*. **203**: 253-310.
- KRAMER, J. M. K. & BOTTERWEG, J., 1991. Aquatic Biological Early Warning Systems: An Overview. *Bioindicators and Environmental Management*: 95-126.
- LANGE, M., GEBAUER, W., MARKL, J. & NAGEL, R., 1995. Comparison of Testing Acute Toxicity on Embryo of Zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 Cytotoxicity as Possible Alternatives to the Acute Fish Test. *Chemosphere*. **30**. (11): 2087-2102.
- LAUGHTON, R. V., MORAN, T., & ROY, G. (1994). Case studies for toxicity testing and risk assessment related to the placement of textile facilities. *21st Annual Aquatic Toxicity Workshop*: 2-5.
- LELE, Z. & KRONE, P. H., 1996. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances*. **14**. (1), 57-72.
- LIN, S. H. & LIU, W. Y., 1994. Continuous treatment of textile water by ozonation and coagulation. *Journal of Environment Engineering*. **120**. (2): 437-446.
- MINISTÉRIO DO AMBIENTE, 1997. Portaria n.º 423/97 de 25 de Junho, que estabelece as normas de descarga de águas residuais especificamente aplicáveis às unidades industriais do sector têxtil, excluindo o subsector dos

- lanifícios, com vista à limitação da poluição dos recursos hídricos. Diário da República. I Série-B. N.º 144, 3111-3112.
- NAGEL, R., 2002. *DarT*: The EmbryoTest with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. *ALTEX* **19**. Suppl. 1: 38-48.
- PASCOE, D., GOWER, D. E., MCCAHERN, C. P., POULTON, M. J. WHILES, A. J. & WULFHORST, J., 1991. Behavioural Responses to Pollutants – Application in Freshwater Bioassays. *Bioindicators and Environmental Management*: 245-254.
- RAJAN, M. R. & BALASUBRAMANIAN, M. P., 1988. Effects of sublethal concentrations of textile industry effluent on the food utilization and growth of the fish *Cyprinus carpio*. *Environmental Ecology*. **6**: 977-984.
- RAND, G. M., 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment, Second Edition. Taylor & Francis, London.
- ROMBOUGH, P. J. (1996). The effects of temperature on embryonic and larval development. *Society of Experimental Biology Seminar. Series* **61**: 177-223
- ROSA, E. V. C., SIERRA, M. M. S. & RADETSKI, C. M., 1999. Use of Plant Tests in the Evaluation of Textile Effluent Toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*. **2** (2): 56-61.
- ROSA, E. V. C., SIMIONATTO, E. L., SIERRA, M. M. S., BERTOLI, S. L. & RADETSKI, C. M., 2001. Toxicity-based criteria for the evaluation of textile wastewater treatment efficiency. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **20** (4): 839-845.
- SAMSON, J. C., GOODRIDGE, R., OLOBATUYI, F. & WEIS, J. S., 2001. Delayed effects of embryonic exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to methylmercury (MeHg). *Aquatic Toxicology*. **51**: 369-376.
- SCHNEIDERS, A., VERHAERT, E., BLUST, G. D., WILS, C., BERVOETS, L. & VERHEYEN, R.F., 1993. Towards an ecological assesement of watercourses. *Journal of Aquatic Ecosystem Healt*. In: Munawar, M. (Ed.), Ecosystem Approach to Water Management. Kluwer Academic Publishers. **2**: 29-38
- SMOLDERS, R., BOECK, G. D. & BLUST, R., 2003. Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluente toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology Chemistry*. **22**. (4): 890-899.

- SNEDDON, L. U., 2003. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Applied Animal Behaviour Science*. 83: 153–162.
- SPONZA, D. T., 2002. Necessity of Toxicity Assessment in Turkish Industrial Discharges (Examples from Metal and Textile Industry Effluents). *Environmental Monitoring Assessment* 73: 41-66.
- STATSOFT, INC., 2003. STATISTICA (data analysis software system). version 6. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- STERN, S. R., SZPYRKOWICZ, L. & RODIGHIERO, I., 2003. Anaerobic treatment of textile dyeing wastewater. *Water Science Technology*. 47. (10): 55-59.
- VILLEGAS-NAVARRO, A., RAMÍREZ-M., Y., SALVADOR-S., B. M. S. & GALLARDO, J. M., 2001. Determination of Wastewater LC<sub>50</sub> of the Different Process Stages of the Textile Industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 48: 56-61.
- WALSH, G. E., BAHNER, L. H. & HORNING, W.B., 1980. Toxicity of textile mill effluents to freshwater and estuarine algae, crustaceans and fish. *Environmental Pollution*. 21: 169-179.
- WARD, G. S. & PARRISH, P. R., 1980. Evaluation of early life stages toxicity tests with embryos and juveniles of sheepshead minnows. In: Eaton, J.G., P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (Ed.). *Aquatic Toxicology*, ASTM STP 707, *American Society for Testing and Materials*: 143-247.
- WARD, G. S. & PARRISH, P. R., 1982. Manual of methods in aquatic environment research. Toxicity tests. *Technical Paper 185*. FAO Fish. Part. 6.
- WESTERFIELD, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th edition, University of Oregon Press, Eugene.
- ZAR, J. H., 1996. *Biostatistical Analysis*. 3<sup>rd</sup> edition. Prentice-Hall International, New Jersey.

## 6. Anexos

Síntese da análise estatística  
Testes com adultos de *D. rerio*

não paramétrico

paramétrico

teste	parâmetro	horas	transformação	normalidade (p=0,01) homogeneidade			Anova (p<0,05)
				shapiro stat	Brown-Forsythe	levene	
agud I	sobrevivência		none	normais	homog	homog	não signif

agud II	sobrevivência		none	não normais	homog	não homog	não signif
			arc	não normais			
			raiz	não normais			

cron I	sobrevivência		none	não normais	homog	homog	não signif	
			arc	não normais				
			raiz	não normais				
	locomoção	todas		none	não normais	não homog	não homog	signif
				raiz	não normais			
				log10	não normais			
		semana1 semana2 semana3		none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
	ventilação	todas		none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif

cron II	sobrevivência		none	não normais	homog	homog	não signif	
			arc	não normais				
			raiz	não normais				
	A - locomoção	todas		none	não normais	homog	homog	signif
				none	não normais	homog	homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
		semana1 semana2 semana3		none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
	B - locomoção	todas		none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
		semana1 semana2 semana3		none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
	A - ventilação	todas		none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
		semana1 semana2 semana3		none	não normais	homog	não homog	signif
				none	não normais	homog	não homog	signif
				none	não normais	homog	não homog	signif
	B - ventilação	todas		none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
				none	não normais	não homog	não homog	signif
semana1 semana2 semana3			none	não normais	não homog	não homog	signif	
			none	não normais	não homog	não homog	signif	
			none	não normais	homog	homog	não signif	

Síntese da análise estatística  
 Testes com adultos de *D. rerio* (cont.)

não paramétrico

paramétrico

teste	parâmetro	horas	transformação	Diferença significativa do controle (p<0,05) Mann-Whitney U (p<0,05)
<b>agud I</b>	sobrevivência		none	

<b>agud II</b>	sobrevivência		none arc raiz	nenhum
----------------	---------------	--	---------------------	--------

<b>cron I</b>	sobrevivência		none	nenhum nenhum	
			arc raiz		
	locomoção	todas	none	todos excepto 71,4%	
			raiz		
			log10		
	semana1 semana2 semana3		none	todos excepto 71,4% todos excepto 51% 71,4%	
			none		
			none		
	ventilação	todas		todos apenas 51% 100%	
			semana1 semana2 semana3		none
					none
					none

<b>cron II</b>	sobrevivência		none	nenhum nenhum
			arc raiz	
A - locomoção	todas	semana1 semana2 semana3	none	todos excepto 71,4% 36,4% apenas 51% todos excepto 51%
			none	
			none	
			none	
B - locomoção	todas	semana1 semana2 semana3	none	todos todos excepto 51% todos excepto 51% todos excepto 71,4%
			none	
			none	
			none	
A - ventilação	todas	semana1 semana2 semana3	none	36,4% 71,4% nenhum apenas 36,4% e 51%
			none	
			none	
			none	
B - ventilação	todas	semana1 semana2 semana3	none	apenas 26% e 36,4% todos apenas 26% e 36,4% apenas 26% e 71,4%
			none	
			none	
			none	

Síntese da análise estatística  
Testes com larvas e embriões de *D. rerio*

não paramétrico paramétrico  
Transformações: raiz, arcoseno

				normalidade (p=0,01) homogeneidade			
parâmetro	horas	concentr	transformação	shapiro stat	bartlett	Brown-Forsythe	levene
<b>Teste I</b>							
sobrevivência		0-100%	brutos transform.	não normais não normais		homog	não homog
eclosão		0-100%	brutos transform.	não normais não normais		homog	não homog
Tempo eclosão		0-100%	brutos	normais		homog	homog
<b>Teste II</b>							
sobrevivência	168	0-51%	brutos	não normais	homog	homog	homog
	168	0-51%	arcoseno	não normais	homog		homog
	168	0-51%	raiz	não normais	homog	não homog	não homog
	72	0-100%	brutos	não normais	homog	homog	homog
	72	0-100%	arcoseno	não normais	homog		homog
	72	0-100%	raiz	não normais			não homog
eclosão		0-51%	brutos	não normais	homog	não homog	não homog
		0-51%	arcoseno	não normais	homog		não homog
		0-51%	raiz	não normais	homog		não homog
tempo eclosão			brutos raiz	não normais não normais		não homog	não homog
deformações	168	0% (0-100%)	brutos	não normais		homog	homog
	144	0-51%	brutos	não normais	não homog	não homog	não homog
		0-51%	arc	não normais	não homog		não homog
		0-51%	raiz	não normais	não homog		não homog
	96	0-71,4%	brutos	não normais	homog	não homog	não homog
	96	0-71,4%	arc	não normais	homog		não homog
crescimento	compr. peso	0-51%	brutos	normais		homog	homog
		0-51%	brutos	normais		homog	homog
		0-51%	brutos/org inic.	normais		homog	homog
bat cardíaco	48h	0-100%	brutos	normais		homog	homog
		raiz					
	96h	0-51%	brutos raiz	não normais não normais		homog homog	homog homog
<b>Teste III</b>							
sobrevivência	168	0-51%	brutos	normais	homog	homog	não homog
	168	0-51%	arcoseno	normais	homog	homog	homog
	72	0-100%	brutos	não normais	homog	homog	homog
	72	0-100%	arcoseno	não normais	homog	homog	homog
	72	0-100%	raiz	não normais			
eclosão		0-71,4%	brutos	não normais	homog	homog	homog
		0-71,4%	arcoseno	não normais	homog		não homog
		0-71,4%	raiz	normais	homog	não homog	não homog
Tempo eclosão			brutos raiz	não normais não normais			
deformações	168	0% (0-100%)	brutos	não normais		homog	homog
			arcoseno	não normais			
			raiz	não normais			
	96	0-71,4%	brutos	normais	homog		homog
	96	0-71,4%	arcoseno		homog		
	96	0-71,4%	raiz		homog		
crescimento	compr.	0-51%	brutos	normais		homog	homog
		raiz	não normais		homog	homog	
	peso	0-51%	brutos	normais			homog
		0-51%	brutos/org inic.	normais			homog
bat cardíaco	48h	0-51%	brutos	não normais		homog	homog
			raiz	não normais		homog	homog
	96h	0-71,4	brutos raiz	não normais não normais		não homog não homog	não homog não homog

		Diferença significativa do controlo (p<0,05)				
parâmetro	horas	Anova	Tukey	U de Mann-Whitney	Dunnet	Steels Many-One
<b>Teste I</b>						
sobrevivência		não signif		nenhuma		nenhuma
eclosão		não signif		nenhuma		nenhuma
Tempo eclosão		não signif				
<b>Teste II</b>						
sobrevivência	168	signf	51-100%	51%	20,23% (51)	todas
	168	signf	51-100%	51%	23,87% (51)	
	168	signf	51-100%	51%	34,46% (51)	
	72		100%	100%	28,94% (100)	100%
	72	signf	100%	100%	32,42% (100)	
	72	signf	100%			
eclosão		signf	36,4-100%	36,4%	26,66% (36,4)	36,4\51%
		signf	36,4-100%	36,4%	27,69% (36,4)	
		signf	36,4-100%		42,90% (36,4)	
tempo eclosão		signf		36,4%		51-100%
deformações	168	signf	todas	todas		todas
	144	signf	51-100%	51%	51,88% (26, 51)	51-100%
		signf	51-100%	51%	56,69% (26, 51)	
		signf	51-100%		75,75% (26, 51)	
	96	signf	71,4\100%	71,4%	31,86% (71,4)	71,4\100%
	96	signf	71,4\100%	71,4%	36,95% (71,4)	
crescimento	compr. peso	signf	26% 51%			
		não signif	todas			
bat cardíaco	48h	signf	36,4-100%			
	96h	signf	36,4-100%	todas		todas
		signf	36,4-100%			
<b>Teste III</b>						
sobrevivência	168	signf	todas		27,77% (26)	
	168	signf	todas			
	72	signf	todas	todas	14,18% (26)	todas
	72	signf	todas		13,39% (26)	
	72					
eclosão		signf	todas	todas	23,09% (26)	todas
		signf	todas	todas	22,41% (26)	
		signf	todas		42,04% (26)	
Tempo eclosão		signf		todas		71,4\100%
deformações	168	signf	todas	todas		todas
	96	signf	todas		20,59% (26)	
	96					
	96				35,86% (26, 51)	
crescimento	compr.	não signif		nenhuma		
		não signif				
	peso	não signif				
		signf	todas			
bat cardíaco	48h	signf	todas	todas		todas
	96h	signf	todas	todas		todas
		signf	todas			

**Tabela 4.** Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste agudo I, com adultos de *D. rerio*. (n= número de observações; c.v.= coeficiente de variação, em percentagem)

		Oxigénio Dissolvido (mg/l)				Temperatura (°C)			
Tratamento	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	15	7,2 ±0,3	4,2	6,4	7,9	22,2 ±0,3	1,4	21,7	22,8
26%	15	7,2 ±0,4	5,6	6,6	7,7	22,4 ±0,3	1,3	22,0	22,7
36,4%	15	7,3 ±0,5	6,8	6,5	8,2	21,9 ±0,8	3,7	20,7	22,9
51%	15	7,2 ±0,3	4,2	6,7	7,6	22,1 ±0,5	2,3	20,8	23,1
71,4%	15	7,1 ±0,5	7,0	6,5	8,1	21,9 ±0,7	3,2	20,5	23,1
100%	15	6,8 ±0,7	10,3	5,6	7,5	22,5 ±0,3	1,3	21,8	23,0
		pH				Condutividade (µS/cm)			
Tratamento	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	15	7,8 ±0,2	2,6	7,5	8,0	276,7 ±20,9	7,6	214,0	317,0
26%	15	7,8 ±0,4	5,1	6,9	8,1	377,4 ±2,1	0,6	374,0	382,0
36,4%	15	7,9 ±0,2	2,5	7,4	8,1	425,5 ±9,7	2,3	415,0	443,0
51%	15	7,9 ±0,2	2,5	7,4	8,1	490,6 ±6,1	1,2	483,0	502,0
71,4%	15	7,9 ±0,2	2,5	7,6	8,1	592,0 ±38,7	6,5	566,0	666,0
100%	15	7,9 ±0,3	3,8	7,4	8,3	700,6 ±17,2	2,5	686,0	730,0
		Azoto Amoniacal (mg N -NH <sub>4</sub> /l)							
Tratamento	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.				
Controlo	9	0,4 ±0,4	100,0	0,0	0,8				
26%	9	4,2 ±1,0	23,8	3,0	6,0				
36,4%	9	4,0 ±0,8	20,0	3,0	4,5				
51%	9	3,7 ±1,3	35,1	3,0	6,0				
71,4%	9	4,0 ±0,8	20,0	3,0	4,5				
100%	9	4,4 ±1,5	34,1	3,0	8,0				

**Tabela 5.** Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste agudo II, com adultos de *D. rerio*. (n= número de observações; c.v.= coeficiente de variação, em percentagem)

Tratamento	Oxigénio Dissolvido (mg/l)					Temperatura (°C)			
	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	15	7,6 ±0,2	2,6	7,2	7,9	22,5 ±0,3	1,3	22,2	23,0
26%	15	7,3 ±0,2	2,7	6,9	7,7	22,5 ±0,2	0,9	22,3	23,0
36,4%	15	7,3 ±0,4	5,5	6,8	7,9	22,3 ±0,3	1,3	21,9	22,8
51%	15	7,3 ±0,5	6,8	6,6	8,1	22,4 ±0,3	1,3	22,0	22,9
71,4%	15	6,8 ±0,4	5,9	6,3	7,5	22,3 ±0,2	0,9	22,0	22,6
100%	15	6,6 ±0,9	13,6	5,4	7,8	22,0 ±0,1	0,5	21,9	22,2
Tratamento	pH					Condutividade (µS/cm)			
	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	15	7,5 ±0,1	1,3	7,0	7,5	285,3 ±3,7	1,3	279,0	290,0
26%	15	7,6 ±0,1	1,3	7,5	7,9	663,8 ±14,5	2,2	653,0	713,0
36,4%	15	7,6 ±0,2	2,6	7,5	7,9	795,5 ±25,7	3,2	748,0	821,0
51%	15	7,6 ±0,2	2,6	7,5	8,0	1038,9 ±7,8	0,8	1027,0	1054,0
71,4%	15	7,6 ±0,2	2,6	7,5	8,1	1347,7 ±84,3	6,3	1296,0	1510,0
100%	15	7,6 ±0,2	2,6	7,5	8,1	1706,8 ±9,9	0,6	1693,0	1728,0
Tratamento	Azoto Amoniacal (mg N -NH <sub>4</sub> /l)								
	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.				
Controlo	15	0,4 ±0,2	50,0	0,0	0,5				
26%	12	1,8 ±0,3	16,7	1,3	2,0				
36,4%	12	3,0 ±0,0	0,0	3,0	3,0				
51%	12	3,8 ±0,8	21,1	3,0	4,5				
71,4%	12	5,3 ±0,8	15,1	4,5	6,0				
100%	15	6,8 ±1,0	14,7	6,0	8,0				

**Tabela 6.** Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste crónico I, com adultos de *D. rerio*. (n= número de observações; c.v.= coeficiente de variação, em percentagem)

Tratamento	n	Oxigénio Dissolvido (mg/l)				Temperatura (°C)			
		média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	6	5,8 ±0,2	3,4	5,7	6,1	24,4 ±0,5	2,0	23,7	24,9
36,4%	6	7,2 ±0,2	2,8	6,9	7,4	24,0 ±0,6	2,5	23,2	24,5
51%	6	6,5 ±0,8	12,3	5,4	7,0	24,0 ±0,8	3,3	23,0	24,8
71,4%	6	6,3 ±0,4	6,3	5,9	6,7	23,6 ±1,2	5,1	22,3	24,9
100%	6	6,3 ±0,6	9,5	5,9	7,1	24,2 ±0,7	2,9	23,6	25,0
Tratamento	n	pH				Condutividade (µS/cm)			
		média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	6	7,5 ±0,0	0,0	7,5	7,5	277,3 ±10,1	3,6	265,0	287,0
36,4%	6	7,5 ±0,0	0,0	7,5	7,6	666,5 ±114,3	17,1	565,0	810,0
51%	6	7,5 ±0,0	0,0	7,4	7,5	818,7 ±155,5	19,0	678,0	1013,0
71,4%	6	7,5 ±0,0	0,0	7,5	7,6	1023,8 ±206,6	20,2	834,0	1281,0
100%	6	7,5 ±0,1	1,3	7,4	7,5	1328,3 ±311,9	23,5	1043,0	1717,0
Tratamento	n	Azoto Amoniacal (mg N -NH <sub>4</sub> /l)							
		média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.				
Controlo	6	0,5 ±0,0	0,0	0,5	0,5				
36,4%	6	2,3 ±0,5	21,7	2,0	3,0				
51%	6	4,0 ±1,5	37,5	3,0	6,0				
71,4%	6	5,7 ±1,8	31,6	4,5	8,0				
100%	6	5,7 ±1,8	31,6	4,5	8,0				

**Tabela 7.** Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste crónico II, com adultos de *D. rerio*. (n= número de observações; c.v.= coeficiente de variação, em percentagem)

Tratamento	n	Oxigénio Dissolvido (mg/l)				Saturação de Oxigénio (%)			
		média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	6	8,6 ±0,2	2,3	8,3	8,7	93,9 ±1,7	1,8	91,0	95,5
26%	6	8,2 ±0,4	4,9	7,7	8,8	88,5 ±1,9	2,1	85,2	90,5
36,4%	6	8,4 ±0,4	4,8	8,0	9,1	88,7 ±1,0	1,1	87,1	90,1
51%	6	8,1 ±0,7	8,6	6,7	8,4	90,8 ±2,7	3,0	87,1	94,0
71,4%	6	8,3 ±0,4	4,8	7,8	8,7	87,9 ±3,7	4,2	83,0	91,3
Tratamento	n	Temperatura (°C)				pH			
		média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	6	19,6 ±0,2	1,0	19,3	19,9	7,2 ±0,1	1,4	7,1	7,3
26%	6	19,4 ±0,4	2,1	18,9	19,9	7,1 ±0,1	1,4	7,0	7,1
36,4%	6	18,8 ±0,2	1,1	18,5	19,1	7,0 ±0,0	0,0	7,0	7,1
51%	6	18,3 ±0,2	1,1	18,1	18,6	6,9 ±0,1	1,4	6,8	7,0
71,4%	6	18,0 ±0,6	3,3	17,3	18,7	6,9 ±0,1	1,4	6,8	7,0
Tratamento	n	Condutividade (µ/cm)							
		média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.				
Controlo	6	244,0 ±1,4	0,6	242,0	246,0				
26%	6	371,8 ±33,6	9,0	340,0	415,0				
36,4%	6	428,2 ±59,9	14,0	375,0	506,0				
51%	6	497,8 ±74,4	14,9	430,0	593,0				
71,4%	6	591,5 ±99,6	16,8	497,0	716,0				

**Tabela 8.** Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste crónico preliminar (teste I), com embriões/larvas de *D. rerio*. (n= número de observações; c.v.= coeficiente de variação, em percentagem)

Tratamento	Oxigénio Dissolvido (mg/l)					Temperatura (°C)			
	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	32	8,1 ±0,3	3,7	7,3	8,5	24,7 ±1,1	4,5	22,5	27,3
26%	32	8,1 ±0,3	3,7	7,1	8,5	24,8 ±1,1	4,4	22,8	27,2
36,4%	32	8,1 ±0,3	3,7	7,5	8,5	24,7 ±0,9	3,6	22,8	26,0
51%	32	8,0 ±0,3	3,8	7,5	8,6	24,5 ±1,1	4,5	22,8	26,4
71,4%	32	8,0 ±0,4	5,0	7,4	8,6	24,3 ±1,1	4,5	21,9	26,1
100%	32	7,9 ±0,6	7,6	6,5	8,6	24,5 ±1,0	4,1	22,9	26,2
Tratamento	pH					Condutividade (µS/cm)			
	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	32	7,7 ±0,3	3,9	6,7	8,2	271,0 ±10,9	4,0	264,0	329,0
26%	32	7,9 ±0,1	1,3	7,5	8,0	384,4 ±17,5	4,6	337,0	397,0
36,4%	32	7,8 ±0,1	1,3	7,6	8,0	433,0 ±25,3	5,8	363,0	450,0
51%	32	7,8 ±0,2	2,6	7,5	8,0	499,0 ±35,3	7,1	405,0	519,0
71,4%	32	7,8 ±0,1	1,3	7,5	8,0	590,6 ±50,9	8,6	449,0	619,0
100%	32	7,6 ±0,2	2,6	7,2	8,0	726,0 ±75,4	10,4	530,0	795,0

**Tabela 9.** Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste crónico II, com embriões/larvas de *D. rerio*. (n= número de observações; c.v.= coeficiente de variação, em percentagem)

Tratamento	Oxigénio Dissolvido (mg/l)					Saturação de Oxigénio (%)			
	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	32	8,7 ±0,2	2,3	8,4	9,1	96,7 ±1,7	1,8	94,2	100,3
26%	32	8,5 ±0,2	2,4	8,3	8,9	93,4 ±2,3	2,5	91,0	98,4
36,4%	32	8,4 ±0,3	3,6	8,1	9,2	92,7 ±3,0	3,2	89,7	99,6
51%	29	8,2 ±0,3	3,7	7,8	8,8	90,2 ±3,1	3,4	87,0	96,4
71,4%	18	7,8 ±0,2	2,6	7,5	8,2	85,4 ±2,6	3,0	81,8	89,5
100%	14	886,6 ±37,0	4,2	832,0	922,0	81,6 ±4,2	5,1	77,3	87,2
Tratamento	Temperatura (°C)					pH			
	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	32	20,4 ±0,8	3,9	19,3	22,0	7,4 ±0,1	1,4	7,3	7,6
26%	32	20,3 ±0,9	4,4	19,2	22,0	7,4 ±0,1	1,4	7,3	7,6
36,4%	32	20,3 ±0,9	4,4	19,1	21,7	7,4 ±0,1	1,4	7,3	7,6
51%	29	20,3 ±0,9	4,4	19,1	21,9	7,4 ±0,2	2,7	7,1	7,7
71,4%	18	20,4 ±0,9	4,4	19,0	21,5	7,4 ±0,2	2,7	7,0	7,5
100%	14	20,9 ±0,8	3,8	19,0	21,5	7,4 ±0,3	4,1	6,7	7,5
Tratamento	Condutividade (µS/cm)								
	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.				
Controlo	32	241,3 ±10,0	4,1	230,0	262,0				
26%	32	407,4 ±6,3	1,5	399,0	415,0				
36,4%	32	480,0 ±11,8	2,5	465,0	494,0				
51%	29	577,5 ±19,9	3,4	536,0	599,0				
71,4%	18	719,1 ±15,2	2,1	694,0	739,0				
100%	14	920,0 ±10,6	1,2	896,0	927,0				

**Tabela 10.** Valores médios dos parâmetros físico-químicos analisados ao longo do teste crónico III, com embriões/larvas de *D. rerio*. (n= número de observações; c.v.= coeficiente de variação, em percentagem)

Tratamento	Oxigénio Dissolvido (mg/l)					Saturação de Oxigénio (%)			
	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	32	8,5 ±0,4	4,7	8,1	9,5	92,6 ±4,5	4,9	88,1	101,9
26%	32	8,5 ±0,4	4,7	8,1	9,1	91,7 ±3,8	4,1	87,2	97,6
36,4%	32	8,3 ±0,4	4,8	7,9	9,0	89,1 ±3,3	3,7	85,6	95,0
51%	32	8,2 ±0,4	4,9	7,7	8,9	89,0 ±3,5	3,9	83,5	94,1
71,4%	19	8,0 ±0,5	6,3	7,4	8,8	86,6 ±4,8	5,5	80,9	93,6
100%	13	7,4 ±0,8	10,8	6,5	8,4	79,8 ±7,9	9,9	69,2	87,9
Tratamento	Temperatura (°C)					pH			
	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.
Controlo	32	19,1 ±0,1	0,5	19,0	19,4	7,4 ±0,2	2,7	7,2	7,6
26%	32	19,3 ±0,2	1,0	19,0	19,6	7,2 ±0,1	1,4	7,2	7,4
36,4%	32	19,3 ±0,1	0,5	19,1	19,6	7,2 ±0,1	1,4	7,0	7,4
51%	32	19,4 ±0,2	1,0	19,1	19,8	7,2 ±0,1	1,4	7,0	7,4
71,4%	19	19,5 ±0,4	2,1	19,0	20,1	7,2 ±0,1	1,4	7,0	7,4
100%	13	19,7 ±0,9	4,6	19,0	20,9	7,1 ±0,1	1,4	7,0	7,2
Tratamento	Condutividade (µS/cm)								
	n	média ± d. padrão	c.v.	mín.	máx.				
Controlo	32	224,4 ±7,2	3,2	218,0	242,0				
26%	32	321,3 ±3,8	1,2	318,0	330,0				
36,4%	32	366,6 ±1,8	0,5	364,0	369,0				
51%	32	431,8 ±3,1	0,7	429,0	439,0				
71,4%	19	516,4 ±2,3	0,4	513,0	519,0				
100%	13	637,9 ±1,4	0,2	636,0	639,0				