

FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

**Avaliação da Ecotoxicidade de Águas Superficiais
Aplicação à Bacia Hidrográfica do Rio Leça**

Ana Isabel de Emílio Gomes

Licenciada em Biologia
pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Dissertação submetida para satisfação parcial dos
requisitos do grau de mestre
em
Engenharia do Ambiente
(área de especialização de Tratamento de Águas e Águas Residuais)

Dissertação realizada sob a orientação de
Doutor Rui Alfredo Boaventura
do Departamento de Engenharia Química
da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
e sob a co-orientação de
Doutora Sónia Adriana Figueiredo
do Departamento de Engenharia Química
do Instituto Superior de Engenharia do Porto

Porto, Fevereiro de 2007

Agradecimentos

Aos orientadores Doutor Rui Boaventura e Doutora Sónia Figueiredo, pelo conhecimento e experiência transmitida, orientação e incentivo na realização deste trabalho. Agradeço também a oportunidade de divulgação do trabalho realizado através da participação no XIII Congresso da Associação Espanhola de Limnologia e V Congresso Ibérico de Limnologia, ocorrido em Barcelona, 2 a 7 de Julho de 2006.

À Doutora Helena Soares, pela oportunidade de participar nas aulas de Ecologia e Ecotoxicologia Geral, do Mestrado Integrado em Eng^a do Ambiente.

À Dr^a Ana Margarida, do Instituto Ricardo Jorge, pela cedência de material bibliográfico relativo ao método Microtox®.

À Engenheira Assunção Abreu, da ETAR de Parada, pela disponibilidade demonstrada e cedência de dados relativos ao efluente final.

Ao futuro Engenheiro José Manuel Gomes, pela disponibilidade, participação e ajuda em todas as recolhas efectuadas ao rio Leça.

Ao Departamento de Engenharia Química, da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, em especial ao Laboratório de Poluição, nomeadamente: à Engenheira Alberta Macedo, pelos conhecimentos e vasta experiência na realização das análises físico-químicas; à Engenheira Liliana Pereira pela ajuda prestada nas análises físico-químicas; à Engenheira Sílvia Faia pelos conhecimentos e experiência na realização das análises bacteriológicas; e à D. Maria do Céu Lopes sempre presente nas diversas análises realizadas.

Ao Engenheiro José Carlos Pires, pela disponibilidade sempre demonstrada ao ajudar na realização e compreensão das análises estatísticas efectuadas.

Ao Biólogo Daniel Silva, pela cedência das cartas militares relativas à Bacia Hidrográfica do Leça, e ajuda na localização das indústrias e estações de amostragem.

Ao Biólogo José Carlos Martins do CIMAR, pelas sugestões relativas aos resultados de ecotoxicidade.

Aos meus colegas do Laboratório de Engenharia de Separação e Reacção, da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Aos meus pais, por acreditarem nas minhas capacidades, pela paciência e contínua compreensão e incentivo. Aos meus irmãos, José e António Gomes, que são a minha força. Ao meu companheiro, Daniel Silva, pela paciência e compreensão.

Sumário

A avaliação ecotoxicológica da qualidade de águas superficiais recorrendo aos ensaios de toxicidade em laboratório deve ser encarado como um diagnóstico complementar em águas que evidenciam possível contaminação. Daí que o rio Leça, considerado um dos mais poluídos da Europa, tenha sido escolhido como alvo de estudo.

Foram realizadas 5 campanhas de amostragem e análise de água do rio Leça, em 7 pontos de amostragem seleccionados. Foi também recolhida uma amostra de efluente final da ETAR de Parada. Como os resultados das análises químicas e bacteriológicas realizadas não retratam por si só o impacto ambiental causado pelos contaminantes de uma água superficial, foram também realizados ensaios de ecotoxicidade, recorrendo a dois organismos-teste (*Vibrio fischeri* e *Chlorella vulgaris*) como indicadores do efeito tóxico total.

De modo a realizar um estudo integrado da qualidade da água do rio Leça, analisaram-se através de diferentes métodos estatísticos (PCA, CA e MLR) os resultados dos parâmetros físico-químicos, parâmetros bacteriológicos e parâmetros ecotoxicológicos.

A qualidade química e bacteriológica da água do rio Leça apresenta-se em geral entre “muito” e “extremamente poluída”, sendo registada uma contínua degradação de montante para jusante, excepto para os parâmetros bacteriológicos que parecem sofrer uma diminuição na estação 4, localizada no troço intermédio do rio, a jusante da ETAR de Ponte de Moreira.

Os resultados obtidos para os parâmetros ecotoxicológicos, analisados por MLR, relativos aos valores de UT_{50} para a *V. fischeri* ao fim de 15 minutos, sugerem correlações negativas com a condutividade e a turvação, e positivas com o fósforo, a dureza, o ferro, o mercúrio, o arsénio e os coliformes fecais ($r = 0,843$). De igual modo, os valores de UT_{50} obtidos para a *C. vulgaris*, parecem apresentar correlações negativas com o COD, o zinco e o manganês, e positivas com a turvação e o arsénio ($r = 0,802$). De um modo geral, a estação 1 apresenta raramente valores de toxicidade, enquanto que a estação 3 é a que apresenta

resultados com maior frequência, seguida pelas estações 2 e 5, enquanto que as estações 4, 6 e 7 apresentam resultados relativamente similares entre si.

A determinação da ecotoxicidade de águas superficiais, em particular, na bacia hidrográfica do Rio Leça, torna possível avaliar a qualidade global em termos de toxicidade, detectando as possíveis interacções entre os diferentes parâmetros de análise. Estas interacções manifestam-se fazendo aumentar a toxicidade de substâncias isoladas (efeito sinérgico), diminuindo-a (efeito antagónico) ou somando-a (efeito aditivo), podendo ocorrer uma alteração da biodisponibilidade dos compostos tóxicos.

Abstract

Laboratory ecotoxicological evaluation of natural water quality must be faced as a complement diagnose when investigating high polluted water. Therefore, the Leça, chosen in the present study, is one of the most polluted rivers in Europe.

Leça river water was sampled and analysed 5 times, in 7 selected sampling stations. It was also collected a sample of final effluent discharged from Parada Wastewater Treatment Station (near sampling station no.2). The results obtained by chemical and bacteriological analyses are not sufficient to portray the impact caused by the contaminants of the natural water, so ecotoxicity assays were carried through, using the two organisms-test (*Vibrio fischeri* and *Chlorella vulgaris*) as indicators of the total toxic effect.

Thus, in order to achieve an integrated study of the Leça river water quality, different statistical methods (PCA, CA and MLR) were used to analyze the results of, physico-chemical parameters, bacteriological parameters, ecotoxicological parameters.

The chemical and bacteriological quality of the river Leça water, for the obtained data, is classified in general as “very” or “extremely polluted”, and continuous degradation through the stream is showed, except for the bacteriological parameters that seem to suffer a reduction in station no. 4, located in the intermediate chunk of the river, downstream of the Wastewater Treatment Station of Ponte de Moreira.

The final results of the ecotoxicological parameters were analyzed by MLR. The values of UT_{50} for the *V. fischeri* at 15 minutes, suggest negative correlations with conductivity and turbation, and positive with phosphorus, hardness, iron, mercury, arsenic and fecal coliformes ($r = 0,843$). In the same way, the values of UT_{50} for the *C. vulgaris*, seem to present negative correlations with DOC (dissolved organic carbon), zinc and manganese, and positive with turbation and arsenic ($r = 0,802$). In a global way, station no. 1 presents few results of toxicity, while station no. 3 presents results frequently, followed by stations no. 2 and 5, while stations no. 4, 6 and 7 present relatively similar results.

The study of the ecotoxicity in superficial waters, particularly in Leça river, makes it possible to evaluate total toxicity quality, detecting possible interactions between different parameters. These interactions can increase the toxicity of isolated substances (synergic effect), diminishing it (antagonic effect) or adding it (additive effect), being able to modify the biodisponibility of toxic components.

Índice Geral

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

CONCEITOS E ABREVIATURAS

Pág.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ECOTOXICOLOGIA: TOXICOLOGIA AQUÁTICA.....	18
1.1.1 Factores de Afectam a Toxicidade.....	21
1.2 TESTES DE TOXICIDADE: BIOENSAIOS.....	23
1.2.1 Testes de Toxicidade Aguda.....	27
1.2.2 Testes de Toxicidade Crónica.....	28
1.2.3 Regime de Exposição.....	29
1.2.4 Níveis Tróficos.....	31
1.2.4.1 Bactérias.....	32
1.2.4.2 Nível trófico 1.....	35
1.2.4.3 Nível trófico 2.....	40
1.2.4.4 Nível trófico 3.....	42
1.2.4.5 Nível trófico 4.....	43
1.2.4.6 Nível trófico 5.....	43
1.3 ECOTOXICIDADE: ENQUADRAMENTO LEGAL.....	44
1.3.1 Substâncias Químicas Perigosas e Avaliação de Risco.....	44
1.3.1.1 Portaria nº 732-A/96.....	45
1.3.1.2 Decreto-Lei nº 222/2001.....	47
1.3.1.3 Decreto-Lei nº 154-A/2002.....	48
1.3.2 Protecção das Águas Contra a Poluição por Substâncias Perigosas.....	49
1.3.2.1 Directiva 76/464/CEE.....	50
1.3.2.2 Directiva 96/61/CEE.....	52
1.3.2.3 Lei nº 58/2005.....	52

2. A BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO LEÇA

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO LEÇA.....	57
2.1.1 Hidrologia.....	59
2.1.2 Clima.....	60
2.1.3 Poluição Urbana e Industrial: principais problemas.....	62
2.1.4 Histórico da Qualidade das Águas Superficiais.....	64

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM.....	67
3.1.1 Locais de Amostragem.....	67
3.1.2 Plano de Amostragem.....	71
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	71
3.2.1 Parâmetros determinados no local.....	71
3.2.2 Parâmetros determinados no laboratório	72
3.2.2.1 Turvação.....	72
3.2.2.2 Cor Verdadeira.....	72
3.2.2.3 Carbono Orgânico Dissolvido.....	72
3.2.2.4 Carência Bioquímica de Oxigênio.....	73
3.2.2.5 Azoto Total.....	73
3.2.2.6 Fósforo Total.....	73
3.2.2.7 Dureza Total.....	73
3.2.2.8 Metais Dissolvidos.....	73
3.3 CARACTERIZAÇÃO BACTERIOLÓGICA.....	74
3.3.1 Coliformes Totais.....	74
3.3.2 Coliformes Fecais.....	74
3.3.3 Estreptococos Fecais.....	75
3.4 CARACTERIZAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA.....	76
3.4.1 Testes de Inibição da Bioluminescência da Bactéria <i>Vibrio fischeri</i>	76
3.4.1.1 Procedimento experimental.....	77
3.4.1.2 Tratamento de dados.....	78
3.4.2 Testes de Inibição do Crescimento da Alga <i>Chlorella vulgaris</i>	80
3.4.2.1 Procedimento experimental.....	81
3.4.2.2 Preparação da cultura de algas.....	83
3.4.2.3 Tratamento de dados.....	84

	Pág.
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	86
3.5.1 Análise de Componentes Principais (PCA).....	87
3.5.2 Análise de <i>Cluster</i> (CA).....	87
3.5.3 Regressão Linear Múltipla (MLR).....	88
 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: VARIAÇÃO ESPACIAL	
E TEMPORAL	91
4.1.1 Temperatura/ pH/ Potencial Oxidação Redução.....	91
4.1.2 Oxigénio Dissolvido.....	93
4.1.3 Condutividade.....	93
4.1.4 Turvação.....	94
4.1.5 Cor Verdadeira.....	95
4.1.6 Carbono Orgânico Dissolvido.....	95
4.1.7 Carência Bioquímica de Oxigénio.....	96
4.1.8 Azoto Total.....	96
4.1.9 Fósforo Total.....	97
4.1.10 Dureza Total.....	98
4.1.11 Metais Dissolvidos.....	99
4.1.12 Qualidade da Água: Parâmetros Químicos.....	101
4.2 PARÂMETROS BACTERIOLÓGICOS: VARIAÇÃO ESPACIAL	
E TEMPORAL	103
4.2.1 Coliformes Totais.....	103
4.2.2 Coliformes Fecais.....	104
4.2.3 <i>Streptococcus</i> Fecais.....	104
4.2.4 Qualidade da Água: Parâmetros Bacteriológicos.....	105
4.3 PARÂMETROS ECOTOXICOLÓGICOS: VARIAÇÃO ESPACIAL	
E TEMPORAL	106
4.3.1 Ecotoxicidade para <i>Vibrio fischeri</i> - Microtox®.....	106
4.3.2 Ecotoxicidade para <i>Chlorella vulgaris</i>	110
4.3.3 Ecotoxicidade do efluente da ETAR de Parada.....	114
4.4 RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA	115
4.4.1 Análise aos Parâmetros.....	115
4.4.1.1 Todos os Parâmetros	115
4.4.1.2 Parâmetros Ecotoxicológicos	116

	Pág.
4.4.2 Análise às Estações de Amostragem.....	117
4.4.2.1 Parâmetros Químicos	117
4.4.2.2 Parâmetros Bacteriológicos	118
4.4.2.3 Parâmetros Ecotoxicológicos.....	120
4.4.2.4 Todos os Parâmetros.....	122
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO.....	125
6 BIBLIOGRAFIA	
6.1 Referências.....	129
6.2 Legislação Consultada.....	132
6.3 Manuais de Equipamentos.....	133
6.4 Outra Bibliografia Consultada.....	133
ANEXOS	
A - Características de Qualidade de Cursos de Águas Superficiais....	136
B – Resultados: Parâmetros Físico-Químicos.....	138
C – Resultados: Parâmetros Bacteriológicos.....	142
D - Microtox®: Exemplo de cálculo do CE ₂₀ e CE ₅₀ , e limites de confiança a 95%.....	144
E – Microtox®: Resultados Experimentais.....	148
F – <i>Chlorella vulgaris</i> : Relação entre o N° de algas/mL e a Absorvância	
Exemplo de cálculo do CE ₂₀ e CE ₅₀	
Exemplo do Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk	
Exemplo do Teste de Homogeneidade da Variância de Bartlett..	160
G – <i>Chlorella vulgaris</i> : Resultados Experimentais.....	165
H – Métodos Estatísticos: Resultados da Análise dos	
Componentes Principais (PCA).....	177
I – Métodos Estatísticos: Resultados da Regressão Linear	
Múltipla (MLR).....	183

Índice de Figuras

	Fig. Nº	Título	Pág.
Capítulo 1	1	Curva da luz emitida vs. tempo para o fenol	34
	2	Curva da luz emitida vs. tempo para compostos orgânicos	34
	3	Curva da luz emitida vs. tempo para metais	34
	4	<i>Selenastrum capricornutum</i>	37
	5	<i>Lemna minor</i>	39
	6	<i>R. subcapitata</i>	39
	7	<i>Daphnia magna</i>	41
	8	<i>Artemia salina</i>	41
	9	Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	43
	10	Peixe zebra (<i>Brachidanio rerio</i>)	43
	11	Símbolo “Perigoso para o Ambiente”	46
Capítulo 2	12	Perfil longitudinal do rio Leça	58
Capítulo 3	13	Bacia Hidrográfica do Rio Leça – estações de amostragem e localização de indústrias	70
	14	Estação de amostragem 1	68
	15	Estação de amostragem 2	68
	16	Estação de amostragem 3	69
	17	Estação de amostragem 4	69
	18	Estação de amostragem 5	69
	19	Estação de amostragem 6	69
	20	Estação de amostragem 7	69
	21	Analisador automático de toxicidade por bioluminescência	77
	22	<i>Chlorella vulgaris</i>	80
	23	Gráfico “Curva de crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> ”	80
Capítulo 4	24	Evolução temporal e espacial da temperatura	91
	25	Evolução temporal e espacial do pH	92
	26	Evolução temporal e espacial do potencial de oxidação-redução	92
	27	Evolução temporal e espacial do oxigénio dissolvido	93

Fig. Nº	Título	Pág.
28	Evolução temporal e espacial da condutividade	94
29	Evolução temporal e espacial da turvação	94
30	Evolução temporal e espacial da cor	95
31	Evolução temporal e espacial do carbono orgânico dissolvido	96
32	Evolução temporal e espacial da carência bioquímica de oxigênio	96
33	Evolução temporal e espacial do azoto total	97
34	Evolução temporal e espacial do fósforo total	98
35	Evolução temporal e espacial da dureza total	99
36	Evolução temporal e espacial do ferro solúvel	100
37	Evolução temporal e espacial do mercúrio solúvel	100
38	Evolução temporal e espacial do arsênio solúvel	101
39	Evolução temporal e espacial do teor de coliformes totais	103
40	Evolução temporal e espacial do teor de coliformes fecais	104
41	Evolução temporal e espacial do teor de coliformes fecais	105
42	– Evolução temporal e espacial dos valores de U.T. 50% obtidas para <i>Vibrio fischeri</i> no Microtox®, ao fim de 5 minutos de ensaio	109
43	Evolução temporal e espacial dos valores de U.T. 50% obtidas para <i>Vibrio fischeri</i> no Microtox®, ao fim de 15 minutos de ensaio	109
44	Evolução temporal e espacial dos valores de U.T. 20% obtidas para <i>Vibrio fischeri</i> no Microtox®, ao fim de 5 minutos de ensaio	110
45	Evolução temporal e espacial dos valores de U.T. 20% obtidas para <i>Vibrio fischeri</i> no Microtox®, ao fim de 15 minutos de ensaio	110
46	Evolução temporal e espacial dos valores de U.T. 50% obtidas nos ensaios com <i>Chlorella vulgaris</i>	114
47	Evolução temporal e espacial dos valores de U.T. 20% obtidas nos ensaios com <i>Chlorella vulgaris</i>	114
48	Representação gráfica dos resultados da análise PCA a todos os parâmetros	116
49	Representação gráfica dos resultados da análise PCA às estações, tendo como base os parâmetros: potencial de oxidação-redução, condutividade, OD, COD, CBO ₅ , azoto total, fósforo total e dureza	117
50	Dendograma dos <i>clusters</i> obtidos na análise às estações	118
51	Representação gráfica dos resultados da análise PCA às estações, tendo como base os parâmetros bacteriológicos	119

Fig. Nº	Título	Pág.
52	Dendograma dos <i>clusters</i> obtidos na análise às estações, tendo como base os parâmetros bacteriológicos	119
53	Representação gráfica dos resultados da análise PCA às estações, tendo como base os parâmetros ecotoxicológicos	120
54	Dendograma dos <i>clusters</i> obtidos na análise às estações, tendo como base os parâmetros ecotoxicológicos	121
55	Representação gráfica dos resultados da análise PCA às estações, tendo como base todos os parâmetros analisados	122
56	Dendograma dos <i>clusters</i> obtidos na análise às estações	122

Índice de Tabelas

	Nº	Título	Pág.
Capítulo 1	1	Concentração de algumas substâncias que causam efeitos tóxicos agudos a organismos aquáticos e comparação com valores limite de emissão (VLE) para águas residuais e objectivos ambientais de qualidade mínima para as águas superficiais	20
	2	Medidas-padrão de toxicidade de efluentes e substâncias tóxicas	26
	3	Níveis tróficos das espécies mais utilizadas nos testes de ecotoxicologia	32
	4	Espécies de peixes utilizadas em testes de ecotoxicologia	43
	5	Directivas-filhas e correspondente legislação nacional	51
	6	Lista de substâncias prioritárias e prioritárias perigosas e suas classificações no contexto de outras Directivas	55
Capítulo 2	7	Classificação da qualidade da água	65
Capítulo 3	8	Correspondência entre o número atribuído às estações e o local de amostragem	68
	9	Datas e horas das colheitas de amostras de água	71
	10	Parâmetros determinados no local e equipamento portátil utilizado	72
	11	Constituição das soluções de reserva e sua concentração final no ensaio	82
Capítulo 4	12	Classificação dos parâmetros físico-químicos analisados, segundo critérios do INAG	102
	13	Classificação dos parâmetros bacteriológicos analisados, segundo critérios do INAG	105
	14	Resultados da ecotoxicidade para <i>Vibrio fischeri</i> : CE ₅₀ , CE ₂₀ e limites de confiança a 95%	107
	15	Resultados da ecotoxicidade para <i>Vibrio fischeri</i> : U.T.	108
	16	Resultados da ecotoxicidade para <i>Chlorella vulgaris</i> CE ₅₀ , CE ₂₀	111
	17	Resultados da ecotoxicidade para <i>Chlorella vulgaris</i> U.T.	113

Conceitos e Abreviaturas

Controlo – bioensaio que avalia o desenvolvimento dos organismos-teste na ausência da amostra (controlo negativo).

Bacia Hidrográfica – a área terrestre a partir da qual todas as águas flúem para o mar, através de uma sequência de rios, ribeiros ou eventualmente lagos, desaguardo numa única foz, estuário ou delta.

Controlo positivo – avaliação da resposta tóxica de uma substância de referência. Utilizado para controlar a sensibilidade dos organismos-teste.

Concentração Letal Média (CL₅₀) – concentração do agente tóxico que causa 50% de mortalidade na população de organismos submetidos ao teste.

Concentração Efectiva Média (CE₅₀) – concentração do agente tóxico que causa 50% de redução no parâmetro sub-letal desenvolvido na população de organismos submetidos ao teste.

Concentração Sem Efeito Observável (CSEO) – mais elevada concentração do agente tóxico para a qual não se verifica inibição estatisticamente significativa.

Concentração Efectiva Mínima (CEM) – menor concentração do agente tóxico para a qual o efeito tóxico é estatisticamente significativo.

Ecotoxicidade – estudo dos efeitos nefastos das substâncias químicas sobre os ecossistemas.

Ensaio de Toxicidade Aguda – ensaio que determina os efeitos observados ao fim de um curto espaço de tempo (15 min, 24h, 96h).

Ensaio de Toxicidade Crónica – ensaio que determina os efeitos observados ao fim de um espaço de tempo prolongado (por exemplo, 21 dias).

Efeito final (endpoint) – efeito observado/medido no final de cada tipo de bioensaio (inibição da mobilidade, redução da bioluminescência).

Estado das Águas Superficiais – expressão global do estado em que se encontra uma massa de águas superficiais, determinado em função do pior dos seus estados, ecológico ou químico.

Tóxico – agente que pode induzir uma resposta adversa (efeito) num sistema biológico, causando danos a nível de estrutura ou função, ou mesmo morte.

Toxicidade – propriedade relativa que reflecte o potencial nocivo de uma substância química num organismo vivo. É função da concentração e composição/propriedades da substância química à qual um organismo é exposto (externa e internamente) e da duração da exposição. Tradicionalmente os dados de toxicidade são usados para comparar substâncias químicas ou as sensibilidades de diferentes espécies à mesma substância.

Toxicologia Aquática – estudo dos efeitos adversos de agentes químicos sobre os agentes aquáticos.

Toxicidade Directa – resulta da acção do agente tóxico mais ou menos directamente nos locais de acção no e/ou dentro dos organismos, ou seja, resulta de alterações bioquímicas internas.

Toxicidade Indirecta – ocorre como resultado da influência das variações das características químicas, físicas, e/ou biológicas do ambiente, ou seja, a toxicidade indirecta é uma função das alterações da viabilidade geral do organismo devido a factores externos.

Testes de Toxicidade ou Bioensaios – utilizados para avaliar os efeitos adversos de uma substância química em organismos vivos, em condições padronizáveis e reprodutíveis, de modo a permitir comparações com outras substâncias ou espécies-teste e entre resultados obtidos em diferentes laboratórios.

Unidades de Toxicidade (UT) – expressam os resultados de diferentes ensaios de toxicidade como um único valor numérico (100/CE_{xx}).

Capítulo 1

Introdução

- 1.1 Ecotoxicologia: Toxicologia Aquática**
- 1.2 Testes de Toxicidade: Bioensaios**
- 1.3 Ecotoxicidade: Enquadramento Legal**

1.1 Ecotoxicologia: toxicologia aquática

O termo “ecotoxicologia” foi introduzido por Truhaut em 1969 e é derivado das palavras “ecologia” e “toxicologia”. A introdução deste termo reflectia a preocupação crescente sobre os efeitos ambientais de químicos sobre as espécies que não o homem. Actualmente, a Ecotoxicologia é definida como o estudo dos efeitos nefastos das substâncias químicas nos ecossistemas (Walker et al, 1997).

A ecotoxicologia é uma disciplina da ciência ambiental, em rápido desenvolvimento, que pode ser mais bem definida como o estudo do destino e dos efeitos das substâncias tóxicas num ecossistema (Klaassen, 2003). Enquanto ciência, requer a compreensão dos princípios ecológicos e da teoria ecológica e de como os produtos químicos podem afectar potencialmente indivíduos, populações, comunidades e ecossistemas. A avaliação da ecotoxicidade é conseguida através da utilização de respostas específicas de determinadas espécies a produtos tóxicos ou de impactos nos níveis superiores de organização (Williams et al, 2002).

A Toxicologia Aquática tem sido definida como o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos e de produtos xenobióticos sobre as espécies aquáticas. Tais estudos podem ser conduzidos através de bioensaios (testes experimentais de metodologias distintas) estabelecidos de acordo com os diversos objectivos que se procuram alcançar nas avaliações (Klaassen, 2003).

A descarga de efluentes líquidos, mesmo que tratados, de forma contínua no ambiente aquático, pode causar efeitos crónicos, uma vez que os organismos são expostos a baixas concentrações de determinados poluentes durante longos períodos de tempo. Se estes poluentes forem degradáveis, ocorrerá equilíbrio a uma certa distância do ponto de lançamento, mas na área circundante os organismos poderão ter dificuldades em manterem-se no ambiente, levando a alterações na estrutura e funcionamento do ecossistema aquático. A rejeição de substâncias persistentes ou bioacumuláveis pode causar efeitos drásticos nas populações expostas (Williams et al, 2002).

Os organismos aquáticos indígenas (por exemplo, algas, peixes, macroinvertebrados) completam todo ou quase todo o seu ciclo de vida na água, podendo, por isso, ser utilizados para monitorizar a sua qualidade. Como a

qualidade da água pode variar largamente durante o período de vida de determinada espécie, torna-se benéfico o uso de numerosos grupos taxonómicos (Klaassen, 2003). Organismos com curtos períodos de vida e alta capacidade reprodutiva podem servir como primeiros indicadores de alarme. Para químicos bioacumuláveis é mais útil utilizar organismos de vida mais longa. Os resultados da avaliação de populações aquáticas indígenas são facilmente interpretados biologicamente, permitindo a quantificação dos danos de uma maneira facilmente percebida pelos responsáveis de gestão e controlo de recursos, agentes reguladores e pelo público em geral.

Embora a maior parte dos estudos ecotoxicológicos publicados incluam indicadores de uma série, variando desde bioensaios de toxicidade individual até testes ao nível de comunidade ou de ecossistema, as ligações através de grandes espaços continuam menos estudadas. As respostas tóxicas medidas ao nível da comunidade, tais como a resposta inicial ou subsequente “recuperação”, são tipicamente medições à biodiversidade (ou seja, medição de composição e riqueza em espécies dentro da estrutura da comunidade) e abundâncias relativas (número de indivíduos de uma qualquer espécie relativamente ao número total de indivíduos na comunidade) de comunidades perifíticas, plantónicas, bênticas ou piscícolas. Estes testes apresentam um grande problema quando se trata de produtos químicos (pesticidas, por exemplo), visto que alterações na abundância relativa ou na riqueza das espécies não têm resultado em informação facilmente rapidamente interpretável. As dificuldades têm origem tanto na falta de base teórica, sobre a qual se baseariam os resultados observados, como na falta de compreensão dos efeitos secundários (por exemplo, relações na cadeia alimentar) (Klaassen, 2003).

Os ecossistemas experimentais (bioensaios) permitem-nos comparar sistemas, em que as unidades individuais são construídas como réplicas do sistema e as doses constituem um gradiente de concentrações. Neste sistema de testes de ecotoxicidade, as respostas tóxicas primárias (definidas como a resposta do grupo taxonómico que se espera que seja afectado imediatamente pelo químico) são comparadas com a variação da população em unidades de controlo. As séries de medições concentração-resposta são quantificadas utilizando técnicas estatísticas (Klaassen, 2003).

Os bioensaios de toxicologia aquática são uma importante ferramenta para a avaliação da sensibilidade de organismos aquáticos a poluentes e medicamentos,

baseiam-se em testes de toxicidade aguda e crónica (Walker et al, 1997). Os conhecimentos gerados nestes testes podem viabilizar medidas legais que normalizem a qualidade e o uso de fontes de águas naturais, assim como emissões de águas residuais. A Tabela 1 compara a concentração efectiva de algumas substâncias que causam efeitos tóxicos agudos em organismos aquáticos com os valores limite de emissão de águas residuais e os valores máximos admissíveis de qualidade mínima para as águas superficiais, segundo Decreto-Lei nº 176/98 Anexos XVIII e XXI.

Tabela 1 – Concentração de algumas substâncias que causam efeitos tóxicos agudos a organismos aquáticos (Rodrigues, 2005) e comparação com valores limite de emissão (VLE) para águas residuais e objectivos ambientais de qualidade mínima para as águas superficiais

SUBSTÂNCIA	EC ₅₀ (mg/L)	VLE (mg/L) D.L.236/98	Qualidade Mínima VMA (mg/L) D.L.236/98
Alumínio	3,9	10	-
Cádmio	0,065	1,0	0,01
Chumbo	0,45	1,0	0,05
Cianeto	0,10	0,5	0,05
Cobre	0,009	1,0	0,1
Crómio hexavalente	0,037	0,1	0,05
Ferro	9,6	2,0	-
Manganês	9,8	2,0	-
Mercurio	0,01	0,05	0,001
Níquel	2,6	2,0	0,05
Azoto amoniacal	85,1	10	1,0
Sulfuretos	0,02	1,0	-
Detergentes	3,0	2,0	0,5

Os estudos em toxicologia aquática são, deste modo, qualitativos e quantitativos em relação aos efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos. Os efeitos tóxicos podem incluir efeitos letais (mortalidade) e efeitos sub-letais, alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patologia, bioquímica, fisiologia e comportamento. Os efeitos podem ser expressos através de critérios mensuráveis como o número de organismos mortos, alterações no tamanho e peso, percentagem de inibição de enzima, percentagem de ovos eclodidos, entre outros (Walker et al, 1997). A

toxicologia aquática também está relacionada com as concentrações ou quantidades dos agentes químicos que podem ocorrer no ambiente aquático (água, sedimento ou alimento). A toxicidade de um composto químico depende da exposição, da susceptibilidade do organismo, das características químicas do agente e de factores ambientais.

1.1.1. Factores que afectam a toxicidade

A exposição é o contacto/reacção entre o organismo e o composto químico, sendo os factores mais importantes relativos à exposição: o tipo, duração e frequência de exposição e a concentração do agente químico. Dependendo do tipo de exposição a toxicidade será afectada. Por exemplo, os compostos hidrossolúveis estão mais prontamente disponíveis para os organismos do que aqueles mais lipofílicos que estarão mais fortemente adsorvidos ou de alguma maneira ligados às partículas em suspensão, matéria orgânica ou sistemas biológicos. Assim, os agentes químicos mais hidrossolúveis podem penetrar num organismo através de toda a superfície do corpo, guelras e boca, enquanto os mais lipofílicos têm que ser ingeridos e absorvidos através do tracto gastrointestinal (Rand, 1995).

A duração e a frequência da exposição dos organismos ao agente químico também afectam a toxicidade. Na exposição aguda, os organismos entram em contacto com o composto químico num evento único ou em eventos múltiplos que ocorrem num pequeno período de tempo, geralmente variando de horas a dias. Nas exposições agudas, em que o agente químico é rapidamente absorvido, normalmente os efeitos são imediatos, embora seja possível a produção de efeitos retardados similares aos resultantes da exposição crónica (Rand, 1995). Na exposição crónica normalmente os organismos são expostos a baixas concentrações do agente tóxico que é libertado continuamente ou com alguma periodicidade num longo período de tempo (semanas, meses ou anos). A exposição crónica a compostos químicos pode também induzir efeitos rápidos e imediatos, como os efeitos agudos, em adição aos efeitos que se desenvolvem lentamente (Rand, 1995).

A frequência da exposição também afecta a toxicidade dos compostos químicos. Uma exposição aguda a uma única concentração pode resultar num efeito adverso imediato num organismo, enquanto duas exposições sucessivas

cumulativas iguais à exposição aguda única podem ter efeito pequeno ou nenhum efeito, devido ao metabolismo do organismo entre as exposições ou à aclimação do organismo ao composto (Rand, 1995).

Como já foi mencionado, a toxicidade depende da susceptibilidade dos organismos ao composto químico. Diferentes espécies possuem susceptibilidades diferentes, de acordo com o seu metabolismo, hábitos alimentares, comportamento, fase de desenvolvimento, e muitos outros aspectos.

Indivíduos jovens ou imaturos geralmente são mais susceptíveis aos agentes químicos do que os adultos, provavelmente em função das diferenças no grau de desenvolvimento dos mecanismos metabólicos. Organismos *stressados* devido a exposição prévia a outros tóxicos podem também ser mais susceptíveis aos compostos químicos (Rand, 1995), tal como acontece em ambiente natural, na realidade dos ecossistemas, pois normalmente há a presença simultânea de diferentes produtos.

As características do composto químico também influenciam grandemente a toxicidade como, por exemplo, a sua composição, ou grau de pureza, pois podem estar presentes impurezas ou contaminantes que são consideravelmente mais tóxicos do que o agente propriamente dito podem estar presentes (Klaassen, 2003). Assim, a identidade e a pureza dos compostos químicos são importantes nos testes de toxicidade. As propriedades físicas e químicas como solubilidade, pressão de vapor e pH afectam a biodisponibilidade, persistência, transformação, e o destino do agente químico no ambiente são também factores importantes nos testes de toxicidade. Existem compostos químicos cuja acção é não selectiva, provocando efeitos indesejáveis em numerosas células e tecidos dos organismos aquáticos. Em contrapartida há compostos cujo modo de acção selectivo afecta adversamente apenas um tipo de célula ou tecido, sendo inofensivo para os restantes com os quais podem mesmo ter estado em contacto directo. Assim, o modo de acção dos compostos químicos também afecta a sua toxicidade (Rand, 1995).

Os factores ambientais definidos pelas características bióticas e abióticas também podem alterar a toxicidade de compostos químicos no ambiente aquático. Os factores bióticos incluem o tipo de organismo (alga, insecto ou peixe, etc), estágio de desenvolvimento (larva, juvenil, adulto), tamanho, estado nutricional e de saúde, alterações sazonais no estado fisiológico, influenciando a resposta ao poluente de diferentes maneiras. Os factores abióticos que podem actuar

modificando a toxicidade incluem todas as características físicas e químicas da água que circunda o organismo vivo, como a temperatura, o pH, o teor de oxigénio dissolvido na água, a salinidade e a dureza, o conteúdo de matéria orgânica e material particulado em suspensão e a velocidade de escoamento da água.

1.2 Ensaios de Toxicidade: bioensaio

A contaminação química tem vindo a merecer uma maior atenção na nossa sociedade, devido ao aumento, quase exponencial, do número de substâncias sintetizadas pelo homem no último século. Tomando como base 118 agentes químicos, 103 orgânicos e 15 inorgânicos, considerados mundialmente como prioritários para efeitos de controlo, verifica-se que a maioria deles é persistente e cumulativo no meio aquático. Sendo assim pode-se constatar que os ecossistemas aquáticos podem estar sujeitos aos efeitos dessas substâncias por prolongados períodos de tempo em diferentes locais (Silva, 2002).

Devido à complexidade e à variabilidade apresentada pelos compostos orgânicos e inorgânicos que podem estar presentes num efluente ou no meio hídrico, e como os resultados das análises químicas por si só não retratam o impacto ambiental causado pelos poluentes, pois não demonstram os efeitos sobre o ecossistema, foram desenvolvidos os ensaios de toxicidade, os quais utilizam organismos vivos como indicadores de efeitos tóxicos (Williams et al, 2002). A necessidade de obter informações não reveladas pela simples caracterização física e química tem vindo a estimular a realização destes testes, actualmente considerados análises indispensáveis para se obter um controlo mais abrangente das fontes de poluição das águas. Através dos testes de toxicidade determina-se o potencial tóxico de um agente químico ou de uma mistura complexa, sendo os efeitos desses poluentes medidos através da resposta de organismos vivos (Tisler e Zargoc-Koncan, 1999).

Um tóxico ou contaminante é um agente, que pode produzir uma resposta adversa num sistema biológico, cujas manifestações poderão causar sérios estragos nas estruturas, funções, ou ainda conduzir à morte dos organismos. Embora o ecossistema aquático esteja adaptado a inúmeros mecanismos físicos, químicos e

biológicos, pelos quais as substâncias ou contaminantes podem ser assimilados sem implicações sérias para o bioma endémico, quando os níveis de contaminação assimilados são elevados, a sobrevivência, o desenvolvimento, o crescimento e a reprodução ou bem-estar dos organismos podem ser gravemente afectados (Dias, 2002).

A ideia de que organismos vivos podem indicar a qualidade do meio ambiente é amplamente difundida. Pode detectar-se a poluição de massas de água tanto pela observação da mortalidade dos organismos indicadores, quanto pelo *stress* fisiológico causado pelos poluentes. O *stress* fisiológico pode ser revelado pela diminuição da taxa de crescimento, perda da capacidade reprodutiva ou mudança de comportamento dos organismos (Reginatto, 1998).

Nos E.U.A e na Europa os ensaios de toxicidade para a avaliação da qualidade de águas e de efluentes são utilizados desde o início da década de 70, tendo sido regulamentados a partir dos anos 80. Os primeiros ensaios de toxicidade usavam algas e bactérias como indicadores biológicos e limitavam-se a observar a mortalidade das espécies estudadas. Muitos desses testes têm sido utilizados até hoje, mas têm sido desenvolvidos novos ensaios.

A escolha do ensaio de toxicidade mais adequado depende do objectivo do estudo a ser realizado e deve considerar os seguintes factores: sensibilidade, distribuição geográfica, abundância, importância ecológica e relevância do organismo indicador (Reginatto, 1998).

Os aos objectivos dos estudos de ecotoxicidade, incluem:

- a) determinação da toxicidade de várias substâncias ou de misturas destas;
- b) comparação de sensibilidade específica de vários organismos aos mesmos poluentes;
- c) determinação dos efeitos estimulantes ou inibidores de diferentes substâncias e efluentes;
- d) avaliação da bioacumulação de substâncias;
- e) avaliação da biodegradação de substâncias e de efluentes;

- f) hierarquização de poluentes ou fontes de poluição prioritárias;
- g) avaliação dos efeitos de efluentes e de seus constituintes sobre as estações de tratamento de esgotos e dos meios receptores; monitorização da qualidade das águas;
- h) investigação de descargas de efluentes; especificação de padrões técnicos para tratamento de efluentes.

Temos assim, que os objectivos dos testes de toxicidade aquática de efluentes ou de compostos puros será estimar a concentração de “segurança” ou “sem efeito” dessas mesmas substâncias, sendo definida como a concentração que permite o desenvolvimento normal das comunidades aquáticas nos meios naturais. Os pontos finais considerados nos testes para determinar os efeitos adversos dos tóxicos incluem morte e sobrevivência, diminuição da taxa de reprodução e crescimento, mobilidade, taxa de respiração, histopatologia, actividade enzimática, entre outros. Visto não ser exequível a detecção e/ou medição de todos estes efeitos toxicológicos as observações dos testes estão limitados a apenas alguns efeitos, como a mortalidade, crescimento e reprodução (EPA, 2002). Na Tabela 2, estão apresentadas as formas mais usuais de descrição dos resultados dos ensaios de toxicidade usadas internacionalmente.

Tabela 2 - Medidas-padrão de toxicidade de efluentes e substâncias tóxicas

Medida	Símbolo	Definição
Concentração letal 50	CL₅₀	Concentração que causa a mortalidade de 50% da população de organismos
Concentração efectiva 50	CE₅₀	Concentração que causa 50% de redução no parâmetro subletal observado
Concentração sem efeito observável	CSEO	Concentração na qual a toxicidade já não é estatisticamente significativa
Concentração efectiva mínima	CEM	Menor concentração onde um efeito tóxico estatisticamente significativo é encontrado

Nos últimos anos, tem vindo a aumentar a utilização dos testes de toxicidade que se encontram padronizados, permitindo detectar a toxicidade de efluentes líquidos em organismos aquáticos vivos, permitindo inclusive acções de controlo. Desta forma é possível exercer o mesmo nível de controlo para diferentes efluentes líquidos e para diferentes massas de água.

As desvantagens destes testes estarão no facto dos organismos aquáticos apresentarem sensibilidade diferente às propriedades tóxicas das substâncias químicas. Essas diferenças de uma espécie para a outra ocorrem justamente pela especificidade dos seus metabolismos e pela natureza dos seus “habitats”, que depende das características particulares de cada ecossistema aquático. É recomendável, sempre que possível, avaliar o efeito agudo e crónico em sistemas de escoamento contínuo, com mais do que uma espécie representativa do biota aquático, considerando diferentes níveis tróficos, para que se possa, através do resultado obtido com o organismo mais sensível, estimar com maior segurança o impacto desse efluente no corpo receptor (Silva, 2002).

Há, assim, diversos critérios usados para determinar a aplicabilidade de um teste modelo standard, tais como (Rand, 1995):

- o teste deve ter aceitação generalizada pela comunidade científica;
- o procedimento do teste deve ter uma sólida base estatística, e deve ser reproduzível gerando resultados similares em diferentes laboratórios;
- os resultados devem incluir efeitos de uma vasta gama de concentrações dentro de tempos de exposição realistas. Devem também ser quantificáveis através de interpolação gráfica, análise estatística, ou outros métodos de avaliação quantitativa válidos;
- o teste deve ter alguma capacidade preditiva face a organismos similares;
- os resultados devem ser úteis em avaliação ambiental;
- o teste deve ser económico e de fácil execução;
- o teste deve ser sensível e o mais realista possível na detecção e medição do efeito.

O grau de toxicidade pode ser avaliado através do efeito que a dose ou concentração de uma certa substância causará a determinado organismo num dado intervalo de tempo. Esses efeitos podem ser classificados em agudos e crónicos.

1.2.1 Testes de toxicidade aguda

A toxicidade aguda corresponde a uma resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um estímulo, que se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 horas (Silva, 2002).

A mortalidade é um dos indicadores utilizados para avaliar a resposta dos organismos à toxicidade aguda provocada por um composto ou um efluente.

Deste modo, os testes de toxicidade aguda são ensaios de curta duração que proporcionam rápidas respostas na estimativa dos efeitos tóxicos letais de produtos químicos sobre organismos aquáticos. A mortalidade aguda é facilmente observável daí que tenha sido largamente usada nas primeiras avaliações realizadas a compostos tóxicos puros e efluentes complexos (EPA, 2002). O seu principal objectivo é determinar as Concentrações Letais Médias (CL_{50}) em curto tempo de exposição, que geralmente varia entre 0 a 96 horas. A CL_{50} é definida e padronizada como a concentração do agente tóxico que causa 50% de mortalidade na população de organismos submetidos ao teste.

Quando se observa o efeito do agente tóxico sobre as funções vitais ou funcionais dos organismos teste, utiliza-se o índice de toxicidade CE_{50} , que corresponde à concentração ou dose efectiva que causa efeito em 50% dos organismos testados (Silva, 2002).

Os testes desta natureza disponibilizam informações básicas para outros estudos mais criteriosos como os testes de toxicidade crónica e avaliação de risco ecotoxicológico.

1.2.2 Testes de toxicidade crónica

À medida que os tempos de exposição dos testes de toxicidade aguda foram aumentando, observou-se a diminuição do CL_{50} para muitos compostos. Ao aumentar o tempo dos testes incluiu-se um ou mais ciclos de vida (uma ou mais gerações), observando-se os efeitos de carácter mais subtil dos tóxicos, tais como a redução do crescimento e reprodução, o que permite um resultado mais rigoroso e directo da concentração limite do tóxico (EPA, 2002).

Os testes de toxicidade crónica são, deste modo, ensaios de longa duração que visam o estudo dos efeitos não letais nos organismos aquáticos, a partir da sua exposição prolongada a concentrações sub-letais. Estes efeitos são geralmente avaliados através de análises específicas (histológicas, hematológicas, comportamentais, etc), utilizadas para a detecção de alterações crónicas, tais como: distúrbios fisiológicos, deformidades em tecidos somáticos e/ou gaméticos, alterações no crescimento e reprodução do organismo, entre outras. No entanto, os testes laboratoriais, mesmo usando várias gerações de indivíduos, podem não permitir uma estimativa correcta da concentração limite visto basearem-se num número restrito de espécies, sob condições controladas e estáveis, cujo resultado não contabilizará os efeitos naturais a que os organismos estariam expostos no ambiente (EPA, 2002).

Resumindo, a toxicidade crónica corresponde à resposta a um estímulo prolongado ou contínuo, por um longo período de tempo, podendo abranger parte ou todo o ciclo de vida do organismo.

Foi também evidenciado na literatura que os organismos teste reagem de forma diferente a um mesmo composto, em testes realizados em laboratório ou em meio natural, pelo que a utilização de métodos de ensaio, que se aproximem das condições reais, pode trazer respostas mais precisas do efeito ao ecossistema (Silva, 2002).

O efeito crónico deve ser objecto de verificação quando os testes de toxicidade aguda não forem suficientes para caracterizar um efeito tóxico mensurável.

1.2.3 Regime de exposição

A selecção do tipo de teste dependerá dos objectivos do teste, dos recursos existentes, das necessidades dos organismos-teste, das características do efluente nomeadamente as flutuações da toxicidade (EPA, 2002).

Testes estáticos sem renovação – os organismos-teste são expostos à mesma solução durante o ensaio.

Testes estáticos com renovação (semi-estáticos) – os organismos-teste são expostos a uma nova solução com a mesma concentração da amostra, em cada 24 horas ou noutro intervalo de tempo pré-definido, através da transferência dos organismos-teste de uma câmara de teste para outra ou pela reposição de parte ou totalidade da solução nas câmaras de teste.

Estes dois regimes de exposição apresentam as seguintes vantagens e desvantagens (EPA, 2002):

Testes estáticos sem renovação

Vantagens:

- simples e de baixo custo;
- necessitam de poucos recursos (espaço, humanos e equipamento), permitindo ao laboratório realizar um maior número de testes no mesmo período de tempo;
- necessitam de menor quantidade de efluente necessário do que para o regime estático com renovação, intermitente e contínuo.

Desvantagens:

- a depleção do oxigénio dissolvido (OD) pode resultar de uma elevada carência química de oxigénio (CQO), carência bioquímica de oxigénio (CBO), ou produtos metabólicos;
- a possível perda de tóxicos através da volatilização e/ou adsorção pelos recipientes de ensaio;
- geralmente menos sensíveis do que os de regime estático com renovação, pois as substâncias tóxicas podem sofrer degradação ou ser adsorvidas, reduzindo assim a sua toxicidade aparente.

Testes estáticos com renovação

Vantagens:

- menor a possibilidade de depleção de oxigénio dissolvido devido a elevada CQO e/ou CBO, ou efeitos devido aos produtos metabólicos dos organismos nas soluções-teste;

- menor a possibilidade de perda de tóxicos através da volatilização e/ou adsorção dos recipientes de ensaio;

- os organismos-teste que rapidamente consomem as reservas energéticas são alimentados quando a solução-teste é renovada.

Desvantagens:

- requerem maior volume de efluente do que os testes de regime estático sem renovação;

- geralmente menor possibilidade de variações temporais nas propriedades dos resíduos tóxicos.

Testes contínuos – o meio é continuamente repostos.

O regime de exposição estático sem renovação é apropriado quando é esperado que as concentrações de exposição se mantenham acima dos 80% do valor da concentração inicial, ao longo de todo o tempo do ensaio sem renovação do meio. Em contrapartida, o regime com renovação poderá ser necessário quando é provável que as concentrações assumam valores abaixo de 80% do valor inicial (OECD, 2000).

A renovação da solução-teste após 24 horas de exposição permite, frequentemente, que as concentrações de exposição sejam mantidas e é uma modificação relativamente simples ao procedimento do teste. Geralmente a renovação estática é possível, no entanto há cuidados a ter de modo a não stressar os organismos-teste devido à excessiva manipulação. O regime contínuo deve ser

usado quando o regime semi-estático com renovação em cada 24 horas do período de exposição é incapaz de manter as concentrações de exposição (OECD, 2000).

1.2.4 Níveis tróficos

Uma das limitações encontradas para o emprego de organismos vivos como indicadores de toxicidade é a diferença de sensibilidades apresentada pelos organismos frente aos compostos químicos ou efluentes. Alguns esforços têm sido feitos com o objectivo de encontrar uma espécie de organismo que seja sensível a todos ou a maior parte dos compostos químicos. Porém, tais trabalhos têm mostrado a diferença entre as respostas de toxicidade obtidas para um mesmo composto sobre organismos de espécies diferentes.

Com base nesses estudos, pode-se afirmar que o efeito tóxico de um efluente sobre um organismo de determinada espécie não pode ser simplesmente extrapolado para outras espécies. Sendo assim, a avaliação da toxicidade de efluentes não deve ser realizada apenas por um único ensaio de espécie única (que utiliza apenas um organismo representante de um único nível trófico) (Tisler e Zargoc-Koncan, 1999; Cotman et al, 2004). Para uma avaliação mais adequada recomenda-se o uso de uma bateria de ensaios que utilizem organismos representantes de diferentes níveis da cadeia alimentar [Guimarães et al, 2004].

Na Europa, desde 1993, é obrigatória para a identificação do potencial tóxico de substâncias uma bateria de ensaios com espécies únicas (teste de toxicidade aguda para peixes e crustáceo (dáfnia), teste de inibição do crescimento de algas e bactérias). Na Dinamarca, são exigidos 5 ensaios com espécies de organismos diferentes para a permissão da descarga de efluentes: ensaios com a alga verde (*Rhaphidocellis subcapitata*), a dáfnia (*Daphnia magna*), o peixe-zebra (*Brachydanio rerio*), o macrófito (*Lemna minor*) e com a bactéria luminescente (*Vibrio fischeri*) (Reginatto, 1998).

Tabela 3 – Níveis tróficos das espécies mais utilizadas nos testes de ecotoxicologia
(Adaptado de Shaw e Chadwick, 1998))

Nível Trófico	Descrição	Exemplo	Espécies teste mais utilizadas
1	Produtores primários	Algas	Algas verdes unicelulares
2	Consumidores primários	Dáfnia	<i>Daphnia magna</i>
3	Consumidores secundários (carnívoros)	Aranha d'água	Sem espécies definidas
4	Consumidores terciários (carnívoros)	Peixes	Truta arco-íris
5	Consumidores quaternários (carnívoros)	Aves de rapina	Falcão Peregrino

Além das informações sobre os efeitos causados em diferentes organismos, estes testes podem prever um impacto ambiental, fornecendo informações referentes à ocorrência ou não de bioacumulação e ao transporte e bioamplificação do agente nas cadeias alimentares.

1.2.4.1 Bactérias

As bactérias são microrganismos que podem transformar substâncias orgânicas complexas em elementos dissociados na forma oxidada (mineralização). Esses organismos podem estar presentes em qualquer meio aquático (Silva, 2002).

Os bioindicadores bacterianos produzem uma rápida resposta à toxicidade da água. Enquanto os métodos que usam organismos mais complexos, como por exemplo peixes, podem levar vários dias a produzir resultados mensuráveis, as bactérias indicadoras produzem dados mensuráveis de toxicidade aguda em apenas alguns minutos, tornando-as ideais a uma primeira abordagem sobre a qualidade em sistemas de água. Para além disso, os testes que recorrem a bactérias bioindicadoras podem facilmente ser adaptados a ensaios de campo, algo que não é de todo possível quando se usam outros métodos de avaliação de toxicidade (Reginatto, 1998).

Bactérias, fungos e leveduras são, utilizados como indicadores em função da sua simplicidade, rapidez e baixo custo, não só na monitorização de efluentes, mas também na avaliação do potencial tóxico e biodegradabilidade de novos compostos. O teste de toxicidade com bactérias luminescentes mais difundido é o Microtox[®], considerado simples e reprodutivo. O teste Microtox[®] utiliza a bactéria marinha luminescente *Photobacterium phosphoreum*, actualmente denominada de *Vibrio fischeri* (Shaw e Chadwick, 1998).

Existe um grande interesse no teste com bactérias luminescentes, devido à rapidez de resposta. As principais bactérias são: *Photobacterium phosphoreum* (*Vibrio fischeri*), *Spirillum volutans* e *Beneckeia harveyi* (Rand, 1995).

No teste Microtox[®] a percentagem de inibição é obtida pela razão corrigida pelo ensaio de controlo entre a redução da quantidade de luz e a quantidade de luz remanescente expressa através de um gráfico, em função da concentração da amostra. Daqui pode-se obter o valor de CE₅₀, concentração efectiva da amostra que causa uma redução de 50% na quantidade de luz emitida após os períodos de exposição determinados para o teste. A não ocorrência de decréscimo na produção de luz, pelo organismo teste, significa a ausência de efeito tóxico.

Os ensaios são bastante rápidos, pois após a exposição a uma pequena amostra, o organismo responde rapidamente a um vasto número de substâncias, podendo o efeito ser determinado ao fim de 5, 15 e 30 minutos. As vantagens do ensaio com a bactéria luminescente são, deste modo, a sua simplicidade e a alta reprodutibilidade dos resultados entre diferentes laboratórios, porém, o sistema Microtox[®] é criticado por empregar uma bactéria marinha de pouco significado biológico. Por este motivo, normalmente, este teste é utilizado para medir toxicidade aguda de efluente como parte de uma bateria de ensaios de toxicidade usando diferentes organismos indicadores. Oanh e Bengetsson (1995) utilizaram diferentes ensaios, o teste Microtox[®], a alga *S. capricornutum* e a planta aquática *Lemna aequinoctialis*, utilizadas para avaliar a toxicidade de um efluente da indústria papeleira. A alga *S. capricornutum* foi o organismo mais sensível ao efluente, seguido pela bactéria *V. fischeri*, enquanto *L. aequinoctialis* não apresentou sensibilidade alguma (Shaw e Chadwick, 1998). Qureshi et al, em 1982, concluiu que a medida da luminescência de bactérias era um pobre indicador da toxicidade de efluentes contendo amónia (Tisler e Zargoc-Koncan, 1999), e dados publicados indicam que para além da amónia a *Vibrio fischeri* parece ser pouco sensível a

diversos metais (Tisler e Zargoc-Koncan, 1999, Tisler e Zargoc-Koncan, 2002; Cotman, 2004).

Pelas Figuras 1 a 3 (AZUR, 1998), verifica-se que a relação entre o tempo de exposição e a resposta das bactérias depende da natureza do composto específico que está a ser testado.

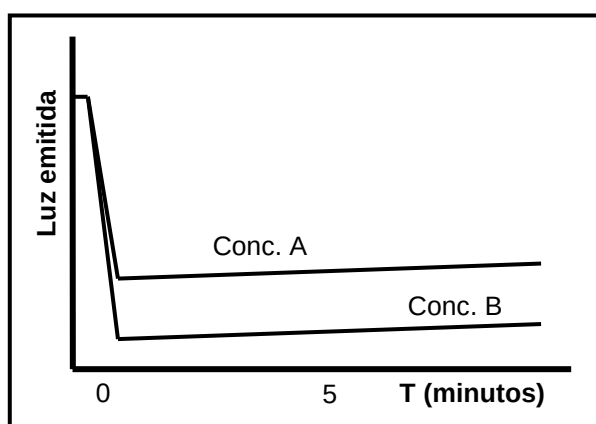


Figura 1 – Curva da luz emitida vs. tempo para o fenol (AZUR, 1998)

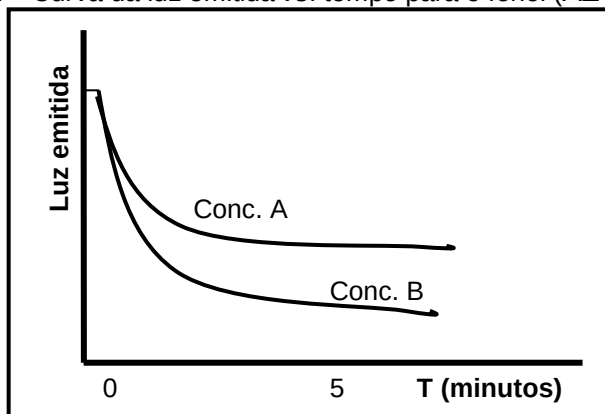


Figura 2 – Curva da luz emitida vs. tempo para compostos orgânicos (AZUR, 1998)

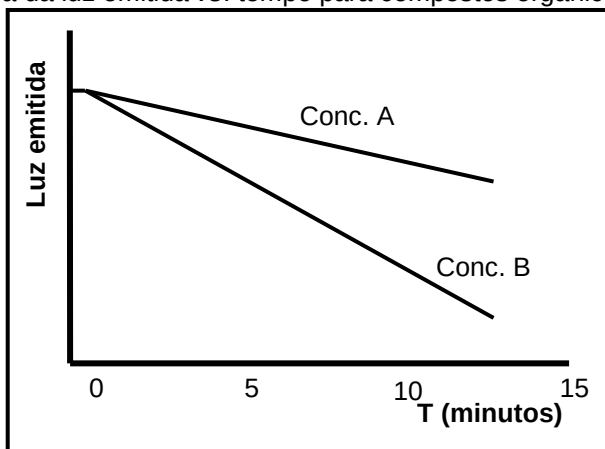


Figura 3 – Curva da luz emitida vs. tempo para metais (AZUR, 1998)
Nestes gráficos a concentração A será inferior à concentração B.

Outras desvantagens citadas na literatura para este teste são:

- a necessidade do aumento da salinidade de algumas amostras, para um nível compatível com as exigências da bactéria utilizada, o que pode favorecer a precipitação de metais pesados;
- a bioluminescência das bactérias diminui com o tempo, requerendo um controle preciso durante a duração do teste e limitando o número de amostras que podem ser processadas simultaneamente;
- a cor do efluente a ser testado influencia na medida da luz emitida pelas bactérias marinhas.

O método de determinação da inibição da luminescência emitida pela bactéria *Vibrio fischeri* encontra-se descrito nas Normas ASTM D 5660-96, DIN 38 412-34 e AFNOR T90-320.

1.2.4.2 Nível trófico 1

A utilidade das algas como organismo-teste tem por base o seu curto ciclo de vida, facilitando os estudos de exposição com várias gerações, além das altas taxas de crescimento, da facilidade em manter culturas no laboratório e da capacidade de crescer em meios sintéticos bem definidos. A origem dos bioensaios com algas é atribuída ao trabalho do Prof. Martinus Beijerinck (1890), o primeiro a obter uma cultura pura de algas – imprescindível para os métodos de bioensaios. Desde então, têm ocorrido grandes avanços no desenvolvimento de meios de cultura apropriados, de métodos de isolamento e cultura das espécies, bem como na elaboração de modelos (Vidotti e Rollemberg, 2004). Os ensaios com algas são fonte de informações quantitativas importantes sobre a disponibilidade das substâncias químicas, nutrientes ou substâncias potencialmente tóxicas e seus efeitos nos ecossistemas. É interessante observar que a informação total obtida nos ensaios com algas supera o significado da soma de todos os dados parciais sobre a abundância relativa dos componentes individuais do sistema aquático, uma vez que a análise química informa a concentração das substâncias presentes, mas não fornece conhecimento da sua influência na água, meio de crescimento para os diferentes organismos (Rand, 1995). Os ensaios com algas abrem a possibilidade de

uma combinação de medidas físicas, químicas e biológicas, que resulta em informações importantes. A partir dos testes de toxicidade com algas, as substâncias químicas podem ser classificadas quanto à sua toxicidade ambiental, auxiliando a avaliação do risco ambiental para os sistemas naturais.

A escolha de um ensaio de toxicidade que utiliza algas como organismo indicador deve-se não apenas ao seu pioneirismo como indicadores de toxicidade e a sua reconhecida importância ecológica, mas também ao grande número de questões levantadas na literatura envolvendo a optimização desse ensaio (Vidotti e Rollemberg, 2004).

Os primeiros estudos usando algas como organismo teste foram realizados na década de 50. Eles eram relacionados com a avaliação da qualidade de águas superficiais em relação à eutrofização. Já em 1956, Bringmann e Kühn utilizaram algas como indicadores de eutrofização de águas superficiais e, alguns anos mais tarde, os mesmos pesquisadores usaram um conjunto de algas, bactérias e microcrustáceos para detectar a presença de substâncias tóxicas em efluentes (Reginatto, 1998).

Nos Estados Unidos, em 1969, os primeiros trabalhos de padronização do ensaio com algas tiveram início pela divulgação do “Provisional Algal Assay Procedure” (PAAP), um método provisório do ensaio com algas. Dois anos mais tarde, foi publicado o primeiro método padronizado do ensaio com algas denominado “Algal Assay Procedure: Bottle Teste” (AAP).

Em 1972, laboratórios do norte da Europa reuniram-se para comparar os métodos utilizados no estudo da eutrofização de águas superficiais. Os resultados obtidos pela realização desse trabalho serviram, posteriormente, para a padronização do método do teste de toxicidade com algas.

A partir da década de 80, vários métodos, ainda utilizados actualmente, foram padronizados. Dos métodos existentes, os mais difundidos são os sugeridos pela “Organization for Economic Cooperation and Development” (OECD), “European Economic Community” (EN), e pela “International Standard Organization” (ISO), sendo os dois últimos iguais. Ainda com a padronização dos métodos por órgãos internacionais, alguns países desenvolveram a sua própria metodologia, apresentando algumas variações entre si, como por exemplo nos Estados Unidos, onde o método utilizado é sugerido pela “United States Environmental Protection

Agency – U.S.EPA” (APHA, 1992) e na Alemanha pelo “Deutsches Institut für Normung” (DIN 38412 Teil 9, 1989; DIN 38412 Teil 33, 1991) (Reginatto, 1998).

Todos os métodos padronizados possuem o mesmo princípio: o crescimento das algas em diferentes concentrações da água residual ou agente químico a ser avaliado, ao qual é adicionado uma determinada quantidade de solução nutriente. Após um determinado período de tempo, o crescimento da alga é comparado com um controle e poderá ser ou não inibido, dependendo da concentração e da acção tóxica do agente analisado. As diferenças entre os métodos encontram-se, essencialmente, na escolha das espécies de algas, nos métodos para a determinação da sua concentração, na composição dos meios de cultura e na forma de exprimir os resultados (EPA, 2002). As espécies recomendadas em ensaios de toxicidade são as algas verdes de água doce *S. capricornutum* (Figura 4) e a *S. subspicatus*, ambas pertencentes à ordem *Chlorococcales*.



Figura 4 – *Selenastrum capricornutum*

Quanto aos métodos sugeridos para a determinação da concentração da alga, a norma ISO 8692 recomenda que a medida seja feita no mínimo uma vez por dia através da contagem de células por microscopia, turbidimetria, fluorescência ou absorvância. Entretanto, a agência de protecção ambiental americana –U.S.EPA recomenda a medida diária de biomassa nos 5 primeiros dias de crescimento da alga, pela determinação de massa seca ou pelos mesmos métodos recomendados pelas normas internacionais (EPA, 2002).

A principal vantagem da padronização dos ensaios é a possibilidade de comparação dos resultados entre laboratórios do mundo inteiro. Porém, os métodos padronizados diferem, por exemplo, nos métodos de determinação da concentração da alga, nas concentrações de inóculo, no controle de pH, etc.

Entretanto, vários autores alertaram para o facto de que o uso de diferentes parâmetros para avaliar o crescimento da alga pode fornecer diferentes respostas de toxicidade para uma mesma amostra e, nesse caso, não podem ser numericamente comparados entre si. Segundo Tisler e Zargoc-Koncan, em 2002, ao avaliar a toxicidade do arsénio na bactéria luminescente *V. fischeri*, na alga verde *S. subspicatus* e no cladóceros *D. magna*, concluíram que a *D. magna* é a espécie teste

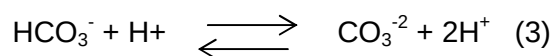
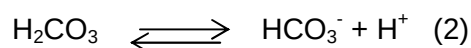
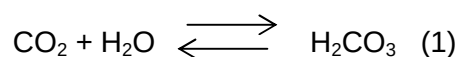
mais sensível, seguida pela alga (sendo a determinação da biomassa um “*endpoint*” mais sensível do que a taxa de crescimento), e pela bactéria.

Deste modo, quanto às formas de exprimir os resultados, o método descrito pela ISO menciona que o resultado de toxicidade pode ser obtido tanto pelo cálculo da área sob a curva de crescimento da alga, como pela determinação da sua taxa de crescimento diário num determinado período de tempo. Como forma de distinguir os resultados é recomendado que os valores de CE_{50} devem ser especificados como C_bE_{50} , se baseados na área da curva de crescimento e como C_rE_{50} , se baseados na taxa de crescimento da alga num determinado intervalo de tempo.

Uma estratégia fundamental usada pelos testes de toxicidade é a tentativa de reproduzir em laboratório as condições naturais em que vivem os organismos teste, para indicarem, com a maior fidelidade possível, os efeitos tóxicos sobre estas espécies. Nesse ponto, localiza-se um dos maiores problemas encontrados, tanto na realização do ensaio com algas, como com outros organismos. Segundo Pederson e Peterson (1996), as restrições que o sistema teste impõe à avaliação da toxicidade devem ser cuidadosamente avaliadas antes que sejam estabelecidos protocolos para o uso dos mesmos (Reginatto, 1998). Para Lin et al (2005), actualmente nenhum dos protocolos de testes de toxicidade em algas é adequado a avaliar a toxicidade de compostos químicos orgânicos.

Os factores ambientais, representados por parâmetros físico-químicos da água, como o pH, a temperatura, a dureza e a concentração salina, têm sido alvo de atenção nos últimos 10 anos para a realização dos ensaios com algas, mas os protocolos oficiais ainda não especificam adequadamente esses problemas.

Um ponto muito discutido é a variação de pH durante a realização do ensaio com algas. Considerando que o pH de águas naturais varia, normalmente, entre 6 e 9, essa faixa deve ser observada durante a realização do ensaio com algas (Reginatto, 1998). Porém, o pH do meio onde é realizado o teste pode sofrer alterações devido ao metabolismo das algas, as quais requerem CO_2 como fonte de carbono para a realização da fotossíntese.

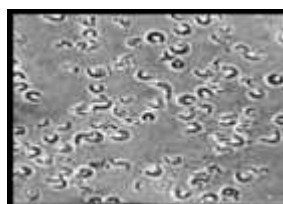


A forma predominante do CO_2 no meio depende do pH do mesmo, sendo que em pH ácido é encontrado em maior abundância na forma de CO_2 . Aproximadamente entre pH 7 e 10, encontra-se quase apenas na forma de bicarbonato, enquanto que acima de pH 10 apresenta-se, na maior parte, como carbonato (Lin et al, 2005).

No ensaio com algas, o CO_2 requerido pela alga pode ser proveniente da atmosfera pela dissolução do CO_2 promovida pela agitação dos frascos-teste ou pelo consumo de carbono inorgânico, o qual é adicionado ao meio de cultura na forma de NaHCO_3 .

Durante a fase exponencial de crescimento, o consumo de CO_2 pela alga é tão intenso que a concentração de CO_2 proveniente da atmosfera nem sempre é suficiente. Nesse caso, parte do carbono consumido será derivado do carbonato ou bicarbonato presente no meio, o que provocará um aumento do pH. O aumento excessivo do pH resulta em prejuízo da própria espécie, pois em pH alcalino o carbono encontra-se na forma de carbonatos insolúveis (equação 3) e portanto não disponível para a alga.

Além das algas, algumas espécies de plantas, também representantes dos produtores primários são, frequentemente, usadas como organismos indicadores de toxicidade. A planta vascular da espécie *Lemna spp* é muito utilizada e os géneros *L. minor* (Figura 5), *L. gibba* e *L. perpusilla* são as espécies-teste mais encontradas na literatura (EPA, 2002).



Figuras 5 e 6 – *Lemna minor* e *R. subcapitata*

Entretanto, uma das desvantagens da utilização das plantas vasculares em ensaios de toxicidade é que algumas delas possuem a capacidade de acumular substâncias tóxicas. Esta característica confere às plantas vasculares uma menor sensibilidade aos efeitos tóxicos do que as algas. Pedersen e Petersen (1996) verificaram a variação de sensibilidade de organismos aquáticos frente a diferentes agentes tóxicos. Nesse estudo a alga *R. subcapitata* (Figura 6) apresentou sensibilidade 8 vezes maior à dietanolamina do que o macrófito *L. minor* (Reginatto, 1998).

1.2.4.3 Nível trófico 2

Para ecossistemas aquáticos é quase sempre utilizada a pulga d'água *Daphnia magna* (Figura 7), enquanto para sistema marinhos usa-se a *Artemia salina* (Figura 8). Ambas as espécies são facilmente cultivadas em laboratório, principalmente a *Artemia* visto que os seus ovos podem ser secos e armazenados por longos períodos de tempo (Reginatto, 1998).

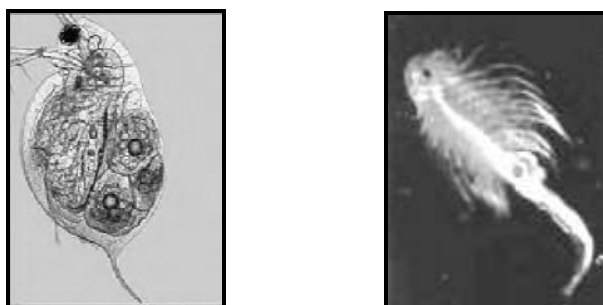
Os microcrustáceos *Daphnia* e *Artemia* são considerados consumidores primários ou secundários, e constituem um importante elo entre os níveis inferiores e superiores da cadeia alimentar de um ecossistema.

As dáfias, pertencentes à ordem Cladocera (Crustacea-Branchiopoda), exercem um papel fundamental na comunidade zooplantónica (Guimarães et al, 2004).

Este microcrustáceo está presente em todos os ambientes de água doce e é facilmente encontrado em lagos, represas, rios e planícies inundadas. Conhecido popularmente como pulga d'água, mede cerca de 0,5 a 5,0 mm de comprimento e alimenta-se basicamente de algas, bactérias, protozoários e detritos orgânicos, os quais são capturados por processo de filtração (comum nos microcrustáceos). O ciclo de vida deste organismo, pode variar de três a cinco semanas, sendo a sua população composta unicamente por fêmeas, tendo como forma reprodutiva a partenogénese, isto é, assexuada.

A *Artemia salina* é um pequeno crustáceo marinho característico de poços e pequenos lagos de água salgada, apresentando uma grande adaptação às

variações de salinidade. Os nauplius da *Artemia salina* são utilizados internacionalmente em testes de toxicidade por apresentarem características vantajosas para este tipo de testes: os organismos adultos têm um grande potencial reprodutivo; são de fácil aquisição no mercado e manutenção em laboratório; os cistos (ovos) são de fácil eclosão e os testes apresentam boa reprodutibilidade (Silva, 2002).



Figuras 7 e 8 – Daphnia e Artemia

O teste é semelhante ao do nível trófico anterior, no entanto para o nível trófico 2 o parâmetro medido não é o crescimento (biomassa), mas sim o efeito do químico a testar sobre o organismo teste.

Os recipientes de ensaio (com água arejada para *Daphnia* ou água do mar para a *Artemia*) são preparados com meio de cultura contendo concentrações crescentes do tóxico a testar (e um controlo sem o tóxico). A cada recipiente são adicionados 5 organismos teste, sendo incubados, na presença de luz, durante tempo determinado. Após o período de incubação é determinado o número de indivíduos imobilizados, devido à dificuldade de determinar a morte ou não dos organismos a imobilidade é considerada o “*endpoint*”. Este teste é usualmente feito em triplicado devido ao pequeno número de organismos teste que são usados (Shaw e Chadwick, 1998).

O CE_{50} é obtido relacionando a proporção (usualmente como percentagem do total) de organismos teste imobilizados com a concentração do tóxico testado.

1. Teste Toxicidade Aguda CE_{50} : as *Daphnias* são expostas ao tóxico durante 24 horas, após as quais é determinada a imobilização.
2. Teste de Reprodução: as dáfrias são expostas ao tóxico durante 14 dias. É calculado o aumento do número de dáfrias sendo determinado o efeito do tóxico na reprodução.

Para se determinar a gama de concentração que deverá ser utilizada no teste, deve-se verificar as concentrações de utilização do produto e as observadas em campo. Quando se trata de efluentes, amostras ambientais e extractos são normalmente avaliados nas concentrações de 1%, 10%, 30%, 50%, 70% e 100% v/v, de forma a tentar obter resultados de inibição distribuídos entre 0 e 100% (Silva, 2002).

Na realização dos testes, as análises físico-químicas para determinação de pH, cloretos, oxigénio dissolvido (OD), devem ser feitas para controlar as condições básicas de exposição dos organismos teste e subsidiar a interpretação dos resultados.

1.2.4.4 Nível trófico 3

Os organismos representativos do nível trófico 3 não estão incluídos nos testes de toxicidade ambiental, isto devido à sua bioquímica e fisiologia e, também ao facto de as suas respostas aos químicos tóxicos serem semelhantes aos do nível trófico 4 (Shaw e Chadwick, 1998).

1.2.4.5 Nível trófico 4

São organismos consumidores, componentes da comunidade nectónica, constituem o nível superior na cadeia alimentar de um ecossistema aquático e têm grande interesse económico.

O nível trófico 4 é representado pelos peixes. Os peixes mais utilizados pelos toxicologistas ambientais são a truta arco-íris (*Salmo gairdneri*, actualmente de nome científico *Oncorhynchus mykiss* uma espécie muito sensível e com necessidades muito específicas, designadamente água pura e bem oxigenada, que se apresenta na Figura 9) e *Lepomis macrochirus* (peixe norte americano de lagos e rios lênticos), mas muitas outras espécies da Tabela 4 podem ser também usadas (Shaw e Chadwick, 1998). Os peixes são expostos ao tóxico em diversas concentrações e a mortalidade monitorizada determinando-se o CL₅₀ (concentração letal para 50% da população).

Tabela 4 – Espécies de peixes utilizadas em testes de ecotoxicologia
(Shaw e Chadwick, 1998)

Espécie	Ambiente
<i>Pimephales promelas</i>	Estuários
<i>Brachidanio rerio</i> (peixe zebra)	Lótico: águas quentes/limpas
<i>Cyprinus carpio</i> (carpa)	Lêntico: águas frias/limpas
<i>Lebistes reticulatus</i>	Lêntico: águas quentes/limpas
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (truta arco-íris)	Lótico: águas frias/limpas
<i>Lepomis macrochirus</i> (peixe guelra-azul)	Lêntico/Lótico: águas frias/limpas

Os peixes, por serem considerados um importante recurso alimentar, podem ser a principal via de contaminação de metais pesados para o homem, donde a sua importância como organismos indicadores, utilizados em bioensaios para verificar a presença ou a ausência de efeitos aparentes dos contaminantes sobre os organismos vivos (Silva, 2002).

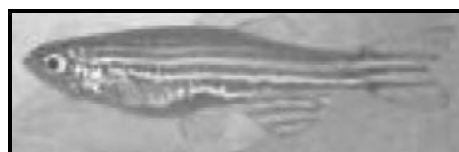


Figura 9 –Truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) **Figura 10** –Peixe zebra (*Brachidanio rerio*)

O aumento da contaminação nos ambientes aquáticos evidencia-se pela redução da população de animais residentes e espécies migratórias de peixes.

1.2.4.6 Nível trófico 5

Os consumidores quaternários estão no topo da cadeia alimentar. Em termos ecológicos estas serão as espécies que estão em maior risco face aos efeitos negativos dos poluentes no ambiente. O problema que se apresenta é que são normalmente espécies raras, como o falcão peregrino (*Falco peregrinus*) que é uma espécie em perigo não podendo por isso ser usada em testes de toxicidade. Por esta razão usam-se espécies da mesma família mas não pertencentes ao nível trófico 5 para representarem este mesmo nível trófico (Shaw e Chadwick, 1998).

1.3 Ecotoxicidade: enquadramento legal

1.3.1 Substâncias químicas perigosas e avaliação de risco

Desde meados dos anos 80, a Comunidade Europeia tem vindo a desenvolver esforços no que diz respeito à avaliação dos riscos potenciais dos químicos. Em 1993, foi adoptado o **Regulamento (CEE) nº 793/93** para avaliação e controlo dos riscos associados às substâncias químicas existentes.

As substâncias químicas existentes são as comercializadas no mercado europeu entre 1 de Janeiro de 1971 e 18 de Setembro de 1981, e encontram-se listadas no EINECS (Inventário Europeu das Substâncias Químicas Existentes). Os fabricantes ou importadores das substâncias que se encontram no EINECS (quando a quantidade da substância é superior a 1 000 toneladas ano), devem fornecer à Comissão Europeia vários dados relativos às substâncias, entre as quais se destacam:

- dados sobre o percurso e o destino final da substância no ambiente;
- dados sobre a ecotoxicidade da substância;
- dados sobre a toxicidade aguda e sub-aguda da substância.

Qualquer substância colocada no mercado europeu depois de 18 de Setembro de 1981 é considerada uma nova substância sujeita a notificação e consequentemente listagem no ELINCS (Lista das Substâncias Químicas Notificadas). Assim, a União Europeia desenvolveu um vasto sistema normativo neste âmbito:

- notificação de novas substâncias (**Directiva 79/831/CEE** do Conselho);
- classificação, embalagem e rotulagem de substâncias perigosas (**Directiva 67/548/CEE** do Conselho);
- avaliação dos riscos potenciais das novas substâncias, para a saúde humana e para o ambiente (**Directiva 93/67/CEE** da Comissão).

Os textos de direito comunitário acima referidos foram transpostos para a ordem jurídica nacional pelo **Decreto-lei nº 82/95**, de 22 de Abril e pelo **Decreto-lei nº 260/2003**, de 21 de Outubro, regulamentado pela **portaria nº 732-A/96** de 11 de Dezembro, que aprova o regulamento para a notificação de substâncias químicas e para a classificação, embalagem e rotulagem de substâncias perigosas.

Em virtude da necessidade de transposição de normas comunitárias, determinadas por novas exigências de adaptação ao progresso científico e técnico, a legislação actual é composta por:

- **Portaria 732-A/96**, 11/ Dezembro
- **Decreto-Lei nº 330-A/98**, 02/ Novembro
- **Decreto-Lei nº 209/99**, 11/ Junho
- **Decreto-Lei nº 195-A/2000**, 22/ Agosto
- **Decreto-Lei nº 222-A/2001**, 08/ Agosto
- **Decreto-Lei nº 154-A/2002**, 11/ Junho

Desta legislação, descreve-se de seguida a de maior relevância:

1.3.1.1 Portaria 732-A/96

A Portaria 732-A/96 tem por objectivo estabelecer as regras a que devem obedecer a notificação de novas substâncias químicas e a classificação, embalagem e rotulagem de substâncias perigosas para o homem e o ambiente, quando colocadas no mercado.

O artigo 3º da portaria nº 732-A/96 define como “perigosas para o ambiente” as substâncias e preparações que, se presentes no ambiente, representam ou podem representar um risco imediato ou diferido para um ou mais compartimentos do ambiente, e o artigo 26º tem em vista a “avaliação de risco: ambiente” em que a autoridade competente deve efectuar uma avaliação de risco associado aos respectivos efeitos ambientais, sendo o primeiro passo a identificação de perigo, após o qual se procede a: i) uma avaliação dose (concentração)-resposta (efeito); ii)

uma avaliação da exposição nos compartimentos ambientais (aquático, terrestre e atmosférico) que possam estar expostos à substância. Esta portaria inclui vários anexos, dos quais se destacam:

- **Anexo I** – Lista das substâncias perigosas;
- **Anexo II** – Símbolos e indicações de perigo das substâncias e preparações perigosas – em que se inclui o símbolo “Perigoso para o Ambiente”

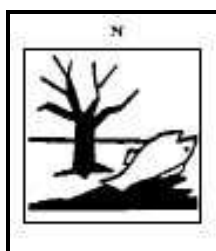


Figura 11 – Símbolo “Perigoso para o Ambiente”

- **Anexo III** – Natureza dos riscos específicos atribuídos às substâncias e preparações perigosas:

R50 – muito tóxico para organismos aquáticos

R51 – tóxico para organismos aquáticos

R52 – nocivo para organismos aquáticos

R53 - pode causar efeitos nefastos para o ambiente

R54 – tóxico para a flora

R55 – tóxico para a fauna

R56 – tóxico para organismos do solo

- **Anexo IV** – Conselhos de prudência relativos às substâncias perigosas (frases “S”):

S29 – Não deitar os resíduos no esgoto

- **Anexo V** – Parte C: Métodos para a determinação da ecotoxicidade

- C.1. Toxicidade aguda para os peixes
- C.2. Toxicidade aguda para a *Daphnia*
- C.3. Teste de inibição para algas

Os métodos descritos neste anexo fundamentam-se nos que são reconhecidos e recomendados pelas instituições internacionais competentes, em particular a OCDE.

1.3.1.2 Decreto-Lei nº 222/2001

O D.L. nº 222/2001 tem por objectivo a alteração do Regulamento para a notificação de substâncias químicas e para a classificação, embalagem e rotulagem de substâncias perigosas, aprovado pela Portaria nº 732-A/96, de 11 de Dezembro, com redacção dada pelo Decreto-Lei nº 330-A/98, de 2 de Novembro, pelo Decreto-Lei nº 209/99, de 11 de Junho, e pelo Decreto-Lei nº 195-A/2000, de 22 de Agosto, transpondo para ordem jurídica interna a Directiva nº 2000/21/CE, da Comissão, de 25 de Abril, que introduz uma isenção de notificação para os produtos fitofarmacêuticos e biocidas.

Este Decreto-lei apresenta no Anexo XIII os “Critérios gerais de Classificação e de Rotulagem das Substâncias e Preparações Perigosas”, sendo o ponto 5 “Classificação com Base em Efeitos no Ambiente”, cuja introdução aponta como principal objectivo alertar para os perigos que as substâncias representam para os ecossistemas, concretamente os ecossistemas aquáticos.

Segundo este Decreto-lei as substâncias serão classificadas de perigosas para o ambiente e caracterizadas pelo símbolo “N” e pela indicação de “perigoso para o ambiente” e por frases indicadoras de risco:

R50 e R53 - toxicidade aguda

- CL₅₀ às 96 h (peixes) ≤ 1 mg/L
- ou - CE₅₀ às 48 h (*Daphnia*) ≤ 1 mg/L
- ou - Cl₅₀ às 72 h (algas) ≤ 1 mg/L

R51 e R53 – toxicidade aguda

- CL₅₀ às 96 h (peixes) 1 mg/L < CL₅₀ ≤ 10 mg/L
- ou - CE₅₀ às 48 h (*Daphnia*) 1 mg/L < CE₅₀ ≤ 10 mg/L
- ou - Cl₅₀ às 72 h (algas) 1 mg/L < Cl₅₀ ≤ 10 mg/L

R52 e R53 – toxicidade aguda

- CL₅₀ às 96 h (peixes) 10 mg/L < CL₅₀ ≤ 100 mg/L
- ou - CE₅₀ às 48 h (*Daphnia*) 10 mg/L < CE₅₀ ≤ 100 mg/L
- ou - Cl₅₀ às 72 h (algas) 10 mg/L < Cl₅₀ ≤ 100 mg/L

1.3.1.3 Decreto-Lei nº 154-A/2002

O Decreto-Lei nº 154-A/2002 altera o Regulamento para a notificação de substâncias químicas e para a classificação, embalagem e rotulagem de substâncias perigosas, aprovado pela Portaria nº 732-A/96, na redacção dada pelos D.L nº 330-A/98, D.L. nº 209/99, D.L. nº 195-A/2000 e D.L. nº 222/2001, transpondo para o ordenamento jurídico interno a Directiva nº 2001/59/CE, do Conselho, de 6 de Agosto, que altera e adapta ao progresso técnico a Directiva nº 67/548/CE, do Conselho, de 27 de Julho.

O ponto 2 do artigo 5º do Decreto-lei nº154-A/2002 adita à parte C do anexo V do Regulamento para a Notificação de Substâncias Químicas e para a Classificação, Embalagem e Rotulagem de Substâncias Perigosas, os métodos constantes dos anexos 4.C e 4.I

Anexo 4.C: - **C.14** – “Ensaio de Crescimento Juvenil de Peixes”, inclui:

- Apêndice 1 “Espécies de Peixes Recomendadas para
Ensaio e Condições de Ensaio Apropriadas”

- Apêndice 2 “Algumas Características Químicas de uma Água de Diluição Aceitável”

- Apêndice 3 “Séries Logarítmicas de Concentração Apropriadas para Ensaio de Toxicidade”

Anexo 4.I - C.20 – “Ensaio sobre a Reprodução de *Daphnia magna*”, e respectivos apêndices.

No ponto 6.2 do Anexo 5, “Recomendações de prudência relativas a substâncias e preparações”, a frase S29 “Não deitar os resíduos no esgoto” inclui âmbito de aplicação e critérios de utilização, sendo obrigatória para substâncias e preparações perigosas para o ambiente e caracterizadas pelo símbolo “N”.

1.3.2 Protecção das águas contra a poluição por substâncias perigosas

As estratégias de controlo da poluição preconizadas nas diversas Directivas Comunitárias adoptadas ao longo dos anos têm tido uma evolução gradual desde o estabelecimento de normas de qualidade da água e valores-limite de emissão de poluentes.

Reconhecendo a insuficiência da legislação comunitária em vigor relativamente à protecção das águas, a Comissão Europeia apresentou a Proposta de **Directiva-Quadro da Água** em Junho de 1997, adoptando um conjunto de mecanismos adicionais aos que estavam já estabelecidos, para o controlo da poluição por substâncias perigosas para o ambiente aquático, nomeadamente na **Directiva 76/464/CEE**. No entanto, só na proposta alterada da Comissão, de 30 de Novembro de 1999, foi prevista a integração na **Directiva-Quadro da Água** das obrigações estabelecidas pela referida **Directiva 76/464/CEE**, com a actualização e ampliação das obrigações e a progressiva revogação desta Directiva.

No caso específico da poluição química, além das Directivas relativas à água, devem ser igualmente consideradas as medidas estabelecidas e as especificações técnicas contidas na legislação orientadas para o produto químico em si, nomeadamente as relacionadas com a avaliação do risco de certas substâncias ou

preparações perigosas para o ambiente, sua classificação e a limitação do seu uso e comercialização (**Directivas 67/548/CEE** e **93/67/CEE**, referidas em 1.3.1). Estas medidas e especificações técnicas podem servir para complementar as medidas estabelecidas com vista à protecção das águas e para complementar os critérios de selecção e identificação de substâncias perigosas que devem ser sujeitas a um controlo prioritário.

Há uma crescente consciencialização de que a redução, ou mesmo a eliminação, da poluição química terá que integrar as normas ambientais, directamente estabelecidas para as águas, e as normas estipuladas para os produtos químicos.

1.3.2.1 Directiva 76/464/CEE

A **Directiva 76/464/CEE**, relativa à protecção do meio aquático contra a poluição causada por determinadas substâncias perigosas, é o primeiro instrumento jurídico que visa a protecção integrada das águas contra a poluição química. Esta Directiva, que está transposta para o direito interno pelo **Decreto-Lei nº 236/98** de 1 de Agosto, estabelece a obrigação de os Estados-membros estabelecerem as medidas adequadas para a eliminação da poluição por substâncias e grupos de substâncias incluídos na Lista I e para a redução da poluição por substâncias e grupos de substâncias incluídos na Lista II. Estas substâncias são seleccionadas com base em critérios de toxicidade, persistência e bioacumulação.

O controlo da poluição é feito através de uma autorização prévia para a descarga de efluentes contendo substâncias das Listas I e II no meio hídrico de superfície, devendo esta autorização estabelecer normas de emissão. Estas normas de emissão são expressas em termos da concentração máxima da substância e quantidade máxima durante um ou mais períodos de tempo.

A selecção das substâncias foi feita pela Comissão, que apresentou uma Comunicação ao Conselho em 1982 propondo um universo de 129 substâncias candidatas à Lista I. Posteriormente, por Resolução do Conselho, foram adicionadas 3 substâncias resultando um conjunto de 132, do qual 18 substâncias foram regulamentadas por Directivas-filhas e constituem a Lista I. As restantes 114

substâncias passaram a integrar a Lista II, juntamente com outras substâncias e famílias que já faziam parte desta lista.

Tabela 5 – Directivas-filhas e correspondente legislação nacional

Directiva	Decreto-Lei	Designação
76/464/CEE	236/98 , 1 de Agosto 46/94 , 22 de Fevereiro	Poluição do meio aquático causada por determinadas substâncias perigosas
82/176/CEE	431/99 , 22 de Outubro	Descargas de mercúrio do sector da electrólise de cloretos alcalinos
84/156/CEE	52/99 , 20 de Fevereiro	Descargas de mercúrio de sectores que não o da electrólise de cloretos alcalinos
83/513/CEE	53/99 , 20 de Fevereiro	Cádmio
84/491/CEE	54/99 , 20 de Fevereiro	Hexaclorociclohexano
86/280/CEE	56/99 , 20 de Fevereiro	Tetracloroto de carbono, DDT, pentaclorofenol
88/347/CEE	56/99 , 20 de Fevereiro	Aldrina, dieldrina, endrina, isodrina, hexaclorobenzeno, hexaclorobutadieno, clorofórmio
90/415/CEE	390/99 , 30 de Setembro	1,2-dicloroetano, tricloroetileno, percloroetileno, triclorobenzeno

Para as substâncias da Lista II, o **Decreto-Lei nº 506/99**, de 20 de Novembro, tem como objectivo a redução da poluição do meio aquático causada por substâncias perigosas pertencentes à referida lista e constante do Anexo XIX do referido **Decreto-Lei nº 236/98**, fixando normas de qualidade da água para algumas das referidas substâncias, presentes ou potencialmente presentes nas águas, e consideradas prioritárias em função da respectiva toxicidade, persistência e bioacumulação.

A **Directiva-Quadro** 2000/60/CE integra e revoga progressivamente a **Directiva 76/646/CEE**. Com a entrada em vigor da **Directiva-Quadro**, o artigo 6º é revogado, sendo a lista de “substâncias candidatas à Lista I” (132 substâncias) substituídas pela lista de substâncias prioritárias. As 114 “substâncias candidatas à Lista I” fazem parte da Lista II e, como tal, estão sujeitas a programas de redução de emissões, que deverão ser estabelecidos pelos Estados-membros, nos termos do Artigo 7º da **Directiva 76/464/CEE**.

1.3.2.2 Directiva 96/61/CE

A **Directiva 96/61/CE** relativa à protecção e ao controlo integrados da poluição (IPPC) tem como objectivo a protecção do ambiente globalmente, através do estabelecimento de medidas para prevenir ou, nas situações em que não for viável, reduzir, de forma integrada, as emissões de determinadas instalações para a atmosfera, água e solo, incluindo medidas específicas de controlo de resíduos.

A Directiva IPPC estipula que as licenças devem especificar valores-limite de emissão para as substâncias poluentes, especialmente as constantes no seu Anexo III, susceptíveis de serem emitidas em quantidades significativas pela instalação em causa. Estes valores-limite de emissão devem ser estabelecidos com base nas melhores técnicas disponíveis e ter em consideração aspectos como as características técnicas da instalação, a localização geográfica e as condições ambientais do local.

As substâncias incluídas no Anexo III, no caso específico da água, coincidem na sua maioria com as substâncias incluídas nas Listas I e II da **Directiva 76/464/CEE**. Na ausência de valores-limite de emissão definidos no contexto da Directiva IPPC, aplicam-se às instalações especificadas no Anexo I os valores-limite de emissão fixados nas normas comunitárias pertinentes. No caso das substâncias da Lista I, são adoptados, no contexto da Directiva IPPC, os valores-limite de emissão dessas substâncias estabelecidos nas Directivas-filhas da **Directiva 76/464/CEE**.

1.3.2.3 Lei nº 58/2005

A Directiva 2000/60/CE, de 23 de Outubro de 2000, vulgarmente conhecida por **Directiva-Quadro da Água**, constitui o instrumento base de uma nova Política da Água na União Europeia. Esta Directiva estabelece de forma integrada e coerente um sistema para a protecção e utilização sustentável das águas de superfície e subterrâneas no espaço comunitário, através de uma abordagem comum e com princípios, objectivos e medidas coordenadas entre si. O Lei nº 58/2005 aprova a **Lei da Água**, transpondo para ordem jurídica nacional a Directiva 2000/60/CE e estabelece as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas. A Declaração de Rectificação nº 11-A/2006, de 23 de

Fevereiro, rectifica a Lei nº 58/2005 e estabelece as bases do quadro constitucional. O Decreto-Lei nº77/2006 de 30 de Março de 2006, complementa a transposição da Directiva 2000/60/CE, que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água, em desenvolvimento do regime fixado na Lei nº 58/2005.

A **Lei da Água** visa, entre outros objectivos, a protecção e melhoria do ambiente aquático através de medidas específicas para a redução progressiva de descargas, emissões e perdas de substâncias que apresentam um risco significativo para a saúde humana e para os ecossistemas aquáticos, incluindo a cessação ou eliminação progressiva de descargas, emissões e perdas de substâncias prioritárias perigosas.

No contexto da **Lei da Água**, a “abordagem combinada” (Artigo 53º) deverá estar na base do programa de medidas a estabelecer (Artigo 30º), que visa o cumprimento dos objectivos ambientais (Artigos 45º a 48º), bem como o cumprimento dos valores-limite de emissão e normas de qualidade já estabelecidos em outras Directivas (tratamento de águas residuais urbanas, nitratos de origem agrícola, poluição causada por substâncias perigosas).

No caso das águas de superfície, os objectivos ambientais são especificados pela prevenção da deterioração das águas e pelo “bom estado das águas”, que integra o “bom estado ecológico” e o “bom estado químico”.

Este decreto-lei diferencia três conjuntos de substâncias, com base no grau de risco que o poluente ou grupo de poluentes apresenta para ou através do meio aquático:

- substâncias que apresentam risco significativo para ou através do ambiente aquático;
- substâncias prioritárias;
- substâncias prioritárias perigosas

A selecção das substâncias prioritárias é feita através do procedimento prático baseado no risco que estas apresentam para ou através do ambiente aquático, podendo-se aplicar as seguintes metodologias:

- Avaliação de risco (**Regulamento nº 793/93**, de 23 de Março);

- Avaliação de risco orientada para ecotoxicidade aquática ou toxicidade humana através do ecossistema aquático (**Regulamento 793/93** e **Directiva 93/67/CEE**, de 20 de Julho);

- Avaliação de risco simplificada

A lista de substâncias prioritárias foi obtida a partir de um conjunto inicial de 658 substâncias, definido com base em outras listas já existentes e dados de programas de monitorização de alguns Estados-membros, e consta da Proposta de Decisão do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece a lista de substâncias prioritárias e prioritárias perigosas no domínio da Política da Água adoptada pela Comissão. As 32 substâncias que compõe a referida lista são apresentadas na tabela 6, bem como a sua classificação no contexto de outras Directivas.

A lista de substâncias prioritárias e prioritárias perigosas deve ser revista periodicamente e num prazo máximo de 4 anos.

Tabela 6 – Lista de substâncias prioritárias e prioritárias perigosas(*) e suas classificações no contexto de outras Directivas

Nº	Composto	76/464/ CEE	793/93/ CEE ⁽¹⁾	76/769/ CEE	91/414/ CEE ⁽²⁾	98/8/ CE
1	Alacloro				1	
2	Antraceno (*)	II	3			
3	Atrazina (*)	II			1	
4	Benzeno	II		+		
5	Éter difenílico bromado (*)		1,2			
6	Cádmio e seus compostos (*)	I	3	+		
7	C ₁₀₋₁₃ -cloroalcanos (*)					
8	Clorfenvinfos				2,3	
9	Clorpirifos (*)				1	
10	Diclorometano	II				
11	1,2-Diclorometano	I				
12	Di(2-etilhexil)ftalato (*)		2			
13	Diurão (*)				2,3	
14	Endossulfão (*)	II			1	
15	Hexaclorobenzeno	I				
16	Hexaclorobutadieno (*)	I				
17	Hexaclorociclohexano (*)	I			1	
18	Isoproturão (*)				1	
19	Chumbo e seus compostos (*)	II		+		
20	Mercúrio e seus compostos (*)	I				
21	Naftaleno (*)	II	1			
22	Níquel e seus compostos	II	3			
23	Nonilfenóis (*)		2			
24	Octilfenóis (*)					
25	PAH's	II				
26	Pentaclorobenzeno (*)					
27	Simazina (*)	II			1	
28	Pentaclorofenol (*)			+	2,3	+
29	Compostos de tributilestanho (*)			+		+
30	Triclorobenzenos (*)	I	2			
31	Triclorometano	I	2			
32	Trifluralina (*)	II			2,3	

⁽¹⁾ Lista de substâncias prioritárias no contexto do Regulamento 793/93/CEE: 1ª Lista – 1179/94/CE; 2ª lista – 2268/95/CE; 3ª lista – 143/97/CE

⁽²⁾ Lista de pesticidas prioritários ao abrigo do Artigo 8º da Directiva 91/414/CEE: 1ª fase – 3600/92/CEE; 2ª e 3ª fases – proposta de Regulamento

Capítulo 2

A Bacia Hidrográfica do Rio Leça

2.1 Caracterização da Bacia Hidrográfica do Rio Leça

2.1 Caracterização da Bacia Hidrográfica do Rio Leça

Actualmente, a Bacia Hidrográfica do Rio Leça, apesar das reduzidas dimensões que possui, apresenta características muito diversas que a distinguem em vários aspectos de outras bacias da região norte de Portugal, nomeadamente no que diz respeito ao tipo de ocupação do solo e aos aspectos sócio-económicos.

De facto, as elevadas densidades, simultaneamente industriais e urbanas, que se verificam a jusante e na parte sul da bacia, e por consequência os elevadíssimos níveis de poluição que se observam nos cursos de água, contrastam com as áreas pouco povoadas, agrícolas e florestadas de montante e a norte. Esta situação deve-se em grande parte à sua localização geográfica, numa área contígua à cidade do Porto, integrando os concelhos de Matosinhos, Maia, Santo Tirso e Valongo. Também relevante é a existência do Porto comercial de Leixões que conferiu à zona envolvente do estuário um desenvolvimento característico (Ministério do Ambiente e DRAOT, 1994).

2.1.1 Caracterização da Bacia Hidrográfica do Rio Leça (adaptado do Plano de B.H. do Rio Leça – revisto 15/01/2000)

A Bacia Hidrográfica do rio Leça tem uma área de cerca de 185 km². As faixas costeiras a Norte e a Sul têm 26 km² e 24 km² de superfície, respectivamente.

A altitude média da bacia do rio Leça é de 145 metros, sendo de referir que as áreas de altitude inferior a 200 m correspondem a cerca de 85% da área total da bacia. O sector mais elevado da bacia é o de montante, onde se atinge o máximo de 531 m.

O rio Leça nasce acima do lugar de Redundo, entre os concelhos de Santo Tirso e Paços de Ferreira, no Monte de Santa Luzia a cerca de 420 metros de altitude, percorrendo 48 km até à sua foz no Oceano Atlântico. Banha o que foram as antigas terras rústicas da Maia e do antigo concelho de Bouças, actual concelho de Matosinhos, tendo sofrido o seu troço de jusante alterações profundas com a construção do porto de Leixões nos finais do séc. XIX. Os principais afluentes do rio

Leça são a ribeira do Arquinho e a ribeira de Leandro, ambos na margem direita (Ministério do Ambiente e DRAOT, 2000).

O perfil longitudinal do rio Leça (Figura 12) apresenta-se nos 20 km, junto à foz, rectilíneo com inclinação média de apenas 0,24 %, ligando-se, por uma fraca ruptura de declive, a um troço com altitudes ainda baixas, mas de inclinação ligeiramente superior 0,47 %, aproximadamente até aos 38 km. Apenas nos primeiros 7 km e já próximo das cabeceiras, a inclinação aumenta, apresentando um valor médio de 5,3 % (Velhas, 1991).

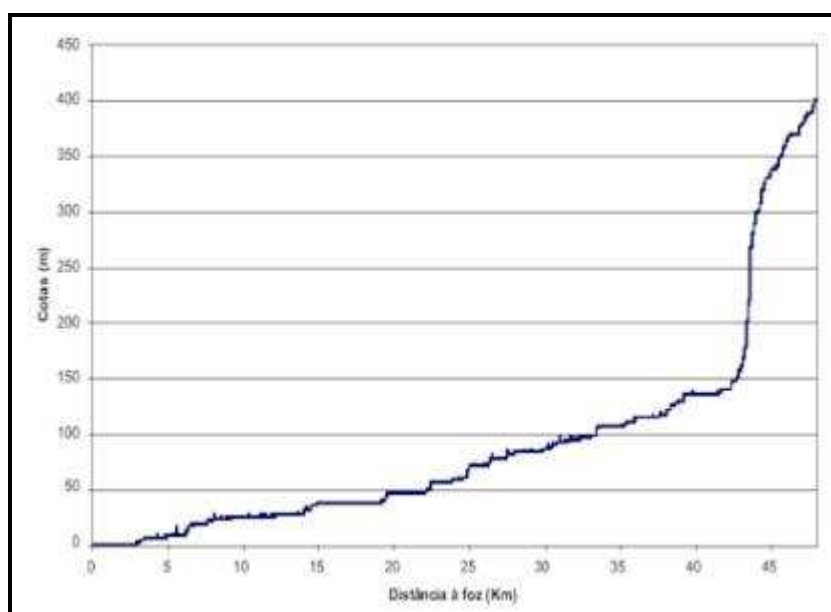


Figura 12 – Perfil longitudinal do rio Leça (DRA-Norte, 2000)

Os afluentes do Leça, a jusante de Ermesinde, apresentam perfis extremamente suaves contrastando com os afluentes a montante com inclinações bastante mais acentuadas, nomeadamente os casos das ribeiras de Alto de S. Jorge, Silvares, Facho e Refojos com respectivamente, 17,3 %, 11,4 %, 9,3 % e 8,9 % de inclinação média (Velhas, 1991).

A zona de cabeceira da bacia é muito estreita e pouco extensa, alargando depois progressivamente, podendo dividir-se a bacia do Leça em três troços que genericamente se descrevem:

- a pequena área de cabeceira, de carácter eminentemente rural, com pequenos aglomerados rurais; engloba as freguesias de Lamelas e Refojos de Riba de Ave.

- a zona intermédia, mais larga e extensa que a anterior mas ainda relativamente estreita, que vai da Reguenga até cerca de S. Pedro Fins e Ermesinde. O primeiro terço deste troço, freguesia da Agrela apresenta características rurais, mas a partir daqui a restante área do troço começa a adquirir um carácter periurbano e algo industrializado. Pertencem a este troço também as freguesias de Água Longa, Alfena, Folgosa e Coronado.

- o troço jusante ou terminal da bacia, a mais extensa e vasta, que engloba todo o núcleo urbano e periurbano dos concelhos da Maia e Matosinhos, fortemente industrializado, incluindo ainda algumas freguesias do Porto. Citam-se deste troço as freguesias de Moreira da Maia, Milheiros, Águas Santas, S. Mamede de Infesta, Paranhos, Leça do Balio, Leça da Palmeira, Custóias e St^a Cruz do Bispo.

De um modo geral, a Bacia Hidrográfica do Leça encontra-se fortemente alterada por se inserir numa área industrializada e com um grande aglomerado populacional, sendo a zona próxima da nascente a que apresenta melhor qualidade ecológica.

Grande parte da rede da Bacia Hidrográfica do Leça, além de contribuir, ou de ter grande potencial para contribuir, economicamente para a riqueza nacional através dos diversos usos que as suas águas proporcionam, tem também valor ambiental, sobretudo na zona mais a montante. É de realçar o facto de, apesar de o rio Leça ter problemas graves de poluição, a sua bacia hidrográfica ter algumas zonas com valor ambiental e paisagístico, principalmente na zona da cabeceira a montante do Monte Córdova.

2.1.2 Hidrologia

A região abrangida pela Bacia Hidrográfica do rio Leça apresenta valores da precipitação média anual que variam entre os 900 e os 2 000 mm, localizando-se os valores mais elevados na região próxima da nascente do rio Leça. À medida que se caminha para a foz regista-se uma diminuição progressiva dos valores.

Segundo o Plano de Bacia, revisto em 2000, e considerando a totalidade da bacia do rio Leça, verifica-se que o escoamento anual médio na foz é de 107 hm³. Estima-se uma precipitação média anual na bacia de 1 340 mm, correspondendo a

248 hm³. Deste volume, 141 hm³ perdem-se por evaporação e 101 hm³ infiltram-se, recarregando os aquíferos. Resulta, portanto, um escoamento superficial imediato de 6 hm³. Os 101 hm³ que se infiltram, surgem à superfície, perfazendo um escoamento superficial total de 107 hm³.

O afluente que mais contribui para o valor do escoamento anual médio na foz é a ribeira do Arquinho, com 13,3 hm³.

Para avaliar a capacidade da bacia para satisfazer as suas necessidades de água, calcularam-se os valores do escoamento anual em diversos pontos da bacia, para várias probabilidades de ocorrência. A probabilidade do escoamento anual na foz do rio Leça ser superior a 59 hm³ é de 80 % e de ser superior a 151 hm³ é de 20 %.

2.1.3 Clima

O clima da região na Bacia Hidrográfica do rio Leça resulta da sua posição geográfica e proximidade do Atlântico e da forma e disposição dos principais relevos. Estes factores determinam que a região seja relativamente pluviosa, ocorrendo, nos sectores mais elevados de montante da bacia, e segundo o Plano de Bacia do rio Leça, uma precipitação anual média da ordem de 2 000 mm, repartida por cerca de 130 dias. Um estudo hidroclimatológico de Edite Velhas, em 1991, que considerou a análise de precipitações ao longo de 37 anos, compreendidos entre 1950 – 51 e 1986 – 87, permitiu calcular a precipitação média anual ponderada para a bacia do Leça em 1 311 mm. O sector de montante é aquele que detém os valores mais elevados de precipitação (Velhas, 1991). De acordo com o Plano de Bacia nas áreas correspondentes à cabeceira do rio Leça, a precipitação média anual ultrapassará os 2 000 mm, enquanto que no estudo hidroclimatológico o valor será de 1 600 mm. As áreas mais deprimidas topograficamente, correspondentes à faixa litoral e foz do rio Leça, e o vale da ribeira do Arquinho na região de Maia, são as que registam menor precipitação, entre 1 000 mm e 1 200 mm.

A maior parte da área da bacia do Leça apresenta temperaturas médias anuais entre 13°C e 15°C. A faixa localizada a leste do alinhamento Santo Tirso-Paços de Ferreira, mais elevada, apresenta temperatura entre 11°C e 13°C. A faixa

litoral apresenta os maiores valores de temperatura, de cerca de 14,5°C e em Pedras Rubras a temperatura é um pouco menor, de cerca de 13,8°C.

Os Verões são do tipo *moderado*, com a temperatura média máxima do mês mais quente (Julho) entre 22°C e 24°C, registando-se temperaturas superiores a 25°C entre 1 a 10 dias anualmente. Considerando o regime de Verão como o conjunto de meses que registam a menor precipitação, teremos o período compreendido entre os meses de Junho a Agosto (Velhas, 1991).

Os Invernos são do tipo *moderado*, observando-se em Janeiro cerca de 1 dia, em média, com temperatura do ar negativa. No sector de montante e nos locais de maior altitude verificam-se Invernos do tipo *frio*, com temperaturas negativas em cerca de 30 dias, em média, e temperatura média mínima do mês mais frio (Dezembro) rondando os 3°C. A estação pluviosa engloba basicamente os meses de Novembro a Março, aqueles em que se verifica uma maior probabilidade de ocorrência de valores elevados de precipitação (Velhas, 1991).

O défice hídrico anual médio varia entre 100 mm em Paços de Ferreira e 200 mm junto ao litoral. Os meses em que se verifica défice são os meses mais quentes, de Junho a Setembro, com valores mais elevados em Julho e Agosto.

O excesso hídrico anual médio é elevado, entre 600 mm e 622 mm no sector intermédio e 1 113 mm no sector de montante. Deste modo, o período de excedente hídrico ocorre desde meados de Novembro a Abril; em Outubro e no 1º decêndio de Novembro, apesar da precipitação já elevada, regista-se a reposição de água no solo, devido à cedência verificada nos meses de Verão (Velhas, 1991). Os maiores valores de excesso hídrico verificam-se, em regra, no mês de Janeiro.

De acordo com critérios simples de classificação, o clima da área da bacia do Leça varia entre temperado, húmido e muito chuvoso nos sectores de montante e temperado, húmido e moderadamente chuvoso na faixa litoral.

Pela classificação climática segundo Thornthwaite, o clima das regiões de montante é *super húmido, mesotérmico, com pequena falta de água no ano e com pequena eficiência térmica no Verão*; No sector intermédio o clima é do tipo *húmido e temperado*. Na faixa litoral o clima é do tipo *sub-húmido a húmido*.

2.1.4 Poluição urbana e industrial: principais problemas

Na Bacia Hidrográfica do Rio Leça apenas o concelho de Matosinhos se encontra totalmente abrangido, estando parcialmente abrangidos os concelhos da Maia, com 85% da área do concelho incluída na bacia o do Porto (42%), o de Valongo (33%), o de Santo Tirso (28%) e o concelho de Paços de Ferreira (4%).

Tendo em conta este universo, a actividade industrial centra-se em maior escala no concelho do Porto, que possui duas vezes mais indústria que os restantes concelhos. Os concelhos de Matosinhos e Santo Tirso apresentam sensivelmente o mesmo nível de industrialização, com maior número de empresas que os concelhos da Maia e de Valongo.

O sector com representação mais significativa é o da indústria têxtil, representando cerca de 37% do total da indústria existente nos concelhos abrangidos pela Bacia Hidrográfica do Leça. Com menor expressão, mas com importância a nível da Bacia, situam-se o sector da metalurgia de base e fabricação de produtos metálicos, composto fundamentalmente por pequenas fundições, com 15% do total da indústria existente, e outras indústrias transformadores (12% do total da indústria existente).

De acordo com as listas das entidades licenciadoras presentes no Plano de Bacia, revisto em 2000, verifica-se que na área abrangida pela Bacia Hidrográfica do Leça existem cerca de 800 unidades industriais, sendo deste modo caracterizada por uma forte industrialização com predominância dos sectores têxtil, de fabricação de produtos metálicos e indústria alimentar.

Existem actualmente em funcionamento na área abrangida pela Bacia Hidrográfica do Leça, 3 Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs): 2 no concelho da Maia e 1 no concelho de Valongo. O concelho de Matosinhos possui um sistema de drenagem e tratamento de águas residuais, com uma ETAR (tratamento primário) e descarga no mar através de um emissário submarino.

Em termos de drenagem e tratamento de águas residuais podem-se distinguir duas zonas com características bem diferenciadas:

- a zona centro/sul, com declives suaves, que inclui aglomerados populacionais com elevadas densidades urbanas e industriais, nomeadamente os

concelhos da Maia e de Matosinhos e ainda algumas freguesias do concelho de Valongo. Esta zona é a que gera a maior carga poluente afluente ao Leça;

- a zona a montante e a norte da bacia hidrográfica, com declive médio mais acentuado e que é caracterizada por aglomerados mais dispersos e de menor dimensão, por uma ocupação industrial fraca e por actividades económicas mais direccionadas para a agricultura e a floresta.

Os aspectos mais relevantes da Bacia Hidrográfica do Leça com implicações significativas na qualidade dos meios hídricos são a inserção numa área fortemente intervencionada, com elevada concentração populacional e forte industrialização, bem como o significativo aumento da vulnerabilidade dos aquíferos à poluição do interior para o litoral.

Não obstante a existência de um nível bastante elevado de atendimento das populações com tratamento de águas residuais urbanas e da resolução quase total dos problemas e tratamento e destino final dos resíduos sólidos urbanos, há que salientar alguns dos aspectos fortemente negativos: elevado número de situações com descargas de efluentes industriais não tratados das mais diversas actividades produtivas (alguns de unidades fabris com cargas poluentes extremamente significativas), existência de zonas críticas quanto à poluição difusa, ocupando grande parte da Bacia Hidrográfica, e presença de elevado número de situações associadas a riscos de poluição tóxica com consequências altamente gravosas para os meios hídricos.

Segundo o Plano da Bacia Hidrográfica do Rio Leça, revisto em 2000, as cargas poluentes totais – tóxicas urbanas, tóxicas industriais e difusas – geradas na área do Plano estimam-se em 13 393 t/ano em CBO₅ (Carência Bioquímica de Oxigénio), 28 935 t/ano em CQO (Carência Química de Oxigénio), 11 812 t/ano em fósforo total e 1 021 t/ano em azoto total.

Relativamente à poluição difusa, os locais mais susceptíveis ou com problemas efectivos situam-se nos concelhos da Maia e Matosinhos, quer quanto à contribuição dos sistemas culturais, quer quanto à contribuição da agropecuária. A contribuição do povoamento disperso é mais significativa nos concelhos da Maia e de Santo Tirso.

Os principais problemas a salientar são os seguintes:

- Existência de numerosas fontes de poluição tóxica industrial associadas a unidades sem tratamento dos respectivos efluentes, traduzida na presença de variadíssimos poluentes, alguns de carácter persistente e dando origem a disfunções ambientais muito significativas em várias situações pontuais;

- Elevado potencial de agressão à qualidade dos recursos hídricos das zonas central e terminal da área da Bacia Hidrográfica do Leça e das suas águas costeiras, por via de situações de risco de poluição tóxica accidental, com consequências extremamente graves em caso de ocorrência;

- Situações de agressão generalizada à qualidade dos meios hídricos por via da poluição difusa, associada a núcleos populacionais disseminados e a alguma actividade agrícola.

2.1.5 Histórico da Qualidade das Águas Superficiais

No que se refere à qualidade das águas superficiais, o Rio Leça começou a ser monitorizado regularmente desde o início de 1994 pela Direcção Regional de Ambiente do Norte (DRA Norte), num total de quatro estações com controlo mensal. De acordo com o critério do INAG (Tabela 7) para classificação mensal com base em 27 parâmetros (Anexo A), foi efectuada, para cada uma das quatro estações de amostragem do Rio Leça a respectiva classificação quanto à qualidade da água referente a cada mês do período de Janeiro de 1994 a Outubro de 1996, com base nos dados fornecidos pela DRA Norte.

Segundo a monitorização realizada pela DRA Norte, a evolução, entre 1994-1996, da qualidade da água do Rio Leça nos locais amostrados, pode resumir-se da seguinte forma:

- Observa-se uma tendência geral de degradação, não só ao longo do período avaliado, como de montante para jusante;
- Essa tendência traduz-se no aumento das médias e dos máximos da condutividade e do CQO, das médias do azoto amoniacal, das médias e dos máximos dos fosfatos e das médias e dos máximos de coliformes fecais e na diminuição das médias e dos mínimos do teor em oxigénio dissolvido;

– A situação evidencia um particular agravamento em termos dos teores em coliformes fecais, com valores absolutos extremamente elevados e tendência para um agravamento muito expressivo na época estival.

Tabela 7 – Classificação da qualidade da água (Fonte: INAG)

Classe	Nível de qualidade
A – Sem poluição	Águas consideradas como isentas de poluição, aptas a satisfazer potencialmente as utilizações mais exigentes em termos de qualidade
B – Fracamente poluído	Águas com qualidade ligeiramente inferior à classe A, mas podendo também satisfazer potencialmente todas as utilizações
C – Poluído	Águas com qualidade “aceitável”, suficiente para irrigação, para usos industriais e produção de água potável após tratamento rigoroso. Permite a existência de vida piscícola (espécies menos exigentes) mas com reprodução aleatória; apta para recreio sem contacto directo
D – Muito poluído	Águas com qualidade “medíocre”, apenas potencialmente aptas para irrigação, arrefecimento e navegação. A vida piscícola pode subsistir, mas de forma aleatória
E – Extremamente poluído	Águas ultrapassando o valor máximo da classe D para um ou mais parâmetros. São consideradas como inadequadas para a maioria dos usos e podem ser uma ameaça para a saúde pública e ambiental

Resumindo, de acordo com os dados de qualidade de 1994 a 1996, o Rio Leça classificava-se como “fracamente poluído” numa única estação de monitorização situada a montante, e “extremamente poluído” nas restantes estações do troço intermédio e final do rio.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

- 3.1 Amostragem**
- 3.2 Caracterização Físico-Química**
- 3.3 Caracterização Bacteriológica**
- 3.4 Caracterização Ecotoxicológica**
- 3.5 Análise Estatística**

3.1 AMOSTRAGEM

Para a avaliação da qualidade da água na Bacia Hidrográfica do rio Leça foi necessário colher amostras ao longo do rio. Foi também recolhida uma amostra do efluente final da ETAR de Parada, no concelho da Maia, que está a ser descarregado continuamente no rio.

As amostras de água do rio Leça foram recolhidas com auxílio de um balde e transferidas para garrações de plástico de 5L (para as análises físico-químicas), frascos de plástico de 1,5L (para os ensaios de ecotoxicidade com *Chlorella vulgaris*), frascos de vidro de 250 mL (para os ensaios de ecotoxicidade com *Vibrio fischeri*), e frascos de mergulho previamente esterilizadas em autoclave (para as análises microbiológicas). Foram depois transportadas em malas térmicas para o laboratório, tendo-se procedido imediatamente à determinação dos parâmetros microbiológicos e de alguns parâmetros químicos e armazenado as amostras no frigorífico e no congelador para conclusão das análises. Foram determinados no local os parâmetros: pH, temperatura, oxigénio dissolvido, potencial de oxidação-redução e condutividade.

A amostra do efluente final da ETAR foi recolhida directamente para um garrafão de plástico de 5L. Os dados relativos ao pH, condutividade, CBO₅, CQO e SST foram obtidos directamente na ETAR.

3.1.1 Locais de Amostragem

Foram seleccionadas 7 estações de amostragem ao longo do rio Leça, numeradas de 1 a 7, da nascente para a foz (Tabela 8 e Figura 13). Apresentam-se a seguir imagens dos locais de amostragem (Figuras 14 a 20).

Tabela 8 – Correspondência entre o número atribuído às estações e o local de amostragem

Nº atribuído	Local	Coordenadas	Distância à foz (km)	Observações
1	Água Longa - S ^{to} Tirso -	41°15'41.11"N 8°28'43.14"W	36,5	A jusante de uma Adega Cooperativa; numa zona predominantemente rural
2	Parada - Maia -	41°12'8.41"N 8°35'47.02"W	20,5	A jusante da descarga do efluente da ETAR de Parada; água com mau cheiro
3	Mosteiro Leça do Balio - Matosinhos -	41°13'5.16"N 8°37'27.01"W	15,5	Local geralmente com muitos detritos na água. Zona fortemente industrializada.
4	P ^{te} Moreira - Maia -	41°14'9.62"N 8°38'49.27"W	10,5	A jusante da descarga do efluente da ETAR de P ^{te} de Moreira
5	P ^{te} Goimil - Matosinhos -	41°13'4.10"N 8°38'47.68"W	7,5	Zona fortemente industrializada.
6	P ^{te} Carro - Matosinhos -	41°12'54.92"N 8°40'2.76"W	4,5	Zona revitalizada, pequeno parque recreativo
7	Silopor - Matosinhos -	41°15'55.28"N 8°40'52.23"W	1	Foz do rio Leça



Figura 14 – Estação de amostragem 1



Figura 15 – Estação de amostragem 2



Figura 16 – Estação de amostragem 3



Figura 17 – Estação de amostragem 4



Figura 18 – Estação de amostragem 5



Figura 19 – Estação de amostragem 6



Figura 20 – Estação de amostragem 7

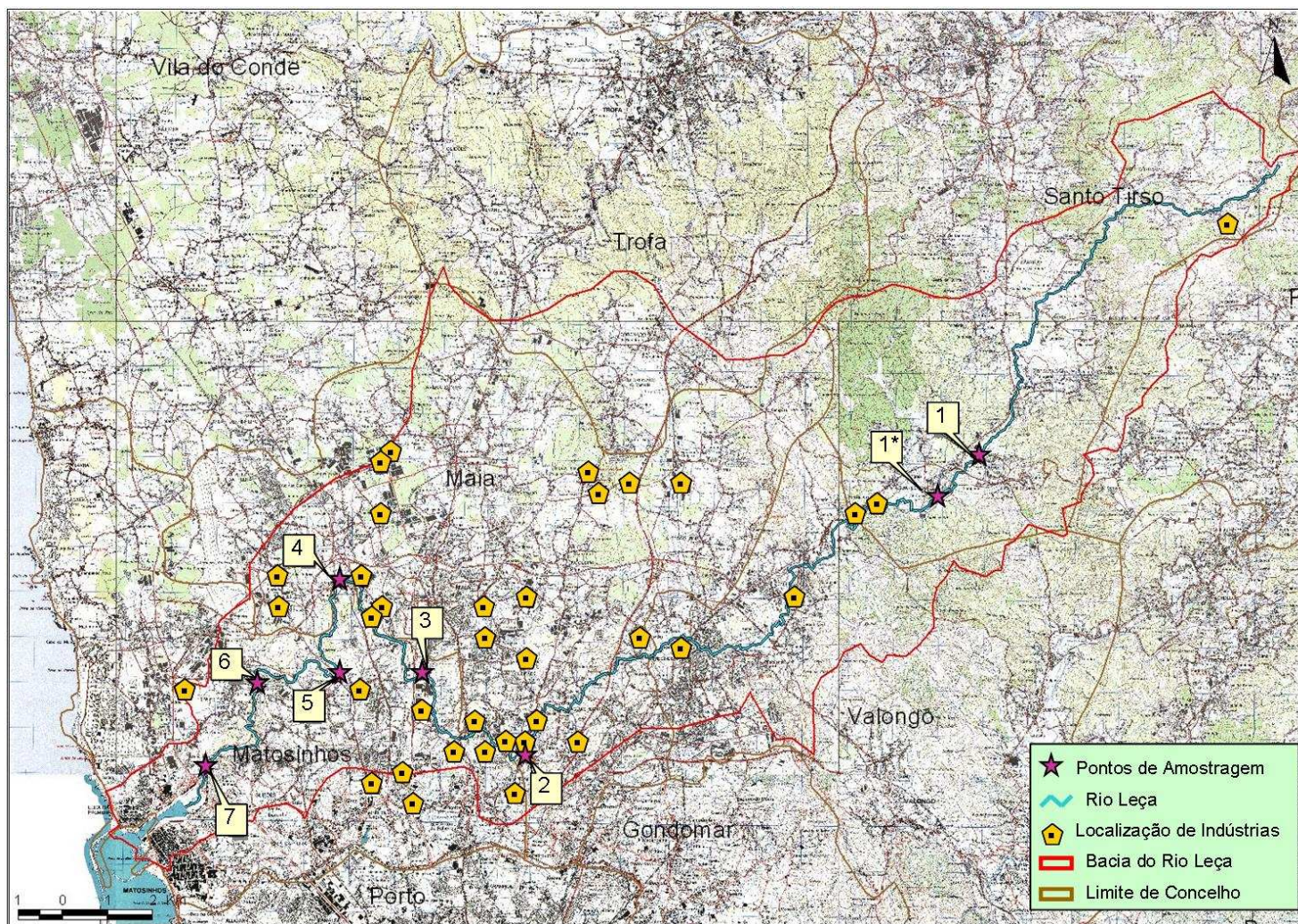


Figura 13 – Bacia Hidrográfica do Rio Leça – estações de amostragem e localização de indústrias

3.1.2 Plano de Amostragem

Foram realizadas 5 campanhas de amostragem de água no rio Leça, conforme descrito na Tabela 9:

Tabela 9 – Datas e horas das colheitas de amostras de água

Data de amostragem	Estações de amostragem e hora da recolha						
	1	2	3	4	5	6	7
19 de Fevereiro 2006	11:20	12:00	12:35	13:15	13:00	15:35	16:35
7 de Maio de 2006	10:45	11:15	11:45	12:30	12:15	13:30	13:00
21 de Junho de 2006	11:00	11:35	12:05	12:45	12:25	14:45	14:30
15 de Agosto de 2006	12:45	12:00	15:00	15:45	15:20	16:35	16:15
24 de Setembro de 2006	16:45	16:00	15:00	15:30	15:15	13:05	12:40

A campanha do mês de Fevereiro foi realizada num dia de chuva intensa (tal como nos dias precedentes), mas em Maio as condições climatéricas apresentavam-se já amenas. Quer em Junho, quer em Agosto, as colheitas foram realizadas em dias de calor, num Verão especialmente quente e seco. Em Setembro, apesar de se estar num período de temperaturas amenas, registaram-se períodos de chuva muito intensa no dia de amostragem.

3.2 Caracterização Físico-Química

3.2.1 Parâmetros determinados no local

No local foram determinados os seguintes parâmetros: temperatura, pH, potencial de oxidação redução (ORP), oxigénio dissolvido (OD) e condutividade, com os equipamentos portáteis mencionados na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros determinados no local e equipamento portátil utilizado

Parâmetros	Equipamento portátil
Temperatura	HANNA Instruments 991003
PH	
Potencial de oxidação redução	
Oxigénio dissolvido	HANNA Instruments 9143
Condutividade	WTW – LF 330

3.2.2 Parâmetros determinados em laboratório

3.2.2.1 Turvação

A turvação foi determinada por turbidimetria com o turbidímetro Turbiquant 3000 IR - Merck. Os resultados são expressos em NTU.

3.2.2.2 Cor Verdadeira

A cor verdadeira foi determinada por espectrometria de absorção molecular (Norma ISO 7887), a um comprimento de onda de 400 nm (Pye Unicam PU 8600 UV/Visível – Philips), após filtração sob vácuo por membrana de nitrato de celulose (Albeit) com diâmetro do poro de 0,45 μm . Os resultados são expressos em unidades de cor (escala Platina-Cobalto).

3.2.2.3 Carbono Orgânico Dissolvido

O teor de carbono orgânico dissolvido foi determinado com o analisador de COT Shimadzu 5000 A. As amostras foram previamente filtradas por membrana de nitrato de celulose (Albeit 0,45 μm). Os resultados são expressos em mg C/L.

3.2.2.4 Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅)

A determinação da CBO₅ foi realizada de acordo com o Manual *Standard Methods* (SM) pelo método das diluições (5210 B). O oxigénio dissolvido (OD) foi medido com um analisador de OD (Oxi 730 – WTW). Os resultados são expressos em mg O₂/L

3.2.2.5 Azoto Total

O azoto total foi determinado pelo método do persulfato (SM 4500-N C). A absorvância das amostras foi lida a um comprimento de onda de 410 (Pye Unicam PU 8600 UV/Visível – Philips), após digestão com persulfato de potássio a 110°C, e desenvolvimento da cor com solução de brucina em meio ácido. Os resultados são expressos em mg N/L.

3.2.2.6 Fósforo Total

A determinação do fósforo total foi feita pelo método do ácido ascórbico (SM 4500-P), sendo as amostras digeridas previamente com persulfato de amónio. A absorvância foi lida a 880 nm (Pye Unicam PU 8600 UV/Visível – Philips), sendo os resultados expressos em mg P/L.

3.2.2.7 Dureza Total

A dureza total foi determinada segundo o método titrimétrico com EDTA (SM 2340 C), tendo-se usado como indicador o corante Negro de Eriocromo T. Os resultados são expressos em mg CaCO₃/L.

3.2.2.8 Metais Dissolvidos

Foram analisados os elementos: arsénio (As), cádmio (Cd), crómio (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), mercúrio (Hg), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb) e

zinco (Zn). As amostras foram previamente filtradas por membrana de nitrato de celulose (0,45 μm), acidificadas com HNO_3 concentrado e armazenadas a 4°C até ao momento da análise. A determinação dos metais dissolvidos nas amostras foi efectuada por espectrometria de absorção atómica (*Atomic Absortion Spectrometer* – GBC 932 plus e GBC HG 3000), utilizando a chama de ar-acetileno para os metais Cd, Cu, Fe, Mn, Ni e Zn; chama de protóxido de azoto para o metal Cr; com câmara de vapor frio para Hg; e gerador de hidretos para As. O arsénio e o mercúrio foram determinados segundo o procedimento descrito em “*AA Hydride System HG3000 Operation e Service Manual*”, enquanto que, para os restantes metais, seguiu-se o Manual “*Flame Methods Manual for Atomic Absorption*”.

3.3 Caracterização Bacteriológica

3.3.1 Coliformes Totais

O teor de bactérias coliformes totais foi determinado pelo método de filtração por membrana (ISO 9308-1). As amostras foram diluídas em tubos esterilizados contendo a solução de diluição (soro fisiológico) e filtradas por membranas de nitrato de celulose (0,45 μm). As membranas foram colocadas no meio Endo-Les (meio presuntivo) e incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, durante $24 \pm 1\text{h}$. Após a incubação procedeu-se à contagem das colónias formadas. São colónias típicas as que apresentam cor verde brilhante. Para confirmar os resultados nas membranas, repicou-se cada colónia para tubos de ensaio contendo LTB (Lauryl Tryptose Broth) e BGB (Brilliant Green Bile), voltando a incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, durante $48 \pm 2\text{h}$. A produção de gás confirma a presença de bactérias coliformes.

3.3.2 Coliformes Fecais

As bactérias coliformes fecais (ou coliformes termotolerantes) foram determinadas pelo método de filtração por membrana (ISO 9308-1). As amostras foram diluídas em tubos esterilizados contendo a solução de diluição (soro fisiológico), e filtradas por membranas de nitrato de celulose com poro de diâmetro 0,45 μm . As membranas foram colocadas no meio m-FC (meio presuntivo) e incubadas a $44 \pm 1^\circ\text{C}$, durante $24 \pm 1\text{h}$. Após a incubação procedeu-se à contagem das colónias formadas. São colónias típicas as que apresentam cor azul. Para confirmar os resultados nas membranas, repicou-se cada colónia para tubos de ensaio contendo meio EC, voltando a incubar a $44 \pm 1^\circ\text{C}$, durante $48 \pm 2\text{h}$. A produção de gás e turvação confirma a presença de bactérias coliformes fecais (ou termotolerantes).

3.3.3 Streptococos Fecais

A pesquisa e quantificação de estreptococos fecais foram realizadas pelo método de filtração por membrana (ISO 7899-2). As amostras foram diluídas em tubos esterilizados contendo a solução de diluição (soro fisiológico), e filtradas por membranas de nitrato de celulose (0,45 μm). As membranas foram colocadas no meio m-*Enterococcus* (meio presuntivo) e incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, durante $48 \pm 2\text{h}$. Após a incubação procedeu-se à contagem das colónias formadas. São colónias típicas as que apresentam cor rosa-castanho avermelhado escuro. Para confirmar os resultados nas membranas, repicou-se cada colónia para placas contendo BEA (Bile Esculine Agar) voltando a incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, durante $24 \pm 1\text{h}$, e realizou-se o teste da catalase com peróxido de hidrogénio. O desenvolvimento de pigmentação negra no meio BEA e a não produção de gás no teste da catalase confirmam a presença de estreptococos fecais.

3.4 Caracterização Ecotoxicológica

3.4.1 Teste de Inibição da Bioluminescência da Bactéria *Vibrio fischeri*

A *Vibrio fischeri* é uma bactéria bioluminescente de origem marinha, anaeróbia facultativa com flagelo polar, Gram negativa, pertencente à família das Vibrionaceae, que emite luz e apresenta vida livre ou associada a outros organismos superiores (Silva, 2002). Estas bactérias não estão associadas a nenhuma actividade patogénica e são imediatamente destruídas quando se adiciona água da torneira (Microbics Corporation). As bactérias luminescentes são preservadas a -18°C sob a forma liofilizada (Rodrigues, U. Minho, 2005).

A bioluminescência é um processo bioquímico utilizado por muitos animais e algas marinhas, resultando na produção de luz, ou seja, na emissão de luz visível derivada da libertação química de fotões. O processo é feito através da oxidação de uma proteína – luciferina - catalisada por uma enzima – luciferase. Os tóxicos presentes numa amostra inibem esta reacção, sendo a redução de luminescência quantificada através de um sistema com um fotomultiplicador e um fotómetro (Tecnilab, 2003).

O Microtox® é um método que permite determinar a toxicidade de uma determinada amostra através da sua exposição à bactéria luminescente *Vibrio fischeri*. Após serem confrontadas com uma amostra de toxicidade desconhecida, a quantidade de luz emitida pelas bactérias luminescentes é medida e comparada com a emissão de luz do controlo. A diferença de luz emitida pelas bactérias no ensaio em branco (controlo) e na amostra é atribuída ao efeito desta sobre as bactérias, o que indica a existência de inibição metabólica nos organismos e, consequentemente, o grau de toxicidade da amostra. Daqui pode-se obter a concentração efectiva da amostra que causa uma redução de 50% na quantidade de luz emitida após os períodos de exposição estabelecidos para o teste (5, 15 e se necessário 30 minutos). A não ocorrência de decréscimo na produção de luz, pelo organismo teste, significa a ausência de efeito tóxico (Rodrigues, 2005).

No presente trabalho foi utilizado o Microtox Toxicity Analyser Model 2055, da Microbics Corporation, actualmente AZUR Environmental (Figura 21). O método de determinação da inibição da luminescência emitida pela bactéria *Vibrio fischeri* encontra-se descrito nas Normas ASTM D 5660-96, DIN 38 412-34 e AFNOR T90-320.



Figura 21 – Analisador automático de toxicidade por bioluminescência

3.4.1.1 Procedimento experimental

Todos os ensaios de toxicidade com *Vibrio fischeri* (estirpe NRRL B 11177) foram realizados até 48 h após a colheita das amostras, preservadas a 4°C. As amostras a ensaiar apresentaram sempre pH entre 6,3 e 7,8.

A reactivação das bactérias foi feita através de uma rehidratação, bastando para isso colocá-las em contacto com uma solução de reactivação. As bactérias só permanecem activas por um período de 3 horas após a reactivação.

Uma vez que as bactérias *V. fischeri* são halofílicas, torna-se necessário adicionar às amostras cloreto de sódio a 2 %.

Para determinar o valor de CE_{50} é necessário ter pelo menos três valores de percentagem de inibição (Microbics Corporation). Deste modo, a amostra foi diluída, numa série geométrica de concentrações, com a solução de cloreto de sódio a 2 %.

A intensidade de radiação emitida pela suspensão de bactérias foi medida antes destas serem expostas à amostra, e após 5 e 15 minutos de exposição. Foi realizado um ensaio em branco (controlo) para todas as determinações, no qual apenas se adiciona a solução de cloreto de sódio a 2 % às bactérias reactivadas.

Para além do CE_{50} , foi também calculado o CE_{20} , tal como requerido pela norma DIN e pela proposta de norma ISO, de 1991.

De modo a confirmar a sensibilidade da *V. fischeri* realizaram-se ensaios com uma substância de referência - fenol (C_6H_5OH).

3.4.1.2 Tratamento de dados

Os cálculos apresentados foram efectuados segundo o Manual do Microtox “*How to reduce Microtox test data*” da Microbics Corporation. No Anexo D é apresentado um exemplo dos cálculos para o ensaio efectuado com a substância de referência – fenol.

Cálculo da Razão dos Brancos

$$RB_{(t)} = (I_{(t)B}/I_{(0)B})$$

em que $I_{(0)B}$ é a leitura de luz emitida pela célula com o branco, para o tempo zero e $I_{(t)B}$ é a leitura de luz emitida pela mesma célula, após a exposição de t minutos

São válidos os valores $0,6 < RB < 1,3$.

Cálculo da Intensidade corrigida

$$I_{corr.(t)} = I_0 \times RB_{(t)}$$

Este valor representa a intensidade teórica da luminescência das soluções de teste após t minutos de incubação sem que haja nenhuma influência de substâncias tóxicas da amostra.

Cálculo do valor da função Gama

A função gama é definida como a razão da luz “perdida” em relação à luz remanescente após as bactérias terem sido confrontadas pela amostra

$$\Gamma(t) = (I_{corr.(t)} - I_{(t)})/I_{(t)}$$

Relação log Γ vs log C

$$\log \Gamma = b (\log C) + \log a$$

O valor de CE_{50} é o valor de C para $\Gamma = 1$. Analogamente, o valor de CE_{20} é o valor de C para $\Gamma = 0,25$.

Intervalo de Confiança 95 %

$$FC_{95\%} = S_{CE_{xx}} * t_{0,05}$$

em que,

$FC_{95\%}$ - factor de confiança para 95 %

$S_{CE_{xx}}$ – desvio do valor de CE_{xx}

$t_{0,05}$ – valor t – Student para n-1 graus de liberdade (probabilidade de 95 %)

Os intervalos de confiança são determinados pela multiplicação ou divisão do valor de CE pelo factor de confiança.

Unidades de Toxicidade

$$UT = \frac{100}{CE_{xx}}$$

A expressão da toxicidade em unidades de toxicidade (UT) evita a confusão muitas vezes gerada pela apresentação dos resultados em termos de CE_{xx} : baixos valores de CE_{xx} indicam elevada toxicidade, enquanto que valores baixos de UT indicam baixa toxicidade. Se CE_{xx} for expresso em %, quando U.T. = 1 a amostra não apresenta toxicidade.

3.4.2 Teste de Inibição do Crescimento na Alga *Chlorella vulgaris*

A microalga utilizada para os ensaios de ecotoxicidade foi a *Chlorella vulgaris* (Figura 22). Classificada a nível botânico na ordem *Chlorococcales*, a *Chlorella* é uma alga verde unicelular de água doce. Estas algas são utilizadas como alimento para viveiros e animais, produção de pigmentos e biorremediação de água contendo metais pesados. A *Chlorella vulgaris* uma espécie particular desta alga.

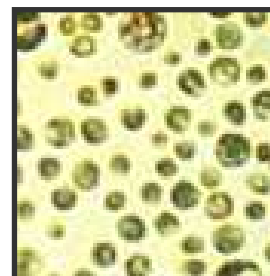


Figura 22 – *Chlorella vulgaris*

A *Chlorella vulgaris* como ser unicelular, reproduz-se por sucessivas divisões mitóticas a partir da célula-mãe, sendo o seu crescimento, sem renovação do meio, caracterizado pelo gráfico representado na Figura 23.

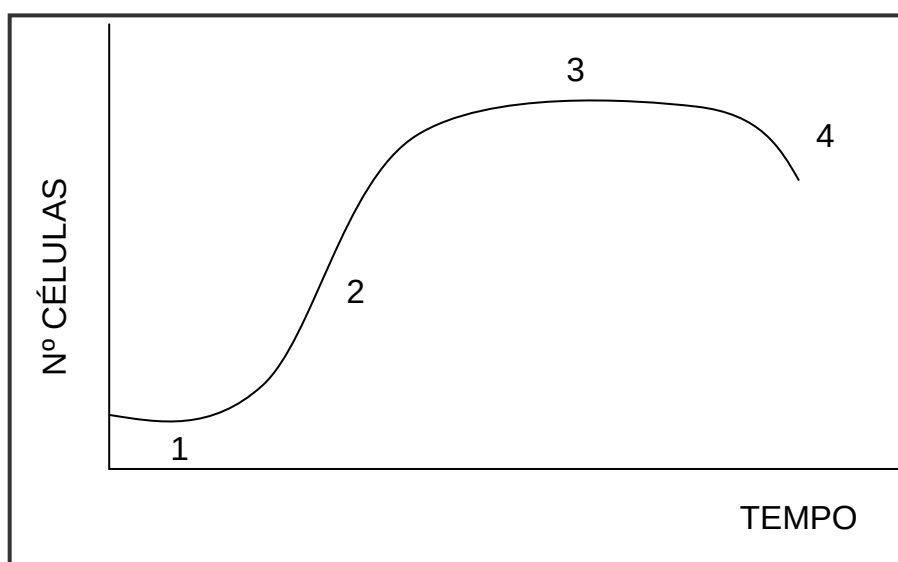


Figura 23 – Gráfico “Curva de crescimento da *Chlorella vulgaris*”

Esta curva de crescimento demonstra a existência de 4 fases distintas de crescimento:

- Fase de adaptação ou *lag* (1) – fase de adaptação a novas condições;
- Fase exponencial (2) – as algas já adaptadas crescem exponencialmente;

- Fase estacionária (3) – devido ao efeito prejudicial dos produtos resultantes do próprio metabolismo das algas, o número de células geradas é igual ao número de células mortas, por unidade de tempo;
- Fase de morte (4) – além das toxinas metabólicas, a falta de renovação do meio leva ao aumento gradual do número de células mortas relativamente ao de células geradas.

3.4.2.1 Procedimento experimental

O objectivo do teste é determinar os efeitos de uma dada substância sobre o crescimento de espécies de algas verdes unicelulares, *Chlorella vulgaris*, segundo a Portaria 732 - A/96.

O ensaio baseia-se na exposição de culturas de algas verdes seleccionadas, em fase de crescimento exponencial, em condições definidas, a diferentes concentrações da substância de ensaio, durante diversas gerações.

As soluções de ensaio foram incubadas durante um período de 72 horas, medindo-se a absorvância a 440 nm (espectrofotómetro UV/Visível – SHIMADZU) no início e no fim do ensaio e determinando-se a inibição do crescimento em relação a uma cultura de controlo. Para isso, foram realizadas medições de densidade celular recorrendo ao método de contagem directa das células vivas, através de um microscópio e câmara de contagem, de modo a obter-se a relação entre a densidade celular e a absorvância a 440 nm (Anexo C).

Para o ensaio prepararam-se pelo menos cinco concentrações numa série geométrica cuja razão entre concentrações não excedeu 2,2.

O ensaio incluiu três repetições para cada concentração ensaiada, incluindo repetições do controlo.

As amostras a ensaiar foram testadas em frascos de 100 mL, previamente autoclavados. Cada frasco contém 20 mL de *Chlorella vulgaris*, x mL de amostra (em que x depende da concentração pretendida, excepto controlo), sendo o volume de 100 mL completado com meio de cultura das algas.

As culturas foram mantidas à temperatura ambiente (21 a 25°C) e com iluminação contínua durante as 72 horas de ensaio.

Para a preparação do meio de ensaio foi utilizada água destilada, na qual se diluiu quatro soluções de reserva, previamente preparadas, de modo a obter as concentrações finais de nutrientes (Tabela 11):

Tabela 11 – Constituição das soluções de reserva e sua concentração final no ensaio

Nutriente	Concentração final na solução de ensaio (mg/L)
Solução de reserva nº1: macronutrientes	
	15
NH ₄ Cl	12
MgCl ₂ .6H ₂ O	18
CaCl ₂ .2H ₂ O	15
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,6
KH ₂ PO ₄	
Solução de reserva nº2	
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,08
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,1
Solução de reserva nº3: micronutrientes	
	0,185
H ₃ BO ₃	0,415
MnCl ₂ .4H ₂ O	3×10^{-3}
ZnCl ₂	$1,5 \times 10^{-3}$
CoCl ₂ .6H ₂ O	10^{-5}
CuCl ₂ .2H ₂ O	7×10^{-3}
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	
Solução de reserva nº4	
NaHCO ₃	50

De modo a evitar contaminações as soluções de reserva foram esterilizadas (por autoclave, excepto a solução nº 4 que foi esterilizada por filtração através de membrana), sendo o meio de cultura preparado em câmara de fluxo laminar e todo o material previamente autoclavado (frascos, pontas de micropipetas e a água destilada).

De modo a confirmar a sensibilidade da *C. vulgaris* realizaram-se ensaios com uma substância de referência – dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$).

3.4.2.2 Preparação da cultura de algas

Devem ser usados métodos adequados para garantir que as culturas de algas não são infectadas com bactérias (ISO 4833). As culturas anéxicas podem, deste modo ser desejáveis, mas as culturas de algas de uma única espécie são essenciais.

As culturas de reserva (cultivadas em frascos de ensaio contendo meio adequado) são pequenas culturas de algas que são regularmente transferidas para um meio fresco afim de servirem de material de ensaio inicial (pré-cultura). Durante a transferência, uma determinada quantidade de cultura “antiga” é transferida por meio de pipetas esterilizadas para um frasco de ensaio contendo o meio fresco.

A pré-cultura é passível de ser utilizada em ensaio após período de incubação de cerca de três dias.

No presente trabalho, as culturas foram desenvolvidas numa sala a temperatura ambiente, com borbulhamento de ar, de modo a manter as células em suspensão e melhorar as trocas gasosas, e com iluminação uniforme contínua (as culturas foram colocadas a aproximadamente 35 cm de uma lâmpada fluorescente de luz branca de 35 W). Todas as operações foram efectuadas sob condições estéreis (a manipulação das culturas foi sempre efectuada no interior da câmara de fluxo laminar e todo o material e água desionizada utilizados foram previamente esterilizados em autoclave) de maneira a evitar a contaminação das culturas.

3.4.2.3 Tratamento de dados

Uma vez obtida a relação entre a densidade celular e a leitura da absorvância a 440 nm, calcularam-se os valores de CE_{50} e CE_{20} , e fez-se a respectiva validação estatística através de um teste para a normalidade da distribuição dos resultados obtidos para cada concentração e um teste de homogeneidade da variância, de acordo com o Manual da EPA (2002) - “Short-term

Methods for estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms". No Anexo C é apresentado um exemplo dos cálculos para o ensaio efectuado com a substância de referência – dicromato de potássio.

Método de Interpolação Linear para o Cálculo de CE_x

$$CE_x = C_j + [M_{(j)} (1 - p/100) - M_j] \frac{(C_{(j+1)} - C_j)}{(M_{(j+1)} - M_{(j)})}$$

sendo,

CE_x – concentração efectiva que causa x % de inibição

C_j – concentração de ensaio testada cujo efeito de inibição é imediatamente inferior à inibição x pretendida

$C_{(j+1)}$ - concentração de ensaio testada cujo efeito de inibição é imediatamente superior à inibição x pretendida

M_j – média da resposta de inibição (N° algas/mL) para a concentração de ensaio C_j

$M_{(j+1)}$ - média da resposta de inibição (N° algas/mL) para a concentração de ensaio $C_{(j+1)}$

Quando não se regista monotonicidade, ou seja, quando para baixas concentrações de amostra testada se obtém crescimento superior ao do controlo, deve-se fazer média entre o crescimento obtido nessa(s) concentração(s) com o do controlo ($Y_{\text{médio suavizado}}$).

O método de interpolação linear é válido se se verificarem os requisitos para uma distribuição normal e homogeneidade da variância dos dados obtidos para cada concentração, de acordo com os testes que a seguir se descrevem.

Teste para a Normalidade de Shapiro-Wilk

$$D = \sum_{i=1}^n (X_i - X_{\text{médio}})^2$$

em que,

X_i – observação centrada i

$X_{\text{médio}}$ – média de todas as observações centradas

n – número total de observações centradas

$$W = \frac{1}{D} \left[\sum_{i=1}^k a_i (X^{(n-i+1)} - X^{(i)}) \right]^2$$

sendo,

a_i - coeficientes para o teste de Shapiro-Wilk

k – corresponde a $n/2$ se n for par e $(n-1)/2$ se n for ímpar

Aplica-se este teste ao conjunto de pontos experimentais constituídos pelos desvios em relação à média das observações para cada concentração testada, $X^{(i)}$. A média destes desvios ($X_{\text{médio}}$) é sempre zero.

Se o valor de W obtido for superior ao valor crítico tabelado para este teste (considerando um nível de significância de 0,01 e n observações centradas), então os dados estão normalmente distribuídos.

Teste de Bartlett para a Homogeneidade da Variância

$$B = \left[\left(\sum_{i=1}^p V_i \right) \ln S^2_{\text{médio}} - \sum_{i=1}^p V_i \ln S^2_i \right] / C$$

V_i – graus de liberdade para cada concentração testada e controlo, $V_i = (n_i - 1)$

p – número de concentrações testadas, incluindo o controlo

n_i – número de réplicas para a concentração i

$i = 1, 2, \dots, p$, em que p é o número de concentrações, incluindo o controlo

$$S^2_{\text{médio}} = \left(\sum_{i=1}^p V_i S_i^2 \right) / \sum_{i=1}^p V_i$$

$$C = 1 + (3(p-1))^{-1} \left[\sum_{i=1}^p 1/V_i - \left(\sum_{i=1}^p V_i \right)^{-1} \right]$$

B apresentará uma distribuição aproximada do tipo χ^2 com $p-1$ graus de liberdade quando as variâncias são semelhantes, isto é, se B for inferior ao valor crítico para essa distribuição, para um nível de significância de 0,01 e $p-1$ graus de liberdade.

3.5 Análise Estatística

Ao recorrer às análises estatísticas PCA, CA e MLR, é necessário proceder à normalização dos dados ($\mu = 0$ e $\sigma = 1$)

3.5.1 Análise dos Componentes Principais (PCA)

A análise dos componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*) é uma técnica muito utilizada na redução das dimensões de problemas com multivariáveis. A PCA cria novas variáveis, os componentes principais (PC – *Principal Component*), que são ortogonais e não correlacionáveis. Estas variáveis são combinações lineares das variáveis originais. Os PC são ordenados de tal modo que o primeiro componente principal é composto pela maior fracção de variabilidade dos dados originais (Abdul-Wahab et al, 2005; Wang, 2004 e Sousa et al, 2007). De modo a avaliar a influência de cada variável nos PC é geralmente utilizada a rotação *varimax* que permite obter um factor que representa a contribuição de cada variável

num componente principal específico. Como método de classificação não paramétrico, a PCA é aplicada na divisão dos pontos de amostragem em classes (PC) que possuam características de poluição semelhantes e diferentes dos que ocupam outras classes.

3.5.2 Análise de *Cluster* (CA)

A análise de *cluster* (CA – *Cluster Analyses*) é um método de classificação usado para dividir os dados em classes (*clusters*). O objectivo deste método é estabelecer um conjunto de *clusters*, de tal modo que os objectos no mesmo *cluster* são similares entre si e diferentes dos objectos contidos em outros *clusters* (Kannel et al, 2006). Pode ser também útil na redução de dados. A CA foi utilizada para agrupar os pontos de amostragem baseados na similaridade dos valores da concentração dos poluentes. É utilizada a distância Eucladiana e o Método das Médias das Distâncias para proceder ao agrupamento em *cluster*. Este procedimento é baseado nas distâncias médias entre todos os pares de objectos (os dois objectos tem de pertencer a *clusters* diferentes). Os dois objectos cuja distância média é a menor são ligados formando um novo *cluster*. Descreve-se de seguida o procedimento completo:

Passo 1: determinação das distâncias entre todos os objectos;

Passo 2: ligação dos dois objectos que correspondem à menor distância e recalcular as distâncias;

Passo 3: Repetição do passo 2 até inclusão de todos os objectos num *cluster*.

O número ideal de *clusters* a estabelecer pode ser determinado graficamente através de um dendograma, que é basicamente um diagrama em árvore, usualmente utilizada em Análises de Cluster (Manly, 1994 e Mckenna, 2003).

3.5.3 Regressão Linear Múltipla (MLR)

A regressão linear múltipla (MLR – *Multiple Linear Regression*) procura modelar a relação entre duas ou mais variáveis independentes e a variável de resposta (y), através do ajuste dos dados observados a uma equação linear.

$$y = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i + \varepsilon$$

em que x_i ($i=1, \dots, k$) são as variáveis independentes, $\hat{\beta}_i$ ($i=0, \dots, k$) os coeficientes de regressão, e ε o erro associado à regressão, que se assume ter distribuição normal e variância constante (Agirre-Basurko, 2006).

O valor previsto dado pelo modelo de regressão ($\hat{y}$) é calculado através de:

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i$$

O método mais comum para estimar os parâmetros de regressão $\hat{\beta}_i$, é a minimização da soma do quadrado dos erros, segundo a equação:

$$\hat{\beta}_i = \arg \min \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Este método é usualmente utilizado no ajuste dos dados observados e na criação de modelos de previsão. O MLR é utilizado para tentar prever os valores de ecotoxicidade, comparando-os com os diversos parâmetros físico-químicos e bacteriológicos determinados.

A significância dos parâmetros de regressão no modelo de MLR é avaliada através do cálculo dos intervalos de confiança. O parâmetro $\hat{\beta}_i$ é válido se:

$$|\hat{\beta}_i| > \frac{t^{\alpha/2} \hat{\sigma}}{\sqrt{S_{xx_i}}}$$

em que t é o valor da distribuição de Student, n o número de pontos, k o número de parâmetros, α é o nível de significância, $\hat{\sigma}$ é o desvio padrão dado por

$\sqrt{\frac{SSE}{n-k-1}}$, e Sxx_i é a soma do quadrados relativos a x_i segundo a expressão

$$\sum_{j=1}^n (x_{i,j} - \bar{x}_i)^2.$$

Os parâmetros de regressão são considerados válidos para valores positivos de γ_i , definido por:

$$\gamma_i = \left| \hat{\beta}_i \right| - \frac{t_{n-k-1}^{\alpha/2} \hat{\sigma}}{\sqrt{Sxx_i}}$$

Deste modo, são determinadas as equações de regressão correspondentes a todas as combinações possíveis das variáveis independentes, através da selecção dos parâmetros válidos e do menor valor de SSE (**S**um of **S**quare **E**rror).

Capítulo 4

Resultados

- 4.1 Parâmetros Físico-Químicos: Variação Espacial e Temporal**
- 4.2 Parâmetros Bacteriológicos: Variação Espacial e Temporal**
- 4.3 Parâmetros Ecotoxicológicos: Variação Espacial e Temporal**

4.4 Resultados da Análise Estatística

4.1 Parâmetros Físico-Químicos: Variação Espacial e Temporal

Os resultados obtidos nas análises efectuadas aos parâmetros físico-químicos encontram-se no Anexo B.

4.1.1 Temperatura/ pH/ Potencial de Oxidação-Redução

A temperatura da água do rio Leça apresenta, nas campanhas realizadas (Figura 24), valores máximos no mês de Agosto ($T_{\text{média}} = 22,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e mínimos no mês de Fevereiro ($T_{\text{média}} = 10,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). A variação de temperatura entre estações em cada campanha não é significativa, não havendo, por isso, indícios de fontes de poluição térmica.

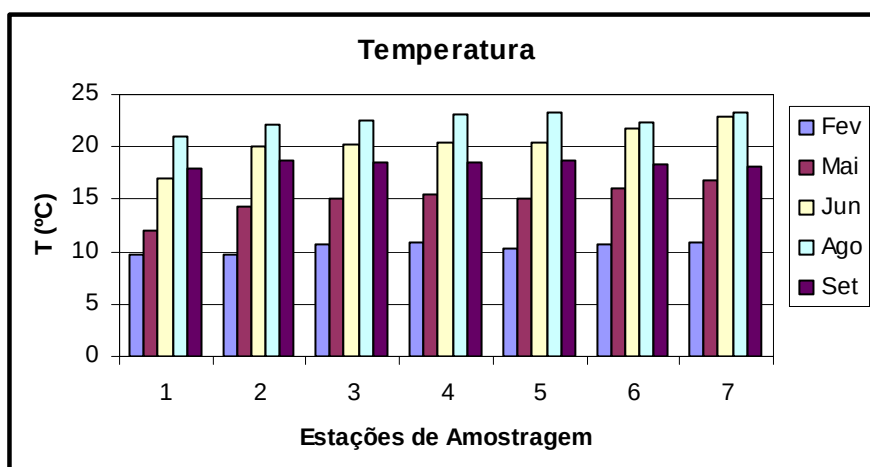


Figura 24 – Evolução temporal e espacial da temperatura

Quanto ao pH (Figura 25), apresenta sempre valores próximos da neutralidade, tendo-se observado os valores mais baixos nos meses de Junho, Agosto e Setembro, e mais altos em Fevereiro e Maio. Deste modo, o pH variou entre um mínimo de 5,64 na estação 2 no mês de Junho, e um máximo de 7,14 na estação 1 no mês de Fevereiro. As variações de pH ao longo das estações de amostragem não são significativas.

Segundo o **Anexo XXI do D.L. 236/98** (que estabelece normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos), todos os valores registados estão de acordo com os objectivos de qualidade mínima para águas superficiais, ou seja, $\text{pH} > 5$. Segundo o critério do INAG (tabela 7 e Anexo A), a água do rio Leça apresenta, geralmente, classificação C, excepto no mês de Fevereiro e na estação 1 (classe A).

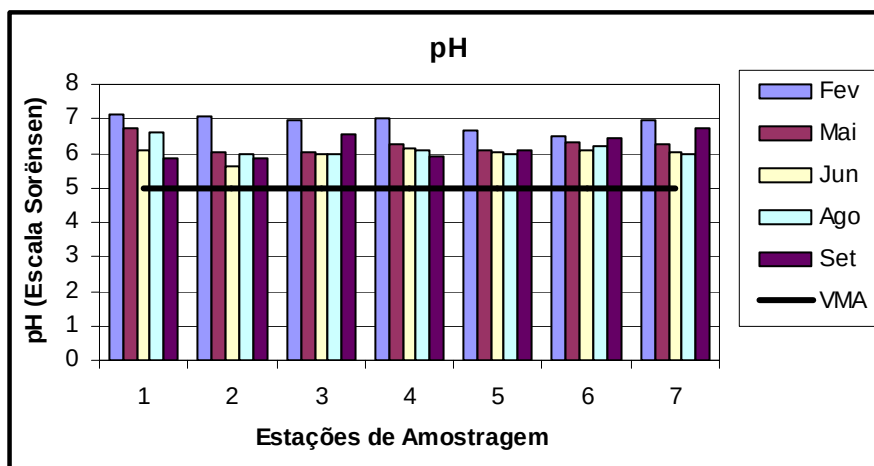


Figura 25 – Evolução temporal e espacial do pH

O potencial de oxidação-redução (Figura 26) apresentou os valores mais baixos nos meses de Agosto e Setembro - valores médios de 92 e 115 mV respectivamente -, e os mais altos em Maio e Junho - valores médios de 225 e 214 mV. A análise dos resultados obtidos em cada uma das campanhas não revela qualquer tendência de variação ao longo das estações.

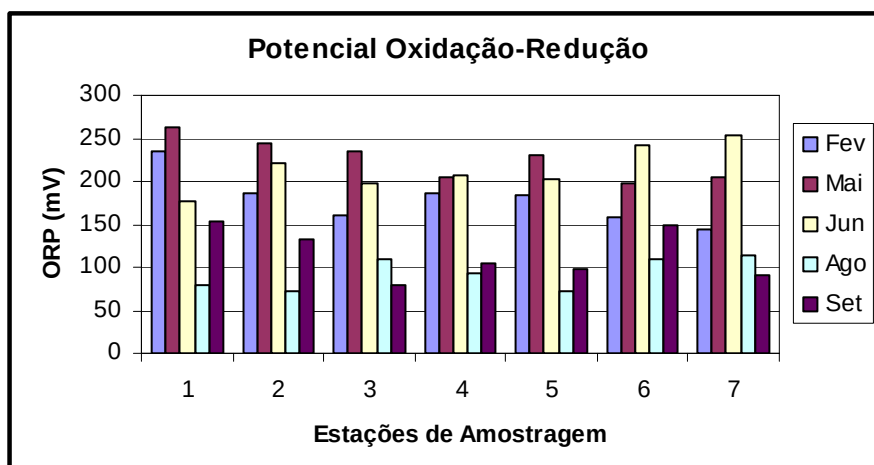


Figura 26 – Evolução temporal e espacial do potencial de oxidação-redução

4.1.2 Oxigénio Dissolvido

O oxigénio dissolvido (OD) apresentou (Figura 27) valores máximos em Fevereiro ($OD_{\text{médio}} = 10,3 \text{ mg O}_2/\text{L}$) e mínimos em Agosto e Setembro ($OD_{\text{médio}} = 5,5 \text{ mg O}_2/\text{L}$ em ambas as campanhas).

De um modo geral, os valores mais altos de OD são registados na estação 1 (Mai, Jun, Ago e Set) e os mais baixos na estação 3 (Fev, Jun e Ago).

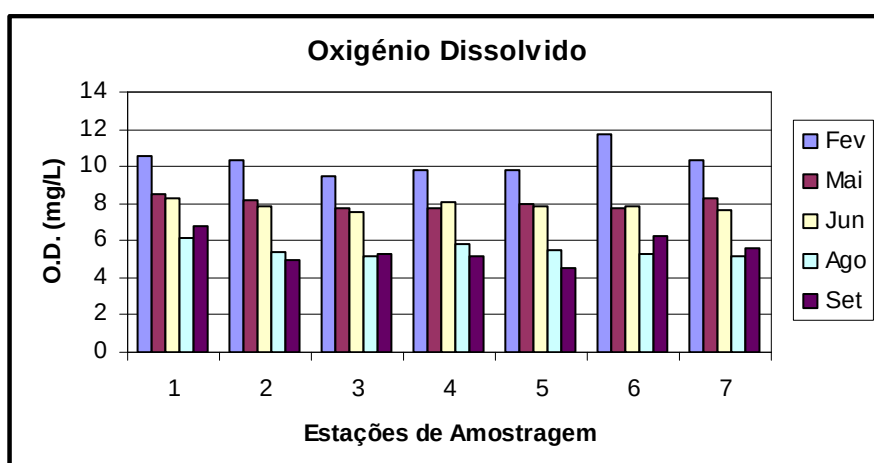


Figura 27 – Evolução temporal e espacial do oxigénio dissolvido

4.1.3 Condutividade

A condutividade (Figura 28) apresentou valores máximos no mês de Agosto - valor médio de $953 \mu\text{S}/\text{cm}$ - e mínimos em Fevereiro e Setembro - valores médios de 169 e $205 \mu\text{S}/\text{cm}$, respectivamente.

A estação 1 apresentou, em cada uma das campanhas, o valor mais baixo, enquanto que o valor mais alto foi obtido nas estações 7 (Mai, Jun e Ago) e 6 (Fev e Set), o que tem a ver com a progressiva mineralização da água ao longo do rio, com origem natural e antropogénica.

De acordo com o critério do INAG, para a qualidade de águas superficiais (Tabela 7 e Anexo A), todas as estações apresentaram classificação A, excepto no mês de Agosto em que as estações 3, 4, 5 e 6 apresentaram classificação B, a estação 2 classificação C, e a estação 7 classificação D.

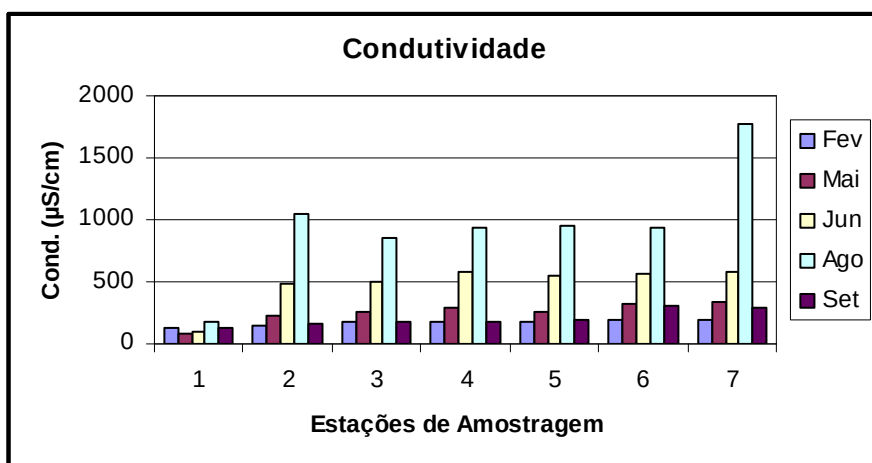


Figura 28 – Evolução temporal e espacial da condutividade

4.1.4 Turvação

A turvação (Figura 29), apresenta os valores mais altos nas campanhas realizadas em Setembro e Fevereiro – valores médios de 200 e 89 NTU, respectivamente - coincidindo com as amostragens realizadas em períodos de chuva, enquanto que nas restantes campanhas a turvação apresentou valores similares.

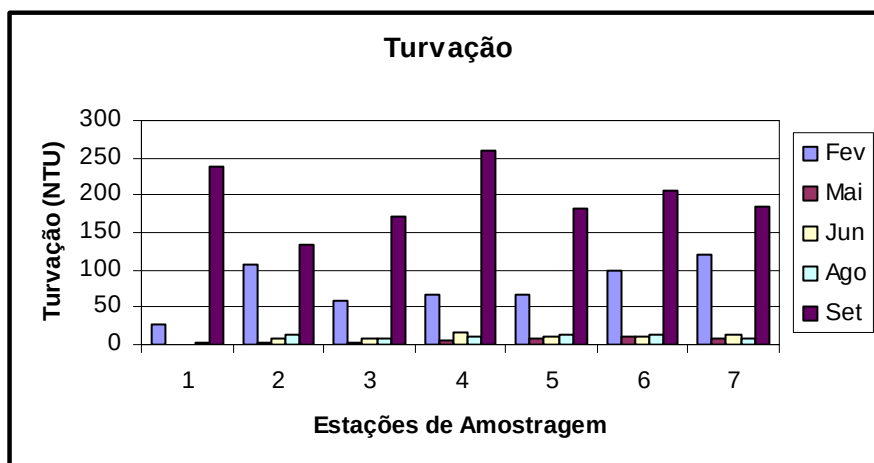


Figura 29 – Evolução temporal e espacial da turvação

A análise da evolução dos valores de turvação ao longo das estações de amostragem demonstra que a estação 1 apresenta na maioria das campanhas o valor mais baixo (Fev, Mai, Jun e Ago), enquanto que a estação 4 (Jun e Set) e a estação 6 (Mai e Ago) apresentam o valor mais alto.

4.1.5 Cor Verdadeira

Os valores mais elevados da cor verdadeira (Figura 30) foram observados na campanha realizada em Junho seguindo-se as campanhas de Agosto e Setembro – valores médios de 50, 33 e 32 unidades Platina-Cobalto. Os valores mais baixos foram registados na campanha do mês de Maio – valor médio de 2 unidades.

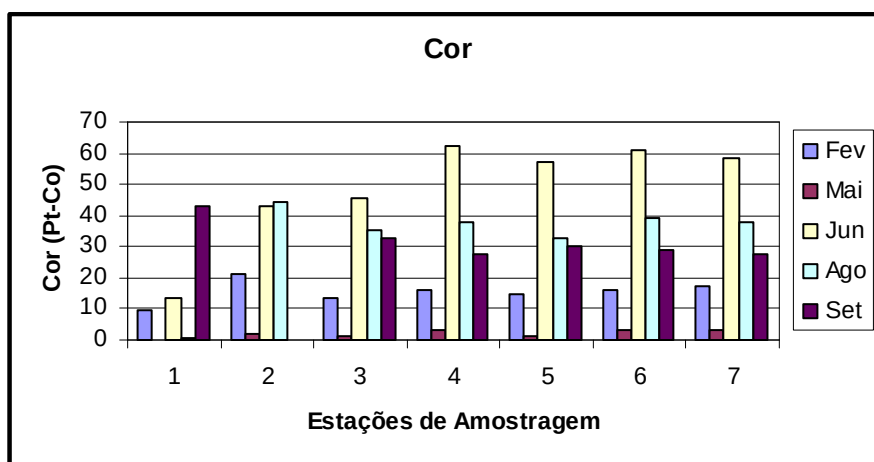


Figura 30 – Evolução temporal e espacial da cor

Comparando as estações de amostragem, verifica-se que a estação 1 é a que apresenta valores de cor mais baixos em todas as campanhas, com excepção de Setembro, enquanto que os valores mais altos foram registados na estação 2 (Fev e Ago) e estação 4 (Mai e Jun), ambas a jusante de ETARs.

4.1.6 Carbono Orgânico Dissolvido

Os valores mais altos de carbono orgânico dissolvido (Figura 31) foram registados na campanha efectuada no mês de Agosto ($COD_{\text{médio}} = 19,2 \text{ mg/L}$), seguindo-se as campanhas dos meses de Junho e Setembro ($COD_{\text{médio}} = 12,8$ e $11,4 \text{ mg/L}$), e os valores mais baixos nas campanhas de Fevereiro e Maio ($COD_{\text{médio}} = 4,8$ e $4,1 \text{ mg/L}$, respectivamente). Seria de esperar que as maiores concentrações pudessem ocorrer nos períodos de menor caudal do rio.

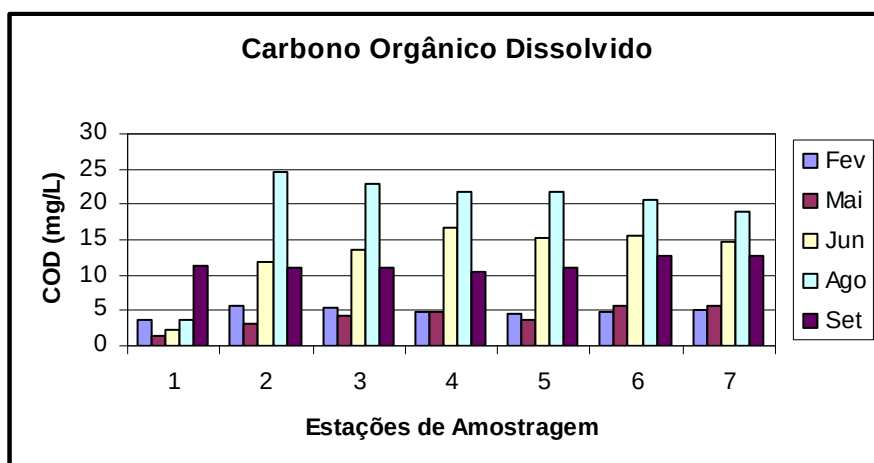


Figura 31 – Evolução temporal e espacial do carbono orgânico dissolvido

A estação 1 apresenta na maioria das campanhas (Fev, Mai, Jun e Ago) o valor mais baixo de carbono orgânico dissolvido.

4.1.7 Carência Bioquímica de Oxigénio

A carência bioquímica de oxigénio não foi determinada na 1ª campanha pelo que não há resultados relativos ao mês de Fevereiro. Os valores mais elevados foram registados (Figura 32) na campanha realizada em Agosto ($CBO_{5\text{médio}} = 18,9 \text{ mg O}_2/\text{L}$), e os mais baixos em Maio ($CBO_{5\text{médio}} = 7,3 \text{ mg O}_2/\text{L}$).

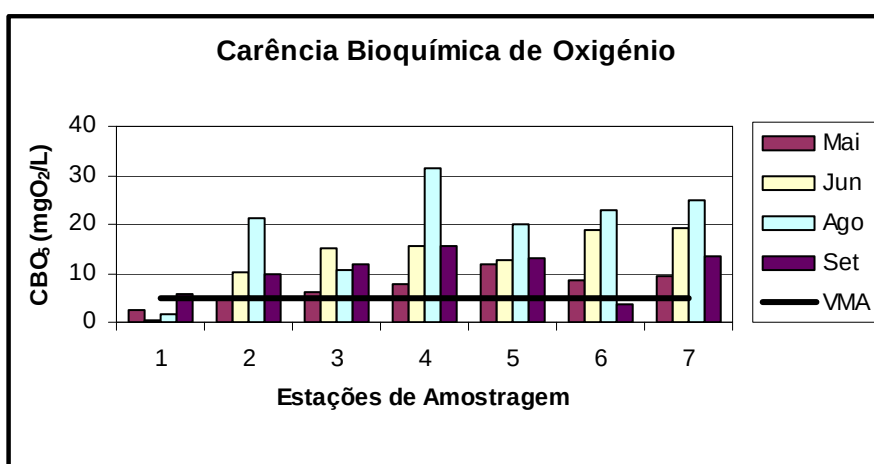


Figura 32 – Evolução temporal e espacial da carência bioquímica de oxigénio

Analisando os resultados por campanha, verifica-se que a estação 1 é a que apresenta os valores de CBO_5 mais baixos, excepto em Setembro, sendo por isso

praticamente a única estação que cumpre os objectivos de qualidade mínima para águas superficiais (CBO₅ inferior a 5 mg O₂/L, conforme **D.L. 236/98, Anexo XXI**).

Segundo o critério do INAG (Tabela 7 e Anexo A) apenas a estação 1 pertence à classe A, excepto em Setembro em que é da classe B, enquanto que as restantes estações geralmente tem classificação D.

4.1.8 Azoto Total

Relativamente ao azoto total (Figura 33), a campanha em que se registaram valores mais altos foi a realizada no mês de Agosto - valor médio de 59,9 mg N/L – e os valores mais baixos ocorreram em Setembro – valor médio de 8,3 mg N/L.

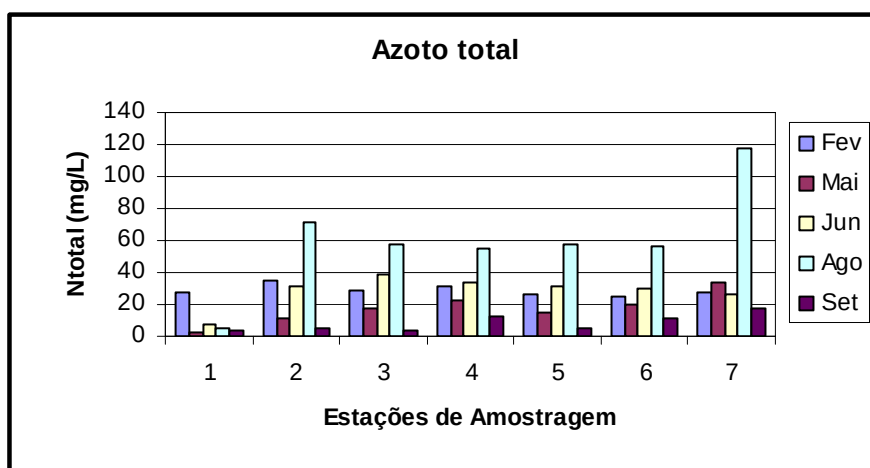


Figura 33 – Evolução temporal e espacial do azoto total

Analisando os resultados ao longo das estações de amostragem, a estação 1 é a que apresenta valores de azoto total mais baixos em todas as campanhas, com excepção da realizada em Fevereiro, enquanto que a estação 7 é a que apresenta concentrações de azoto mais elevadas em Maio, Agosto e Setembro.

4.1.9 Fósforo Total

Registaram-se valores máximos para o fósforo total (Figura 34) na campanha realizada no mês de Agosto – valor médio de 4,9 mg P/L -, e mínimos nas

campanhas de Fevereiro e Maio – valores médios de 0,7 e 0,8 mg P/L, respectivamente.

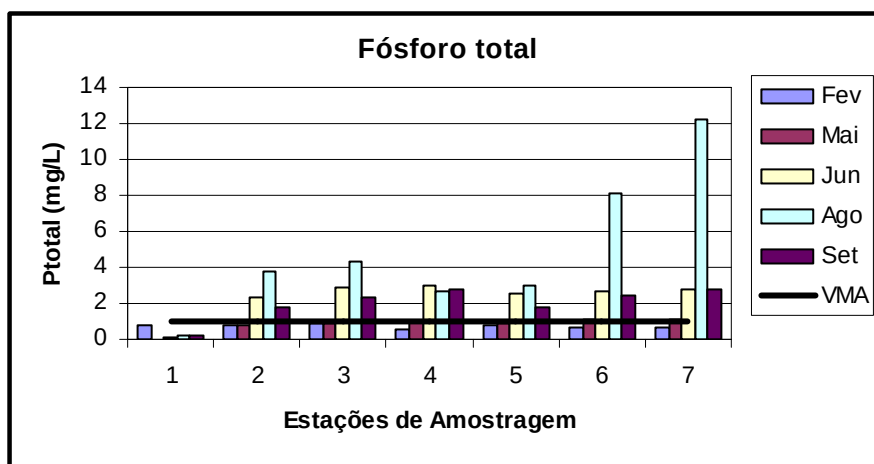


Figura 33 – Evolução temporal e espacial do fósforo total

A estação 1 é, mais uma vez, a que apresenta teores mais baixos de fósforo, em todas as campanhas, com excepção da realizada em Fevereiro. O objectivo de qualidade mínima para águas superficiais, **D.L. 236/98 Anexo XXI** (VMA = 1mg P/L), foi ultrapassado nas campanhas realizadas nos meses de Junho, Agosto e Setembro, em todas as estações de amostragem, excepto na estação 1.

4.1.10 Dureza Total

Relativamente à dureza total (Figura 35), a campanha realizada no mês de Agosto apresentou os valores mais elevados – valor médio de 140,3 mg CaCO₃/L - , enquanto que os valores mais baixos foram registados na campanha do mês de Fevereiro – valor médio de 59,3 mg CaCO₃/L.

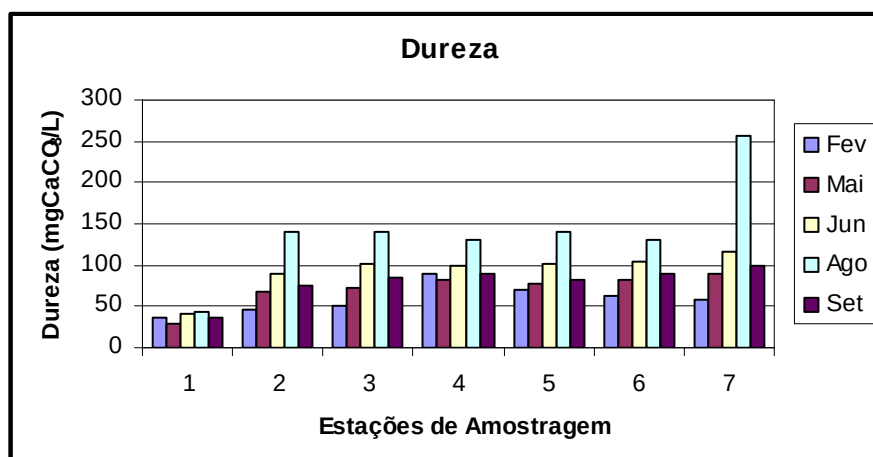


Figura 35 – Evolução temporal e espacial da dureza total

A estação 1 apresentou sempre o valor mais baixo e a estação 7 o valor mais alto em todas as campanhas, excepto na realizada em Fevereiro.

4.1.11 Metais Dissolvidos

Dos dez metais analisados, arsénio (As), cádmio (Cd), crómio (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), mercúrio (Hg), manganês (Mn), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn), nunca foram detectados em nenhuma das 5 campanhas, os seguintes: Cd (< 0,15 mg/L), Cr (< 0,08 mg/L), Cu (< 0,04 mg/L), Ni (< 0,08 mg/L) e Pb (< 0,03 mg/L).

O Zn foi detectado em todas as estações de amostragem apenas na campanha realizada em Fevereiro, apresentando valores entre 0,08 mg/L (estações 1, 5 e 6) e 0,22 mg/L (estação 2). O Mn foi detectado unicamente na estação 5 na campanha do mês de Junho (0,13 mg/L).

O Fe solúvel (Figura 36), foi detectado em todas as campanhas, excepto em Agosto, tendo-se registado valores máximos de: 0,33 mg/L na estação 6, em Fevereiro; 0,40 mg/L na estação 5, em Junho e 0,33 mg/L nas estações 2 e 3, em Setembro. Em Maio, o ferro foi detectado apenas na estação 5 com um valor de 0,40 mg/L.

De acordo com o critério do INAG (Anexo A), para os teores de zinco e ferro registados, as águas são de classe A, enquanto que para o manganês são da classe B.

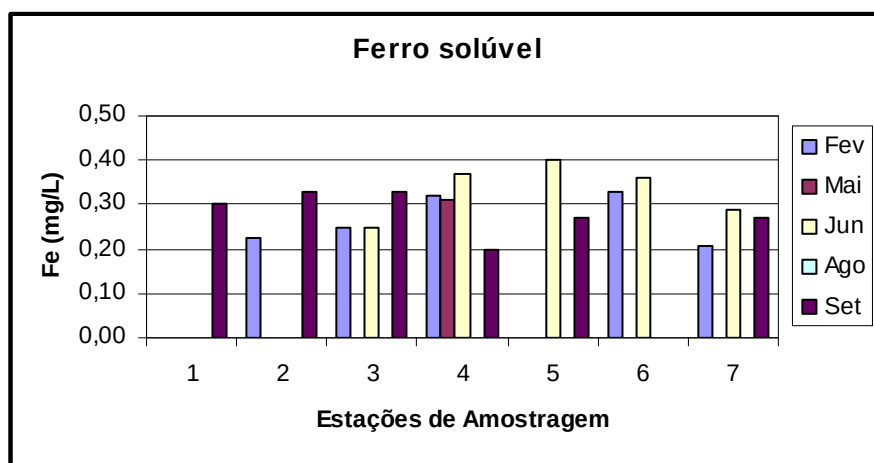


Figura 36 – Evolução temporal e espacial do ferro solúvel

O mercúrio solúvel (Figura 37), foi detectado em todas as campanhas, apresentando valores máximos de: 3,20 $\mu\text{g/L}$ na estação 3, em Fevereiro; 6,54 $\mu\text{g/L}$ na estação 7, em Agosto e 1,54 $\mu\text{g/L}$ na estação 5, em Setembro. Em Maio, o Hg foi detectado apenas nas estações 6 e 7 (0,42 e 0,43 $\mu\text{g/L}$) e, em Junho, na estação 5 (0,40 $\mu\text{g/L}$).

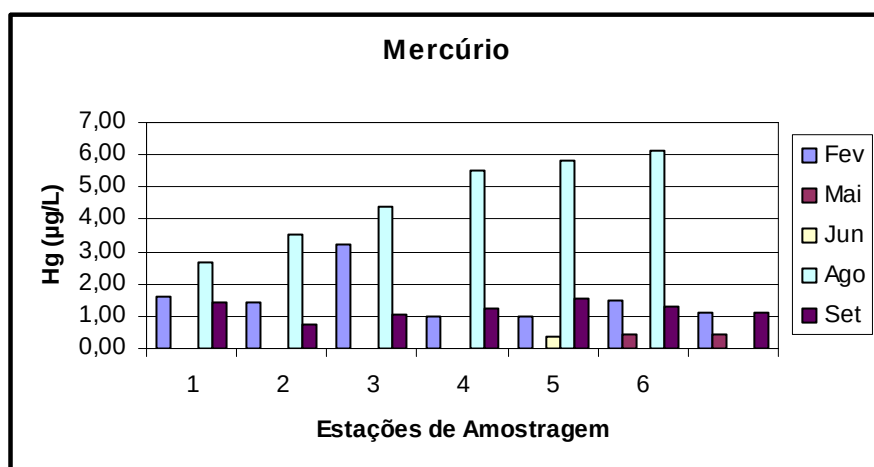


Figura 37 – Evolução temporal e espacial do mercúrio solúvel

Relativamente ao arsénio solúvel (Figura 38), não foi detectado na campanha em Maio, em Fevereiro foi detectado apenas nas estações 2 e 3 (1,49 e 2,42 $\mu\text{g/L}$), e, em Setembro, nas estações 1, 2 e 3 (0,83, 2,21 e 0,65 $\mu\text{g/L}$, respectivamente). Em Junho e Agosto os valores máximos foram de 1,74 $\mu\text{g/L}$ (estação 5) e 2,94 $\mu\text{g/L}$ (estação 3), respectivamente.

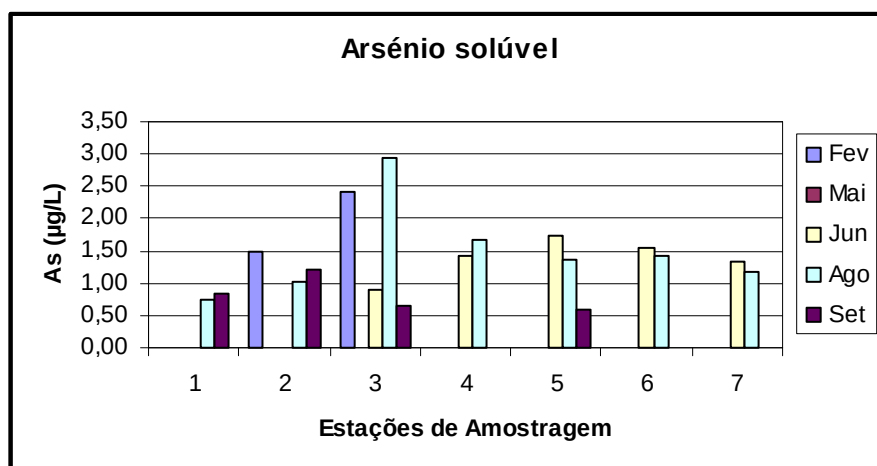


Figura 38 – Evolução temporal e espacial do arsénio solúvel

Segundo o critério do INAG, o mercúrio nos meses de Maio e Junho apresenta teores da classe A, enquanto que nos restantes meses está geralmente na classe E. Por sua vez, o arsénio apresenta-se sempre incluído na classe A.

4.1.12 Qualidade da Água – Parâmetros Químicos

Na tabela 12 encontra-se o resumo da classificação da qualidade pelo INAG, para os parâmetros físico-químicos analisados. A qualidade da água do rio Leça, de um modo global, classifica-o como “extremamente poluído” (classe E), devido aos parâmetros mercúrio e CBO_5 .

Tabela 12 – Classificação dos parâmetros físico-químicos analisados, segundo critérios do INAG (Tabela 7 e Anexo A)

Parâmetro	Mês	Estações de Amostragem						
		1	2	3	4	5	6	7
pH	Fev	A	A	A	A	A	A	A
	Mai	A	C	C	C	C	C	C
	Jun	C	D	C	C	C	C	C
	Ago	A	C	C	C	C	C	C
	Set	D	D	A	D	C	C	A
Condutividade	Fev	A	A	A	A	A	A	A
	Mai	A	A	A	A	A	A	A
	Jun	A	A	A	A	A	A	A
	Ago	A	C	B	B	B	B	D
	Set	A	A	A	A	A	A	A
CBO ₅	Mai	A	C	C	C	D	D	D
	Jun	A	D	D	D	D	D	D
	Ago	A	D	D	E	E	E	E
	Set	C	D	D	D	D	B	D
Fe	Fev	A	A	A	A	A	A	A
	Mai	A	A	A	A	A	A	A
	Jun	A	A	A	A	A	A	A
	Ago	A	A	A	A	A	A	A
	Set	A	A	A	A	A	A	A
Zn	Fev	A	A	A	A	A	A	A
	Mai	A	A	A	A	A	A	A
	Jun	A	A	A	A	A	A	A
	Ago	A	A	A	A	A	A	A
	Set	A	A	A	A	A	A	A
Mn	Fev	A	A	A	A	A	A	A
	Mai	A	A	A	C	A	A	A
	Jun	A	A	A	A	A	A	A
	Ago	A	A	A	A	A	A	A
	Set	A	A	A	A	A	A	A
Hg	Fev	E	E	E	C	C	E	E
	Mai	A	A	A	A	A	A	A
	Jun	A	A	A	A	A	A	A
	Ago	E	E	E	E	E	E	E
	Set	E	C	E	E	E	E	E
As	Fev	A	A	A	A	A	A	A
	Mai	A	A	A	A	A	A	A
	Jun	A	A	A	A	A	A	A
	Ago	A	A	A	A	A	A	A
	Set	A	A	A	A	A	A	A

4.2 Parâmetros Bacteriológicos: Variação Espacial e Temporal

Os resultados obtidos na determinação dos parâmetros bacteriológicos encontram-se no Anexo C.

4.2.1 Coliformes Totais

O teor em coliformes totais (Figura 39) apresenta os valores mais baixos em Fevereiro, Maio e Junho (teores médios de $2,5 \times 10^6$ a $2,8 \times 10^6$), enquanto que, em Agosto, se registaram os valores mais altos (teor médio de $2,21 \times 10^7$).

A estação 1 apresenta os teores mais baixos em todas as campanhas, excepto em Setembro, enquanto que as estações 2 (Ago e Set) e 3 (Fev e Mai) registaram os valores mais altos.

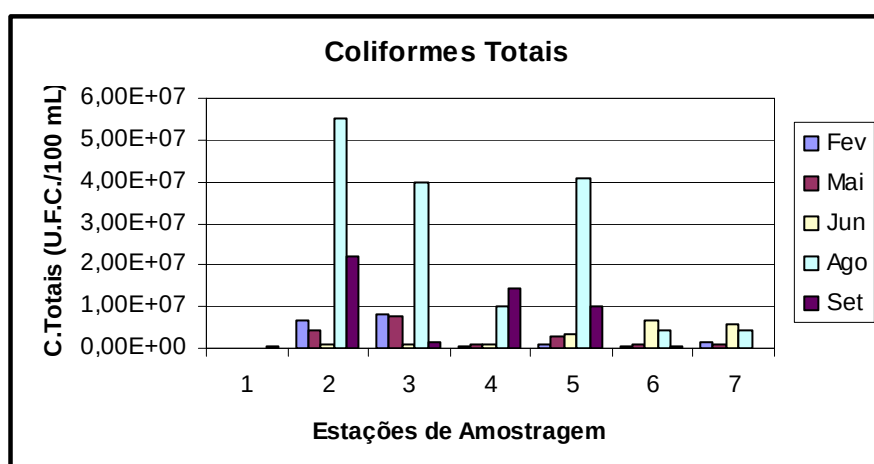


Figura 39 – Evolução temporal e espacial do teor de coliformes totais

O teor de coliformes totais apresenta sempre, de acordo com o INAG (Anexo A), classificação de “muito poluído”, classe D, excepto na estação 1 nos meses de Fevereiro, Maio e Agosto.

4.2.2 Coliformes Fecais

O teor de coliformes fecais (Figura 40) apresenta o valor mais baixo em Fevereiro (teor médio de $1,46 \times 10^4$) e o mais alto em Agosto (teor médio de $1,27 \times 10^6$). De modo similar aos coliformes totais, os valores mais baixos são registados na estação 1, excepto em Setembro, e os mais altos nas estações 2 (Fev e Ago) e 3 (Mai, Jun).

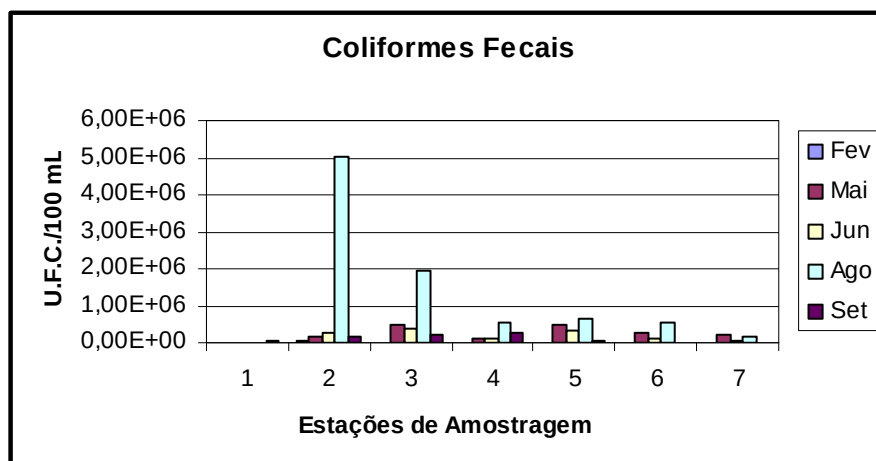


Figura 40 – Evolução temporal e espacial do teor de coliformes fecais

Segundo o critério do INAG, pelo teor de coliformes fecais, o rio classifica-se como “poluído” (classe C) apenas em Fevereiro, enquanto que nos restantes meses está sempre na classe D. A estação 1 apresenta-se sempre na classe A, excepto em Setembro.

4.2.3 Estreptococos Fecais

O teor de estreptococos fecais (Figura 41) apresenta o valor mais baixo em Maio (teor médio de $1,21 \times 10^4$) e o mais alto em Agosto (teor médio de $8,80 \times 10^4$). De modo similar aos coliformes totais e fecais, os valores mais baixos são registados na estação 1, excepto em Setembro, e os mais altos nas estações 2 (Fev e Ago) e 4 (Mai, Set).

Tal como nos parâmetros anteriores, pelo teor de estreptococos fecais, o rio classifica-se, em geral, como “muito poluído” (classe D), excepto no mês de Maio em que está na classe C. A estação 1, nos meses de Maio, Julho e Agosto, pertence à classe B, tal como as estações 6 e 7 no mês de Setembro.

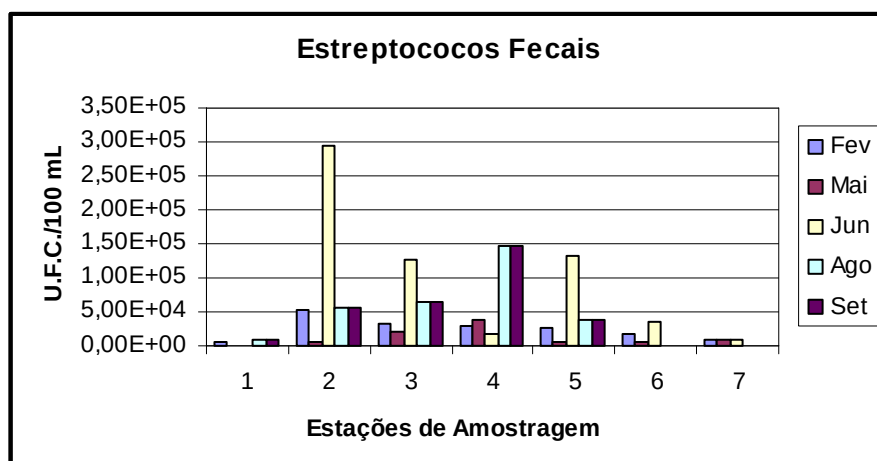


Figura 41 – Evolução temporal e espacial do teor de coliformes fecais

4.1.12 Qualidade da Água – Parâmetros Bacteriológicos

A qualidade da água do rio Leça, baseada nos parâmetros bacteriológicos (Tabela 13) classifica-se como “muito poluída” (classe D). A estação 1 relativamente à contaminação de origem fecal classifica-se maioritariamente como “fracamente poluída” (classe B).

Tabela 13 – Classificação dos parâmetros bacteriológicos analisados, segundo critérios do INAG (Tabela 7 e Anexo A)

Parâmetro	Mês	Estações de Amostragem						
		1	2	3	4	5	6	7
Coliformes Totais	Fev	C	D	D	D	D	D	D
	Mai	C	D	D	D	D	D	D
	Jun	D	D	D	D	D	D	D
	Ago	C	D	D	D	D	D	D
	Set	D	D	D	D	D	D	D
Coliformes Fecais	Fev	B	D	D	C	C	C	C
	Mai	B	D	D	D	D	D	D
	Jun	B	D	D	D	D	D	D
	Ago	B	D	D	D	D	D	D
	Set	D	D	D	D	D	C	C
Estreptococos Fecais	Fev	C	D	D	D	D	C	C
	Mai	B	C	C	D	C	C	C
	Jun	B	C	D	D	D	C	C
	Ago	B	D	D	C	D	D	C
	Set	C	D	D	D	D	B	B

4.3 Parâmetros Ecotoxicológicos: Variação Espacial e Temporal

4.3.1 Ecotoxicidade para *Vibrio fischeri* - Microtox®

Os resultados da ecotoxicidade no rio Leça apresentam-se na Tabela 14, sob a forma de CE_{50} , CE_{20} e respectivos limites de confiança 95%, e na Tabela 15, sob a forma de Unidades de Toxicidade (UT).

Os cálculos de CE_{50} e CE_{20} , e limites de confiança 95% encontram-se descritos no Anexo D, tendo como exemplo o ensaio realizado com a substância de referência (fenol - C_6H_5OH). Os resultados experimentais dos valores de Gama e Razão dos Brancos para cada ensaio realizado apresentam-se no Anexo E.

Tabela 14 – Resultados da ecotoxicidade para *Vibrio fischeri* : CE₅₀, CE₂₀ e limites de confiança a 95%

Mês	CE _x	t min	Estações de Amostragem						
			1	2	3	4	5	6	7
Fevereiro	50	5	> 100	> 100	15,9 (14,4 - 17,7)	16,0 (14,4 - 17,7)	70,6 (26,8 - >100)	67,9 (31,6 - >100)	16,0 (14,4 - 17,7)
		15	n. c.	> 100	17,5 (14,4 - 21,2)	17,5 (14,4 - 21,2)	47,3 (24,3 - 92,3)	58,3 (13,1 - >100)	n. c.
	20	5	82,2 (40,0 - >100)	75,9 (10,0 - >100)	5,5 (4,6 - 6,5)	5,5 (4,6 - 6,5)	21,3 (13,3 - 34,5)	21,5 (14,6 - 31,8)	5,5 (4,6 - 6,5)
		15	n. c.	50,8 (31,6 - 81,8)	6,3 (4,7 - 8,5)	6,3 (4,7 - 8,5)	23,2 (15,5 - 35,0)	21,5 (9,1 - 50,3)	n. c.
Maio	50	5	> 100	59,6 (33,9 - >100)	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
		15	> 100	67,2 (30,6 - >100)	87,1 (77,2 - 98,3)	> 100	> 100	> 100	> 100
	20	5	> 100	5,5 (3,4 - 8,9)	13,0 (8,5 - 20,0)	42,0 (20,9 - 84,6)	1,3 (0,5 - 3,7)	26,4 (25,6 - 27,1)	78,0 (42,3 - >100)
		15	> 100	4,3 (2,1 - 8,9)	8,6 (8,1 - 9,2)	28,4 (25,0 - 32,3)	12,1 (10,5 - 13,9)	24,8 (14,1 - 43,6)	32,4 (27,5 - 38,3)
Junho	50	5	> 100	n. c.	> 100	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.
		15	> 100	n. c.	> 100	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.
	20	5	> 100	n. c.	24,4 (18,1 - 33,0)	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.
		15	> 100	n. c.	17,0 (12,5 - 23,1)	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.
Agosto	50	5	n. c.	n. c.	24,8 (14,5 - 42,5)	n. c.	n. c.	32,5 (17,1 - 61,9)	>100
		15	n. c.	n. c.	22,3 (12,9 - 38,4)	n. c.	n. c.	31,0 (18,0 - 53,4)	>100
	20	5	n. c.	n. c.	13,3 (8,2 - 21,5)	n. c.	n. c.	15,5 (9,6 - 25,1)	82,2 (64,0 - >100)
		15	n. c.	n. c.	12,1 (7,1 - 20,5)	n. c.	n. c.	18,2 (12,0 - 27,8)	82,4 (61,4 - >100)
Setembro	50	5	> 100	16,2 (9,4 - 28,0)	17,3 (9,4 - 31,9)	> 100	29,5 (17,8 - 48,9)	n. c.	n. c.
		15	n. c.	18,9 (9,4 - 31,9)	16,1 (10,7 - 24,3)	n. c.	29,5 (16,5 - 52,8)	n. c.	n. c.
	20	5	37,3 (24,3 - 57,1)	9,8 (5,1 - 18,5)	9,3 (4,5 - 19,4)	> 100	14,4 (9,7 - 21,5)	n. c.	n. c.
		15	n. c.	12,3 (8,0 - 19,0)	10,0 (6,3 - 16,2)	n. c.	15,4 (9,8 - 24,4)	n. c.	n. c.

n. c. – não calculável, a luminescência emitida pelos ensaios com a amostra é superior à emitida pelo branco, resultando valores de Gama negativos

Tabela 15 – Resultados da ecotoxicidade para *Vibrio fischeri* : UT

Mês	UT	t (min)	Estações de Amostragem						
			1	2	3	4	5	6	7
Fevereiro	50	5	1	1	6,29	6,25	1,42	1,47	6,25
		15	1	1	5,71	5,71	2,11	1,72	1
	20	5	1,22	1,32	18,18	18,18	4,69	4,65	18,18
		15	1	1,97	15,87	15,87	4,31	4,65	1
Maio	50	5	1	1,68	1	1	1	1	1
		15	1	1,49	1,15	1	1	1	1
	20	5	1	18,18	3,53	76,92	3,79	3,79	1,28
		15	1	23,26	11,63	8,26	4,03	4,03	3,09
Junho	50	5	1	1	1	1	1	1	1
		15	1	1	1	1	1	1	1
	20	5	1	1	4,10	1	1	1	1
		15	1	1	5,88	1	1	1	1
Agosto	50	5	1	1	4,03	1	1	3,08	1
		15	1	1	4,48	1	1	3,23	1
	20	5	1	1	7,52	1	1	6,45	1,22
		15	1	1	8,26	1	1	5,49	1,21
Setembro	50	5	1	6,17	5,78	1	3,39	1	1
		15	1	5,29	6,21	1	3,39	1	1
	20	5	2,68	10,20	10,75	1	6,94	1	1
		15	1	8,13	10,00	1	6,49	1	1

Como $UT = 100 / CE_{50}$, para valores de $CE_{50} > 100$ assume-se $UT = 1$, ou seja, a amostra não apresenta toxicidade. De igual modo para os casos não calculáveis devido aos resultados negativos de Gama, a amostra não apresenta efeito tóxico, logo $UT = 1$.

Pelos valores de UT 50%, representados nas Figuras 42 e 43, torna-se fácil verificar que nos meses de Fevereiro e Setembro se registaram os valores mais elevados de toxicidade, enquanto que em Maio e Junho praticamente não se registou toxicidade.

Relativamente às estações é nítida a ausência de toxicidade na estação 1, enquanto que a estação 3, seguida pelas estações 2, 5 e 6, apresenta frequentemente valores de toxicidade.

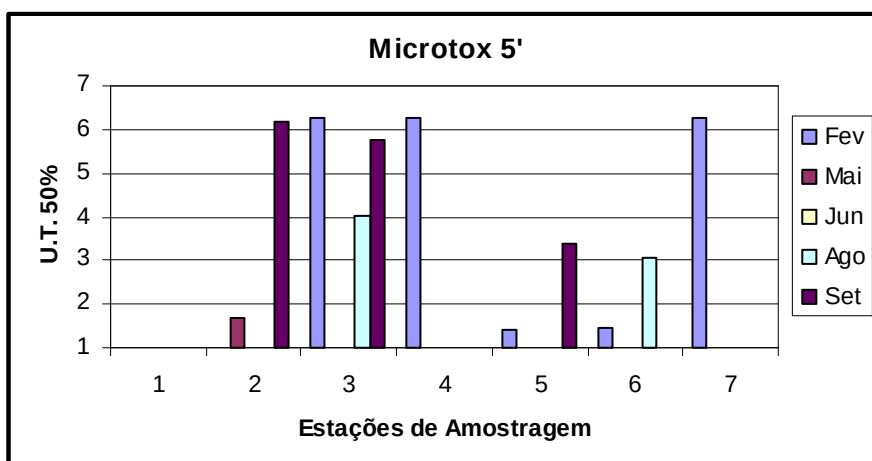


Figura 42 – Evolução temporal e espacial dos valores de UT 50% obtidas para *Vibrio fischeri* no Microtox®, ao fim de 5 minutos de ensaio

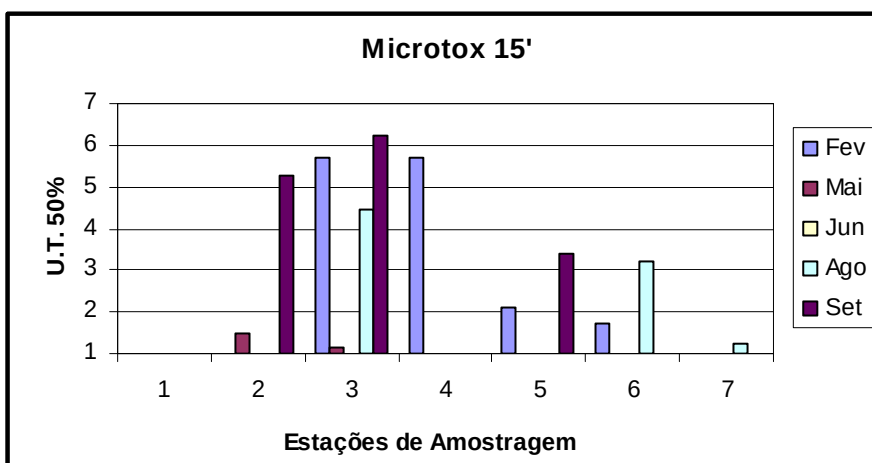


Figura 43 – Evolução temporal e espacial dos valores de UT 50% obtidas para *Vibrio fischeri* no Microtox®, ao fim de 15 minutos de ensaio

Analisando as Figuras 44 e 45, que representam os valores de UT 20% para 5 e 15 minutos de ensaio, verifica-se que, além dos meses de Fevereiro e Setembro, também Maio apresenta valores de toxicidade em diversas estações.

A estação 1 praticamente não apresenta valores de toxicidade, enquanto que a estação 3 apresenta valores de toxicidade em todos os meses.

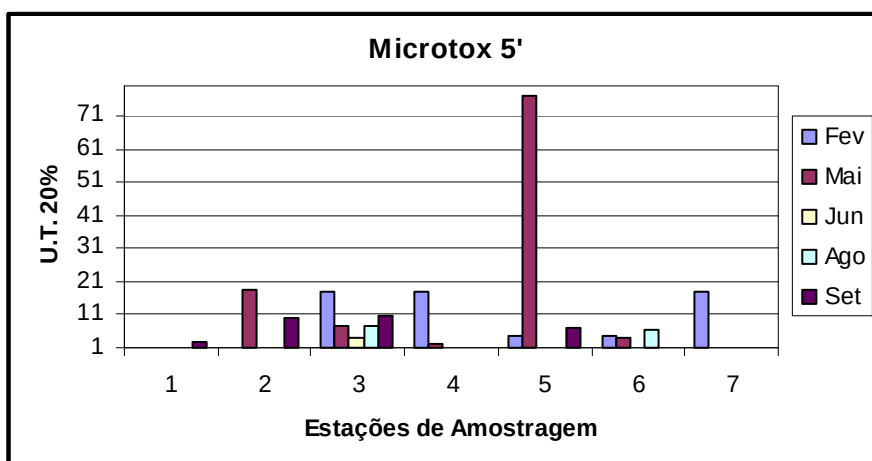


Figura 44 – Evolução temporal e espacial dos valores de UT 20% obtidas para *Vibrio fischeri* no Microtox®, ao fim de 5 minutos de ensaio

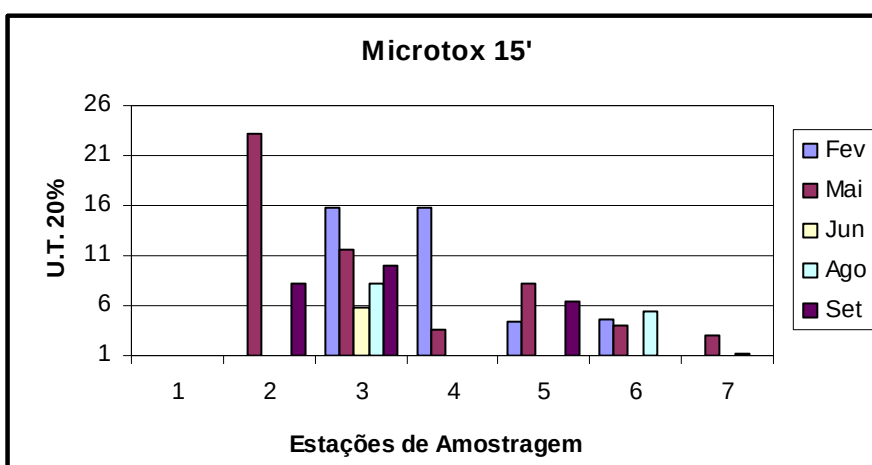


Figura 45 – Evolução temporal e espacial dos valores de UT 20% obtidas para *Vibrio fischeri* no Microtox®, ao fim de 15 minutos de ensaio

4.3.2 Ecotoxicidade para *Chlorella vulgaris*

Os resultados da ecotoxicidade no rio Leça apresentam-se na Tabela 16, sob a forma de CE_{50} , CE_{20} , e, na Tabela 17, sob a forma de Unidades de Toxicidade (UT).

Os cálculos de CE_{50} e CE_{20} , e validação estatística dos dados, encontram-se descritos no Anexo F, tendo como exemplo o ensaio realizado com a substância de referência (dicromato de potássio - $K_2Cr_2O_7$). Os resultados do crescimento das algas, bem como os valores de W e B, relativos aos testes de normalidade e de homogeneidade da variância dos dados, encontram-se no Anexo G.

Tabela 16 – Resultados da ecotoxicidade para *Chlorella vulgaris* CE₅₀, CE₂₀

Mês	CE _{xx}	Estações de Amostragem						
		1	2	3	4	5	6	7
Fevereiro	50	> 100	> 100	8,4	41,3	85,9	> 100	> 100
	20	51,8	38,0	3,4	6,0	30,6	39,3	7,2
Maio	50	n.c.	51,4	56,2	n.c.	29,0	n.c.	n.c.
	20	n.c.	29,8	26,2	n.c.	2,8	n.c.	16,5*
Junho	50	> 100	63,1**	27,0**	15,9*	n.c.	39,9**	64,6**
	20	95,0	80,7**	83,2**	26,2*	8,2*	81,5**	> 100
Agosto	50	n.c.	n.c.	8,8	83,2	63,8	n.c.	64,7**
	20	4,7**	n.c.	3,5	32,4	42,9	6,8*	> 100
Setembro	50	9,7	9,0	11,4*	21,6*	n.c.	5,6*	62,3**
	20	3,6	3,6	43,6*	26,8*	n.c.	12,0*	96,3**

n.c. – o efeito da amostra testada nos ensaios realizados foi de bioestimulação, ou seja, registou-se um aumento de crescimento quando comparado com o do controlo.

CE_{xx} * - para baixas concentrações de amostra obtiveram-se valores de inibição do crescimento, permitindo o cálculo do valor de CE₂₀, e em alguns casos também o de CE₅₀ no entanto, apresentaram efeitos de bioestimulação para os ensaios com as concentrações mais elevadas de amostra. Nestes casos deve-se analisar os valores de CE₅₀ e CE₂₀ com alguma reserva e especial cuidado.

CE_{xx} ** - as concentrações de amostra testadas causaram respostas de 50 e 20% de inibição do crescimento das algas, no entanto essa inibição diminui com o aumento da concentração testada, daí que CE₂₀ > CE₅₀.

Perante os resultados de bioestimulação investigou-se a possibilidade deste efeito poder ser parcialmente devido aos elevados níveis de contaminação bacteriológica presente na água do rio Leça, aos quais está associada uma elevada produção de CO₂. Deste modo, realizaram-se, em simultâneo e em triplicado, ensaios com amostras das estações 6 e 7 “tal e qual” e esterilizadas, em concentrações de 80% (v/v). Os ensaios efectuados com as amostras “tal e qual” apresentaram resultados de bioestimulação (16 e 26% de estimulação de crescimento relativamente ao controlo), enquanto as amostras estéreis apresentaram efeitos de inibição (65 e 54 % de inibição). Os resultados parecem sugerir uma influência da contaminação bacteriológica nos resultados de bioestimulação da alga *Chlorella vulgaris*.

Importa, neste momento, salientar algumas situações particulares:

Maio: a estação 7 apresenta inibição do crescimento para baixas concentrações de amostra e efeito de bioestimulação a partir de 29,0 % (v/v).

Junho: as estações 2, 3, 6 e 7 apresentaram resposta de inibição do crescimento, no entanto a resposta diminui com o aumento da concentração da amostra. As estações 4 e 5 apresentaram valores de inibição para baixas concentrações, e bioestimulação a partir de 35,6 e 16,3 % (v/v) de amostra, respectivamente. Os resultados das estações 2, 5, 6 e 7 parecem sugerir um ajuste de 2ª ordem (parábola).

Agosto: a estação 1 apresenta unicamente valores de inibição inicialmente decrescentes com a concentração e depois crescentes, enquanto que a estação 6 apresenta resultados de inibição decrescentes para baixas concentrações, passando a bioestimulação crescente a partir de 15,2 % (v/v) de amostra. A estação 7 apresenta sempre resultados de inibição, que decresce com o aumento da concentração da amostra. As estações 1, 6 e 7 apresentam resultados que sugerem um ajuste de 2ª ordem (parábola).

Setembro: as estações 3, 4 e 6 apresentaram efeitos de inibição do crescimento a baixas concentrações e de bioestimulação a partir de 77,5, 31,9 e 16,2 % (v/v), respectivamente. A estação 7 apresenta sempre valores de inibição em todas as concentrações testadas no entanto, a inibição aumenta e depois diminui com o aumento da concentração. Os resultados das estações 4, 6 e 7 sugerem um ajuste de 2ª ordem (parábola).

Segundo Sparks (2000) os modelos de regressão possíveis para análise de dados de resposta quantitativa, em experiências de toxicidade em laboratório, incluem a regressão linear e polinomial (parábola). A representação gráfica dos casos particulares está incluída no Anexo G.

Tabela 17 – Resultados da ecotoxicidade para *Chlorella vulgaris* UT

Mês	UT	Estações de Amostragem						
		1	2	3	4	5	6	7
Fevereiro	50	1	1	11,9	2,42	1,16	1	1
	20	1,93	2,63	29,4	16,7	3,27	2,54	13,9
Maio	50	1	1,94	1,78	1	3,45	1	1
	20	1,05	3,34	3,12	1	35,7	1	1 _(6,06)
Junho	50	1	1,58**	3,70**	1 _(6,29)	1	2,51**	1,55**
	20	1	1,24**	1,20**	1 _(3,82)	1 _(12,2)	1,23**	1
Agosto	50	1	1	11,3	1	1,57	1	1,55**
	20	21,28**	1	28,6	3,08	2,33	1 _(14,7)	1
Setembro	50	10,3	11,1	8,77*	1 _(4,63)	1	1 _(17,86)	1,60**
	20	27,8	27,8	2,29*	1 _(3,73)	1	1 _(8,33)	1,04**

À semelhança dos resultados de ecotoxicidade obtidos pelo Microtox®, os valores de $CE_{50} > 100$, tal como os resultados de bioestimulação quando convertidos em unidades de toxicidade, terão o valor 1, ou seja, quando $UT = 1$ não é observado efeito tóxico. As amostras que apresentam bioestimulação a partir de concentrações inferiores a 50 % (v/v) serão, para efeitos práticos, consideradas não tóxicas.

Pela análise dos valores de UT obtidos nos ensaios com *C. vulgaris* (Figuras 46 e 47) o mês que apresenta valores de toxicidade mais elevados e em maior número de estações é Fevereiro, seguindo-se Maio e Setembro. Relativamente às estações de amostragem, a estação 3 apresentou sempre valores de toxicidade, seguindo-se a estações 2 e 5, enquanto que as restantes apresentaram valores pontuais de toxicidade.

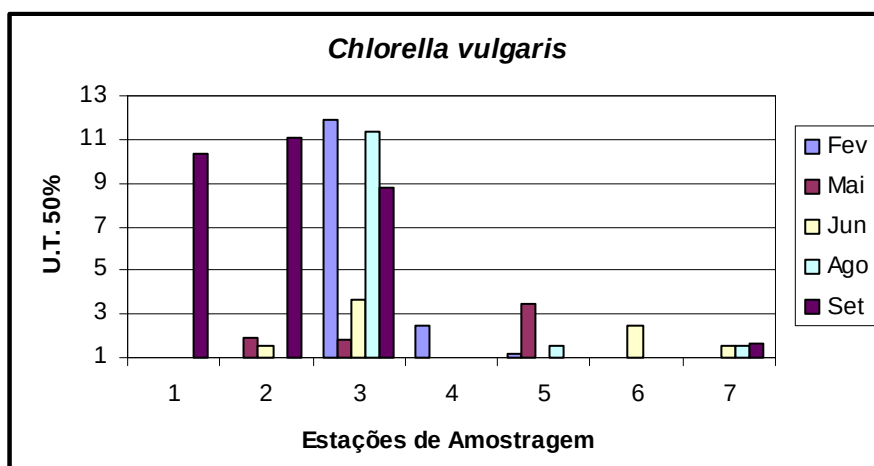


Figura 46 – Evolução temporal e espacial dos valores de UT 50% obtidas nos ensaios com *Chlorella vulgaris*

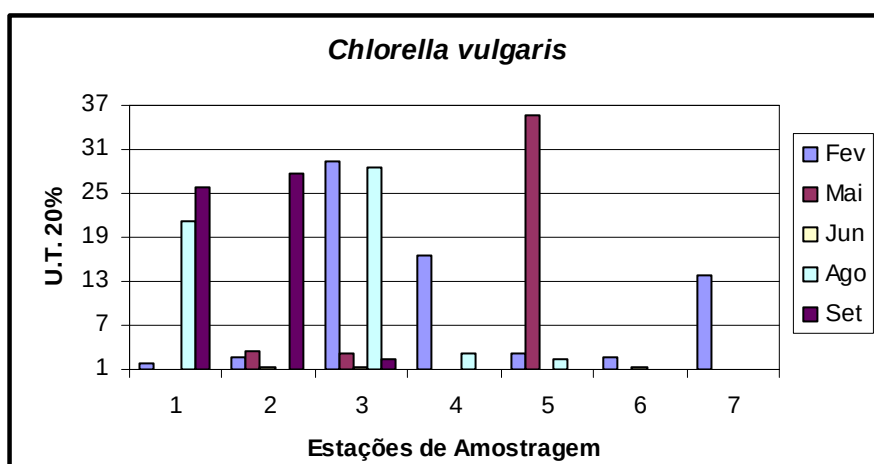


Figura 47 – Evolução temporal e espacial dos valores de UT 20% obtidas nos ensaios com *Chlorella vulgaris*

4.3.3 Ecotoxicidade do Efluente da ETAR de Parada

A Tabela 18 apresenta os dados relativos à amostra de efluente final da ETAR, recolhida a 12 de Setembro de 2006:

Tabela 18 – Resultados físico-químicos do efluente final ETAR

Parâmetro	pH	Cond. mS/cm	CBO ₅ mg/L	CQO mg/L	SST mg/L
	7,6	8	21	122	33

Relativamente aos resultados obtidos nos testes ecotoxicológicos, o efluente final da ETAR de Parada apresentou, para a *Vibrio fischeri* valores negativos de Gama (Anexo E), ou seja não revelou toxicidade. Com a *Chlorella vulgaris* obteve-se $CE_{20} = 91,4 \%$ ($UT_{20} = 1,09$) e $CE_{50} > 100$.

4.4 Resultados da Análise Estatística

4.4.1 Análise aos Parâmetros

4.4.1.1 Todos os parâmetros

Aplicou-se o método PCA aos parâmetros estudados no rio Leça (Anexo H). Os parâmetros foram agrupados em 7 componentes principais, explicando 86,7% da variância dos resultados. O PC1 inclui os parâmetros condutividade (P04), COD (P06), azoto total (P10), fósforo total (P11), dureza (P12) e mercúrio (P21), apresentando factores de -0,923, -0,729, -0,881, -0,935, -0,909, -0,834, respectivamente. No PC2 estão os parâmetros ecotoxicológicos, UT_{50} *Chlorella vulgaris* (P26), UT_{20} *Chlorella vulgaris* (P27); UT_{50} /5 min *Vibrio fischeri* (P28); UT_{20} /5 min *Vibrio fischeri* (P29); UT_{50} /15 min *Vibrio fischeri* (P30) e UT_{20} /15 min *Vibrio fischeri* (P31), sendo os factores de -0,811, -0,798, -0,800, -0,565, -0,833 e -0,712, respectivamente. No PC3 estão agrupados os parâmetros turvação (P08), Fe (P19), Mn (P20), As (P22), com factores de 0,681, 0,722, 0,752 e 0,520, enquanto que no PC4 se incluem os parâmetros bacteriológicos coliformes totais (P25), coliformes fecais (P26) e estreptococos fecais (P27), factores de 0,906, 0,902 e 0,929. O PC5 é ocupado pela cor (P09), com factor de 0,830, e o PC6 corresponde ao Zn (P15), com factor de -0,929.

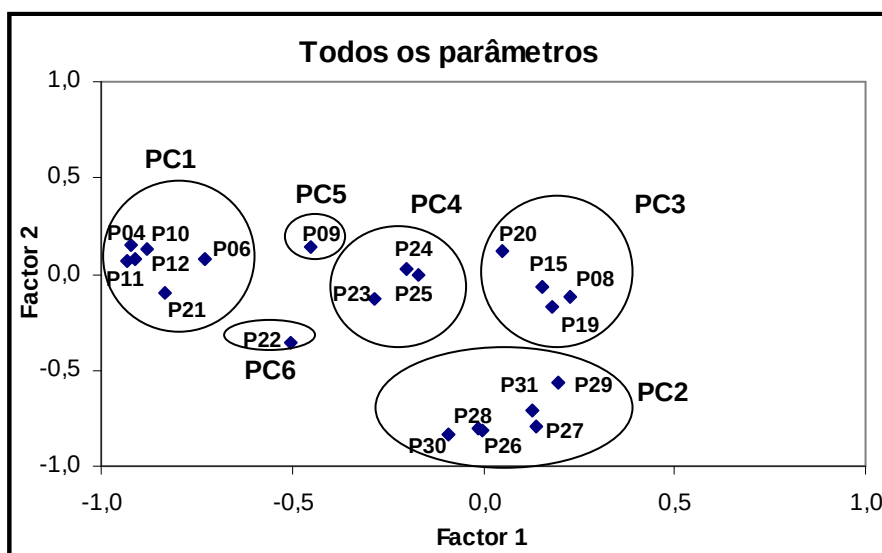


Figura 48 – Representação gráfica dos resultados da análise PCA a todos os parâmetros

4.4.1.2 Parâmetros ecotoxicológicos

O Anexo I apresenta os coeficientes estatisticamente válidos obtidos pela MLR. Esta análise teve como o objectivo de verificar possíveis relações entre os parâmetros físico-químicos e bacteriológicos com os resultados obtidos nos testes ecotoxicológicos.

Os resultados, obtidos por MLR (Anexo I), sugerem para os dados de ecotoxicidade UT_{50} para a *Vibrio fischeri* aos 5 minutos, correlação negativa com a condutividade, e positiva para a dureza, Hg e As, sendo $r = 0,642$, enquanto que para UT_{50} aos 15 minutos apresenta correlação negativa com a condutividade e a dureza, e positiva com o fósforo total, dureza, Fe, Hg, As e coliformes fecais, $r = 0,843$. Para os dados em UT_{20} não foi possível estabelecer qualquer correlação para os 5 minutos, mas para os resultados obtidos aos 15 minutos obteve-se correlação negativa com a condutividade e cor, e positivos com a dureza e o As, e $r = 0,576$. Relativamente à *Chlorella vulgaris*, para UT_{50} apresenta correlação negativa com o COD, Zn e Mn, e positiva para a turvação e As, sendo $r = 0,802$, enquanto para os dados de UT_{20} para a *C. vulgaris* apresentam correlação negativa com a cor e positiva com o As, $r = 0,514$.

4.4.2 Análise às Estações de Amostragem

Recorreu-se às técnicas de PCA E CA, de modo a dividir e classificar as estações segundo as características e similaridade dos parâmetros analisados.

4.4.2.1 Parâmetros Químicos

De modo a analisar as diferenças entre as estações, relativamente a alguns parâmetros químicos, procedeu-se à análise de PCA (Figura 49) e de CA (Figura 50). Os parâmetros químicos analisados (potencial de oxidação-redução, condutividade, OD, COD, CBO₅, azoto total, fósforo total e dureza) foram seleccionados através de matrizes de correlação.

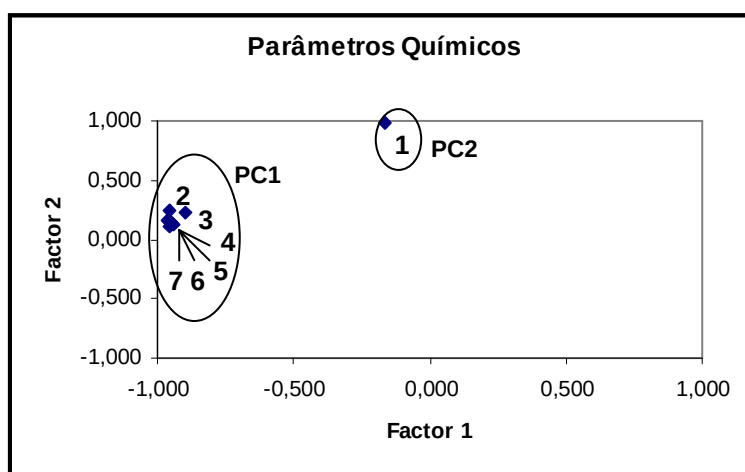


Figura 49 – Representação gráfica dos resultados da análise PCA às estações, tendo como base os parâmetros: potencial de oxidação-redução, condutividade, OD, COD, CBO₅, azoto total, fósforo total e dureza

Segundo a análise de PCA, dois componentes principais explicam 93,3% da variância dos parâmetros químicos seleccionados (Anexo H). As estações 2, 3, 4, 5, 6 e 7 apresentam para PC1 factores de (-0,954, -0,900, -0,948, -0,961, - 0,944, - 0,956, respectivamente), enquanto que a estação 1 apresenta factor de 0,985 relativamente a PC2.

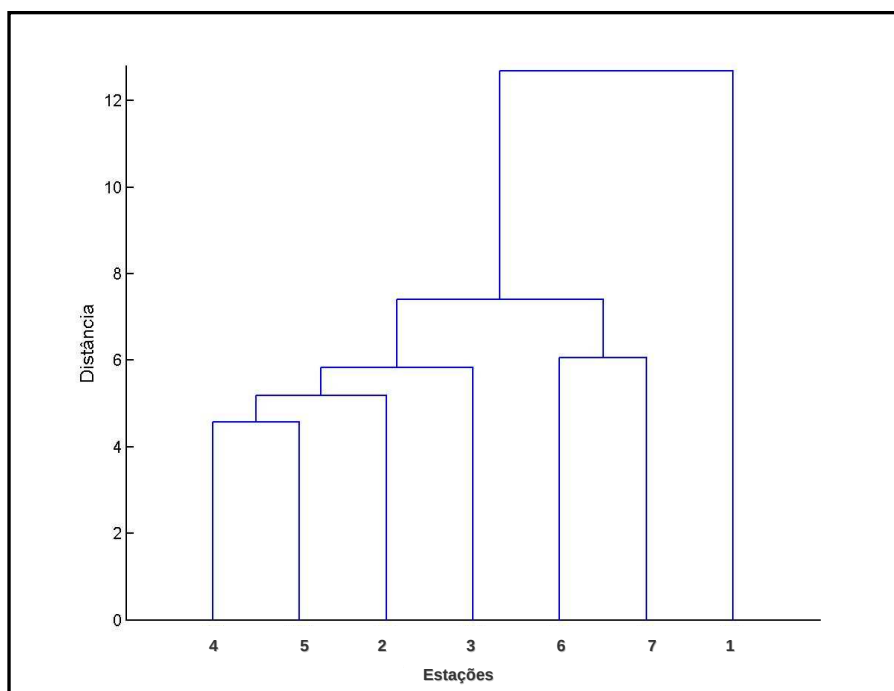


Figura 50 - Dendrograma dos *clusters* obtidos na análise às estações

A CA aplicada aos parâmetros químicos (potencial de oxidação-redução, condutividade, OD, COD, CBO₅, azoto total, fósforo total e dureza), divide as estações em dois grupos distintos. O *cluster* 1 (CL1) é composto pelas estações 2, 3, 4, 5, 6 e 7, quanto que o *cluster* 2 (CL2) é formado apenas pela estação 1. As estações 4 e 5 apresentam características químicas mais similares.

Os dois métodos estatísticos (PCA e CA) dividiram as estações de igual forma, de tal modo que, PC1 e PC2 correspondem a CL1 e CL2, respectivamente.

4.4.2.2 Parâmetros Bacteriológicos

As estações foram analisadas através de PCA e de CA tendo como base os resultados obtidos nos parâmetros bacteriológicos.

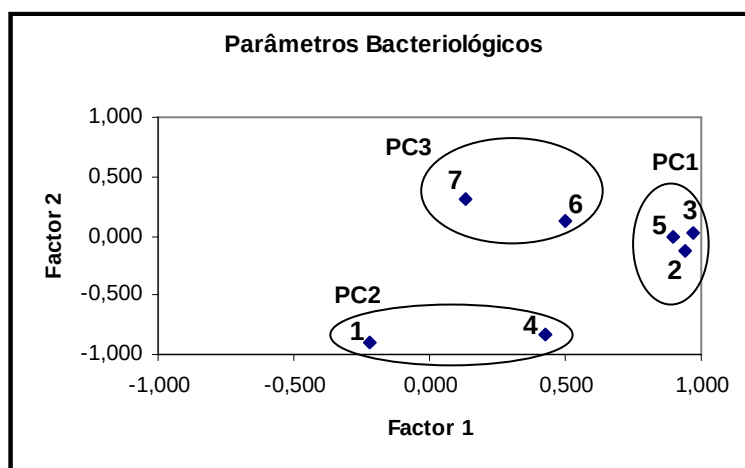


Figura 51 – Representação gráfica dos resultados da análise PCA às estações, tendo como base os parâmetros bacteriológicos

Segundo a análise PCA (Figura 51), as estações, quando agrupadas tendo como base os parâmetros bacteriológicos, distribuem-se em 3 PC que explica 93,0% da variância (Anexo H). O PC1 inclui as estações 2, 3 e 5 (factores de 0,941, 0,973 e 0,895, respectivamente), as estações 1 e 4 estão inseridas no PC2 (-0,902 e -0,829), enquanto o PC3 inclui as estações 6 e 7 (0,799 e 0,910).

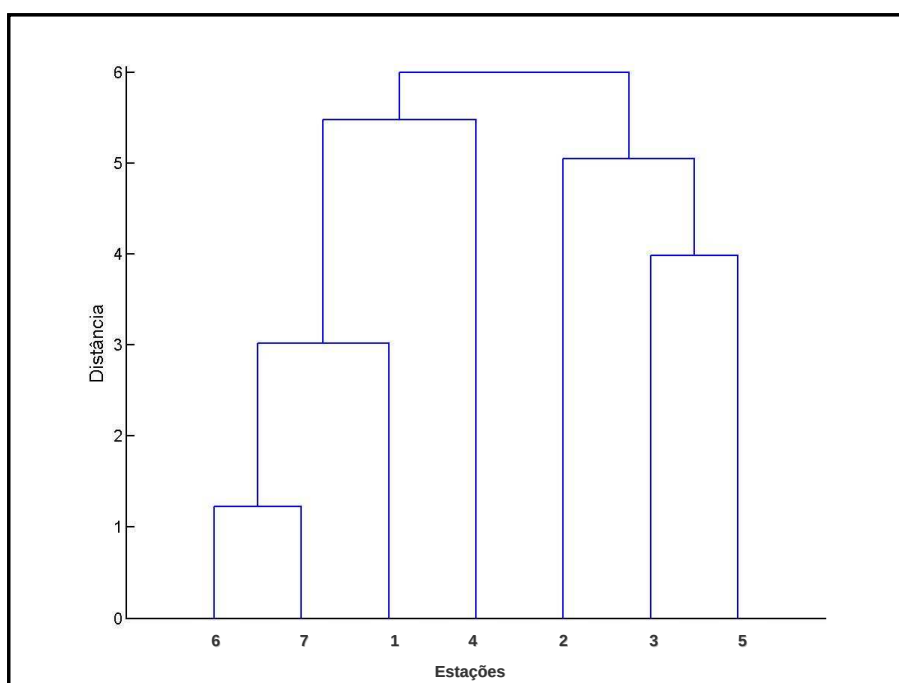


Figura 52 – Dendrograma dos *clusters* obtidos na análise às estações, tendo como base os parâmetros bacteriológicos

Pela CA (Figura 52) as estações são divididas em dois *clusters*. O CL1 é composto pelas estações 1, 4, 6, 7, e CL2 pelas estações 2, 3 e 5. Em CL1 as estações 6 e 7 são as que apresentam contaminação bacteriológica mais similar.

Comparando os dois métodos de análise, mais uma vez os dados são concordantes, e PC1 corresponderá a CL2, enquanto que PC2 juntamente com PC3 correspondem a CL1.

4.4.2.3 Parâmetros Ecotoxicológicos

As estações foram analisadas através de PCA e de CA, tendo como base os resultados obtidos nos testes ecotoxicológicos (*Vibrio fischeri* e *Chlorella vulgaris*).

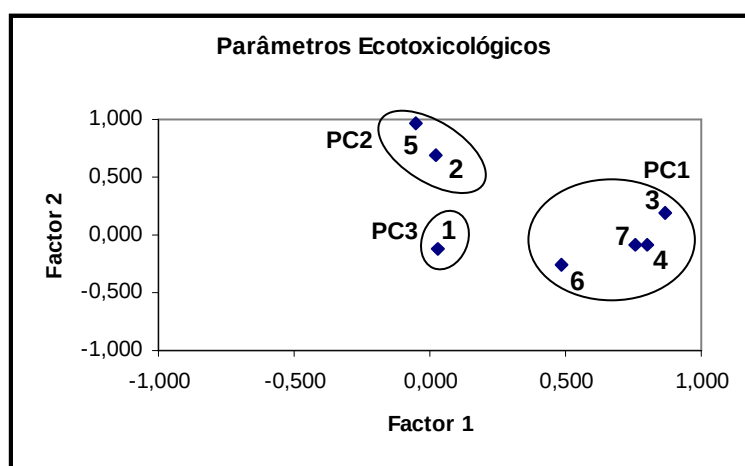


Figura 53 – Representação gráfica dos resultados da análise PCA às estações, tendo como base os parâmetros ecotoxicológicos

A análise de PCA (Figura 53), baseada nos resultados obtidos nos testes de ecotoxicidade, agrupa as estações em 3 PC que explica 75,3% da variância (Anexo H). As estações 3, 4, 6 e 7 estão inseridas no PC1, factores de 0,870, 0,803, 0,488 e 0,757, respectivamente. No PC2 agrupam-se as estações 2 e 5, apresentando factores de 0,693 e 0,964, enquanto no PC3 a estação 1 tem factor de 0,960.

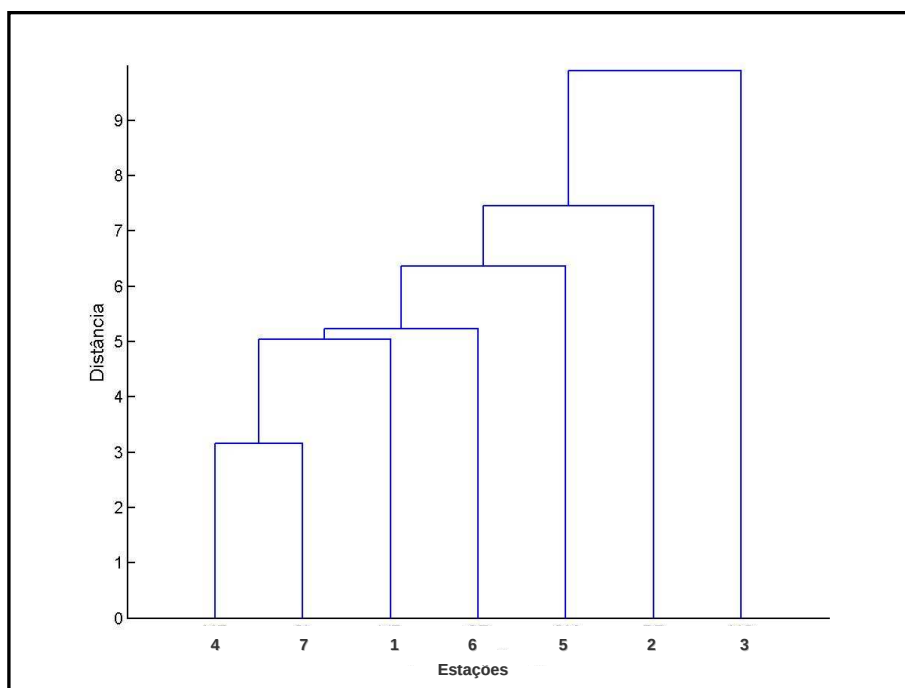


Figura 54 - Dendrograma dos *clusters* obtidos na análise às estações, tendo como base os parâmetros ecotoxicológicos

A divisão das estações por CA (Figura 54), divide as estações em dois clusters, o CL1 inclui as estações 4, 7, 1, 6, 5 e 2, demonstrando ainda muita proximidade nos resultados de ecotoxicidade entre as estações 4 e 7. O CL2 é formado apenas pela estação 3.

As duas técnicas estatísticas apresentam divisões das estações em classes ligeiramente diferentes, no entanto as estações 2 e 5 que constituem o PC2 aparecem próximas no dendrograma, do mesmo modo as estações 4, 7 e 6, incluídas no PC1, apresentam pela CA características muito semelhantes.

4.4.2.4 Todos os Parâmetros

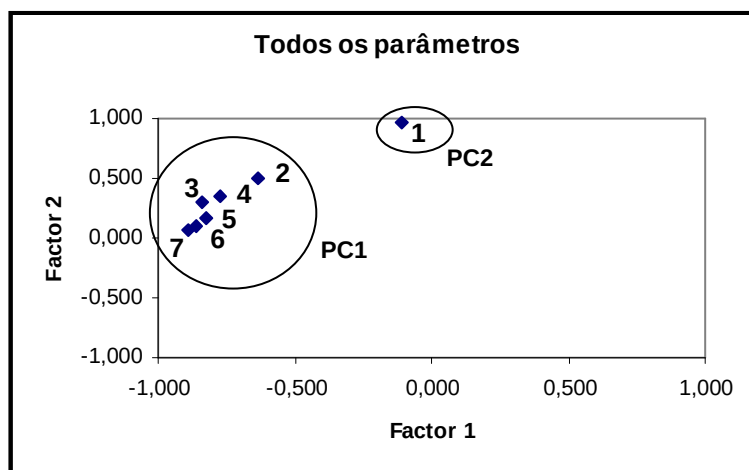


Figura 55 – Representação gráfica dos resultados da análise PCA às estações, tendo como base todos os parâmetros analisados

Segundo a análise dos componentes principais (Figura 55), dois PC explicam 76,6% da variância de todos os parâmetros analisados ao longo das 5 campanhas. As estações 2, 3, 4, 5, 6 e 7 apresentam para PC1 (correlações de -0,633; -0,839; -0,775; -0,823; -0,860 e -0,891, respectivamente), enquanto a estação 1 apresenta correlação de 0,960 relativamente a PC2.

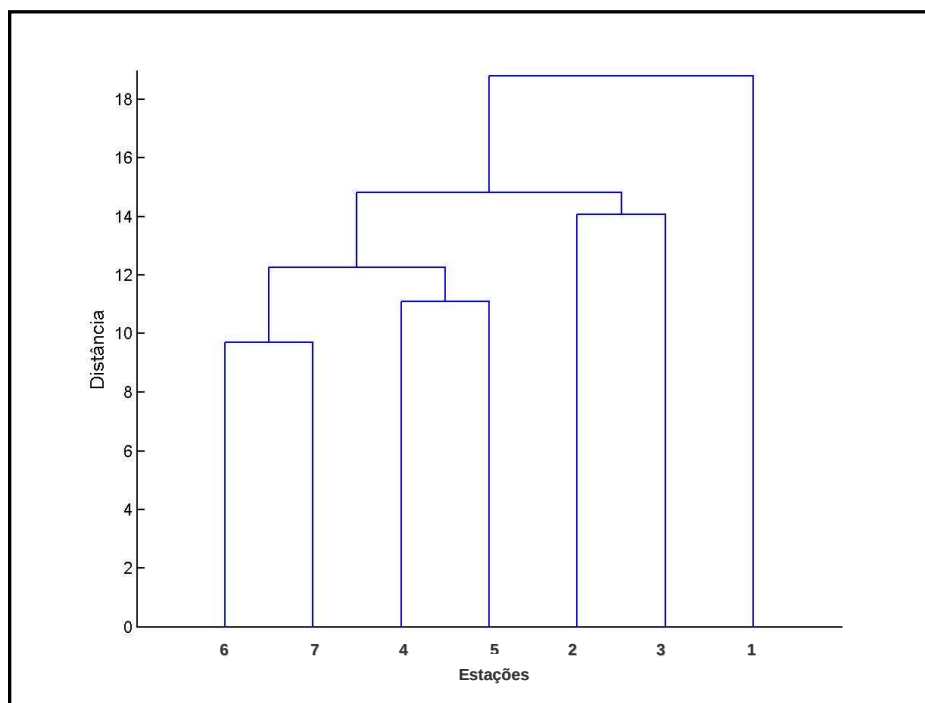


Figura 56 – Dendrograma dos *clusters* obtidos na análise às estações

Pela CA (Figura 56) as estações dividem-se em dois clusters. O CL1 é formado pelas estações 6, 7, 4, 5, 2 e 3, na qual as estações 6 e 7 são as que apresentam características mais similares, e o CL2 formado apenas pela estação 1.

Há concordância entre as duas técnicas de análise estatística, de tal modo que, PC1 e PC2 correspondem a CL1 e CL2, respectivamente.

Capítulo 5

Conclusão e Sugestões

5 Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

Este trabalho teve como objectivo avaliar a qualidade da água do rio Leça, não só pelas características químicas e bacteriológicas comumente utilizadas, mas recorrendo também às características ecotoxicológicas através dos ensaios realizados com a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri* e a alga verde *Chlorella vulgaris*. A qualidade química e bacteriológica da água do rio foi classificada segundo os critérios do INAG, e os diferentes parâmetros analisados foram sujeitos a análise estatística de PCA (análise de componentes principais), CA (análise de *cluster*) e MLR (regressão linear múltipla).

A PCA divide e classifica os parâmetros e as estações tendo como base a evolução dos valores dos parâmetros apresentados, enquanto que a CA divide e classifica as estações segundo as diferenças/similaridades entre os valores dos parâmetros seleccionados. A técnica de MLR, por sua vez, é aplicada na tentativa de estudar possíveis influências e interações entre os parâmetros químicos e bacteriológicos e os resultados da avaliação da ecotoxicidade.

Relativamente aos resultados dos parâmetros químicos analisados, e segundo os critérios de qualidade para águas superficiais do INAG, conclui-se que a água do rio Leça apresenta níveis de contaminação química que variam entre “muito” a “extremamente poluída”. Os parâmetros que mais contribuem para esta classificação são a CBO₅ (que sugere contaminação de origem orgânica – águas residuais urbanas) e o Hg (que sugere contaminação de origem inorgânica – águas residuais industriais). A estação de amostragem 1, localizada a montante, apresenta na maioria dos parâmetros valores característicos de uma água “sem poluição”, excepto para o mercúrio nos meses de Fevereiro, Agosto e Setembro. Os resultados obtidos na análise estatística de PCA e de CA realizada às estações, tendo como base os parâmetros químicos, são concordantes e permitem concluir que a estação 1 apresenta características químicas próprias, distintas das restantes estações, o que sugere degradação da qualidade química da água ao longo do rio.

Segundo os resultados obtidos nos parâmetros bacteriológicos estudados, e tendo como base o critério de qualidade do INAG, a água do rio Leça classifica-se como “muito poluída”. A estação 1 é a única que apresenta, em alguns meses, níveis de contaminação fecal característicos de águas “fracamente poluídas”. A

análise de PCA divide as estações em três grupos, sendo o PC1 composto pelas estações 2, 3 e 5, que inclui as estações que apresentam os maiores valores de contaminação bacteriológica. O PC2 é formado pelas estações 6 e 7, que apresentam valores de contaminação inferiores ao PC1, e por último, o PC3 que agrupa as estações 1 e 4, também com valores de contaminação inferiores aos do PC1. Apesar da nítida diferença entre os resultados bacteriológicos da estação 1 e 4, o seu agrupamento num PC poderá ser devido ao baixo valor dos parâmetros coliformes totais e coliformes fecais da estação 4 (a jusante da ETAR de Ponte de Moreira – Maia) relativamente à estação 3. Por sua vez, a análise de CA divide as estações em dois grupos. O grupo CL1 inclui as estações 6, 7, 1 e 4, sendo de salientar que as estações 6 e 7 são as que apresentam valores de contaminação bacteriológica mais similares. As estações 2, 3 e 5 formam o CL2, concordante com o PC1 formado pela análise de PCA. Deste modo, a evolução dos níveis de contaminação bacteriológica ao longo do rio parece ser: níveis relativamente baixos na estação a montante (estação 1); elevada contaminação nas estações 2 e 3; decréscimo dos valores na estação 4 (possivelmente devido à diluição da água do rio com o efluente da ETAR); aumento da contaminação na estação 5 e ligeira diminuição nas estações 6 e 7.

Como os compostos tóxicos presentes numa água superficial interagem, não só entre eles, como também com os outros compostos químicos e organismos presentes, variando a toxicidade global (devido a efeitos de antagonismo, sinergismo, etc.) e a biodisponibilidade (Olguín et al, 2004), os dados de ecotoxicidade foram submetidos, não só à análise estatística de PCA e de CA, mas também à técnica de MLR. Assim, os valores de UT_{50} obtidos para a *V. fischeri* ao fim de 15 minutos parecem ser influenciados negativamente pela condutividade e turvação, e positivamente pelo fósforo, dureza, ferro, mercúrio, arsénio e coliformes fecais ($r = 0,843$). De igual modo, para a *C. vulgaris* os valores de UT_{50} parecem ser influenciados negativamente pelo COD, zinco e manganês, e positivamente pela turvação e arsénio ($r = 0,802$).

Pela análise de PCA e CA, tendo como base os resultados ecotoxicológicos, obtêm-se uma divisão das estações ligeiramente diferente. Segundo a técnica de PCA formam-se três grupos. O PC1 é formado pelas estações 3, 4, 6 e 7, enquanto que o PC2 inclui as estações 2 e 5, o aumento do nível de contaminação bacteriológica verificado nestas estações poderá de algum modo justificar este agrupamento. A estação 1, uma vez que globalmente apresenta poucos valores de ecotoxicidade, forma o PC3. No entanto, a CA divide as estações em dois grupos, o

CL1 composto pelas estações 4, 7, 1, 6 e 2, sendo as estações 4 e 7 as que apresentam valores de ecotoxicidade global mais próximos, e o CL2 que inclui apenas a estação 3, o que parece estar de acordo com os resultados, uma vez que esta estação é a que apresenta valores de toxicidade com maior frequência para ambos os organismos-teste.

As constantes alterações que ocorrem nas águas superficiais, traduzidas pelos resultados obtidos ao longo das 5 campanhas de recolha, dificultam a obtenção de dados precisos nos testes de ecotoxicidade, relativamente a ensaios realizados com amostras puras. Por exemplo, o resultado da avaliação da ecotoxicidade de uma água no local de recolha pode ser superior ao obtido em laboratório, uma vez que a amostra poderá conter tóxicos não persistentes (por exemplo, compostos orgânicos voláteis). Também devido à variabilidade diária das características da água superficial, os resultados de ecotoxicidade obtidos num conjunto de amostras colhidas num dia não podem ser directamente comparados com os resultados de um segundo conjunto de amostras colhidas num outro dia (Olguín *et al*, 2004). Ou seja, os testes de avaliação da ecotoxicidade águas superficiais não são reproduzíveis como os testes de toxicidade aplicados a compostos químicos puros (Rand, 1995, Baez *et al*, 2004).

A avaliação da ecotoxicidade de águas superficiais é relevante em cursos de água contaminada como o caso do rio Leça, pois como os resultados obtidos sugerem, os parâmetros físico-químicos e bacteriológicos por si só não são suficientes. Para uma correcta monitorização e gestão de uma Bacia Hidrográfica como a do Leça, é necessário um estudo integrado que deve incluir a componente ecotoxicidade, indicando os possíveis efeitos que a contaminação do rio poderá ter nos organismos-vivos que dele fazem parte. Para tal, seria necessária a realização de campanhas de amostragem e análise de água frequentes (no mínimo, com frequência mensal), durante um maior período de tempo (no mínimo 2 anos), com um maior número de parâmetros analisados (o que poderia implicar a necessidade de alargar a equipa de analistas), medição/dados do caudal do rio, e medição/dados das cargas poluente dos efluente domésticos e industriais descarregados no rio.

Capítulo 6

Bibliografia

- 6.1 Referências**
- 6.2 Legislação Consultada**
- 6.3 Manuais de Equipamentos**
- 6.4 Outra Bibliografia Consultada**

6.1 Referências

Abdul-Wahab, S. A., Bakheit, C. S., Al-Alawi, S. M. – **“Principal Component and Multiple Regression Analysis in Modelling of Ground-Level Ozone and Factors Affecting Concentrations”** – Environmental Modelling and Software 20 (10), pp. 1263-1271, 2006

Agirre-Basurko, E., Ibarra-Berastegi, G., Madariaga, I. – **“Regression and Multilayer Perceptron-Based Models to Forecast Hourly O₃ e NO₂ Levels in the Bilbao Area”** – Environmental Modelling and Software, 21, pp 430-446, 2006

Baez, Maria C. D.; Rossini, Gustavo D. B.; Granados, Y.P. - **“Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas – Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones”** – Editado por Gabrila Castillo, 2004

Cotman, M.; Zargoc-Koncan, J. e Zgajnar-Gotvaj, A. – **“The Relationship Between Composition and Toxicity of Tannery Wastewater”** – Water Science Technology, Vol 49, No 1, pp 39-46, 2004

Dias, André – **“Testes de Toxicidade em *Artemia salina*: Contaminante (K₂Cr₂O₇) e Efluentes Químicos (Tratado e Não Tratado)”** – Relatório final da Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas, Universidade do Algarve, 2002

EPA (United States Environmental Protection Agency) – **“Short-term Methods for estimating the Chronic Toxicity os Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms”** – Fourth Edition, 2002

Guimarães, Eduardo; Lacava, Pedro; Magalhães, Neili – **“Avaliação da Toxicidade Aguda com *Daphnia similis* na Água Captada no Rio Paraíba e Processada na Estação de Tratamento de Água do Município de Jacarei”** – Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental, Vol 9, Nº 2, pp 124-130, 2004

Kannel, P. R., Lee, S., Kanel, S. R., Khan, S. P., - **“Chemometric Application in Classification and Assessment of Monitoring Locations of an Urban River System”** – Analytica Chemica Acta, In Press, 2006

Klaassen, Curtis D.; Watkins III, John B. – **“Essentials of Toxicology”** – The McGraw-Hill Companies Inc, 2003

Lin, Jui-Ho; Kao, Wei-Chen; Tsai, Huo-Pei; Chen, Chung-Yuan – **“A Novel Algal Toxicity Testing Technique for Assessing the Toxicity of Both Metallic and Organic Toxicants”** – Water Research, 39 (9), pp 1869-77, 2005

Manly, B. F. J. – **“Multivariate Statistical Methods: a Primer”** – 2^a Edição, Chapman and Hall, Londres, 1994

McKenna, J. E. – **“An Enhanced Cluster Analysis Program with Bootstrap Significance Testing for Ecological Community Analysis”** – Environmental Modelling and Software 18 (3), pp 205-220, 2003

OECD (Organization for economic Co-operation and Development) – **“Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”** – Environmental Health and Safety Publications, Paris, 2000

Olguín, Hector F; Puig, A.; Loez, C. R.; Salibián, A.; Topalián, M.L. – **“An Integration of Water Physicochemistry, Algal Bioassays, Phytoplankton, and Zooplankton for Ecotoxicological Assessment In a Highly Polluted Lowland River”** – Water, Air and Soil Pollution, 155, pp. 355-381, 2004

Rand, Gary M. – **“Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment”** – Editora Taylor & Francis, 1995

Reginatto, Valeria – **“Avaliação do Ensaio de Toxicidade com a Alga *Scenedesmus suspicatus* para o Estudo de Efluentes Industriais”** – Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998

Rodrigues, Maria Teresa O. G. – **“Aplicação do Lumistox na Determinação da Toxicidade de Amostras de Sedimentos”** – Universidade do Minho, 2005

Rodrigues, Néborá Vendramin – **“Testes de Toxicidade Aguda Através de Bioensaios no Extrato Solubilizado dos Resíduos Classe II A – Não Inertes e Classe II B – Inertes”** – Dissertação de Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005

Shaw, Ian C.; Chadwick, John – **“Principles of Environmental Toxicology”** – Editora Taylor & Francis, 1998

Silva, A. Cristina – **“Tratamento do Percolado de um Aterro Sanitário e Avaliação da Toxicidade do Efluente Bruto e Tratado”** – Dissertação de Mestrado em Eng^a Civil, Univ. Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002

Sousa, S. I. V., Martins, F. G., Alvim-Ferraz, M. C. M., Pereira, M. C. – **“Multiple Linear Regression and Artificial Neural Networks Based on Principal Components to Predict Ozone Concentrations”** – Environmental Modelling and Software 22, pp 97-103, 2007

Sparks, Tim – **“Statistics in Ecotoxicology”** – John Wiley e Sons, Ltd, 2000

Tecnilab – **“Analisador Automático de Toxicidade por Bioluminescência”** – catálogo 2003

Tisler, Tatjana; Zargoc-Koncan, Jana – **“Toxicity Evaluation of Wastewater from the Pharmaceutical Industry to Aquatic Organisms”** – Water Science Technology, Vol 39, No 10-11, pp 71-76, 1999

Tisler, Tatjana; Zargoc-Koncan, Jana – **“Acute and Chronic Toxicity of Arsenic to some Aquatic Organisms”** – Bulletin Environmental Contamination and Toxicity, pp 421-429, 2002

Velhas, Edite – **“A Bacia Hidrográfica do Rio Leça – Estudo Hidroclimatológico”** – Revista da Faculdade de Letras, Geografia, Série I, Vol VH, Porto, 1991

Vidotti, Elliane e Rollemberg, Cramo – **“Algas: da Economia nos Ambientes Aquáticos à Biorremediação e à Química Analítica”** Revista Química Nova, 2004

Walker, C.H.; Hopkins, S.P.; Sibly, R.M.; Peakall, D.B. – **“Principles of Ecotoxicology”** – Editora Taylor & Francis, 1997

Wang, S., Xiao, F. – **“AHU Sensor Fault Diagnosis Using Principal Component Analysis Method”** – Energy and Buildings 36 (2), pp 147-160, 2004

Williams, Phillip L. et al – **“Principles of Toxicology Environmental and Industrial Application”** – New York, John Wiley e Sons, 2002

Ministério do Ambiente e Direcção Regional do Ambiente e Recursos Naturais do Norte - **“Caracterização e Directrizes de Planeamento dos Recursos Hídricos do Norte – A Bacia Hidrográfica do Rio Leça”** - 1994

Ministério do Ambiente e Direcção Regional do Ambiente e Ordenamento do Norte - **“Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Leça”** – revisto em 2000

6.2 Legislação Consultada

Directiva 92/69/CEE, de 31 de Julho de 1992 – Comissão Europeia

Portaria nº 732-A/96, de 11 de Dezembro – Ministérios da Economia, da Saúde e do Ambiente

Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto – Ministério do Ambiente

Decreto-Lei nº 330-A/98, de 2 de Novembro – Ministério do Ambiente

Decreto-Lei nº 195-A/2000, de 22 de Agosto – Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território

Decreto-Lei nº 222/2001, de 8 de Agosto – Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território

Decreto-Lei nº 154-A/2002, de 11 de Junho – Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território

Lei nº 58/2005, de 29 de Dezembro – Assembleia da República

Directiva 2006/11/CE, de 15 de Fevereiro – Parlamento Europeu e do Conselho

Declaração de Rectificação nº 11-A/2006, de 23 de Fevereiro – Assembleia da República

Decreto-Lei nº 77/2006, de 30 de Março – Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional

6.3 Manuais de Equipamentos

“A Microtox Manual – How to Run a Standard Microtox Test” – Microbics Corporation

“A Microtox Manual – How to Reduce Microtox Test Data” – Microbics Corporation

“AA Hydride System HG3000, EHG3000 e MC3000 Operation e Service Manual”
– GBC Scientific Equipment Pty Ltd – Maio 1995

Antanasopoulos, Nick - **“Flame Methods Manual for Atomic Absorption”** - GBC Scientific Equipment Pty Ltd

6.4 Outra Bibliografia Consultada:

Almeida, Vanessa – **“Estudos de Ecotoxicidade em Efluentes da Indústria Farmacêutica”** – trabalho realizado no âmbito da disciplina Estudo de Casos da Pós-Graduação em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2004

Antão, M^a Cristina – **“Avaliação da Toxicidade de Composto de Níquel para o Cladócero *Daphnia magna* (Ensaio *in vivo* e *in vitro*)”** – Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade, Especialidade “Água e Alimentos”, Faculdade de Farmácia Universidade do Porto, Porto 2000

Araújo, C. V. M.; Nascimento, R.B.; Oliveira, C. A.; Strotmann, U. L. e Silva, E. M. – **“The Use of Microtox® to Assess Toxicity of Industrial Effluents from the Industrial District of Camaçari (Brazil)”** – Chemosphere 58, pp 1277 – 1281, Elsevier, 2005

Chapman, P. F.; Crane, M.; Wiles, J. A.; Noppert, F.; McIndoe, E. C. – **“Asking the Right Questions: Ecotoxicology and Statistics”** – Society of Environmental Toxicology and Chemistry – Europe, 1995

Castané, P. M.; Rovedatti, M. G.; Topallián, M. L.; Salibián, A. – **“Spatial and Temporal Trends of Physicochemical Parameters In the Water of the**

Reconquista River (Buenos Aires, Argentina)” – Environmental Monitoring and Assessment, 117, pp. 135-144, 2006

Dular, M.; Zargoc-Koncan, J. – **“Evaluation of Toxicity in Receiving Streams”** – Water Science Technology, Vol 26, No. 9 - 11, pp 2357 – 2360, 1992

Garay, V.; Roman, G.; Isnard, P. – **“Evaluation of PNEC Values: Extrapolation from Microtox®, Algae, Daphnid, and Fish Data to HC5”** –Chemosphere 40, pp 267 – 273, Pergamon, 2000

Harmel, V. Chapiewsky; Saar, J. Henri; Pinheiro, Adilson – **“Busca de Padronização de um Teste de Toxicidade Crônica com *Vibrio fischeri* para Análise da Qualidade de Águas Superficiais”** – trabalho apresentado no 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABESA – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005

Hoffmann, C.; Sales, D.; Christofi, N. – **“Combination Ecotoxicity and Testing of Common Chemical Discharges to Sewer Using the *Vibrio fischeri* Luminescence Bioassay”** – International Microbiology 6, pp 41 – 47, Springer, 2003

Jager, T.; Heugens, E. H. W.; Kooijman, S. A. L. M. – **“Making Sense of Ecotoxicological Test Results: Towards Application of Process-Based Models”** –Ecotoxicology 15; pp 305 – 314, Springer, 2006

Lima, Ana Raquel; Machado, Adriana Rita – **“Avaliação da Ecotoxicidade em Efluentes da Indústria Farmacêutica”** – trabalho realizado no âmbito da disciplina Laboratórios de Tecnologia Ambiental III, 5º ano, Licenciatura de Engenharia Química, do Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, 2005

Miller, James N. e Miller, Jane C. – **“Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry”** – Prentice Hall, 2000

Anexo A

Características de Qualidade de Cursos de Águas Superficiais

Tabela A1 – Classificação por parâmetro dos cursos de águas superficiais de acordo com as suas características de qualidade para usos múltiplos
(Fonte: INAG)

Parâmetro	Classe	A (sem poluição)	B (fracamente poluído)	C (poluído)	D (muito poluído)	E (extremamente poluído)
pH		6,5 – 8,5 *	-	6,0 – 9,0	5,5 – 9,5	-
Temperatura (°C)		≤ 20	21 – 25	26 – 28	29 – 30	> 30
Condutividade (μS/cm, 20°C)		≤ 750	751 – 1 000	1 001 – 1 500	1 501 – 3 000	> 3 000
SST (mg/L)		≤ 25,0	25,1 – 30,0	30,1 – 40,0	40,1 – 80,0	> 80,0
Sat. OD (%)		≥ 90	89 – 70	69 – 50	49 – 30	< 30
CBO ₅ (mg O ₂ /L)		≤ 3,0	3,1 – 5,0	5,1 – 8,0	8,1 – 20,0	> 20,0
CQO (mg O ₂ /L)		≤ 10,0	10,1 – 20,0	20,1 – 40,0	40,1 – 80,0	> 80,0
Oxidabilidade (mg O ₂ /L)		≤ 3,0	3,1 – 5,0	5,1 – 10,0	10,1 – 25,0	>25,0
Azoto amoniacal (mg NH ₄ ⁺ /L)		≤ 0,10	0,11 – 1,00	1,10 – 2,00	2,01 – 5,00	> 5,0
Nitratos (mg NO ₃ ⁻ /L)		≤ 5,0	5,0 – 25,0	25,1 – 50,0	50,1 – 80,0	> 80,0
Fosfatos (mg P ₂ O ₅ /L)		≤ 0,54	-	< 0,94	> 0,94	-
Coliformes totais (/100 mL)		≤ 50	51 – 5 000	5 001 – 50 000	> 50 000	-
Coliformes fecais (/100 mL)		≤ 20	21 – 2 000	2 001 – 20 000	> 20 000	-
Estreptoc. fecais (/100 mL)		≤ 20	21 – 2 000	2 001 – 20 000	> 20 000	-
Ferro (mg/L)		≤ 0,50	0,51 – 1,00	1,01 – 1,50	1,50 – 2,00	> 2,00
Manganês (mg/L)		≤ 0,10	0,11 – 0,25	0,26 – 0,50	0,51 – 1,00	> 1,00
Zinco (mg/L)		≤ 0,30	0,31 – 1,00	1,10 – 5,00	-	> 5,00
Cobre (mg/L)		≤ 0,020	0,021 – 0,05	0,051 – 1,00	-	> 1,00
Crómio (mg/L)		≤ 0,05	-	-	-	>0,05
Selénio (mg/L)		≤ 0,01	-	-	-	> 0,01
Cádmio (mg/L)		≤ 0,0010	-	0,0011 – 0,0050	-	>0,0050
Chumbo (mg/L)		≤ 0,050	-	0,051 – 0,100	-	>0,100
Mercúrio (mg/L)		≤ 0,00050	-	0,00051 – 0,001	-	>0,001
Arsénio (mg/L)		≤ 0,010	0,011 – 0,050	-	0,051 – 0,100	>0,100
Cianetos (mg/L)		≤ 0,010	-	0,011 – 0,050	-	>0,050
Fenóis (mg/L)		≤ 0,0010	0,0011 – 0,0050	0,0051 – 0,010	0,011 – 0,100	>0,100
Agentes tensioactivos (LAS mg/L)		≤ 0,2	-	0,21 – 0,50	-	>0,50

O pH , sendo um parâmetro muito dependente de características geomorfológicas, pode apresentar valores fora deste intervalo, sem contudo significar alterações de qualidade devidas à poluição.

Anexo B

Resultados: Parâmetros Físico-Químicos

Fevereiro

Tabela B1 - Resultados dos parâmetros físico-químicos

Parâmetro	Estações de Amostragem						
	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura (°C)	9,8	9,8	10,6	10,9	10,4	10,7	10,9
pH	7,14	7,07	6,94	7,01	6,65	6,5	6,98
O.R.P. (mV)	235	187	161	187	183	158	145
Cond. (µS/cm)	121	150	179	180	176	192	187
O.D. (mg/L)	10,5	10,3	9,5	9,8	9,8	11,7	10,3
COD (mg/L)	3,64	5,69	5,45	4,74	4,42	4,76	4,98
Turvação (NTU)	28,09	106,64	59,19	67,49	66,27	97,95	120,39
Cor (Pt-Co)	9,82	21,29	13,64	16,19	14,92	16,19	17,47
Ntotal (mgN/L)	27,39	35,48	28,34	30,88	26,44	25,02	27,87
Ptotal (mgP/L)	0,76	0,76	0,92	0,55	0,83	0,69	0,72
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	37,08	46,65	51,44	89,71	69,38	62,20	58,61
Pb solúvel (mg/L)	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Cu solúvel (mg/L)	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04
Zn solúvel (mg/L)	0,08	0,22	0,09	0,10	0,08	0,08	0,10
Cr solúvel (mg/L)	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Cd solúvel (mg/L)	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15
Ni solúvel (mg/L)	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Fe solúvel (mg/L)	0,05	0,23	0,25	0,32	0,19	0,33	0,21
Mn solúvel (mg/L)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Hg solúvel (µg/L)	1,63	1,42	3,20	0,99	0,96	1,51	1,09
As solúvel (µg/L)	< 0,6	1,49	2,42	< 0,6	< 0,6	< 0,6	< 0,6

Maio

Tabela B2 - Resultados dos parâmetros físico-químicos

Parâmetro	Estações de Amostragem						
	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura (°C)	12,1	14,4	15	15,4	15	16	16,8
pH	6,75	6,04	6,03	6,28	6,07	6,34	6,25
O.R.P. (mV)	263	244	236	204	230	197	204
Cond. (µS/cm)	73	226	251	287	265	318	343
O.D. (mg/L)	8,5	8,2	7,8	7,8	8	7,7	8,3
COD (mg/L)	1,32	3,02	4,34	4,8	3,8	5,55	5,66
CBO ₅ (mgO ₂ /L)	2,6	5,1	6	7,7	12	8,7	9,3
Turvação (NTU)	0,6	3,46	3,54	4,26	6,71	10,03	8,09
Cor (Pt-Co)	0	2	1	3	1	3	3
Ntotal (mgN/L)	2,33	11,65	17,4	22,15	14,42	19,77	34,04
Ptotal (mgP/L)	0	0,77	0,86	1	0,9	1,15	1,07
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	28,71	66,99	71,77	82,54	76,56	82,54	88,52
Pb solúvel (mg/L)	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Cu solúvel (mg/L)	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04
Zn solúvel (mg/L)	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06
Cr solúvel (mg/L)	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Cd solúvel (mg/L)	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15
Ni solúvel (mg/L)	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Fe solúvel (mg/L)	< 0,2	< 0,2	< 0,2	0,31	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Mn solúvel (mg/L)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Hg solúvel (µg/L)	< 0,35	< 0,35	< 0,35	< 0,35	< 0,35	0,42	0,43
As solúvel (µg/L)	< 0,6	< 0,6	< 0,6	< 0,6	< 0,6	< 0,6	< 0,6

Junho

Tabela B3 - Resultados dos parâmetros físico-químicos

Parâmetro	Estações de Amostragem						
	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura (°C)	17	20	20,2	20,5	20,4	21,8	22,9
pH	6,11	5,64	5,96	6,12	6,05	6,07	6,05
O.R.P. (mV)	176	222	197	206	203	241	253
Cond. (µS/cm)	89	483	496	577	556	560	578
O.D. (mg/L)	8,3	7,9	7,5	8,1	7,9	7,9	7,6
COD (mg/L)	2,23	11,96	13,57	16,6	15,26	15,52	14,75
CBO ₅ (mgO ₂ /L)	0,6	10,2	15	15,7	12,6	18,9	19,2
Turvação (NTU)	0,06	7,79	9,3	16,58	11,78	10,84	12,48
Cor (Pt-Co)	13,64	42,96	45,51	62,08	56,98	60,81	58,26
Ntotal (mgN/L)	7,89	30,72	38,17	33,74	30,72	30,41	25,97
Ptotal (mgP/L)	0,1	2,38	2,84	3,02	2,6	2,7	2,8
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	40,67	89,71	101,67	99,28	100,48	102,87	117,22
Pb solúvel (mg/L)	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Cu solúvel (mg/L)	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04
Zn solúvel (mg/L)	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06
Cr solúvel (mg/L)	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Cd solúvel (mg/L)	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15
Ni solúvel (mg/L)	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Fe solúvel (mg/L)	< 0,2	< 0,2	0,25	0,37	0,4	0,36	0,29
Mn solúvel (mg/L)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,13	< 0,1	< 0,1
Hg solúvel (µg/L)	< 0,35	< 0,35	< 0,35	< 0,35	0,4	< 0,35	< 0,35
As solúvel (µg/L)	< 0,6	< 0,6	0,9	1,43	1,74	1,54	1,32

Agosto

Tabela B4 - Resultados dos parâmetros físico-químicos

Parâmetro	Estações de Amostragem						
	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura (°C)	21,0	22,2	22,5	23,0	23,3	22,4	23,2
pH	6,61	6,00	5,96	6,07	5,97	6,23	5,98
O.R.P. (mV)	79	71	109	94	72	109	113
Cond. (µS/cm)	179	1050	857	935	952	932	1769
O.D. (mg/L)	6,1	5,4	5,2	5,8	5,5	5,3	5,2
COD (mg/L)	3,75	24,61	23,06	21,74	21,75	20,70	19,10
CBO ₅ (mgO ₂ /L)	1,5	21,2	10,6	31,3	20,2	22,7	24,7
Turvação (NTU)	3,5	12,2	8,5	10,5	12,7	13,2	8,2
Cor (Pt-Co)	0,9	44,24	35,31	37,86	32,77	39,14	37,86
Ntotal (mgN/L)	5,36	70,68	57,84	54,66	57,04	56,41	116,97
Ptotal (mgP/L)	0,2	3,73	4,3	2,68	3,03	8,15	12,18
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	44,26	139,95	139,95	130,38	139,95	131,58	255,98
Pb solúvel (mg/L)	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Cu solúvel (mg/L)	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04
Zn solúvel (mg/L)	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06
Cr solúvel (mg/L)	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Cd solúvel (mg/L)	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15
Ni solúvel (mg/L)	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Fe solúvel (mg/L)	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Mn solúvel (mg/L)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Hg solúvel (µg/L)	2,68	3,52	4,42	5,54	5,81	6,12	6,54
As solúvel (µg/L)	0,74	1,02	2,94	1,66	1,37	1,44	1,19

Setembro

Tabela B5 - Resultados dos parâmetros físico-químicos

Parâmetro	Estações de Amostragem						
	1	2	3	4	5	6	7
Temperatura (°C)	18,0	18,7	18,6	18,6	18,7	18,3	18,2
pH	5,88	5,85	6,55	5,91	6,07	6,41	6,74
O.R.P. (mV)	153	133	80	105	98	149	90
Cond. (µS/cm)	123	160	174	178	194	305	298
O.D. (mg/L)	6,8	5	5,3	5,2	4,5	6,3	5,6
COD (mg/L)	11,26	11,08	11,00	10,48	10,90	12,74	12,66
CBO ₅ (mgO ₂ /L)	5,6	9,6	12	15,6	13,2	3,8	13,6
Turvação (NTU)	239	134	171	261	183	205	185
Cor (Pt-Co)	42,96	32,77	32,77	27,67	30,227	28,94	27,67
Ntotal (mgN/L)	3,29	4,72	3,45	12,81	5,36	11,22	16,93
Ptotal (mgP/L)	0,2	1,78	2,3	2,75	1,75	2,5	2,8
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	35,87	75,24	83,56	90,45	82,47	89,65	100,35
Pb solúvel (mg/L)	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Cu solúvel (mg/L)	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04
Zn solúvel (mg/L)	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06	< 0,06
Cr solúvel (mg/L)	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Cd solúvel (mg/L)	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15	< 0,15
Ni solúvel (mg/L)	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Fe solúvel (mg/L)	0,3	0,33	0,33	0,2	0,27	< 0,2	0,27
Mn solúvel (mg/L)	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Hg solúvel (µg/L)	1,43	0,75	1,08	1,21	1,54	1,33	1,1
As solúvel (µg/L)	0,83	1,21	0,65	< 0,6	0,6	< 0,6	< 0,6

Anexo C

Resultados: Parâmetros Bacteriológicos

Tabela C1 - Resultados dos parâmetros bacteriológicos

Mês	Parâmetro (U.F.C./100mL)	Estações de Amostragem						
		1	2	3	4	5	6	7
Fevereiro	Coliformes Totais	3,25E+04	6,90E+06	8,20E+06	5,60E+05	9,25E+05	3,90E+05	1,25E+06
	Coliformes Fecais	7,00E+02	3,70E+04	2,40E+04	1,02E+04	1,80E+04	8,05E+03	4,05E+03
	Estreptococos Fecais	5,10E+03	5,20E+04	3,30E+04	2,80E+04	2,70E+04	1,90E+04	7,50E+03
Maio	Coliformes Totais	2,50E+04	4,30E+06	7,80E+06	7,95E+05	3,05E+06	1,07E+06	1,00E+06
	Coliformes Fecais	1,00E+03	1,50E+05	5,00E+05	9,95E+04	4,70E+05	2,75E+05	2,00E+05
	Estreptococos Fecais	1,50E+02	6,80E+03	1,95E+04	3,70E+04	6,90E+03	5,95E+03	8,45E+03
Junho	Coliformes Totais	1,30E+05	9,70E+05	1,05E+06	9,45E+05	3,60E+06	6,55E+06	5,85E+06
	Coliformes Fecais	5,00E+02	2,90E+05	3,70E+05	1,06E+05	3,05E+05	1,03E+05	7,50E+04
	Estreptococos Fecais	2,50E+02	1,15E+04	6,15E+04	4,00E+04	3,35E+04	1,90E+04	5,55E+03
Agosto	Coliformes Totais	4,35E+04	5,50E+07	4,00E+07	1,02E+07	4,10E+07	4,40E+06	4,40E+06
	Coliformes Fecais	1,90E+03	5,05E+06	1,95E+06	5,50E+05	6,40E+05	5,55E+05	1,41E+05
	Estreptococos Fecais	1,11E+02	2,95E+05	1,27E+05	1,90E+04	1,31E+05	3,65E+04	7,95E+03
Setembro	Coliformes Totais	6,00E+05	2,20E+07	1,50E+06	1,45E+07	1,02E+07	7,00E+05	2,20E+05
	Coliformes Fecais	3,15E+04	1,55E+05	2,25E+05	2,70E+05	5,80E+04	4,00E+03	5,50E+03
	Estreptococos Fecais	1,01E+04	5,60E+04	6,40E+04	1,46E+05	3,80E+04	9,00E+02	1,30E+03

Anexo D

Microtox®: Exemplo de cálculo do CE_{20} e CE_{50} ,
e limites de confiança a 95%

Cálculo do CE_{50} , CE_{20} , e Limites de Confiança a 95%

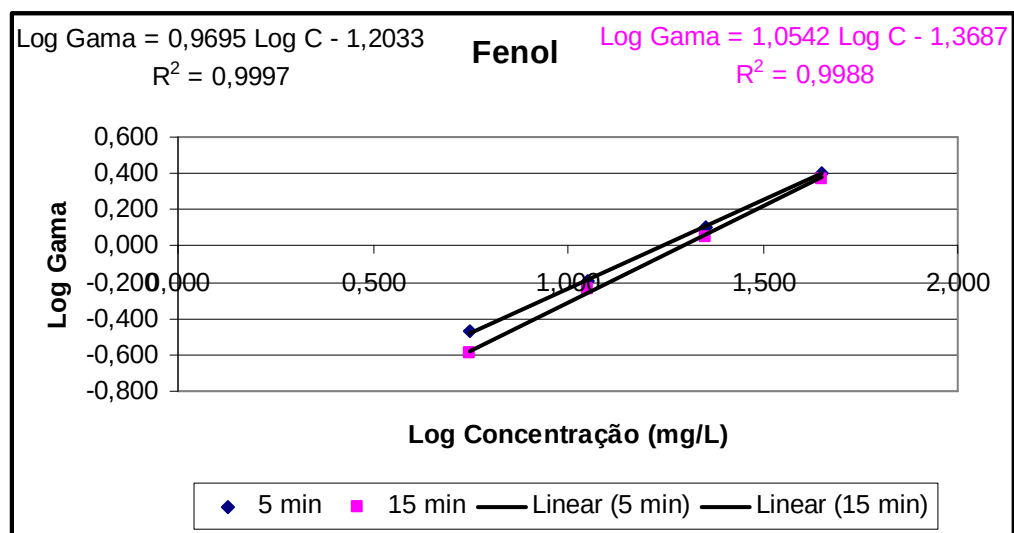
Os resultados utilizados nos cálculos que se apresentam neste anexo foram obtidos nos ensaios efectuados com a substância de referência - **fenol (C_6H_5OH)**.

Tabela D1 - Cálculo da concentração de fenol nos poços da fila A e nos poços da fila B

$C(\text{fenol})_{\text{inicial}}$ (mg/L)	100				
	A1	A2	A3	A4	A5
VNaCl (μL)	1000	1000	1000	1000	250
Vfenol (μL)	0	1000	1000	1000	2500
Cfenol (mg/L)	0,00	11,36	22,73	45,45	90,91
	B1	B2	B3	B4	B5
VNaCl (μL)	1000	500	500	500	500
Vfenol (μL)	0	500	500	500	500
Vbactérias (μL)	10	10	10	10	10
Cfenol (mg/L)	0	5,63	11,25	22,50	45,00

Tabela D2 - Cálculo da Intensidade Corrigida e do valor Gama

	C (mg/L)	log Conc.	Int. 0	Int. 5	Int 15	RB5	RB15	I corr. 5'	I corr. 15'	I corr. 30'	Gama 5'	log Gama 5'	Gama 15'	log Gama 15'
B1			58	53	44	0,914	0,759							
B2	5,63	0,750	63	43	38			58	48	0	0,339	-0,470	0,258	-0,589
B3	11,25	1,051	54	30	26			49	41	0	0,645	-0,191	0,576	-0,240
B4	22,50	1,352	67	27	24			61	51	0	1,268	0,103	1,118	0,048
B5	45,00	1,653	62	16	14			57	47	0	2,541	0,405	2,360	0,373



	5 min	15 min
CE ₅₀	17	20
CE ₂₀	4	5

Figura D1 – Representação gráfica dos valores do logaritmo de Gama aos 5 e 15 minutos em função do logaritmo da concentração de fenol (mg/L) e respectivos valores de CE₅₀ e CE₂₀

Tabela D3 - Valores da toxicidade apresentada pela substância de referência fenol

Norma	Padrão	CE	t (min)	Concentração de Fenol (mg/L)
Astm: D 5660–96	Fenol	CE ₅₀	5	13-26
	Fenol	CE ₂₀	5	3-6
Afnor T90-320	Fenol	CE ₅₀	15	13-40
NVN 6516	Fenol	CE ₂₀	5	3-10

Tabela D4 – Cálculo de S_{CE50} , S_{CE20} , $FC_{95\%}$, CE_{50} , CE_{20} ao fim de 5 minutos e respectivos intervalos de confiança a 95%

	Conc. (x_i)	log Conc. (x_i)	Gama (y_i)	log Gama (y_i)	C (y_{est})	log C_{est}	$x_i - x_{médio}$	$(x_i - x_{médio})^2$	$y_i - y_{médio}$	$(y_i - y_{médio})^2$	$(x_i - x_{médio})(y_i - y_{médio})$	R	declive	ordenada na origem
	5,63	0,751	0,339	-0,470	5,710	0,757	-0,432	0,186	-0,451	0,203	0,194	0,999	1,030	1,240
	11,25	1,051	0,645	-0,190	11,082	1,045	-0,152	0,023	-0,151	0,022	0,022		0,969	-1,203
	22,5	1,352	1,268	0,103	22,247	1,347	0,141	0,019	0,150	0,022	0,021	R^2		
	45	1,653	2,541	0,405	45,552	1,659	0,443	0,196	0,451	0,203	0,200	0,999		
SOMA	84,38	4,807	4,793	-0,152				0,425		0,452	0,439			
MÉDIA	21,095	1,201	1,198	-0,038										

$(y_i - y_{est})$	$(y_i - y_{est})^2$	x_i^2	$S_{y/x}$	S_b	S_a	y_o 50%	S_{CE50}	t	CE_{50}	CE_{50} 95%	y_o 20%	S_{CE20}	CE_{20}	CE_{20} 95%
-0,006	0,000	0,220	0,0085	0,0124	0,0041	0	0,0041	4,3	17,42	18,14	-0,602	0,0081	4,17	4,52
0,007	4,24E-05	0,036								16,73				3,85
0,005	2,4E-05	0,010	S^2			0,0014					0,318			
-0,005	2,8E-05	0,164	6,6E-05					0,017				0,034		
								FC=1,041				FC=1,083		
SOMA	0,000132	0,431												

Anexo E

Microtox®: Resultados Experimentais

Fevereiro

Tabela E1 - Resultados do valor Gama e Razão dos Brancos aos 5 e 15 minutos

		Concentração testada % (v/v)				
Estação	t (min)		5,6	11,3	22,5	45,0
1	5	Gama	0,003	0,014	0,029	0,093
		Log Gama	-2,458	-1,851	-1,544	-1,032
		RB	1,03			
	15	Gama	-0,106	-0,143	-0,100	0,029
		Log Gama	---	---	---	-1,544
		RB	1,03			
2	5	Gama	0,050	0,054	0,079	0,225
		Log Gama	-1,303	-1,269	-1,103	-0,648
		RB	1,08			
	15	Gama	0,038	0,059	0,115	0,240
		Log Gama	-1,425	- 1,228	- 0,940	-0,620
		RB	1,21			
3	5	Gama	0,225	0,628	1,682	3,667
		Log Gama	-0,593	-0,202	0,226	0,564
		RB	1,00			
	15	Gama	0,233	0,486	1,366	3,855
		Log Gama	-0,632	-0,314	0,136	0,586
		RB	0,98			
4	5	Gama	0,064	0,090	0,274	0,643
		Log Gama	-1,194	-1,048	-0,562	-0,192
		RB	0,98			
	15	Gama	0,064	0,070	0,180	1,035
		Log Gama	-1,194	-1,153	-0,745	0,015
		RB	0,98			
5	5	Gama	0,255	0,628	1,682	3,667
		Log Gama	-0,593	-0,202	0,226	0,564
		RB	1,00			
	15	Gama	0,233	0,486	1,366	3,855
		Log Gama	-0,632	-0,314	0,136	0,586
		RB	0,98			
6	5	Gama	0,057	0,090	0,274	0,643
		Log Gama	-1,247	-1,048	-0,562	-0,192
		RB	0,98			
	15	Gama	0,057	0,070	0,180	1,035
		Log Gama	-1,247	-1,153	-0,745	0,015
		RB	0,98			
7	5	Gama	0,255	0,628	1,682	3,667
		Log Gama	-0,593	-0,202	0,226	0,564
		RB	1,00			
	15	Gama	0,233	0,486	1,366	3,855
		Log Gama	-0,632	-0,314	0,136	0,586
		RB	0,98			

Fevereiro

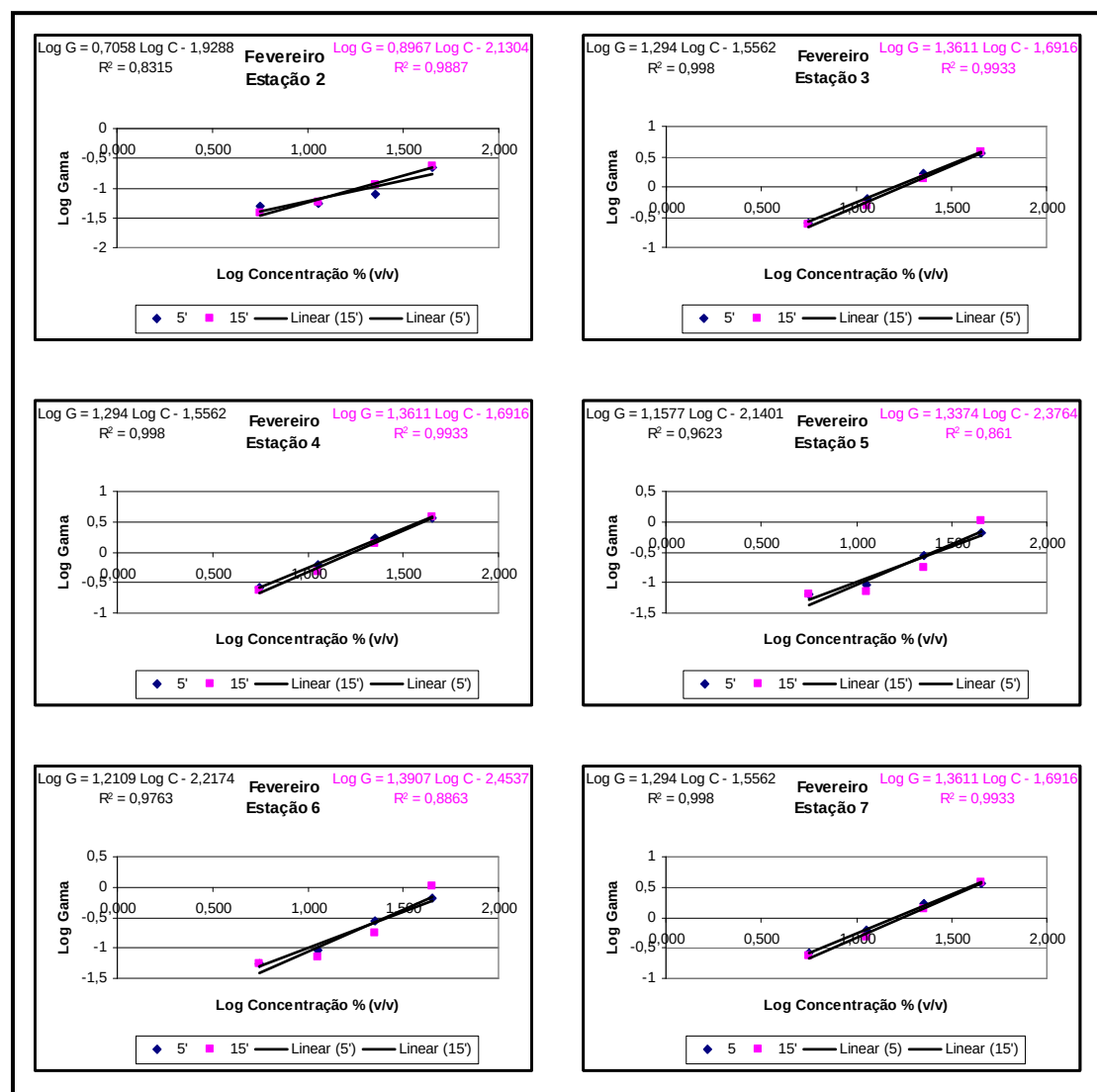


Figura E1 – Representação gráfica dos valores de logaritmo Gama em função do logaritmo da concentração % (v/v) aos 5 e 15 minutos e respectivas regressões lineares

Maio

Tabela E2 - Resultados do valor Gama e Razão dos Brancos aos 5 e 15 minutos

		Concentração testada % (v/v)				
Estação	t (min)		5,6	11,3	22,5	45,0
1	5	Gama	0,012	0,027	0,056	0,074
		Log Gama	-1,937	-1,574	-1,252	-1,130
		RB	1,03			
	15	Gama	0,025	0,025	0,025	0,025
		Log Gama	-1,607	-1,607	-1,607	-1,607
		RB	1,04			
2	5	Gama	0,242	0,417	0,544	0,848
		Log Gama	-0,615	-0,380	-0,264	-0,072
		RB	1,00			
	15	Gama	0,270	0,430	0,620	0,765
		Log Gama	-0,568	-0,366	0,207	0,116
		RB	0,98			
3	5	Gama	0,168	0,208	0,325	0,546
		Log Gama	-0,776	-0,682	-0,488	-0,263
		RB	0,97			
	15	Gama	0,195	0,290	0,449	0,673
		Log Gama	-0,710	-0,538	-0,348	-0,172
		RB	0,99			
4	5	Gama	0,035	0,049	0,143	0,275
		Log Gama	-1,453	-1,308	-0,844	-0,560
		RB	1,01			
	15	Gama	0,085	0,129	0,217	0,342
		Log Gama	-1,073	-0,888	-0,663	-0,467
		RB	1,03			
5	5	Gama	0,403	0,489	0,593	0,788
		Log Gama	-0,395	-0,310	-0,227	-0,104
		RB	1,10			
	15	Gama	0,193	0,238	0,313	0,402
		Log Gama	-0,715	-0,624	-0,505	-0,395
		RB	1,12			
6	5	Gama	0,079	0,135	0,222	0,370
		Log Gama	-1,102	-0,870	-0,653	-0,412
		RB	1,04			
	15	Gama	0,072	0,099	0,272	0,410
		Log Gama	-1,143	-1,005	-0,566	-0,387
		RB	0,97			
7	5	Gama	0,021	0,034	0,070	0,158
		Log Gama	-1,681	-1,462	-1,156	-0,802
		RB	1,00			
	15	Gama	0,065	0,111	0,179	0,333
		Log Gama	-1,186	-0,954	-0,746	-0,477
		RB	1,00			

Maio

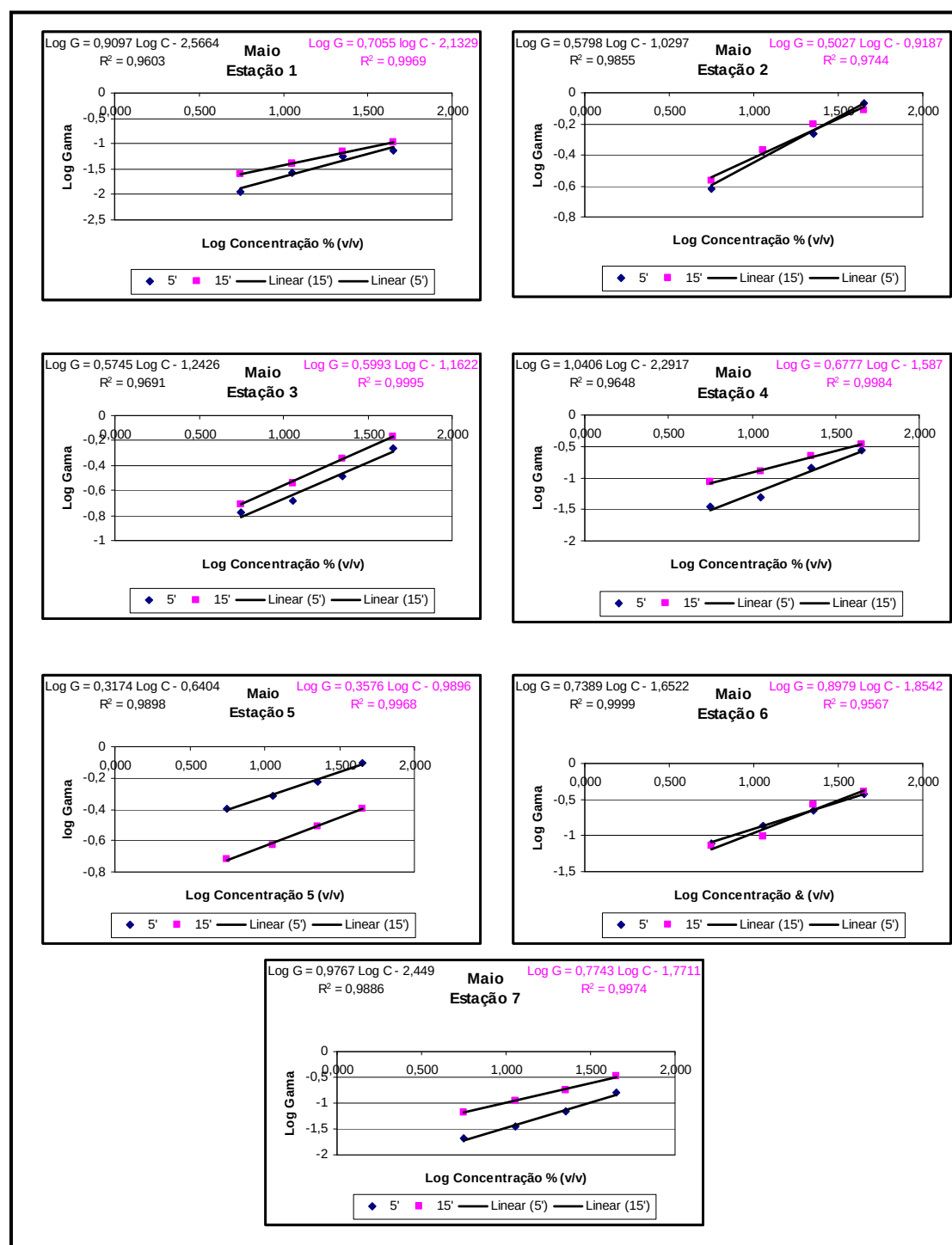


Figura E2 – Representação gráfica dos valores de logaritmo Gama em função do logaritmo da concentração % (v/v) aos 5 e 15 minutos e respectivas regressões lineares

Junho

Tabela E3 - Resultados dos valores de Gama e Razão dos Brancos aos 5 e 15 minutos

		Concentração testada % (v/v)				
Estação	t (min)		5,6	11,3	22,5	45,0
1	5	Gama	0,135	0,078	0,150	0,228
		Log Gama	-0,869	-1,108	-0,824	-0,641
		RB	0,83			
	15	Gama	0,109	0,004	0,150	0,254
		Log Gama	-0,962	-2,374	-0,824	-0,594
		RB	0,67			
2	5	Gama	-0,086	-0,156	-0,195	-0,209
		Log Gama	---	---	---	---
		RB	0,74			
	15	Gama	-0,128	-0,191	-0,288	-0,309
		Log Gama	---	---	---	---
		RB	0,70			
3	5	Gama	0,065	0,127	0,263	0,395
		Log Gama	-1,188	-0,897	-0,580	-0,404
		RB	0,85			
	15	Gama	0,108	0,192	0,340	0,462
		Log Gama	-0,967	-0,717	-0,469	-0,335
		RB	0,77			
4	5	Gama	-0,258	-0,090	-0,193	-0,062
		Log Gama	---	---	---	---
		RB	0,78			
	15	Gama	-0,278	-0,109	-0,273	-0,192
		Log Gama	---	---	---	---
		RB	0,66			
5	5	Gama	0,009	-0,052	-0,050	-0,035
		Log Gama	-2,035	---	---	---
		RB	0,86			
	15	Gama	0,001	-0,038	-0,077	-0,050
		Log Gama	-2,913	---	---	---
		RB	0,77			
6	5	Gama	-0,002	-0,013	0,008	0,239
		Log Gama	---	---	-2,079	-0,622
		RB	0,88			
	15	Gama	-0,056	-0,083	-0,034	0,202
		Log Gama	---	---	---	-0,694
		RB	0,75			
7	5	Gama	0,046	0,032	-0,001	-0,021
		Log Gama	-1,332	-1,497	---	---
		RB	0,88			
	15	Gama	0,022	0,011	-0,006	-0,025
		Log Gama	-1,665	-1,941	---	---
		RB	0,78			

Junho

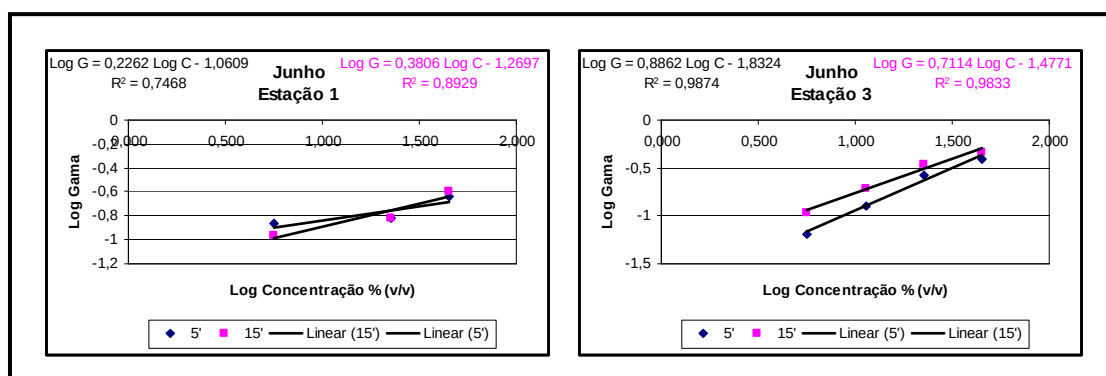


Figura E3 – Representação gráfica dos valores de logaritmo Gama em função do logaritmo da concentração % (v/v) aos 5 e 15 minutos e respectivas regressões lineares

Agosto

Tabela E4 - Resultados dos valores de Gama e Razão dos Brancos aos 5 e 15 minutos

			Concentração testada % (v/v)			
Estação	t (min)		5,6	11,3	22,5	45,0
1	5	Gama	-0,012	-0,012	-0,006	-0,002
		Log Gama	---	---	---	---
		RB	0,88			
	15	Gama	-0,030	-0,017	0,062	-0,020
		Log Gama	---	---	-1,208	---
		RB	0,77			
2	5	Gama	-0,057	-0,032	-0,102	-0,038
		Log Gama	---	---	---	---
		RB	0,83			
	15	Gama	-0,074	-0,044	-0,170	-0,147
		Log Gama	---	---	---	---
		RB	0,69			
3	5	Gama	0,047	0,156	0,480	5,470
		Log Gama	-1,326	-0,808	-0,318	0,738
		RB	0,77			
	15	Gama	0,063	0,153	0,670	7,307
		Log Gama	-1,200	-0,816	-0,174	0,864
		RB	0,63			
4	5	Gama	0,035	0,052	-0,018	-0,067
		Log Gama	-1,454	-1,287	---	---
		RB	0,84			
	15	Gama	0,029	0,081	0,028	0,035
		Log Gama	-1,531	-1,089	-1,560	-1,451
		RB	0,79			
5	5	Gama	-0,045	-0,007	-0,025	-0,052
		Log Gama	---	---	---	---
		RB	0,84			
	15	Gama	-0,053	-0,053	-0,088	-0,133
		Log Gama	---	---	---	---
		RB	0,70			
6	5	Gama	0,036	0,181	0,309	2,314
		Log Gama	-1,447	-0,742	-0,509	0,364
		RB	0,70			
	15	Gama	0,014	0,071	0,243	3,894
		Log Gama	-1,847	-1,152	-0,614	0,590
		RB	0,70			
7	5	Gama	0,017	0,037	0,067	0,138
		Log Gama	-1,778	-1,429	-1,173	-0,859
		RB	1,08			
	15	Gama	0,017	0,031	0,068	0,137
		Log Gama	-1,778	-1,505	-1,170	-0,864
		RB	1,10			

Agosto

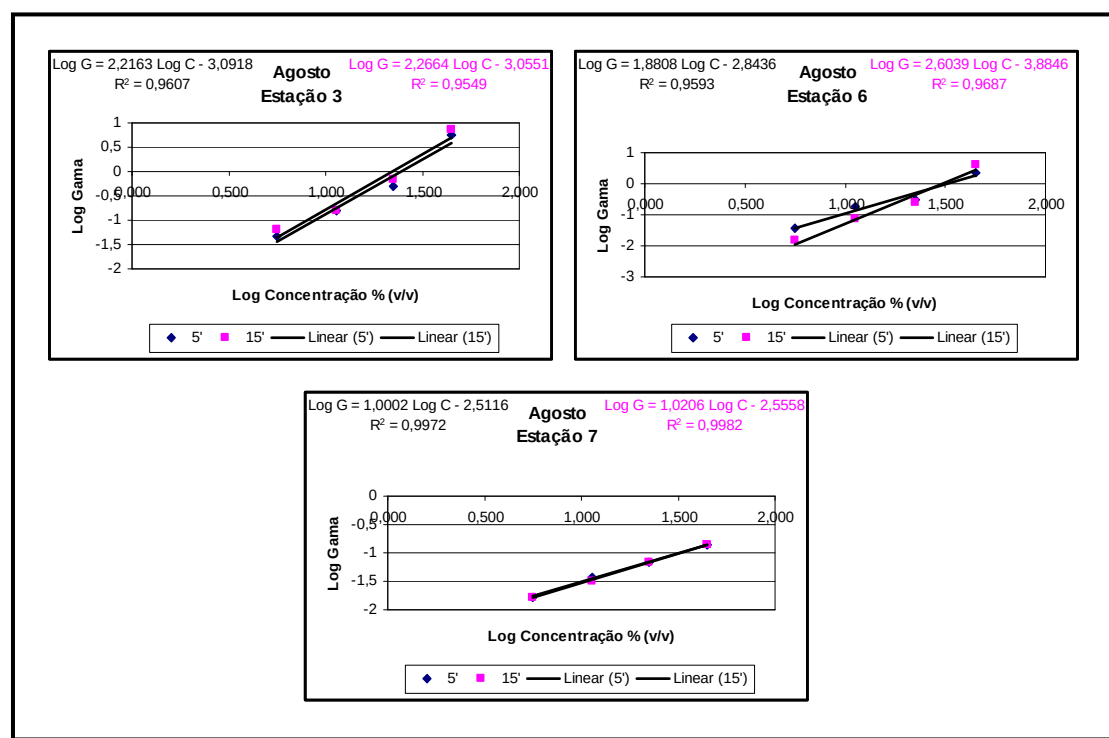


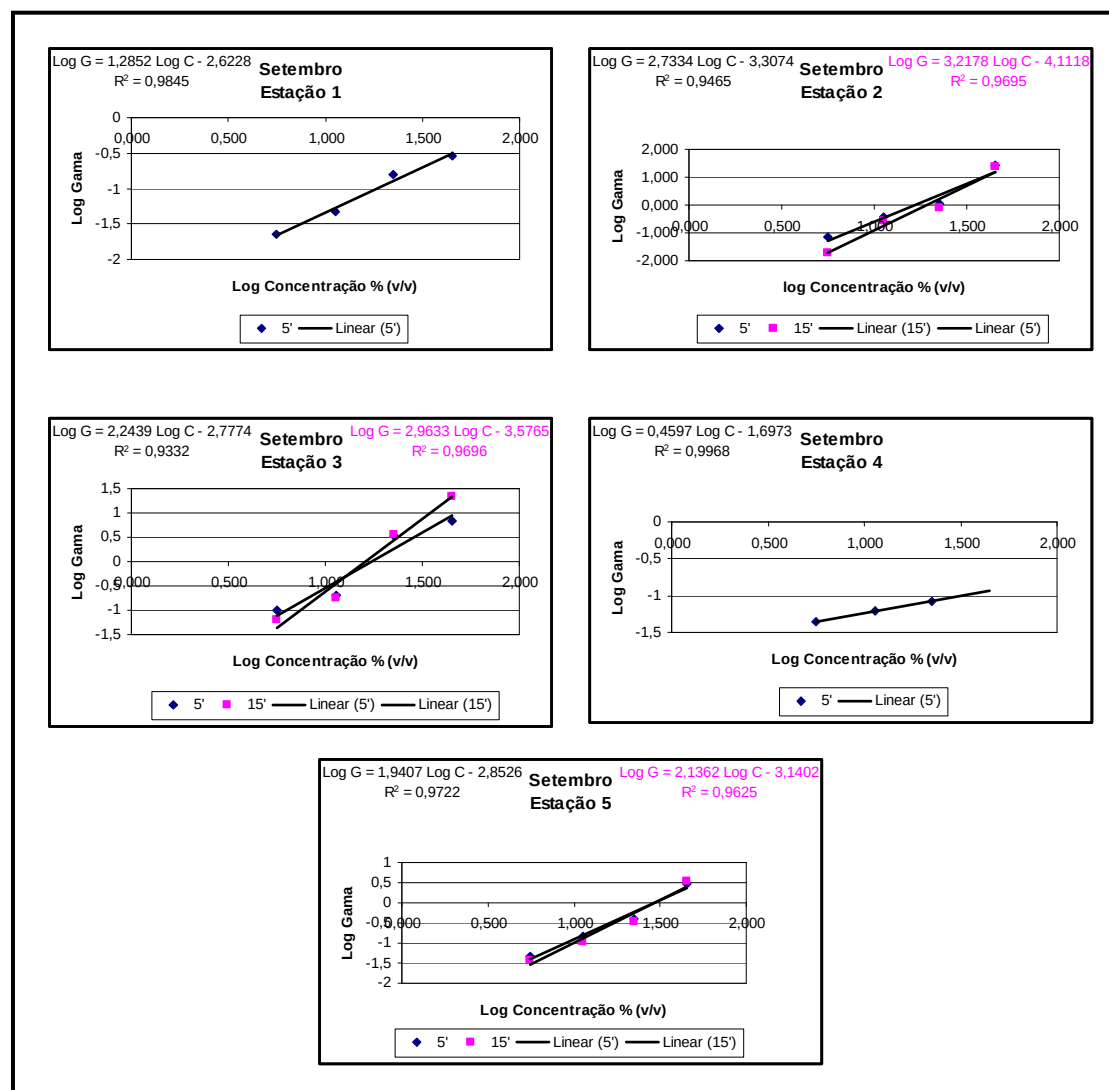
Figura E4 – Representação gráfica dos valores de logaritmo Gama em função do logaritmo da concentração % (v/v) aos 5 e 15 minutos e respectivas regressões lineares

Setembro

Tabela E5 - Resultados dos valores de Gama e Razão dos Brancos aos 5 e 15 minutos

		Concentração testada % (v/v)				
Estação	t (min)		5,6	11,3	22,5	45,0
1	5	Gama	0,022	0,047	0,158	0,293
		Log Gama	-1,649	-1,330	-0,802	-0,533
		RB	0,86			
	15	Gama	-0,078	0,008	-0,541	0,022
		Log Gama	---	-2,082	---	-1,659
		RB	0,74			
2	5	Gama	0,071	0,381	1,083	27,824
		Log Gama	-1,151	-0,419	0,035	1,444
		RB	0,82			
	15	Gama	0,020	0,275	0,844	23,020
		Log Gama	-1,708	-0,561	-0,073	1,362
		RB	0,69			
3	5	Gama	0,097	0,207	3,393	6,920
		Log Gama	-1,011	-0,684	0,530	0,840
		RB	0,93			
	15	Gama	0,063	0,178	3,500	22,182
		Log Gama	-1,202	-0,750	0,544	1,346
		RB	0,68			
4	5	Gama	0,044	0,062	0,083	0,044
		Log Gama	-1,358	-1,204	-1,080	-1,358
		RB	0,89			
	15	Gama	-0,002	0	0,002	0,005
		Log Gama	---	---	-2,741	-2,320
		RB	0,73			
5	5	Gama	0,048	0,143	0,405	3,000
		Log Gama	-1,322	-0,845	-0,392	0,477
		RB	1,00			
	15	Gama	0,037	0,111	0,352	3,525
		Log Gama	-1,433	-0,953	-0,453	0,547
		RB	0,73			
6	5	Gama	0,004	-0,039	-0,044	-0,046
		Log Gama	-2,369	---	---	---
		RB	1,04			
	15	Gama	-0,040	-0,029	-0,030	-0,041
		Log Gama	---	---	---	---
		RB	0,84			
7	5	Gama	0,151	0,069	0	-0,031
		Log Gama	-0,821	-1,163	---	---
		RB	0,90			
	15	Gama	0,156	0,066	-0,018	-0,029
		Log Gama	-0,806	-1,178	---	---
		RB	0,79			

Setembro



Figuras E5 - Representação gráfica dos valores de logaritmo Gama em função do logaritmo da concentração % (v/v) aos 5 e 15 minutos e respectivas regressões lineares

ETAR

Tabela E6 - Valores de Gama e Razão dos Brancos obtidos aos 5 e 15 minutos

t (min)		Concentração testada % (v/v)			
		5,6	11,3	22,5	45,0
5	Gama	-0,044	0,124	-0,002	-0,010
	Log Gama	---	-0,908	---	---
	RB	0,90			
15	Gama	-0,441	0,075	-0,006	-0,017
	Log Gama	---	-1,123	---	---
	RB	0,74			

Anexo F

Chlorella vulgaris: Relação entre o N° de algas/mL e a Absorvância

Exemplo de cálculo do CE₂₀ e CE₅₀

Exemplo do Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk

Exemplo do Teste de Homogeneidade da Variância de Bartlett

Relação entre o N° de algas/mL e a Absorvância

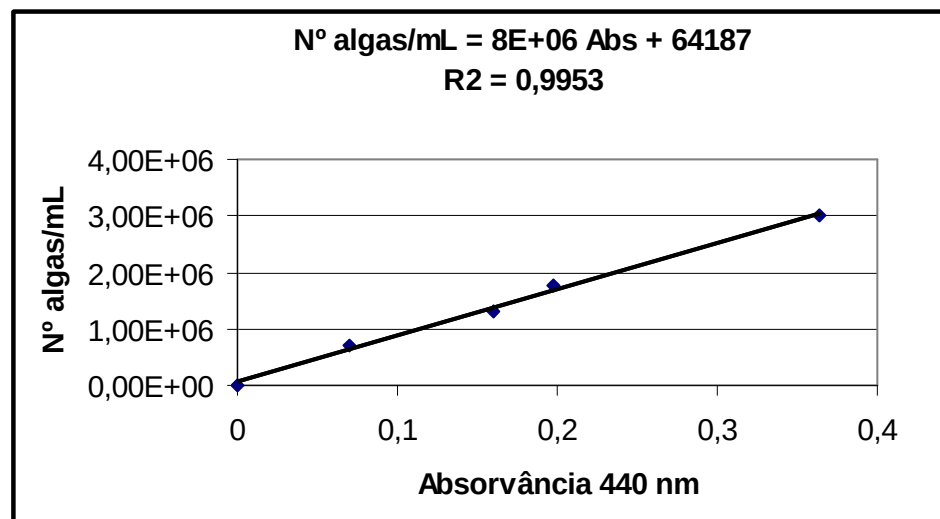


Figura F1 – Representação gráfica e regressão linear da relação entre o nº de algas/mL e a leitura da absorvância a 440 nm

Os resultados utilizados nos cálculos que se apresentam neste anexo foram obtidos nos ensaios efectuados com a substância de referência – **dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$)**.

Método de Interpolação Linear - Cálculo de CE_{50} e CE_{20}

Tabela F1 - Resultados da resposta de crescimento da *Chlorella vulgaris* vs. a concentração da substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$)

Réplica	Controlo	Concentração de $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)				
		0,25	0,5	1	2	3
A	1120	608	720	536	464	376
B	808	792	384	456	344	272
C	992	488	432	440	288	200
Média	973	629	512	477	365	283
Transformação $\log_{10}$						
A	3,049	2,784	2,857	2,729	2,667	2,575
B	2,907	2,899	2,584	2,659	2,537	2,435
C	2,997	2,688	2,635	2,643	2,459	2,301
Média	2,984	2,790	2,692	2,677	2,554	2,437

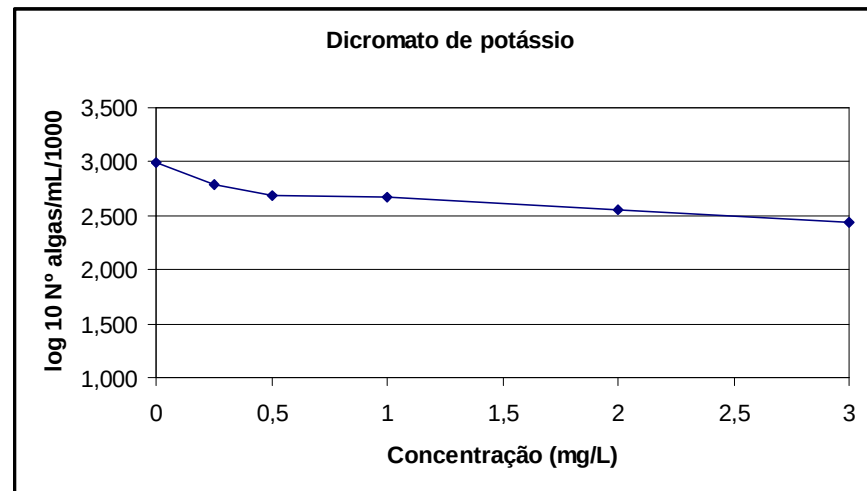


Figura F2 - Representação gráfica da relação entre os dados transformados em $\log_{10}$ da resposta de crescimento da *C. vulgaris* e a concentração da substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$)

$$CE_x = C_j + [M_{(j)} (1 - p/100) - M_j] \frac{(C_{(j+1)} - C_j)}{(M_{(j+1)} - M_{(j)})}$$

$$CE_{50} = 0,5 + (487 - 512) \times \frac{(1 - 0,5)}{(477 - 512)}$$

$$CE_{50} = 0,87 \text{ mg/L}$$

Segundo a Portaria 732-A/96 o valor de CE_{50} da substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) deve situar-se dentro do intervalo de 0,60 a 1,03 mg/L.

$$CE_{20} = 0 + (779 - 973) \times \frac{(0,25 - 0)}{(629 - 973)}$$

$$CE_{20} = 0,14 \text{ mg/L}$$

Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk

Tabela F2 - Observações centradas para o Teste de Shapiro-Wilk e respectivo valor de D calculado

Réplica	Controlo	Concentração de $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)					D
		0,25	0,5	1	2	3	
A	0,065	-0,006	0,165	0,052	0,112	0,138	0,1382
B	-0,077	0,108	-0,108	-0,018	-0,018	-0,002	
C	0,012	-0,102	-0,057	-0,034	-0,095	-0,136	

Tabela F3 – Observações centradas ordenadas para o Teste de Shapiro-Wilk

i	$x^{(i)}$	i	$x^{(i)}$
1	-0,136	10	-0,006
2	-0,108	11	-0,002
3	-0,102	12	0,012
4	-0,095	13	0,052
5	-0,077	14	0,065
6	-0,057	15	0,108
7	-0,034	16	0,112
8	-0,018	17	0,138
9	-0,018	18	0,165

Tabela F4 – Coeficientes (a_i) e diferenças ($X^{(n-i+1)}-X^{(i)}$) para o Teste de Shapiro-Wilk e valor de W calculado

i	a_i	$X^{(n-i+1)}-X^{(i)}$		W
1	0,4886	0,301	$X^{(18)}-X^{(1)}$	0,955
2	0,3253	0,246	$X^{(17)}-X^{(2)}$	
3	0,2553	0,214	$X^{(16)}-X^{(3)}$	
4	0,2027	0,203	$X^{(15)}-X^{(4)}$	
5	0,1587	0,142	$X^{(14)}-X^{(5)}$	
6	0,1197	0,109	$X^{(13)}-X^{(6)}$	
7	0,0837	0,046	$X^{(12)}-X^{(7)}$	
8	0,0496	0,016	$X^{(11)}-X^{(8)}$	
9	0,0163	0,012	$X^{(10)}-X^{(9)}$	

Para um nível de significância de 0,01 e para 18 observações o valor crítico é de 0,858 (valor tabelado), como W calculado é superior ao valor crítico, conclui-se que os dados assumem uma distribuição normal.

Teste de Homogeneidade da Variância de Bartlett

$$B = \left[\left(\sum_{i=1}^p V_i \right) \ln S^2_{\text{médio}} - \sum_{i=1}^p V_i \ln S^2_i \right]^2 / C$$

$$B = (12 \times 13,177 - 154,468)/1,194$$

$$\mathbf{B = 3,065}$$

Neste teste o valor crítico, para um nível de significância de 0,01 e 5 graus de liberdade, é de 15,09 (valor tabelado da distribuição χ^2). Como B é inferior ao valor crítico, conclui-se que as variâncias não são diferentes.

Anexo G

***Chlorella vulgaris*: Resultados Experimentais**

Fevereiro

Estação		Concentrações testadas % (v/v)					
		Controlo	10	20	40	60	80
1	$Y_{\text{médio}}$	880	896	747	772	668	652
	$Y_{\text{médio suave}}$	888	888	747	772	668	652
	Log_{10}	2,948	2,948	2,873	2,887	2,825	2,814
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,992				
	Teste Bartlett	B	8,22				
2	$Y_{\text{médio}}$	880	936	872	720	208	592
	$Y_{\text{médio suave}}$	908	908	872	720	208	592
	Log_{10}	2,958	2,958	2,940	2,857	2,318	2,772
	Teste Shapiro-Wilk	W					
	Teste Bartlett	B	9,11				
3	$Y_{\text{médio}}$	880	356	236	188	188	184
	Log_{10}	2,944	2,551	2,373	2,274	2,274	2,265
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,965				
	Teste Bartlett	B	4,09				
4	$Y_{\text{médio}}$	1149	764	688	580	996	412
	Log_{10}	3,060	2,883	2,838	2,763	2,998	2,615
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,948				
	Teste Bartlett	B	3,42				
5	$Y_{\text{médio}}$	880	944	812	732	708	652
	$Y_{\text{médio suave}}$	912	912	812	732	708	652
	Log_{10}	2,960	2,960	2,910	2,865	2,850	2,814
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,967				
	Teste Bartlett	B	2,68				
6	$Y_{\text{médio}}$	1149	1588	1224	908	800	1488
	$Y_{\text{médio suave}}$	1320	1320	1320	908	800	1488
	Log_{10}	3,121	3,121	3,121	2,958	2,903	3,173
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,874				
	Teste Bartlett	B	8,16				
7	$Y_{\text{médio}}$	1149	832	796	780	756	576
	Log_{10}	3,060	2,920	2,901	2,892	2,879	2,760
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,943				
	Teste Bartlett	B	2,81				

Tabela G1 - Resultados da resposta de crescimento obtidos com a *Chlorella vulgaris*

Fevereiro

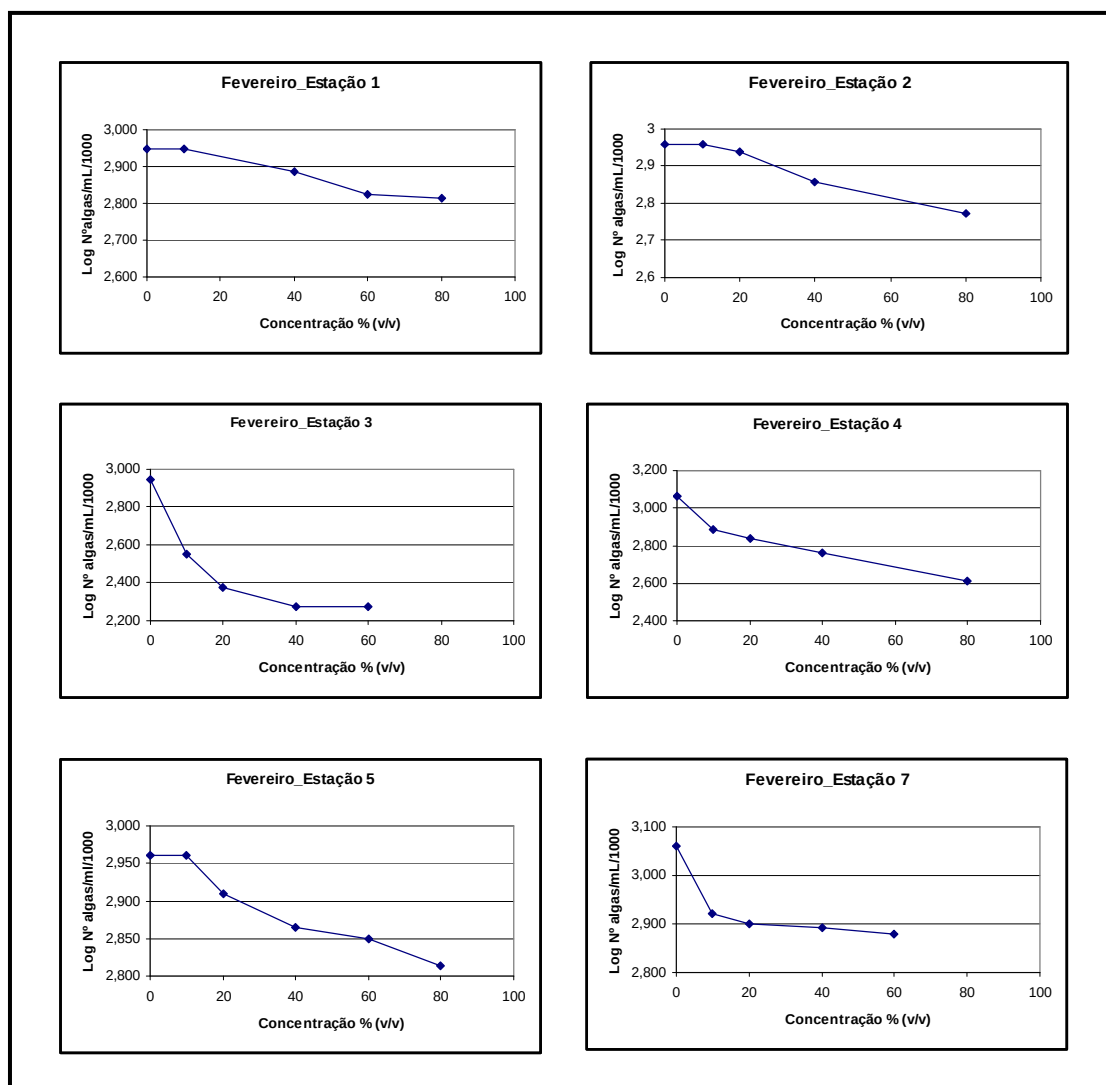


Figura G1 - Representação gráfica do logaritmo do nº de algas/mL/1000 em função da concentração testada % (v/v)

Maio

Tabela G2 - Resultados da resposta de crescimento obtidos com a *Chlorella vulgaris*

Estação		Concentrações testadas % (v/v)					
		Controlo	10	20	40	60	80
1	$Y_{\text{médio}}$	421	644	500	652	680	769
	Log_{10}	2,625	2,809	2,699	2,814	2,833	2,885
	Teste Shapiro-Wilk	W	1,042				
	Teste Bartlett	B	5,50				
2	$Y_{\text{médio}}$	656	416	660	388	408	181
	$Y_{\text{médio suave}}$	658	416	658	388	408	181
	Log_{10}	2,818	2,619	2,818	2,589	2,611	2,258
	Teste Shapiro-Wilk	W	1,265				
	Teste Bartlett	B	10,05				
3	$Y_{\text{médio}}$	656	768	628	440	336	492
	$Y_{\text{médio suave}}$	712	712	628	440	336	492
	Log_{10}	2,852	2,852	2,798	2,643	2,526	2,692
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,964				
	Teste Bartlett	B	5,59				
4	$Y_{\text{médio}}$	421	565	584	644	892	1104
	Log_{10}	2,625	2,752	2,766	2,809	2,950	3,043
	Teste Shapiro-Wilk	W	1,515				
	Teste Bartlett	B	10,14				
5	$Y_{\text{médio}}$	656	464	380	264	251	548
	Log_{10}	2,817	2,667	2,580	2,422	2,399	2,739
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,888				
	Teste Bartlett	B	14,99				
6	$Y_{\text{médio}}$	421	779	844	932	1011	1037
	Log_{10}	2,625	2,891	2,926	2,969	3,005	3,016
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,970				
	Teste Bartlett	B	1,97				
7	$Y_{\text{médio}}$	971	612	864	1101	1004	1443
	Log_{10}	2,987	2,787	2,937	3,042	3,002	3,159
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,926				
	Teste Bartlett	B	1,90				

Maio

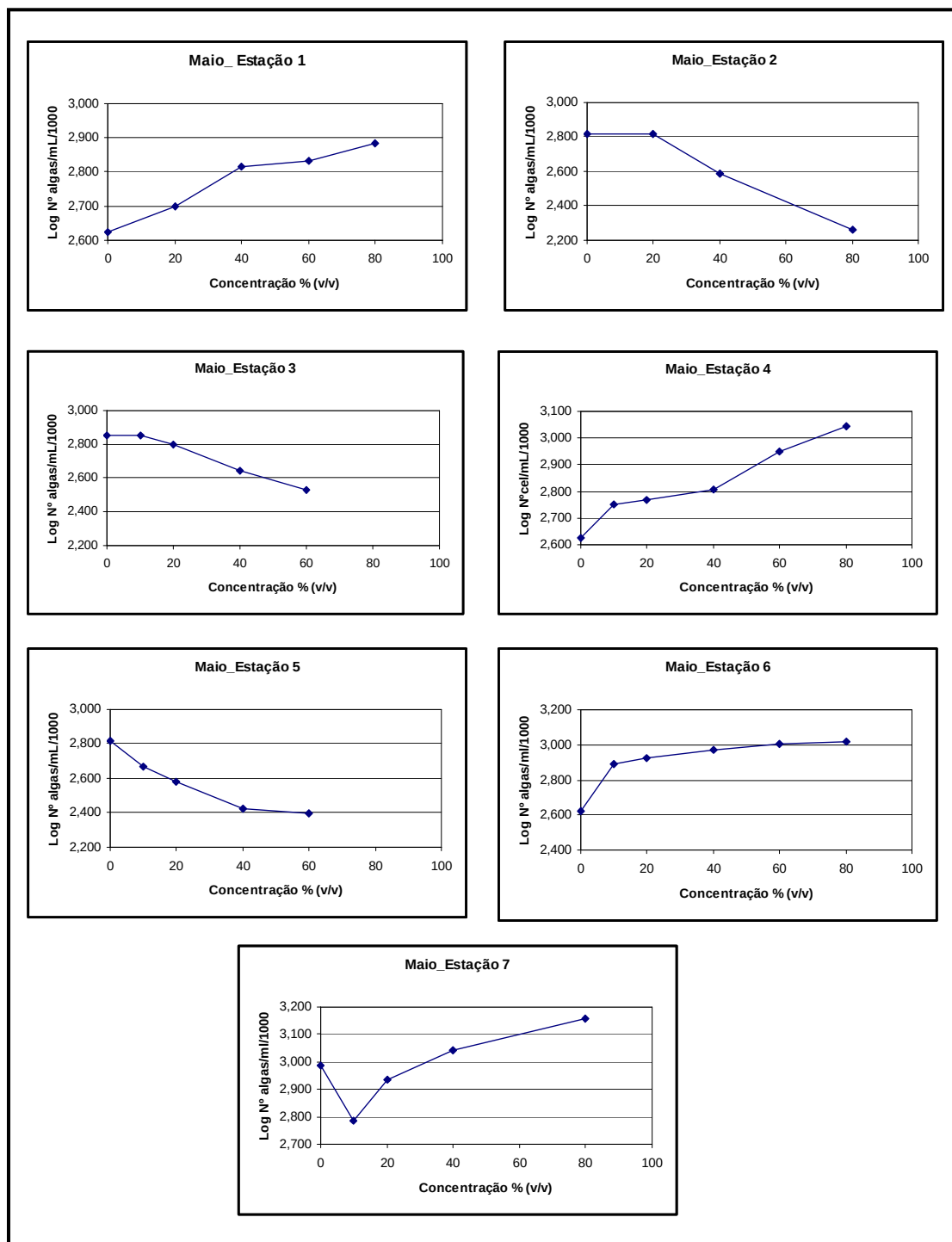


Figura G2 - Representação gráfica do logaritmo do nº de algas/mL/1000 em função da concentração testada % (v/v)

Junho

Tabela G3 - Resultados da resposta de crescimento obtidos com a *Chlorella vulgaris*

Estação		Concentrações testadas % (v/v)					
		Controlo	10	20	40	60	80
1	$Y_{\text{médio}}$	277	140	309	288	283	256
	$Y_{\text{médio suave}}$	289	140	289	289	289	256
	Log_{10}	2,461	2,146	2,461	2,461	2,461	2,408
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,922				
	Teste Bartlett	B	5,58				
2	$Y_{\text{médio}}$	277	24	35	96	124	219
	Log_{10}	2,443	1,380	1,540	1,982	2,093	2,340
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,967				
	Teste Bartlett	B	11,69				
3	$Y_{\text{médio}}$	277	85	117	179	272	219
	Log_{10}	2,443	1,931	2,069	2,252	2,434	2,340
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,926				
	Teste Bartlett	B	4,09				
4	$Y_{\text{médio}}$	813	208	544	888	972	1144
	Log_{10}	2,910	2,318	2,736	2,948	2,988	3,058
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,912				
	Teste Bartlett	B	8,25				
5	$Y_{\text{médio}}$	813	616	931	1060	1204	932
	Log_{10}	2,910	2,790	2,969	3,025	3,081	2,969
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,895				
	Teste Bartlett	B	7,40				
6	$Y_{\text{médio}}$	813	412	192	408	572	645
	Log_{10}	2,910	2,615	2,283	2,611	2,757	2,810
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,886				
	Teste Bartlett	B	3,98				
7	$Y_{\text{médio}}$	717	12	84	244	307	531
	Log_{10}	2,856	1,079	1,924	2,387	2,487	2,725
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,986				
	Teste Bartlett	B	10,65				

Junho

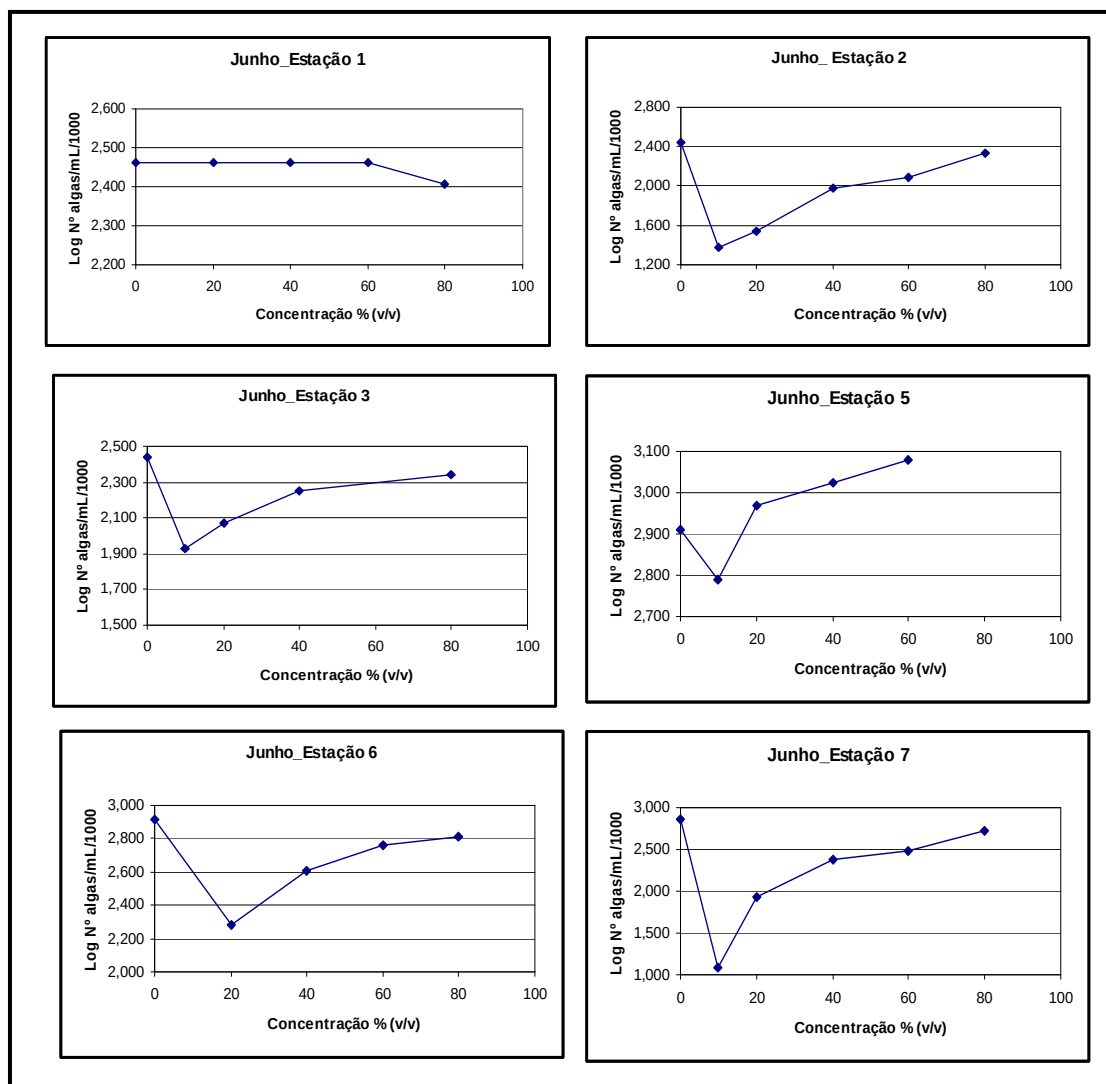


Figura G3- Representação gráfica do logaritmo do nº de algas/mL/1000 em função da concentração testada % (v/v)

Agosto

Tabela G4 - Resultados da resposta de crescimento obtidos com a *Chlorella vulgaris*

Estação		Concentrações testadas % (v/v)					
		Controlo	10	20	40	60	80
1	Y _{médio}	571	516	524	560	60	407
	Log ₁₀	2,756	2,713	2,719	2,748	1,778	2,609
	Teste Shapiro-Wilk	W	1,012				
	Teste Bartlett	B	2,22				
2	Y _{médio}	571	1032	944	656	872	584
	Log ₁₀	2,756	3,014	2,975	2,817	2,940	2,766
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,952				
	Teste Bartlett	B	6,07				
3	Y _{médio}	571	245	219	180	423	76
	Log ₁₀	2,756	2,390	2,340	2,255	2,630	1,881
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,863				
	Teste Bartlett	B	1,70				
4	Y _{médio}	480	508	627	364	320	456
	Log ₁₀	538	538	538	364	320	2,659
	Teste Shapiro-Wilk	2,731	2,731				
	Teste Bartlett	W	0,976				
5	Y _{médio}	480	496	524	424	256	224
	Y _{médio suave}	500	500	500	424	256	224
	Log ₁₀	2,699	2,699	2,699	2,627	2,408	2,350
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,932				
	Teste Bartlett	B	4,19				
6	Y _{médio}	480	339	612	732	661	536
	Log ₁₀	2,681	2,530	2,787	2,864	2,820	2,729
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,939				
	Teste Bartlett	B	2,78				
7	Y _{médio}	1144	304	452	541	672	1144
	Log ₁₀	3,058	2,483	2,655	2,733	2,827	3,058
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,907				
	Teste Bartlett	B	10,52				

Agosto

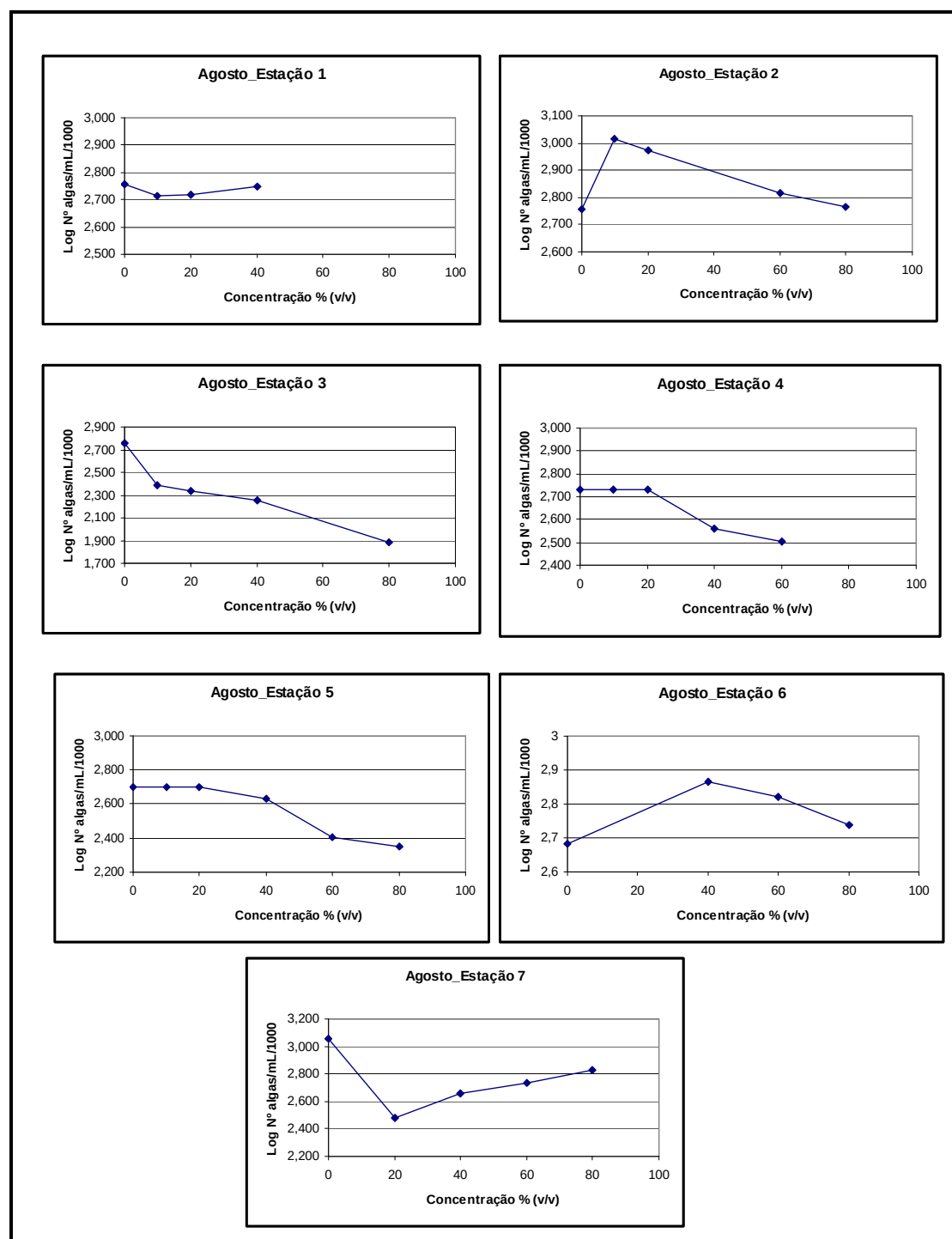


Figura G4 - Representação gráfica do logaritmo do nº de algas/mL/1000 em função da concentração testada % (v/v)

Setembro

Tabela G5 - Resultados da resposta de crescimento obtidos com a *Chlorella vulgaris*

Estação		Concentrações testadas % (v/v)					
		Controlo	10	20	40	60	80
1	$Y_{\text{médio}}$	1128	544	427	272	232	136
	Log_{10}	3,052	2,736	2,630	2,435	2,365	2,134
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,950				
	Teste Bartlett	B	5,31				
2	$Y_{\text{médio}}$	1128	504	448	432	404	731
	Log_{10}	3,052	2,702	2,651	2,635	2,606	2,864
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,860				
	Teste Bartlett	B	2,53				
3	$Y_{\text{médio}}$	603	284	412	469	696	612
	Log_{10}	2,780	2,453	2,615	2,671	2,843	2,787
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,925				
	Teste Bartlett	B	2,92				
4	$Y_{\text{médio}}$	603	592	324	792	909	824
	Log_{10}	2,780	2,772	2,511	2,899	2,959	2,916
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,957				
	Teste Bartlett	B	7,04				
5	$Y_{\text{médio}}$	603	819	867	939	987	912
	Log_{10}	2,780	2,913	2,938	2,973	2,994	2,960
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,912				
	Teste Bartlett	B	8,93				
6	$Y_{\text{médio}}$	480	339	565	692	715	536
	Log_{10}	2,681	2,530	2,752	2,840	2,854	2,729
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,953				
	Teste Bartlett	B	4,96				
7	$Y_{\text{médio}}$	1128	484	304	452	541	740
	Log_{10}	3,052	2,685	2,483	2,655	2,733	2,869
	Teste Shapiro-Wilk	W	0,974				
	Teste Bartlett	B	6,74				

Setembro

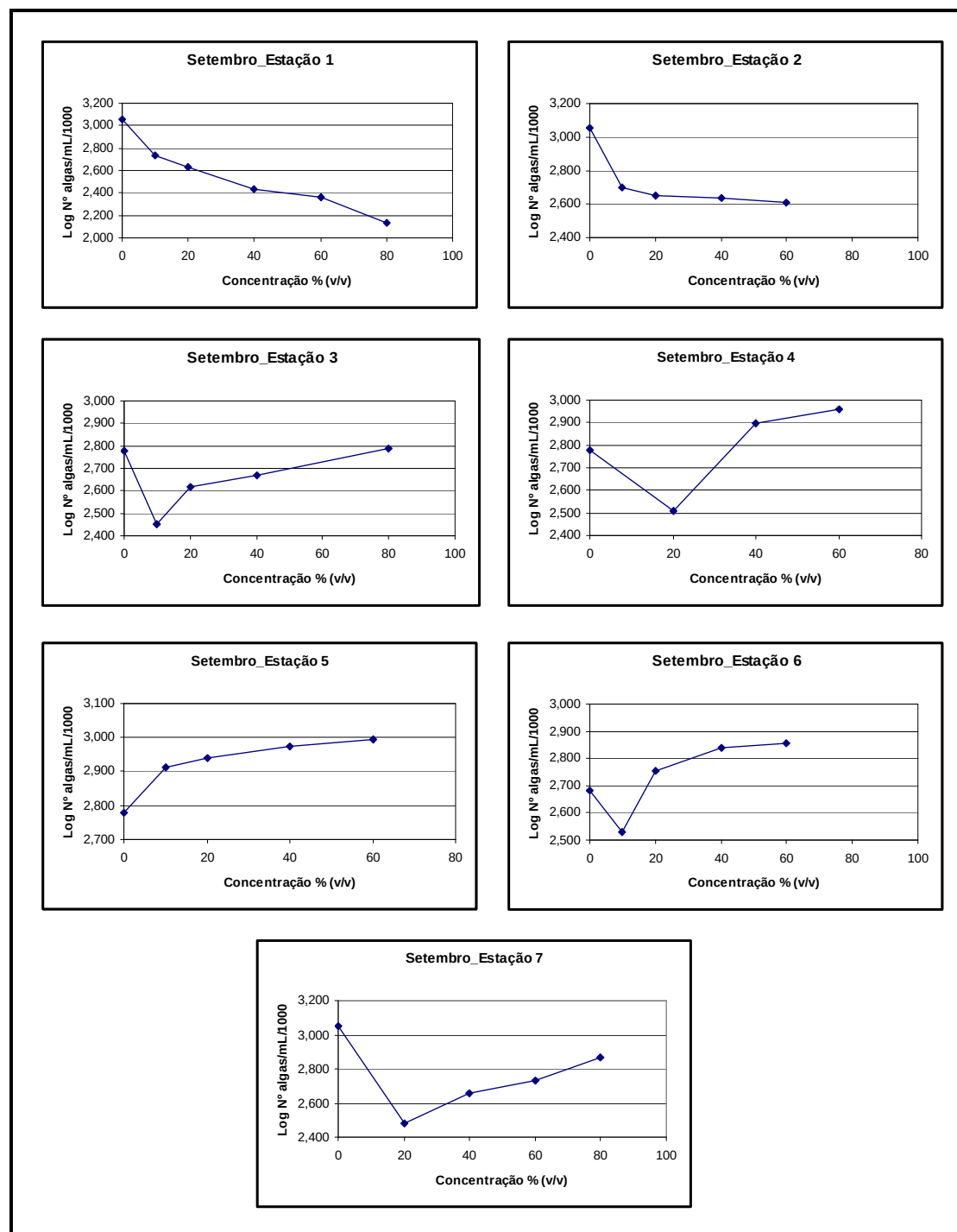


Figura G5 - Representação gráfica do logaritmo do nº de algas/mL/1000 em função da concentração testada % (v/v)

Casos Particulares – A Regressão Polinomial (parábola)

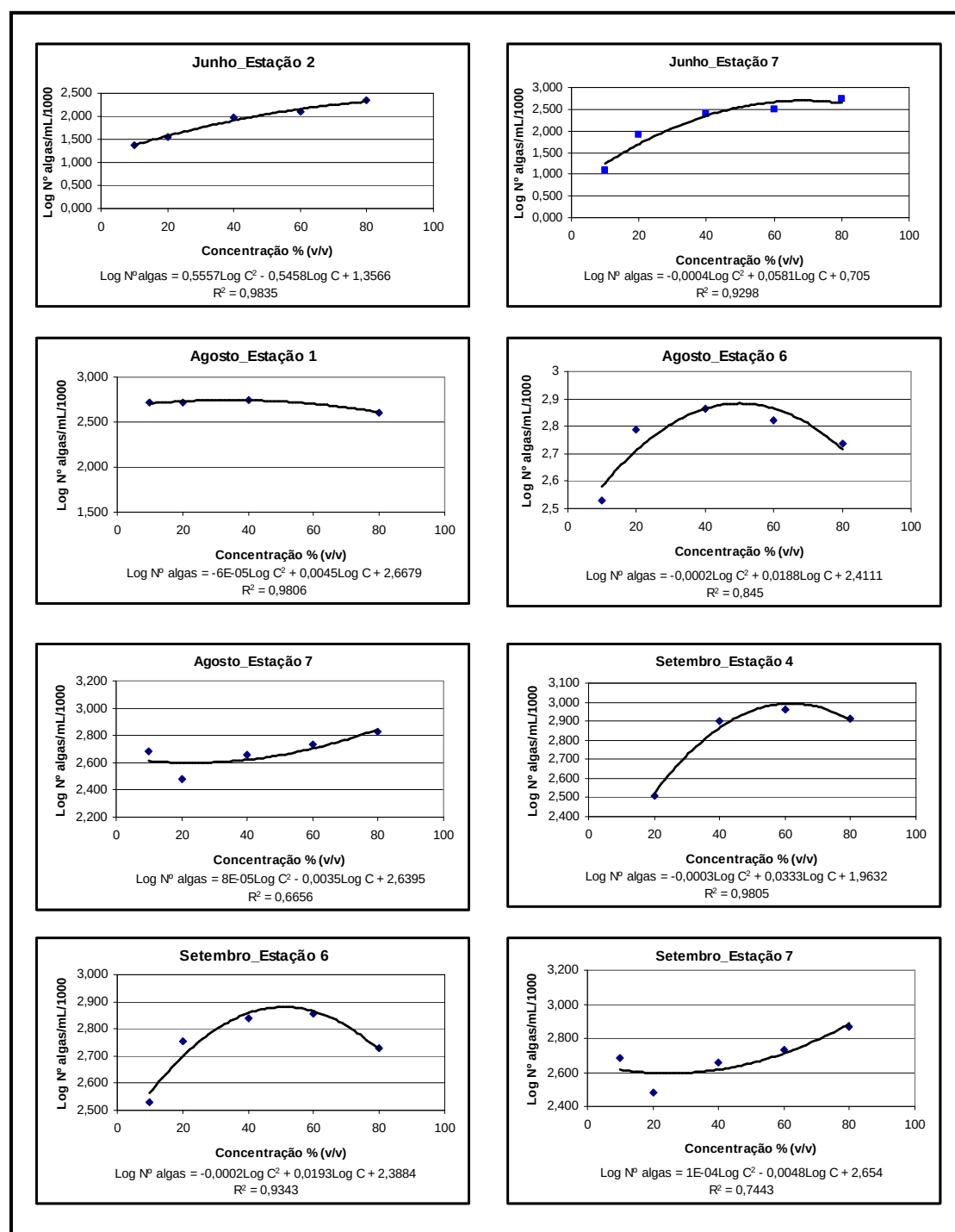


Figura G6 - Representação gráfica do logaritmo do nº de algas/mL/1000 em função da concentração testada % (v/v), ajuste polinomial

Anexo H

Métodos Estatísticos: Resultados da Análise dos Componentes
Principais (PCA)

Análise PCA aos Parâmetros

Tabela H1 – Resultados da análise de PCA

PC	EV	%V	%CV
1	6,71	31,93	31,9
2	3,87	18,45	50,4
3	2,28	10,86	61,2
4	1,90	9,03	70,3
5	1,32	6,28	76,6
6	1,16	5,51	82,1
7	0,97	4,62	86,7
8	0,78	3,72	90,4
9	0,59	2,81	93,2
10	0,35	1,66	94,9
11	0,27	1,27	96,1
12	0,22	1,07	97,2
13	0,14	0,67	97,9
14	0,14	0,66	98,5
15	0,08	0,40	98,9
16	0,08	0,36	99,3
17	0,07	0,32	99,6
18	0,04	0,20	99,8
19	0,02	0,10	99,9
20	0,01	0,06	100,0
21	0,00	0,01	100,0

Legenda: EV *Eigenvalue*; %V variância; %CV variância cumulativa

Tabela H2 – Correlações obtidas pela análise de PCA

Parâmetro	UFL							RFL						
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	Com	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	Com
P04	-0,947	0,109	-0,086	-0,258	-0,054	0,023	0,985	-0,923	0,154	0,074	0,232	-0,183	0,131	0,985
P06	-0,915	-0,087	0,243	0,096	-0,030	0,144	0,935	-0,729	0,076	0,323	0,470	0,161	0,217	0,935
P08	0,260	-0,234	0,428	0,223	0,529	0,349	0,757	0,227	-0,122	-0,022	-0,025	0,830	0,011	0,757
P09	-0,600	-0,025	0,688	0,063	-0,108	0,077	0,855	-0,452	0,137	0,681	0,190	0,319	0,174	0,855
P10	-0,865	0,067	-0,180	-0,278	0,094	-0,248	0,933	-0,881	0,128	-0,008	0,224	-0,233	-0,188	0,933
P11	-0,818	0,048	0,049	-0,429	0,125	0,172	0,904	-0,935	0,066	0,031	-0,001	0,056	0,148	0,904
P12	-0,880	0,048	-0,010	-0,309	0,013	0,164	0,899	-0,909	0,081	0,056	0,143	-0,036	0,205	0,899
P15	0,260	-0,156	0,002	-0,035	0,435	-0,785	0,898	0,154	-0,072	-0,020	-0,066	0,022	-0,929	0,898
P19	0,171	-0,264	0,818	0,019	-0,093	-0,068	0,783	0,181	-0,173	0,722	-0,173	0,407	-0,057	0,783
P20	-0,089	0,097	0,470	-0,001	-0,578	-0,317	0,673	0,047	0,121	0,754	-0,038	-0,292	0,021	0,673
P21	-0,753	-0,160	-0,233	-0,279	0,290	-0,061	0,813	-0,834	-0,102	-0,194	0,213	-0,010	-0,156	0,813
P22	-0,588	-0,477	0,243	-0,091	-0,193	-0,340	0,794	-0,504	-0,356	0,520	0,298	-0,104	-0,207	0,794
P23	-0,654	-0,337	-0,230	0,568	-0,007	-0,048	0,919	-0,283	-0,131	-0,007	0,906	-0,015	0,010	0,919
P24	-0,610	-0,152	-0,314	0,615	-0,117	-0,039	0,887	-0,201	0,025	-0,046	0,902	-0,152	0,088	0,887
P25	-0,579	-0,253	-0,113	0,699	0,085	-0,045	0,909	-0,167	-0,007	0,028	0,929	0,128	-0,023	0,909
P26	0,004	-0,851	0,132	0,006	-0,064	0,164	0,773	-0,005	-0,811	0,178	0,162	0,229	0,076	0,773
P27	0,176	-0,736	-0,223	-0,071	-0,262	0,029	0,698	0,140	-0,798	-0,013	0,084	-0,180	0,047	0,698
P28	0,137	-0,830	0,083	-0,158	0,214	-0,044	0,787	-0,014	-0,800	0,029	-0,022	0,285	-0,254	0,787
P29	0,276	-0,401	-0,426	-0,181	-0,396	0,107	0,621	0,195	-0,565	-0,186	-0,089	-0,423	0,202	0,621
P30	0,045	-0,865	0,095	-0,160	0,170	0,038	0,816	-0,089	-0,833	0,056	0,020	0,294	-0,158	0,816
P31	0,268	-0,606	-0,300	-0,209	-0,139	0,034	0,593	0,129	-0,712	-0,171	-0,090	-0,178	-0,008	0,593

Legenda: Com Comunalidades; UFL Unrotated Factor Loadings; RFL Rotated Factor Loadings

P04- Condutividade; **P06** – COD; **P08** – Turvação; **P09** – Cor; **P10** – Azoto total; **P11** – Fósforo total; **P12** – Dureza; **P15** – Zn; **P19** – Fe; **P20** – Mn; **P21** – Hg; **P22** – As; **P23** – Coliformes Totais; **P24** – Coliformes Fecais; **P25** – Estreptococos Fecais; **P26** - UT 50% *Chlorella vulgaris*; **P27** - UT 20% *Chlorella vulgaris*; **P28** UT 50%(5 min) *Vibrio fischeri*; **P29** UT 20% (5 min) *Vibrio fischeri*; **P30** – UT 50% (15 min) *Vibrio fischeri*; **P31** – UT 20% (15 min) *Vibrio fischeri*

Análise PCA – parâmetros químicos (potencial de oxidação-redução; condutividade, OD, COD, CBO₅, azoto total, fósforo total e dureza)

Tabela H3 – Resultados da análise de PCA

PC	EV	%V	%CV
1	5,65	80,73	80,7
2	0,88	12,53	93,3
3	0,20	2,89	96,2
4	0,16	2,26	98,4
5	0,06	0,80	99,2
6	0,04	0,56	99,8
7	0,02	0,23	100,0

Legenda: EV *Eigenvalue*; %V variância; %CV variância cumulativa

Tabela H4 – Correlações obtidas pela análise de PCA

Estação	UFL			RFL		
	PC1	PC2	Com	PC1	PC2	Com
1	-0,399	0,916	0,999	-0,168	0,985	0,999
2	-0,983	0,000	0,967	-0,954	0,236	0,967
3	-0,928	0,004	0,861	-0,900	0,227	0,861
4	-0,954	-0,090	0,919	-0,948	0,142	0,919
5	-0,970	-0,077	0,948	-0,961	0,159	0,948
6	-0,947	-0,103	0,908	-0,944	0,127	0,908
7	-0,956	-0,116	0,927	-0,956	0,117	0,927

Legenda: Com Comunalidades; UFL *Unrotated Factor Loadings*; RFL *Rotated Factor Loadings*

Análise PCA – parâmetros bacteriológicos

Tabela H5 – Resultados da análise de PCA

PC	EV	%V	%CV
1	3,83	54,74	54,7
2	2,08	29,72	84,5
3	0,60	8,58	93,0
4	0,22	3,18	96,2
5	0,15	2,19	98,4
6	0,08	1,12	99,5
7	0,03	0,46	100,0

Legenda: EV *Eigenvalue*; %V variância; %CV variância cumulativa

Tabela H6 – Correlações obtidas pela análise de PCA

Estação	UFL				RFL			
	PC1	PC2	PC3	Com	PC1	PC2	PC3	Com
1	-0,418	-0,769	0,404	0,929	-0,223	-0,902	-0,255	0,929
2	0,886	-0,364	-0,142	0,938	0,941	-0,123	0,193	0,938
3	0,910	-0,274	-0,262	0,972	0,973	0,020	0,157	0,972
4	0,203	-0,900	0,201	0,891	0,429	-0,829	-0,141	0,891
5	0,947	-0,178	-0,065	0,932	0,895	-0,008	0,363	0,932
6	0,852	0,265	0,330	0,905	0,502	0,123	0,799	0,905
7	0,617	0,609	0,442	0,946	0,133	0,317	0,910	0,946

Legenda: Com Comunalidades; UFL *Unrotated Factor Loadings*; RFL *Rotated Factor Loadings*

Análise PCA – parâmetros ecotoxicológicos

Tabela H7 – Resultados da análise de PCA

PC	EV	%V	%CV
1	2,31	33,04	33,0
2	1,73	24,71	57,7
3	1,23	17,59	75,3
4	0,88	12,51	87,8
5	0,46	6,61	94,4
6	0,25	3,54	98,0
7	0,14	2,01	100,0

Legenda: EV *Eigenvalue*; %V variância; %CV variância cumulativa

Tabela H8 – Correlações obtidas pela análise de PCA

Parâmetro	UFL				RFL			
	PC1	PC2	PC3	Com	PC1	PC2	PC3	Com
1	-0,233	0,511	0,787	0,936	0,028	-0,118	0,960	0,936
2	-0,338	0,843	-0,035	0,826	0,025	0,693	0,587	0,826
3	0,720	0,530	-0,028	0,801	0,870	0,192	0,084	0,801
4	0,792	0,194	0,016	0,664	0,803	-0,088	-0,109	0,664
5	-0,257	0,554	-0,762	0,953	-0,049	0,964	-0,148	0,953
6	0,653	-0,260	-0,134	0,512	0,488	-0,262	-0,453	0,512
7	0,712	0,254	0,099	0,580	0,757	-0,082	0,012	0,580

Legenda: Com Comunalidades; UFL *Unrotated Factor Loadings*; RFL *Rotated Factor Loadings*

Análise PCA – todos os parâmetros

Tabela H9 – Resultados da análise de PCA

PC	EV	%V	%CV
1	4,44	63,43	63,4
2	0,92	13,18	76,6
3	0,54	7,65	84,3
4	0,45	6,41	90,7
5	0,28	4,05	94,7
6	0,20	2,92	97,6
7	0,16	2,36	100,0

Legenda: EV *Eigenvalue*; %V variância; %CV variância cumulativa

Tabela H10 – Correlações obtidas pela análise de PCA

Estação	UFL			RFL		
	PC1	PC2	Com	PC1	PC2	Com
1	-0,469	0,845	0,934	-0,112	0,960	0,934
2	-0,777	0,222	0,652	-0,633	0,501	0,652
3	-0,892	-0,039	0,797	-0,839	0,304	0,797
4	-0,853	0,035	0,729	-0,775	0,357	0,729
5	-0,823	-0,164	0,703	-0,823	0,162	0,703
6	-0,831	-0,239	0,748	-0,860	0,096	0,748
7	-0,852	-0,271	0,800	-0,891	0,075	0,800

Anexo I

Métodos Estatísticos: Resultados da Regressão Linear Múltipla

Tabela I1 – Resultados finais da análise de MLR: parâmetros estatisticamente válidos

C. vulgaris (UT ₅₀)	Y	COD	Turvação	Zn	Mn	As								
	2,718571	-2,19338	1,650901	-1,39854	-0,78155	3,642771	Ymedio	Sr	St	r^2	r			
	1,979799	-3,32359	0,855777	-2,2934	-1,55747	2,527237	2,718571	132,4352	371,442	0,643457	0,802157			
	3,457344	-1,06317	2,446024	-0,50368	-0,00563	4,758304								
C. vulgaris (UT ₂₀)	Y	Cor	As											
	6,772286	-5,06966	5,821292	Ymedio	Sr	St	r^2	r						
	3,625689	-8,83601	2,054942	6,772286	2672,678	3633,964	0,264528	0,514323						
	9,918883	-1,30331	9,587641											
V. fischeri (UT ₅₀ - 5min)	Y	Cond.	Dureza	Hg	As									
	1,994571	-3,75731	2,386948	0,99402	0,827169	Ymedio	Sr	St	r^2	r				
	1,469562	-5,66617	0,743005	0,142078	0,18561	1,994571	69,38996	118,1445	0,412669	0,642393				
	2,519581	-1,84844	4,030892	1,845962	1,468729									
V fischeri (UT ₂₀ - 5min)	Y													
	6,850857	Ymedio	Sr	St	r^2	r								
	2,239112	6,850857	6128,098	6128,098	0									
	11,4626													
V fischeri (UT ₅₀ - 15min)	Y	Cond	Turvação	FósforoT	Dureza	Fe	Hg	As	Colif.Fecais					
	1,848857	-5,84451	-0,85961	0,970924	2,950865	0,55113	1,623609	0,595248	0,656609	Ymedio	Sr	St	r^2	r
	1,501974	-7,69344	-1,41447	0,015	1,553378	0,028343	0,868556	0,078187	0,200001	1,848857	25,91561	89,55375	0,710614	0,842979
	2,195741	-3,99559	-0,30474	1,926848	4,348352	1,073916	2,378662	1,112309	1,113216					
V fischeri (UT ₂₀ - 15min)	Y	Cond	Cor	Dureza	As									
	4,514	-6,54739	-2,8288	5,858475	2,578912	Ymedio	Sr	St	r^2	r				
	2,904141	-11,8028	-4,89766	0,818496	0,466556	4,514	652,4355	975,9226	0,331468	0,575733				
	6,123859	-1,292	-0,75994	10,89845	4,691267									