

Valentina Lunghi

Análise de toxicidade em matrizes de águas  
Implementação e Validação do método de toxicidade  
utilizando o equipamento Microtox® FX



Universidade do Algarve  
Instituto Superior de Engenharia

2020



Valentina Lunghi

Análise de toxicidade em matrizes de águas  
Implementação e Validação do método de toxicidade  
utilizando o equipamento Microtox® FX

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de  
Alimentos

**Trabalho efetuado sob orientação de:**

Professora Doutora Patrícia Alexandra Reis Nunes  
*Departamento de Engenharia Alimentar  
Instituto Superior de Engenharia do Algarve*

Doutora Maria do Rosário Coelho  
*Coordenadora – Laboratório Águas do Algarve*



Análise de toxicidade em matrizes de águas  
Implementação e Validação do método de toxicidade  
utilizando o equipamento Microtox® FX

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Faro, 18 Maio 2020

Valentina Lunghi

---

Copyright©2020 Valentina Lunghi - A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

## *Agradecimentos*

Escrever uma página de agradecimento não é tão simples quanto parece, em parte porque as palavras tendem a faltar, e também porque temos sempre medo de esquecer alguém importante. Ao final deste trabalho, gostaria de agradecer e expressar minha gratidão a todas as pessoas que, de diferentes maneiras, estiveram próximas de mim e permitiram e incentivaram meus estudos e a realização e redação desta tese.

Desejo agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Patrícia Nunes pela simpatia e disponibilidade em me fornecer conselhos valiosos para a redação desta tese, bem como todo o carinho que demonstrou, não só ao acompanhar-me ao longo deste estágio mas também ao longo de todo o meu percurso académico.

À minha coorientadora de estágio, à Doutora Maria do Rosário Coelho coordenadora da unidade laboratorial das Águas do Algarve que tornou possível a realização deste estágio, orientando-me e ajudando-me no que tivesse preciso para a edição desta tese. Não posso deixar de agradecer a Doutora Isabel de Sousa por todo o carinho demonstrado ao longo deste tempo, a qual, juntamente a Doutora Rosário permitiu prolongar a minha permanência no laboratório ao fim de incrementar a minha experiência na área da microbiologia.

À Engenheira Ana Calvino, responsável pelo laboratório de microbiologia, por toda a ajuda que me demonstrou desde o primeiro dia dando-me, ao mesmo tempo, muita autonomia nas tarefas a realizar.

As engenheiras Vera Sousa e Soraia Carvalho por toda a paciência, simpatia e dedicação que me demonstraram ao longo de todo deste período, ensinando-me as principais técnicas utilizadas no laboratório.

A Doutora Cristina Ferreira, a qual me forneceu uma formação sobre o tema da ecotoxicologia e me ajudou durante alguns dos ensaios, ao fim de familiarizar-me com a técnica, sendo sempre muito gentil e ajudando-me sempre que tivesse preciso.

A todo o pessoal da unidade laboratorial da físico-química, da amostragem e do gabinete da qualidade e de compras, bem como o restante pessoal da ETA de Alcantarilha pelo acolhimento e simpatia que me demonstraram desde o princípio, fazendo-me sentir parte de uma ótima equipa num ambiente trabalhador mas ao mesmo tempo muito simpático e divertido.

Ao meu namorado, que sempre apoio as minhas escolhas e que me ajudou sempre nos meus momentos mais difíceis, e à sua família que ao longo destes anos, sempre me ajudaram e apoiaram em tudo o que fosse necessário.

De uma forma especial quero agradecer aos meus pais, os quais são e serão sempre o meu ponto de referência, os quais sempre me apoiaram não só economicamente mas também emotivamente ao longo destes anos, incentivando-me sempre nos bons e maus momentos para ser e dar sempre o meu melhor seja como aluna que como pessoa.

*Obrigada a todos*



## Resumo

A gestão de qualidade de água baseia-se, em grande medida, em análises laboratoriais fiáveis que são efetuadas em laboratório acreditados para o efeito.

O controlo da qualidade da água inclui inúmeros parâmetros indicadores entre os quais a toxicidade, que mede o eventual efeito nocivo de determinada substância num organismo, ou numa subestrutura deste.

A análise do grau de toxicidade da água é atualmente reconhecido como um parâmetro de elevada importância para a qualidade e segurança da água, tanto em monitorização de rotina, como em situações de emergência, embora não tenha ainda sido integrado na legislação nacional de águas de consumo, naturais ou residuais.

Neste trabalho pretendeu-se efetuar a implementação das análises de toxicidade em matrizes de águas, pela técnica fotometria/ bioluminescência. O método de análise implementado utilizou o equipamento, Microtox® FX, com a utilização da bactéria bioluminescente *Aliivibrio fischeri* como bioindicador.

A bactéria foi testada com substâncias de referência, presentes na norma ISO 11348-3:2007, nomeadamente dicromato de potássio e 3,5-diclorofenol e os valores da  $CE_{50}$  obtidos com o método Microtox® FX foram de  $43,76 \pm 6,35$  mg/L e  $53,20 \pm 5,50$  mg/L para o dicromato de potássio e  $3,99 \pm 0,15$  mg/L para o 3,5-diclorofenol.

Relativamente aos cloritos, a bactéria apresentou sensibilidade com baixas % de inibição, concordante com o valor estipulado pela legislação de 0,7 mg/L. Outro subproduto de oxidação, os cloratos, com valores legais semelhantes, foram obtidos resultados diferentes, pois as % E foram muito baixas, para concentrações elevadas (81,9 mg/L e 40,95 mg/L).

Para os ensaios com microcistina-LR e anatoxina-a, para a primeira as % E foram muito baixas em elevadas concentrações (acima do limite legal de 1 µg/L), tendo-se concluído que a bactéria é sensível a esta toxina somente em elevadas concentrações, enquanto para a anatoxina-a as bactérias apresentaram elevada sensibilidade, pois baixas % E foram detetadas até uma concentração de 0,00038 µg/L detetando toxicidade abaixo do limite provisório para água de consumo 0,001 µg/L e abaixo do futuro valor guia da OMS de 30 µg/L.

Conclui-se que foi possível implementar e validar o método de ensaio para a avaliação da toxicidade usando a bactéria bioluminescente *Aliivibrio fischeri* com o equipamento Microtox® FX, para que seja possível uma avaliação da toxicidade em diferentes matrizes de água.

Palavras-chave: Água, Ecotoxicidade, Bactérias Bioluminescentes, Microtox® FX

## Abstract

Water quality management is largely based on reliable laboratory analysis that are performed in accredited laboratories.

Water quality control includes a number of indicator parameters, including toxicity, which measures the eventual harmful effect of a substance on an organism or its sub-structure.

Water toxicity analysis is currently recognized as a parameter of high importance for water quality and safety/security, both in routine monitoring and in emergency situations. Nevertheless, it has not yet been integrated into the National legislation for drinking, natural or waste waters.

This work intended to implement the toxicity analysis in water matrices by photometry / bioluminescence technique. This method was implemented using the equipment Microtox® FX, using the bacterium *Aliivibrio fischeri* as a bioindicator. After implementing the water toxicity analysis method, different chemicals relevant to natural and drinking water quality were tested.

The bacterium was tested with reference substances, present in the ISO 11348-3:2007 standard, namely potassium dichromate and 3,5-dichlorophenol and the EC50 values obtained with the Microtox® FX method were  $43.76 \pm 6.35$  mg / L and  $53.20 \pm 5.50$  mg / L for potassium dichromate and  $3.99 \pm 0.15$  mg / L for 3,5-dichlorophenol.

Regarding chlorites, the bacteria showed sensitivity with low % inhibition, in agreement with the value stipulated by the legislation of 0.7 mg / L. Another oxidation by-product, chlorates, with similar legal values, obtained different results, since the % E were very low, for high concentrations (81.9 mg / L and 40.95 mg / L).

For the tests with microcystin-LR and anatoxin-a, for the former % E were very low in high concentrations (above the legal limit of 1 µg / L), concluding that the bacteria is sensitive to this toxin only in high concentrations, whereas for anatoxin-a the bacteria showed high sensitivity, as low % E were detected up to a concentration of 0.00038 µg / L detecting toxicity below the provisional limit for drinking water 0.001 µg / L and below the future value WHO guide of 30 µg / L.

It is concluded that it was possible to implement and validate the test method for the evaluation of toxicity using the bioluminescent bacterium *Aliivibrio fischeri* with the Microtox® FX equipment, so that it is possible to evaluate the toxicity in different water matrices in the laboratory.

Keywords: Water, Ecotoxicity, Bioluminescent bacteria, Microtox® FX

## Índice

Estrutura da dissertação.....	17
CAPÍTULO I - Descrição da Empresa.....	19
1. Introdução .....	20
1.1 A importância da água .....	20
1.2 Águas do Algarve (AdA) .....	21
1.2.1 ETA de Alcantarilha .....	22
1.2.1.1 Funcionamento da ETA de Alcantarilha .....	23
1.2.1.2 Laboratório da AdA .....	23
1.3 Qualidade da água .....	23
Capítulo II – Fundamentos do projeto de Estágio .....	25
2. A Ecotoxicologia .....	26
3. Ensaio Ecotoxicológicos .....	27
3.1 Testes de toxicidade aguda e crónica.....	28
3.2 Principais vantagens e desvantagens dos bioensaios .....	29
4. Bactérias Bioluminescentes.....	29
4.1 Mecanismo de Luminescência.....	30
4.2 Principais aplicações.....	31
5. Compostos tóxicos e águas de consumo.....	31
5.1 As Cianobactérias.....	31
5.2 Cianotoxinas .....	32
5.2.1 Neurotoxinas.....	34
5.2.1.1 Anatoxinas.....	34
5.2.1.2 Saxitoxina .....	35
5.2.2 Hepatotoxinas .....	36
5.2.2.1 Microcistinas.....	36
5.3 Cloritos e Cloratos.....	37
5.3.1 Efeitos de cloritos e cloratos sobre a saúde .....	38
6. Sistema Microtox® FX.....	39
6.1 O Sistema Microtox® FX, um simples aliado em situações de emergência .....	39
7. Objetivo da dissertação.....	40
CAPÍTULO III- Materiais e Métodos: Determinação da toxicidade de subprodutos de desinfecção da água e de cianotoxinas em bactérias bioluminescentes.....	41
8. Equipamento Microtox® FX.....	42
8.1 Constituição do Equipamento .....	42
8.2 Princípio de funcionamento .....	43
8.2.1 Tratamento de Resultados .....	45
8.2.1.1 Cálculo da % Efeito .....	45
8.2.1.2 Cálculo da Razão dos Brancos.....	46

8.2.1.3 Cálculo da Intensidade corrigida .....	46
8.2.1.4. Cálculo do valor da função Gama .....	47
8.3 Tratamento estatístico dos resultados .....	50
8.4 Principais vantagens e desvantagens em relação a outros ensaios de toxicidade.....	50
8.5 Reagentes e materiais Microtox ® FX .....	51
8.5.1 Solução Diluente e Reconstituente .....	51
8.5.2 Solução de ajuste osmótico .....	51
8.6 Instrumentos e material de vidro .....	52
9. Procedimento experimental.....	52
9.1 Reconstituição do Reagente Solo .....	52
9.2 Ensaio com as substâncias de referência .....	53
9.2.1 Dicromato de Potássio .....	53
9.2.2 3,5-Diclorofenol.....	54
9.3 Ensaio com matrizes de água .....	55
9.4 Ensaio com Cloritos e Cloratos .....	56
9.5 Ensaio com padrões de contaminantes.....	56
CAPÍTULO IV- Resultados e Discussão .....	57
10. Resultados e Discussão.....	58
11.Resultados dos ensaios com a substância de referência- Dicromato de Potássio .....	59
11.1 Dicromato de Potássio (100 mg/L) .....	59
11.2 Dicromato de Potássio (129 mg/L) .....	61
12. Resultados dos ensaios com a substância de referência- 3,5-diclorofenol 8 mg/L .....	63
13.Resultados dos ensaios com cloritos e cloratos .....	65
13.1 Resultados dos ensaios com padrão de cloritos.....	65
13.2 Resultados dos ensaios com padrão de cloratos .....	67
14. Resultados dos ensaios com cianotoxinas .....	68
14.1 Resultados com padrão de Microcistinas-LR .....	68
14.2 Resultados com Anatoxina-a 0,15 µg/L .....	69
14.3 Resultados com Saxitoxina 10 µg/L .....	72
Capitulo V - Conclusões.....	75
Referências Bibliográficas .....	79
Apêndice I - Ensaio com matrizes de Água .....	85
Apêndice II- Cálculo da Razão dos Brancos .....	89
Apêndice III - Tabelas com resultados das concentrações/efeito e respectivos valores de EC <sub>50</sub> , EC <sub>20</sub> e EC <sub>10</sub> .....	105
Apêndice IV- Modelo Probit.....	113
Apêndice V- Método Estatístico.....	135
Anexo I – Procedimento Microtox FX.....	149

## Índice Tabelas

Tabela 1 - Exposição humana a cianotoxinas .....	33
Tabela 2 - Exemplo do cálculo do valor $\Gamma$ pelo Software da Modernwater .....	47
Tabela 3 - Tabela para transformação de % E em unidades Probit .....	49

## Índice Figuras

Figura 1 - Distribuição da água na terra.....	21
Figura 2 - Classificação das cianotoxinas.....	34
Figura 3 - Estrutura química da anatoxina-a, homoanatoxina-a e anatoxina-a(s) .....	35
Figura 4 - Estrutura molecular da saxitoxina .....	36
Figura 5 - Estrutura química da microcistina-LR .....	37
Figura 6 - Equipamento Microtox® FX (versão portátil).....	42
Figura 7 - Menu principal e funções do equipamento.....	42
Figura 8 - Componentes internos ao Microtox ® FX .....	43
Figura 9 - Representação esquemática do funcionamento do equipamento Microtox® FX .....	45
Figura 10 - Exemplo de uma curva dose resposta (Software Microtox) .....	47
Figura 11 - Exemplo do fator Gama por concentração .....	48
Figura 12 - Probits das % E vs. log das concentrações de uma determinada substância .....	49
Figura 13 - Solução diluente Microtox ® FX .....	51
Figura 14 - Solução de ajuste osmótico.....	52
Figura 15 - Dicromato de potássio.....	54
Figura 16 - Substância referência - - $K_2Cr_2O_7$ 100 mg/L.....	54
Figura 17 - Estrutura molecular do 3,5-diclorofenol .....	55
Figura 18 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de dicromato de potássio 100 mg/L .....	59
Figura 19 - % E obtidas para diferentes temperaturas de ensaio com dicromato de potássio 100 mg/L .....	60
Figura 20 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de dicromato de potássio 100 mg/L .....	60
Figura 21 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de dicromato de potássio 129 mg/L.....	61
Figura 22 - % E para diferentes temperaturas de ensaio com dicromato de potássio 129 mg/L .....	62
Figura 23 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de dicromato de potássio 129 mg/L .....	62
Figura 24 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de 3,5-diclorofenol .....	63
Figura 25 - % E para diferentes temperaturas de ensaio com 3,5-diclorofenol .....	64
Figura 26 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de 3,5-diclorofenol.....	64
Figura 27 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de cloritos .....	66
Figura 28 - % E para diferentes temperaturas de ensaio com cloritos .....	66
Figura 29 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de cloritos .....	67
Figura 30 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de anatoxina-a.....	69
Figura 31 - % E para diferentes temperaturas de ensaio com anatoxina-a .....	70
Figura 32 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de anatoxina-a.....	71
Figura 33 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de saxitoxina .....	72
Figura 34 - % E para diferentes temperaturas de ensaio com saxitoxina .....	73
Figura 35 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de saxitoxina.....	73



## Lista de Abreviaturas

AdA-Águas do Algarve

B-Tox - Basic Toxicity Test

Q-Tox – Quick Toxicity test

CE<sub>50</sub> - Concentração Efetiva 50 %

CE<sub>20</sub> - Concentração Efetiva 20 %

CE<sub>10</sub> – Concentração Efetiva 10 %

ETA- Estação de Tratamento de Água

OMS -Organização Mundial de Saúde

RB- Razão dos Brancos

% E – Percentagem de Efeito



## Estrutura da dissertação

A presente dissertação tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular, desenvolvido no âmbito do segundo ano do curso de Mestrado em Tecnologia dos Alimentos da Universidade do Algarve, o qual foi realizado na área de Microbiologia do Laboratório da empresa Águas do Algarve.

A seguinte dissertação encontra-se dividida em 5 capítulos.

No capítulo I é feita uma breve descrição da empresa Águas do Algarve, S.A. e salienta-se a importância do tratamento de água e a sua qualidade para consumo humano.

O Capítulo II pretende descrever os principais objetivos do projeto de estágio e fundamentos do mesmo.

Os materiais e métodos utilizados durante o projeto de estágio são descritos no Capítulo III.

No Capítulo IV apresentam-se os resultados obtidos durante o projeto e estes são discutidos com base na análise ecotoxicológica, considerando a literatura recentemente publicada sobre o assunto. As conclusões deste trabalho são apresentadas no Capítulo V assim como algumas sugestões de trabalho futuro.



# CAPÍTULO I - Descrição da Empresa

## Síntese

Neste capítulo encontra-se um breve resumo sobre a importância da água para a sobrevivência de todos os ecossistemas bem como uma breve descrição da empresa onde foi realizado o estágio

# 1. Introdução

## 1.1 A importância da água

A água para o consumo humano, ou seja, a água isenta de qualquer perigo/risco para a saúde dos consumidores, deve ser de fácil acesso e estar disponível para todos como um direito (Bijelovic *et al.*, 2017; Rompré *et al.*, 2002; WHO, 2017).

Este importante recurso desempenha um papel significativo na prosperidade social e no bem-estar de toda a população (Damo & Icka, 2013; Mendes, 2010).

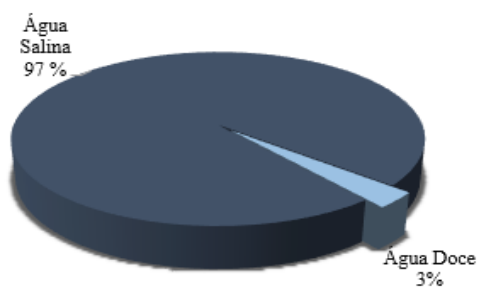
É graças à presença de água que a vida se desenvolveu na Terra. Esta é uma das poucas substâncias presentes na natureza que apresenta diferentes estados físicos, como o estado sólido, líquido e gasoso. Esta característica é muito importante, pois permite a regeneração da água que, uma vez consumida, estaria esgotada. A distribuição de água na terra é governada por um complexo sistema de troca de matéria e energia entre a superfície da terra e a atmosfera, através do mais comumente conhecido “ciclo da água” (Delpiaz, 2014).

A Figura 1 ilustra a forma desigual de distribuição da água na terra, verificando-se que somente 3 % da água na superfície terrestre é água doce, sendo que os restantes 97 % de água residem no oceano. De água doce, 69 % encontram-se em calotes polares e Glaciares, 30 % no subsolo e menos de 1 % corresponde a água superficial a qual encontra-se localizada em lagos, rios e pântanos (Bralower & Bice, 2019).

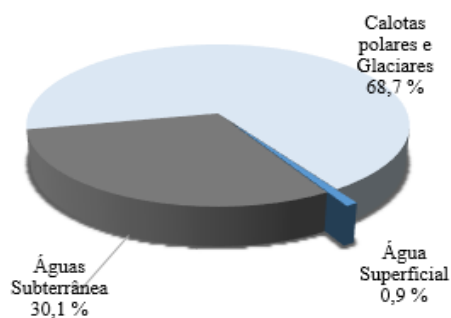
Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a água destinada ao consumo humano não deve apresentar nenhum risco para a saúde, mesmo para os indivíduos mais vulneráveis como o caso de bebés, idosos, doentes crónicos e pessoas imunodeprimidas.

A água potável não é somente utilizada para beber mas é também necessária para todos os fins domésticos habituais, como para a lavagem e preparação de alimentos e para a manutenção da higiene pessoal. A água para o consumo deve possuir características físicas, químicas e biológicas que permitam todos estes usos possíveis (Roccaro, Mancini, & Vagliasindi, 2005).

**Distribuição da água na terra**



**Distribuição da água doce**



**Distribuição da água superficial doce**

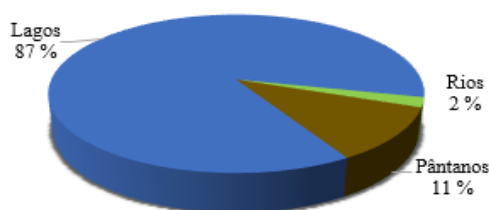


Figura 1 - Distribuição da água na terra.  
Fonte: Adaptado de (Bralower & Bice, 2019)

Com o aumento da população mundial, a água disponível para o consumo tornou-se um recurso limitado e, por consequência, ao longo dos séculos, foram desenvolvidas técnicas e sistemas sofisticados para obter acesso a novas reservas de água através da construção de poços, aquedutos e barragens, conseguindo assim distribuir água necessária para irrigação e para o consumo. Além dos problemas de higiene causados pelos resíduos insalubres, o rápido desenvolvimento das indústrias, especialmente o desenvolvimento das indústrias químicas, resultou numa contaminação constante de todos os recursos hídricos (Szewzyk *et al.*, 2000). Estes últimos estão sob crescente pressão devido ao aumento das necessidades de água em todos os sectores e ao elevado risco de poluição devido às atividades humanas (Roccaro, Mancini, & Vagliasindi, 2005).

## 1.2 Águas do Algarve (AdA)

Toda a região do Algarve é abrangida por um sistema multimunicipal de água e saneamento, cujo concessionário é a empresa Águas do Algarve. A AdA S.A, criada através da publicação do Decreto-Lei 168/2000 de 5 de Agosto, a qual é integrada no Grupo Águas de Portugal.

A AdA é uma concessionária detentora das concessões de captação, tratamento e abastecimento de água para consumo humano e tratamento de águas residuais para a região do Algarve. Os municípios abrangidos pelos sistemas de abastecimento de água e de saneamento de águas residuais são os que constituem toda a região do Algarve nomeadamente Albufeira, Alcoutim, Aljezur, Castro Marim, Faro, Lagoa, Lagos, Loulé, Olhão, Monchique, Portimão, São Brás de Alportel, Silves, Tavira, Vila do Bispo e Vila Real de Santo António.

As albufeiras de Odeleite, Beliche, Odelouca e Bravura, as quais fazem parte deste sistema de abastecimento, são aquelas que fornecem os volumes de água necessários para abastecer a população do Algarve (Franco, 2015).

O Sistema Multimunicipal de Abastecimento da AdA compreende 78 Pontos de entrega de água, 20 captações de água subterrânea e 4 captações de água superficial, cerca de 500 km de condutas, 34 estações elevatórias, 4 estações de tratamento de água (ETA), nomeadamente a ETA de Alcantarilha, de Beliche, de Fontainhas e a de Tavira, com uma capacidade total de tratamento de 5,65 m<sup>3</sup>/s. Possui também 20 reservatórios para armazenamento de água, em alta (71 055 m<sup>3</sup>) (Águas do Algarve SA, 2019).

### 1.2.1 ETA de Alcantarilha

A estação de tratamento de água de Alcantarilha encontra-se a cerca de 10 Km da cidade de Silves e a cerca de 12 Km do Túnel Odelouca, junto à localidade de Alcantarilha - Gare. Esta ETA tem como função tratar a água superficial proveniente da albufeira de Odelouca (desde 2012) e a água subterrânea proveniente das captações de Vale da Vila e de Benaciate, sendo a sua capacidade máxima de produção de 259.000 m<sup>3</sup>/dia. Para garantir as necessidades de abastecimento de água, tanto em época alta como em época baixa, a ETA de Alcantarilha é constituída por três linhas de tratamento em paralelo, garantindo assim a necessária flexibilidade de tratamento. A água tratada em Alcantarilha, é seguidamente distribuída para os conselhos de Albufeira, Aljezur, Lagoa, Lagos, Monchique, Portimão, Loulé (Oeste e Norte), Silves e Vila do Bispo, podendo também abastecer, em caso de necessidade, os municípios de Faro, Olhão e Tavira através da estação elevatória reversível (Águas do Algarve SA, 2019).

### 1.2.1.1 Funcionamento da ETA de Alcantarilha

O objetivo das várias técnicas aplicadas no tratamento de água potável é, além da remoção e inativação de potenciais microrganismos patogénicos, remover o maior número possível de compostos da água bruta, de modo a satisfazer os limites exigidos pelas autoridades e a salvaguarda da saúde pública (Douterelo, Sharpe, & Boxall, 2013; Hebaiti *et al.*, 2017; Roccaro, Mancini, & Vagliasindi, 2005).

Após a captação da água superficial proveniente da albufeira de Odelouca e água subterrânea proveniente das captações de Vale da Vila e de Benaciate, inicia-se o processo de tratamento da água bruta.

Com o objetivo de assegurar uma água livre e sem quaisquer riscos para os consumidores a ETA de Alcantarilha utiliza os seguintes processos de tratamento: Pré-oxidação, coagulação/adsorção, floculação, decantação, filtração e desinfecção final.

### 1.2.1.2 Laboratório da AdA

A empresa AdA possui um laboratório de controlo de qualidade da água constituído por duas unidades laboratoriais, situadas nas duas principais estações de tratamento de água da empresa, nomeadamente a ETA de Tavira e ETA de Alcantarilha. Neste laboratório existem 3 áreas técnicas: biologia, microbiologia e físico-química. O laboratório da AdA centrou-se na colheita e análise de águas para consumo humano (águas processadas na ETA e águas de adução), águas naturais (superficiais e subterrâneas) bem como águas residuais e respetivos meios recetores. O Laboratório encontra-se acreditado, desde 2006, pela norma ISO/IEC 17025:2018, a qual estabelece os requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. Este encontra-se acreditado para cerca de 200 parâmetros de qualidade da água, que correspondem a cerca de 382 ensaios acreditados, em diferentes tipos de matrizes (águas naturais, águas de consumo, águas residuais, balneares e piscinas), das três áreas técnicas acima mencionadas (Águas do Algarve SA, 2019) estando ainda acreditado para colheita de amostras.

## 1.3 Qualidade da água

O problema da poluição de água afeta em grande escala os ambientes aquáticos, os quais são sensíveis principalmente a várias tipologias de contaminação, como a poluição química e a contaminação microbiológica, as quais são resultantes de várias atividades

antropogénicas. Estes poluentes podem ter efeitos devastadores nos ecossistemas com consequências de longo prazo (Adams & Rowland, 2002; Soares de Mendonça, 2005).

Segundo Peterson , *et al.*, 2017, estima-se que, anualmente, a indústria química liberte para o ambiente aproximadamente 1.000 novas substâncias e que pelo menos 100 milhões de toneladas de produtos químicos sejam libertados no ambiente anualmente. Entre eles estão pesticidas, metais pesados, óleos, produtos de higiene pessoal, produtos farmacêuticos e desreguladores endócrinos, entre outros. Embora casos de poluição em grande escala sejam raros (como o caso do derrame de petróleo), os efeitos subletais e crónicos da exposição a substâncias químicas são muito comuns.

Em vários setores industriais, a utilização cada vez mais extensa de produtos químicos com uma elevada ação tóxica, que entram diretamente / ou indiretamente no ambiente como resultado da lixiviação do solo, ou pela precipitação de chuvas e posteriormente transferidos para os cursos de água, requer um controlo cada vez mais cuidadoso destas emissões. Um controlo constante da qualidade das águas e uma verificação dos efeitos que estas substâncias podem causar no ambiente, deverá ser realizado nos vários ecossistemas e, no caso da água para consumo humano, também deverão ser estudados os efeitos sobre a saúde dos consumidores (Marchini, 2005; Peterson *et al.*, 2017).

Por outro lado, as atividades urbanas são uma das maiores fontes de poluição para os ecossistemas aquáticos, os quais estão cada vez mais degradados e fragilizados devido à descarga de poluentes. A descarga excessiva de alguns constituintes nos recursos hídricos, como sólidos suspensos, nutrientes, microrganismos e compostos tóxicos tornam a água inadequada para a sobrevivência ou o crescimento de organismos aquáticos (Koçbaş & Oral, 2015).

Em Portugal, a principal regulamentação da qualidade da água de consumo humano encontra-se estabelecida no Dec. Lei 306/2007, alterado pelo Decreto-Lei nº 152/2017, de 7 de Dezembro.

A legislação dos diversos países baseia-se nas orientações da Organização Mundial de Saúde e em particular nos *Guidelines for Drinking Water Quality*, que constituem o padrão de referência mundial do sector.

# Capítulo II – Fundamentos do projeto de Estágio

## Síntese

Este capítulo irá abordar o tema da ecotoxicologia e os métodos de ensaios para determinar a toxicidade de determinadas substâncias sobre organismos teste

## 2. A Ecotoxicologia

Pelas razões expostas no capítulo anterior, a monitorização e a avaliação da poluição ambiental é um assunto de grande preocupação devido às implicações que os poluentes podem exercer sobre o ambiente, organismos e ecossistemas, bem como sobre a qualidade de vida dos seres humanos e sobre a saúde pública (Silva, 2017; Szezyk *et al.*, 2000).

A ecotoxicologia é uma disciplina relativamente recente, designada pela primeira vez em 1969, pelo toxicologista francês René Truhaut (Hoffman *et al.*, 2002; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Rodrigues, 2017).

Literalmente, a toxicologia (do termo latim *toxĭcum*, e por sua vez do grego τοξικόν-veneno) é a "ciência dos venenos". Por outro lado, a ecologia (do grego οἶκος, oikos – ambiente e λόγος, logos-estudo) é o estudo das interações entre todos os organismos. A ecotoxicologia é, portanto, a ciência dos venenos ou tóxicos para o ambiente (Marchini, 2005; Satoh & Inayat-Hussain, 2009).

Esta ciência pertence ao ramo da toxicologia e tem como objetivo o estudo dos efeitos de agentes tóxicos, substâncias naturais ou sintéticas, sobre a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas e sobre as interações entre a componente biótica e abiótica, protegendo espécies naturais e as populações (Barbosa, 2005; Hoffman *et al.*, 2002; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Rubinger, 2009; Truhaut, 1977).

A toxicidade de uma substância pode então ser definida como o potencial, ou a capacidade de qualquer substância, de causar efeitos adversos em organismos vivos como, por exemplo, um veneno ou uma toxina produzida por microrganismos (Rice *et al.*, 2012; Silva, 2017).

Tendo em conta que, no ambiente, os compostos se encontram naturalmente em misturas, o estudo da ecotoxicidade, em amostras ambientais, pode não envolver a ação de apenas uma substância isolada, mas sim da interação e extensão de vários agentes presentes num determinado ambiente (Brotta, 2012).

A ecotoxicologia tem como objetivo realizar medições de toxicidade em amostras ambientais utilizando baterias de testes, recorrendo a uma série de organismos alvo (bioindicadores), ou subestruturas destes, com a finalidade de determinar o grau ou o efeito biológico de diferentes concentrações de uma substância ou de uma amostra-teste nos mesmos. Desta forma, pretende prever os possíveis impactos dos compostos presentes nas amostras ambientais, nos ecossistemas, pesquisando quaisquer causas de toxicidade (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Duarte, 2016).

### 3. Ensaio Ecotoxicológicos

A presença de uma grande variedade de poluentes orgânicos e inorgânicos no meio aquático, constitui atualmente um problema muito grave, devido aos seus potenciais efeitos adversos nos ecossistemas, ameaçando ao mesmo tempo a saúde humana. Portanto, é muito importante estabelecer e melhorar os métodos e procedimentos analíticos sensíveis e seletivos para a detecção e identificação prévia destes compostos, os quais deverão ser tratados/minimizadas na origem, a fim de proteger o ambiente e a saúde humana e animal (DIRECTIVA 2008/105/CE; Satoh & Inayat-Hussain, 2009; Schreiber *et al.*, 2018; Vega Morales *et al.*, 2010).

Para garantir a qualidade química e a segurança da água potável, é essencial controlar as fontes de água superficiais, subterrâneas bem como toda a rede de distribuição (Parvez, Venkataraman, & Mukherji, 2006; Woutersen, 2011).

Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidas várias técnicas, entre as quais, os testes ecotoxicológicos, que constituem algumas das ferramentas mais utilizadas para a avaliação ecológica e bioquímica da qualidade da água. Estes testes são baseados na detecção de sinais biológicos produzidos por microrganismos, organismos ou subestruturas destes, em resposta à presença de contaminantes tóxicos (Bodini *et al.*, 2018; Brota, 2012; Fernández-Piñas *et al.*, 2014; Parvez, Venkataraman, & Mukherji, 2006; Silva, 2017)

Normalmente, estes organismos são expostos, durante um determinado período de tempo, a diferentes concentrações da mesma substância, composto químico ou a diferentes diluições de uma amostra ambiental (águas residuais, lamas de depuração, solos, sedimentos fluviais ou marinhos, etc.), num meio adequado (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Silva, 2017).

Simultaneamente, pelo menos um grupo de organismos não é submetido à substância-teste ou amostra sendo assim denominado grupo de controlo, enquanto no controlo positivo, utiliza-se um agente tóxico de efeito conhecido (substância química de referência) para assegurar que o organismo responda apropriadamente ao agente tóxico (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Rodrigues, 2017; Rubinger, 2009; Silva, 2017).

Após o contato com amostras possivelmente contaminadas, ocorrem vários processos nos organismos testados, podendo estes resultar em mudanças bioquímicas, metabólicas, de comportamento, crescimento, reprodução ou até a morte dos mesmos. Estas alterações podem então indicar um sinal de toxicidade, sendo necessárias análises químicas mais detalhadas para determinar a origem da toxicidade (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Niemirycz *et al.*, 2007; Rodrigues, 2017).

Entre os principais grupos de organismos, utilizados nos ensaios laboratoriais, destacam-se: microalgas, micro-crustáceos, equinoides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos aquáticos (Bodini *et al.*, 2018; Brota, 2012).

### 3.1 Testes de toxicidade aguda e crónica

Ao longo dos ensaios, os organismos-teste podem ser submetidos a exposições agudas ou crónicas após o contacto com a substância-teste ou amostra. Estas exposições diferem na duração dos ensaios e nas respostas finais (Costa *et al.*, 2008; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

A expressão ‘dose’ é utilizada para especificar a quantidade de uma substância química administrada durante os testes, enquanto os termos ‘efeito’ ou ‘resposta’, são utilizados para indicar uma alteração biológica, num organismo (ou subestrutura) ou numa população em relação a uma exposição (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

Os testes de toxicidade aguda são ensaios de curta duração em relação ao período de vida do organismo-teste ou população (geralmente entre 0 a 96 h) os quais permitem estimar a dose ou concentração de um agente tóxico, capaz de produzir uma resposta específica mensurável (Gomes, 2007; Rodrigues, 2017; Silva, 2017).

Através destes testes é possível avaliar diferentes parâmetros ecotoxicológicos tais como a imobilidade, alterações nas reações bioquímicas/enzimáticas, alterações no metabolismo e alterações no sistema reprodutivo ou a mortalidade. A partir destes testes, obtém-se parâmetros padronizados como a concentração letal 50 % (CL<sub>50</sub>), ou seja, a concentração de uma determinada substância dissolvida em meios aquosos, capaz de provocar morte em 50 % dos organismos teste, num determinado tempo de exposição. Pode medir-se também a concentração efetiva 50 % (CE<sub>50</sub>), ou seja, a concentração de substância dissolvida em meios aquosos capaz de provocar efeitos agudos em 50 % dos organismos, como por exemplo, provocar alterações de parâmetros associados a funções biológicas, após um determinado período de tempo de exposição (Costa *et al.*, 2008; Gomes, 2007; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Niemirycz *et al.*, 2007).

Os testes de toxicidade crónica são utilizados para medir os efeitos de substâncias por um período de exposição prolongada podendo abranger parte ou todo o ciclo de vida de uma população ou de um organismo - teste. Estes permitem determinar a concentração em que não se observam efeitos, denominada concentração de efeito não observado (CENO) e a concentração mais baixa em que deteta um efeito tóxico, designada concentração de efeito

observado (CEO), podendo os resultados ser expressos também em CE<sub>50</sub> (Costa *et al.*, 2008; Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Rodrigues, 2017; Silva, 2017).

### 3.2 Principais vantagens e desvantagens dos bioensaios

Em relação às análises químicas, as quais permitem identificar e quantificar os compostos presentes nas amostras, os bioensaios apresentam várias vantagens, pois permitem realizar avaliações globais do impacto de todos os poluentes presentes no ambiente através de um único ensaio; permitem examinar e quantificar os efeitos tóxicos nos organismos vivos utilizando espécies indicadoras sensíveis às substâncias em teste. Estes ensaios são ainda, em geral, simples de executar, sem requerer técnicos altamente especializados, e são relativamente económicos. No entanto, os bioensaios também apresentam algumas desvantagens como a de avaliar o efeito do poluidor, mas sem identificar o poluente e a sua origem e, também, não permitem testar todas as espécies ambientais expostas, nem todas as possíveis vias de exposição. Por essa razão, as análises químicas e os testes de toxicidade devem-se complementar (Costa *et al.*, 2008; Duarte, 2016; Niemirycz *et al.*, 2007).

## 4. Bactérias Bioluminescentes

Durante muitos anos, as avaliações de toxicidade de corpos hídricos foram realizadas com organismos teste tais como algas, dáfnias, peixes, plantas, vermes, mexilhões e ostras. No entanto, estes testes são muito demorados pois requerem tempos maiores de exposição e maiores volumes da amostra, exigem o cultivo contínuo dos organismos, apresentando também custos elevados (Costa *et al.*, 2008; Gomes, 2007; Niemirycz *et al.*, 2007).

Atualmente, existe também um grande interesse nos ensaios com bactérias bioluminescentes, devido à sua rapidez de resposta. Uma das bactérias bioluminescentes mais estudada ao longo dos anos é a espécie *Aliivibrio fischeri* ou *Vibrio fischeri* (também denominada como *Photobacterium fischeri*) (Abbas *et al.*, 2018; Gomes, 2007).

A bioluminescência deriva da palavra grega “*Bios*” (viver) e da palavra latina “*lumen*” (luz) que literalmente significa uma luz viva. Este tipo de fenómeno tem sido visto em muitos tipos de organismos o qual ganhou a atenção dos cientistas por causa de sua beleza, fisiologia, bioquímica, genética e facilidade de deteção (Kulkarni & Kulkarni, 2015).

Estas bactérias, têm forma de bastonete, são móveis, Gram-negativas e podem funcionar como anaeróbios facultativos (Molina, Tuazon, & Larman, 2015).

As bactérias bioluminescentes são encontradas principalmente em ambientes marinhos em simbiose com outros organismos (certos tipos de lulas e peixes), colonizando o órgão produtor de luz (fotóforo) ou sendo parte da microbiota entérica normal (intestino), conferindo assim a luminescência para a camuflagem ou atração de presas pelo hospedeiro. Também podem ser encontrados em estado de vida livre (planctônico) alimentando-se de substâncias orgânicas presentes na água (Abbas *et al.*, 2018; Shaikh & Prabhu, 2017).

#### 4.1 Mecanismo de Luminescência

A luz é emitida pelas bactérias bioluminescentes através de um mecanismo que muitas células bacterianas utilizam para comunicar entre elas, denominado de *Quorum sensing*, ou seja, após alcançarem uma certa densidade celular apresentam luminescência. A reação de luminescência bacteriana, catalisada pela luciferase, envolve a oxidação de um aldeído alifático de cadeia longa e um mononucleotídeo de flavina reduzido (FMNH<sub>2</sub>), gerando luciferina (FMN), a forma oxidada do aldeído e água, com libertação do excesso de energia livre na forma de uma luz azul-verde correspondente a 490nm.



Devido a esta sua característica, e ao facto de ser possível medir a luminescência com o equipamento de laboratório, as bactérias luminescentes são comumente utilizadas como um biossensor para a presença de diferentes poluentes ambientais encontrados na água, no solo e na atmosfera (Boynton, 2009; Molina, Tuazon, & Larman, 2015).

As interações de substâncias tóxicas com as bactérias bioluminescentes causam uma diminuição da respiração celular e conseqüentemente a inibição da produção de luminescência. As substâncias tóxicas podem causar a inibição de algumas enzimas ou interferirem nos processos de transporte através da membrana, levando a um abrandamento das reações de produção de energia da célula e, conseqüentemente, uma redução na emissão de bioluminescência (Boynton, 2009; Girotti *et al.*, 2002; Shaikh & Prabhu, 2017).

## 4.2 Principais aplicações

Uma das aplicações dos organismos bioluminescentes é a detecção de poluentes tóxicos na água. Os métodos de detecção baseados na bioluminescência são adequados para uma triagem preliminar de substâncias tóxicas presentes no meio ambiente. Este sistema é sensível a muitos compostos tóxicos e utiliza uma técnica rápida e simples. Apesar da sua simplicidade, pode representar o real impacto de todos os produtos químicos presentes numa dada amostra ou ecossistema (Gomes, 2007; Halmi *et al.*, 2014).

Os testes ecotoxicológicos são também muito utilizados para avaliação de descargas de águas residuais urbanas e industriais no ambiente (William *et al.*, 1993).

Em alguns países, tais como os EUA, Canada, Austrália, Nova Zelândia, e alguns países Europeus, este tipo de testes são mesmo utilizados na monitorização de efluentes, desde os anos 90, constituindo a base da legislação de descargas de águas residuais. É provável que os testes ecotoxicológicos venham a ter um importante papel na regulamentação do setor da água, num futuro próximo.

## 5. Compostos tóxicos e águas de consumo

### 5.1 As Cianobactérias

As cianobactérias são organismos cujo nome deriva da palavra grega κυανός (kyanós) “azul”, sendo também conhecidas e chamadas algas azuis ou algas verde-azuladas, pois estas possuem características comuns tanto às algas como às bactérias (Muro, 2014; Sieroslawska, 2014; WHO, 2003).

O filo Cyanobacteria (cianobactérias), ou divisão Cyanophyta (cianófitas) são bactérias fotossintéticas capazes de realizar as fases claras e escuras da fotossíntese devido a possuir clorofila *a* na sua estrutura. Além da clorofila *a*, estas possuem também outros pigmentos, como o caroteno, a xantofila, a ficocianina azul e a ficoeritrina vermelha (Carpenter & Khiari, 2016; Ettoumi *et al.*, 2011; Funari & Testai, 2008; Petrachi, 2015; WHO, 2003). As cianobactérias podem ser encontradas em ecossistemas aquáticos ou terrestres, incluindo regiões árticas e tropicais (Rutkowska *et al.*, 2019).

A maioria das cianobactérias são fotoautotróficas aeróbias, que requerem apenas água, dióxido de carbono, nutrientes inorgânicos e luz para sobrevivência, mas outras têm

propriedades heterotróficas e podem sobreviver por longos períodos em completa escuridão. Algumas espécies também são capazes de fixar o azoto atmosférico, através de estruturas especializadas chamadas de heterocistos, produzindo compostos de azoto inorgânicos para sintetizar biomoléculas contendo azoto, tais como ácidos nucleicos e proteínas. As cianobactérias podem ser encontradas em formas filamentosas unicelulares, colônias ou em agregações multicelulares. Estas bactérias são Gram-negativas, embora a camada de peptidoglicano seja mais espessa do que a maioria das bactérias Gram-negativas (Ettoumi *et al.*, 2011). Além disso, algumas espécies podem regular a sua flutuabilidade, usando vesículas de gás especializadas e, assim, mover-se verticalmente dentro da coluna de água para otimizar o crescimento (Muro, 2014).

As cianobactérias têm a capacidade produzir florescências sazonalmente, sob condições favoráveis, em vários ambientes naturais (pH ideal, disponibilidade de nutrientes, luz, temperatura), incluindo água salgada, salobra ou doce, nascentes frias e quentes, e em ambientes onde não existem outras microalgas, incluindo areia do deserto, cinzas vulcânicas e rochas. As cianobactérias também formam associações simbióticas com animais e plantas aquáticos (Codd, 2000; Ettoumi *et al.*, 2011; Funari & Testai, 2008; Sieroslawska, 2014).

As influências humanas como a urbanização, aumento da população e agricultura contribuem para a incidência de florescências (*blooms*) de cianobactérias (Carpenter & Khiari, 2016).

## 5.2 Cianotoxinas

As cianobactérias podem produzir uma ampla gama de compostos bioativos, que poderão ter efeitos benéficos ou terapêuticos, ou ainda efeitos tóxicos. Entre estas substâncias, encontram-se toxinas que podem representar uma ameaça direta não apenas para os organismos que vivem nos mesmos ecossistemas, mas também para os animais terrestres e humanos (Chorus & Bartram, 1999; Sieroslawska, 2014).

A crescente eutrofização de muitas origens de água e de áreas recreativas, pelo escoamento de detergentes e fertilizantes, promove o aumento de nutrientes e a proliferação de cianobactérias potencialmente perigosas. Algumas cianotoxinas estão principalmente presentes na célula cianobacteriana (cianotoxinas intracelulares), enquanto outras são libertadas da célula na água circundante (cianotoxinas extracelulares) (Ettoumi *et al.*, 2011).

Quando as células de cianobactérias sofrem lise ou morrem, as toxinas são normalmente libertadas para a água. Além disso, as cianotoxinas podem acumular-se na cadeia trófica, por exemplo, em moluscos bivalves e peixes, em níveis que, embora não sejam tóxicos para os mesmos, podem levar, por bioacumulação, a níveis consumidos por seres humanos que estão acima do nível recomendado de consumo (Lindner *et al.*, 2004).

Nem todas as cianobactérias produzem toxinas, mas o enriquecimento de nutrientes e poluentes do escoamento antropogénico nos recursos hídricos favorece o crescimento de cianobactérias e a formação de *blooms* prejudiciais, tornando-se um problema global (Carpenter & Khiari, 2016; Muro, 2014).

Existem vários métodos laboratoriais para a deteção, identificação e avaliação de efeitos biológicos das cianotoxinas. Estes métodos incluem técnicas analíticas que permitem especificar as concentrações precisas de uma determinada toxina, bem como testes baseados em organismos vivos, para determinar o impacto toxicológico de uma única substância ou de uma mistura de compostos (Sieroslawska, 2014).

Os ensaios de bioluminescência, os quais envolvem a bactéria *Aliivibrio fischeri*, são utilizados como uma forma rápida, reprodutível e relativamente económica de avaliação da toxicidade de uma amostra. Desde a sua apresentação, o ensaio Microtox® FX, baseado na bioluminescência de *Aliivibrio fischeri*, tem sido aplicado para avaliar a toxicidade de uma ampla gama de substâncias incluindo as cianotoxinas (Balaji *et al.*, 2019).

A presença de florescências de cianobactérias nocivas em águas superficiais destinadas ao consumo e uso recreativo é um problema emergente em todo o mundo. De facto, nas últimas décadas, a incidência destes fenómenos tem aumentado (Petrachi, 2015).

A exposição humana a cianotoxinas, pode ocorrer por diferentes formas (Tabela 1)

Tabela 1 - Exposição humana a cianotoxinas

Fonte: (Codd, 2000;EPA, 2015)

<b>Exposição</b>	<b>Meio</b>
<b>Oral</b>	Água (potável ou de uso recreativo) Alimentos (produtos da pesca)
<b>Pulmonar</b>	Aerossóis Água utilizada em atividades recreativas Água de banhos domésticos (duche)
<b>Cutânea</b>	Água utilizada em atividades recreativas Água de banhos domésticos (duche)
<b>Hemodialise</b>	Água utilizada em hemodialise

A exposição às cianotoxinas através da água potável pode ocorrer se houver toxinas na origem de água e as tecnologias de tratamento de água existentes não forem projetadas para a remoção destas toxinas (Codd, 2000; EPA, 2015).

As cianotoxinas podem ser subdivididas de acordo com dois critérios, o primeiro baseado no seu mecanismo de ação em vertebrados terrestres, especialmente mamíferos: hepatotoxinas, neurotoxinas, dermatotoxinas e o segundo de acordo com sua estrutura química: peptídeos cíclicos, alcaloides lipopolissacarídeos (Muro, 2014).

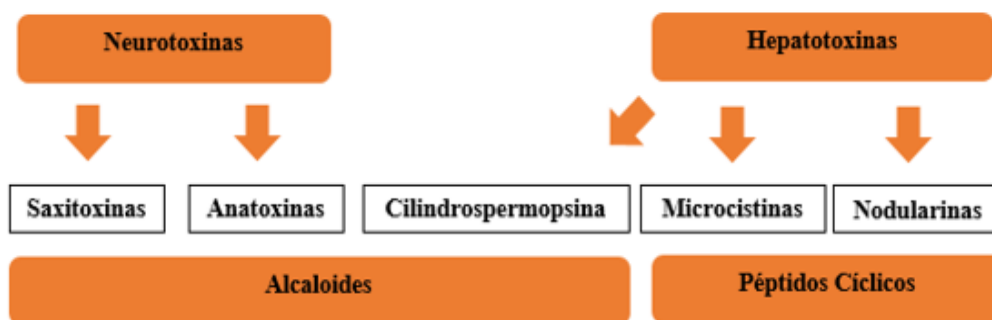


Figura 2 - Classificação das cianotoxinas.  
Fonte: Adaptado de Muro, 2014.

Os lipopolissacarídeos, são os principais produtores de dermatotoxinas as quais encontram-se nos géneros *Lyngbya*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Gloeotrichia* e *Schizothrix* (Lindner *et al.*, 2004; Vasconcelos, 1995).

## 5.2.1 Neurotoxinas

### 5.2.1.1 Anatoxinas

As anatoxinas são neurotoxinas solúveis em água as quais são produzidas principalmente por *Anabaena* genus bem como por outros géneros, incluindo *Plantkothrix*, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum* and *Phormidium*. Estas toxinas podem ser classificadas em 3 categorias: anatoxina-a (Figura 3A), a sua estrutura homologa homoanatoxina-a (Figura 3B) e a anatoxina-a(s) (Figura 3C) (Mello *et al.*, 2018).

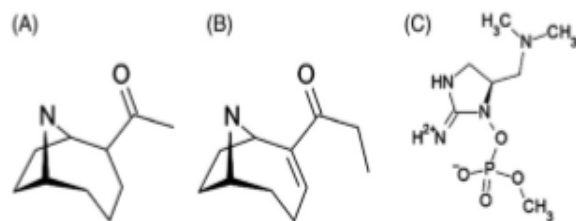


Figura 3 - Estrutura química da anatoxina-a, homoanatoxina-a e anatoxina-a(s)  
 Fonte: Mello *et al.*, 2018

Na água, a anatoxina-a é relativamente estável em condições neutras e ácidas, no entanto, sofre rápida degradação fotoquímica pela luz solar e sua decomposição é acelerada por condições alcalinas (Testai *et al.*, 2016).

O principal alvo desta neurotoxina são os recetores nicotínicos de acetilcolina (nAChRS) neuronais (proteínas integrais) da membrana os quais desempenham um papel-chave na transmissão de sinal entre os neurónios e o sistema nervoso central e periférico (Devic *et al.*, 2002).

A anatoxina-a liga-se aos recetores de acetilcolina no sistema nervoso central (SNC) e periférico e em junções neuromusculares causando estimulação contínua com paragem da transmissão eléctrica. A morte pode ocorrer por paralisia muscular e asfixia. A homoanatoxina-a é um potente agente bloqueador neuromuscular enquanto a anatoxina-a(s), organofosforado natural, inibe a atividade da acetilcolinesterase somente no sistema nervoso periférico. Os sinais clínicos da ingestão por anatoxina-a incluem convulsões, tremores musculares, paralisia, paragem respiratória e, por vezes, a morte (Neilan *et al.*, 2013).

### 5.2.1.2 Saxitoxina

As saxitoxinas pertencem ao grupo dos alcaloides neurotóxicos e são conhecidas também como “toxinas paralisantes de mariscos” ou *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP), tendo sido primeiramente isoladas em dinoflagelados marinhos, responsáveis pela ocorrência de marés vermelhas. Estas toxinas são produzidas também por cianobactérias dos géneros *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix*, *Lyngbya* e *Aphanizomenon* (Neilan *et al.*, 2013).

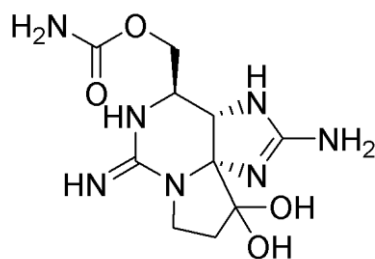


Figura 4 - Estrutura molecular da saxitoxina

Fonte: <https://www.safetysecuritymagazine.com/articoli/quali-rischi-reali-nella-minaccia-bioterroristica-per-mezzo-di-tossine-i-casi-di-ricina-e-sassitossina/>

As toxinas paralisantes interferem na comunicação entre os neurónios e as células musculares. Estas inibem a condução nervosa por bloqueio dos canais de sódio, afetando a permeabilidade ao potássio ou à resistência das membranas conduzindo desta forma uma paragem da transmissão do impulso nervoso com conseqüente paralisção muscular e respiratória. Os sintomas de intoxicação com saxitoxina são sensação de queimadura, dormência da pele e membros. Outros sintomas podem incluir vomito, diarreia, suor e salivação excessiva e dores de cabeça (Mello, *et al.*, 2018).

## 5.2.2 Hepatotoxinas

### 5.2.2.1 Microcistinas

O tipo mais comum de intoxicação provocada por ingestão de cianotoxinas é proporcionado pelas hepatotoxinas. As espécies já identificadas como produtoras dessas hepatotoxinas estão incluídas nos géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* (Agoas, 2008). A maioria das hepatotoxinas (todos os heptapeptídeos cíclicos) são microcistinas. As três principais isoformas produzidas pelas cianobactérias são microcistina-LR (a mais toxica), microcistina-RR e microcistina-YR, que apresentaram resíduos de leucina (L), tirosina (Y) ou arginina (R). Estas toxinas são responsáveis pela destruição da estrutura interna do fígado resultante em choque hipovolemico e hepatomegalia (Mello *et al.*, 2018).

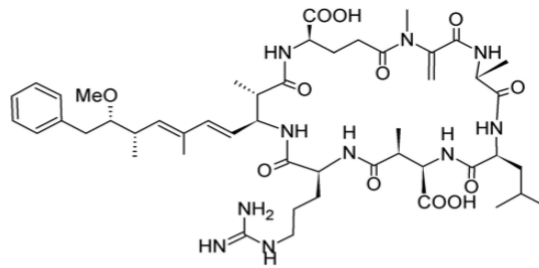


Figura 5 - Estrutura química da microcistina-LR  
 Fonte: Mello, Braidy, Marçal *et al.*, 2018

A presença destas toxinas nas águas, mesmo em concentrações baixas, levanta grandes preocupações devido à sua toxicidade aguda e subletal. De modo a minimizar a exposição pública, a OMS adotou o valor guia para águas de abastecimento público de 1 µg/L para a Microcistina-LR, uma das variantes mais comuns.

O Decreto-Lei nº 152/2017 de 7 de Dezembro também estabelece o valor paramétrico das microcistinas LR, de 1 µg/L em águas para o consumo humano. No referido Decreto-Lei na Nota 12 parte III é mencionado que este parâmetro deve ser determinado a saída da estação de tratamento de água, quando há suspeitas de eutrofização da massa de água superficial.

### 5.3 Cloritos e Cloratos

A desinfecção da água é de importância crucial para o fornecimento de água segura, livre de riscos microbiológicos. A destruição de microrganismos patogênicos é essencial e frequentemente envolve o uso de agentes desinfetantes químicos durante as várias fases de potabilidade, reduzindo desta forma a incidência de doenças transmissíveis pela ingestão de água contaminada, promovendo também a inibição da formação de biofilmes (Al-Outom *et al.*, 2016; Kettliz *et al.*, 2016; WHO, 2017).

Os desinfetantes mais comuns são oxidantes como o cloro, ozono, cloraminas e o dióxido de cloro (WHO, 2016; Kettliz *et al.*, 2016).

Em geral, o uso de desinfetantes químicos no tratamento de água pode produzir subprodutos de desinfecção os quais podem colocar em risco a saúde humana (Cisternas, 2007).

No entanto, os riscos para a saúde poderão ser comparativamente menores que os riscos associados à desinfecção inadequada, e é importante que a eficácia da desinfecção não seja comprometida na tentativa de controlar esses subprodutos (Health Canada, 2008; WHO, 2017).

Os subprodutos de desinfecção são compostos orgânicos e inorgânicos que se formam devido à reação entre os oxidantes / desinfetantes utilizados nos processos de purificação da água e compostos de vários tipos naturalmente presentes na água a ser tratada.

Os principais subprodutos da desinfecção, quando é utilizado o dióxido de cloro, são os cloritos ( $\text{ClO}_2^-$ ) e cloratos ( $\text{ClO}_3^-$ ); entre estes, o íon clorito, é uma grande preocupação do ponto de vista toxicológico. Um dos processos mais comuns para a geração de dióxido de cloro é aquele que no seu procedimento utiliza soluções de clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ) e de gás Cloro ( $\text{Cl}_2$ ). Uma das desvantagens deste processo, é a possibilidade de geração de cloro livre, o qual em excesso, pode resultar em grandes concentrações de cloritos, enquanto a sua ausência favorece a formação de cloratos (Health Canada, 2008; Rizzo, Belgiorno, & Casale, 2004).

As características principais que afetam a formação de íões cloritos e cloratos na água para consumo humano incluem a dose de aplicação de dióxido de cloro, temperatura da água, pH, exposição a luz e sistema de distribuição para a manutenção residual (Al-Outom *et al.*, 2016).

Os íões cloritos e cloratos podem ser considerados poluentes emergentes, uma vez que em alguns estados europeus foi aplicada uma regulação específica durante alguns anos: estes parâmetros, para o qual a OMS identificou nas suas orientações (OMS/WHO, 2017), um valor de referência de 0,7 mg / L, enquanto a *Environmental Protection Agency* (EPA) dos EUA, reporta um limite de 1,0 mg / L (Mobilia, Hutchison, & Zilles, 2017). Este valor deve ser tão baixo quanto possível sem comprometer a eficácia da desinfecção e deve apenas ser controlado quando é utilizado o dióxido de cloro no processo de tratamento de água Decreto-Lei nº 152/2017 de 7 de Dezembro (Mobilia, Hutchison, & Zilles, 2017).

### 5.3.1 Efeitos de cloritos e cloratos sobre a saúde

A água destinada ao consumo é a principal fonte de exposição de cloritos e cloratos para seres humanos. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) estabeleceu que estes produtos são associados ao aumento de risco cancerígeno (Rizzo, Belgiorno, & Casale, 2004).

Os efeitos dos cloritos e cloratos na saúde humana apresentam semelhanças aos dos nitritos, provocando principalmente danos oxidativos nos glóbulos vermelhos (Mobilia, Hutchison, & Zilles, 2017).

Estes podem induzir respostas hematológicas em exposição aguda ou subcrônica, que podem resultar em danos oxidativos a eritrócitos, levando a meta-hemoglobinemia e anemia hemolítica (Al-Outom *et al.*, 2016).

## 6. Sistema Microtox® FX

Um exemplo muito comum de um bioensaio comercial que utiliza bactérias bioluminescentes é o teste de toxicidade biológica Microtox® FX. Este foi desenvolvido nos EUA no final da década de 1970 e há muito tempo tornou-se uma alternativa viável aos testes convencionais com peixes e invertebrados, como uma ferramenta de triagem para o controle de qualidade de amostras líquidas (Ajuzieogu, Odokuma, & Chikere, 2018). Este é um teste de toxicidade padrão com uma única espécie *Aliivibrio fischeri* (NRRL B-11177), utilizando um sistema de exposição estático e com um controle negativo por ensaio.

### 6.1 O Sistema Microtox® FX, um simples aliado em situações de emergência

Atualmente, em todo o planeta ocorrem cada vez mais eventos naturais catastróficos (terramotos, furações etc.) e mais atos de violência (terrorismo) colocando em riscos a saúde e a vida das populações. Entre as várias formas de ações terroristas é de particular importância o bioterrorismo, que na definição consolidada, constitui o uso intencional de vírus, bactérias, fungos ou toxinas de organismos vivos para produzir efeitos patológicos ou morte de seres humanos, animais ou plantas, através de diferentes métodos de propagação, tais como a contaminação pelo meio ambiente, água ou alimentos (Barras & Greub, 2014; Ottaviani *et al.*, 2005).

Essa ameaça, há muito tempo ignorada, representa hoje um risco significativo não só para a segurança nacional de todos os países, mas também para a saúde de todos os cidadãos. A ameaça do bioterrorismo está a aumentar como resultado do desenvolvimento das capacidades técnicas, a rápida expansão da indústria global de biotecnologia e o crescimento de redes de grupos terroristas que manifestaram interesse neste tipo de atos (Madad, 2014).

Os sistemas de abastecimentos e de distribuição de água, apresentam pontos, que podem ser suscetíveis a ataques terroristas e/ou eventos acidentais devido ao papel essencial que a água desempenha em cada segmento de nossa sociedade (Barras & Greub, 2014; Meinhardt, 2005; Ottaviani *et al.*, 2005).

É, por isso, necessário estabelecer estratégias e medidas efetivas para a prevenção e controlo de potenciais ataques terroristas que tenham como objetivo a disseminação de agentes tóxicos transmissíveis após a ingestão de produtos contaminados, dentro os quais e primeiramente, a água destinada a consumo humano (Ottaviani *et al.*, 2005).

O equipamento Microtox® FX, devido à sua fácil utilização e a sua rapidez na obtenção de respostas a deteção de compostos tóxicos pode ser considerado um ótimo aliado em situações de emergência, seja no caso de ataques bioterroristas, bem como em situações de desastres naturais, com o fim de salvaguardar a água e o ambiente.

## 7. Objetivo da dissertação

A presente dissertação teve como objetivo principal a implementação de um método de ensaio para a avaliação da toxicidade de padrões tóxicos e amostras, no laboratório de microbiologia da AdA. Neste tipo de ensaio, utilizado para a deteção de compostos tóxicos que podem acidentalmente, ou intencionalmente, contaminar as origens de água, é utilizado como organismo teste a bactéria bioluminescente *Aliivibrio fischeri*. Os ensaios foram desenvolvidos num dos mais modernos equipamentos produzidos pela *ModernWater*, o Microtox® FX, o qual permite desenvolver ensaios com respostas rápidas (entre 5 a 30 min) e precisas, podendo ser um ótimo aliado em situações de emergência. Este método permitiu calcular as concentrações efetivas 50 % (CE<sub>50</sub>), 20 % (CE<sub>20</sub>) e 10 % (CE<sub>10</sub>) ou seja a concentração de uma substância dissolvida em meio aquoso que é capaz de provocar efeitos agudos em 50 %, 20 % ou 10 % dos organismos.

# CAPÍTULO III- Materiais e Métodos: Determinação da toxicidade de subprodutos de desinfecção da água e de cianotoxinas em bactérias bioluminescentes

## Síntese

Neste capítulo encontram-se descritos os materiais utilizados para a realização dos ensaios bem como o procedimento experimental

## 8. Equipamento Microtox® FX

### 8.1 Constituição do Equipamento

Para determinar a toxicidade de padrões de substâncias tóxicas, e amostras, utilizou-se um analisador de toxicidade Microtox® FX (versão portátil da *Modernwater*). Este equipamento é constituído por um visor cristal líquido (LCD) e por quatro teclas de membrana, nomeadamente o ON / OFF, seta para cima, seta para baixo e a tecla ENTER (Figura 6). As teclas que representam as setas são utilizadas para aceder aos menus operacionais. Na parte traseira do equipamento, encontram-se a entrada para o carregador e para o cabo USB (MODERNWATER, 2017).



Figura 6 - Equipamento Microtox® FX (versão portátil)

Fonte: Microtox® FX-The Definitive Solution for Rapid Toxicity Testing (Brochure)

No display encontra-se indicada a temperatura do poço de leitura (é recomendado efetuar análises entre os 10 °C e os 28 °C), a carga do equipamento e as funções que o mesmo permite (Figura 7).

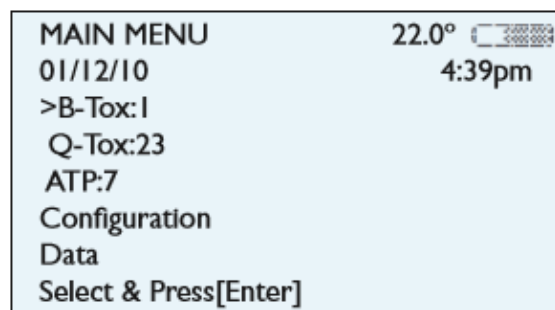


Figura 7 - Menu principal e funções do equipamento

Fonte: MODERNWATER, Microtox® FX Analyser - User Manual, 2017

No interior do equipamento este possui vários componentes (Figura 8): a) Tubo fotomultiplicador, sendo este o dispositivo responsável pela detecção de luz. Este, mede os fótons presentes nas cuvettes colocadas no poço de leitura; b) obturador de segurança e sensor ótico. O obturador de segurança fecha automaticamente para proteger o tubo fotomultiplicador da luz ambiente sempre que a tampa da câmara de amostra estiver aberta. O sensor ótico sinaliza a posição do obturador e remove a energia do tubo fotomultiplicador sempre que a tampa estiver aberta; c) câmara de amostra a qual contém a cuvette sob medição e d) tampa, a qual é utilizada para fornecer uma cobertura à prova de luz para a câmara de amostras (MODERNWATER, 2017).

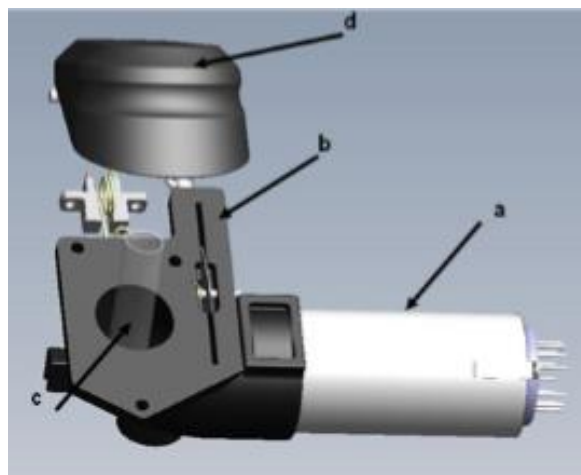


Figura 8 - Componentes internos ao Microtox® FX  
Fonte: MODERNWATER, Microtox® FX Analyser - User Manual, 2017

## 8.2 Princípio de funcionamento

O sistema de teste Microtox® FX, que utiliza a bactéria luminescente *Aliivibrio fischeri* NRRL-B-11177, foi projetado para testes rápidos de toxicidade (*screening test*) permitindo realizar ensaios de campo ou ensaios em laboratório, sendo este teste recomendado pela norma ISO 11348-3:2007. Os *vials* de reagente SOLO, os quais contêm os organismos, são fornecidos pela *ModernWater* liofilizados e congelados, para manter a sensibilidade e estabilidade dos mesmos. É recomendada a conservação entre os -20 °C e os -25 °C (até um ano) ou a 4 °C (até aproximadamente 4 semanas).

Devido ao seu largo espectro de sensibilidade para vários compostos orgânicos e inorgânicos, este método tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta de rastreio para avaliar a toxicidade de vários tipos de amostras como as de: água potável com possível

contaminação, águas superficiais ou subterrâneas e amostras de sedimentos e solos (Costa *et al.*, 2008; Niemirycz *et al.*, 2007).

Este método baseia-se na medição das alterações na emissão de luz da bactéria marinha não patogênica, *Aliivibrio fischeri*, após exposição a substâncias químicas simples ou amostras ambientais complexas durante um período que varia entre os 5 e os 30 min. O grau de mudança na saída de luz em relação a um controle é diretamente proporcional ao nível de toxicidade presente nas amostras em teste. Quando os compostos tóxicos entram em contato com as bactérias luminescentes, ocorre quebra do processo respiratório afetando desta forma a via metabólica e resultando na inibição da enzima luciferase e consequentemente da luminescência (Ajuzieogu, Odokuma, & Chikere, 2018; Costa *et al.*, 2008).

A alteração na saída de luz e a concentração do agente tóxico produzem uma relação dose-resposta. A toxicidade da amostra vem expressa em termos de CE<sub>50</sub>, que representa a concentração efetiva na qual ocorre uma redução de 50 % da emissão de luz emitida pelas bactérias após um determinado período de tempo (Gomes, 2007).

Este equipamento apresenta dois tipos diferentes de testes de toxicidade, nomeadamente o teste Basic toxicity test (B-tox), o teste Quick toxicity (Q-tox) e ainda a possibilidade de medir a adenosina trifosfato (ATP). Estas funções medem a luminescência, mas de diferentes processos biológicos. A função TOX (Q-Tox ou B-Tox) efetua uma leitura da luz produzida por bactérias luminescentes (*Aliivibrio fischeri*) após a exposição a uma amostra, comparando-a com a emissão de luz de um controle (reagente em branco). O grau ou percentagem de perda de luz (indicação de inibição metabólica nos organismos teste) indica a toxicidade relativa da amostra. A função ATP mede a luz produzida por uma interação entre os reagentes de ATP e a luciferina / luciferase (MODERNWATER, 2017).

O teste B-tox é utilizado quando se querem obter resultados com uma maior precisão. Este, de forma diferente do teste Q-tox, permite realizar leituras da bactéria reidratada (Microtox Reagent SOLO) antes da introdução da amostra (leitura do tempo 0). O teste B-tox ainda apresenta três métodos de análise, nomeadamente o teste B-tox 2 % (análise de amostras com elevada toxicidade como águas residuais industriais ou urbanas), o teste B-tox 45 % (análise de amostras de média toxicidade, como o caso de águas pluviais) e o teste B-tox 81,9 % (análise de amostras de baixas toxicidade, como amostras de águas tratadas). O teste Q-tox é utilizado quando devem ser testadas rapidamente várias amostras ou quando é necessário somente estimar o nível de toxicidade de uma ou várias amostras (MODERNWATER, 2017).

Na Figura 9, está representado, de forma esquemática, o procedimento experimental utilizado ao longo dessa experiência.

A linha de cuvettes A é utilizada somente para as diluições das amostras (estas cuvettes não passarão pela leitura no equipamento Microtox® FX), enquanto na linha de cuvettes B, encontra-se o reagente previamente reidratado durante 15 min. A linha de cuvettes B será lida no equipamento duas vezes. A primeira leitura será considerada o tempo “0” ou seja a luminescência emitida pelas bactérias sem estar em contato com a amostra (controlo), enquanto a segunda leitura (durante um tempo de  $t = 5, 15$  ou  $30$  min) será utilizada para determinar a perda luminescência pela bactéria após do contato com a amostra.

O mesmo procedimento se aplica quando queremos estudar mais ou menos de 4 concentrações como representado na imagem.

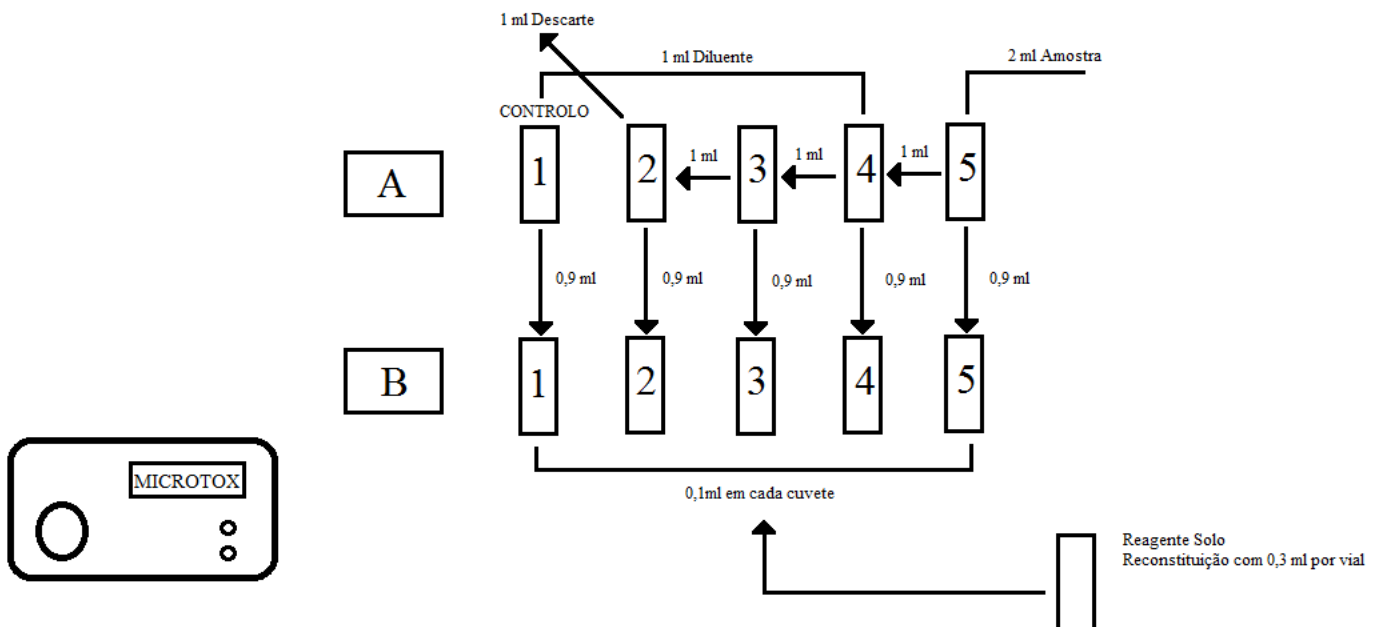


Figura 9 - Representação esquemática do funcionamento do equipamento Microtox® FX

## 8.2.1 Tratamento de Resultados

### 8.2.1.1 Cálculo da % Efeito

O equipamento Microtox® FX, após leitura de cada cuvette, apresenta um resultado relativo a % de efeito (% E) ou seja a % inibição da luminescência de uma determinada substância após do contato com a bactéria. A fórmula utilizada pelo próprio equipamento para calcular a % E (perda ou ganho de luminescência), encontra-se descrito no manual de utilizador, a qual para o teste B-Tox é a seguinte:

$$\left\{1 - \left[\frac{(S_t \times C_0)}{(S_0 \times C_t)}\right]\right\} \times 100$$

onde,  $C_0$  corresponde a leitura de luminescência (contagem dos fotões) do controlo no tempo=0 e  $C_t$  a leitura da luminescência (contagem dos fotões) do controlo no tempo= 5,15 ou 30 min;  $S_0$  é a leitura da luminescência (contagem fotões) da amostra no tempo= 0 e  $S_t$  a leitura da luminescência (contagem dos fotões) da amostra quando o tempo=5,15 ou 30 min.

O cálculo da % E (inibição da luminescência) apresenta valores positivos os quais devem ser reportados em % positiva, enquanto o cálculo da % E (ganho de luminescência) apresenta valores negativos, devendo estes últimos ser reportados com % positiva (MODERNWATER, 2017).

#### 8.2.1.2 Cálculo da Razão dos Brancos

Após cada ensaio, foi calculada a razão dos brancos (RB) para validar o teste, onde:

$$RB(t) = \frac{I(t)_B}{I(0)_B}$$

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  $t=5,15$  ou 30 min. São aceites, como validos, os valores  $0,6 < RB < 1,3$  (ISO 11348-3:2007).

#### 8.2.1.3 Cálculo da Intensidade corrigida

Este valor, calculado diretamente pelo equipamento, 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:

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

#### 8.2.1.4. Cálculo do valor da função Gama

Para poder calcular a  $CE_{50}$ , o programa do equipamento Microtox® FX, calcula o valor da função gama (formula seguintes) a qual é definida como a razão da luz “perdida” em relação à luz remanescente, após as bactérias terem sido expostas à amostra (Tabela 2).

$$\Gamma = \left| \left( \frac{1}{(\%E-1)} \right) \right| - 1$$

Tabela 2 - Exemplo do cálculo do valor  $\Gamma$  pelo Software da *Modernwater*

Diluições	Concentrações (mg/L)	Gama	% Efeito
<b>Controlo</b>	0	-	-
<b>1</b>	0,64	0,053	5 %
<b>2</b>	1,28	0,099	9 %
<b>3</b>	2,56	0,176	15 %
<b>4</b>	5,12	0,299	23 %
<b>5</b>	10,24	0,538	35 %
<b>6</b>	20,48	0,852	46 %

Com as concentrações de contaminantes testadas e as % E, é possível construir um gráfico dose-resposta, onde o eixo das abcissas apresenta as concentrações e no eixo das ordenadas as % E (MODERNWATER, 2017). A curva típica dose-resposta para o teste Microtox® FX é ilustrada na Figura 10.

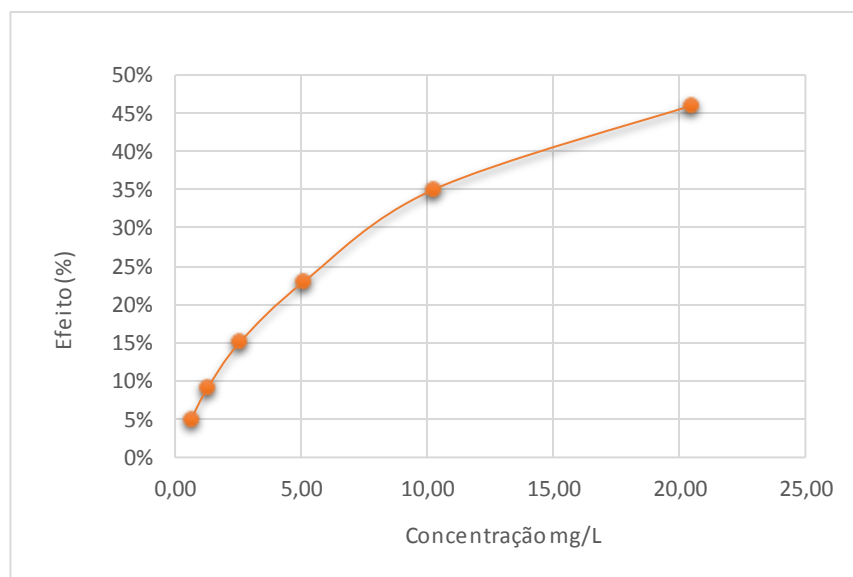


Figura 10 - Exemplo de uma curva dose resposta (Software Microtox)

Através do cálculo dos valores  $\Gamma$  (gama) e das concentrações é possível converter a curva da figura anterior para uma função linear, ao fim de calcular a  $CE_{50}$  (Figura 11).

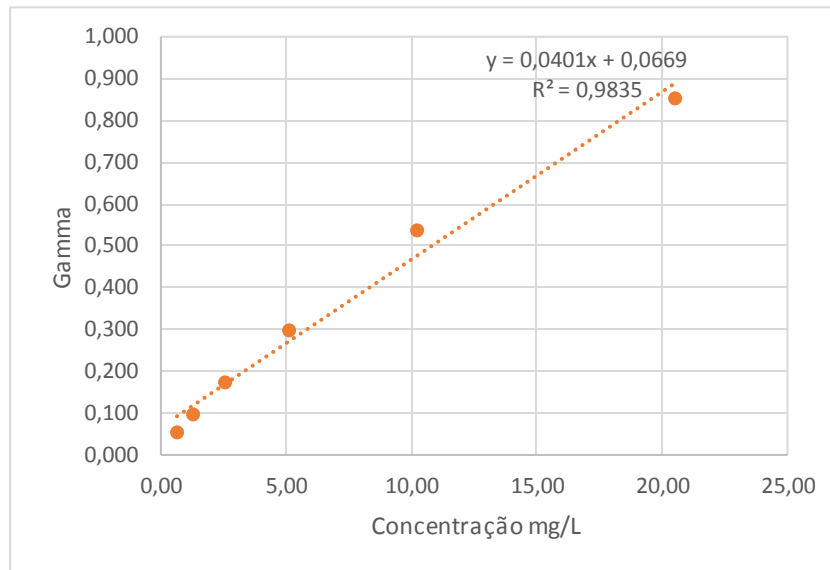


Figura 11 - Exemplo do fator Gama por concentração

A partir da equação da reta,  $Y=ax+b$  (exemplo do gráfico  $Y=0,0401x+0,0669$ ), o Software Microtox® Fx, calcula a  $CE_{50}$ , através da seguinte fórmula:

$$CE_{50} = \frac{(1-b)}{a}$$

Outro método utilizado para determinar a  $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$  e  $CE_{10}$  de cada substância é o método Probit, muito utilizado em ecotoxicologia. Com este modelo é possível transformar os dados da curva dose-resposta (curva parabólica) numa função matemática conhecida, ou esperada, antes dos valores da  $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$  e  $CE_{10}$  serem estimados.

Inicialmente, foram calculados os  $\text{Log}_{10}$  das concentrações, seguidamente as % E foram convertidas em unidades Probit utilizando a tabela de transformação de % a Probit (Tabela 3).

Tabela 3 - Tabela para transformação de % E em unidades Probit  
 Fonte: <http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/Probit-Analysis.htm>

0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.30	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Por exemplo, a um efeito de 32 % irá corresponder um valor probit de 4,53.

Após ter calculado os Log<sub>10</sub> das concentrações de uma determinada substância testada e após ter convertido as % E obtidas (através da Tabela 3), é possível criar gráficos como o exemplo da Figura 12.

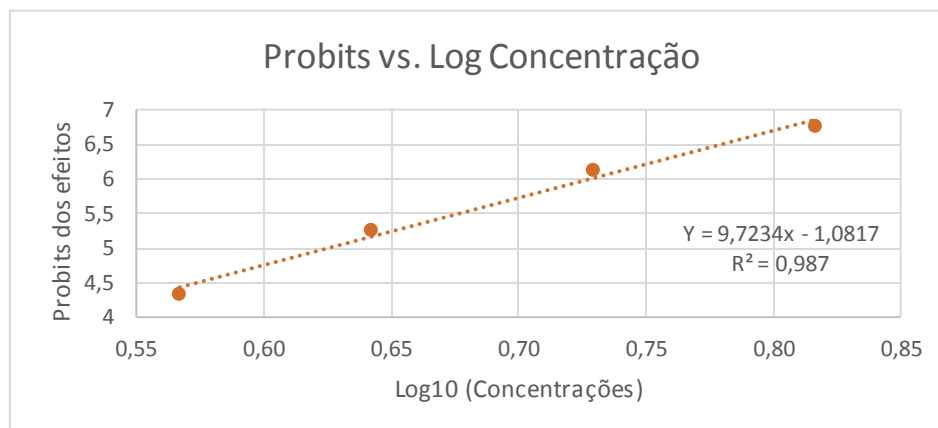


Figura 12 - Probits das % E vs. log das concentrações de uma determinada substância

Através da equação da reta ( $Y = ax + b$ ) será possível calcular o valor da CE<sub>50</sub>, CE<sub>20</sub> e CE<sub>10</sub> substituindo os respectivos valores probit (Tabela 3) no “Y”. O valor da CE<sub>50</sub>, CE<sub>20</sub> e CE<sub>10</sub> é calculado a partir de 10<sup>x</sup>.

Para poder confirmar os resultados das CE<sub>50</sub> obtidos foi também utilizado o método estatístico. Foram inicialmente calculadas as % E remanescente da bactéria *Aliivibrio fischeri* para todas as concentrações de todos os compostos estudados.

Para cada ensaio foram criados gráficos (Apêndice V), e através das equações de 2º grau dos mesmos foi possível calcular a CE<sub>50</sub> de todos os compostos.

### 8.3 Tratamento estatístico dos resultados

Com o objetivo de identificar a presença de eventuais diferenças significativas nos resultados das  $CE_{50}$  obtidas pelos três diferentes métodos, foi realizada uma análise de variância univariada com o método da ANOVA. As diferenças, foram consideradas estatisticamente significativas com um  $p < 0,05$  (teste de Tukey's). Estas análises foram realizadas com o auxílio do Software Microsoft Excel.

### 8.4 Principais vantagens e desvantagens em relação a outros ensaios de toxicidade

O mais recente equipamento Microtox® FX Analyzer (versão portátil do modelo Microtox® 500) produzido pela *ModernWater*, apresenta diversas vantagens. Este é capaz de medir a toxicidade aguda de amostras e detetar contaminantes biológicos mais rapidamente, pois após a exposição a uma pequena amostra, o organismo responde rapidamente (entre 5, 15 e 30 minutos) a um vasto número de substâncias que podem acidentalmente ou intencionalmente contaminar a água potável ou as águas residuais. Este equipamento, sendo portátil, pode ser facilmente adaptado a ensaios de campo em locais como lagos, rios, oceanos, reservatórios, tanques de armazenamento ou longo de todo o seu sistema de distribuição de água potável, em resposta a qualquer tipo de emergência. Quase não ocupa espaço laboratorial e não requer técnicos muito especializados, é relativamente económico pois requer apenas 2,0 ml de amostra e as bactérias são fáceis de obter e armazenar. Pode ser utilizado para prever os resultados de outros bioensaios e testes químicos. É ainda um teste relativamente seguro, tanto do ponto de vista de segurança dos técnicos, como do ambiente, dado que, à exceção das substâncias de referência, praticamente não requer o uso de reagentes perigosos (MODERNWATER, 2019).

Segundo Costa *et al.*, 2008, apesar destas vantagens, este é um teste bastante criticado por empregar uma bactéria marinha de pouco significado ecológico. Por essa razão, normalmente, este teste é utilizado para medir toxicidade aguda de efluentes como parte de uma bateria de ensaios de toxicidade utilizando diferentes organismos indicadores. Como em qualquer metodologia analítica, também podem ocorrer inconsistências nos resultados, em particular devido a diferentes temperaturas, manuseio inadequado das bactérias, diluições imprecisas, diferentes tempos de exposição e outros erros humanos.

## 8.5 Reagentes e materiais Microtox® FX

### 8.5.1 Solução Diluente e Reconstituente

O diluente é uma solução de cloreto de sódio a 2 % (não tóxico) utilizado para a reconstituição da bactéria liofilizada (reagente SOLO), para realizar diluições das amostras e como também como controlo de amostra não tóxica. Os *vials* após a sua reconstituição do reagente SOLO, devem ser utilizados num prazo máximo de 30 minutos para manter a atividade bacteriana (MODERNWATER, 2017).

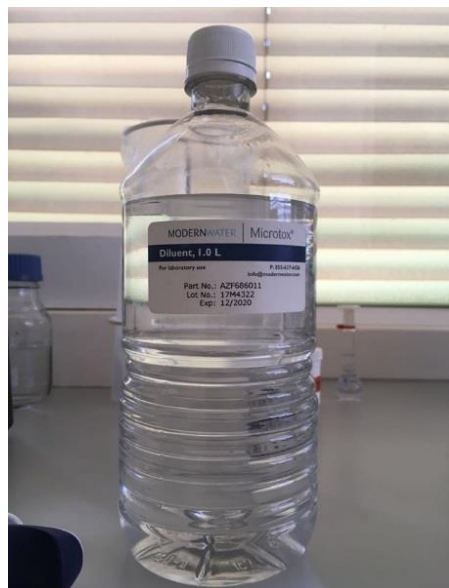


Figura 13 - Solução diluente Microtox® FX

### 8.5.2 Solução de ajuste osmótico

A solução de ajuste osmótico é uma solução de cloreto de sódio 22 % não tóxica. Esta é utilizada para introduzir a salinidade as amostras (aproximadamente 2 %) permitindo a sobrevivência da bactéria nas amostras de água doce (MODERNWATER, 2017).

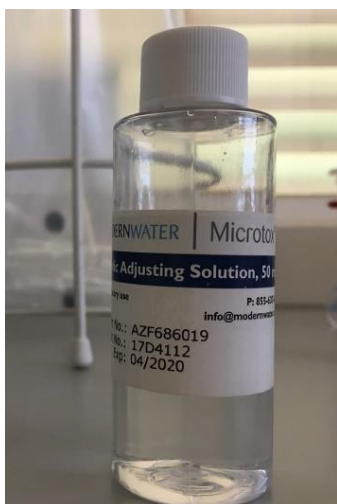


Figura 14 - Solução de ajuste osmótico

## 8.6 Instrumentos e material de vidro

Para a condução do ensaio foram utilizadas micropipetas de 10-1000  $\mu\text{L}$ , cronometro, pontas (100  $\mu\text{l}$  e 1000  $\mu\text{L}$ ), cuvettes e em vidro descartáveis e porta cuvettes (fornecidos pela *ModernWater*).

## 9. Procedimento experimental

### 9.1 Reconstituição do Reagente Solo

Os *vials* de Reagente Solo, após retirados do congelador, foram reconstituídos com a adição de 300  $\mu\text{L}$  de solução diluente, por cada vial utilizado nos ensaios<sup>1</sup> e homogeneizados com uma micropipeta. Após a reconstituição do reagente, é recomendado pelo fabricante que o mesmo seja utilizado dentro de um prazo de 30 min, sendo o tempo de reconstituição recomendado de 15 minutos. É possível que a sensibilidade do reagente a algumas amostras/substâncias possa mudar se o tempo de reconstituição for superior a 30 minutos.

---

<sup>1</sup> 1 vial Reagente SOLO = 1 amostra mais um controle

2 vials Reagente SOLO = 4 amostras mais um controle

3 vials Reagente SOLO = 7 amostras mais um controle

## 9.2 Ensaaios com as substâncias de referência

Antes da realização dos ensaios de toxicidade aguda, ao longo do período de estudo, foram realizados testes para avaliar o desempenho dos ensaios, nomeadamente avaliar a sensibilidade da bactéria após a sua reconstituição.

A norma ISO 11348-3 de 2007 recomenda a utilização de três substâncias de referências para testar a atividade do *Aliivibrio fischeri*, nomeadamente o sulfato de zinco heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 19,34 mg/L, 3,5-diclorofenol ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{OC}_2$ ) 6,8 mg/L e o dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) 105,8 mg/L. Estas substâncias são muito tóxicas para os organismos testes, sendo por essa razão muito utilizadas para avaliar a qualidade do sistema Microtox® FX em muitos laboratórios. Estas substâncias devem ser testadas pelo menos uma vez por mês durante os ensaios ou sempre que se iniciam testes com novos lotes de bactéria (durante o transporte podem ocorrer variações de temperatura as quais podem afetar a viabilidade da bactéria). Ao longo deste trabalho experimental foram realizados ensaios com o dicromato de potássio e com 3,5-diclorofenol, por estarem disponíveis no Laboratório.

### 9.2.1 Dicromato de Potássio

Neste trabalho foi preparada uma solução de cristais de dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) com massa molar de 294,19 g/mol com uma concentração final de 100 mg/L, sendo assim estudada uma concentração efetiva de 81,9 mg/L (devido as diluições que este teste possui). Seguidamente, foi também preparada uma solução de maior concentração 129 mg/L a fim de estudar uma concentração de 105,65 mg/L (concentração requerida pela ISO11348-3 de 2007).

O cromo é um importante poluente ambiental, o qual pode ser encontrado no ambiente aquático como resultado da descarga de efluentes de fábricas de galvanoplastia (galvanização), indústria têxtil, tratamento de peles, fábricas de aço e entre outras. O dicromato de potássio, também conhecido como dicromato ou bicromato é um sal de cromo ou cromato. À temperatura ambiente, apresenta-se como um sólido laranja-avermelhado e inodoro. É um composto com fortes propriedades oxidantes, mas também é extremamente tóxico e carcinogénico devido ao seu conteúdo hexavalente de cromo. Em água, este dissocia-se em iões dicromato e iões potássio. Na solução, também é estabelecido um equilíbrio entre o anião dicromato e o anião cromato, fortemente dependente do pH. Se a solução for básica, prevalecerá o anião amarelado do cromo, enquanto em solução ácida, prevalecerá a cor laranja do dicromato (Ekeh *et al.*, 2018).



Figura 15 - Dicromato de potássio

Fonte: <http://www.restaurarconservar.com/Dicromato-de-Potassio>

Numa balança analítica (Mettler Toledo AG204), foram pesados 10,0 mg e 12,9 mg/L e de cristais de  $K_2Cr_2O_7$ , os quais foram posteriormente diluídos num balão de 100 mL (Figura 16).

Foram testadas diferentes concentrações seguindo o procedimento descrito no protocolo (Anexo I). Foi calculada a  $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$  e  $CE_{10}$  de cada ensaio para cada substância de referência.



Figura 16 - Substância referência - -  $K_2Cr_2O_7$  100 mg/L

### 9.2.2 3,5-Diclorofenol

Os clorofenóis são um grupo de compostos organoclorados constituídos pelo fenol, cujo anel aromático possui átomos de cloro (entre um e cinco). O fenol é um composto aromático derivado do benzeno, ou hidrocarboneto aromático mais simples, adicionando um ou mais hidroxilos a um carbono. Existem cinco tipos básicos de clorofenóis: monoclórofenóis, diclorofenóis, triclorofenóis, tetraclorofenóis, e pentaclorofenóis (Mourato, 2014).

A influência nociva dos clorofenóis e seus derivados pode levar a toxicidade aguda, alterações histopatológicas, mutagenicidade e cancro. A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) determinou que os clorofenóis como grupo, são possivelmente cancerígenos para o homem.

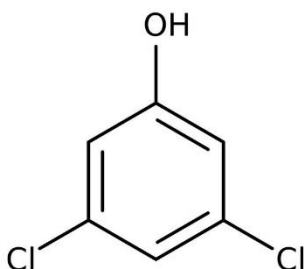


Figura 17 - Estrutura molecular do 3,5-diclorofenol  
Fonte: <https://www.fishersci.com/shop/products/3-5-dichlorophenol-99-acros-organics-2/AC113610100>

Numa balança analítica (Mettler Toledo AG204), foi preparada uma concentração de 3,5-diclorofenol de 8 mg/L pesando 0,8 mg de cristais de 3,5-diclorofenol ( $C_6H_4Cl_2O$ ) com 99 % de pureza, os quais foram posteriormente diluídos num balão de 100 mL, ao fim de testar uma concentração efetiva de 6,55 mg/L.

Foram testadas diferentes concentrações seguindo o procedimento descrito no protocolo. Tal como com o dicromato de potássio, foi calculada a  $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$  e  $CE_{10}$  de cada ensaio com a substância de referência.

### 9.3 Ensaio com matrizes de água

Neste estudo, inicialmente, foram realizados ensaios de toxicidade analisando várias matrizes de águas, nomeadamente amostras de águas dos ETAs, de origem subterrâneas e de origem superficial. Durante estas análises ocorreu sempre um ganho de luminescência por parte dos organismos testes sendo este fenómeno conhecido por *hormesis* o qual pode ocorrer com muita frequência.

*Hormesis*, do verbo grego *ormao*, que significa estimular, é o termo muito utilizado pelos toxicologistas os quais o utilizam para descrever uma resposta bifásica à dose com estímulo ou efeito benéfico em baixas doses e um efeito inibitório ou tóxico em altas doses. Assim, resumidamente é “o processo em que a exposição a uma baixa dose de um agente químico ou

fator ambiental que é prejudicial em doses mais altas, induz um efeito benéfico adaptativo na célula ou organismo” (Mattson, 2008).

Devido ao ganho de luminescência por parte dos organismos, não foi possível calcular a CE<sub>50</sub> das matrizes de água em estudo. As mesmas amostras foram também testadas com outro ensaio de toxicidade utilizando *Daphnia magna* não apresentando mortalidade nos organismos testados.

As concentrações testadas e os resultados das respectivas % E encontram-se no Apêndice I: Ensaio com matrizes de água

#### 9.4 Ensaio com Cloritos e Cloratos

Nos ensaios realizados com os subprodutos de desinfecção da água, cloritos e cloratos, as concentrações das soluções padrão utilizadas foram de 1000 mg/L.

#### 9.5 Ensaio com padrões de contaminantes

Após verificar que as amostras previamente estudadas apresentaram o efeito *hormesis*, foi decidido avaliar a toxicidade de padrões de subprodutos de desinfecção da água (cloritos e cloratos) bem como padrões de cianotoxinas (microcistina-LR, saxitoxina e anatoxina-a). As concentrações estudadas, os efeitos e o cálculo da CE<sub>50</sub>, CE<sub>20</sub> e CE<sub>10</sub> encontram-se descritos no próximo capítulo.

# CAPÍTULO IV- Resultados e Discussão

## Síntese

Neste capítulo estão reportados os resultados obtidos ao longo dos ensaios em compostos tóxicos previamente selecionados, bem como uma discussão dos mesmos

## 10. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos foram agrupados numa tabela (Apêndice III) onde se apresentam os dias da realização dos ensaios, as concentrações testadas/tempo de exposição e os efeitos (% E), com os respetivos resultados das concentrações efetivas. Com a finalidade de calcular a concentração efetiva capaz de causar efeito em 50 % nas bactérias em estudo foi utilizado o Software do equipamento Microtox® FX, o método Probit (apêndice IV) e o método estatístico, enquanto para o cálculo das restantes concentrações efetivas (CE<sub>20</sub> e CE<sub>10</sub>) foi utilizado o método Probit.

Os valores dos ensaios brancos, calculados através da fórmula  $RB = I_{(t)B} / I_{(0)B}$  encontram-se reportados no apêndice II.

Para obter uma melhor visualização dos resultados obtidos ao longo do estágio, por cada composto estudado, foram criados 3 gráficos. Os primeiros gráficos de cada composto, representam graficamente as médias e os desvios-padrão dos efeitos obtidos ao longo dos ensaios. Como ao longo desta experiência foram registadas diferentes temperaturas de leitura dos compostos, para verificar que a perda de luminescência não sofreu alterações, os segundos gráficos representam graficamente as concentrações (mg/L, µg/L) / efeito (%) agrupadas por diferentes temperaturas.

O fator temperatura, para muitos organismos aquáticos, é uma variável ambiental muito importante a qual pode influenciar os mecanismos fisiológicos a nível enzimático e celular, resultando em alterações das taxas metabólicas (Willmig, Qin, & Maul 2013).

As Figuras 20, 23, 26, 29, 32 e 35, representam graficamente as médias e os desvios-padrão das concentrações efetivas (CE<sub>50</sub>, CE<sub>20</sub> e CE<sub>10</sub>) previamente calculadas.

Nos gráficos referidos anteriormente, de cada composto estudado, encontram-se os valores da CE<sub>50</sub> repetidos, sendo a primeira coluna da CE<sub>50</sub> calculada com o modelo Probit, a segunda calculada através do Software Microtox e a terceira calculada com o método estatístico, com o objetivo de comparar os resultados obtidos por diferentes metodologias.

Ao longo das Figuras (19, 22, 25, 28, 31 e 34) apresentadas é possível verificar que existem continuas variações nos resultados obtidos, isto porque, tratando-se de ensaios de natureza biológica, os quais implicam a utilização de organismos vivos, e a consequente variabilidade natural, não é possível obter uma distribuição normal dos dados, sendo impossível obter réplicas exatas dos mesmos resultados. Além das variações de temperaturas, é necessário também ter em conta a técnica de trabalho utilizada e erros geralmente associados (erros na

pipetagem, erros nas diluições e entre outros) bem como possíveis alterações de pH (durante as diluições) e alterações das próprias soluções padrão.

## 11. Resultados dos ensaios com a substância de referência- Dicromato de Potássio

Com o objetivo de verificar a estabilidade/viabilidade dos lotes de bactérias *Aliivibrio fischeri*, foram realizadas 14 réplicas com a solução de concentração 100 mg/L e 5 da solução com concentração de 129 mg/L, previamente preparadas em laboratório.

Foram estudadas 4 concentrações de dicromato de potássio em cada ensaio, obtidas por diluições sucessivas a partir de uma concentração de 81,9 mg/L até uma concentração de 10,24 mg/L e de 105,65 mg/L até uma concentração de 13,21 mg/L, com um tempo de exposição de 30 min para cada ensaio.

### 11.1 Dicromato de Potássio (100 mg/L)

Os resultados obtidos foram agrupados na Figura 18 onde foram representadas as médias e os desvios padrão das % E obtidas após os ensaios com a solução padrão de dicromato de potássio com concentração de 100 mg/L.

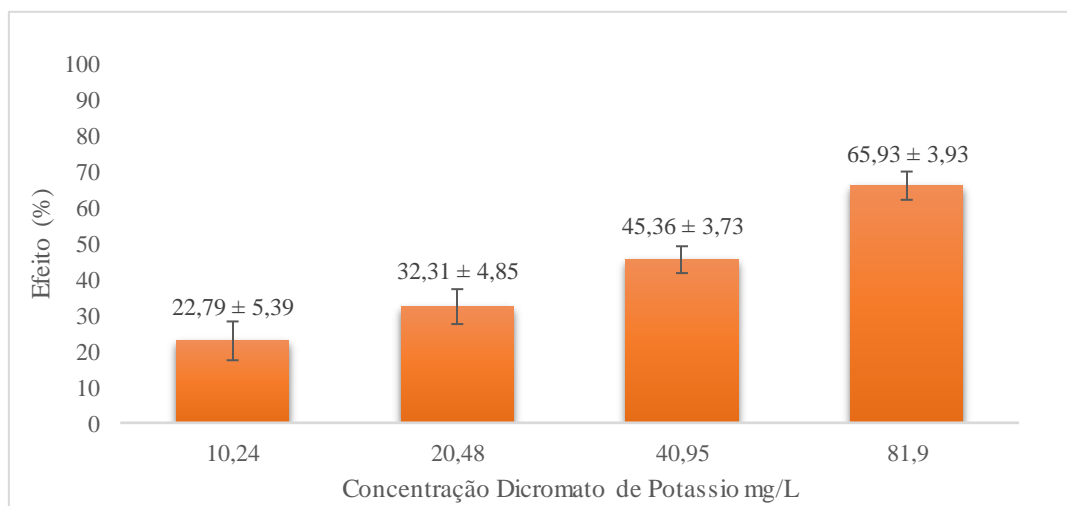


Figura 18 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de dicromato de potássio 100 mg/L

A Figura 18 mostra um aumento gradual da % E ao longo das concentrações testadas.

Na Figura 19 é possível observar as % E obtidas ao longo dos ensaios com diferentes temperaturas de teste.

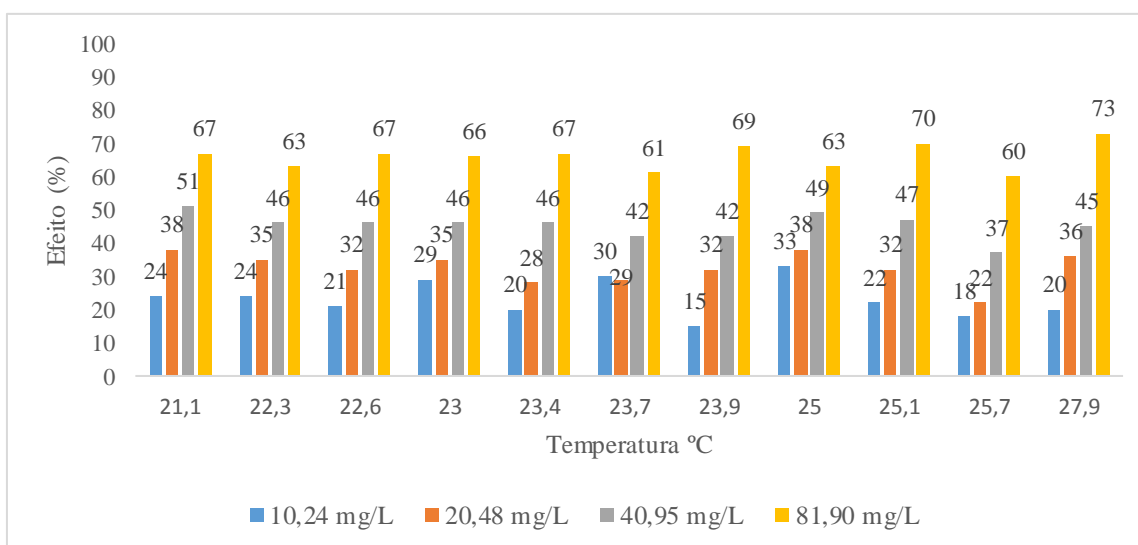


Figura 19 - % E obtidas para diferentes temperaturas de ensaio com dicromato de potássio 100 mg/L

Os ensaios realizados com o dicromato de potássio, previamente preparado em laboratório, não apresentaram diferenças significativas em relação a temperatura.

A Figura 20 apresenta as médias (mg/L) e os desvios padrão das concentrações efetivas (CE) calculadas após ter efetuados todas as repetições com a solução padrão de dicromato de potássio com concentração de 100 mg/L.

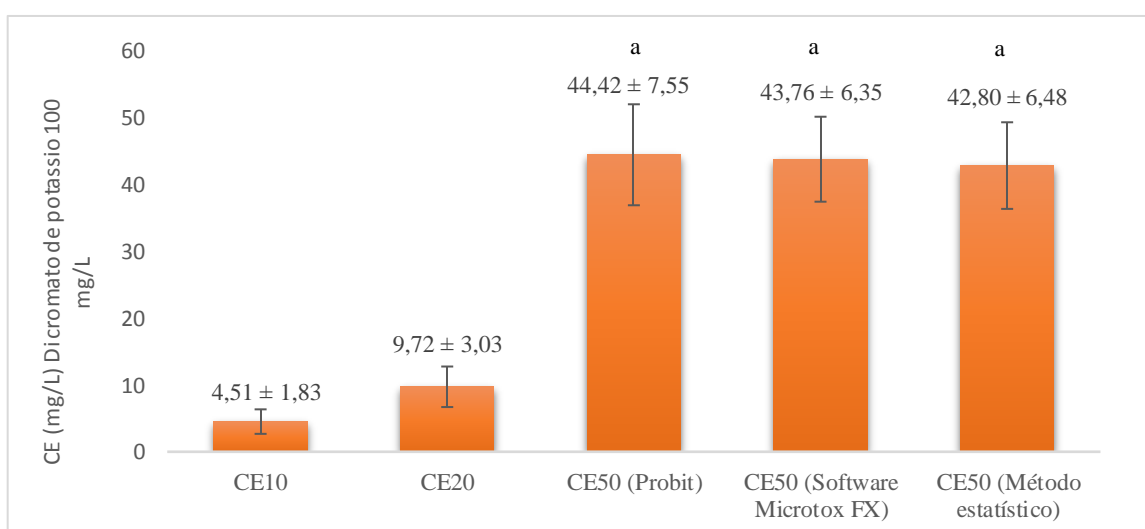


Figura 20 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de dicromato de potássio 100 mg/L

Foi obtida uma  $CE_{50}$  de 44,42 mg/L pelo método Probit, uma  $CE_{50}$  de 43,76 mg/L pelo Software Microtox e uma  $CE_{50}$  de 42,80 mg/L pelo método estatístico, não se verificando diferenças significativas entre os resultados obtidos.

Não sendo esta a concentração de dicromato de potássio (81,9 mg/L) a requerida pela norma ISO 11348-3:2007, foi então criada uma nova solução mais concentrada, ao fim de obter uma concentração final de 105,65 mg/L.

## 11.2 Dicromato de Potássio (129 mg/L)

Na Figura 21 encontram-se representadas as médias e os desvios padrão das % E obtidas após os ensaios com a solução padrão de dicromato de potássio com concentração de 129,2 mg/L.

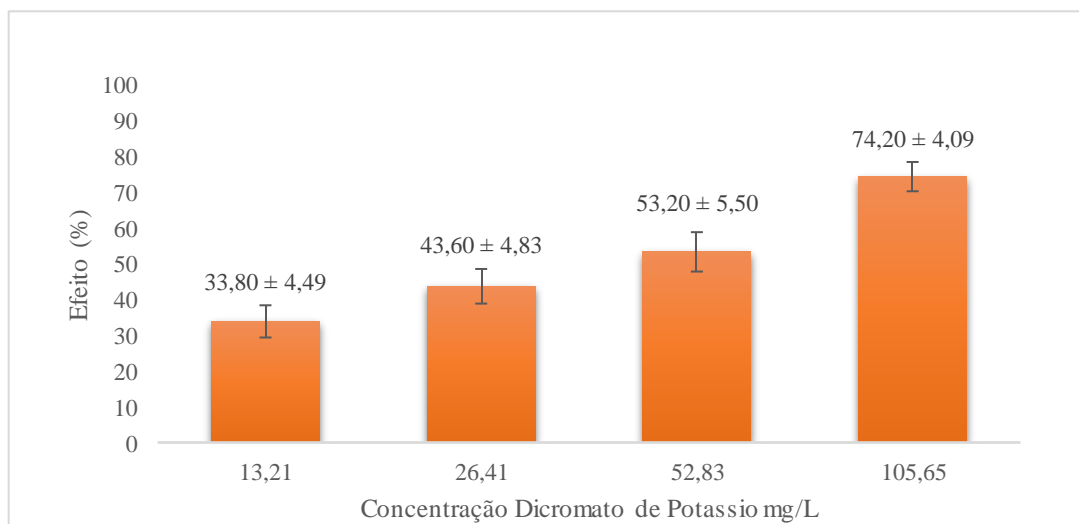


Figura 21 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de dicromato de potássio 129 mg/L

Como apresentado no gráfico, as concentrações mais elevadas de dicromato de potássio, aumentam com a % E nas bactérias em estudo.

Na Figura 22 encontram-se representadas as concentrações de dicromato de potássio (mg/L) estudadas e as respetivas % E agrupadas para diferentes temperaturas. É possível verificar que os efeitos obtidos não representam variações significativas para as diferentes temperaturas testadas.

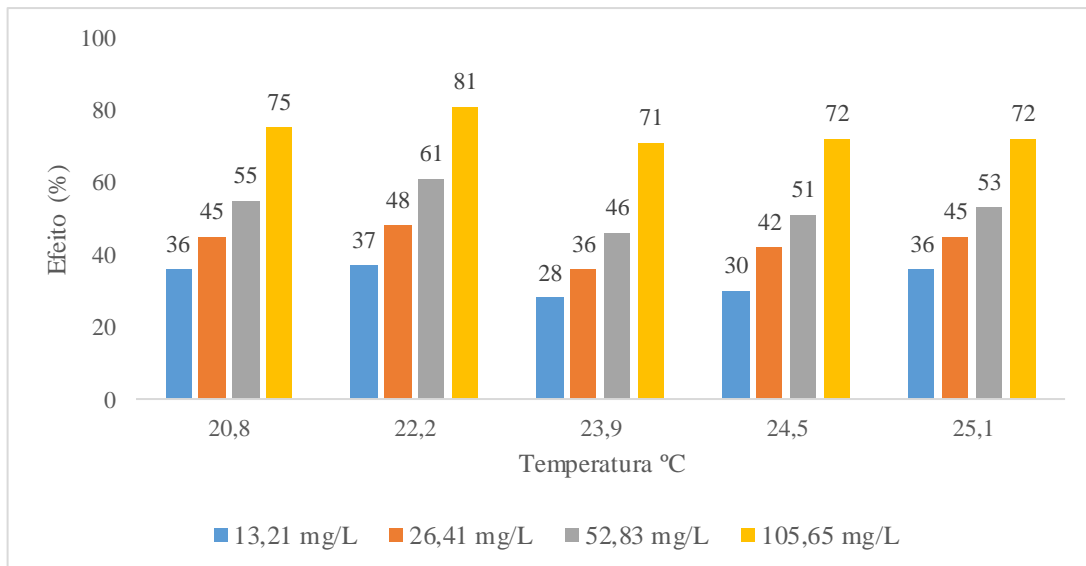


Figura 22 - % E para diferentes temperaturas de ensaio com dicromato de potássio 129 mg/L

Na figura 23 encontram-se representadas as médias (mg/L) e os desvios padrão das concentrações efetivas previamente calculadas.

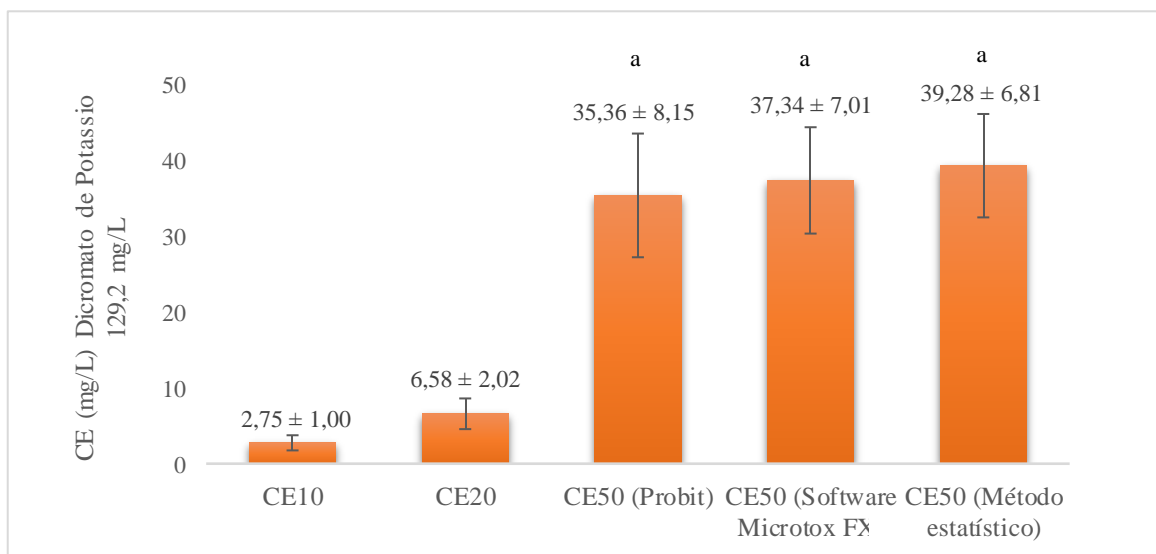


Figura 23 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de dicromato de potássio 129 mg/L

Foi obtida uma  $CE_{50}$  de 35,36 mg/L (pelo método Probit), uma  $CE_{50}$  de 37,34 mg/L (pelo software Microtox) e uma  $CE_{50}$  de 39,28 mg/L (pelo método estatístico) não apresentando, como no caso anterior, diferenças significativas relativamente aos resultados obtidos.

A norma ISO 11348-3:2007 prevê que para uma concentração de 105,8 mg/L de dicromato de potássio deve corresponder aproximadamente uma  $CE_{50}$  de 52,9 mg/L e uma  $CE_{50}$

para o cromo (VI) de 18,7 mg/L. A mesma também refere que as substâncias de referência estudadas podem causar uma inibição de 20 % a 80 % após 30 minutos de tempo de contato nas concentrações finais obtidas.

O método utilizado permitiu concluir a viabilidade/funcionalidade dos lotes de bactérias testados. As variações que estes tipo de ensaio apresenta, podem ser consideradas como uma desvantagens do método, devendo sempre que possível, repetir os ensaios para que se possam obter resultados mais fiáveis.

## 12. Resultados dos ensaios com a substância de referência- 3,5-diclorofenol 8 mg/L

Após os resultados obtidos com diferentes concentrações de dicromato de potássio foi decidido testar os lotes de *Aliivibrio fischeri* com a substância 3,5-diclorofenol a fim de verificar a funcionalidade/viabilidade das bactérias. Foram realizadas 6 repetições com a solução de concentração 8 mg/L previamente preparada em laboratório. Foram estudadas 6 concentrações no total, partindo de uma concentração de 6,55 mg/L até uma concentração de 3,28 mg/L de 3,5-diclorofenol com um tempo de exposição de 30 min para cada ensaio. Foram realizadas inicialmente diluições 1:2, mas como houve uma grande variabilidade de resultados, ao fim de obter significativas % E foram realizadas diluições intermedias.

Na Figura 24 encontram-se representadas as médias e os desvios padrão das % E obtidas após os ensaios com a solução padrão de 3,5-Diclorofenol com concentração de 8 mg/L.

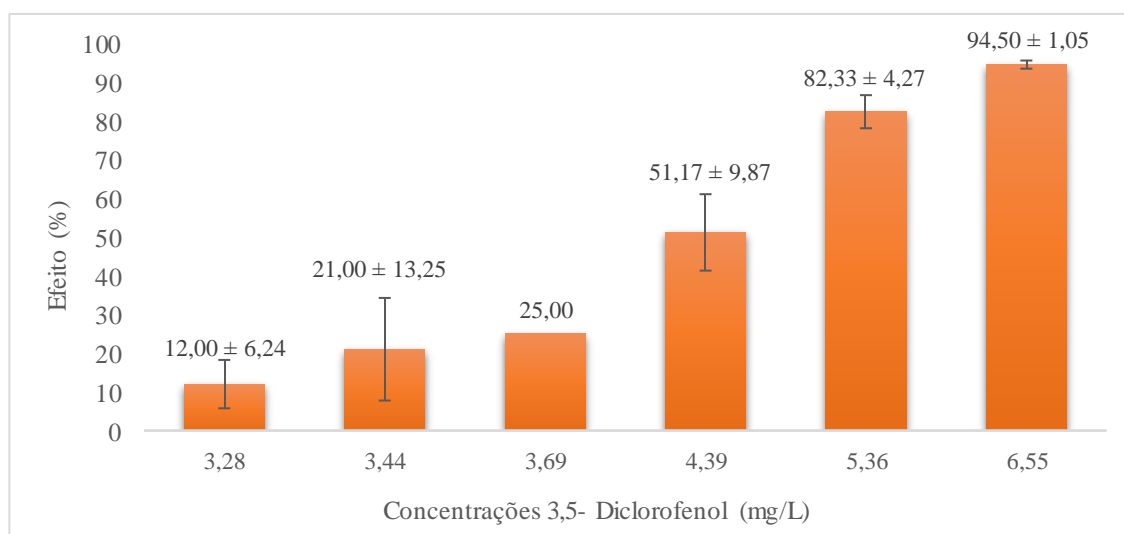


Figura 24 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de 3,5-diclorofenol

Na concentração de 3,5-diclorofenol mais elevada, a média da % E correspondeu a 94,5 % com um desvio de 1,05 %. Ao mesmo tempo, as concentrações de 3,44 mg/L e 4,39 mg/L apresentaram desvios de % E maiores (13,25 % e 9,87 % respetivamente).

Após analisar os efeitos (Figura 25) nas diferentes concentrações aos 30 minutos, também é possível verificar que nas concentrações de 3,44 mg/L e na de 4,39 mg/L de 3,5-diclorofenol, houve uma variação maior nas % E.

Esta variação não parece ser devida a uma alteração de temperatura, mas pode ter ocorrido devido a erros acumulados de execução ao longo do procedimento.

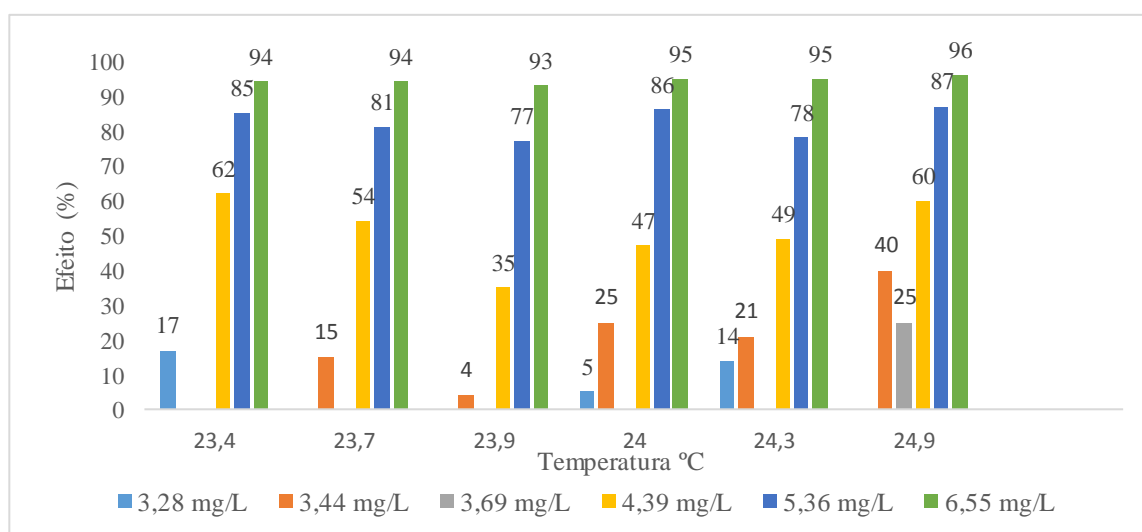


Figura 25 - % E para diferentes temperaturas de ensaio com 3,5-diclorofenol

Na Figura 26 encontram-se representadas as médias (mg/L) e os desvios padrão das concentrações efetivas previamente calculadas.

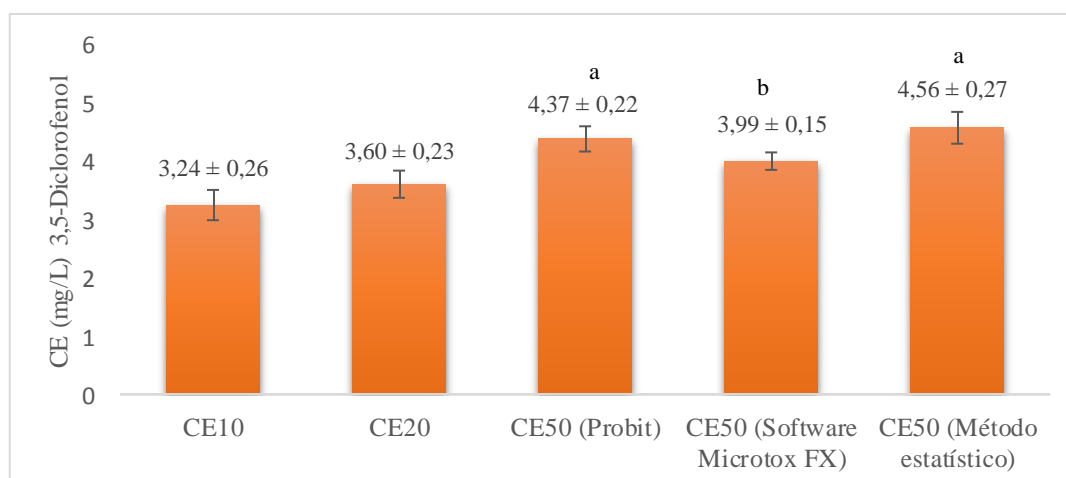


Figura 26 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de 3,5-diclorofenol

Foi obtida uma  $CE_{50}$  de 4,37 mg/L (pelo método Probit), uma  $CE_{50}$  de 3,99 mg/L (pelo software Microtox) e uma  $CE_{50}$  de 4,56 mg/L (pelo método estatístico) apresentando neste caso diferenças significativas nos resultados obtidos pelo Software Microtox.

A norma ISO 11348-3:2007 aponta uma  $CE_{50}$  de 3,4 mg/L para uma concentração de 6,8 mg/L de 3,5-Diclorofenol. É possível verificar a partir da Figura 26 que os valores obtidos são muito próximos do valor reportado na norma (3,4 mg/L), e como no caso do dicromato de potássio, o 3,5-diclorofenol pode causar uma inibição de 20 % a 80 % após 30 minutos de tempo de contato nas concentrações finais obtidas. O método utilizado permitiu concluir a viabilidade/funcionalidade dos lotes de bactérias testados.

As variações obtidas ao longo dos ensaios com este composto, devem ser devido ao facto de ter ocorrido algum erro de pipetagem durante as diluições intermedias.

## 13. Resultados dos ensaios com cloritos e cloratos

### 13.1 Resultados dos ensaios com padrão de cloritos

Para testar a sensibilidade das bactérias *Aliivibrio fischeri* ao composto cloritos ( $ClO_2^-$ ) foi preparada uma solução com concentração de 25 mg/L, sendo assim a concentração efetiva mais alta estudada foi de 20,48 mg/L. Foram realizadas 5 diluições (1:2) a fim de obter a concentração mais baixa de 0,64 mg/L a mais próxima do limite legal (0,7 mg/L) estabelecido para águas de consumo (Decreto-Lei nº 152/2017; WHO, 2016).

Foram efetuadas 8 repetições ao longo do período de estudo, com um tempo de exposição de 15 minutos para cada ensaio efetuado.

Na Figura 27 encontram-se representadas as médias e os desvios padrão das % E obtidas após os ensaios com a solução de cloritos com 25 mg/L.

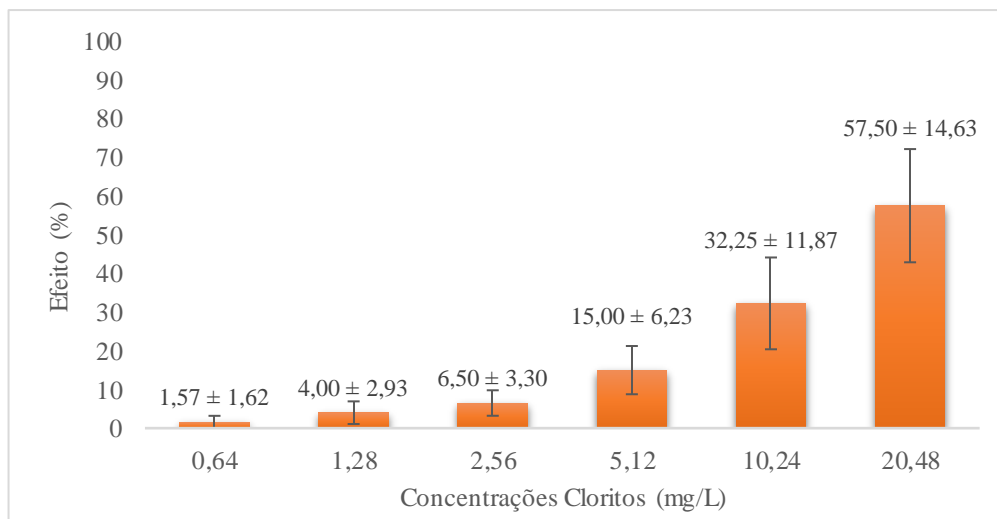


Figura 27 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de cloritos

Ao examinar os efeitos para as diferentes concentrações de cloritos após 15 minutos (Figura 27), é possível verificar que na concentração mais baixa, ou seja, a mais próxima da concentração máxima prevista de cloritos em águas para consumo (0,7 mg/L), a % E foi muito baixa. É possível concluir que a uma concentração de 0,64 mg/L de cloritos apresenta uma toxicidade mínima para a bactéria *Aliivibrio fischeri*. Estes resultados permitem também indicar que a toxicidade poderá ser um método útil para testar a qualidade da água de consumo, embora mais testes, com concentrações mais elevadas sejam necessários para uma melhor conclusão.

As % E obtidas após ensaios com os cloritos, sofreram variação significativa em uma concentração de 10,24 mg/L e 20,48 mg/L.

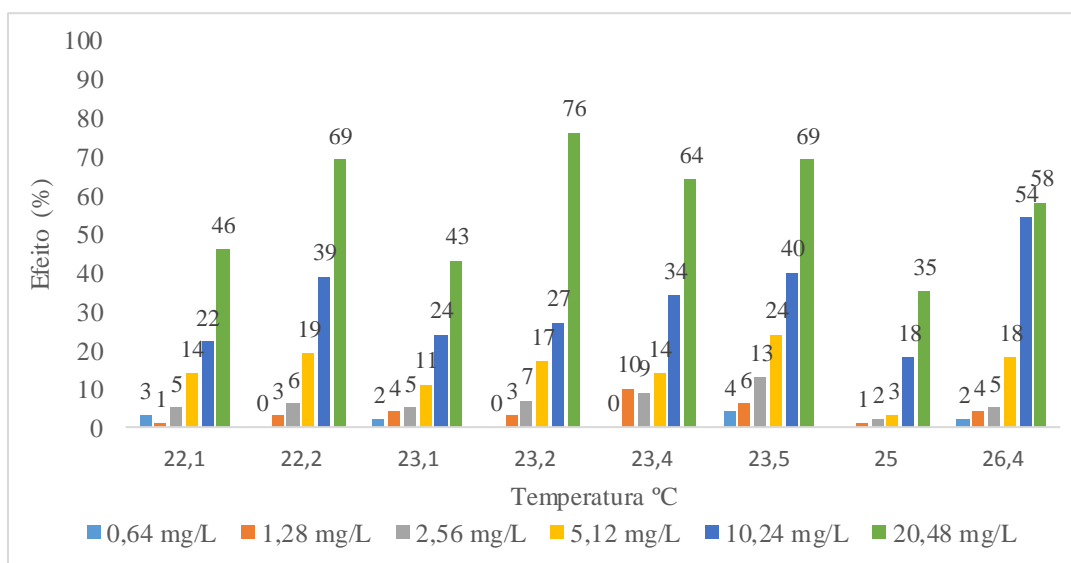


Figura 28 - % E para diferentes temperaturas de ensaio com cloritos

É possível verificar na Figura 28 uma viragem na % de inibição a partir da concentração de 10,24 mg/L. As % E de 46 % e 43 % e 35 % obtidas na concentração mais alta testada (mais baixas das obtidas nos outros ensaios) muito provavelmente ocorreu devido a um erro de preparação da concentração desejada da solução ou devido a um possível erro na preparação da diluição.

Na Figura 29 encontram-se representadas as médias (mg/L) e os desvios padrão das concentrações efetivas previamente calculadas.

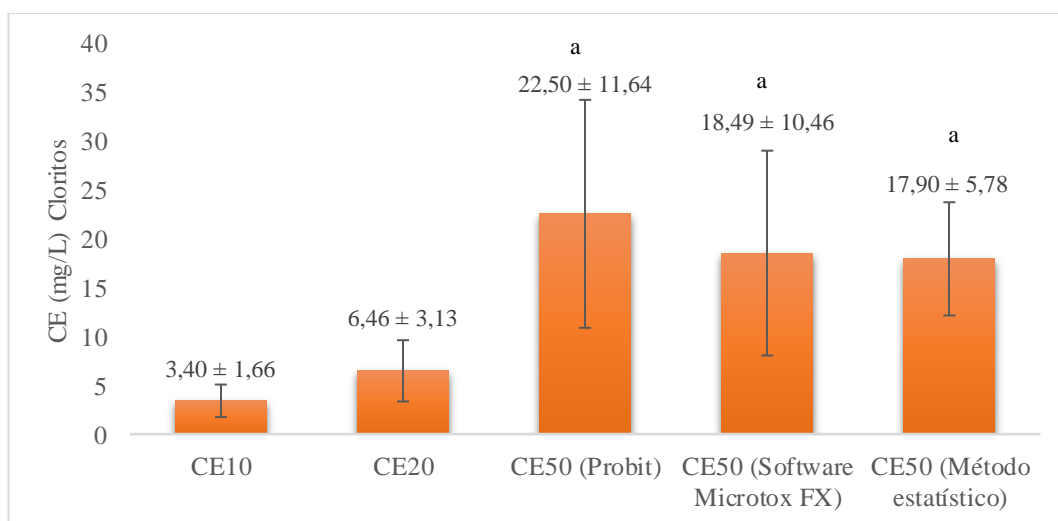


Figura 29 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de cloritos

O valor médio das concentrações capazes de causar efeito em 50 % da população de bactérias é de 22,50 mg/L (método Probit), de 18,49 mg/L (Software Microtox) e de 17,90 mg/L (método estatístico), não apresentando diferenças significativas entre os resultados obtidos.

Dado que os cloritos são um composto muito pouco estudado em águas de consumo e, por isso, não tendo sido possível encontrar bibliografia relacionada com este composto, deveriam ser realizados mais testes com cloritos com o objetivo de obter uma menor variação nos resultados obtidos.

### 13.2 Resultados dos ensaios com padrão de cloratos

Para o ensaio com uma solução de cloratos, a partir de um padrão de 1000 mg/L foram preparadas duas soluções, uma concentração de 100 mg/L (concentração efetiva estudada de 81,9 mg/L) e uma concentração de 50 mg/L (concentração efetiva estudada de 40,95 mg/L).

Após 15 minutos de exposição, as % E foram de 5 % e 3 % respectivamente. Ao apresentar baixos efeitos em concentrações elevadas de solução de cloratos, significa que em concentrações muito baixas, como a estabelecida para o limite legal de cloratos em água para o consumo humano, nomeadamente de 0,7 mg/L, não teria algum efeito na bactéria em estudo. É possível concluir que os cloratos não apresentam toxicidade para a bactéria *Aliivibrio fischeri* para as concentrações estudadas, sendo por isso necessário a realização de mais testes com concentrações mais elevadas.

## 14. Resultados dos ensaios com cianotoxinas

### 14.1 Resultados com padrão de Microcistinas-LR

Foi necessário realizar testes exploratórios com padrões de Microcistina-LR fora da validade, dado que eram os disponíveis, à data, no Laboratório, e que o seu custo é elevadíssimo. A realização de testes de toxicidade com cianotoxinas é uma metodologia inovadora, não tendo sido encontrada bibliografia sobre o assunto. Por esta razão, a escolha das concentrações a testar foi bastante difícil. Por outro lado, estes testes seriam sempre limitados dado que o custo de aquisição de padrões de toxinas ser muito elevado, pelo que não seria possível fazer testes sistemáticos, a diferentes concentrações, como seria desejável.

Os testes realizaram-se, com umas concentrações de 100 µg/L e 50 µg/L (81,9 µg/L e 40,95 µg/L respectivamente) foram obtidos, após uma exposição de 15 minutos, % E de 6 % e 4 % respectivamente. Devido a estas baixas perdas de luminescência após contatos com concentrações elevadas desta toxina foi decidido experimentar com um padrão dentro da validade, a fim de chegar a resultados mais conclusivos para este parâmetro.

O padrão de Microcistinas-LR possuía uma concentração de 10 µg/mL (103 µg/L). Foi então preparada uma concentração de 50 µg/L e estudada uma concentração efetiva d 40,95 µg/L. A %E obtida com esta concentração, após um tempo de exposição de 15 minutos, foi de 5 % (equivalente ao padrão fora do prazo de validade). Embora mais testes sejam necessário, estes resultados preliminares indicam que esta cianotoxina pode ser considerada não toxica para o organismo em estudo, nesta gama de concentrações. Como seria expectável, em concentrações muito baixas, como a estabelecida para o limite legal de microcistina em água para o consumo humano, nomeadamente 1 µg/L, não teria algum efeito na bactéria em estudo.

## 14.2 Resultados com Anatoxina-a 0,15 µg/L

Para testar a sensibilidade das bactérias *Aliivibrio fischeri* à anatoxina-a foi preparada uma solução padrão de anatoxina-a (0,15 µg/L) com uma concentração de 0,015 µg/L, sendo assim, a mais alta concentração de 0,01229 µg/L. Foram realizadas 6 diluições (1:2) a fim de chegar à concentração mais baixa anatoxina-a de 0,00038 µg/L. Foram realizados 6 ensaios com um tempo de exposição de 15 minutos.

Na Figura 30 encontram-se representadas as médias e os desvios padrão das % E obtidas após os ensaios com a solução de anatoxina-a 0,15 µg/L.

Ao examinar os efeitos nas diferentes concentrações após 15 min, é possível verificar que na concentração mais baixa de anatoxina-a, ou seja  $3,4 \times 10^{-4}$  µg/L a média das % E foi de  $6,75 \pm 3,20$  e na concentração mais alta de anatoxina-a,  $12,29 \times 10^{-3}$  µg/L a % E foi de 99 %. Na concentração mais alta foi realizada somente uma repetição e na concentração de anatoxina-a de  $6,14 \times 10^{-3}$  µg/L foram realizadas duas repetições onde foi obtida a mesma % E (98 %). A partir da concentração de anatoxina-a de  $3,07 \times 10^{-3}$  µg/L foram realizadas mais repetições, pois observou-se uma viragem nos resultados a partir desta concentração.

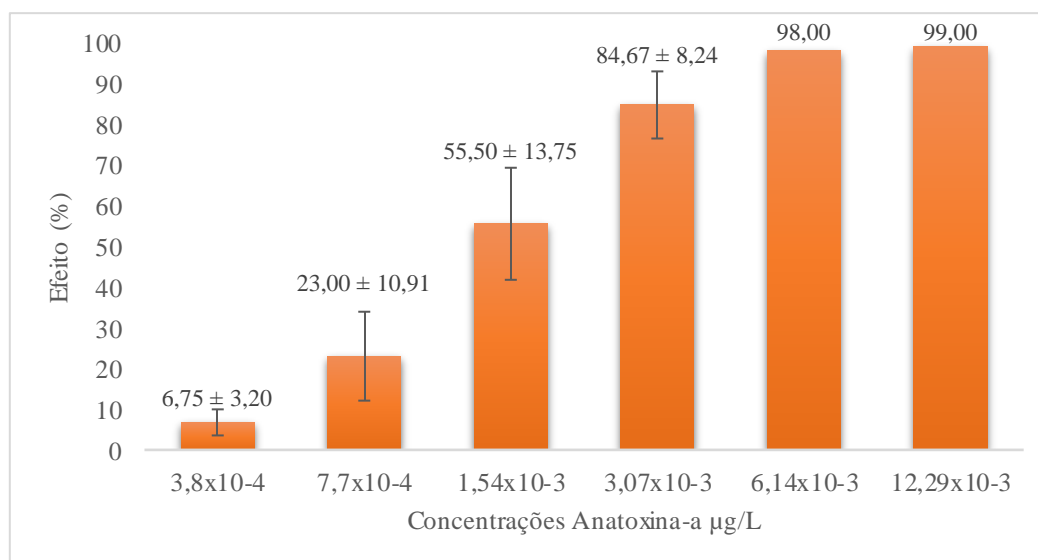


Figura 30 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de anatoxina-a

Na Figura 31, é possível verificar e concluir que a bactéria apresentou elevada sensibilidade para esta substância, apresentando elevadas % de inibição para baixas concentrações de anatoxina-a ( $3,8 \times 10^{-4} \mu\text{g/L}$ ).

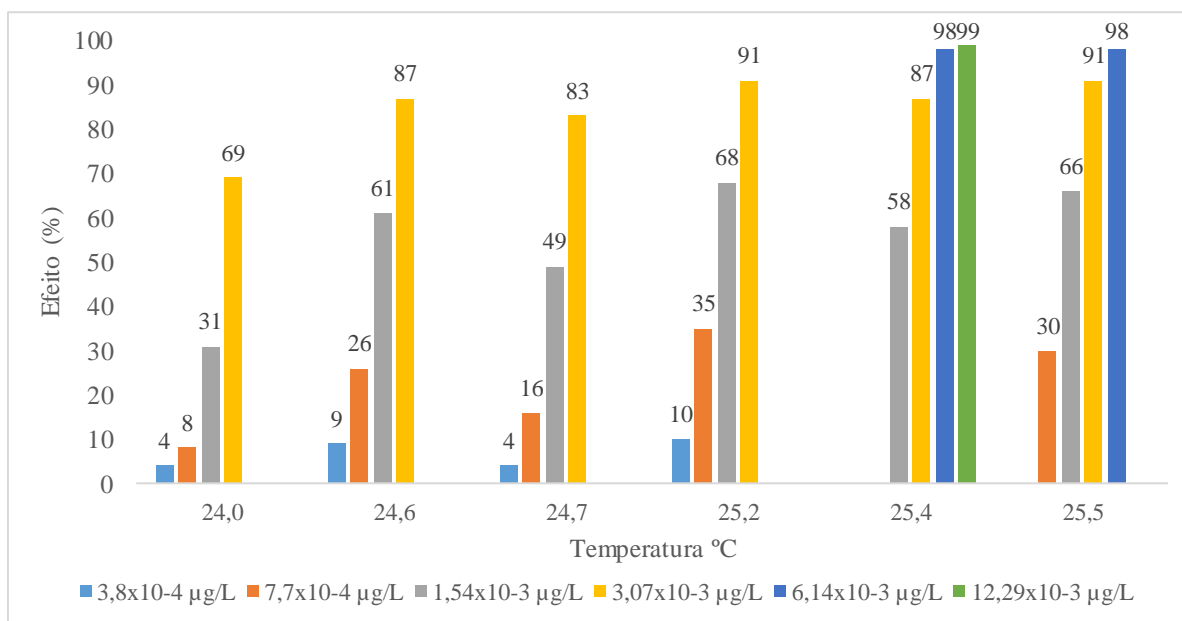


Figura 31 - % E para diferentes temperaturas de ensaio com anatoxina-a

As normas internacionais (Regulamento da Nova Zelândia) referem que a concentração de anatoxina-a no ambiente não pode exceder  $1 \mu\text{g/L}$  enquanto na água potável este parâmetro deve ser inferior a  $0,001 \mu\text{g/L}$ , sendo estes valores provisórios (EPA, 2015). A OMS está a preparar uma nova edição do livro *Toxic cyanobacteria in Water*, (autor Ingrid Chorus) que será publicado este ano, o qual indica um valor guia, para anatoxina-a, em águas de consumo de  $30 \mu\text{g/L}$ .

É possível verificar na Figura 31 que foram obtidas % E a partir de uma concentração inferior a de  $30 \mu\text{g/L}$ .

A anatoxina-a difere das outras cianotoxinas (como as microcistinas) por sofrer rápida degradação fotoquímica pela luz solar (dependente da intensidade da luz,) e a sua decomposição é acelerada por condições alcalinas. No entanto, é relativamente estável em condições neutras e ácidas (EPA, 2015; Testai, *et.al*, 2016).

Na Figura 32 encontram-se representadas as médias ( $\mu\text{g/L}$ ) e os desvios padrão das concentrações efetivas previamente calculadas para a anatoxina-a.

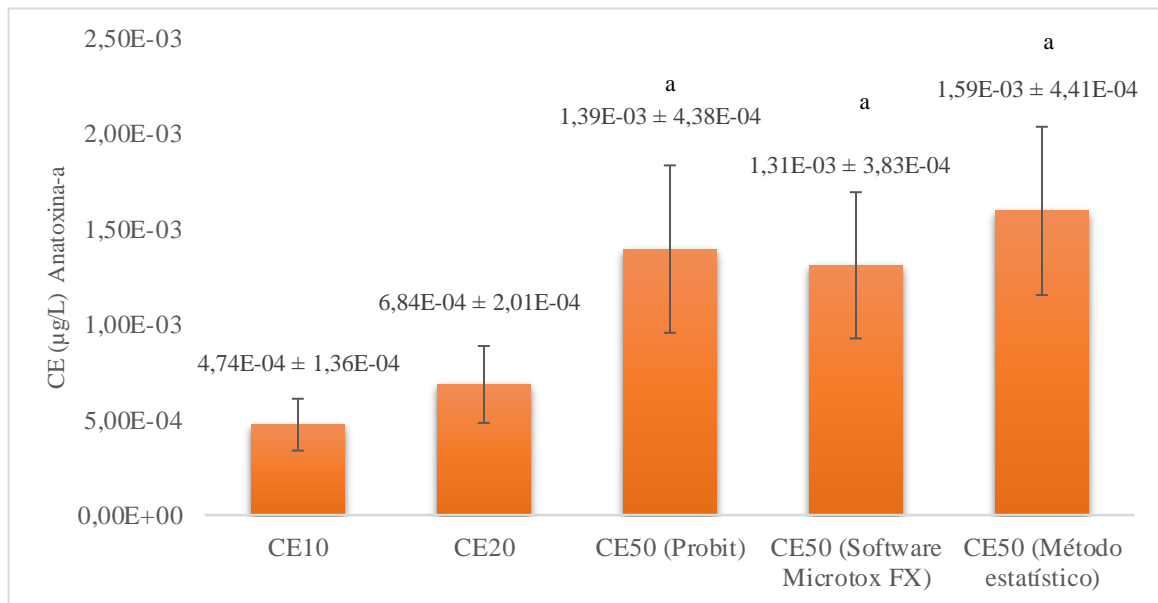


Figura 32 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de anatoxina-a

É possível concluir que a bactéria *Aliivibrio fischeri* é muito sensível a este composto e tem uma ótima capacidade de detetar esta cianotoxina, sendo que as  $\text{CE}_{50}$  obtidas foram de  $1,39 \times 10^{-3} \mu\text{g/L}$  (método Probit),  $1,31 \times 10^{-3} \mu\text{g/L}$  (Software Microtox) e  $1,59 \times 10^{-3} \mu\text{g/L}$  (método estatístico) são capazes de provocar perda de luminescência em 50 % da população em estudo.

Através da análise ANOVA foi possível concluir que não existem diferenças significativas entre os resultados obtidos.

### 14.3 Resultados com Saxitoxina 10 µg/L

Para testar a sensibilidade das bactérias *Aliivibrio fischeri* à saxitoxina foi utilizada uma solução de dicloridrato de saxitoxina diluída em ácido clorídrico aquoso. Foi preparada uma concentração de 10 µg/L de dicloridrato de saxitoxina, sendo assim a concentração efetiva mais alta estudada foi de 8,19 µg/L. Foram estudadas 5 concentrações sendo a concentração mais baixa estuda de 0,512 µg/L. Foram realizados somente dois ensaios com um tempo de exposição de 15 minutos.

Na Figura 33 encontram-se representadas as médias e os desvios padrão das % E obtidas após os ensaios com a solução de saxitoxina 10 µg/L.

Ao examinar os efeitos nas diferentes concentrações após 15 min, é possível verificar que foram obtidas grandes variações nos resultados obtidos.

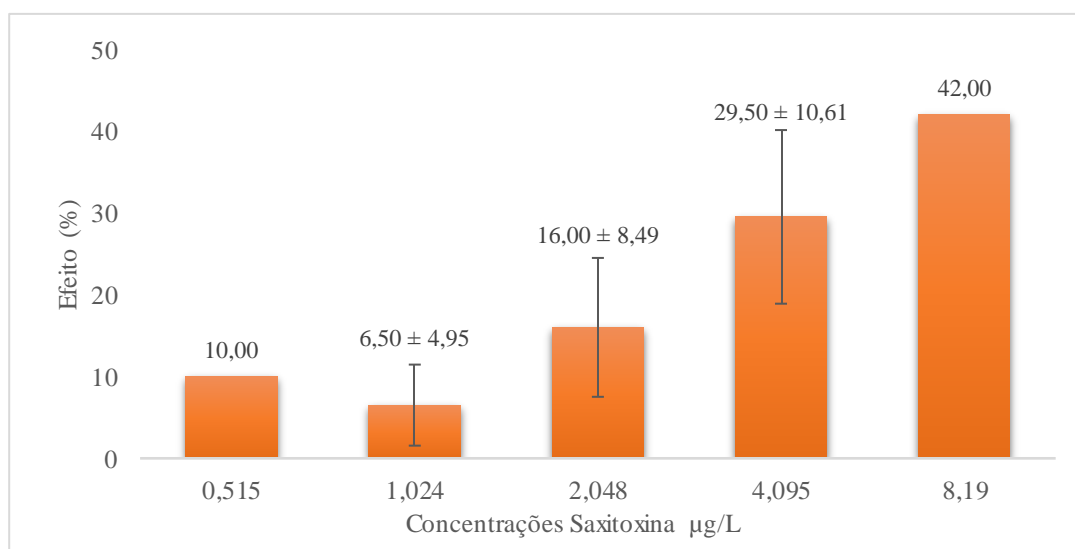


Figura 33 - % E obtidas nos ensaios com a solução padrão de saxitoxina

Foram realizadas somente duas repetições dos ensaios devido a verificação da instabilidade da solução previamente preparada. É possível observar através dos valores representados na Figura 34 uma diminuição na % E logo a partir do segundo ensaio, sendo os ensaios realizados à mesma temperatura.

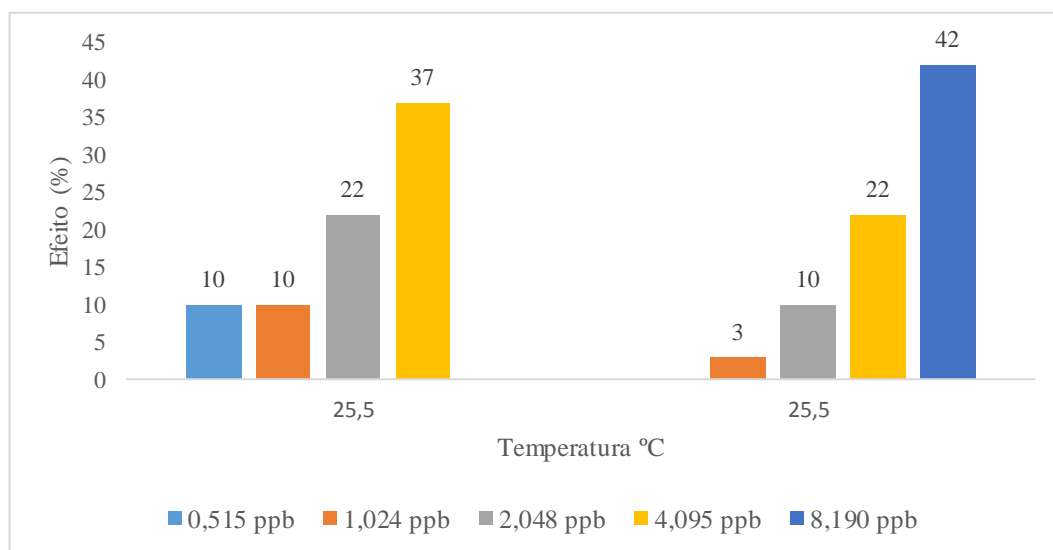


Figura 34 - % E para diferentes temperaturas de ensaio com saxitoxina

Além de poder ter sido um erro associado ao procedimento experimental, o ácido clorídrico aquoso presente na solução de saxitoxina pode ter interferido na solução bem como variações no pH.

O novo livro da OMS apresenta um valor guia para a saxitoxina de 3 µg/l, em águas de consumo. Na Figura 34 é possível verificar que foram obtidas % E a partir de uma concentração inferior a de 3 µg/l, concluindo-se que, uma concentração abaixo do valor guia, apresenta toxicidade para a bactéria *Aliivibrio fischeri*.

Na Figura 35 encontram-se representadas as médias (µg/L) e os desvios padrão das concentrações efetivas previamente calculadas.

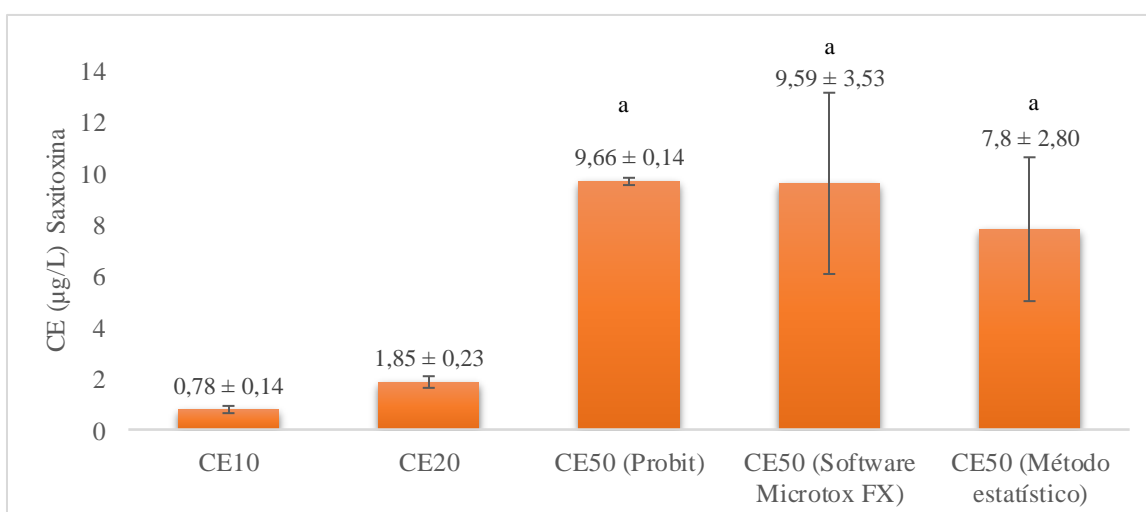


Figura 35 - Concentrações efetivas obtidas com solução padrão de saxitoxina

É possível concluir que a bactéria *Aliivibrio fischeri* é muito sensível a este composto e tem uma ótima capacidade de detetar esta cianotoxina, tendo sido obtidos CE<sub>50</sub> de 9,66 µg/L (método Probit), 9,59 µg/L (Software Microtox) e 7,8 µg/L (método estatístico), sendo capazes de provocar perda de luminescência em 50 % da população em estudo. Também com este composto foi possível verificar que não existem diferenças significativas entre os resultados obtidos.

Não existindo bibliografia associada a este tipo de ensaio com esta cianotoxina, bem como os cloritos e a anatoxina-a, tornou-se bastante difícil a interpretação dos resultados obtidos.

## Capitulo V – Conclusões

A ecotoxicologia, ou seja, a área que estuda o impacto de determinadas substâncias tóxicas sobre o ambiente e os seus ecossistemas, pode ser considerada como um tema muito atual. O contínuo aumento da população mundial e o conseqüente aumento das atividades industriais e humanas, tem vindo a promover significativamente a poluição ambiental especialmente, a dos corpos hídricos, um recurso fundamental para a sobrevivência da vida na terra.

Durante muitos anos, as avaliações de toxicidade de águas foram realizadas com macro organismos tais como algas, dáfrias e ostras. No entanto, estes testes caracterizam-se por serem muito demorados, e apresentarem um elevado custo, devido à necessidade de manter populações de organismos em condições controladas. Estas características também dificultariam o seu uso em situações de emergências. Atualmente, a realização de ensaios de toxicidade com bactérias bioluminescentes tem vindo a crescer, sobretudo por serem muito rápidos, por não haver necessidade de manter as populações de bactérias e ainda por utilizarem uma pequena quantidade de amostras.

O principal objetivo desta dissertação foi a implementação de um método de ensaio para a avaliação da toxicidade usando a bactéria bioluminescente *Aliivibrio fischeri* com o equipamento Microtox® FX, com o objetivo de avaliar matrizes de água, bem como avaliar padrões tóxicos de contaminantes que podem acidentalmente ou intencionalmente contaminar as origens de água.

Os ensaios foram desenvolvidos num dos mais modernos equipamentos produzidos pela *ModernWater*, o Microtox® FX, o qual permite desenvolver ensaios com respostas rápidas (entre 5 a 30 min), e precisas, podendo ser um ótimo aliado em situações de emergência. Este método permitiu calcular as concentrações efetivas  $CE_{50}$ ,  $CE_{20}$  e  $CE_{10}$ .

Inicialmente as bactérias foram testadas com substâncias de referência, preconizadas na norma ISO 11348-3:2007, nomeadamente duas soluções de dicromato de potássio com concentração de 100 mg/L e 129,2 mg/L e uma solução de 3,5-diclorofenol com concentração de 8 mg/L, a fim de testar a eficiência dos lotes de bactérias. A norma referência indica que, para a concentração de 105,8 mg/L de dicromato de potássio, a  $CE_{50}$  esperada deve ser aproximadamente de 52,9 mg/L enquanto para o 3,5-diclorofenol é esperada uma  $CE_{50}$  de aproximadamente 3,4 mg/L. Os valores da  $CE_{50}$  obtidos, mesmo aproximando-se das  $CE_{50}$  requeridas na escassa regulamentação existente, apresentaram variações, pois tratando-se de ensaios de natureza biológica, nos quais são utilizadas bactérias altamente sensíveis, não seria possível obter os mesmos resultados, como expectável numa análise química.

Após testar matrizes de água (origem subterrânea, águas brutas e tratadas de processo) concluiu-se que estas não apresentaram toxicidade para a bactéria, tendo pelo contrário promovido uma estimulação/efeito de adaptação (*hormesis*), descrito na bibliografia, o qual pode ser devido a vários fatores como nutrientes presentes nas amostras ou substâncias tóxicas em pequenas concentrações, entre outras.

Nos ensaios com subprodutos do tratamento da água, em particular da desinfecção, como os cloritos, a bactéria apresentou sensibilidade com baixas % de inibição, concordante com o valor estipulado pela legislação de 0,7 mg/L. No caso de outro subproduto de oxidação, os cloratos, com valores legais semelhantes, foram obtidos resultados diferentes, pois as % E foram muito baixas, para concentrações elevadas (81,9 mg/L e 40,95 mg/L).

Para os ensaios com cianotoxinas, nomeadamente com microcistina-LR e anatoxina-a, para a primeira as % E foram muito baixas em elevadas concentrações (acima do limite legal de 1 µg/L), tendo-se concluído que a bactéria é sensível a esta toxina somente em elevadas concentrações (acima do limite legal), enquanto para a anatoxina-a as bactérias apresentaram elevada sensibilidade, pois baixas % E foram detetadas até uma concentração de 0,00038 µg/L detetando toxicidade abaixo do limite provisório para água de consumo 0,001 µg/L e abaixo do futuro valor guia da OMS de 30 µg/L.

Dado o elevadíssimo custo dos padrões e a dificuldade em obtê-los, foram realizados somente dois ensaios com a solução de dicloridrato de saxitoxina. Devido a sua baixa estabilidade, não foi possível obter conclusões satisfatórias sobre este composto. O valor guia da OMS, que será publicado ainda este ano, aponta para uma concentração de saxitoxina na água de 3 µg/L, sendo que foram obtidas % E abaixo desta concentração, podendo-se concluir que a bactéria é sensível a este composto.

Após este estudo, foi possível concluir que, este método, juntamente com as análises quantitativas (químicas) pode ser considerado uma ótima metodologia para detetar substâncias tóxicas potencialmente presentes em águas de consumo ou recreativas. É de ter em conta a variabilidade dos ensaios, que indica a necessidade de testar sempre novos lotes de bactérias com as substâncias de referência reportadas na norma ISO 11348-3:2007, a fim de confirmar a viabilidade das mesmas. As condições ambientais também devem ser tidas em consideração: por exemplo, as alterações repentinas na temperatura ou até na luz, pois estes fatores podem afetar o resultado final dos ensaios. Tendo em conta essa variabilidade, e tratando-se de testes biológicos, estes devem sempre acompanhados por outros ensaios.

As variações que estes tipos de ensaios apresentam, podem ser consideradas como uma desvantagem do método, devendo, sempre que possível, efetuar réplicas dos ensaios a fim de obter resultados mais robustos e trazer conclusões mais satisfatórias.

Sendo uma nova área de investigação e como ainda não existe bibliografia disponível relativamente a ensaios de toxicidade com alguns destes compostos, torna-se bastante difícil tirar conclusões sobre a toxicidade dos mesmos, utilizando bactérias *Aliivibrio fischeri*. No entanto, uma das perspectivas futuras de trabalho seria a de aprofundar este estudo, através da realização de mais testes, seja com as substâncias previamente estudadas, seja testando outras substâncias tóxicas frequentemente encontradas no ambiente.

Salienta-se, como conclusão final, que o objetivo deste trabalho foi plenamente alcançado, uma vez que foi possível implementar, e validar, com sucesso, o método de ensaio para a avaliação da toxicidade usando a bactéria bioluminescente *Aliivibrio fischeri* com o equipamento Microtox® FX, para que seja possível uma avaliação da toxicidade em diferentes matrizes de água no laboratório. Com base neste trabalho foi ainda elaborado um procedimento de análise, com base na norma ISO 11348-3:2007, que já está a ser utilizado, no laboratório, para as análises de rotina de toxicidade e, eventualmente, para a futura acreditação deste método de ensaio.

## Referências Bibliográficas

- Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., . . . Iqbal, M. (2018). *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity. *Science of the Total Environment*, 1295-1300.
- Adams, W. J., & Rowland, C. D. (2002). Aquatic toxicology test methods (chapter 2). Em D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton, & J. J. Cairns, *Handbook of Ecotoxicology* (Second Edition) (pp. 19-38). CRC press.
- Agoas, I. O. (2008). Utilização de origens de água com qualidade inferior a A3 na produção de água para consumo humano. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa .
- Águas do Algarve SA. (2019). Principais infraestruturas. Obtido em 12 de Janeiro de 2019, de Água do Algarve: <https://www.aguasdoalgarve.pt/>
- Ajuzieogu, C. A., Odokuma, L. O., & Chikere, C. B. (2018). Toxicity Assessment of Produced Water Using Microtox Rapid Bioassay. *South Asian Journal of Research in Microbiology*, 1(4):1-9.
- Al-Outom, F., Al-Ghouti, M. A., Ahmed, T. A., Abu-Dieyeh, M., & Ali, M. (2016). Desinfection by-products of chlorine dioxide (chlorite, chlorate and trihalomethanes): Occurrence in drinking water in Qatar. *Chemosphere*, 164:649-656.
- Balaji, P. B., Santhanam, P., Nandakumar, R., & Jayalakshmi, T. (2019). Detection of Cyanotoxins of Cyanobacterial (*Microcystis aeruginosa*) Strain Using Microtox® Bioluminescence Bioassay. Em P. Santhanam, A. Begum, & P. Pachiappan, *Basic and Applied Phytoplankton Biology*. Singapore: Springer.
- Barbosa, R. F. (2005). Caracterização química e ecotoxicológica de escórias de cinzas resultantes da combustão de lamas e carvão. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa.
- Barras, V., & Greub, G. (2014). History of biological warfare and bioterrorism. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(6):497-502.
- Bijelovic, S. V., Jevtic, M., Dragic, N., Zivadinovic, E., Lukic, D., & Medic, D. (2017). Risk assessment of drinking water from public wells. *Medicinski Pregled*, 70(9-10):297-306.
- Bodini, S. F., Malizia, M., Tortelli, A., Sanfilippo, L., Zhou, X., Arosio, R., . . . Moschetta, P. (2018). Evaluation of a novel automated water analyzer for continuous monitoring of toxicity and chemical parameters in municipal water supply. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157:335-342.
- Boynton, L. (2009). Using bioluminescent bacteria to detect water contamination. *Journal of the U.S. SJWP*, 29-41.
- Bralower, T., & Bice, D. (2019). Distribution of Water on the Earth's Surface. Obtido em 11 de Janeiro de 2019, de Earth 103: Earth in the Future: <https://www.e-education.psu.edu/earth103/node/701>
- Brota, G. A. (2012). Ensaios ecotoxicológicos em organismos-teste *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri* na avaliação de efluentes sanitários aplicados na cultura de eucalipto (*Eucalyptus eurograndis*). Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
- Carpenter, A., & Khiari, D. (2016). *Managing Cyanotoxins in drinking water: A technical guidance manual for drinking water professionals*. USA: American Water Works Association and Water Research Foundation.

- Chorus , I., & Bartram, J. (1999). Toxic cyanobacteria in water : a guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization.
- Cisternas, R. A. (2007). Formação de trihalometanos utilizando dióxido de cloro e cloro como oxidantes e remoção por adsorção em carvão ativado em pó . Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
- Codd, G. A. (2000). Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, 16:51-60.
- Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. R., & Espindola, E. G. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quimica Nova*, 31, 1820-1830.
- Damo, R., & Icka, P. (2013). Evaluation of water quality index for drinking water. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22, 1045-1051.
- Decreto-Lei 130/95. (s.d.). de 5 de Junho, Cria a sociedade Águas do Sotavento Algarvio, S. A.
- Decreto-Lei 136/95. (s.d.). de 12 de Junho, Cria a sociedade Águas do Barlavento Algarvio, S. A.
- Decreto-Lei 168/2000. (s.d.). de 5 de Agosto, Constitui a sociedade Águas do Algarve, S. A., por fusão das sociedades Águas do Sotavento Algarvio, S. A., e Águas do Barlavento Algarvio, S. A., constituídas, respectivamente, pelos Decretos-Leis n.os 130/95, de 5 de Junho, e 136/95, de .
- Decreto-lei 379/93. (s.d.). de 5 de Novembro, Permite o acesso de capitais privados às actividades económicas de captação, tratamento e rejeição de efluentes e recolha e tratamento de resíduos sólidos.
- Decreto-Lei nº 152/2017 . (s.d.). de 7 dezembro, Altera o regime da qualidade da água para consumo humano, transpondo as Diretivas n.os 2013/51/EURATOM e 2015/1787.
- Decreto-Lei nº 152/2017. (s.d.). de 7 de Dezembro, procede à segunda alteração do Decreto -Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto, alterado pelo Decreto -Lei n.º 92/2010, de 26 de julho, que estabelece o regime da qualidade da água para consumo humano.
- Delpiaz, N. (2014). Gestione sostenibile dei deflussi urbani: Applicazioni in Alto Adige. Dipartimento del territorio e sistemi agro-forestali. Padova, italia: Università degli Studi di Padova.
- Devic, E., Li, D., Dauta, A., Henriksen, P., Codd, G. A., Marty, J. L., & Fournier, D. (2002). Detection of Anatoxin-a(s) in Environmental Samples of Cyanobacteria by Using a Biosensor with Engineered Acetylcholinesterases. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4102-4106.
- DIRETIVA 2008/105/CE. (s.d.). de 16 Dezembro 2008, Relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que altera e subsequentemente revoga as Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE do Conselho, e que altera a Directiva 2000/60/CE.
- Douterelo, I., Sharpe, R. I., & Boxall, J. B. (2013). Influence of hydraulic regimes on bacterial community structure and composition in an experimental drinking water distribution system. *Water Research*, 47, 503-516.
- Duarte, D. M. (2016). Avaliação da toxicidade de lamas de ETAR. Faculdade de Ciências. Porto: Universidade do Porto.
- Ekeh, F., Ekechukwu, E., Atama, C., Ezenwajaku, F., Ohanu , C., Nzei , J., . . . Dibuah, U. (2018,). Oxidative stress responses of juvenile catfish, *Clarias gariepinus* exposed to potassium dichromate at sublethal concentrations in south-eastern Nigeria. *African Journal of Aquatic Science*, 43(4): 393–403.
- EPA. (2015). Health effects support document for the cyanobacterial toxin anatoxin-a. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

- Etoumi , A., Khalloufi, F., El Ghazali, I., Oudra, B., Amrani, A., Nasri, H., & Bouaicha, N. (2011). Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health. Em G. Kattel, Zooplankton and Phytoplankton (pp. 1-34). New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Fernández-Piñas, F., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., González-Pleiter, & Muñoz-Martín, M. A. (2014). Evaluation of the ecotoxicity of pollutants with bioluminescent microorganisms. Em G. Thouand, & R. Marks, Bioluminescence: Fundamental and Applications in Biotechnology- Volume 2. Berlin: Springer.
- Franco, S. P. (2015). Recursos Hídricos na Região Hidrográfica das Ribeiras do Algarve. Faculdade de Ciência e Tecnologia. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa.
- Funari, E., & Testai, E. (2008). Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 38:97-125.
- Girotti , S., Bolelli , L., Roda, A., Gentilomi , G., & Musiani, M. (2002). Improved detection of toxic chemicals using bioluminescent bacteria. *Analytica Chimica Acta*, 113-120.
- Gomes , A. D. (2007). Avaliação da Ecotoxicidade de Águas Superficiais - Aplicação à Bacia Hidrográfica do Rio Leça. Faculdade de Engenharia . Porto: Universidade do Porto.
- Halmi, M. E., Jirangon, H., Johari, W., Abdul Rachman, A. R., Shukor, M. Y., & Syed, M. A. (2014). Comparison of microtox and xenoassay light as a near real time river monitoring assay for heavy metals. *The Scientific World Journal*, 1-10.
- Health Canada . (2008). Guidelines for canadian drinking water quality: Guideline technical document - Chlorite and Chlorate . Ottawa, Ontario: Water Quality and Health Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada.
- Hebaiti, M., Stedmon, C. A., Stenroth, K., Rauch, S., Toljander, J., Save-Soderbergh, M., & Murphy, K. R. (2017). Assessment of drinking water quality at the tap using fluorescence spectroscopy. *Water Research*, 125, 1-10.
- Hoffman , D. J., Rattner, B. A., Burton, G. A., & Cairns, J. (2002). Handbook of Ecotoxicology (Second Edition). CRC Press.
- ISO 11348-3:2007. (s.d.). Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- ISO/IEC 17025:2018. (s.d.). Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.
- Kettliz, B., Kemendi , G., Thorgrimsson, N., Cattoor, N., Verzeznassi, L., Le Bail-Collet, Y., . . . Stadler, R. H. (2016). Why chlorate occurs in potable water and processed foods: a critical assessment and challenges faced by the food industry. *Food additives & Contaminants*, 1-15.
- Koçbaşı, F., & Oral, R. (2015). *Daphnia magna* as a test species for toxicity evaluation of municipal wastewater treatment plant effluents on freshwater cladoceran in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15:619-624.
- Kulkarni, V. S., & Kulkarni, B. S. (2015). Isolation of bioluminescent bacteria and their application in toxicity testing of chromium in water. *Internal Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(10), 23-32.
- Lindner, P., Molz, R., Yacoub-George, E., Durkop, A., & Wolf, H. (2004). Development of highly sensitive inhibition immunoassay for microcystin-LR. *Analytica Chimica Acta*, 521:37-44.
- Madad, S. S. (2014). Bioterrorism: An emerging global health threat. *Journal of Bioterrorism & Biodefense*, 5 (1).

- Magalhães, D., & Ferrão-Filho, A. (2008). A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12(3), pp. 355-381.
- Marchini, S. (2005). Ecotossicologia e qualità delle acque. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità*, 41(3), 371-379.
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, pp. 1–7.
- Meinhardt, P. L. (2005). Water and Bioterrorism: Preparing for the potential threat to U.S water supplies and public health. *Annual Review of Public Health*, 26:213-37.
- Mello, F. D., Braid, N., Marçal, H., Guillemin, G., Nabavi, S. M., & Neilan, B. A. (2018). Mechanisms and effects posed by neurotoxic products of cyanobacteria/microbial eukaryotes/dinoflagellates in algae blooms: a Review. *Neurotoxicity Research*, 33:153-167.
- Mendes, B. (2010). Microbiologia da água. Em W. F. Ferreira, J. C. de Sousa, & N. Lima, *Microbiologia* (pp. 506-520). Lisboa: Lidel.
- Mobilia, K. C., Hutchison, J. M., & Zilles, J. L. (2017). Characterizing isozymes of chlorite dismutase for water treatment. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-8.
- MODERNWATER. (2017). Microtox® FX Analyser - User Manual. MODERNWATER.
- MODERNWATER. (2019). Toxicity monitoring. Obtido em 13 de Março de 2019, de MODERNWATER: <https://www.modernwater.com/monitoring/products/toxicity>
- Molina, A. J., Tuazon, R. M., & Larman, N. (2015). Responses of bioluminescent bacteria isolated from philippine marine fishes to various heavy metals. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(13):38-42.
- Mourato, M. (2014). Determinação de clorofenóis em águas por LC-MS/MS. Caso de estudo: 2-amino-4-clorofenol. Lisboa: Técnico Lisboa.
- Muro, G. (2014). Tossine prodotte dai cianobatteri in acqua dolce: tossicità e impatto sulla salute. Dipartimento di Farmacia. Pisa, Italia: Università di Pisa.
- Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., & Moffitt, M. C. (2013). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1239-1253.
- Niemirycz, E., Nithaus, J., Staniszevska, M., Nałecz-Jawecki, G., & Bolalek, J. (2007). The Microtox® biological test: Application in toxicity evaluation of surface waters and sediments in Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 36, 151-163.
- Ottaviani, M., Drusiani, R., Lucentini, L., Ferretti, E., & Bonadonna, L. (2005). Sicurezza dei sistemi acquedottistici. Dipartimento di Ambiente e Prevenzione Primaria. Roma: Istituto Superiore di Sanità.
- Parvez, S., Venkataraman, C., & Mukherji, S. (2006). A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*, 32, 265-268.
- Peterson, E. K., Buchwalter, D. B., Kerby, J. L., LeFauve, M. K., Varian-Ramos, C. W., & Swaddle, J. P. (2017). Integrative behavioral ecotoxicology: bringing together fields to establish new insight to behavioral ecology, toxicology, and conservation. *Current Zoology*, 63(2), 185–194.
- Petrachi, S. (2015). Valutazione della presenza di microcistine in acque stagnanti in aree della toscana del nord. Dipartimento di Farmacia. Pisa, Italia: Università di Pisa.
- Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D., & Clesceri, L. S. (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater 22nd edition. Washington: American Public Health Association.

- Rizzo , L., Belgiorino , V., & Casale, R. (2004). Control of disinfection by-products in drinking water treatment plant. International Symposium on Sanitary and Environmental Engineering . Taormina (Italy): SIDISA 2004).
- Roccaro, P., Mancini, G., & Vagliasindi, F. G. (2005). Water intended for human consumption-Part I: Compliance with European water quality standards. *Desalination*, 176:1-11.
- Rodrigues , P. F. (2017). Metodologia de avaliação do potencial de ecotoxicidade de matérias-primas e materiais de construção de base cimentícia. Lisboa: Técnico Lisboa.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M. R., & Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49:31-54.
- Rubinger, C. F. (2009). Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.
- Rutkowska, M., Plotka-Wasyłka, J., Majchrzak, T., Wojnowski, W., Mazur-Marzec , H., & Namiesnik, J. (2019). Recent trends in determination of neurotoxin in aquatic environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 112-122.
- Satoh, T., & Inayat-Hussain, S. H. (2009). Environmental toxicology and human health. Em T. Satoh, *Environmental toxicology and human health* (Vol. 1, pp. 1-42). Oxford, United Kingdom: EOLSS.
- Schreiber, B., Fischer , J., Schiwy, S., Hollert, H., & Schulz, R. (2018). Towards more ecological relevance in sediment toxicity testing with fish: Evaluation of multiple bioassays with embryos of the benthic weatherfish (*Misgurnus fossilis*). *Science of the Total Environment*, 391-400.
- Shaikh, A. S., & Prabhu, S. (2017). Bioluminescent bacteria: The sparkling hope for pollution detection. *Indian Journal of Scientific Research*, 8(1):125-130.
- Sieroslawska, A. (2014). Evaluation of usefulness of microbial assay for risk assessment (MARA) in the cyanobacterial toxicity estimation . *Environmental Monitoring and Assessment*, 186:4629-4636.
- Silva, T. V. (2017). Bioensaios toxicológicos na bacia hidrográfica do Rio Pardo (UGRHI 04) Brasil. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo.
- Soares de Mendonça, V. (2005). Aplicabilidade de testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*, no monitoramento da qualidade das águas de bacias hidrográficas: O caso do rio Ipojuca em Pernambuco. Recife: Universidade Federal de Pernambuco.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., & Schleifer, K. H. (2000). Microbiological safety of drinking water. *Annual Review of Microbiology*, 54(1):81-127.
- Testai, E., Scardala, S., Vichi, S., Buratti , F. M., & Funari, E. (2016). Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Critical Reviews in Toxicology*, 46, 385-419.
- Truhaut, R. (1977). Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1, 151-173.
- Vasconcelos, V. O. (1995). Toxicologia de cianobactérias: Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves. Faculdade de Ciências . Porto: Universidade do Porto .
- Vega Morales, T., Montesdeoca Esponda, S., Santana Rodríguez, J. J., Efremova , S., & Aaron, J. J. (2010). Luminescence methods for study and determination of pollutants in the environment. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 29, 1-42.

- WHO. (2003). Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Geneva: World Health Organization .
- WHO. (2016). Chlorine Dioxide, Chlorite and Chlorate in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality . Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2017). Guidelines for drinking-water quality: fourth edition Incorporating the first addendum. Geneva: World Health Organization.
- William, T. D., Hutchinson, T. H., Roberts, G. C., & Coleman, C. A. (1993). The assessment of industrial effluent toxicity using aquatic microorganisms, invertebrates and fish. *Science of the Total Environment*, 134, 1129-1141.
- Willmig, M. M., Qin , G., & Maul, J. D. (2013). Effect of environmentally realistic daily temperature variation on pesticide toxicity to aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 2738-2745.
- Woutersen, M., Belkin, S., Brouwer, B., Van Wezel, A. P., & Heringa , M. B. (2011). Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400:915-929.

# Apêndice I- Ensaio com matrizes de Água

## Águas Brutas

1) 23,6°C teste 81,9 diluições Exposição 15 min

Dark	03/28/19	15:10:28	23		
Control(s)	03/28/19	15:18:32		11236647	9699599
tem	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
10,24	03/28/19	15:18:50	-4	10954893	9902506
20,48	03/28/19	15:19:12	-8	10860555	10203586
40,95	03/28/19	15:19:32	-12	10878830	10597743
81,90	03/28/19	15:19:54	-12	11836167	11480506

2) 24,8°C teste 81,9 diluições exposição 15 min

Dark	03/28/19	16:33:39	29		
Control(s)	03/28/19	16:40:55		2704597	2218372
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
10,24	03/28/19	16:41:13	-3	3351716	2847962
20,48	03/28/19	16:41:37	-10	3476916	3146807
40,95	03/28/19	16:41:57	-9	3768996	3378098
81,90	03/28/19	16:42:21	-14	4451760	4163498

3) 23,0°C teste 81,9 exposição 5 min

Dark	03/29/19	11:40:53	26		
Control(s)	03/29/19	11:46:57		2857350	2485341
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
	03/29/19	11:47:14	-12	2811421	2744228

4) 21,0°C teste 81,9 Exposição 15 min

Dark	03/29/19	14:12:09	10		
Control(s)	03/29/19	14:20:09		11314183	9310860
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
	03/29/19	14:20:33	-6	11804577	10393487

5) 24,4°C 81,9 exposição 30 min

Dark	03/29/19	15:56:19	33		
Control(s)	03/29/19	16:27:18		7261256	4922356
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
	03/29/19	16:27:34	-15	7129308	5579962

## Águas brutas Subterraneas

1) 81,9 % tempo exposição 30 min

Dark 04/03/19 11:42:54 19

Control(s) 04/03/19 12:15:41 7580693 5753800

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
10,24	04/03/19 12:15:58	1	7733468	5804409
20,48	04/03/19 12:16:15	-2	7580693	5925669
40,95	04/03/19 12:16:34	-6	7756181	6277735
81,9	04/03/19 12:16:56	-16	7417638	6547690

2) 24,4°C Teste 81,9 % Exposição 5 min

Dark 04/04/19 14:47:15 19

Control(s) 04/04/19 14:56:43 10179933 8745644

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
0,32	04/04/19 14:57:00	-1	11833748	10323056
0,64	04/04/19 14:57:19	-3	9801237	8684502
1,28	04/04/19 14:57:38	-5	10694230	9694249
2,56	04/04/19 14:57:57	-3	10385138	9219203
5,12	04/04/19 14:58:16	0	10444034	9011814
10,24	04/04/19 14:58:33	-4	10276436	9263749
20,48	04/04/19 14:58:51	-6	10468810	9605949
40,95	04/04/19 14:59:08	-7	10706547	9892293
81,90	04/04/19 14:59:25	-14	10493569	10326161

## Água Tratada

1) 22,1°C teste 81,9% exposição 5 min

Dark 04/09/19 11:47:09 20

Control(s) 04/09/19 11:53:14 10278964 9106295

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
Sample# 1	04/09/19 11:53:31	-10	10423772	10217197

## Água de Barragem

1) 23,4°C T:45 % Exposição 5 min

Dark 04/09/19 15:21:05 25

Control(s) 04/09/19 15:28:21 2069076 1818745

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
Sample# 5,63	04/09/19 15:28:38	-1	2133276	1908270
Sample# 11,25	04/09/19 15:28:56	-1	2154660	1922582
Sample# 22,50	04/09/19 15:29:12	0	3694784	3262961
Sample# 45,00	04/09/19 15:29:27	2	3607990	3080888

## Apêndice II- Cálculo da Razão dos Branços

Dicromato de Potassio 100 mg/L

1)t:23,0°C

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
Dark	04/16/19 11:04:45	14		
Control(s)	04/16/19 11:39:45	10664978	7565834	
Sample# 1	04/16/19 11:40:08	29	10418156	5208210
Sample# 2	04/16/19 11:40:33	35	9084600	4136046
Sample# 3	04/16/19 11:40:56	46	9146805	3440744
Sample# 4	04/16/19 11:41:21	66	11041422	2623868

2)T: 25,7°C

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
Dark	05/31/19 14:21:35	30		
Control(s)	05/31/19 14:54:00	18123274	11752251	
Sample# 1	05/31/19 14:54:24	18	22084644	9418941
Sample# 2	05/31/19 14:54:46	22	25679546	10436143
Sample# 3	05/31/19 14:55:11	37	25653656	8369271
Sample# 4	05/31/19 14:55:34	60	25144392	5149631

3)T:23,4°C

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
Dark	07/02/19 11:33:58	27		
Control(s)	07/02/19 12:10:36	19978327	12902105	
Sample# 1	07/02/19 12:10:56	19	19385667	9186980
Sample# 2	07/02/19 12:11:16	93	23607035	882194
Sample# 3	07/02/19 12:12:04	48	23440641	7108522
Sample# 4	07/02/19 12:12:33	68	23479505	4392622

4)T:23,4°C

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
Dark	07/04/19 11:39:57	16		
Control(s)	07/04/19 12:14:14	9991559	7033243	
Sample# 1	07/04/19 12:14:41	20	13182761	5885006
Sample# 2	07/04/19 12:15:14	28	19724930	7888313
Sample# 3	07/04/19 12:15:42	44	19758674	6199271
Sample# 4	07/04/19 12:16:12	65	19012126	3710441

5)T:22,3°C

Dark 07/24/19 09:47:18 16

Control(s) 07/24/19 10:22:23 13515816 9121343

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
Sample# 1	07/24/19 10:22:40	18	14573797	7154237
Sample# 2	07/24/19 10:22:59	30	14426855	6026324
Sample# 3	07/24/19 10:23:19	43	14373261	4896087
Sample# 4	07/24/19 10:23:37	60	14624409	3500933

6)T:21,1°C

Dark 08/02/19 11:24:18 15

Control(s) 08/02/19 11:57:47 20662311 13916695

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
Sample# 1	08/02/19 11:58:02	24	20702297	10560737
Sample# 2	08/02/19 11:58:21	38	21743027	9005660
Sample# 3	08/02/19 11:58:38	51	21172055	6870807
Sample# 4	08/02/19 11:58:59	67	20544011	4533641

7)T:25,1°C

Dark 08/08/19 16:21:13 28

Control(s) 08/08/19 16:56:42 13554189 8755994

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
Sample# 1	08/08/19 16:57:00	21	16406749	6800220
Sample# 2	08/08/19 16:57:24	32	16446788	5856933
Sample# 3	08/08/19 16:57:49	49	16404078	4316573
Sample# 4	08/08/19 16:58:13	71	16470788	2510999

8) T:22,6°C

Dark	08/19/19	09:20:31	25		
Control(s)	08/19/19	09:54:30		17967697	12147965
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/19/19	09:54:47	21	19750245	9444839
Sample# 2	08/19/19	09:55:01	32	19805721	8133510
Sample# 3	08/19/19	09:55:20	46	19549423	6439860
Sample# 4	08/19/19	09:55:35	67	19612087	3905574

9)T:27,9°C

Dark	08/20/19	16:21:04	48		
Control(s)	08/20/19	16:55:11		11289082	8355149
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/20/19	16:55:29	20	21087346	6894364
Sample# 2	08/20/19	16:55:50	36	20757646	5432345
Sample# 3	08/20/19	16:56:14	45	20232744	4480106
Sample# 4	08/20/19	16:56:35	73	20470608	2255227

10)T:23,9°C

Dark	08/27/19	17:13:16	27		
Control(s)	08/27/19	17:47:26		9800216	6665368
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/27/19	17:47:43	15	12213001	5577870
Sample# 2	08/27/19	17:48:01	32	20626841	7527309
Sample# 3	08/27/19	17:48:18	42	18437253	5733606
Sample# 4	08/27/19	17:48:36	69	18258503	3021289

11)T:22,3°C

Dark	09/11/19	11:40:14	18		
Control(s)	09/11/19	12:13:02		9409713	6273582
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	09/11/19	12:13:19	29	9104238	4263211
Sample# 2	09/11/19	12:13:36	39	13910275	5595383
Sample# 3	09/11/19	12:13:54	49	12894643	4317822
Sample# 4	09/11/19	12:14:10	65	12497508	2890600

12)T:25,0°C

Dark	09/11/19	17:18:03	23		
Control(s)	09/11/19	17:50:32		7202449	5091362
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	09/11/19	17:50:49	33	9857308	3486677
Sample# 2	09/11/19	17:51:07	38	15077893	4939538
Sample# 3	09/11/19	17:51:24	49	14456328	3882493
Sample# 4	09/11/19	17:51:41	63	14506461	2841198

13)T:23,7°C

Dark	09/12/19	10:51:24	23		
Control(s)	09/12/19	11:24:21		11029347	7588074
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	09/12/19	11:24:39	30	15811235	5148733
Sample# 2	09/12/19	11:25:12	29	18155057	5980511
Sample# 3	09/12/19	11:25:30	42	16500185	4481224
Sample# 4	09/12/19	11:25:51	61	16632074	2984760

14) T:25,1°C

Dark	09/12/19	17:07:42	40		
Control(s)	09/12/19	17:40:31		19501600	12998174
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	09/12/19	17:40:49	22	18409524	8141162
Sample# 2	09/12/19	17:41:07	29	20221232	8049368
Sample# 3	09/12/19	17:41:32	44	20630634	6442411
Sample# 4	09/12/19	17:41:49	68	19942244	3525529

Dicromato de Potassio 129 mg/L

1) 24,5°C

Dark	10/02/19	10:04:11	36		
Control(s)	10/02/19	10:37:47		4504068	2766563
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	10/02/19	10:38:02	30	4418958	1891295
Sample# 2	10/02/19	10:38:21	42	5529287	1969032
Sample# 3	10/02/19	10:38:38	51	5396942	1624023
Sample# 4	10/02/19	10:38:57	72	5664779	943281

2)25,1°C

Dark	10/02/19	11:46:55	58		
Control(s)	10/02/19	12:20:17		8873400	5476892
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	10/02/19	12:20:33	36	8506848	3354405
Sample# 2	10/02/19	12:20:50	45	9419804	3146450
Sample# 3	10/02/19	12:21:07	53	8863348	2559618
Sample# 4	10/02/19	12:21:24	72	9700587	1636443

3) 20,8°C

Dark	10/03/19	10:36:43	22		
Control(s)	10/03/19	11:10:07		16231546	10901973
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	10/03/19	11:10:22	38	14760514	6144637
Sample# 2	10/03/19	11:10:40	47	14801973	5223124
Sample# 3	10/03/19	11:10:59	55	15044455	4487686
Sample# 4	10/03/19	11:11:21	75	14926024	2505395

4) 22,2°C

Dark	10/04/19	10:28:06	31		
Control(s)	10/04/19	11:00:34		24554169	17521313
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	10/04/19	11:00:51	37	24969569	11200607
Sample# 2	10/04/19	11:01:08	48	21925679	8089605
Sample# 3	10/04/19	11:01:32	61	21070481	5780066
Sample# 4	10/04/19	11:01:54	81	21235131	2808349

5) 23,9°C

Dark 10/30/19 18:34:30 93

Control(s) 10/30/19 19:06:25 10538157 6192597

Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark
Sample# 1	10/30/19 19:06:41	28	7736689	3271954
Sample# 2	10/30/19 19:07:06	39	7450803	2658783
Sample# 3	10/30/19 19:07:26	46	6930150	2183514
Sample# 4	10/30/19 19:07:45	71	6954562	1162962

### 3,5 Diclorofenol 8 mg/L

#### 1) 23,4°C

Dark	10/29/19	17:04:38	46		
Control(s)	10/29/19	17:37:06		14950551	10550980
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	10/29/19	17:37:21	62	14746316	3918743
Sample# 2	10/29/19	17:37:43	85	16006500	1638446
Sample# 3	10/29/19	17:38:03	17	15764183	9198692
Sample# 4	10/29/19	17:38:26	94	15827683	585991

#### 2)24,0°C

Dark	10/30/19	13:04:57	81		
Control(s)	10/30/19	13:38:00		11854271	7221935
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	10/30/19	13:38:23	47	8752283	2812204
Sample# 2	10/30/19	13:38:52	86	16318613	1389387
Sample# 3	10/30/19	13:39:18	25	15045774	6863359
Sample# 4	10/30/19	13:39:40	5	16721644	9620174
Sample# 5	10/30/19	13:40:02	95	24211763	674927

#### 3) 23,9°C

Dark	10/30/19	16:11:47	187		
Control(s)	10/30/19	16:45:49		3423886	2228806
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	10/30/19	16:46:16	35	3369755	1420378
Sample# 2	10/30/19	16:46:44	77	9498417	1415143
Sample# 3	10/30/19	16:47:10	4	9256996	5728396
Sample# 4	10/30/19	16:47:41	-9	9379472	6702632
Sample# 5	10/30/19	16:48:08	93	6967063	301467

4) 24,3°C

Dark	10/30/19	16:59:24	138		
Control(s)	10/30/19	17:32:24		10817217	7069316
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	10/30/19	17:32:45	49	11466779	3810844
Sample# 2	10/30/19	17:33:10	78	3864546	549030
Sample# 3	10/30/19	17:33:30	21	3835911	1962619
Sample# 4	10/30/19	17:33:59	14	3749922	2102858
Sample# 5	10/30/19	17:34:17	95	14694881	400476

5) 23,7°C

Dark	10/31/19	14:59:15	112		
Control(s)	10/31/19	15:33:30		12305340	8204863
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	10/31/19	15:33:48	45	7450249	2687890
Sample# 2	10/31/19	15:34:14	81	10053624	1213882
Sample# 3	10/31/19	15:34:36	15	9835248	5513306
Sample# 4	10/31/19	15:34:56	-1	9930324	6748397
Sample# 5	10/31/19	15:35:14	94	12505508	485924

6) 24,9°C

Dark	10/31/19	16:41:00	108		
Control(s)	10/31/19	17:14:26		5596255	5067559
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	10/31/19	17:14:42	40	11746288	6278358
Sample# 2	10/31/19	17:15:14	25	5648497	3826124
Sample# 3	10/31/19	17:15:40	60	13194779	4753559
Sample# 4	10/31/19	17:16:01	87	12348804	1450829
Sample# 5	10/31/19	17:16:20	96	12796441	398608

Cloritos 25 mg/L |

1) T:23,2°C

Dark	04/30/19	11:29:29	33		
Control(s)	04/30/19	11:50:10		12473906	9722702
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	04/30/19	11:50:30	0	12239553	9466344
Sample# 2	04/30/19	11:50:54	3	11239654	8426461
Sample# 3	04/30/19	11:51:15	7	11449462	8211798
Sample# 4	04/30/19	11:51:39	17	11510080	7419809
Sample# 5	04/30/19	11:52:07	27	11612930	6561146
Sample# 6	04/30/19	11:52:30	76	11537330	2118998

2)T:22,1°C

Dark	06/27/19	11:39:26	20		
Control(s)	06/27/19	11:59:24		14563942	11333237
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	06/27/19	11:59:49	3	14264587	10658267
Sample# 2	06/27/19	12:00:16	1	19196654	14719610
Sample# 3	06/27/19	12:00:42	5	19016550	13928708
Sample# 4	06/27/19	12:01:05	14	19635630	13056547
Sample# 5	06/27/19	12:01:28	22	9743724	5875351
Sample# 6	06/27/19	12:01:54	46	9778283	4069332

3)T:22,2°C

Dark	07/26/19	12:27:13	13		
Control(s)	07/26/19	12:45:11		23689615	18990659
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	07/26/19	12:45:26	-32	23852495	25240453
Sample# 2	07/26/19	12:45:46	3	24843917	19267715
Sample# 3	07/26/19	12:46:05	6	24770125	18541967
Sample# 4	07/26/19	12:46:24	19	25799439	16651460
Sample# 5	07/26/19	12:46:47	39	24469205	11833482
Sample# 6	07/26/19	12:47:11	69	24797809	6018523

## 4)T:23,4°C

Dark	07/26/19	17:31:06	41		
Control(s)	07/26/19	17:50:57		8471524	6527734
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	07/26/19	17:51:13	-1	7864180	6132089
Sample# 2	07/26/19	17:51:34	10	19894039	13659404
Sample# 3	07/26/19	17:51:51	9	18437427	12846349
Sample# 4	07/26/19	17:52:10	14	18052131	11882031
Sample# 5	07/26/19	17:52:30	34	18205841	9146247
Sample# 6	07/26/19	17:52:50	64	18036717	4913298

## 5)T:25,0°C

Dark	08/19/19	16:57:02	34		
Control(s)	08/19/19	17:22:51		22467674	16359472
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/19/19	17:23:05	-3	22182554	16640237
Sample# 2	08/19/19	17:23:24	1	23266744	16697188
Sample# 3	08/19/19	17:23:43	2	22292666	15771292
Sample# 4	08/19/19	17:24:04	3	23058286	16142511
Sample# 5	08/19/19	17:24:25	18	18759972	11180708
Sample# 6	08/19/19	17:24:47	35	18876234	8911946

## 6)T:23,1°C

Dark	08/20/19	09:18:42	15		
Control(s)	08/20/19	09:38:12		23118143	18311541
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/20/19	09:38:27	2	22946055	17718573
Sample# 2	08/20/19	09:38:46	4	23545785	17737983
Sample# 3	08/20/19	09:39:05	5	23120943	17273281
Sample# 4	08/20/19	09:39:22	11	24023685	16788305
Sample# 5	08/20/19	09:39:38	24	24104285	14444368
Sample# 6	08/20/19	09:39:58	43	23981943	10665754

7)T:26,4°C

Dark	08/29/19	16:27:53	38		
Control(s)	08/29/19	16:51:46	19755532	14112490	
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/29/19	16:52:02	2	20299108	14163064
Sample# 2	08/29/19	16:52:24	4	22173516	15102749
Sample# 3	08/29/19	16:52:42	5	21306224	14379489
Sample# 4	08/29/19	16:53:04	18	22100556	12805155
Sample# 5	08/29/19	16:53:22	54	23967476	7791232
Sample# 6	08/29/19	16:53:41	58	23041710	6780642

8)T:23,5°C

Dark	08/30/19	16:46:19	22		
Control(s)	08/30/19	17:06:16	14716121	11308085	
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/30/19	17:06:36	4	14056507	10359133
Sample# 2	08/30/19	17:06:54	6	13975831	10025929
Sample# 3	08/30/19	17:07:10	13	14533907	9641872
Sample# 4	08/30/19	17:07:27	24	14486208	8431727
Sample# 5	08/30/19	17:07:45	40	14377302	6531677
Sample# 6	08/30/19	17:08:04	69	14847529	3454436

Anatoxina-a

1)T:25,4°C

Dark	08/09/19	12:36:59	33		
Control(s)	08/09/19	13:00:17		18836379	13825931
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/09/19	13:00:34	58	18449911	5559024
Sample# 2	08/09/19	13:00:55	87	18517185	1762242
Sample# 3	08/09/19	13:01:15	98	18404971	250609
Sample# 4	08/09/19	13:01:37	99	18272235	24601

2)T:25,5°C

Dark	08/09/19	14:14:39	41		
Control(s)	08/09/19	14:38:59		12693470	9355240
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/09/19	14:39:16	30	12662457	6523396
Sample# 2	08/09/19	14:39:40	66	12225852	2990517
Sample# 3	08/09/19	14:40:00	91	12429120	817957
Sample# 4	08/09/19	14:40:24	98	12009016	169623

3) T:25,2°C

Dark	08/09/19	15:01:10	30		
Control(s)	08/09/19	15:21:10		13893314	10562610
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/09/19	15:21:32	10	13470827	9153821
Sample# 2	08/09/19	15:21:52	35	14157109	6914836
Sample# 3	08/09/19	15:22:11	68	13327976	3160974
Sample# 4	08/09/19	15:22:33	91	13636332	921544

4)T:24,6°C

Dark	08/12/19	17:31:52	32		
Control(s)	08/12/19	17:49:55		24707870	18348926
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/12/19	17:50:13	9	25069974	16831586
Sample# 2	08/12/19	17:50:39	26	25299944	13838176
Sample# 3	08/12/19	17:50:59	61	25013074	7218220
Sample# 4	08/12/19	17:51:22	87	24774948	2350575

5)T:24,7°C

Dark	08/13/19	17:39:07	25		
Control(s)	08/13/19	17:58:35	21119709	15336487	
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/13/19	17:59:12	4	20457247	14138495
Sample# 2	08/13/19	17:59:37	16	20647745	12512904
Sample# 3	08/13/19	17:59:58	49	20721679	7531655
Sample# 4	08/13/19	18:00:21	83	20878033	2442953

6)T:24,0°C

Dark	08/14/19	17:31:25	25		
Control(s)	08/14/19	17:49:28	20718071	15555976	
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/14/19	17:49:43	4	20708537	14826623
Sample# 2	08/14/19	17:50:04	8	20860637	14349766
Sample# 3	08/14/19	17:50:23	31	20677527	10563155
Sample# 4	08/14/19	17:50:43	69	20969387	4810936

## Saxitoxina

1)T:25,5°C

Dark	08/09/19 16:58:53	34			
Control(s)	08/09/19 17:18:15		17967658	12894476	
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/09/19 17:18:30	10	18509172	11945653	
Sample# 2	08/09/19 17:18:46	10	17762868	11450632	
Sample# 3	08/09/19 17:19:07	22	17767940	9819791	
Sample# 4	08/09/19 17:19:25	37	17813568	7990244	

2)T:25,5°C

Dark	08/09/19 17:35:19	38			
Control(s)	08/09/19 17:54:18		11303579	8149184	
Item	DateTime	Result	RawBefore-Dark	RawAfter-Dark	
Sample# 1	08/09/19 17:54:33	3	11115907	7699719	
Sample# 2	08/09/19 17:54:51	10	10691401	6926892	
Sample# 3	08/09/19 17:55:10	22	11594216	6490164	
Sample# 4	08/09/19 17:55:33	42	12012839	4955306	



Apêndice III- Tabelas com resultados das concentrações/efeito e respectivos valores de  $EC_{50}$ ,  $EC_{20}$  e  $EC_{10}$

Dricromato de Potássio 100 mg/L

Dias	T°C	Branco	81,9	40,95	20,48	10,24	CE <sub>50</sub> Probit mg/L	CE <sub>20</sub> mg/L	CE <sub>10</sub> mg/L	CE <sub>50</sub> Software Microtox mg/L	CE <sub>50</sub> Método Estatístico
			mg/L	mg/L	mg/L	mg/L					
16/abr	23,0	0,709	66	46	35	29	40,74	6,50	2,49	42,9	39,18
31/mai	25,7	0,65	60	37	22	18	62,95	14,39	6,65	57,5	59,62
02/jul	23,4	0,65	68	48	93*	19	41,28	11,16	5,62	40,8	41,99
04/jul	23,4	0,70	65	44	28	20	47,57	11,58	5,52	46,3	46,43
24/jul	22,3	0,67	60	43	30	18	53,7	11,83	5,37	53,9	47,64
02/ago	21,1	0,67	67	51	38	24	37,24	8,02	3,59	38,4	34,78
08/ago	25,1	0,65	71	49	32	21	38,72	10,69	5,44	37,2	39,22
19/ago	22,6	0,67	67	46	32	21	43,00	10,47	4,99	42,2	41,97
20/ago	27,9	0,74	73	45	36	20	38,03	10,67	5,48	35,9	40,50
27/ago	23,9	0,68	69	42	32	15	44,46	13,52	7,25	42,0	46,27
11/Set	22,3	0,66	65	49	39	29	37,75	5,67	2,10	40,1	34,71
11/Set	25,0	0,71	63	49	38	33	39,14	4,14	1,27	41,8	34,53
12/Set	23,7	0,68	61	42	29	30	53,31	6,72	2,27	51,4	47,24
12/Set	25,1	0,66	68	44	29	22	44,01	10,73	5,12	42,2	45,17

Dicromato de Potássio 129,2 mg/L

Dias	T°C	Branco	105,65	52,83	26,41	13,21	CE <sub>50</sub> Probit mg/L	CE <sub>20</sub> mg/L	CE <sub>10</sub> mg/L	CE <sub>50</sub> Software Microtox mg/L	CE <sub>50</sub> Método Estatístico mg/L
			mg/L	mg/L	mg/L	mg/L					
			Efeitos (%) após 30 min de exposição								
02/out	24,5	0,61	72	51	42	30	39,42	7,58	3,19	41,22	41,41
02/out	25,1	0,62	72	53	45	36	33,90	4,96	1,81	37,07	37,08
03/out	20,8	0,67	75	55	47	38	29,81	4,69	1,78	32,88	36,19
04/out	22,2	0,71	81	61	48	37	26,55	6,1	2,83	28,79	31,87
30/out	23,9	0,61	71	46	36	28	47,14	9,57	4,15	46,74	49,86

3,5-Diclorofenol 8 mg/L

Dias	T°C	Branços	6,55	5,36	4,39	3,69	3,44	3,28	CE <sub>50</sub> Probit mg/L	CE <sub>20</sub> mg/L	CE <sub>10</sub> mg/L	CE <sub>50</sub> Software Microtox mg/L	CE <sub>50</sub> Método Estatístico mg/L
			mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L					
29/out	23,4	0,71	94	85	62	-	-	17	4,15	3,43	3,03	3,88	4,27
30/out	24,0	0,61	95	86	47	-	25	5	4,38	3,61	3,27	3,82	4,68
30/out	23,9	0,65	93	77	35	-	4	+9	4,77	4,05	3,74	4,15	4,99
30/out	24,3	0,65	95	78	49	-	21	14	4,33	3,47	3,09	3,87	4,69
31/out	23,7	0,67	94	81	54	-	15	+1	4,37	3,55	3,18	4,08	4,55
31/out	24,9	0,9	96	87	60	25	40	-	4,22	3,46	3,12	4,14	4,18

Cloritos 25 mg/L

Dias	T°C	Branco	20,48	10,24	5,12	2,56	1,28	0,64	CE <sub>50</sub> Probit mg/L	CE <sub>20</sub> mg/L	CE <sub>10</sub> mg/L	CE <sub>50</sub> Software Microtox mg/L	CE <sub>50</sub> Método Estatístico mg/L
			mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L					
30/abr	23,2	0,78	76	27	17	7	3	0	13,43	5,12	3,09	9,1	15,19
27/jun	22,1	0,78	46	22	14	5	1	3	33,65	7,94	3,72	25,2	22,38
26/jul	22,2	0,80	69	39	19	6	3	0	13,12	4,99	3,01	10,9	13,88
26/jul	23,4	0,77	64	34	14	9	10	0	17,58	4,41	2,14	13,1	15,83
19/ago	25,0	0,73	35	18	3	2	1	+3	41,58	13,00	7,08	37,8	26,90
20/ago	23,1	0,79	43	24	11	5	4	2	33,06	8,18	3,94	27,73	24,37
29/ago	26,4	0,71	58	54	18	5	4	2	14,66	4,58	2,49	13,45	11,63
30/ago	23,5	0,77	69	40	24	13	6	4	12,89	3,48	1,75	10,62	13,01

Anatoxina-a 0,15 µg/L

Dias	T°C	Branco	12,29x10 <sup>-3</sup>	6,14x10 <sup>-3</sup>	3,07x10 <sup>-3</sup>	1,54x10 <sup>-3</sup>	0,77x10 <sup>-3</sup>	0,38x10 <sup>-3</sup>	CE <sub>50</sub> Probit µg/L	CE <sub>20</sub> µg/L	CE <sub>10</sub> µg/L	CE <sub>50</sub> Software Microtox µg/L	CE <sub>50</sub> Método Estatístico
			µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L					
9/Ago	25,4	0,73	99	98	87	58	-	-	1,12x10 <sup>-3</sup>	5,06x10 <sup>-4</sup>	3,3x10 <sup>-4</sup>	1,72x10 <sup>-3</sup>	1,75x10 <sup>-3</sup>
9/Ago	25,5	0,74	-	98	91	66	30	-	1,22x10 <sup>-3</sup>	6,15x10 <sup>-4</sup>	4,46x10 <sup>-4</sup>	1,34x10 <sup>-3</sup>	1,26x10 <sup>-3</sup>
9/Ago	25,2	0,76	-	-	91	68	35	10	1,05x10 <sup>-3</sup>	5,39x10 <sup>-4</sup>	3,79x10 <sup>-4</sup>	0,86x10 <sup>-3</sup>	1,12x10 <sup>-3</sup>
12/ago	24,6	0,74	-	-	87	61	26	9	1,21x10 <sup>-3</sup>	6,03x10 <sup>-4</sup>	4,18x10 <sup>-4</sup>	0,98x10 <sup>-3</sup>	1,33x10 <sup>-3</sup>
13/ago	24,7	0,73	-	-	83	49	16	4	1,54x10 <sup>-3</sup>	8,06x10 <sup>-4</sup>	5,75x10 <sup>-4</sup>	1,16x10 <sup>-3</sup>	1,80x10 <sup>-3</sup>
14/ago	24,0	0,75	-	-	69	31	8	4	2,22x10 <sup>-3</sup>	10,36x10 <sup>-4</sup>	6,94x10 <sup>-4</sup>	1,79x10 <sup>-3</sup>	2,3x10 <sup>-3</sup>

Saxitoxina 10 µg/L

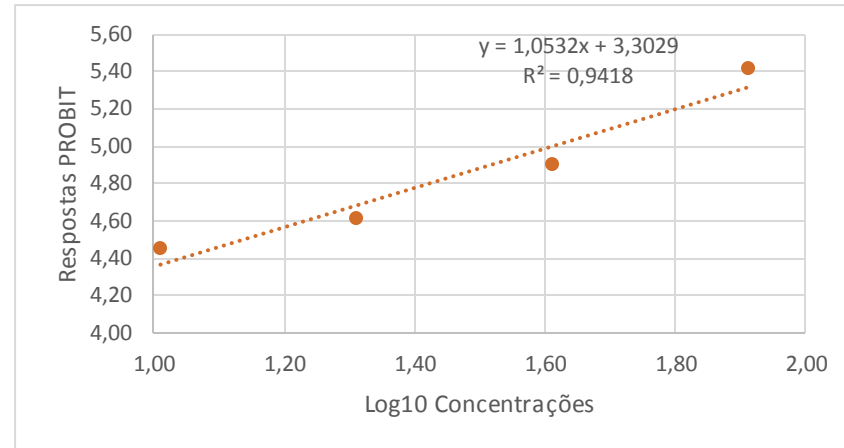
Dias	T°C	Branco	8,190	4,095	2,048	1,024	0,512	CE <sub>50</sub> Probit µg/L	CE <sub>20</sub> µg/L	CE <sub>10</sub> µg/L	CE <sub>50</sub> Software Microtox µg/L	CE <sub>50</sub> Método Estatístico
			µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L					
			Efeitos (%) após 15 min de exposição									
09/ago	25,5	0,72	-	37	22	10	10	9,56	1,69	0,68	7,09	5,82
09/ago	25,5	0,72	42	22	10	3	-	9,76	2,01	0,88	12,08	9,78



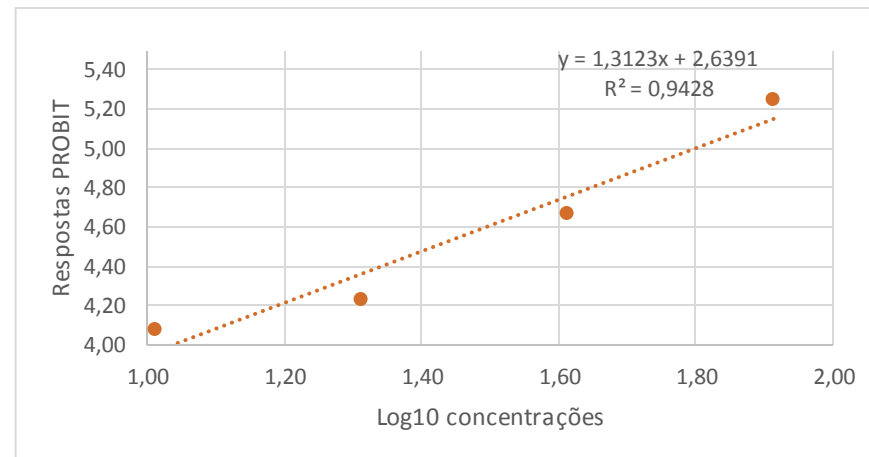
## Apêndice IV-Modelo Probit

Dicromato de Potássio 100 mg/L

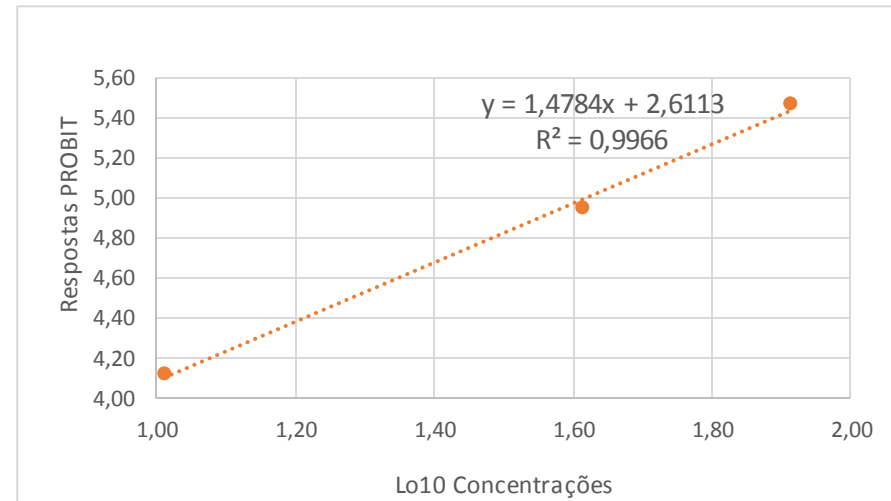
16/abr			
Concentrações (mg /L)	Log	Respostas (%)	Respostas Probit
10,24	1,01	29	4,45
20,48	1,31	35	4,61
40,95	1,61	46	4,9
81,9	1,91	66	5,41



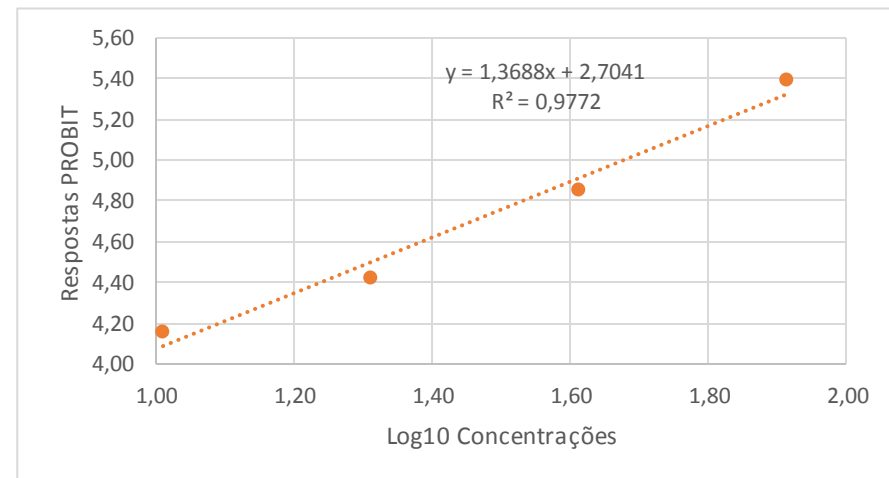
31/mai			
Concentrações (mg /L)	Log	Respostas (%)	Respostas Probit
10,24	1,01	18	4,08
20,48	1,31	22	4,23
40,95	1,61	37	4,67
81,9	1,91	60	5,25



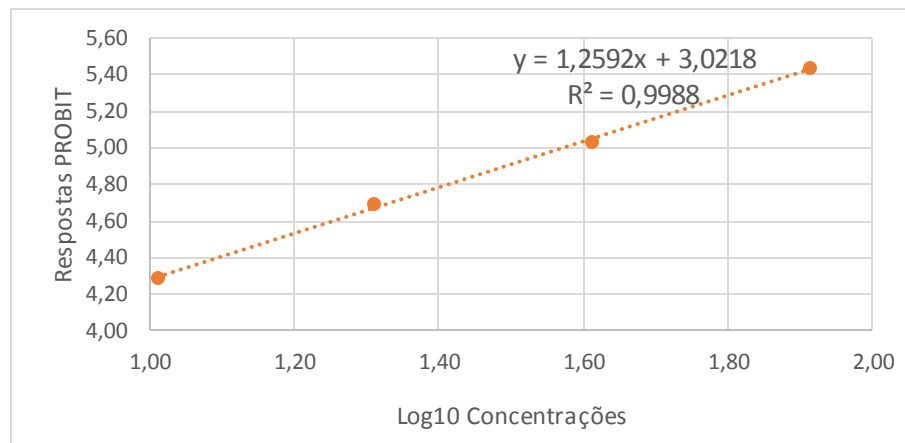
02/jul			
Concentrações (mg /L)	Log	Respostas (%)	Respostas Probit
10,24	1,01	19	4,12
40,95	1,61	48	4,95
81,9	1,91	68	5,47



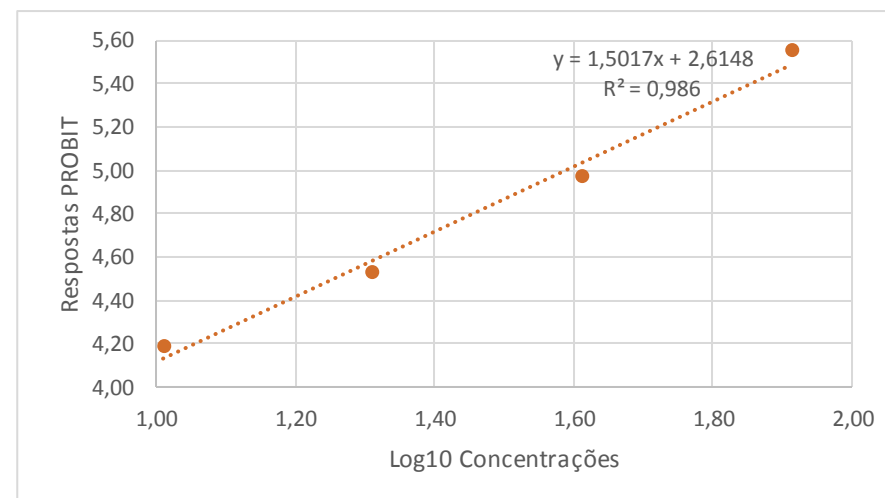
04/jul			
Concentrações (mg /L)	Log	Respostas (%)	Respostas Probit
10,24	1,01	20	4,16
20,48	1,31	28	4,42
40,95	1,61	44	4,85
81,9	1,91	65	5,39



02/ago			
Concentrações (mg /L)	Log	Respostas (%)	Respostas Probit
10,24	1,01	24	4,29
20,48	1,31	38	4,69
40,95	1,61	51	5,03
81,9	1,91	67	5,44

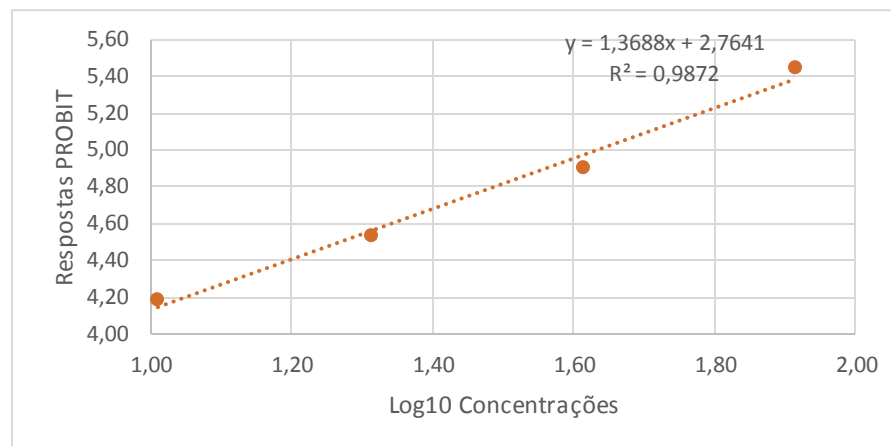


08/ago			
Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
10,24	1,01	21	4,19
20,48	1,31	32	4,53
40,95	1,61	49	4,97
81,9	1,91	71	5,55



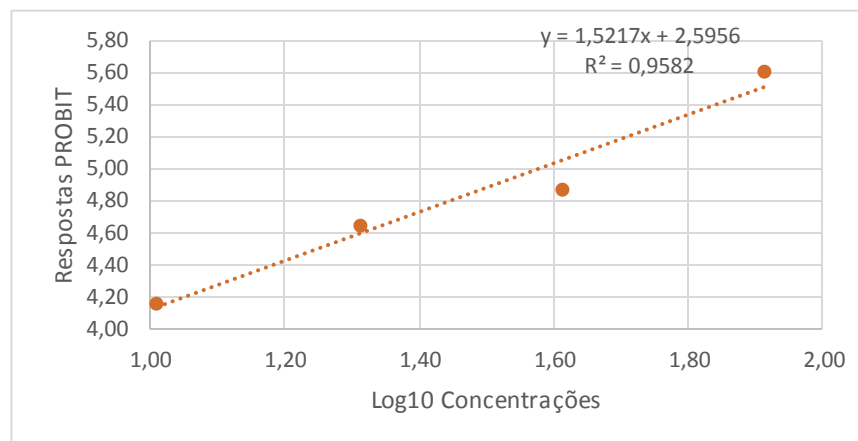
19/ago

Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
10,24	1,01	21	4,19
20,48	1,31	32	4,53
40,95	1,61	46	4,9
81,9	1,91	67	5,44



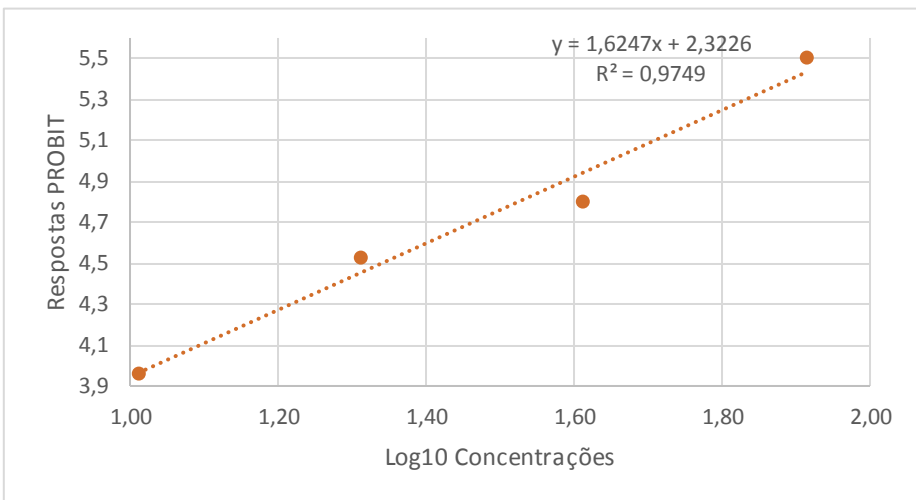
20/ago

Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
10,24	1,01	20	4,16
20,48	1,31	36	4,64
40,95	1,61	45	4,87
81,9	1,91	73	5,61



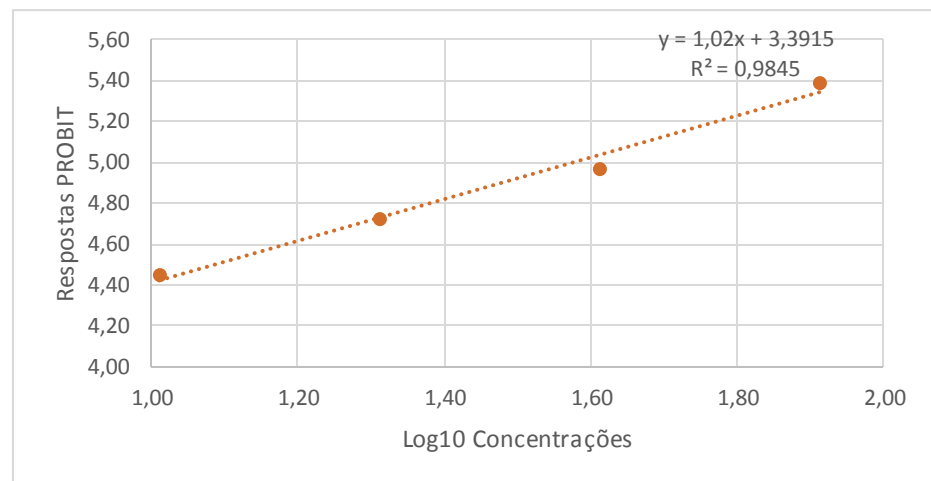
27/ago

Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
10,24	1,01	15	3,96
20,48	1,31	32	4,53
40,95	1,61	42	4,8
81,9	1,91	69	5,5



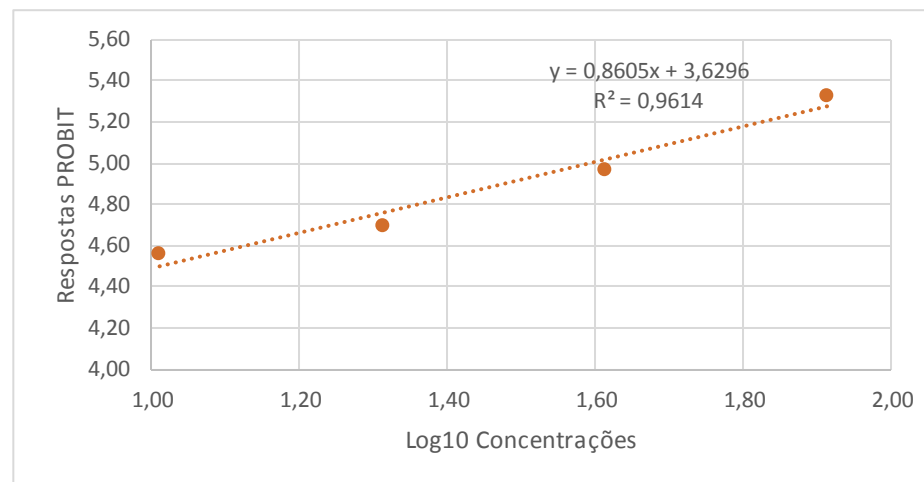
11/set

Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
10,24	1,01	29	4,45
20,48	1,31	39	4,72
40,95	1,61	49	4,97
81,9	1,91	65	5,39



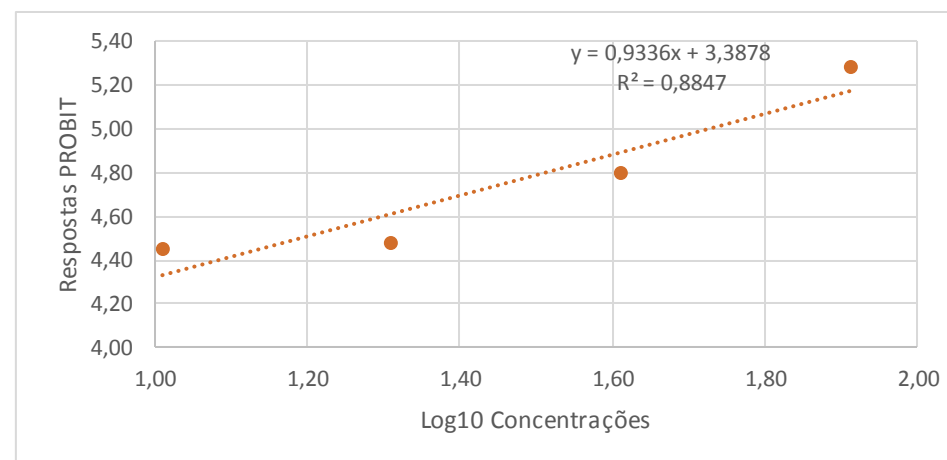
11 Setembro

Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
10,24	1,01	33	4,56
20,48	1,31	38	4,69
40,95	1,61	49	4,97
81,9	1,91	63	5,33

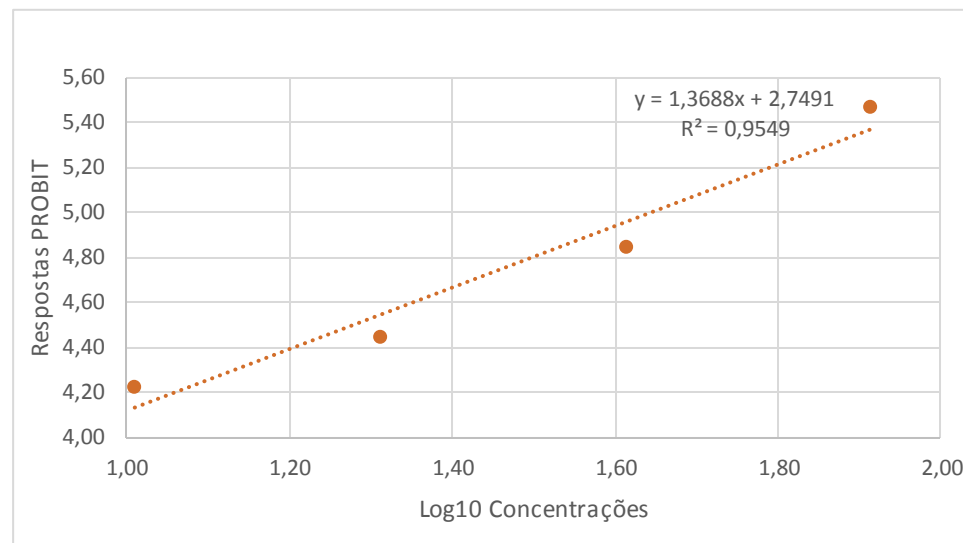


12/set

Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
10,24	1,01	29	4,45
20,48	1,31	30	4,48
40,95	1,61	42	4,8
81,9	1,91	61	5,28

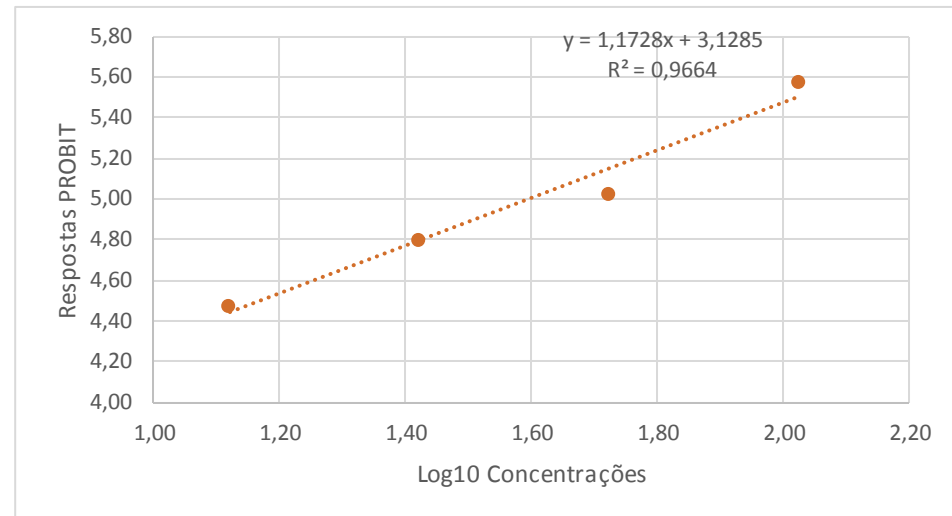


12/set			
Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
10,24	1,01	22	4,23
20,48	1,31	29	4,45
40,95	1,61	44	4,85
81,9	1,91	68	5,47

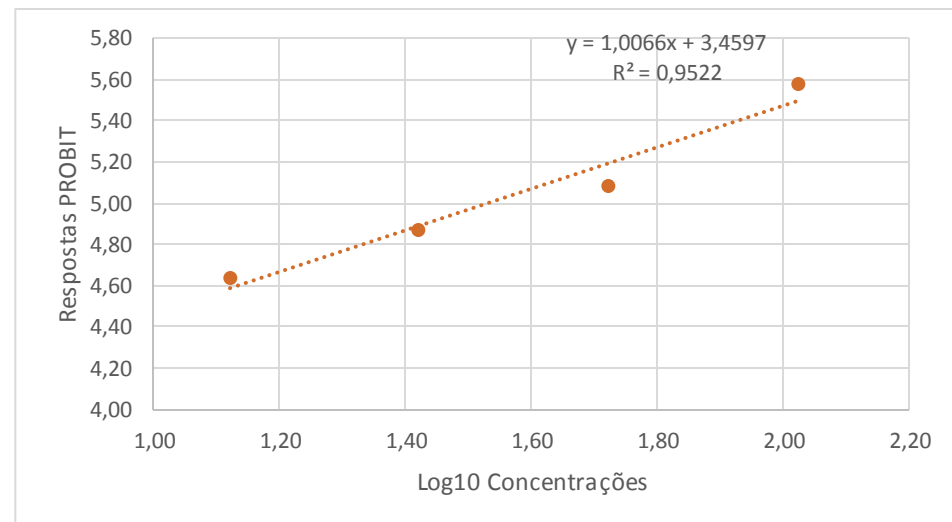


Dicromato de Potássio 129,2 mg/L

2/out			
Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
13,21	1,12	30	4,48
26,41	1,42	42	4,80
52,83	1,72	51	5,03
105,65	2,02	72	5,58

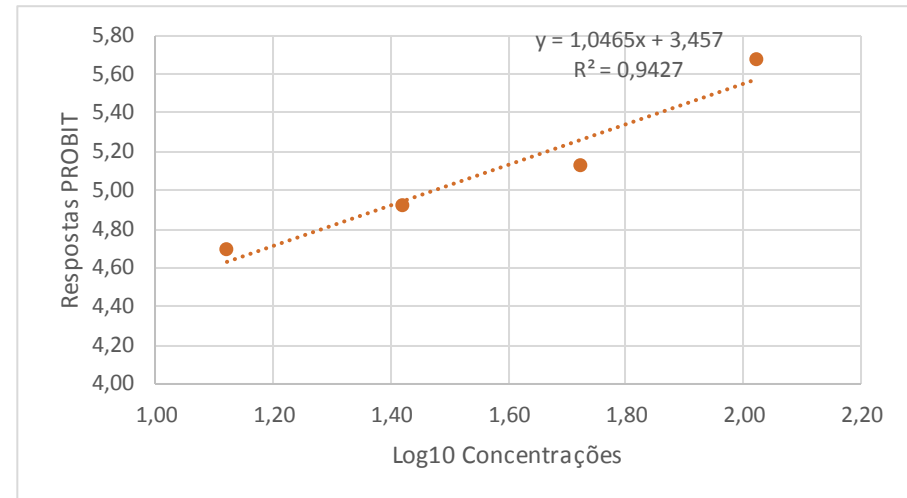


2/out			
Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
13,21	1,12	36	4,64
26,41	1,42	45	4,87
52,83	1,72	53	5,08
105,65	2,02	72	5,58



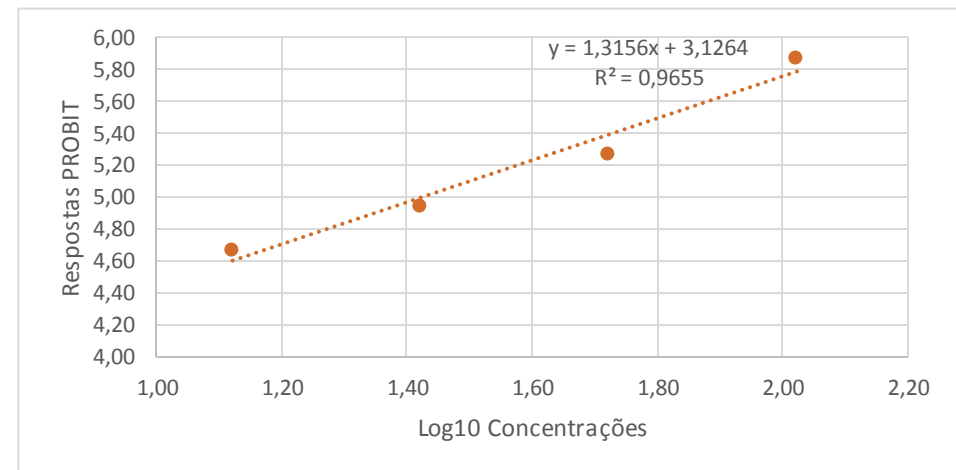
3/out

Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
13,21	1,12	38	4,69
26,41	1,42	47	4,92
52,83	1,72	55	5,13
105,65	2,02	75	5,67



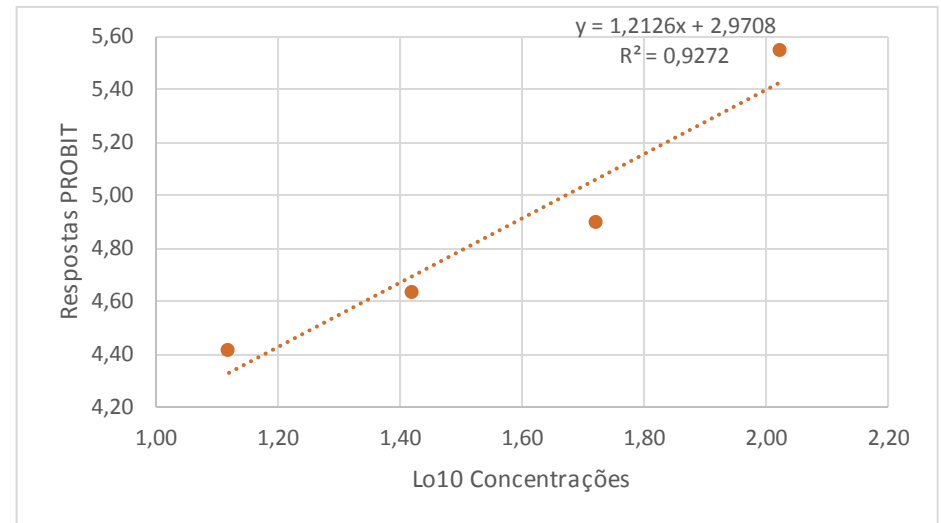
4/out

Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
13,21	1,12	37	4,67
26,41	1,42	48	4,95
52,83	1,72	61	5,28
105,65	2,02	81	5,88



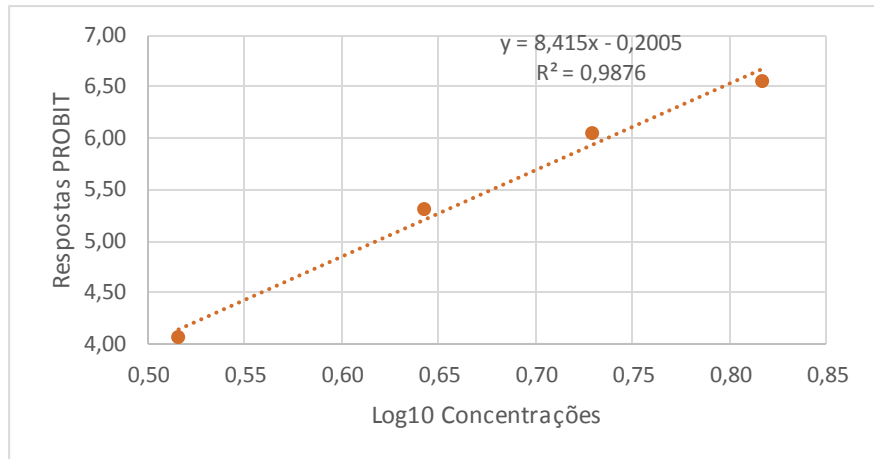
30/out

Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
13,21	1,12	28	4,42
26,41	1,42	36	4,64
52,83	1,72	46	4,90
105,65	2,02	71	5,55

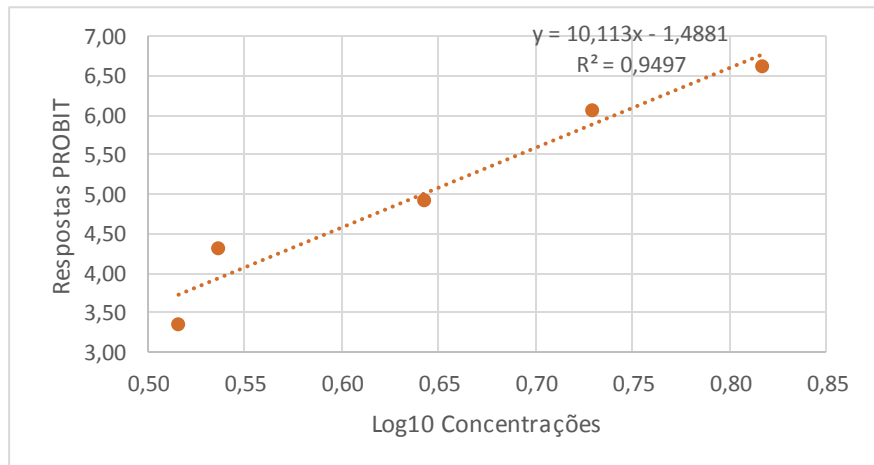


3,5-Diclorofenol 8 mg/L

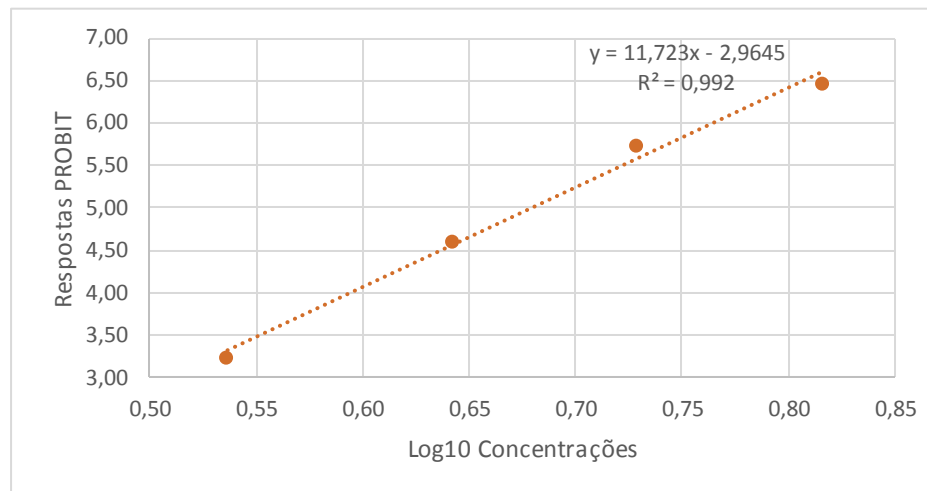
29/out			
Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
3,28	0,52	17	4,05
4,39	0,64	62	5,31
5,36	0,73	85	6,04
6,55	0,82	94	6,55



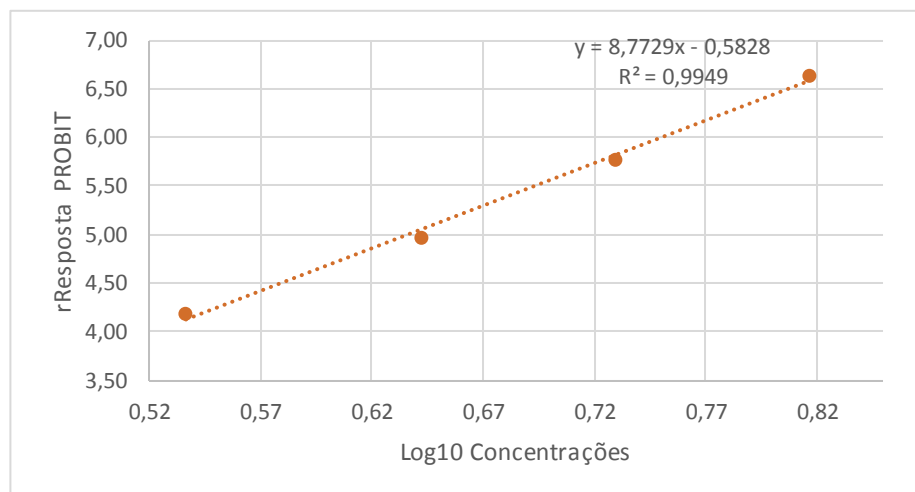
30/out			
Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
3,28	0,52	5	3,36
3,44	0,54	25	4,33
4,39	0,64	47	4,92
5,36	0,73	86	6,08
6,55	0,82	95	6,64



30/out			
Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
3,44	0,54	4	3,25
4,39	0,64	35	4,61
5,36	0,73	77	5,74
6,55	0,82	93	6,48

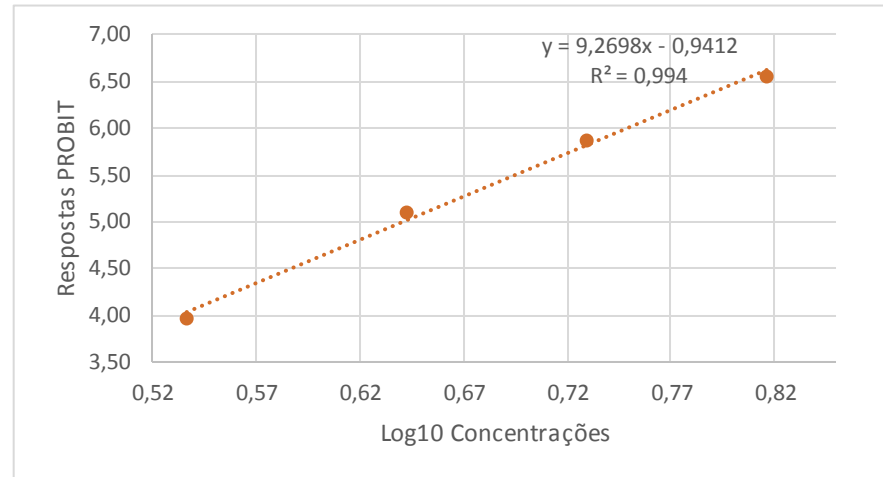


30/out			
Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
3,28	0,52	14	3,92
3,44	0,54	21	4,19
4,39	0,64	49	4,97
5,36	0,73	78	5,77
6,55	0,82	95	6,64



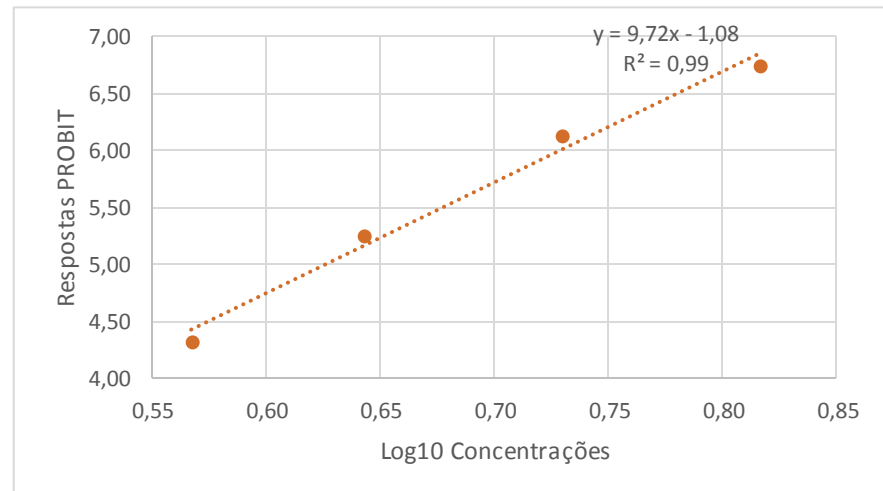
31/out

Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
3,44	0,54	15	3,96
4,39	0,64	54	5,10
5,36	0,73	81	5,88
6,55	0,82	94	6,55



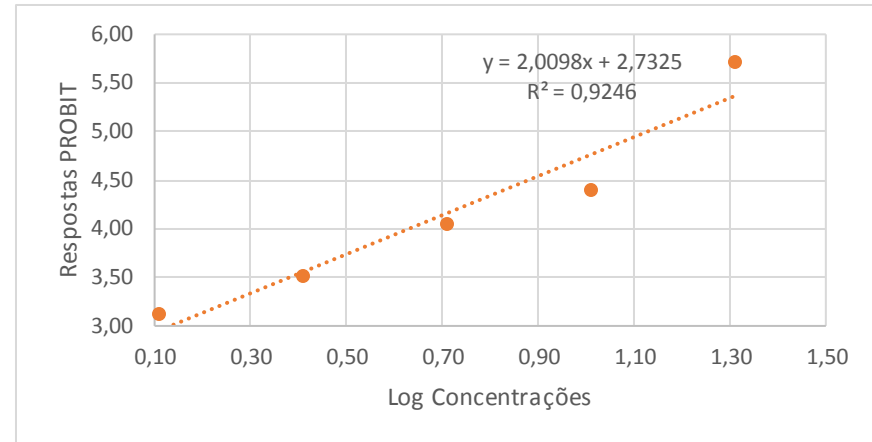
31/out

Concentrações mg/L	Log	Respostas %	Respostas Probit
3,69	0,57	25	4,33
4,39	0,64	60	5,25
5,36	0,73	87	6,13
6,55	0,82	96	6,75

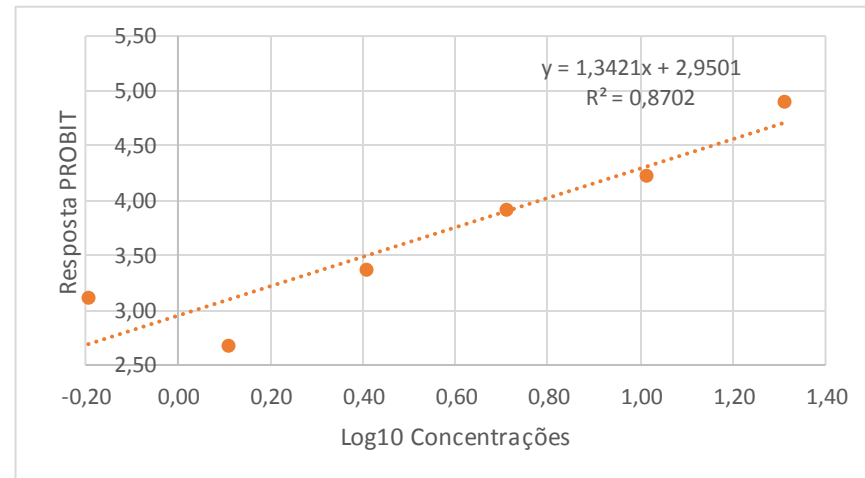


Cloritos 25 mg/L

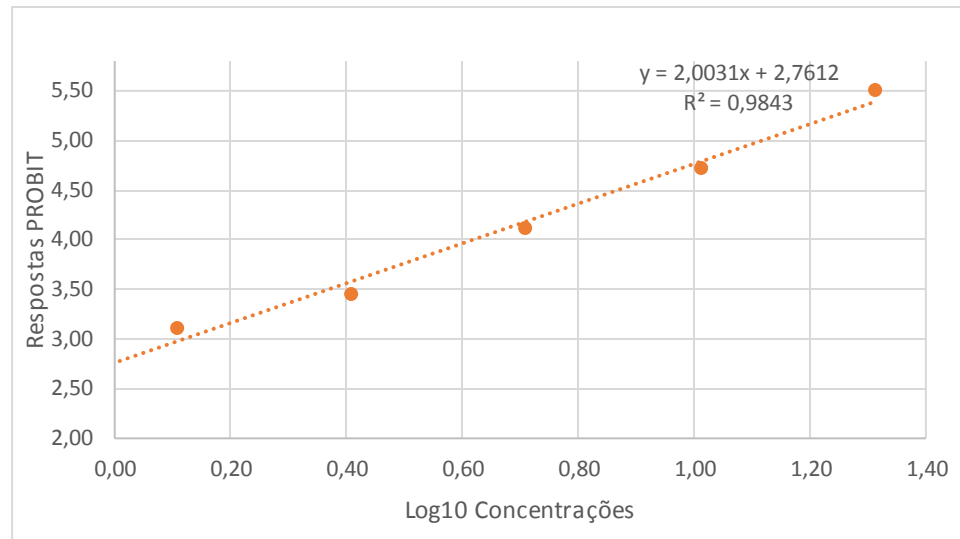
30/abr			
Concentrações (mg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,64	-0,19	0	-
1,28	0,11	3	3,12
2,56	0,41	7	3,52
5,12	0,71	17	4,05
10,24	1,01	27	4,39
20,48	1,31	76	5,71



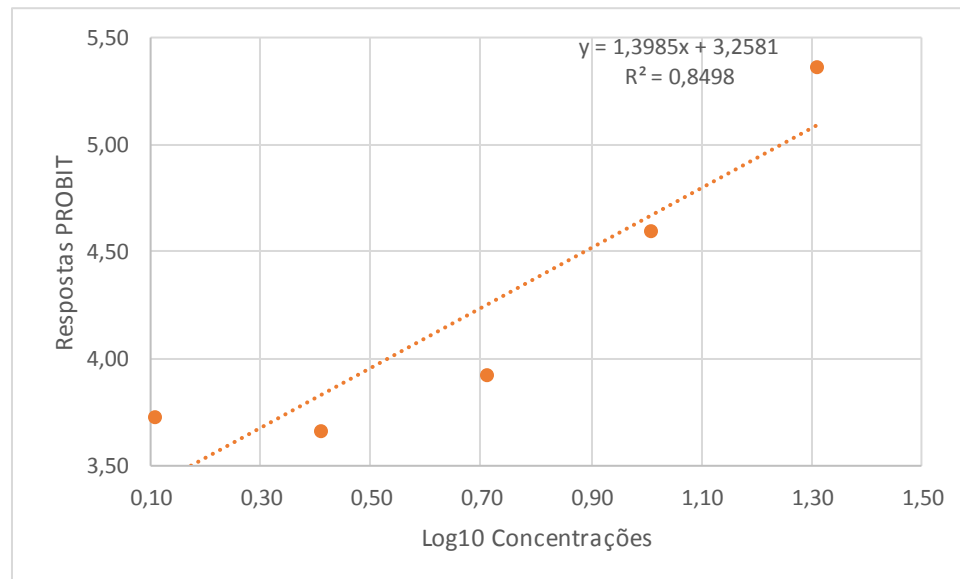
27/jun			
Concentrações (mg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,64	-0,19	3	3,12
1,28	0,11	1	2,67
2,56	0,41	5	3,36
5,12	0,71	14	3,92
10,24	1,01	22	4,23
20,48	1,31	46	4,9



26/jul			
Concentrações (mg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,64	-0,19	X	
1,28	0,11	3	3,12
2,56	0,41	6	3,45
5,12	0,71	19	4,12
10,24	1,01	39	4,72
20,48	1,31	69	5,5

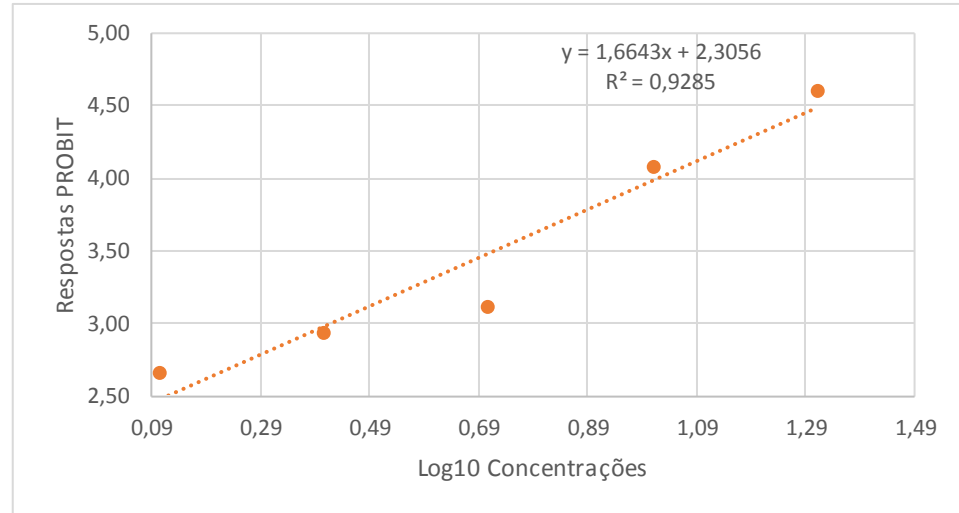


26/jul			
Concentrações (mg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,64	-0,19	0	0
1,28	0,11	10	3,72
2,56	0,41	9	3,66
5,12	0,71	14	3,92
10,24	1,01	34	4,59
20,48	1,31	64	5,36



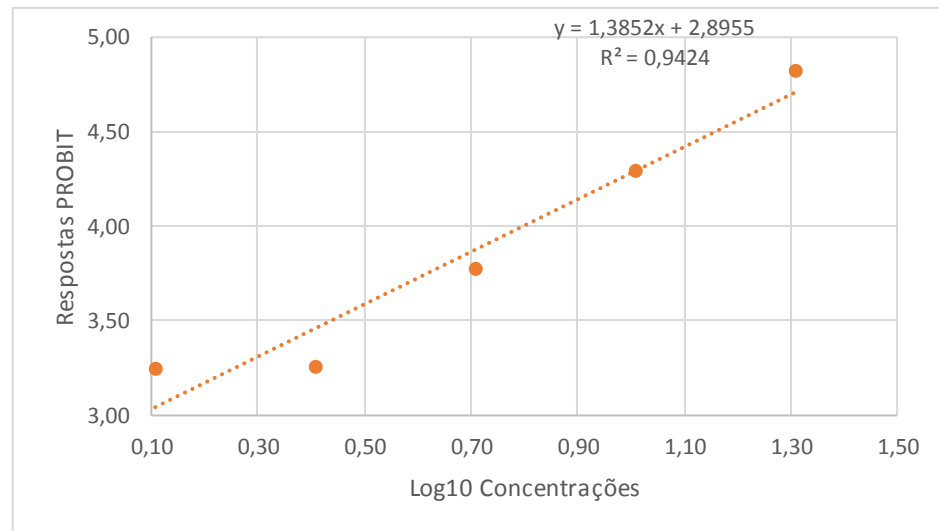
19/ago

Concentrações (mg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,64	-0,19	0	-
1,28	0,11	1	2,67
2,56	0,41	2	2,95
5,12	0,71	3	3,12
10,24	1,01	18	4,08
20,48	1,31	35	4,61



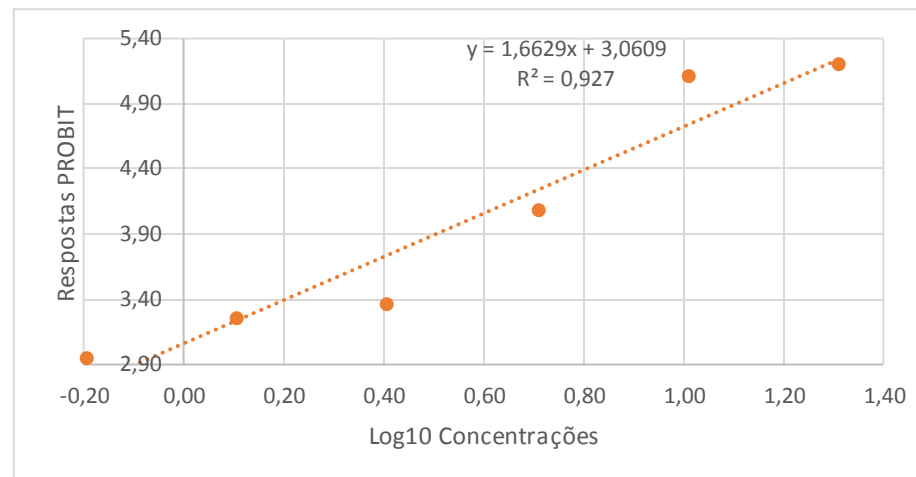
20/ago

Concentrações (mg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,64	-0,19	2	2,95
1,28	0,11	4	3,25
2,56	0,41	5	3,26
5,12	0,71	11	3,77
10,24	1,01	24	4,29
20,48	1,31	43	4,82



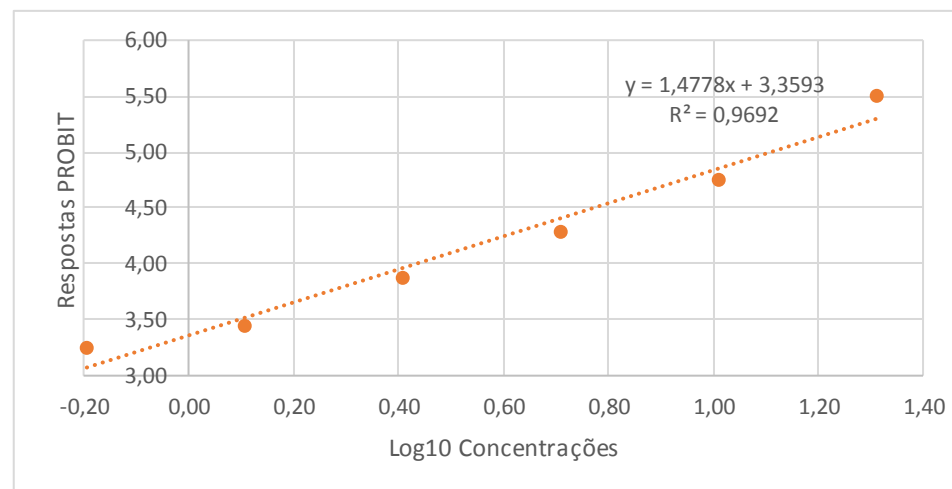
29/ago

Concentrações (mg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,64	-0,19	2	2,95
1,28	0,11	4	3,25
2,56	0,41	5	3,36
5,12	0,71	18	4,08
10,24	1,01	54	5,10
20,48	1,31	58	5,2



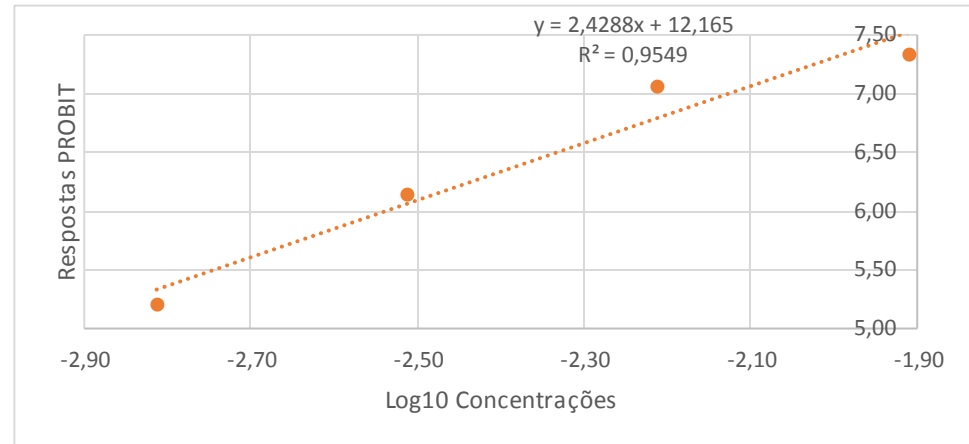
30/ago

Concentrações (mg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,64	-0,19	4	3,25
1,28	0,11	6	3,45
2,56	0,41	13	3,87
5,12	0,71	24	4,29
10,24	1,01	40	4,75
20,48	1,31	69	5,5

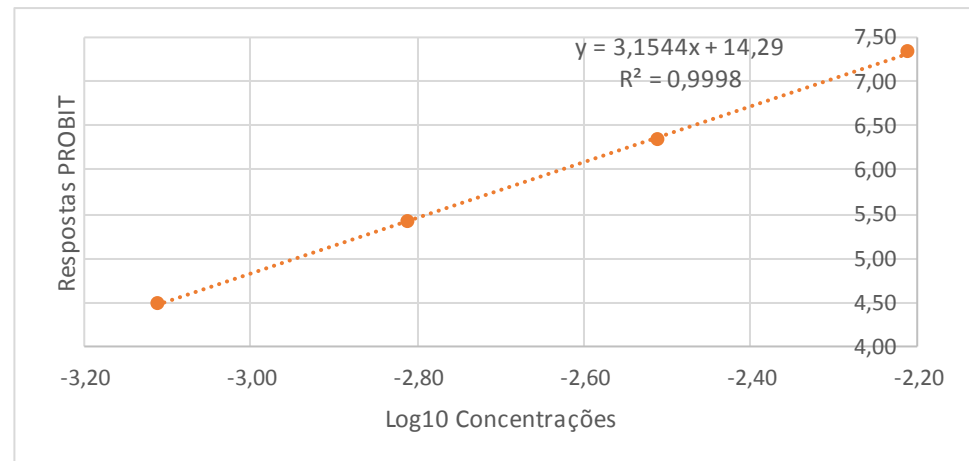


Anatoxina-a 0,15 µg/L

09/ago			
Concentrações (µg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,0015375	-2,81	58	5,20
0,00307	-2,51	87	6,13
0,00614	-2,21	98	7,05
0,01229	-1,91	99	7,33

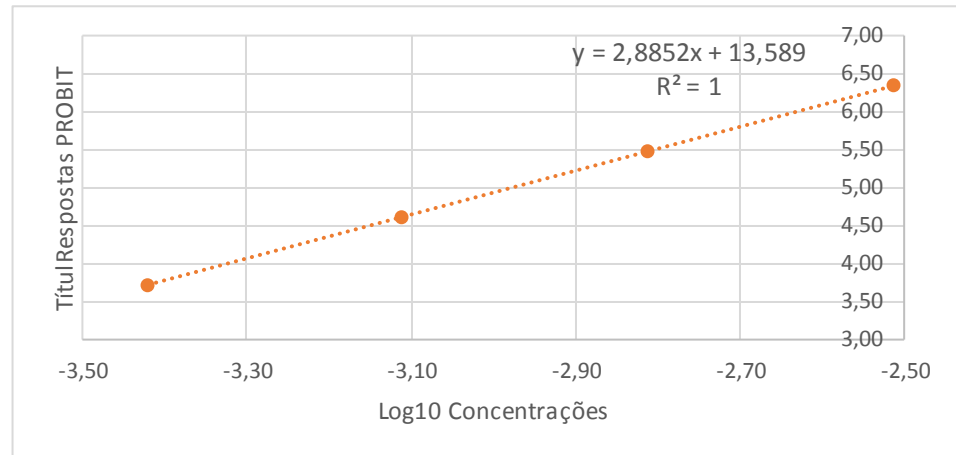


09/ago			
Concentrações (µg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,00077	-3,11	30	4,48
0,0015375	-2,81	66	5,41
0,00307	-2,51	91	6,34
0,00614	-2,21	98	7,33



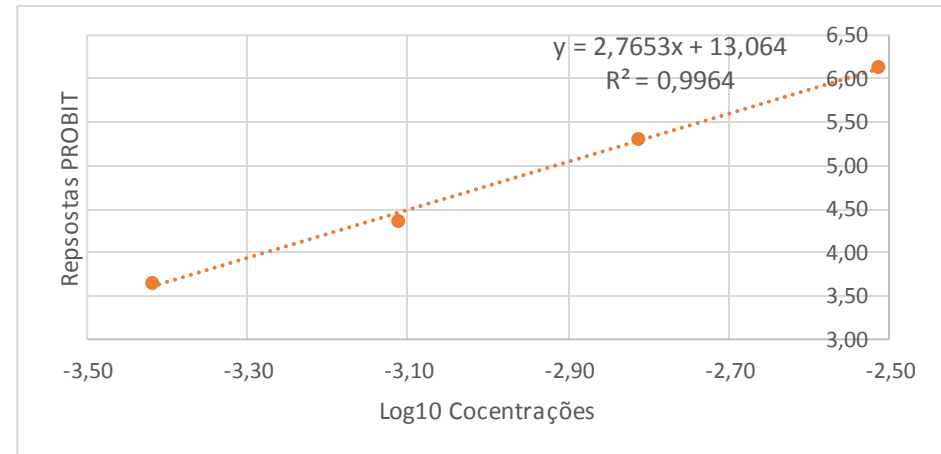
9/ago

Concentrações (µg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,00038	-3,42	10	3,72
0,00077	-3,11	35	4,61
0,0015375	-2,81	68	5,47
0,00307	-2,51	91	6,34



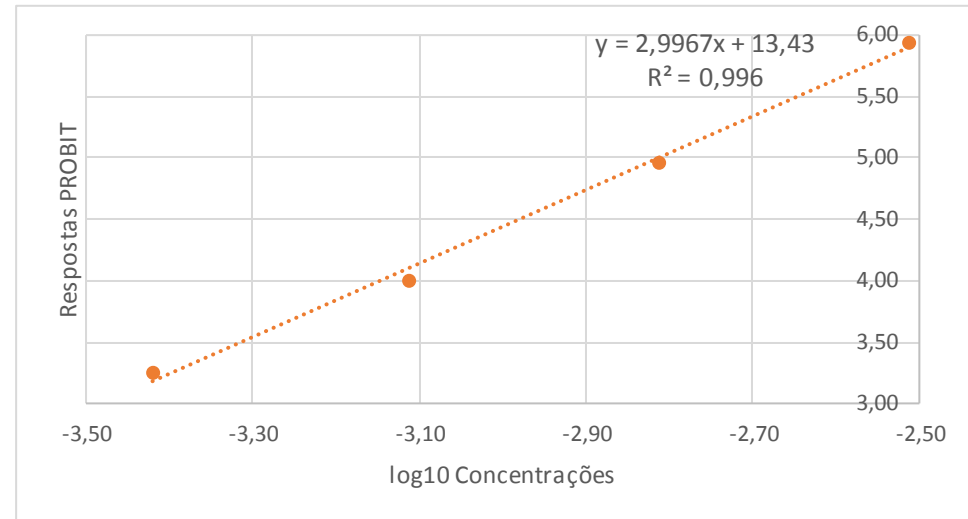
12/ago

Concentrações (µg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,00038	-3,42	9	3,66
0,00077	-3,11	26	4,36
0,0015375	-2,81	62	5,31
0,00307	-2,51	87	6,13



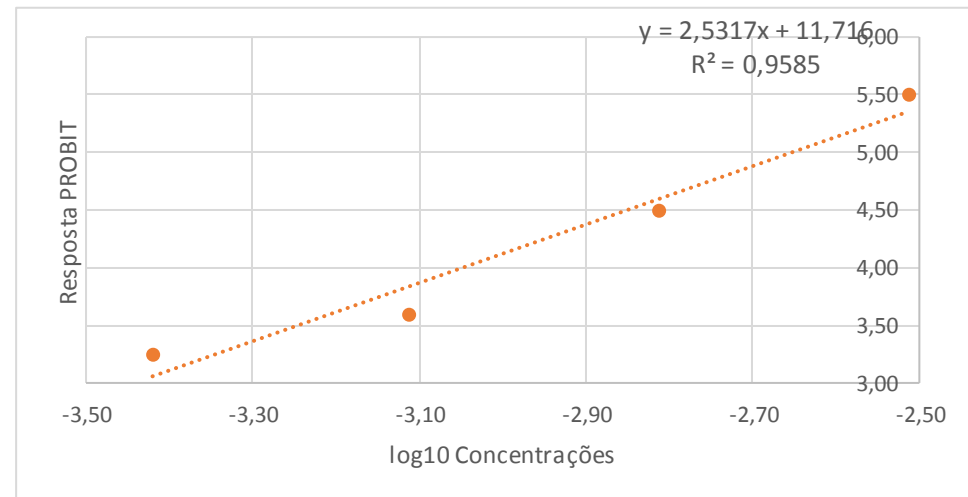
13/ago

Concentrações (µg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,00038	-3,42	4	3,25
0,00077	-3,11	16	4,01
0,0015375	-2,81	49	4,97
0,00307	-2,51	83	5,95



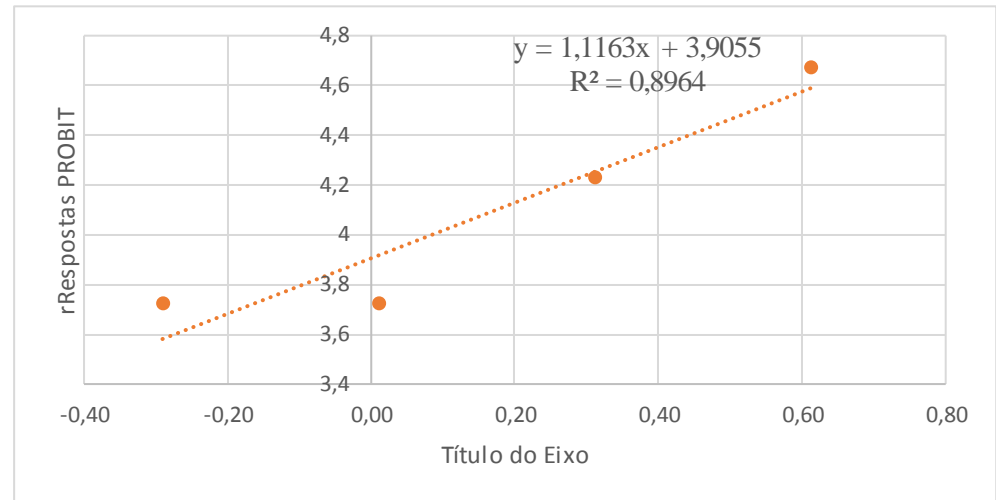
14/ago

Concentrações (µg/L)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
0,00038	-3,42	4	3,25
0,00077	-3,11	8	3,59
0,0015375	-2,81	31	4,50
0,00307	-2,51	69	5,5

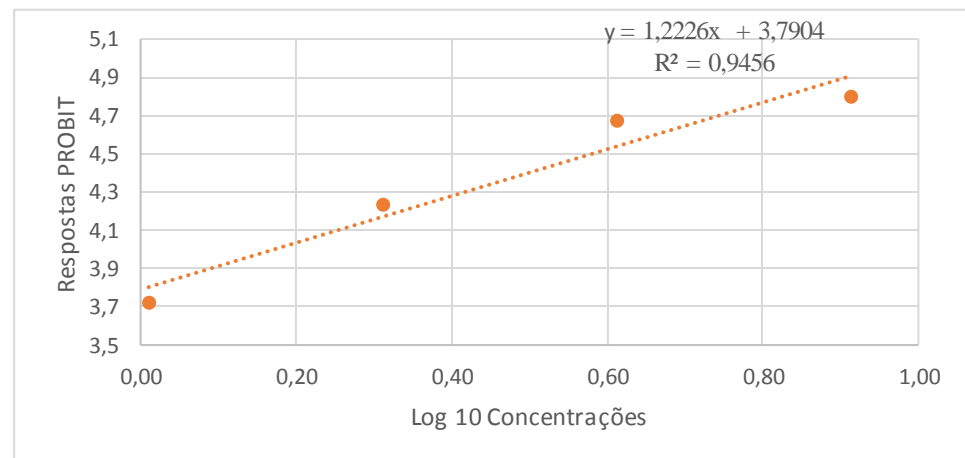


Saxitoxina 10 µg/L

09/ago			
Concentrações (µL)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
4,095	0,61	37	4,67
2,048	0,31	22	4,23
1,024	0,01	10	3,72
0,512	-0,29	10	3,72

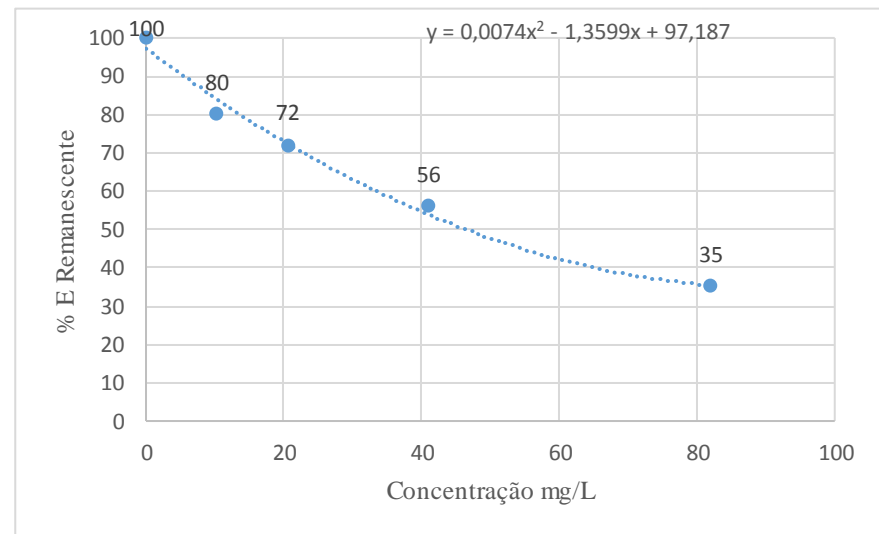
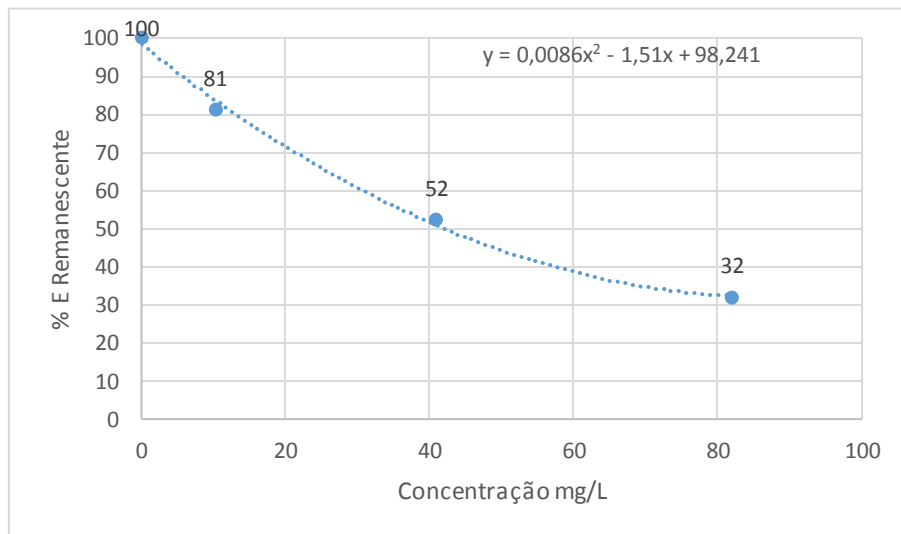
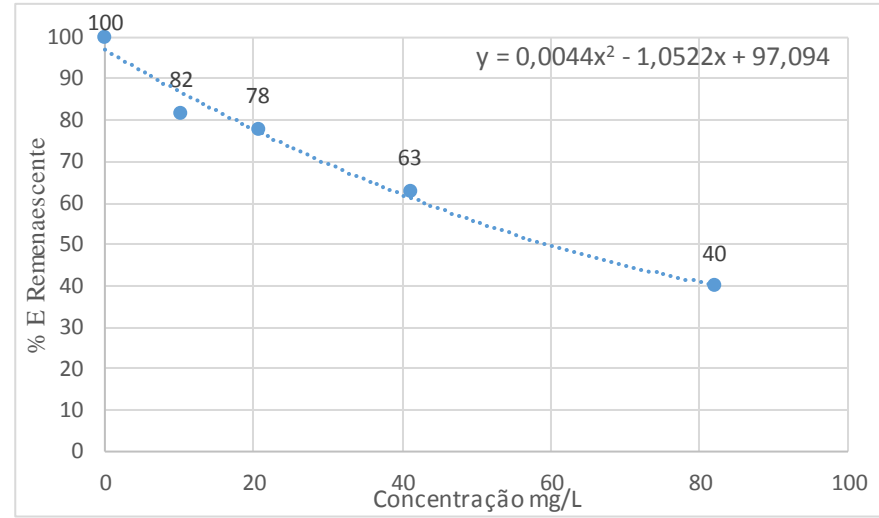
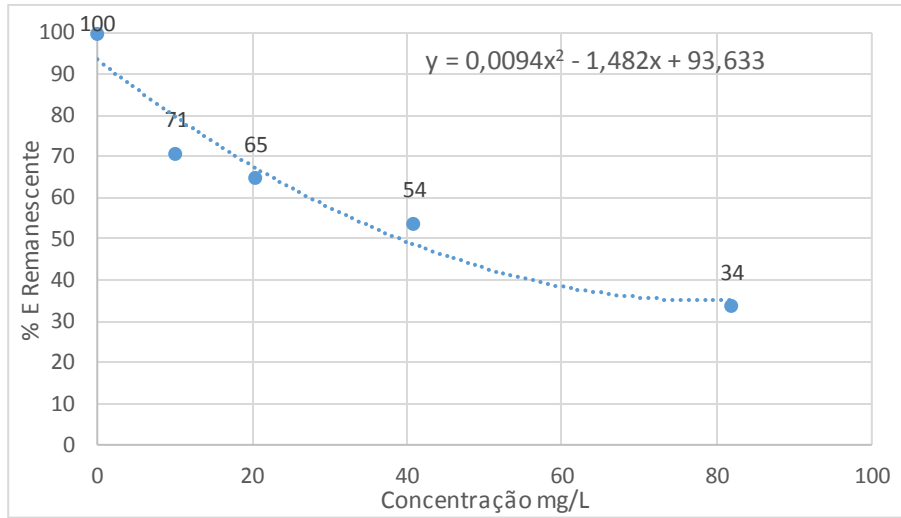


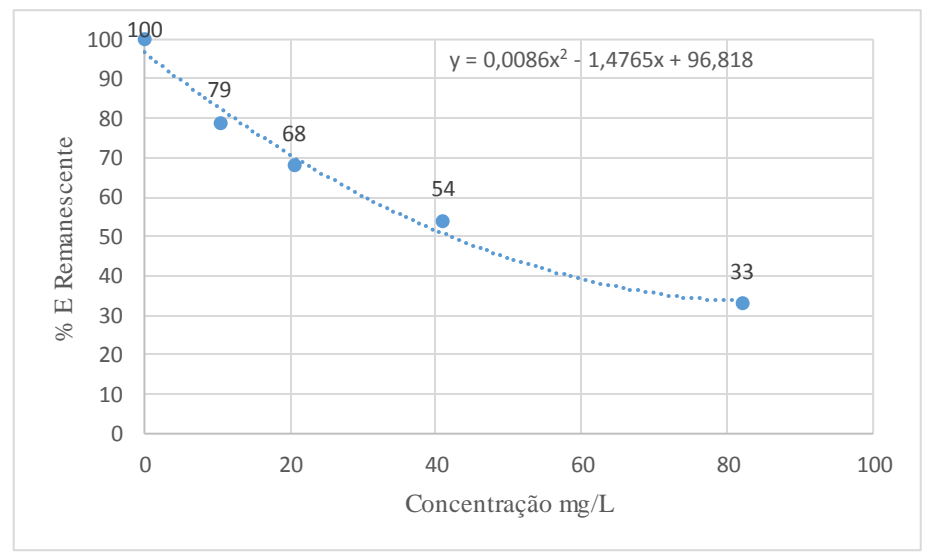
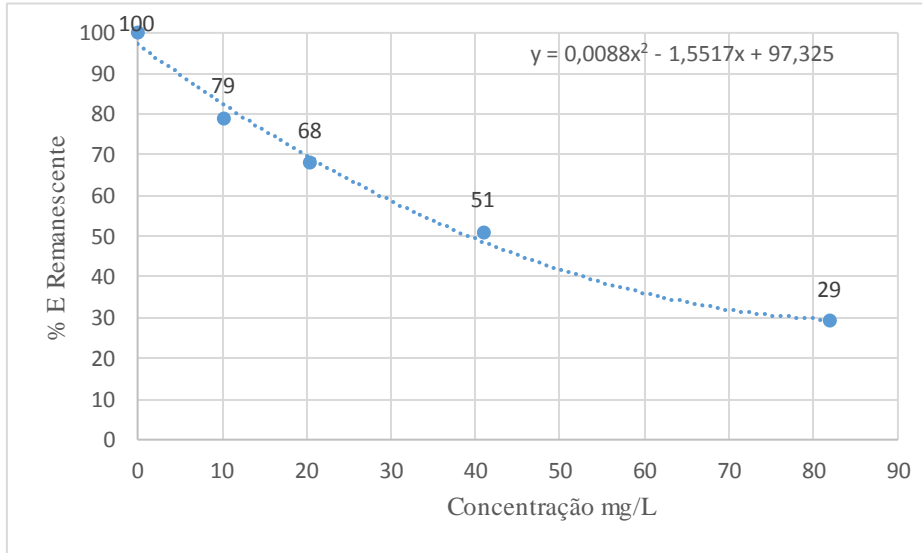
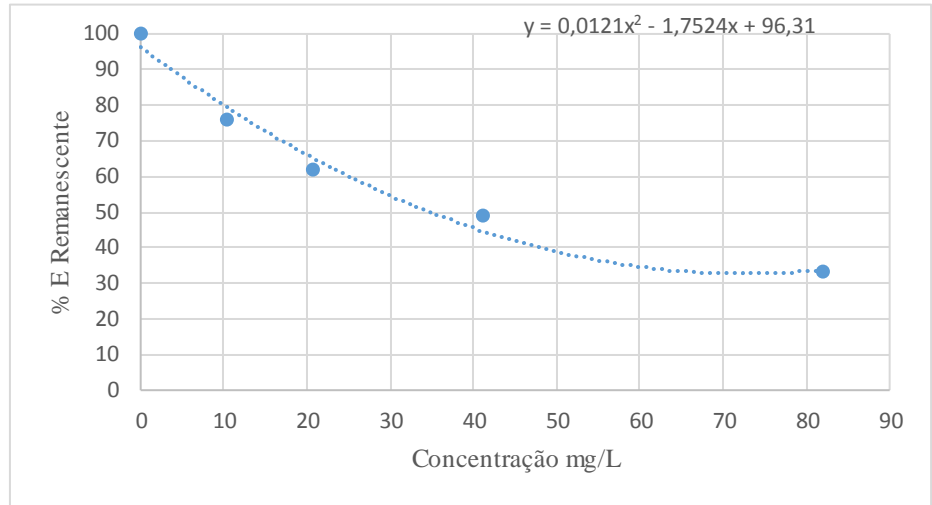
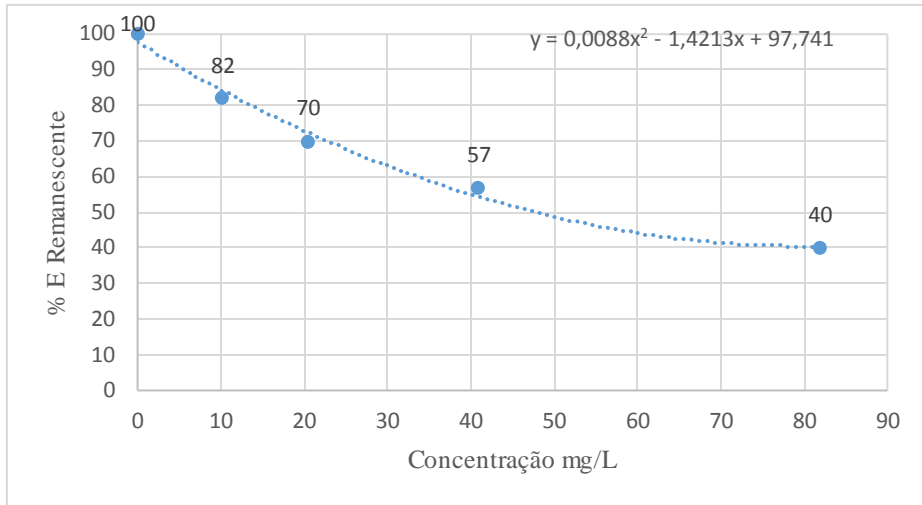
09/ago			
Concentrações (µL)	Log10	Respostas %	Respostas Probit
8,19	0,91	42	4,8
4,095	0,61	22	4,67
2,048	0,31	10	4,23
1,024	0,01	3	3,72

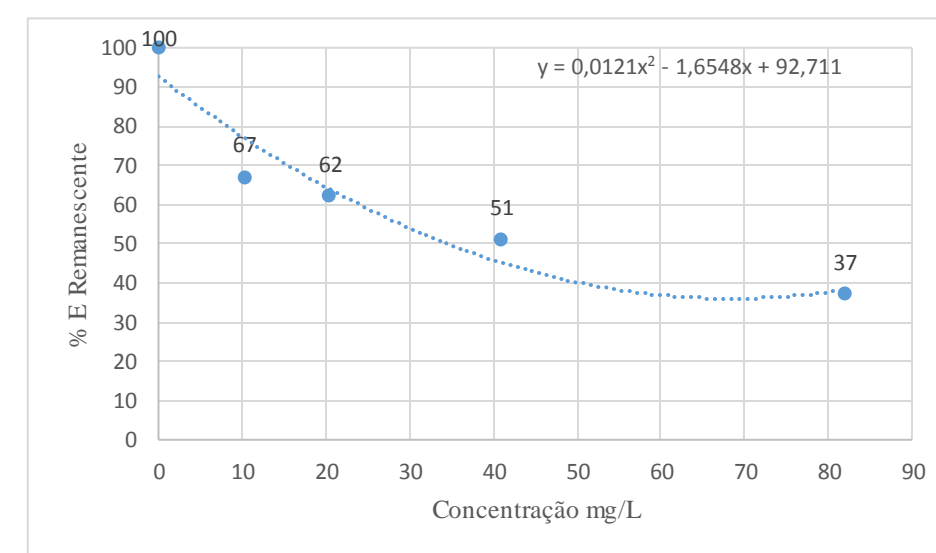
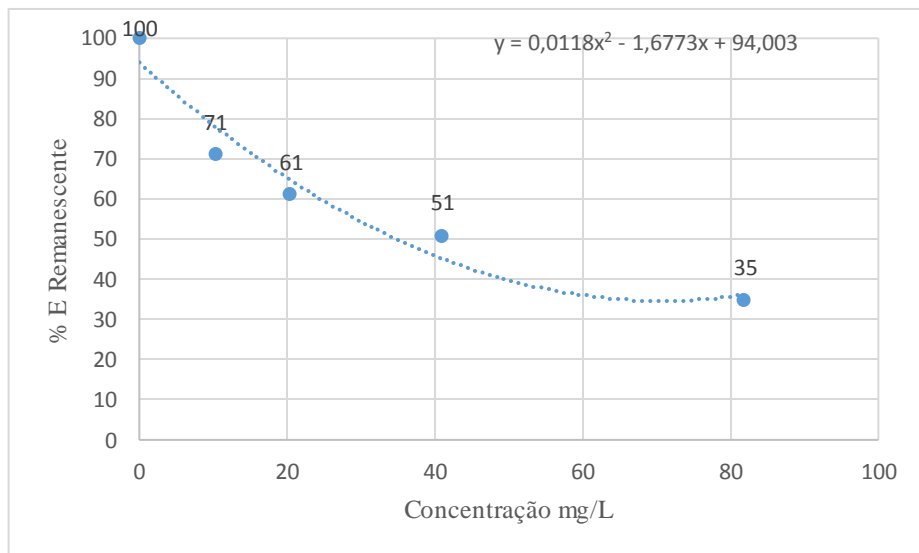
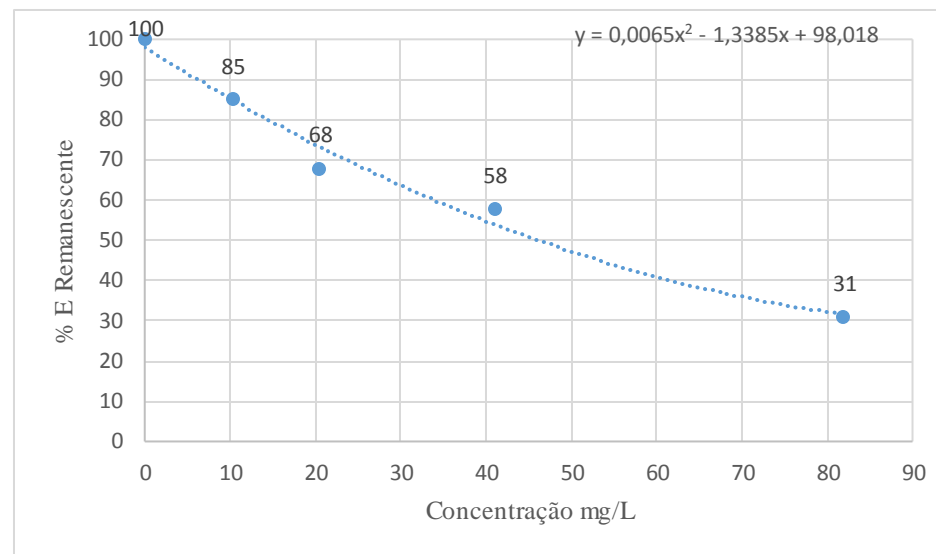
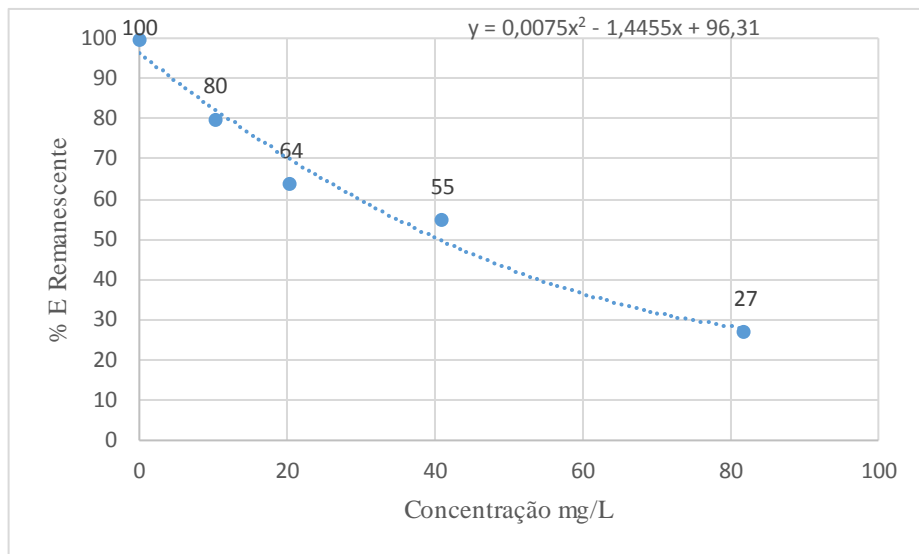


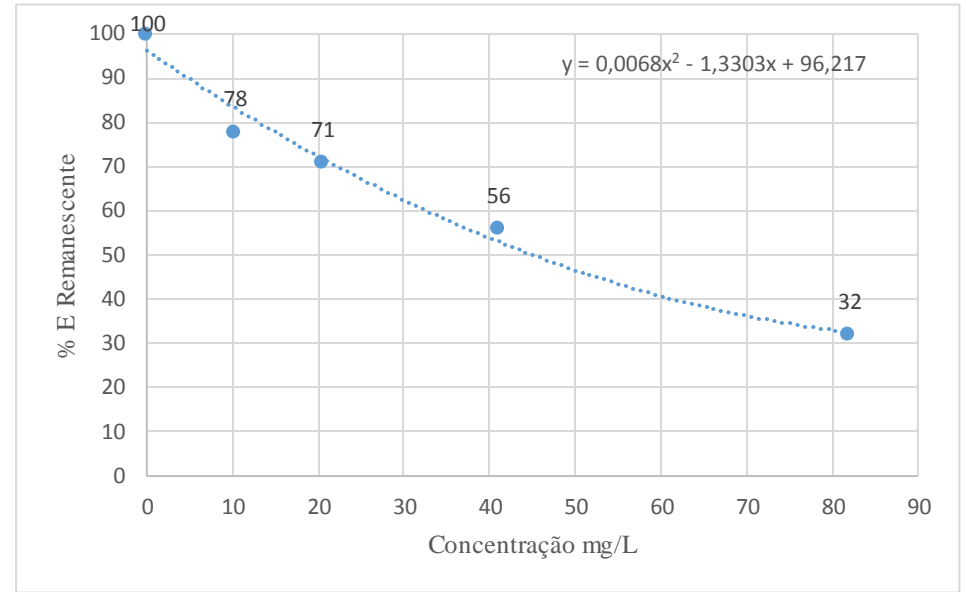
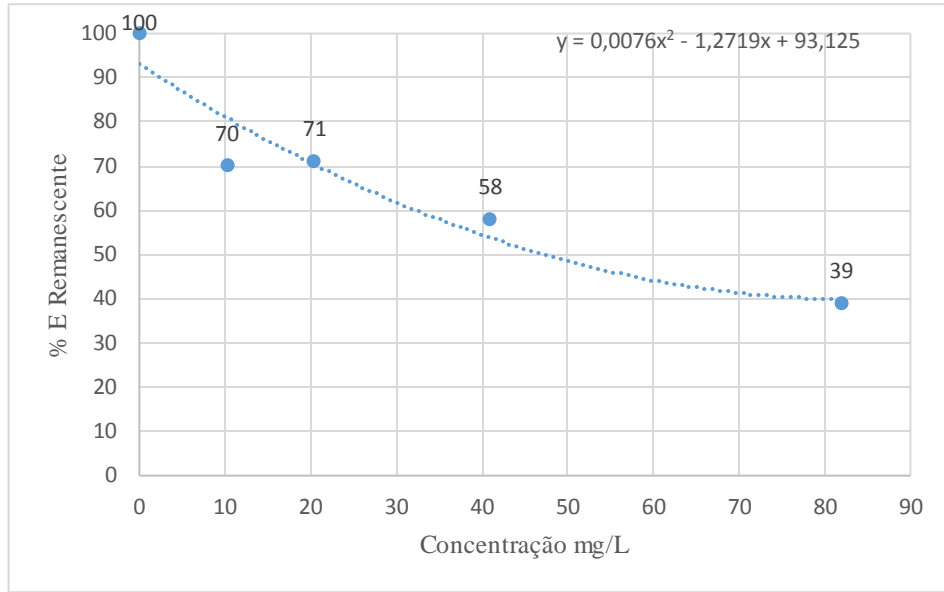
## Apêndice V- Método Estatístico

Dicromato de Potássio 100 mg/L

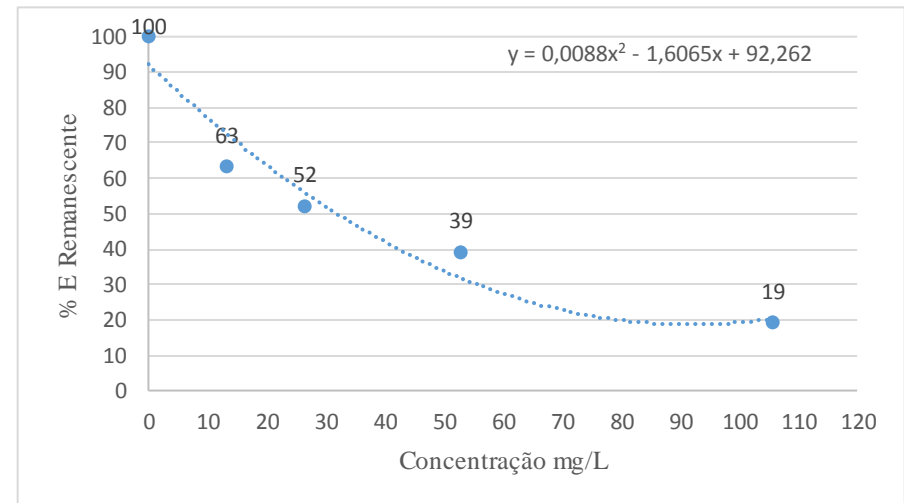
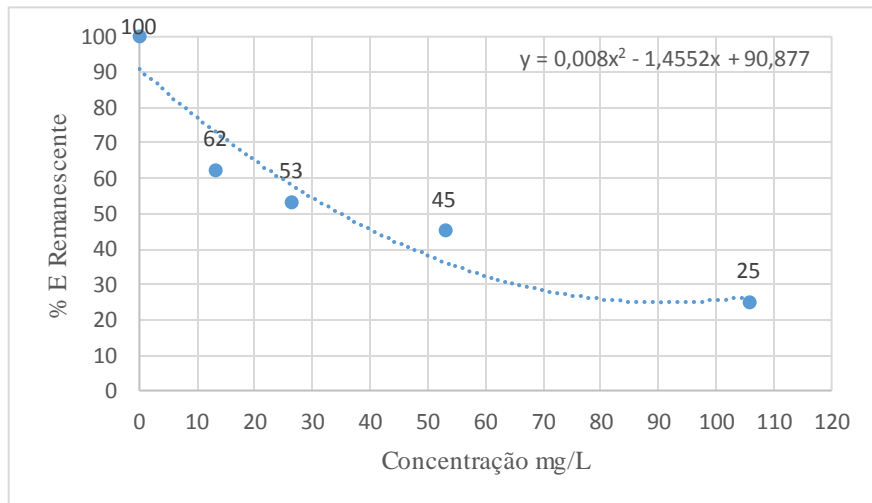
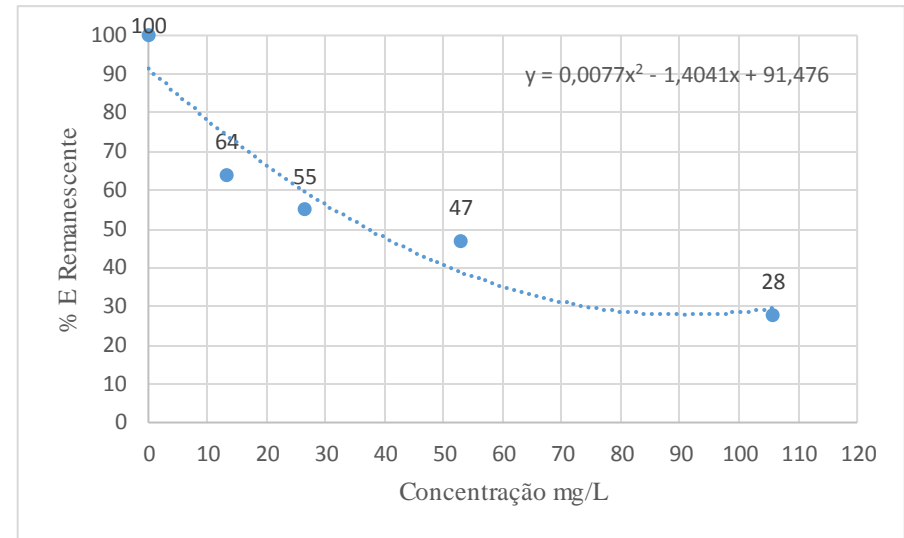
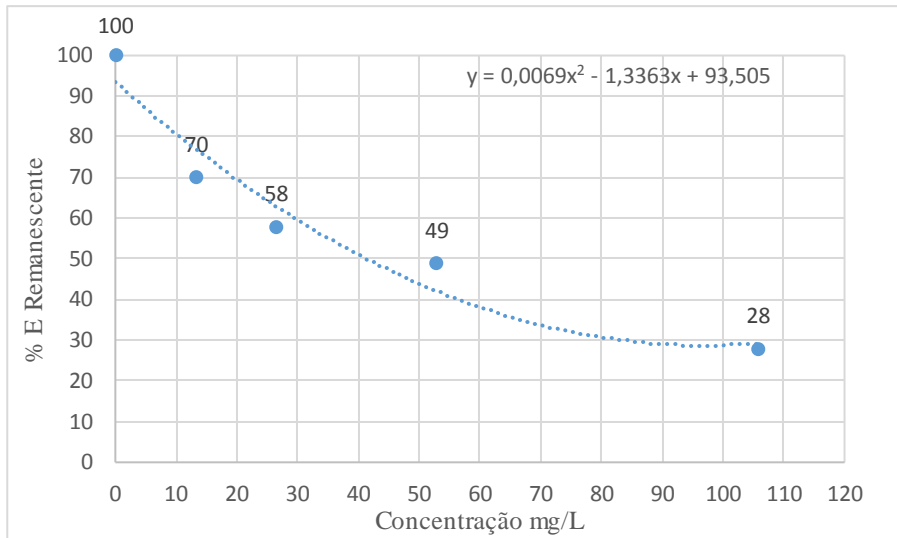


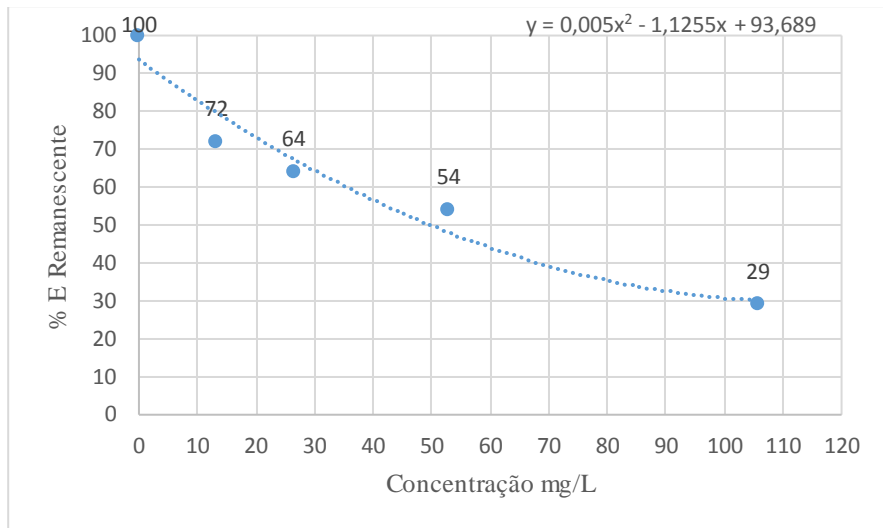




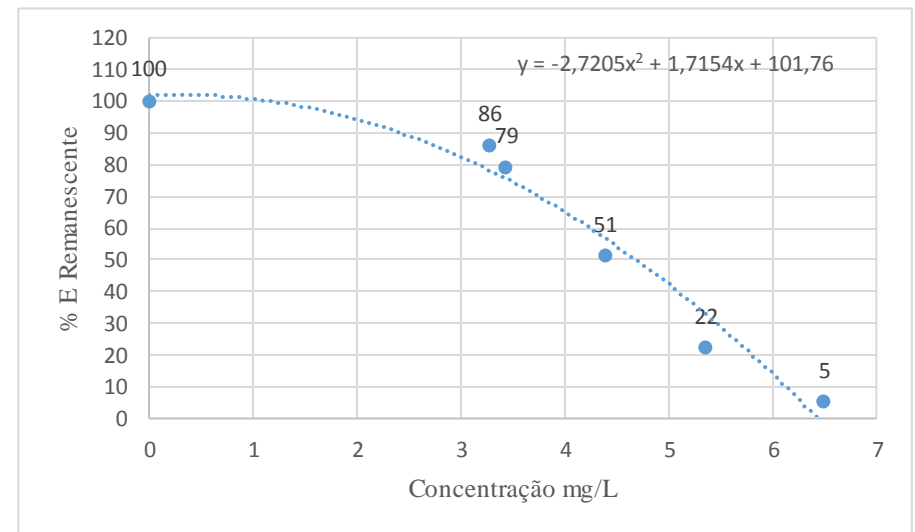
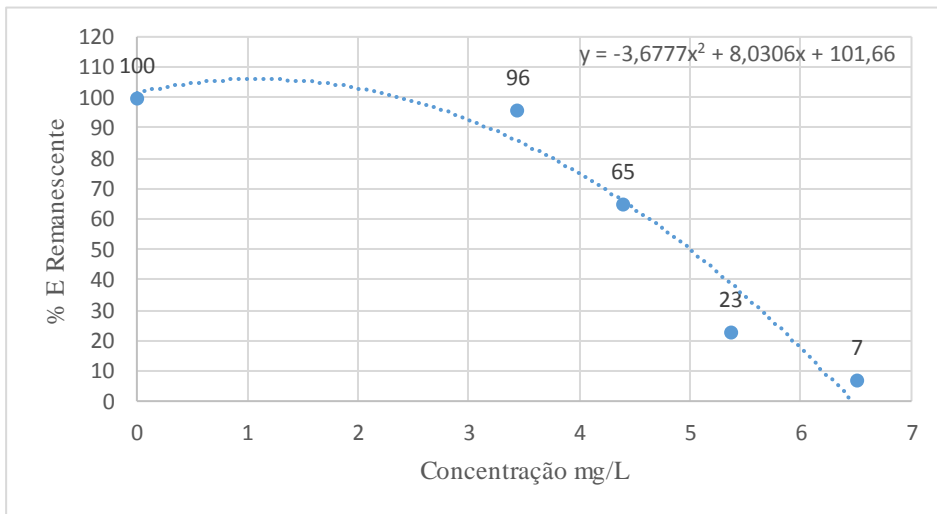
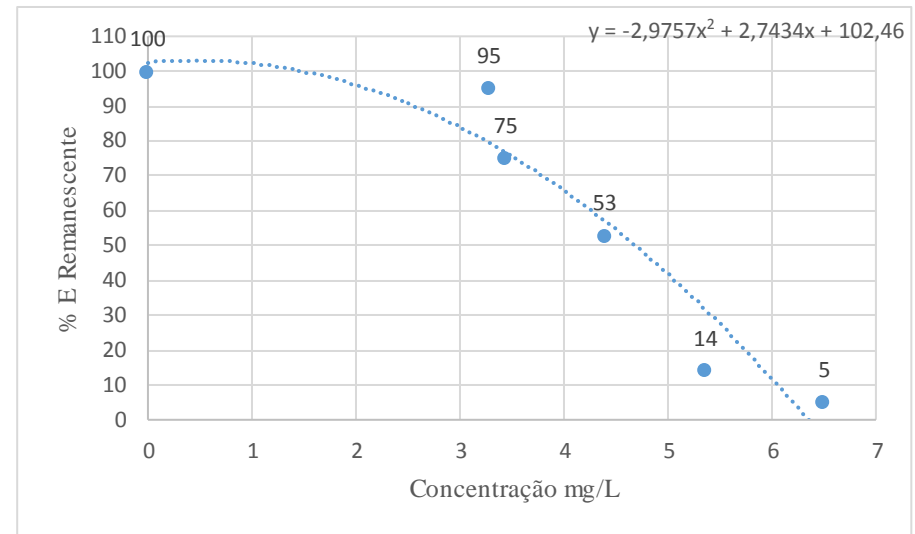
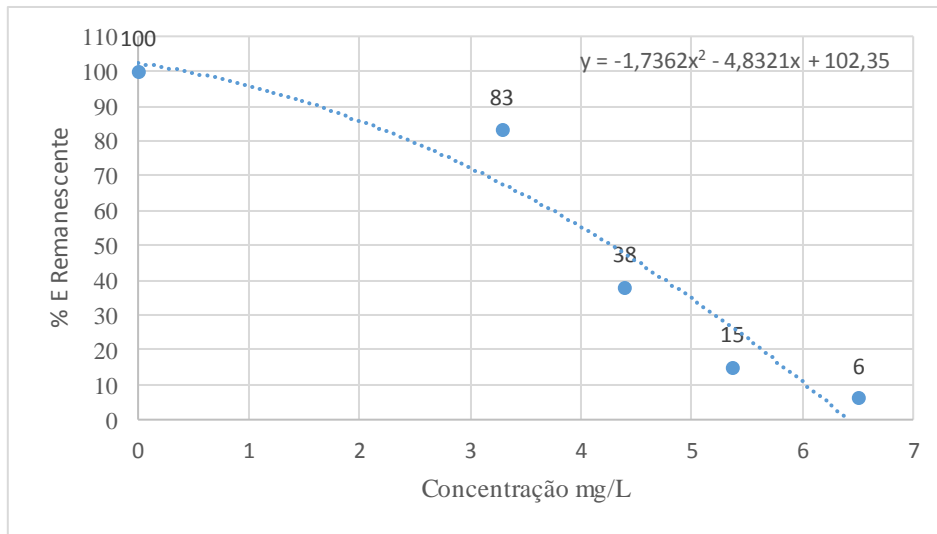


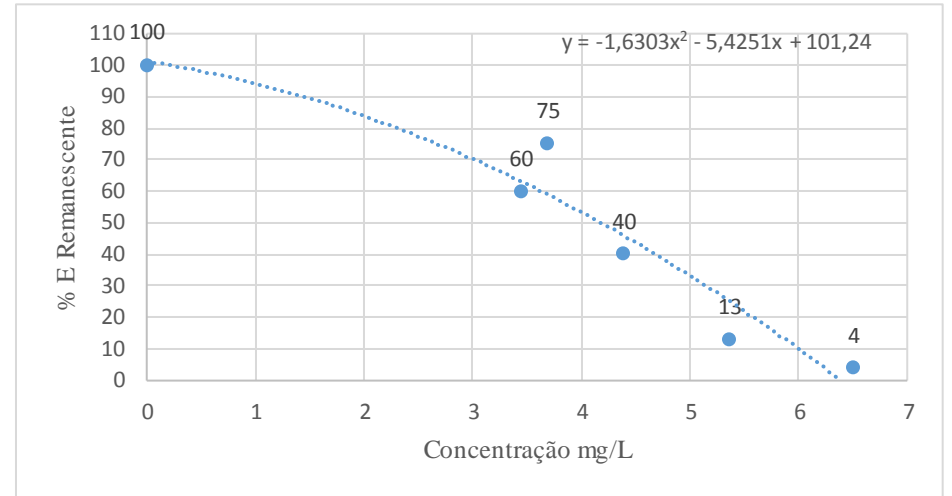
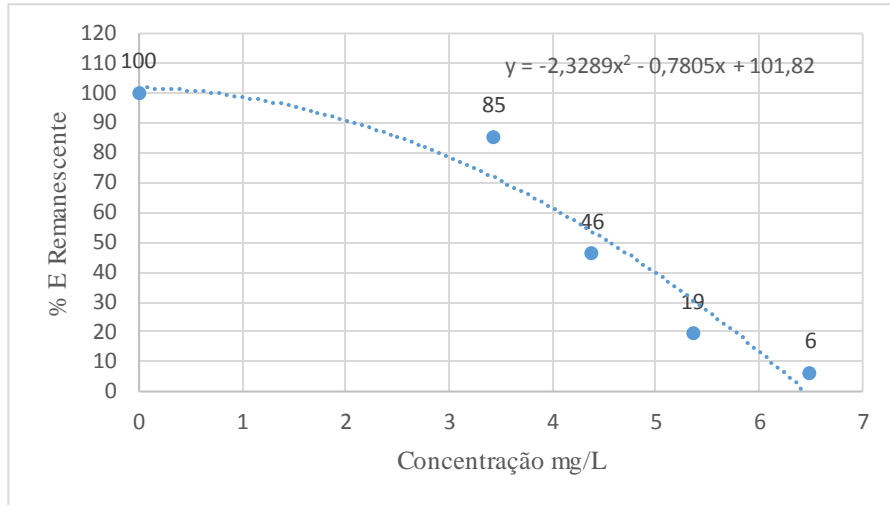
Dicromato de Potássio 129,2 mg/L



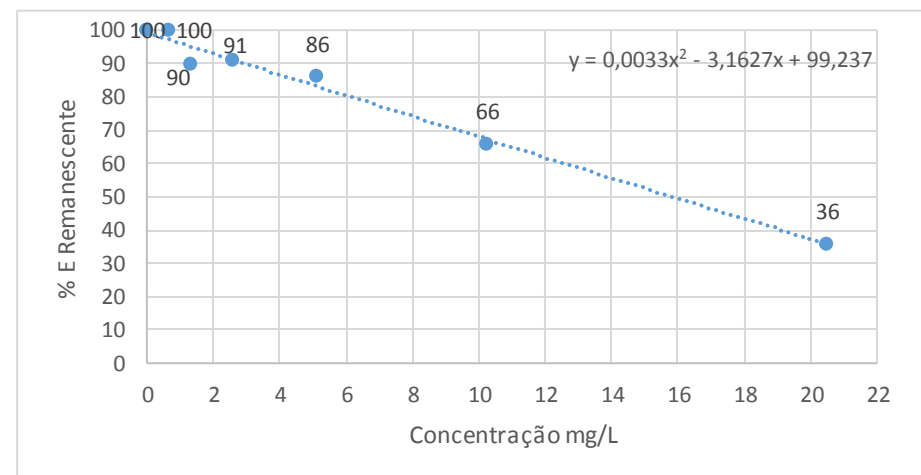
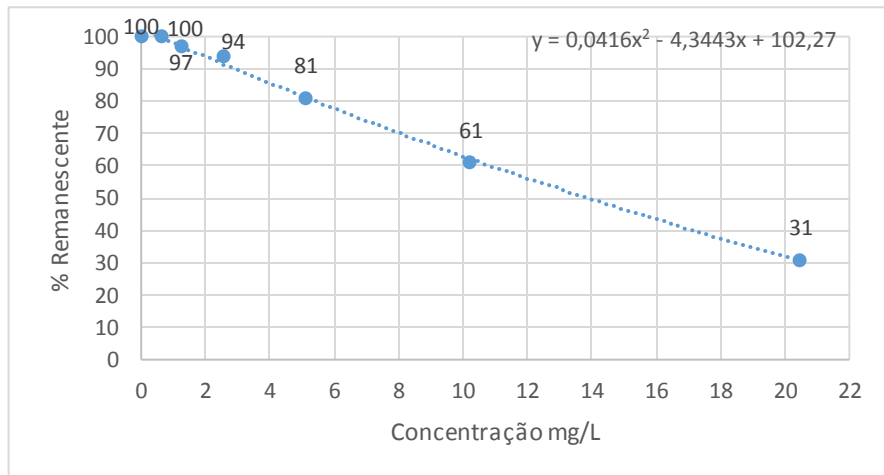
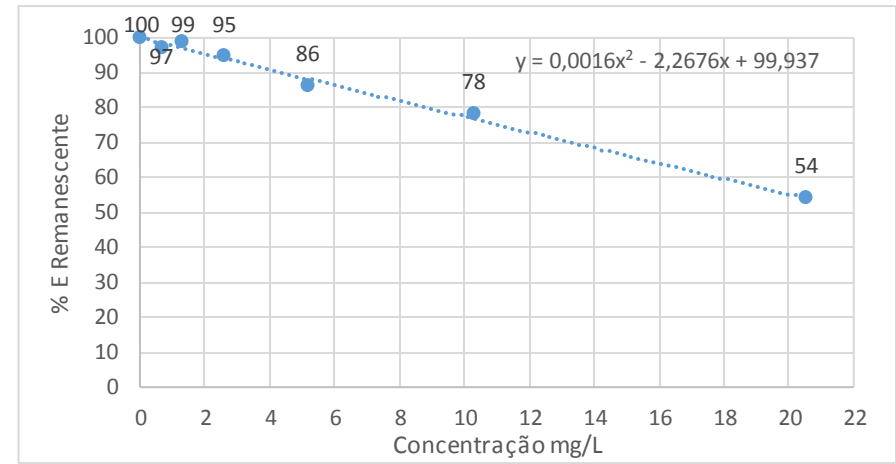
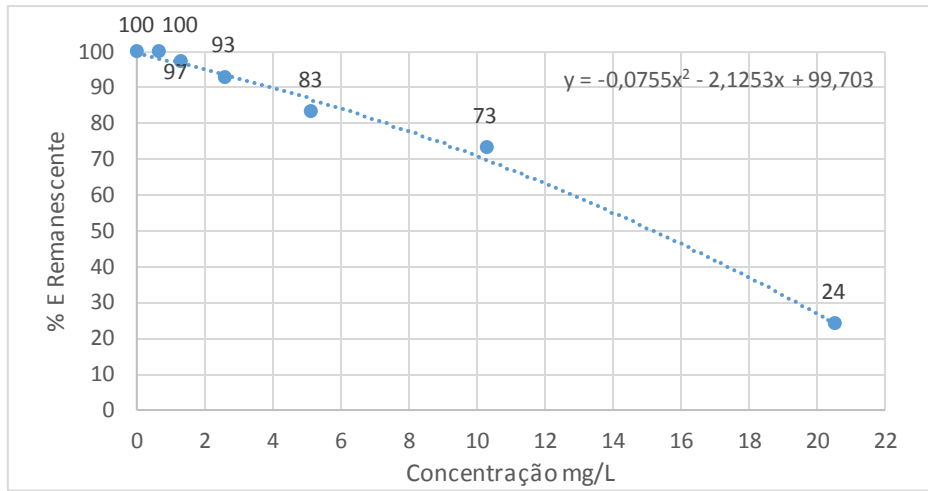


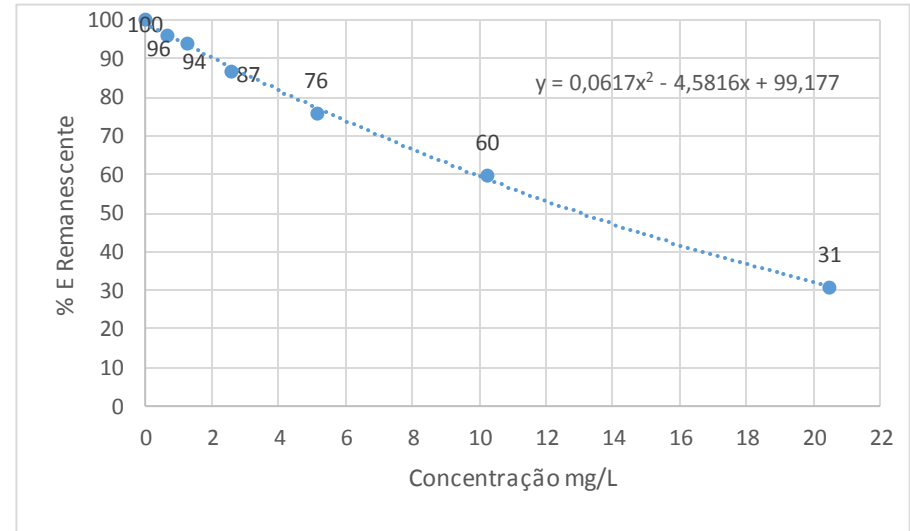
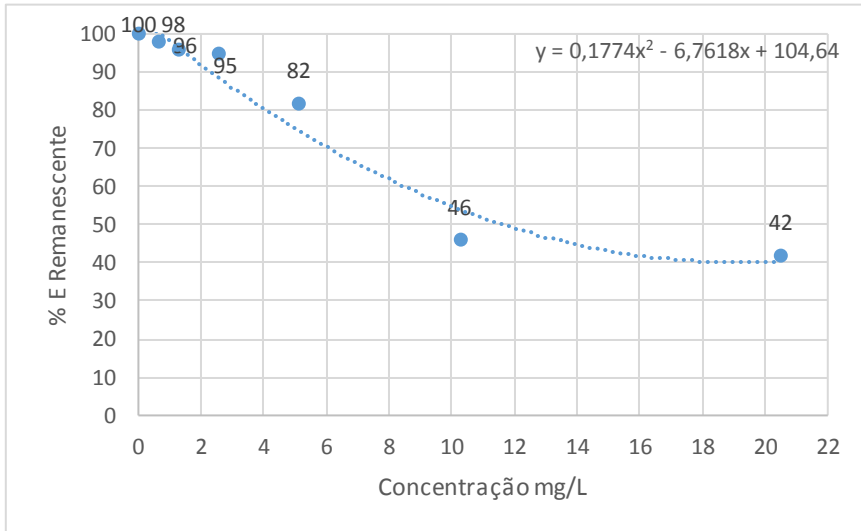
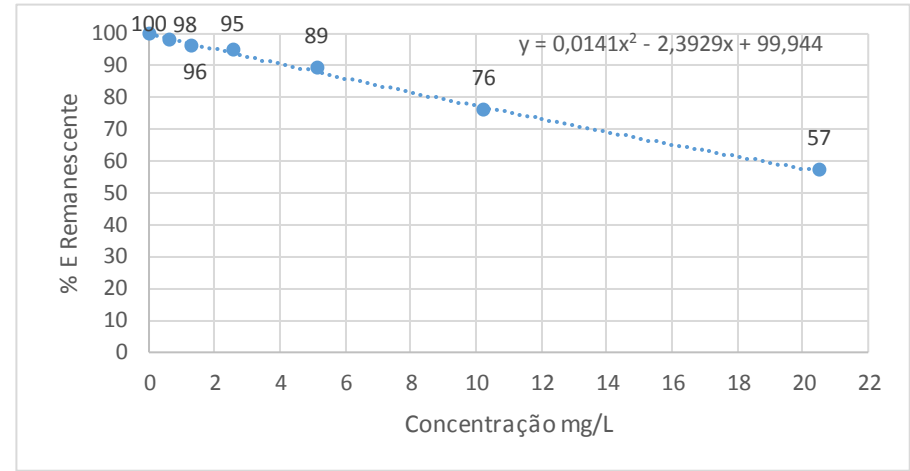
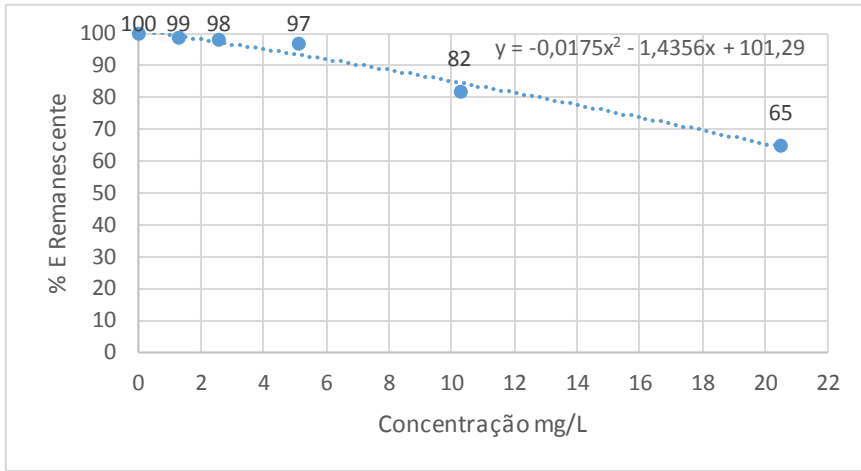
### 3, 5-Diclorofenol



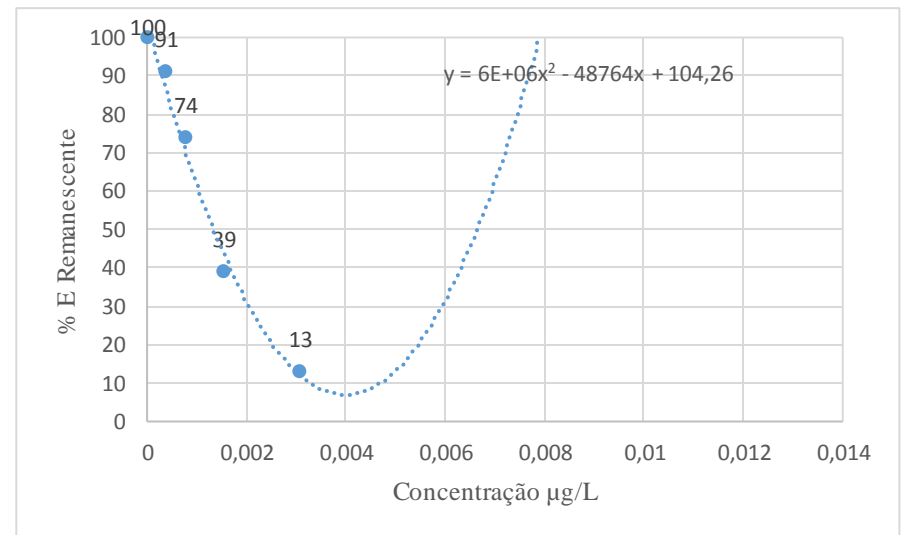
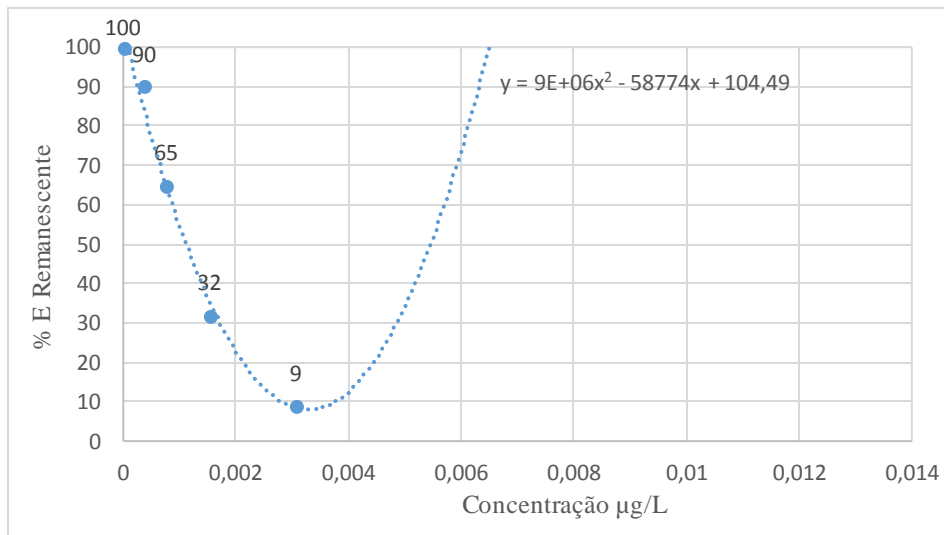
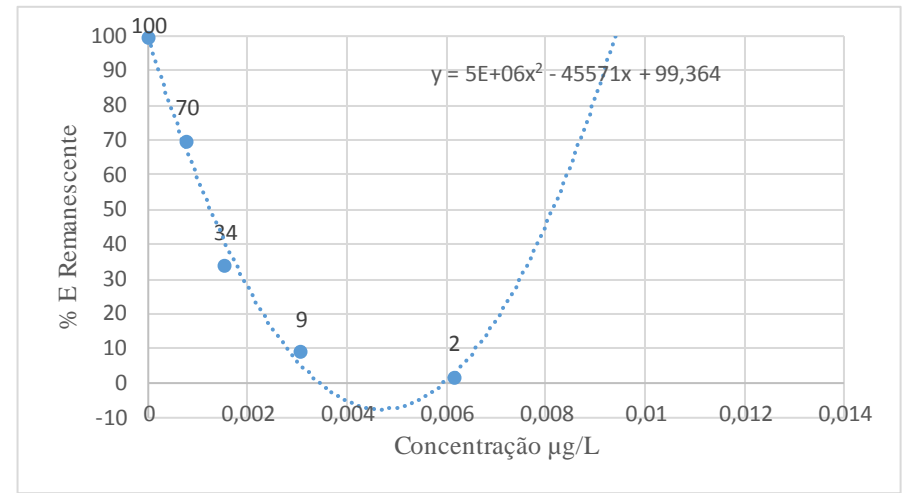
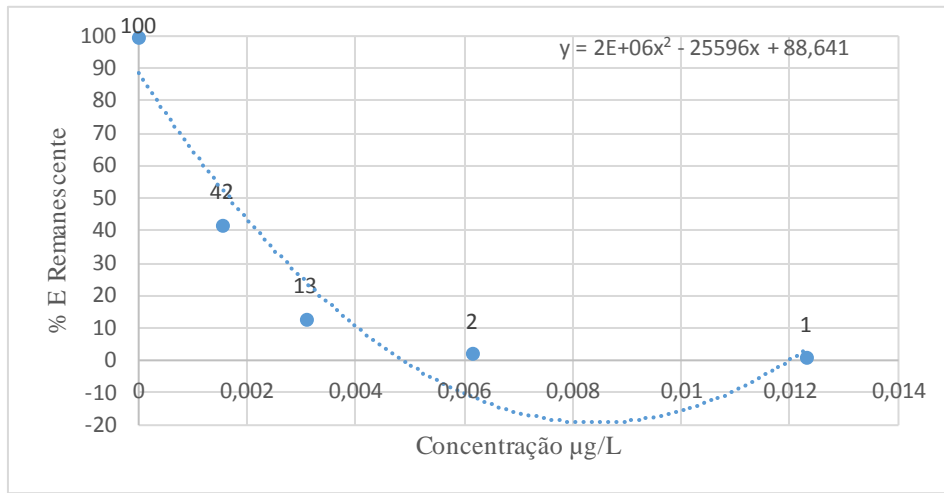


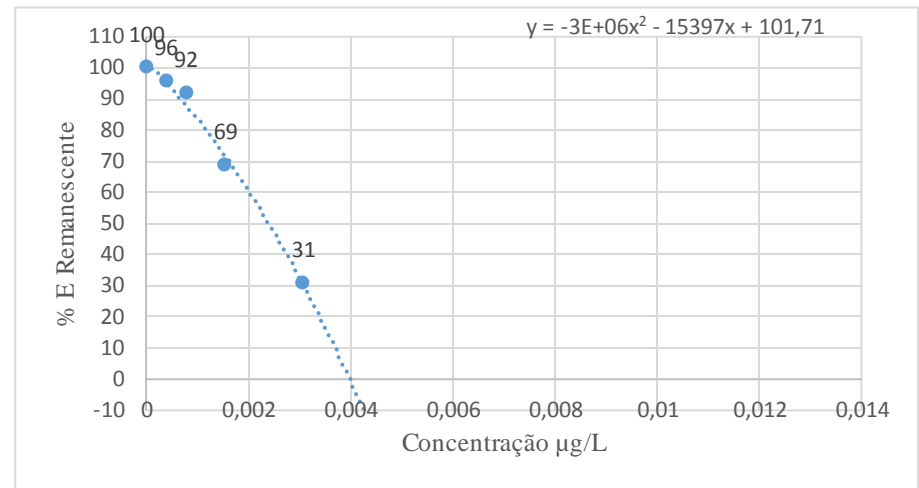
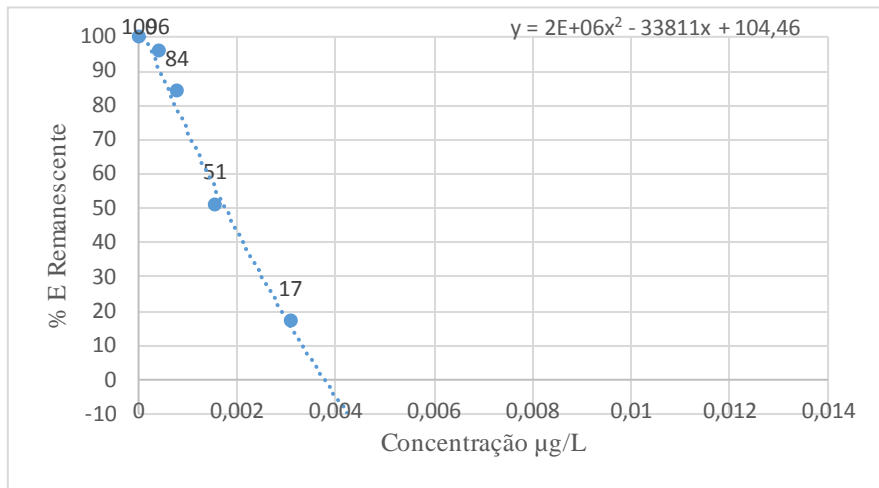
Cloritos 25 mg/L



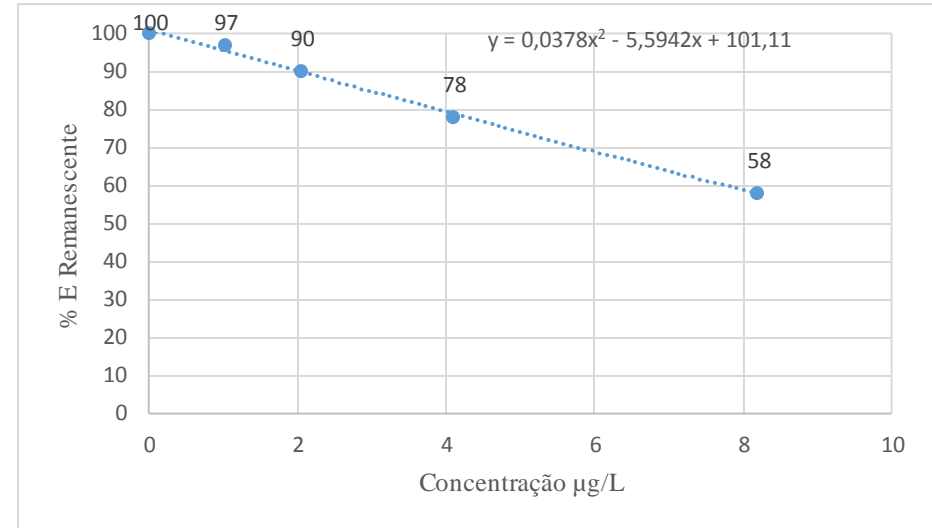
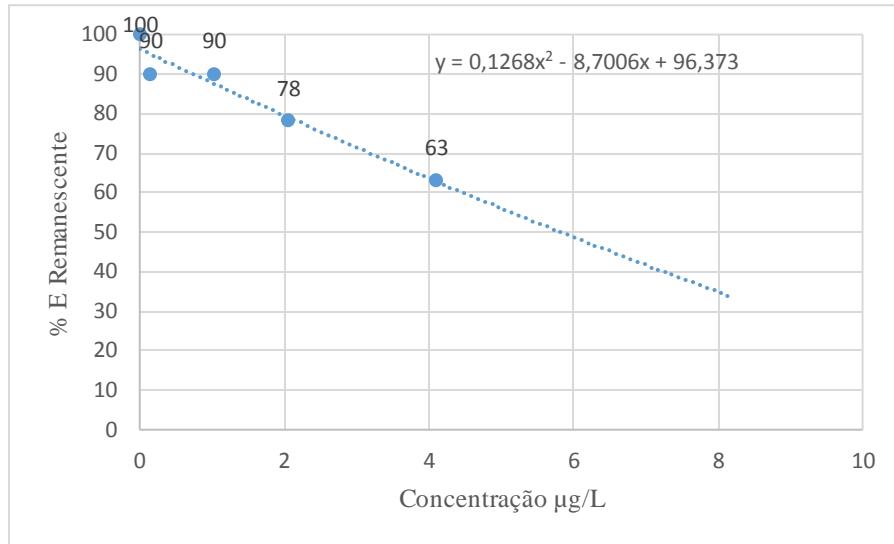


Anatoxina-a 0,15 µg/L





Saxitoxina 10 µg/L



# Anexo I – Procedimento Microtox FX

## 81.9 % Basic Test

1. Place cuvettes in cuvette rack
  - a. A1 through to A5 and B1 through to B5
2. Add 1,000 uL of Microtox Diluent to cuvettes A1 through A4
3. Add 2,000 uL of sample to cuvette A5.
4. Add 200 uL of Microtox Osmotic Adjusting Solution to cuvette A5 and mix using pipettor.
5. Make 1:2 serial dilutions by transferring 1000 uL, mixing after each transfer:
  - a. A5 to A4
  - b. A4 to A3
  - a. A3 to A2, discarding 1000 uL from A2. (A1 should remain as a negative control and should just contain diluent)
6. Reconstitute 2 vials of Microtox SOLO Reagent using 300 uL of Microtox Diluent per vial.
7. Combine vials and mix with pipettor.
8. Transfer 100 uL of reconstituted reagent into cuvettes B1 through B5
9. Wait 15 minutes to allow reagent to equilibrate.
10. From the **MAIN MENU**, press the **DOWN ARROW** key until **B-Tox** is selected.
11. Without a cuvette in the Sample Chamber press the enter key. The instrument will display '**Tuning PMT**'. During this time the instrument creates and opens a record. The screen will then display **BTOX: CONTROL, Insert Cuvette**.
12. Place the control cuvette (B1) into the Sample Chamber. Close the lid. Press the **ENTER** key to take a reading of the control cuvette. The instrument will then display '**PMT Settling Please Wait**'
13. The instrument will then prompt the user to Insert Sample 1. Place the cuvette B2 into the sample chamber. Close the lid. Press the **ENTER** key to take a reading, continue reading all the cuvettes in row B.
14. After all cuvettes have been read, use the arrow keys to scroll to **DONE**. Start a five minute countdown on a timer.
15. Immediately add 900 uL as follows, mixing the contents of each cuvette by gently swirling:
  - a. From A1 to B1
  - b. From A2 to B2
  - c. From A3 to B3
  - d. From A4 to B4
16. Following the 5 minute countdown an alarm will sound and the instrument will prompt the user to '**Reinsert Cuvette, Reread Control**'. Insert the B1 (control cuvette) in the sample chamber. Close the lid. Press the **ENTER** key.
17. The instrument will then prompt the user to '**Reinsert Cuvette 1, Reread Sample**'. Place the cuvette from B2 into the Sample Chamber. Close the lid. Press the **ENTER** key to take a reading, continue rereading all cuvettes in row B.
  - a. NOTE: As the instrument read, the analyser will display % light loss or gain for each dilution. This is then stored in the DATA section.
18. Once all samples have been read the instrument will display **DONE** press **ENTER**.
19. Once the data has been downloaded onto Note Pad it will need to be entered into the Microtox FX EC50 81.9% graph.