

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE LIXIVIADOS DE
LAMAS PROVENIENTES DE ESTAÇÕES DE
TRATAMENTO DE ÁGUAS.
CAPACIDADE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
ALFACE (*LACTUCA SATIVA*)**

CARLA ALEXANDRA MOREIRA VIEIRA

Mestrado em Engenharia Química

Ramo Tecnologias de Protecção Ambiental

Novembro 2009

Orientador: Doutora Susana R. Sousa

Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, ISEP

Co-orientador: Mestre Cristina Antão

Empresa Equilibrium - Laboratório de Controlo de Qualidade e de Processos, Lda.

Local de realização do trabalho: Equilibrium - Laboratório de Controlo de Qualidade e de Processos, Lda (Laboratório Acreditado L0312).

AGRADECIMENTOS

À Doutora Susana Sousa, enquanto docente orientadora neste projecto, pela completa dedicação, incentivo, auxílio e persistência; elemento fundamental na execução deste trabalho.

À Mestre Cristina Antão, co-orientadora, responsável pela empresa *Equilibrium-Laboratório de Controlo de Qualidade e de Processos, Lda.*, pelo apoio, ajuda e empenho, e pela total confiança na disponibilização de todos os meios necessários para o desenvolvimento da parte experimental.

À Eng.^a Sónia Mendes e Eng.^a Sofia Oliveira, responsáveis dos laboratórios de Microbiologia e Química, respectivamente, da empresa Equilibrium, por toda a disponibilidade e ajuda.

Ao meu marido pelo apoio incondicional e total compreensão.

RESUMO

A água superficial para posterior consumo humano, tem de passar por diversas etapas de tratamento, de forma a dar cumprimento aos requisitos da legislação vigente, decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto. Como resultado do referido tratamento produzem-se resíduos, nomeadamente, as lamas de clarificação de água. De acordo com a estratégia da União Europeia, a deposição em aterro destas lamas apenas deverá ser efectuada em situações excepcionais ou temporárias. A procura de uma solução ambientalmente mais aceitável para o destino final a atribuir a estas lamas de clarificação de água deverá ser, um dos objectivos das empresas abastecedoras de água para consumo humano.

Com o intuito de verificar a possibilidade de utilização das lamas produzidas nas Estações de Tratamento de Água (ETA) em solos agrícolas, realizaram-se testes ecotoxicológicos para avaliar a capacidade de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*). Foram igualmente realizadas determinações de alguns metais nos lixiviados, por espectrofotometria de absorção atómica com atomização por chama e por Câmara de grafite. O cádmio e o chumbo por imposição da legislação aplicável aos géneros alimentícios, Regulamento (CE) 1881/2006 de 19 de Dezembro e o alumínio e o ferro por estarem presentes nos tratamentos de algumas das águas superficiais em estudo.

As lamas estudadas eram provenientes de ETA com captação de água superficial em rios e albufeiras distintos do norte de Portugal, com utilização de tratamentos também diferentes.

Os resultados obtidos com os lixiviados das lamas provenientes das ETA com captações dos rios Ferreira, Ferro e Vizela e Tâmega, evidenciaram inibição da germinação para algumas das diluições testadas. No entanto, não se observou qualquer efeito tóxico para as lamas das ETA com captações da albufeira do Alto Rabagão e dos rios Rabaçal, Douro e Paiva.

Dos metais alumínio, cádmio, ferro e chumbo determinados nos lixiviados, apenas o alumínio estava acima do limite de detecção. No entanto, não foi possível estabelecer qualquer correlação entre o tratamento aplicado à água superficial nas várias ETA com a concentração do alumínio nem com os resultados dos ensaios ecotoxicológicos. Não obstante, parece haver relação entre a proximidade geográfica do local de captação de água e os resultados dos bioensaios.

Palavras chave: *Lactuca Sativa*, germinação, ETA, bioensaio, ecotoxicidade

ABSTRACT

The surface water for human consumption has to undergo several stages of treatment, in order to meet applicable legislation requirements, Decree-law nr. 306/2007 from 27th of August. Residues such as water clarification sludge are a result from those treatments. According to the European Community strategy, deposition in residue landfills should only be done in exceptional or temporary situations. The search for an environmental acceptable solution for a final disposal should be considered as one of the objectives of the human consumption water supply companies.

The objective of this work was to determine whether sludge produced by water treatment systems could be used in agriculture soils. For that, ecotoxicological tests were performed using sludge leachates in order to evaluate lettuce (*Lactuca sativa*) seeds germination capability.

Some metals were also determined, by Atomic Absorption Spectrophotometer with flame and electrothermal atomization, on the sludges leachates. Cadmium and lead by legal document applicable imposition to food genders, EC Regulation nr. 1881/2006 from 19th of December, and aluminium and iron because they are present on some of the studied surface water treatments.

The studied sludges were provided from Water Treatment Stations with surface water captation in several rivers on the north of Portugal with different kinds of treatments.

The results obtained with the sludge leachates formed by the water treatment station with water captation on Ferreira, Ferro and Vizela and Tâmega rivers, showed germination inhibition for some of the tested dilutions. On the other hand, no germination inhibition was observed for the sludge leachates from the water treatment system with surface water captation from the Alto Rabagão albufeira, and Rabaçal, Douro and Paiva rivers.

Only aluminium was detected among the analysed metals. However it was not possible to establish a correlation between the surface water treatment and the aluminium concentration or even to the ecotoxicological results. On the contrary, the geographical location of water captation seemed to be related to the bioassay results.

Key words: *Lactuca Sativa*, germination, ETA, bioassay, ecotoxicity

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
ÍNDICE GERAL.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJECTIVOS	1
1.2 ENQUADRAMENTO LEGAL DO DESTINO FINAL DE LAMAS PROVENIENTES DO TRATAMENTOS DE ÁGUAS	1
1.3 AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE LAMAS	3
1.4 ORGANISMOS TESTE USADOS.....	6
1.5 ENQUADRAMENTO DAS LAMAS TESTADAS	7
1.5.1 LOCAL DE CAPTAÇÃO DA ÁGUA E TIPO DE TRATAMENTO NA ETA.....	7
1.5.2 DESTINO FINAL ACTUAL DAS LAMAS	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 REAGENTES.....	11
2.2 AMOSTRAGEM E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS.....	11
2.3 EQUIPAMENTO E MATERIAL.....	12
2.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	13
2.4.1 PREPARAÇÃO DE LIXIVIADOS.....	13
2.4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS LIXIVIADOS	14
2.5 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO ARTIFICIAL E ORGANISMOS TESTE	19
2.6 ENSAIOS DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i>	20
2.6.1 OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TESTE DE AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i>	21

2.6.2 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i>	23
2.6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i>	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1 OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TESTE	27
3.2 PROVENIÊNCIA DAS AMOSTRAS TESTE.....	31
3.3 ENSAIOS DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i>	31
3.4 DETERMINAÇÃO DE METAIS	37
4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO	41
5. BIBLIOGRAFIA.....	45
ANEXO I - Boletim de análise do solo artificial.....	A1
ANEXO II - Características das sementes de <i>Lactuca sativa</i> buttercrunch	B1
ANEXO III - Tipo de tratamento da água nas várias ETA onde foram recolhidas as lamas para estudo.....	C1
ANEXO IV - Extracto do Decreto-Lei n.º 276/2009 de 2 de Outubro, que estabelece o regime jurídico da utilização agrícola das lamas de depuração	D1
ANEXO V - Extracto do Regulamento (CE) N.º 1881/2006 de 19 de Dezembro de 2006, alterado pelo Regulamento (CE) N.º 629/2008 de 2 de Julho de 2008, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios	E1

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de Bioensaios e respectivos organismo teste para diversas matrizes (água, lixiviados, solos ou resíduos sólidos)	5
Tabela 2 - Local de captação da água e tipo de tratamento aplicado nas várias ETA estudadas.	8
Tabela 3 - Concentrações utilizadas para as curvas de calibração do Cd, Fe e Pb em AAS – atomização por chama.....	16
Tabela 4 - Condições de ensaio de ecotoxicidade definidos na EPA 600/3-88/029 ^[11] para a germinação de sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	21
Tabela 5 - Condições de ensaio utilizadas nos ensaios de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i>	23
Tabela 6 - Concentração de Al nos lixiviados das lamas A-G, determinada por AAS-atomização electrotérmica, e respectivas incertezas.	38
Tabela 7 - Limites de detecção, de quantificação, ^[28] incerteza ^[29] do método e equações das rectas de calibração obtidas na determinação do Cd, Fe e Pb por AAS chama de ar/acetileno.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Etapa inicial da montagem do ensaio: a) disposição das caixas de Petri (n=3 por concentração), utilizando 30 g de areia, b) caixas de Petri após colocação de 10 mL de lixiviado, c) distribuição das 20 sementes de <i>Lactuca sativa</i>	24
Figura 2 - Demonstração das etapas de germinação durante as 120 h de ensaio: a) após as 48h iniciais de estufa ao abrigo da luz, b) com luz durante 16 h em saco transparente fechado, c) após a etapa final de 56 h de estufa.....	24
Figura 3 - Imagem onde se apresentam as sementes de <i>Lactuca sativa</i> germinadas.....	25
Figura 4 - Resultados de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função das diluições de lixiviado, para 25 e 50 g de solo artificial (sementes colocadas na parte superior do solo).	27
Figura 5 - Resultados de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> obtidos em função das diluições de lixiviado para duas quantidades de solo artificial, 35 e 50 g (sementes colocadas na parte superior do solo).	28
Figura 6 - Resultados de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da posição relativa das sementes no solo artificial (35 e 50 g), sem controlo de humidade. .	29
Figura 7 - Resultados de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da posição relativa das sementes no solo artificial (35 e 50 g), com controlo de humidade. .	30
Figura 8 - Resultados obtidos para a germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da posição relativa das sementes no solo artificial (50 g de solo artificial).....	30
Figura 9 - Localização geográfica das várias ETA onde foram recolhidas as lamas estudadas.	31
Figura 10 - Resultados de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da concentração de lixiviado da lama da ETA A.	32
Figura 11 - Resultados de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da concentração de lixiviado da lama da ETA B.	33
Figura 12 - Resultados de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da concentração de lixiviado da lama da ETA E.	33
Figura 13 - Resultados de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da concentração de lixiviado da lama da ETA F.	34

Figura 14 - Resultados de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da concentração de lixiviado da lama da ETA C.....	35
Figura 15 - Resultados de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da concentração de lixiviado da lama da ETA D.....	35
Figura 16 - Resultados de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> em função da concentração de lixiviado da lama da ETA G.....	36

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AAS – Espectrofotometria de Absorção Atómica

Abs – Absorvância

Al – Alumínio

ANOVA – Análise de variâncias

Cd – Cádmió

CE – Comunidade Europeia

C_v – Coeficiente de variação

Conc – Concentração

DECO – Defesa do consumidor

DGADR - Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural

EN – Norma Europeia

EPA – Environmental Protection Agency

E_r – Erro relativo

ETA – Estação de Tratamento de Água

FDA – Food and Drug Administration

Fe – Ferro

IPAC – Instituto Português de Acreditação

ISO – International Organization for Standardization

n – Número de leituras

N – Azoto

NP – Norma Portuguesa

P – Fósforo

Pb – Chumbo

ppb – partes por bilião

ppm – partes por milhão

r - Coeficiente de correlação

RSU – Resíduo sólido urbano

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

U – Incerteza final para cada leitura

U_{var} – Incerteza associada à variabilidade/precisão da metodologia

X – Concentração média de metal

X_e – Concentração esperada de metal

X_i – Concentração do metal na leitura i

1. INTRODUÇÃO

1.1 OBJECTIVOS

A água superficial captada para posterior consumo humano, tem de passar por diversas etapas de tratamentos, tais como decantação, floculação, filtração e desinfecção. ^[1] Durante estes tratamentos são produzidos resíduos, sendo as lamas de clarificação de água o resíduo produzido em maior quantidade pela Estação de Tratamento de Água (ETA). Este resíduo é composto principalmente por água (80 a 85 por cento em massa), por material sólido presente na água superficial (por exemplo rio ou albufeira) e por hidróxidos de coagulante utilizados no tratamento. A produção elevada destas lamas, constitui uma preocupação ambiental uma vez que a alternativa mais simples, a deposição em aterro, não deve constituir a última opção na gestão daqueles resíduos. De acordo com a estratégia da União Europeia ^[2-4] a deposição em aterro apenas deverá ser efectuada em situações excepcionais ou temporárias. A procura de uma solução ambientalmente mais aceitável para o destino final a atribuir a estas lamas de clarificação de água deverá ser um dos objectivos das empresas abastecedoras de água para consumo humano.

Constituindo a aplicação de lamas na agricultura uma das alternativas à deposição deste resíduo em aterro e com o intuito de avaliar o resultado desta prática, estudou-se o efeito ecotoxicológico na capacidade de germinação das sementes de alface (*Lactuca sativa*).

1.2 ENQUADRAMENTO LEGAL DO DESTINO FINAL DE LAMAS PROVENIENTES DO TRATAMENTOS DE ÁGUAS

O solo desempenha uma variedade de funções vitais, de carácter ambiental, ecológico, social e económico. Constitui um importante elemento paisagístico, patrimonial e físico para o desenvolvimento de infra-estruturas e actividades humanas, uma vez que é um recurso complexo, dinâmico, interactivo e não renovável, cada vez mais sob a pressão da actividade humana. ^[1,5]

A protecção do solo e a limitação dos processos de degradação deste são reconhecidamente imprescindíveis para a sua sustentabilidade do desenvolvimento, existindo no entanto, o paradoxo de um vazio de legislação.

A poluição do solo é um tema que tem suscitado interesse e preocupação dos especialistas, das autoridades e das sociedades. São importantes não só os aspectos ambientais e de saúde pública inerentes, como também a ocorrência de episódios críticos de poluição.

Atendendo não só à sua escassez como recurso natural finito, acresce ao solo, a função nuclear na regulação do ciclo da água e na manutenção da sua qualidade. Presentemente assistimos ao ressurgir de aplicações como a produção de energia, como é o caso dos biocombustíveis, o papel fundamental que desempenha na redução das emissões de carbono, o suporte da biodiversidade, bem como a sua procura para actividades de lazer das populações.

Assim, com o acréscimo da sensibilidade ambiental por parte da sociedade, e em especial no sector agrícola e florestal, o solo passou a ser assumido como um recurso precioso, escasso e indispensável à sustentabilidade dos nossos ecossistemas e à salvaguarda do planeta. É assim fundamental e estratégico, pelas profundas alterações geopolíticas que as sociedades actuais têm sofrido, que se promovam políticas de defesa e conservação dos solos. ^[6]

A importância da aplicação das lamas nos solos resulta dos seus elevados teores em matéria orgânica, azoto, fósforo, cálcio e outros elementos minerais. Sendo a maioria dos nossos solos pobres em matéria orgânica, a deposição de lamas permite ultrapassar este problema de forma económica contribuindo, simultaneamente, para a solução de um problema ambiental. ^[7] No entanto, a deposição de lamas contendo elevados teores em metais pesados nos solos pode ser particularmente grave, pelas repercussões nocivas que podem ter na qualidade sanitária dos produtos agrícolas ou animais pelo facto de ser passível a sua bioconcentração e bioacumulação nos tecidos vegetais e animais, entrando na cadeia alimentar do Homem. ^[8]

Os benefícios para os solos e culturas só se verificam se a aplicação das lamas for feita correctamente, respeitando as épocas, técnicas de aplicação e quantidades a depositar, as condicionantes do solo, clima e das culturas agrícolas. Não obstante a importância desta actividade, importa garantir que a aplicação das lamas não prejudica a qualidade do ambiente, em especial das águas e dos solos, e não constitui um risco para a saúde pública. A grande motivação desta prática reside, assim, na necessidade de atingir dois

objectivos ambientais primordiais: a valorização de resíduos e a protecção do ambiente e da saúde pública.

A legislação nacional aplicável (decreto-Lei n.º 276/2009 de 2 de Outubro), ^[9] impõe a verificação de requisitos de qualidade para as lamas e para os solos, verificáveis através da conformidade das análises requeridas com os valores limite estabelecidos, define um conjunto de restrições à utilização das lamas no solo, prevê procedimentos específicos de aplicação das lamas, bem como deveres de registo e informação por parte dos operadores de gestão de lamas.

O licenciamento da utilização agrícola das lamas de depuração tem por base o plano de gestão de lamas que, entre outros aspectos, identifica as explorações onde se prevêem realizar as respectivas aplicações. O referido plano é complementado pela declaração anual do planeamento das operações, que define as parcelas a estabelecer. ^[9]

A introdução destes instrumentos de planeamento e gestão, cujo cumprimento fica a cargo de um técnico responsável acreditado pela Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR) de acordo com um conjunto concreto de requisitos, obvia a necessidade de licenciamento por proveniência e destino das lamas. ^[9] Compete a esse técnico assegurar o cumprimento dos requisitos da legislação aplicável (decreto-Lei n.º 276/2009 de 2 de Outubro) no que se refere à utilização de lamas em solos agrícolas, designadamente as relativas ao controlo da qualidade das lamas e dos solos, aos procedimentos de aplicação das lamas, aos deveres de registo e informação, à formação do pessoal afecto à actividade de utilização das lamas em solos agrícolas, e, bem assim, assegurar o cumprimento das demais orientações técnicas impostas pelas entidades competentes. ^[9]

1.3 AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE LAMAS

A preservação do meio ambiente é um tema central no actual contexto mundial. A consciencialização de que o futuro da humanidade e do planeta depende da manutenção do equilíbrio ecológico, tem originado uma crescente mobilização dos organismos públicos e de alguns segmentos do sector privado, quanto à avaliação e redução dos riscos de impacto ambiental resultantes de actividades antropogénicas. ^[1]

A Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos das substâncias químicas (naturais ou sintéticas), nos ecossistemas e a sua acção nos organismos. Estuda agentes

de *stress* que afectam o crescimento, a reprodução, o comportamento e a sobrevivência dos indivíduos. O âmbito da Ecotoxicologia compreende a identificação e estudo dos poluentes ambientais e respectivos efeitos biológicos (toxicológicos). Os efeitos biológicos dos químicos podem ir desde um efeito molecular num organismo (alteração genética) até aos efeitos da biosfera como um todo. ^[10]

Através da Ecotoxicologia pode-se efectuar uma avaliação de risco, por identificação dos efeitos adversos resultantes da exposição do ecossistema a um ou mais factores de *stress* ambiental, prevenindo a sua degradação. A monitorização ambiental e biológica pode ser realizada através de ensaios de ecotoxicidade, utilizando bioindicadores. Estes organismos reagem a alterações ambientais passíveis de serem observadas, avaliadas e quantificadas.

Os ensaios de ecotoxicidade, podem avaliar os efeitos de uma mistura complexa a nível de toxicidade aguda, toxicidade crónica, genotoxicidade, bioacumulação ou persistência, fazendo assim, uma abordagem integrada passível de traduzir os efeitos a nível do ecossistema. Os ensaios de ecotoxicidade começaram a ser utilizados para a avaliação da toxicidade de efluentes no século XX, e, desde então, a Ecotoxicologia tem tido uma grande evolução. Apesar de existir muita informação laboratorial sobre a toxicologia de substâncias químicas, pouco se conhece sobre a toxicidade de misturas complexas e os seus efeitos no meio receptor. A década de 80 caracterizou-se pela utilização de integração de factores biológicos e químicos nos estudos ecotoxicológicos, desenvolvimento de ensaios com organismos de vários níveis tróficos, e também pelo desenvolvimento de metodologias para avaliação do risco ecológico. ^[11]

A ecotoxicologia é um dos novos campos da ciência que busca compreender a forma como os ecossistemas metabolizam, transformam, degradam, eliminam, acumulam e sofrem acção da toxicidade das diversas substâncias químicas neles introduzidas. Desta forma, testes ecotoxicológicos são metodologias que permitem avaliar a toxicidade de substâncias sobre os organismos através da exposição de organismos vivos (bioindicadores). ^[12]

A necessidade de testes rápidos e sensíveis para o diagnóstico da qualidade de recursos hídricos e de solos reflecte-se a nível mundial. Bioindicadores, como crustáceos, bactérias e algas têm sido aplicados em ensaios eficazes de toxicidade aguda, complementando os parâmetros físico-químicos de efluentes industriais ou lixiviados, e sendo contemplados pelas legislações europeias e transpostas para a legislação nacional. ^[11] Os mesmos bioindicadores podem ser utilizados em ensaios crónicos, que monitorizam alterações mais subtis e a longo prazo nos próprios ecossistemas aquáticos.

No caso da avaliação do impacto de misturas de substâncias químicas em solos, resíduos sólidos ou dos respectivos lixiviados, poderão ser usados ensaios de germinação com sementes de alface, anelídeos (minhocas), etc.

Na Tabela 1 são apresentados alguns exemplos de bioensaios em matrizes líquidas (água ou lixiviados) e sólidas (solos ou resíduos sólidos) e respectivos organismos teste.

Tabela 1 - Exemplos de Bioensaios e respectivos organismo teste para diversas matrizes (água, lixiviados, solos ou resíduos sólidos)

Bioensaios em que a matriz é a água ou lixiviados (de resíduos sólidos) que utilizam organismos aquáticos

- *Vibrio fischeri* (bactéria)
 - *Daphnia magna* (microcrustáceo)
 - *Thamnocephalus platyurus* (microcrustáceo)
 - *Artemia franciscana* (microcrustáceo no caso de amostras salinas)
 - *Pseukircheneriella subcapitata* (alga)
 - *Lemna minor* (macrófita)
-

Bioensaios em que a matriz são solos, resíduos sólidos ou lixiviados que utilizam organismos terrestres

- *Lactuca Sativa* (alface)
 - Anelídeos (minhocas)
-

A toxicidade de resíduos pode ser avaliada utilizando duas estratégias distintas: através de testes de análise química ou utilizando testes toxicológicos. Na aproximação química são usadas as análises de substâncias químicas para estimar a toxicidade. Se a concentração de uma substância ultrapassa os valores permitidos é considerada como tóxica. Na aproximação toxicológica usam-se os bioensaios para medir directamente a toxicidade, de misturas químicas complexas. De um modo genérico, estas duas aproximações complementam-se e, dependendo das condições específicas da matriz podem ser utilizadas individualmente ou em conjunto para estimar a toxicidade.

De seguida apresentam-se as vantagens de utilização de bioensaios para avaliar a toxicidade de uma dada matriz: ^[11]

- Os testes ecotoxicológicos medem a toxicidade global de todos os constituintes de uma mistura complexa, incluindo os efeitos aditivos, sinérgicos e antagónicos;
- A biodisponibilidade de substâncias tóxicas pode ser avaliada com estes testes mas não pode com os ensaios químicos. Então, os resultados quantitativos podem sobre ou subestimar as toxicidades de substâncias químicas individuais;
- As análises químicas de misturas complexas (em especial no caso das substâncias orgânicas) podem ser muito mais dispendiosas do que os testes de toxicidade;
- As análises químicas podem não considerar substâncias que podem estar presentes;
- Não existem valores permitidos por lei para muitas substâncias químicas;
- Nem sempre é claro, através dos resultados de análises químicas a misturas complexas, quais as substâncias que causam toxicidade.

A estratégia de se utilizar os testes de análise química pode ser apropriado nos seguintes casos:

- Resíduos simples (com poucas substâncias presentes), para os quais as análises toxicológicas são mais dispendiosas do que as análises químicas;
- Presença de substâncias químicas específicas, tais como, compostos carcinogénicos ou os que provocam bioacumulação, pode ser avaliada directamente;
- No desenvolvimento de sistemas de tratamento que são mais facilmente indicados para eliminar químicos específicos, do que para reduzir um parâmetro genérico como a toxicidade.

1.4 ORGANISMOS TESTE USADOS

As plantas são sensíveis a substâncias tóxicas e podem ser utilizadas como bioindicadores. Alguns estudos têm demonstrado a eficiência de espécies como pepino e

agrião, alface e soja em testes de toxicidade, sendo que a fitotoxicidade pode ser determinada pela germinação das sementes, alongamento da raiz e crescimento da muda. ^[12]

As sementes de *Lactuca sativa* fornecem diversas vantagens sobre outros organismos teste, nomeadamente no que diz respeito ao baixo preço, são fáceis de cultivar, não sendo necessária manutenção entre experiências, como acontece por exemplo com a *Daphnia Magna*.

A *Lactuca sativa* L. variedade *Buttercrunch* é a espécie padrão recomendada para bioensaios pela U.S. Environmental Protection Agency, EPA, a Food and Drug Administration, FDA e pela Organization for Economic Cooperation and Development.

Da pesquisa efectuada percebe-se que a *Lactuca sativa* se trata, de facto, de um organismo de aplicação versátil, apresentando sensibilidade a uma diversidade de aspectos, tendo permitido obter resultados em estudos para avaliação dos efeitos ecotoxicológicos de lamas de depuração, ^[13] de poluentes farmacêuticos, ^[14] de solos poluídos ^[15] e formulações químicas, ^[16] para monitorização de solos remediados, ^[17] para determinação da qualidade de águas, ^[18,19] entre outros.

1.5 ENQUADRAMENTO DAS LAMAS TESTADAS

1.5.1 LOCAL DE CAPTAÇÃO DA ÁGUA E TIPO DE TRATAMENTO NA ETA

As lamas estudadas eram provenientes de ETA com captação de água superficial em rios e albufeiras distintos do norte de Portugal, com utilização de tratamentos também diferentes. Na tabela 2 encontram-se descritos os locais de captação de água e o tipo de tratamento aplicado em cada ETA em estudo.

Tabela 2 - Local de captação da água e tipo de tratamento aplicado nas várias ETA estudadas.

ETA	Local de captação da água	Tratamento
A	Albufeira do Alto Rabagão	Ozono e Dióxido de carbono
B	Rio Rabaçal	Polielectrólito - Sulfato de alumínio
C	Rio Ferreira	Polielectrólito - Sulfato de alumínio
D	Rio Ferro e Vizela	Polielectrólito – Policloreto de alumínio
E	Rio Douro	Polielectrólito - Sulfato de alumínio
F	Rio Paiva	Polielectrólito – Cloreto férrico
G	Rio Tâmega	Polielectrólito - Sulfato de alumínio

1.5.2 DESTINO FINAL ACTUAL DAS LAMAS

Como já foi referido anteriormente, durante os tratamentos de águas superficiais para consumo, são produzidos resíduos, sendo as lamas de clarificação de água o resíduo produzido em maior quantidade pelas ETA. A produção elevada destas lamas, constitui uma preocupação ambiental uma vez que a alternativa mais simples, a deposição em aterro, não deve constituir a última opção na gestão daqueles produtos. De acordo com a estratégia da União Europeia ^[2,4] a deposição em aterro apenas deverá ser efectuada em situações excepcionais ou temporárias. A procura de uma solução ambientalmente mais aceitável para a redução e destino final a atribuir a estas lamas de clarificação de água deverá ser então um dos objectivos das empresas abastecedoras de água para consumo humano.

A redução de produção de lamas deverá constituir a primeira opção das empresas. Esta pode estar ligada a uma alteração na gestão das águas de origem, isto é, utilização de maior quantidade de água subterrânea relativamente à água superficial. Outro factor importante para uma menor produção de lamas pode estar ligado ao facto da ocorrência de menos registos de turvação nas águas superficiais (partículas em suspensão).

No que concerne ao destino final das lamas, apontam-se como referência as seguintes soluções: valorização agrícola, recuperação de solos, florestas, recobrimento de aterros sanitários, selagem de lixeiras (recuperação paisagística), construção civil (fabrico de tijolos), cerâmica (incorporação de 20 % de lamas), estradas (recuperação/sementeira de taludes), áreas verdes, co-incineração/cimento (incorporação no cimento, valor calorífico

para a queima), incineração (combustível, valor calorífico para as incineradoras) e co-compostagem com resíduos sólidos urbanos (RSU). [20]

O caso da ETA de Lever é um exemplo de aplicação de uma destas técnicas, tendo elaborado um protocolo com um fabricante nacional de materiais de construção desde o início de 2006 em que as lamas são valorizadas por reciclagem. Uma outra alternativa pode ser a utilização das lamas na agricultura, possibilidade essa que está a ser avaliada neste trabalho.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho envolveu a recolha e amostragem de lamas provenientes das ETA, a preparação dos respectivos lixiviados, o controlo de pH dos lixiviados, o ensaio ecotoxicológico de germinação propriamente dito e ainda a determinação de metais nos lixiviados das lamas.

2.1 REAGENTES

A água utilizada foi sempre de qualidade ultra-pura (resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$), obtida a partir de água desionizada (condutividade inferior a $0,1 \text{ }\mu\text{S/cm}$).

As soluções padrão utilizadas para a determinação de metais por Espectrofotometria de Absorção Atómica (AAS) foram preparadas utilizando soluções stock de $1000 \pm 2 \text{ mg/L}$ de nitrato de alumínio, cádmio, chumbo e ferro, todos da Merck, grau de pureza 99,9 %.

O material de vidro utilizado foi lavado com água e detergente, passado por água desionizada e posteriormente seco em estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$. A lavagem do material de vidro usado na determinação de metais por AAS, ainda envolvia uma etapa de passagem durante cerca de 12 h em solução de ácido nítrico $\sim 0,1\%$ (v/v) após a lavagem com detergente.

Nos ensaios ecotoxicológicos utilizou-se sempre material corrente de laboratório descartável esterilizado.

2.2 AMOSTRAGEM E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS

No que se refere à amostragem, esta foi efectuada por um técnico das várias ETA no seu local de armazenamento, não sendo possível intervir nesta etapa para aplicação dos requisitos de amostragem conforme norma NP 5667-13:1997. ^[21] Embora a quantidade de amostra recebida tenha sido sempre muito superior à necessária para ensaio, o facto

de não se poder intervir na etapa de amostragem, impede garantir a representatividade da amostra recebida.

Quanto à conservação das amostras de lama, estas foram mantidas à temperatura ambiente, simulando as condições de armazenamento reais.

Após cada etapa de lixiviação, conservaram-se os lixiviados obtidos, em estufa à temperatura de $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ até um máximo de 24 h.

2.3 EQUIPAMENTO E MATERIAL

Antes da utilização da lama procedeu-se à sua secagem, utilizando-se uma estufa calibrada da marca BINDER a $T=104\pm 1^{\circ}\text{C}$.

A pesagem da amostra de lama para o ensaio de lixiviação foi efectuada com uma balança da marca KERN, modelo 572 e precisão de 0,1 g.

O ensaio de lixiviação foi efectuado primeiro, utilizando um agitador electromagnético da marca SELECTA e modelo Agimatic-N, para agitação/homogeneização da lama com a água. Finalmente, a obtenção do lixiviado foi efectuada com um sistema de filtração por sucção com filtros de $0,45\ \mu\text{m}$, utilizando uma bomba de vácuo. Para todos os lixiviados foi efectuada uma medição do pH, com um medidor de pH da marca CRISON modelo Basic 20, antes de ser mantido em estufa da marca HERAEUS, modelo BK-600 a $T=5\pm 3^{\circ}\text{C}$ até ensaio de germinação (durante um máximo de 24 h).

A preparação das diluições de lixiviado a utilizar no ensaio ecotoxicológico foi efectuada com material de vidro corrente de laboratório.

Para o ensaio ecotoxicológico foi utilizado material descartável esterilizado, uma estufa da marca HERAEUS, modelo BK-600 a $T=22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e uma fonte de luz de 10.000 lux. O solo artificial foi pesado com uma balança da marca KERN, modelo 572 e precisão de 0,1 g.

No que se refere aos metais, estes, foram determinados nos lixiviados com um espectrofotómetro de AAS da marca SHIMADZU, modelo AA-6800, equipado com chama de ar/acetileno e câmara de grafite.

Para a preparação das soluções padrão utilizadas na determinação de metais usou-se material de vidro de laboratório classe A e duas micropipetas da marca SOCOREX,

modelo Acura 825 e precisão de 1µL. As micropipetas eram de 100 µL e 1000 µL de capacidade.

Todos os equipamentos utilizados pertencem ao laboratório Equilibrium - Laboratório de Controlo de Qualidade e de Processos, Lda, acreditado segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, ^[22] pelo que, se encontram devidamente controlados.

Os resultados foram tratados estatisticamente utilizando o software de análise estatística SPSS 16.0.

2.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste ponto, serão descritos os procedimentos seguidos para a obtenção de lixiviados e sua caracterização (pH e determinação de metais), bem como o cálculo de incertezas, limites de detecção e de quantificação, ensaio de germinação de sementes de *Lactuca sativa* e tratamento estatístico de resultados.

2.4.1 PREPARAÇÃO DE LIXIVIADOS

A preparação dos lixiviados foi efectuada de acordo com a norma *EN 12457-4: Characterisation of waste - Leaching - Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges - Part 4: One stage batch test at a liquid to solid ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 10 mm (without or with size reduction)*. ^[23]

2.4.1.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE LAMA

A amostra de lama a utilizar para o ensaio de lixiviação foi inicialmente sujeita a uma operação de amostragem por esquadramento, para que se utilizassem sempre amostras significativas da respectiva lama em cada preparação de lixiviado.

Após esta operação, submeteu-se a porção de lama a secagem em estufa a 105 °C durante 12 h e só depois de arrefecida em exsiccador é que foi pesada a quantidade necessária para o ensaio. Utilizaram-se 100 g de lama seca por 1 L de água desmineralizada.

2.4.1.2 OBTENÇÃO DOS LIXIVIADOS

Os lixiviados foram obtidos conforme se descreve abaixo:

1. Pesagem de lama seca e medição de água desmineralizada de forma a obter a razão de 10 L/Kg. Habitualmente utilizaram-se 100 g de lama seca por 1 L de água desmineralizada.
2. Colocação da lama e água num frasco de vidro com agitação constante durante $24 \pm 0,5$ h a 900 r.p.m.
3. No final das 24 h de contacto, a mistura foi submetida a uma filtração por vácuo com filtro de 0,45 μm .
4. Etiquetou-se e conservou-se o lixiviado à $T=5 \pm 3$ °C até um máximo de 24 h, após determinação do valor de pH. Esta determinação do pH serviu de controlo da aptidão do lixiviado para utilização em ensaios ecotoxicológicos, sendo a gama aconselhável deste parâmetro de 5 a 7 a 20 °C. ^[24]

2.4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS LIXIVIADOS

2.4.2.1 DETERMINAÇÃO DO pH

O valor de pH foi determinado em todos os lixiviados após preparação e antes da utilização no ensaio ecotoxicológico, consistindo apenas, na leitura com eléctrodo combinado de vidro mergulhado na solução de lixiviado.

Utilizou-se esta determinação de pH como controlo da aptidão do lixiviado para utilização em ensaios ecotoxicológicos, sendo a gama aconselhável deste parâmetro de 5 a 7 a 20 °C, conforme requisito da norma ISO 5667-16:1998. [24]

2.4.2.2 DETERMINAÇÃO DE METAIS

Para que a sociedade atinja a sustentabilidade, os fluxos de energia e nutrientes devem ser otimizados. Os aspectos de qualidade da lama aplicáveis incluem aspectos de higiene (agentes patogénicos), nutrientes (N e P) e tóxicos (metais e orgânicos). De especial preocupação são os metais pelo facto de não serem degradáveis. [25] A matéria orgânica apresenta também o risco da solubilização de micropoluentes apolares com potenciais características de poluentes persistentes no meio ambiente e desreguladores endócrinos. [1]

Estudos efectuados no sentido de avaliar as características das lamas provenientes dos tanques de decantação e filtração de Estações de Tratamento de Água (ETA) nos seus aspectos físico-químicos e toxicológicos, com o objectivo de recolher informação necessária a um futuro estudo de alternativas de tratamento e destino final mais sustentáveis, demonstram que o lixiviado da lama que apresenta concentrações mais elevadas de alguns metais (tais como Zn, Cu, Al, Ni e Cr) é aquele cuja toxicidade ao microcrustáceo *Daphnia magna* é mais elevada. [18]

De forma a obter alguma diferenciação em termos de potencial de utilização das lamas em estudo na agricultura, decidiu-se proceder ao teste de alguns metais, incluídos na legislação aplicável para este fim – decreto-Lei n.º 118/2006, revogado pelo decreto-Lei n.º 276/2009. [8,9]

A legislação nacional aplicável, define um conjunto de restrições à utilização das lamas no solo, prevê procedimentos específicos de aplicação das lamas, bem como deveres de registo e informação por parte dos operadores de gestão de lamas. No que se refere aos metais, impõe valores limites para o cádmio, cobre, níquel, chumbo, zinco, mercúrio e cromo para a aplicação de lamas no solo.

Na selecção dos metais a analisar, foi ainda considerado o regulamento CE 1881/2006, [26] que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Este regulamento, apresenta apenas valores limites dos metais cádmio e chumbo para a alface (*Lactuca sativa*).

Desta forma, e no sentido de verificar a aplicação da legislação acima referida, foram analisados os metais alumínio (Al), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e ferro (Fe). Embora não estejam definidos na legislação, valores limite de concentração de Fe e Al, foram previamente seleccionados tendo em conta que em alguns tratamentos destas lamas se utilizam compostos destes metais e se pretendia verificar a influência destes sobre a ecotoxicidade das lamas em estudo.

2.4.2.2.1 DETERMINAÇÃO DE Fe, Pb, Cd POR AAS - ATOMIZAÇÃO POR CHAMA

A determinação do Fe, Pb e Cd foi efectuada por AAS com chama de ar/acetileno, segundo métodos definidos no Standard Methods of Water and Waste Water, método 3113 B. [27]

Para as respectivas curvas de calibração destes metais foram utilizadas soluções stock de Cd, Fe e Pb de concentração 1000 ± 2 mg/L para a preparação das soluções dos padrões de trabalho (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentrações utilizadas para as curvas de calibração do Cd, Fe e Pb em AAS – atomização por chama.

Elemento analisado	Gama de concentrações, mg/L
Cd	0.15, 0.50, 0.90, 1.50 e 2.00
Fe	1.50, 4.00, 8.00, 12.0 e 16.0
Pb	1.00, 3.00, 6.00, 9.00 e 15.0

As concentrações foram obtidas pela correspondência a zonas lineares na curva de calibração onde é obedecida a lei de Beer e valores de Abs entre 0.2 e 0.8.

Para os três metais analisados efectuaram-se leituras directas dos lixiviados em triplicado e eliminaram-se as leituras que não respeitavam o critério de aceitação estabelecido pelo laboratório Equilibrium para o método: coeficiente de variação e erro relativo inferior a 10%, conforme recomendação do GUIA RELACRE 13 – “Validação de Métodos Internos de ensaio em Análise Química”. [28]

2.4.2.2.2 DETERMINAÇÃO DE Al POR AAS-ATOMIZAÇÃO ELECTROTÉRMICA

A determinação do Al foi efectuada por AAS com câmara de grafite, segundo método definidos no Standard Methods of Water and Waste Water, método 3113 B. ^[27] Para a curva de calibração deste metal foram utilizadas diluições de uma solução padrão stock de concentração 1000 ± 2 mg/L.

As concentrações das soluções padrão do Al utilizadas para a curva de calibração foram 80.0, 150, 200, 300 e 400 µg/L correspondendo à zona linear de aplicação da Lei de Beer e valores de absorvância entre 0.2 e 0.8.

À semelhança do que foi realizado com os metais anteriores, também com o alumínio se efectuaram todas as leituras em triplicado, tanto dos padrões como das amostras de lama, eliminando as leituras cujos valores de coeficiente de variação e erro relativo fossem inferiores a 10%, correspondendo ao critério de aceitação definido pelo laboratório para o método em questão, conforme recomendação do GUIA RELACRE 13 – “Validação de Métodos Internos de ensaio em Análise Química”. ^[28]

2.4.2.2.3 DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção e de quantificação do método espectrofotométrico de absorção atómica para um dado metal, foram determinados a partir dos valores de dez leituras consecutivas do padrão mais baixo em utilização na recta de calibração. Com os valores de concentração obtidos, após eliminação dos pontos que não permitiam verificar o critério de aceitação (coeficiente de variação e erro relativo inferiores a 10%), e com base na recomendação do GUIA RELACRE 13 – “Validação de Métodos Internos de ensaio em Análise Química” ^[28] determinou-se:

Concentração média (X):

$$X = \frac{\sum X_i}{n} \quad (1)$$

em que,

X_i é a concentração do metal na leitura i ;

n é o número de leituras;

Desvio padrão (S):

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X)^2}{(n-1)}} \quad (2)$$

Coeficiente de variação (C_v):

$$C_v (\%) = \frac{S}{X} 100 \quad (3)$$

Erro relativo (E_r):

$$E_r (\%) = \frac{(X - X_e)}{X_e} 100 \quad (4)$$

em que,

X_e é a concentração do metal esperada;

Limite de detecção (LD):

$$LD = X + 3,3 * S \quad (5)$$

Limite de quantificação (LQ):

$$LQ = X + 10 * S \quad (6)$$

2.4.2.2.4 DETERMINAÇÃO DE INCERTEZAS ASSOCIADAS ÀS DETERMINAÇÕES POR AAS

Foram utilizados os valores de desvio padrão e concentração média obtidos na determinação dos limites de quantificação e detecção, para o cálculo das incertezas associadas à determinação dos metais atrás referidos.

Desta forma, determinou-se para cada leitura:

Incerteza associada à variabilidade/precisão da metodologia (U_{var}):

$$U_{\text{var}} = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

Incerteza final para cada leitura com um grau de confiança de 95 % (U):

$$U = 2 * U_{\text{var}} * X \quad (8)$$

Este cálculo teve por base de orientação o GUIA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE INCERTEZA EM ENSAIOS QUÍMICOS OGC007 do IPAC. [29]

2.5 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO ARTIFICIAL E ORGANISMOS TESTE

O solo artificial utilizado foi gentilmente fornecido pela empresa mineira MIBAL - Minas de Barqueiros, SA. Esta empresa explora um depósito mineral de caulino do tipo sedimentar no norte de Portugal.

Trata-se de uma areia quimicamente constituída por aproximadamente 90 % de sílica e restantes 10 % por outros óxidos, estando a sua granulometria calibrada entre 0,5-1 mm, conforme recomendação da norma EPA 600/3-88/029. [11] O respectivo boletim de análise encontra-se no Anexo I – Boletim de análise do solo artificial.

Os organismos teste utilizados neste trabalho, e conforme referido no ponto 1.4 ORGANISMOS TESTE, foram as sementes de alface *Lactuca sativa buttercrunch* de

acordo com a norma EPA 600/3-88/029. ^[11] Estas, foram adquiridas no comércio de sementes e as suas características encontram-se especificadas no Anexo II – Características das sementes de *Lactuca sativa buttercrunch*.

2.6 ENSAIOS DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa*

O método de ensaio utilizado teve por base de referência o teste descrito na norma EPA600/3-88/029, A.8.6 “LETTUCE SEED GERMINATION (*Lactuca sativa*)”. ^[11] Este método permite estimar a toxicidade aguda de resíduos sólidos perigosos na alface (*Lactuca sativa*) num teste estático de 120 h. As respostas obtidas medem os efeitos sinérgicos, antagónicos e de adição de todos os componentes químicos, físicos e biológicos que afectam as funções fisiológicas e bioquímicas dos organismos teste. Este método utiliza solo como meio de exposição de modo a simular as condições naturais de germinação. O método pode também ser utilizado com amostras aquosas, utilizando, para isso, 100 % de solo artificial e amostras líquidas com várias diluições em vez de água desionizada/destilada para hidratar os solos teste.

O resultado do teste é baseado na obtenção de germinação das sementes teste e apresenta como critério de aceitação de resultados a obtenção de uma taxa de germinação igual ou superior a 90% para os controlos.

Na tabela 4 resumem-se as condições de ensaio de ecotoxicidade definidas na norma EPA 600/3-88/029. ^[11]

Tabela 4 - Condições de ensaio de ecotoxicidade definidos na EPA 600/3-88/029 ^[11] para a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*).

Parâmetro	Condição
Tipo de teste	Estático
Temperatura (°C)	24±2
Qualidade da iluminação	Fluorescente
Intensidade da iluminação (lux)	4300±430
Fotoperíodo	48 h iniciais ao abrigo da luz, seguido de 16 h de exposição a luz e 8 h ao abrigo da luz
Recipiente teste	Caixas de Petri 150 mm colocadas em sacos fechados de polietileno
Massa de solo teste (g)	100
N.º de organismos por caixa	40
N.º de réplicas por diluição	3
Duração do teste (h)	120
Efeito a medir	Germinação

2.6.1 OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TESTE DE AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM SEMENTES DE *Lactuca sativa*

Embora o teste descrito na EPA 600/3-88/029 ^[11] permita ser utilizado com amostras líquidas, não se encontra definido para estas condições. Desta forma, e como se pretendia simular as condições reais de lixiviação nos solos utilizando lixiviados das lamas, houve necessidade de optimização das condições de ensaio. Assim, numa fase inicial, foram efectuados vários ensaios em que se testaram os efeitos das condições de temperatura, humidade, dos períodos em que as sementes estariam expostas ou não à luz, do volume de lixiviado, da massa de solo artificial, bem como da posição relativa das sementes no solo (profundidade e distância entre sementes), medindo-se a percentagem de germinação de sementes.

De salientar que esta etapa foi a que exigiu maior esforço e envolvimento, dado que, não existe experiência documentada ou estudos, que permitam comparar e obter referências de procedimento para a aplicação desta técnica descrita na norma EPA em lixiviados de lamas de ETA.

Neste seguimento, foi necessário proceder a uma série de ensaios preliminares que tiveram uma relevância preponderante para verificar quais as condições experimentais que melhor permitiriam obter a máxima germinação dos organismos teste de modo a garantir o cumprimento do critério de aceitação: germinação dos ensaios controlo iguais ou superiores a 90 %.

Por uma questão de facilidade operacional, foram consideradas metade das quantidades indicadas na EPA600/3-88/029, ^[11] partindo-se de uma base de 50 g de massa de solo artificial e 20 organismos teste.

As condições experimentais que conduziram aos melhores resultados de germinação são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 - Condições de ensaio utilizadas nos ensaios de germinação de sementes de *Lactuca sativa*.

Parâmetro	Condição
Tipo de teste	Estático
Temperatura ao abrigo da luz (°C)	20±1
Temperatura em luz (°C)€	21±1
Qualidade da iluminação	Fluorescente
Intensidade da iluminação	10.000 lux
Fotoperíodo	48 h iniciais ao abrigo da luz, seguido de 16 h de exposição à luz e 56 h ao abrigo da luz
Recipiente teste	Caixas de Petri de 150 mm de diâmetro, colocadas em caixas fechadas na estufa (condições ao abrigo da luz) seguido em sacos fechados de polietileno transparentes (condições de exposição à luz)
Massa de solo teste (g)	50
N.º de organismos por caixa	20 (colocados em 30 g de areia + 20 g areia)
Volume de solução (mL)	10
N.º de réplicas por diluição	3
Duração do teste (h)	120
Efeito a medir	Germinação

2.6.2 DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM SEMENTES DE *Lactuca sativa*

Após definidas as condições de ensaio de germinação, testaram-se os lixiviados para as concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 e 0 %. Os ensaios foram efectuados em triplicado. ^[11]

Em cada caixa de Petri colocaram-se 30 g de areia (previamente seca a 105 °C durante 12 h), colocando-se de seguida, 10 mL da solução teste e as 20 sementes de *Lactuca sativa* igualmente distribuídas (figura 1). Por fim, colocaram-se os restantes 20g de areia, de modo a cobrir as sementes.



Figura 1 - Etapa inicial da montagem do ensaio: a) disposição das caixas de Petri (n=3 por concentração), utilizando 30 g de areia, b) caixas de Petri após colocação de 10 mL de lixiviado, c) distribuição das 20 sementes de *Lactuca sativa*.

Seguidamente, colocou-se papel absorvente humedecido com água desionizada numa caixa com tampa, na qual se acondicionaram as caixas de Petri já com as sementes. Esta, foi colocada na estufa ao abrigo da luz e a temperatura constante de 20±1 °C, durante 48 h.

Ao fim das 48 h, retirou-se a caixa da estufa e colocaram-se as caixas de Petri em saco transparente fechado em condições de luz, durante 16 h. Perfazendo este tempo, voltaram a colocar-se as caixas de Petri com as sementes, na caixa fechada e na estufa durante 56 h (figura 2).



Figura 2 - Demonstração das etapas de germinação durante as 120 h de ensaio: a) após as 48h iniciais de estufa ao abrigo da luz, b) com luz durante 16 h em saco transparente fechado, c) após a etapa final de 56 h de estufa.

Terminada esta etapa, deu-se como concluído o ensaio como é ilustrado na figura 3, contando-se o número de sementes germinadas,



Figura 3 - Imagem onde se apresentam as sementes de *Lactuca sativa* germinadas.

2.6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa*

Os resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* foram submetidos a um tratamento estatístico de forma a verificar se existiam diferenças significativas entre as várias diluições de lixiviados usadas.

A análise de variância (frequentemente abreviado para ANOVA), é uma ferramenta estatística que pode ser utilizada para separar e estimar as diferentes causas de variação. Pode, portanto, identificar se a alteração de um factor controlado conduz a uma diferença significativa entre os valores médios obtidos. [30]

O Teste-t é utilizado entre os pontos identificados significativamente diferentes no ANOVA de forma a confirmar que são de facto, significativamente diferentes. Estes verificam para $p < 0,05$.

Para validação do método utilizado, aplicou-se posteriormente o método de análise estatística não-paramétrico - Kolmogorov-Smirnov Test, a fim de confirmar a hipótese inicialmente admitida, na aplicação do método ANOVA, de se tratar de uma distribuição normal. O princípio deste método envolve a comparação da curva de frequência cumulativa de dados a testar com a curva de frequência cumulativa da distribuição hipótese. Após traçadas as duas curvas o teste estatístico é obtido encontrando a

máxima diferença vertical entre elas. Se os dados estiverem de acordo com a distribuição em hipótese, as duas curvas nunca serão muito diferentes. ^[30]

No final, os resultados confirmaram a hipótese admitida, tendo-se verificado a distribuição normal entre todos os resultados obtidos.

Os referidos métodos de análise estatística foram aplicados com o software SPSS 16.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Como foi referido anteriormente no ponto 2.6.1 OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TESTE DE AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA EM SEMENTES DE *Lactuca sativa*, foi necessário proceder-se à realização de ensaios preliminares para, adaptar a lixiviados e otimizar, as condições descritas na norma EPA [11] para solos.

Os referidos ensaios de optimização, foram efectuados com uma lama teste controlando-se os parâmetros: temperatura, períodos de exposição à luz e posição relativa das sementes no solo (profundidade e distância entre sementes), em função da quantidade de solo artificial.

Os resultados obtidos nestes primeiros ensaios de optimização são apresentados da figura 4-8.

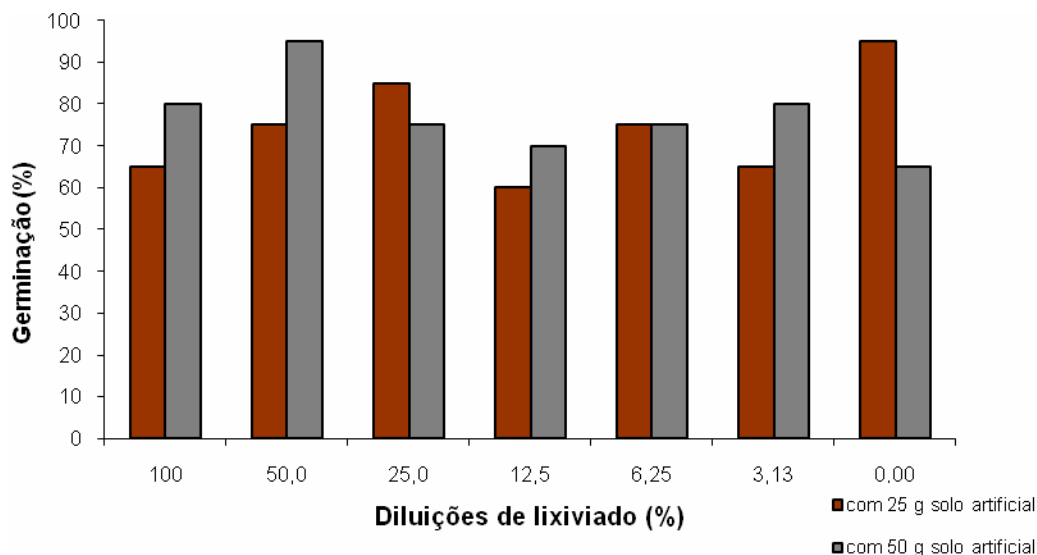


Figura 4 - Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* em função das diluições de lixiviado, para 25 e 50 g de solo artificial (sementes colocadas na parte superior do solo).

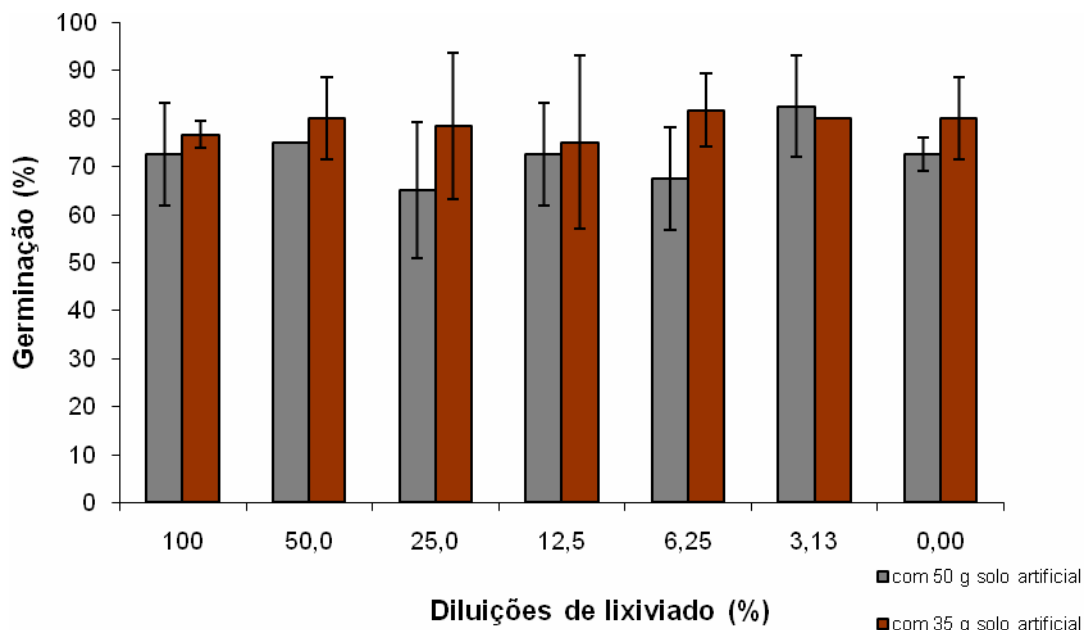


Figura 5 - Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* obtidos em função das diluições de lixiviado para duas quantidades de solo artificial, 35 e 50 g (sementes colocadas na parte superior do solo).

Os resultados destes dois primeiros ensaios demonstram que não é possível só com a variação da quantidade de solo artificial em utilização, e sementes colocadas na parte superior, obter a % de germinação desejada para os ensaios de controlo, conforme indicação da EPA. [11] Segundo esta norma, apenas poderão ser aceites, os resultados que permitam verificar uma % de germinação dos ensaios de controlo $\geq 90\%$.

Desta forma, decidiu-se estudar a influência de outros parâmetros na germinação das sementes de *Lactuca sativa*.

Os parâmetros analisados foram:

- 1) quantidade de solo artificial (35 e 50 g);
- 2) a posição das sementes relativa ao solo (colocadas na parte superior do solo artificial, ou no interior deste, 30+20 g);
- 3) controlo de humidade durante o ensaio.

O controlo de humidade foi efectuado da seguinte forma:

- 1) a areia foi seca na estufa a 105 °C durante 12 h;

- 2) nos períodos em que as caixas de Petri (solo+sementes+lixiviado) eram colocadas na estufa, ficavam numa caixa fechada com papel humedecido com água no fundo;
- 3) nos períodos de luz, as caixas de Petri eram colocadas em saco transparente fechado.

A figura 6 apresenta a % de germinação de sementes de *Lactuca sativa* obtida em função da posição relativa das sementes no solo, utilizando 35 ou 50 g de solo artificial. Estes resultados foram obtidos sem controlo de humidade durante a germinação.

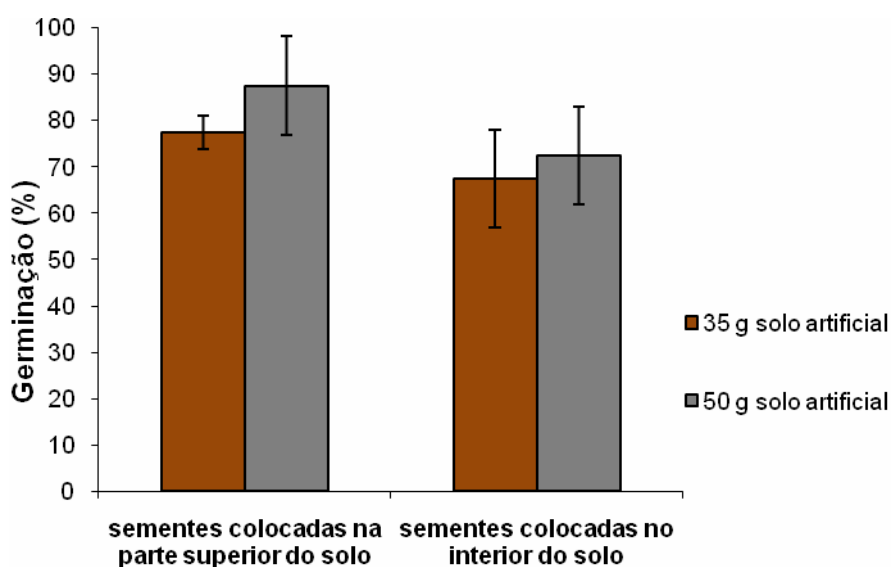


Figura 6 - Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* em função da posição relativa das sementes no solo artificial (35 e 50 g), sem controlo de humidade.

A figura 7 apresenta a % de germinação de sementes de *Lactuca sativa* obtida em função da posição relativa das sementes no solo, utilizando 35 ou 50 g de solo artificial, com controlo de humidade durante a germinação. Como se pode verificar com o controlo deste parâmetro, obtiveram-se melhores resultados utilizando 50 g de solo artificial, com as sementes colocadas na parte superior deste.

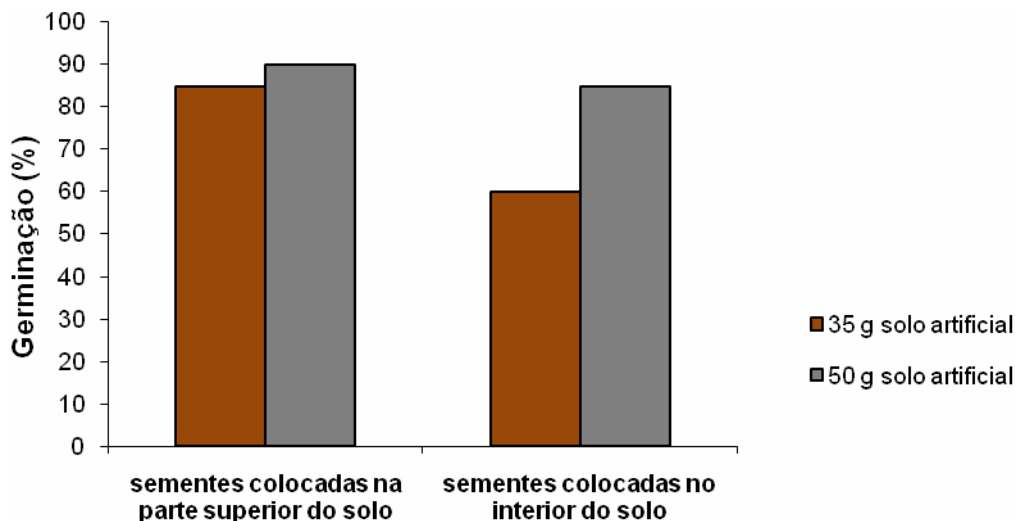


Figura 7 - Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* em função da posição relativa das sementes no solo artificial (35 e 50 g), com controlo de humidade.

Contudo, e numa última tentativa de melhor simular a situação real no que se refere à posição das sementes, foi realizado um ensaio com as sementes colocadas em 30 g de solo e cobertas com os restantes 20 g. Na figura 8, apresentam-se os resultados obtidos para a % de germinação de sementes de *Lactuca sativa*, em função da posição relativa das sementes em 50 g de solo artificial, isto é, na parte superior ou no interior do solo artificial (30+20 g).

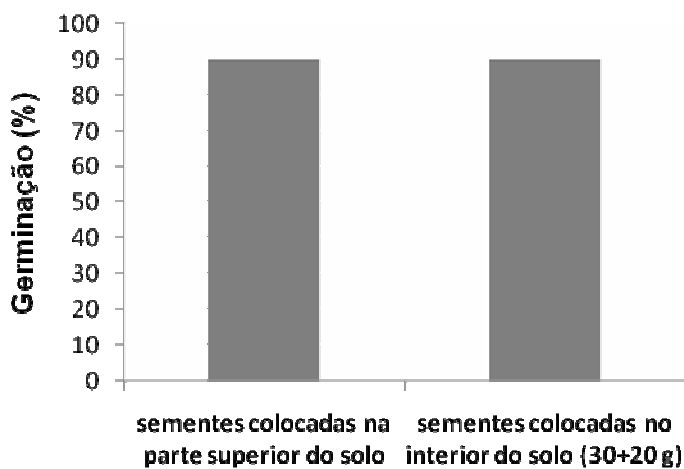


Figura 8 - Resultados obtidos para a germinação de sementes de *Lactuca sativa* em função da posição relativa das sementes no solo artificial (50 g de solo artificial).

Verifica-se no entanto, que a posição das sementes não tem qualquer efeito sobre a % de germinação das sementes. No entanto, como a norma EPA ^[11] refere o envolvimento das sementes no solo, optou-se por esta última condição de ensaio.

3.2 PROVENIÊNCIA DAS AMOSTRAS TESTE

A localização geográfica das várias estações de tratamento de água para consumo humano (ETA) onde foram recolhidas as lamas testadas neste trabalho são apresentadas na figura 9. Conforme referido anteriormente no ponto 1.5.1 LOCAL DE CAPTAÇÃO DA ÁGUA E TIPO DE TRATAMENTO NA ETA, as lamas são provenientes de ETA com captações de água superficial em diversos rios e albufeiras do Norte de Portugal.

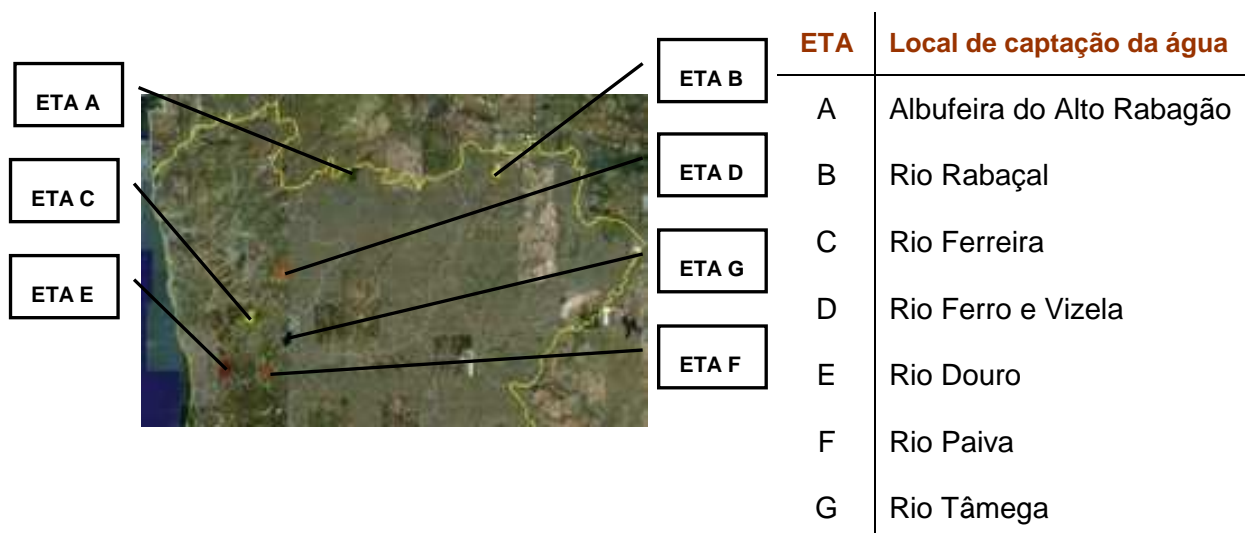


Figura 9 - Localização geográfica das várias ETA onde foram recolhidas as lamas estudadas.

3.3 ENSAIOS DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa*

Os resultados da percentagem de germinação em função das várias diluições dos lixiviados das lamas em estudo, são apresentados da figura 10 - 16.

Todos os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico, conforme descrito em 2.6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS DE GERMINAÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa*, para averiguar se existia diferença estatisticamente significativa entre os vários tratamentos de modo a avaliar a possibilidade de utilização destas lamas na agricultura.

Apresentam-se da figura 10 - 13 os resultados das lamas das ETA A, B, E e F, respectivamente. Estas lamas não apresentam nenhum efeito tóxico, isto é, não se observa nenhum efeito ecotoxicológico na germinação de sementes de *Lactuca sativa* para nenhuma das diluições usadas, uma vez que não há diferenças significativas entre elas. Estes resultados são representativos de outras repetições.

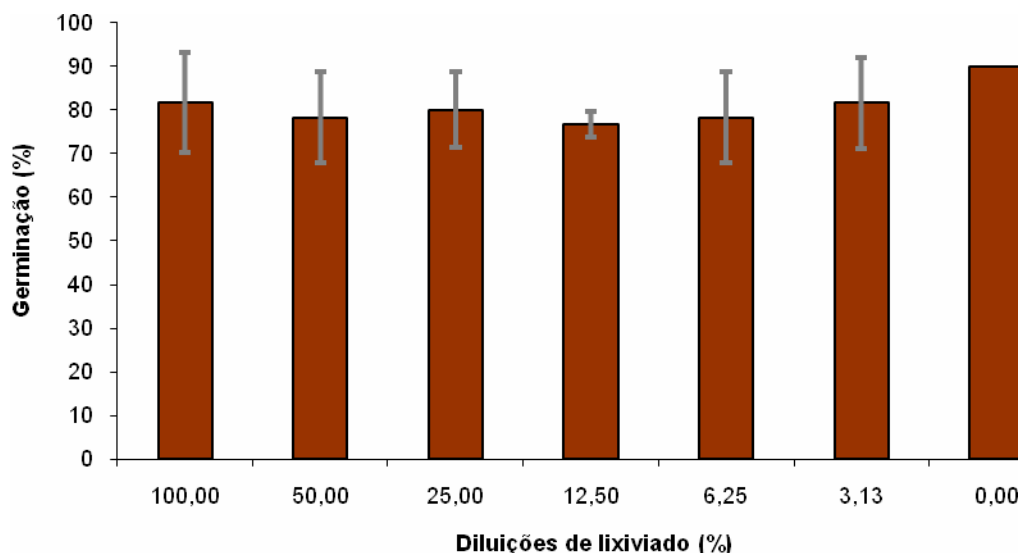


Figura 10 - Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* em função da concentração de lixiviado da lama da ETA A.

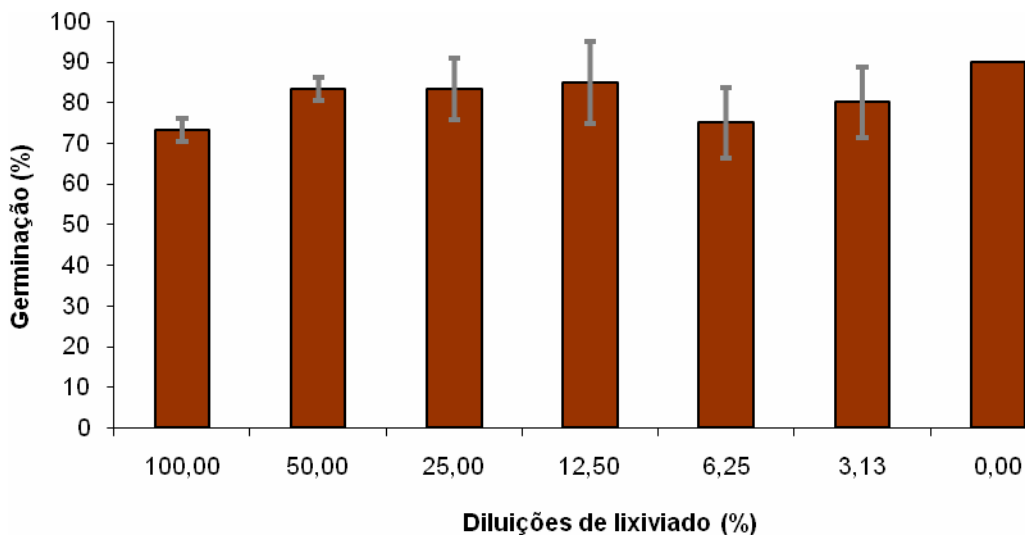


Figura 11 - Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* em função da concentração de lixiviado da lama da ETA B.

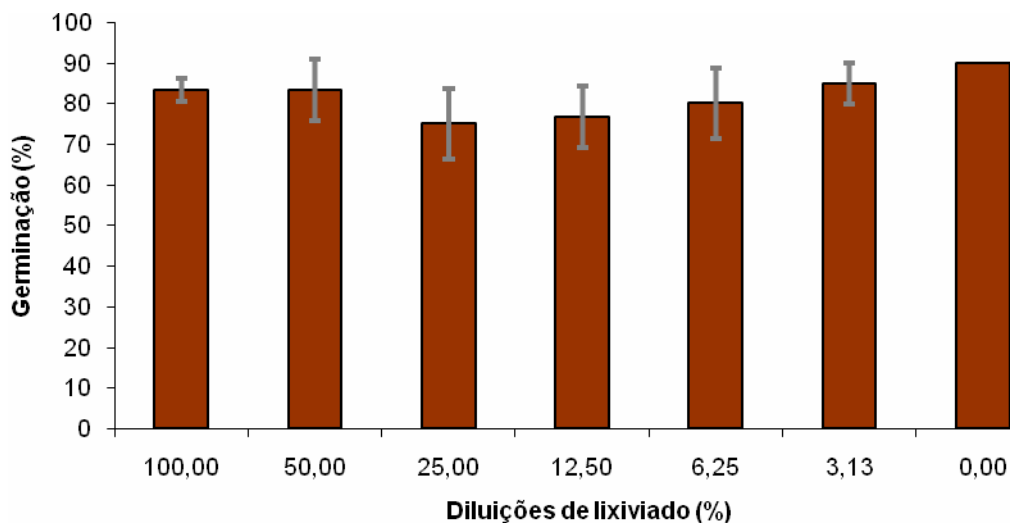


Figura 12 - Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* em função da concentração de lixiviado da lama da ETA E.

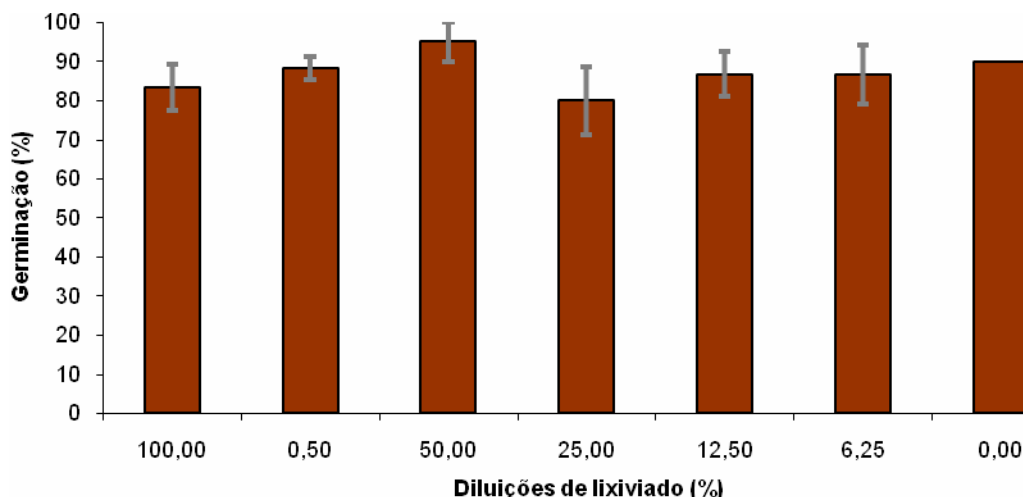


Figura 13 - Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* em função da concentração de lixiviado da lama da ETA F.

Numa tentativa de relacionar a semelhança de resultados aqui apresentados para os lixiviados das lamas destas quatro ETA, com a localização das captações das águas para tratamento, verifica-se existir uma proximidade geográfica, sob o ponto de vista longitudinal, do rio de captação da água a tratar na ETA A com o da ETA B bem como o rio de captação da água a tratar na ETA E com o da ETA F.

Analisando no ponto de vista do tratamento físico-químico não se pode estabelecer qualquer relação deste com a ecotoxicidade da lama obtida, dado que, nestas quatro lamas, resultam de três tipos de tratamentos: a lama da ETA A, proveniente de um tratamento com Ozono e CO₂, a lama da ETA B, utilizando um polielectrólito – Sulfato de alumínio, e as ETA’s E e F com polielectólito - Sulfato de alumínio e Cloreto férrico respectivamente.

Os resultados obtidos com os lixiviados das lamas C, D e G (figura 14 - 16), apresentam inibição da germinação entre algumas das diluições testadas e os ensaios controlo.

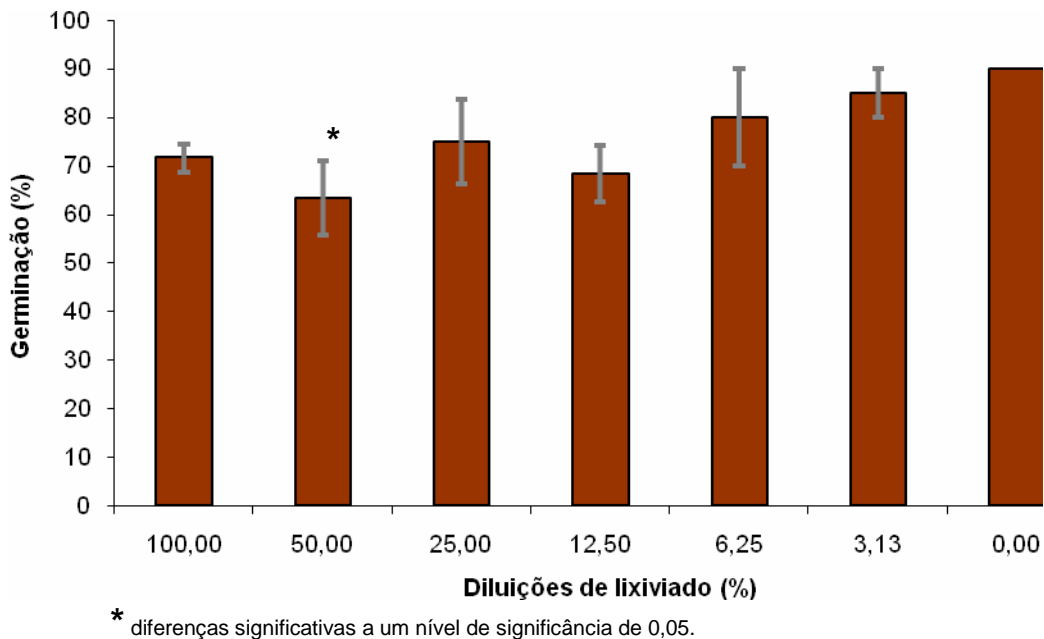


Figura 14 - Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* em função da concentração de lixiviado da lama da ETA C.

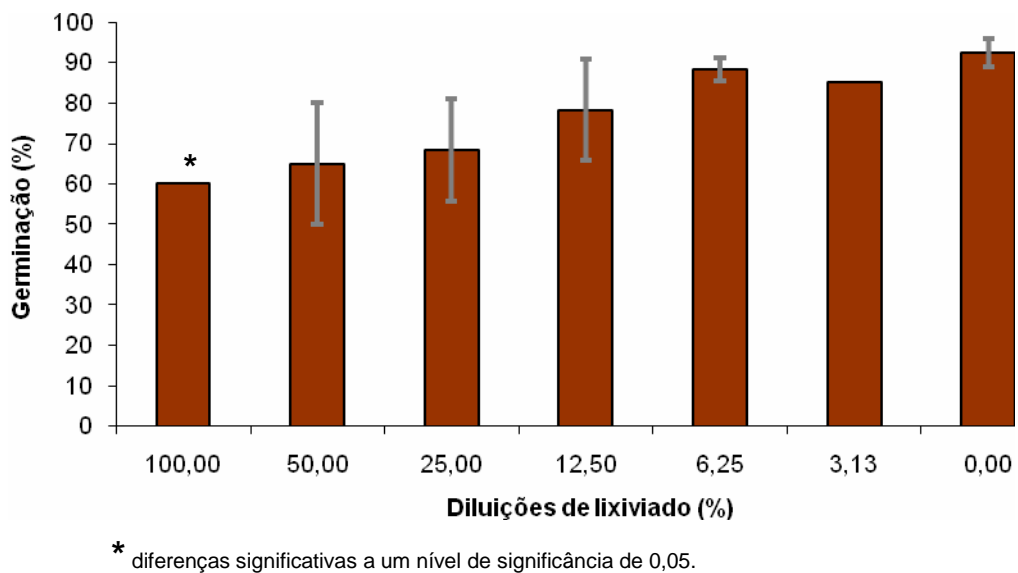


Figura 15 - Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* em função da concentração de lixiviado da lama da ETA D.

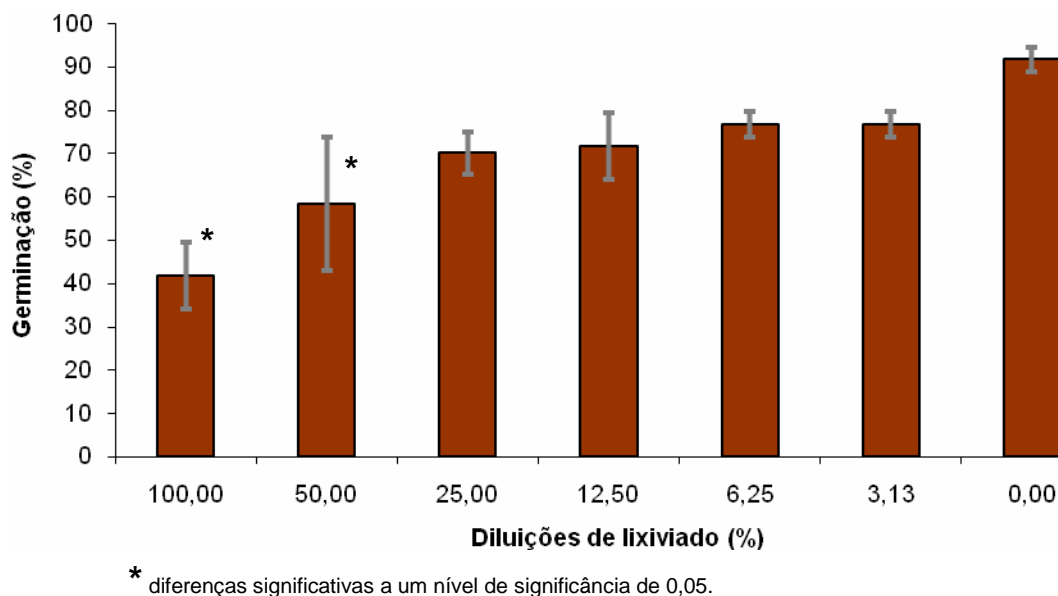


Figura 16 - Resultados de germinação de sementes de *Lactuca sativa* em função da concentração de lixiviado da lama da ETA G.

Da mesma forma em que as ETA atrás se encontram mais próximas geograficamente sob o ponto de vista longitudinal, também estas três ETA captam água para tratamento de locais mais próximos entre si. A questão que se levanta é que a água desta zona pode conter algum/alguns constituinte(s) que lhes é comum (dada a proximidade dos rios de captação) que afecta visivelmente a ecotoxicidade das lamas provenientes após tratamento físico-químico.

No que se refere ao tratamento físico-químico adoptado nas ETA, C, D e G não se verifica qualquer correlação com os resultados ecotoxicológicos apresentados, dado que, são utilizados polielectrólitos à semelhança dos utilizados nas ETA B, E e F.

Obviamente que outros parâmetros deverão ser tidos em conta para a utilização na agricultura deste tipo de lamas, tais como, presença de outros metais, concentrações de nitratos, matéria orgânica, etc, parâmetros estes, que poderão influenciar negativamente a cadeia trófica e constituir em si um factor de perigo para a saúde pública.

A qualidade da água captada deve também ser considerada, como revela estudo efectuado recentemente pela DECO, às águas superficiais de captação de algumas zonas do país, as quais apresentaram concentrações elevadas de alguns químicos, como compostos azotados, fosfatos, sulfatos, hidrocarbonetos, tensoactivos, metais e ainda

uma carga elevada de matéria orgânica. Deste estudo, salienta-se a identificação nestas águas de captação de concentrações elevadas de pesticidas, provenientes da aplicação de insecticidas e herbicidas na Primavera e Verão, e ainda de hormonas (beta-estradiol, estrona, estriol, dietilestilbestrol, levonogestrel, noretindrona e progesterona) resultantes da exploração agro-pecuária. Estas últimas são de especial preocupação, uma vez que, não está definido na legislação qualquer imposição de controlo deste parâmetro. Desta forma, torna-se imperativo redefinir planos de controlo das águas captadas, bem como, das águas distribuídas à população, de forma a incluir parâmetros tais como as hormonas, uma vez que são possíveis disruptores endócrinos, e avaliar a necessidade de alteração dos processos de tratamento.^[31]

Embora mais de 2/3 da superfície terrestre seja constituída por água, 98 % desta água é água salgada, e não pode ser utilizada directamente para consumo, irrigação ou aplicações industriais. Infelizmente a maior parte dos 2 % de água doce estão inacessíveis sob a forma de glaciares, águas subterrâneas e altamente poluídas. A qualidade das águas captadas quer sejam superficiais ou subterrâneas varia largamente de quase pura a altamente poluída. Como o tipo e quantidade de poluentes indesejáveis em águas para consumo variam, também os processos de tratamento se adequam e variam de local para local.^[32]

Sendo que, a produção de resíduos provenientes dos tratamentos destas águas para consumo, é inevitável, resta-nos zelar pela correcta gestão deste resíduo e utilizar técnicas ambientalmente amigáveis de forma a minimizar o impacto desta prática para os solos e águas.

Os testes ecotoxicológicos poderão contribuir para auxiliar, em conjunto com as avaliações físico-químicas, nesta tarefa primordial para a saúde pública e ambiental de controlo de poluentes em sistemas de águas para consumo humano, uma vez que têm a capacidade de avaliar a toxicidade das lamas na sua globalidade.

3.4 DETERMINAÇÃO DE METAIS

Determinou-se a concentração de Alumínio nos lixiviados das lamas A-G, por espectrofotometria de absorção atómica com atomização por câmara de grafite (AAS – câmara de grafite). A recta de calibração obtida para o alumínio apresenta a seguinte equação: $Abs=0,001058.Conc+1,04493$ com $r=0,9999$.

Na tabela 6 apresentam-se os resultados obtidos para os teores de Al nos diferentes lixiviados e respectivas incertezas. Foram determinados os limites de detecção e de quantificação tendo-se obtido os valores 124,9 ppb e 170,3 ppb, respectivamente.

Para os lixiviados provenientes das ETA D e F os teores de Al estão abaixo do limite de detecção, o que, sob o ponto de vista do tratamento físico-químico, demonstra que o tipo de tratamento não influencia o teor deste metal nas lamas, dado que, a lama proveniente da ETA D resulta de um tratamento com Policloreto de alumínio e a da ETA F com Cloreto férrico. Verifica-se ainda, que a concentração de alumínio mais elevada detectada foi para a lama proveniente da ETA A cujo tratamento é efectuado com Ozono e CO₂.

Tabela 6 - Concentração de Al nos lixiviados das lamas A-G, determinada por AAS-atomização electrotérmica, e respectivas incertezas.

LAMA DA ETA	 Al (ppb)	Incerteza associada ao resultado (ppb)
A	2386	100
B	645,3	27
C	315,9	13
D	39,62	1,7
E	437,4	18
F	< LD	n.a.
G	224,9	9,4

Nota: LD = 124,9 ppb; n.a.: não aplicável

Os metais, Cd, Fe e Pb foram determinados por AAS em chama de ar/acetileno, encontrando-se abaixo do limite de detecção em qualquer dos lixiviados analisados. Desta forma, apresentam-se na tabela 7 os valores dos limites de detecção e quantificação obtidos para os referidos metais, bem como as equações das rectas de calibração correspondentes.

Tabela 7 - Limites de detecção, de quantificação, ^[28] incerteza ^[29] do método e equações das rectas de calibração obtidas na determinação do Cd, Fe e Pb por AAS chama de ar/acetileno.

	Cd	Fe	Pb
L.D. (ppm)	0,1848	4,107	1,185
L.Q. (ppm)	0,2604	5,032	1,367
Equação da recta de calibração	Abs = 0,3484Conc+0,0697 r=0,9990	Abs = 0,06235Conc+0,22045 r=0,9995	Abs = 0,02088Conc+0,03662 r=0,9983

Da análise dos metais aqui apresentados, verifica-se que apenas o alumínio foi detectado e não se consegue estabelecer qualquer correlação entre o tratamento com os resultados dos ensaios ecotoxicológicos.

4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

A questão principal dos resíduos está sintetizada numa frase de um relatório da Agência Europeia do Ambiente: “Os resíduos representam uma enorme perda de recursos, tanto sob a forma de materiais, como sob a forma de energia”. Quanto mais resíduos são produzidos, maior é o desperdício de recursos – e este é o epicentro em torno do qual orbita uma ampla constelação de problemas. Produzir menos resíduos, deveria ser portanto, prioridade número um de qualquer política de gestão de resíduos. ^[5]

Na procura de uma alternativa ambientalmente mais aceitável para a gestão de lamas resultantes do processo de tratamento de água superficial para posterior consumo humano, verificou-se neste trabalho, a possibilidade de utilização das lamas produzidas nas Estações de Tratamento de Água (ETA) em solos agrícolas, utilizando-se para isso, ensaios ecotoxicológicos de avaliação da capacidade de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*).

A legislação aplicável à utilização de lamas na agricultura provenientes de Estações de Tratamento de Águas e Águas Residuais apenas impõe limites em parâmetros de natureza físico-química ^[9]

A utilização da abordagem ecotoxicológica apresenta uma mais-valia na avaliação de risco e é vantajosa para a gestão ambiental. Os testes ecotoxicológicos identificam os perigos de uma forma global e podem ser utilizados em avaliação de risco ecológico. ^[33]

Uma avaliação de risco ecotoxicológica em solos tem como objectivo a verificação de utilização sustentável dos recursos naturais. Ainda existe muita investigação para efectuar nos solos, particularmente no que diz respeito ao risco potencial de funcionamento do ecossistema e biodiversidade. ^[34] Da pesquisa efectuada apenas se identificaram alguns estudos realizados para avaliação ecotoxicológica de lamas de Estações de Tratamento Águas Residuais e sua possível aplicação na agricultura. ^[13,35]

No que concerne à avaliação ecotoxicológica de lamas de Estações de Tratamento Água (ETA) não é do nosso conhecimento a existência de trabalho efectuado que pudesse servir de referência a este estudo. Desta forma, o presente trabalho deve ser encarado como um ponto de partida para ensaios futuros, numa área quase intacta, como se apresenta a avaliação ecotoxicológica de lamas de ETA, para aplicação na agricultura.

Este estudo foi efectuado tendo como base de trabalho a norma EPA ^[11] no entanto, embora esta norma preveja a aplicação dos ensaios ecotoxicológicos em lixiviados de lamas utilizando um solo artificial, foi necessária a optimização prévia de diversos

parâmetros como, quantidade de solo, localização das sementes no solo e controlo da humidade.

Como as lamas estudadas eram provenientes de ETA com captação de água superficial em rios e albufeiras distintos do norte de Portugal, com utilização de tratamentos também diferentes, tentou-se relacionar estes parâmetros com os resultados da germinação.

Os resultados obtidos para as lamas provenientes dos tratamentos das águas captadas da Albufeira do Alto Rabagão (ETA A) e dos rios Rabaçal (ETA B), Douro (ETA E) e Paiva (ETA F), não apresentam nenhum efeito tóxico, isto é, não se observa nenhum efeito ecotoxicológico (negativo ou positivo) na germinação de sementes de *Lactuca sativa* para nenhuma das diluições usadas, uma vez que não há diferenças significativas entre elas e com valores próximos dos 90 %.

Analisando a localização das captações das águas para consumo, verifica-se existir uma proximidade geográfica, sob o ponto de vista longitudinal, do local de captação da água a tratar na ETA A com o da ETA B bem como o rio de captação da água a tratar na ETA E com o da ETA F.

Do ponto de vista do tratamento físico-químico não se pode estabelecer qualquer relação deste com a ecotoxicidade da lama obtida, dado que, nestas quatro lamas, se encontram caracterizados três tipos de tratamentos: A lama da ETA A, proveniente de um tratamento com Ozono e CO₂, a lama da ETA B, utilizando um polielectrólito – sulfato de alumínio, e as ETA E e F com polielectólito sulfato de alumínio e cloreto férrico respectivamente.

Os resultados obtidos com os lixiviados das lamas provenientes dos tratamentos das águas captadas dos rios Ferreira (ETA C), Ferro e Vizela (ETA D) e Tâmega (ETA G), apresentam inibição da germinação entre algumas das diluições testadas e os ensaios controlo. No que se refere ao tratamento físico-químico adoptado nas ETA, C, D e G não se verifica qualquer correlação com os resultados ecotoxicológicos apresentados, dado que, são utilizados polielectrólitos à semelhança dos utilizados nas ETA B, E e F.

Da mesma forma em que as ETA atrás se encontram mais próximas geograficamente sob o ponto de vista longitudinal, também estas três ETA captam água para tratamento de locais mais próximos entre si. A água desta zona deve conter algum/alguns constituinte(s) que lhes é comum (dada a proximidade dos rios de captação) que afecta visivelmente a ecotoxicidade das lamas provenientes após tratamento físico-químico.

Dos metais Al, Cd, Fe e Pb determinados por AAS nos lixiviados, apenas o Alumínio estava acima do limite de detecção. No entanto, não foi possível estabelecer qualquer correlação entre o tratamento aplicado à água superficial nas várias ETA com a concentração do alumínio nem com os resultados dos ensaios ecotoxicológicos. No

entanto, parece haver relação entre a proximidade geográfica do local de captação de água e os resultados dos bioensaios.

Considerando o interesse e actualidade do tema dos ensaios ecotoxicológicos aplicados a resíduos sólidos, com vista quer à sua reciclagem quer à aplicação de tratamentos de remediação de solos, propõe-se a continuação do estudo. Embora a legislação portuguesa não exija a realização destes testes para nenhuma matriz ambiental, é de salientar a sua importância na avaliação da toxicidade, uma vez que estimam os efeitos integrados de misturas químicas complexas, independentemente de existirem valores limite estipulados por lei para substâncias individuais.

Em termos de trabalho futuro, outros parâmetros deverão ser determinados para a utilização na agricultura deste tipo de lamas, nomeadamente, concentração de nitratos, matéria orgânica, pesticidas, hormonas, etc, uma vez que poderão influenciar negativamente a cadeia trófica e constituir em si factor de perigo para a saúde pública. Também as fontes de poluição do meio envolvente devem ser estudadas, de forma a verificar se exercem algum tipo de influência nos resultados de ecotoxicidade.

No que diz respeito ao bioensaio de germinação de sementes seria também interessante utilizar outras espécies, assim como, controlar além da germinação o crescimento da respectiva planta e até analisar a própria alface.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Baird C, Cann M. Environmental Chemistry. New York: W.H. Freeman and Company; 2008.
2. Portugal B. Case study, Um Exemplo na Valorização de Resíduos, Águas do Douro e Paiva. 2008;
3. Livro Verde sobre a gestão dos bio-resíduos na União Europeia - Conclusões do Conselho da União Europeia. 2009.
4. Directiva 1999/31/CE do Conselho, de 26 de Abril de 1999, relativa à deposição de resíduos em aterros.
5. Garcia R. Sobre a Terra: Um Guia para quem lê e escreve sobre o Ambiente. Lisboa: Público; 2004.
6. Decreto-Lei n.º 73/2009 de 31 de Março Aprova o regime jurídico da Reserva Agrícola Nacional. 2009.
7. Pereira C. Aplicação de lamas de ETARs em solos agrícolas e florestais. 2004;
8. Decreto-Lei nº 118/2006 de 21 de Junho. Regime de Utilização de Lamas de Depuração em Solos Agrícolas. 2006.
9. Decreto-lei nº 276/2009, de 2 de Outubro. Regime de Utilização de Lamas de Depuração em Solos Agrícolas. 2009.
10. Lynch JM, Wiseman A, De Leij FAAM, Simon AL. Ecotoxicology. Encyclopedia of Biodiversity. New York: Elsevier; 2001. p 363-373.
11. US EPA 600/3-88/029. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. A.8.6. Lettuce seed germination (*Lactuca sativa*). 1989.
12. Labre JCC, Silva JMA, Millioli VS, Carvalho DD. Testes ecotoxicológicos baseados na exposição de anelídeos e sementes de alface através da adição de diferentes concentrações de surfactantes ao solo. III Workshop de Ecotoxicologia. Suplemento 1. Volume 8, nº 2. Rio Claro, SP, Brasil; 2008.
13. B. Fjallborg NG. Short-term bioassay responses to sludge products and leachate. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 367-376 2006;
14. Abrosca Bd, Fiorentino A, Izzo A, Cefarelli G, Pascarella MT, Uzzo P, Monaco P. Phytotoxicity evaluation of five pharmaceutical pollutants detected in surface water on germination growth of cultivated and spontaneous plants. Journal of Environmental Science and Health Part A (2008) 43, 285-294 2007;

BIBLIOGRAFIA

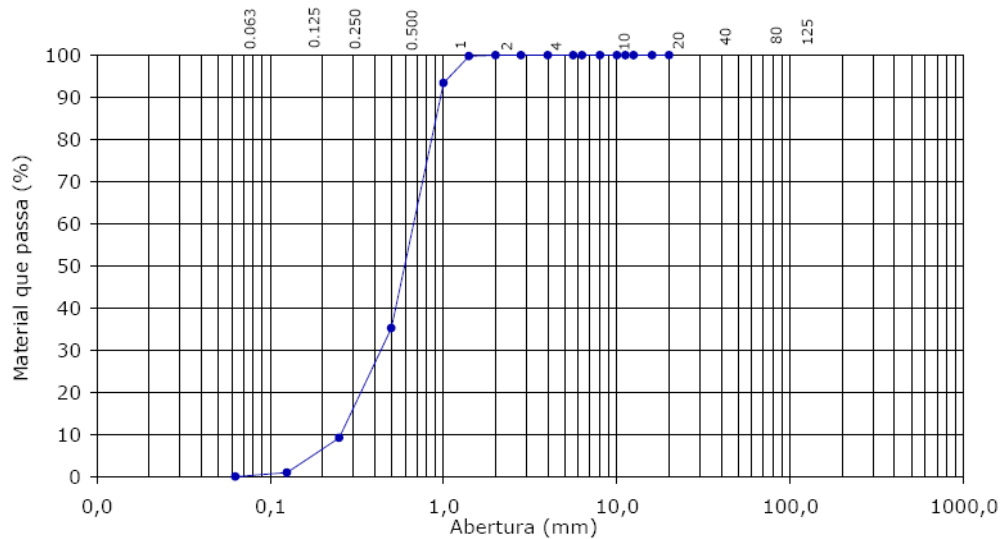
15. Ester Marti JS, Monica Sanchez Ecotoxicological tests assessment of soils polluted by chromium (VI) or pentachlorophenol. ELSEVIER 2007:53-57.
16. Pillard DA, DuFresne DL. Toxicity of formulated glycol deicers and ethylene and propylene glycol to *Lactuca sativa*, *Lolium perenne*, *Selenastrum capricornutum*, and *Lemna minor*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 1999;37 (1):29-35.
17. Mendonca E, Picado A. Ecotoxicological monitoring of remediation in a coke oven soil. Environmental Toxicology 2002;17 (1):74-79.
18. Costa EBd, Lima LRd, Lobo EA, Brentano DM. Avaliação física, química e toxicologica do sedimento produzido em Estações de Tratamento de Águas (ETAs) para abastecimento público. 22º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental 2003;
19. Lallana MC, Billard CE, Elizalde JH, Lallana VH. Germination bioassay of *Lactuca sativa*: to determine water quality in irrigation dams. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias 2008;XL (1):29-38.
20. www.naturlink.sapo.pt, "Gestão e valorização de lamas de ETAR", d'Azevedo RT, (acedido em 17.11.2009).
21. NP 5667:13. guia para amostragem de lamas provenientes de estações de tratamento de águas e águas residuais. 1997.
22. NP EN ISO/IEC 17025-2005. Acreditação de Laboratórios.
23. EN 12457-4. Characterisation of waste - Leaching - Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges - Part 4: One stage batch test at a liquid to solid ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 10 mm (without or with size reduction). 2002.
24. ISO 5667-16:1998 Water quality -- Sampling -- Part 16: Guidance on biotesting of samples.
25. Fjallborg B, Gustafsson N. Short-term bioassay responses to sludge products and leachate. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2006;51 (3):367-376.
26. CE 1881/2006 de 19 de Dezembro. Regulamento que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. 2006.
27. Standard Methods of Water and Waste Water. 2005.
28. GUIA RELACRE 13. Validação de Métodos Internos de ensaio em Análise Química. 2000.

29. IPAC OGC007 Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos. 2007.
30. Miller JC, Miller JN. Statistics for analytical chemistry: Ellis Horwood PTR Prentice Hall; 1993.
31. DECO. Águas na origem. Proteste 2009 Novembro 2009:18-21.
32. Baird C. Chemistry in your life. Nova Iorque: W.H. Freeman and Company; 2006.
33. Mendonca E, Picado A, Paixao SM, Silva L, Cunha MA, Leitao S, Moura I, Cortez C, Brito F. Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. Journal of Hazardous Materials 2009;163 (2-3):665-670.
34. Filser J, Koehler H, Ruf A, Römbke J, Prinzing A, Schaefer M. Ecological theory meets soil ecotoxicology: Challenge and chance. Basic and Applied Ecology 2008;9 (4):346-355.
35. Schnaak W, Kuchler T, Kujawa M, Henschel KP. Organic contaminants in sewage sludge and their ecotoxicological significance in the agricultural utilization sewage sludge. Chemosphere 1998;35 (1-2):5-11.

ANEXO I - Boletim de análise do solo artificial

Massa inicial da amostra, M_1 (0.001 kg) = **0,300**

Peneiro abertura	Retidos		Passados acumulados
	R_i	$N_i = \frac{R_i}{M_1} \times 100$	$N_i = 100 - N_i$
(mm)	(0.1 g)	(0.001kg)	(0.1 %)
20			100
16			100
12,5			100
11,2			100
10			100
8			100
6,3			100
5,6			100
4			100
2,8			100
2	0,01	0,000	0,0
1,4	0,73	0,001	0,2
1	19,02	0,019	6,3
0,500	174,28	0,174	58,1
0,250	77,96	0,078	26,0
0,125	24,58	0,025	8,2
0,063	3,03	0,003	1,0



Observações:

Data:

Ensaiou:

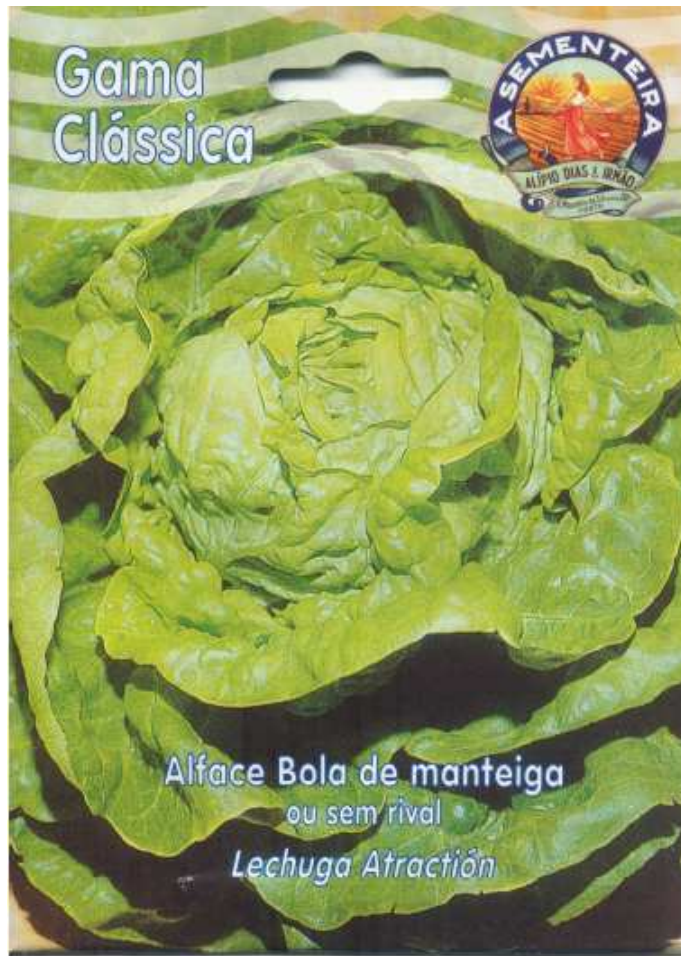
Aprovado:

31-03-2008

Cíntia Rodrigues

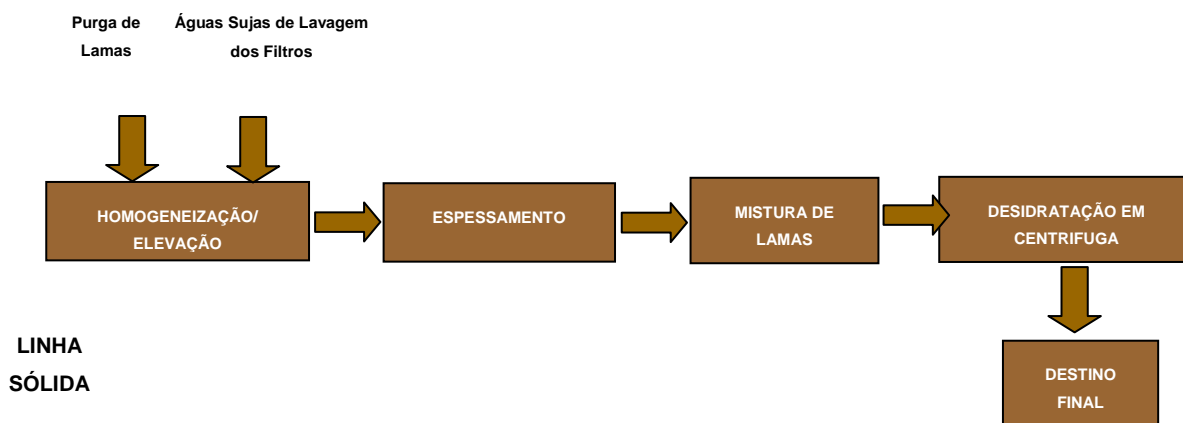
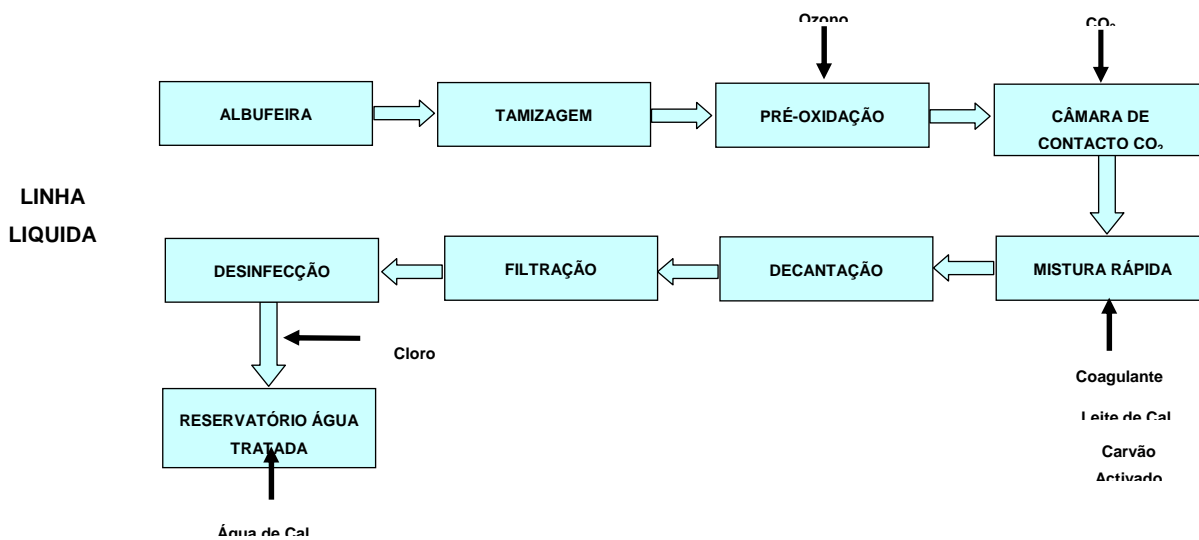
Teresa Araújo

ANEXO II - Características das sementes de *Lactuca sativa* buttercrunch

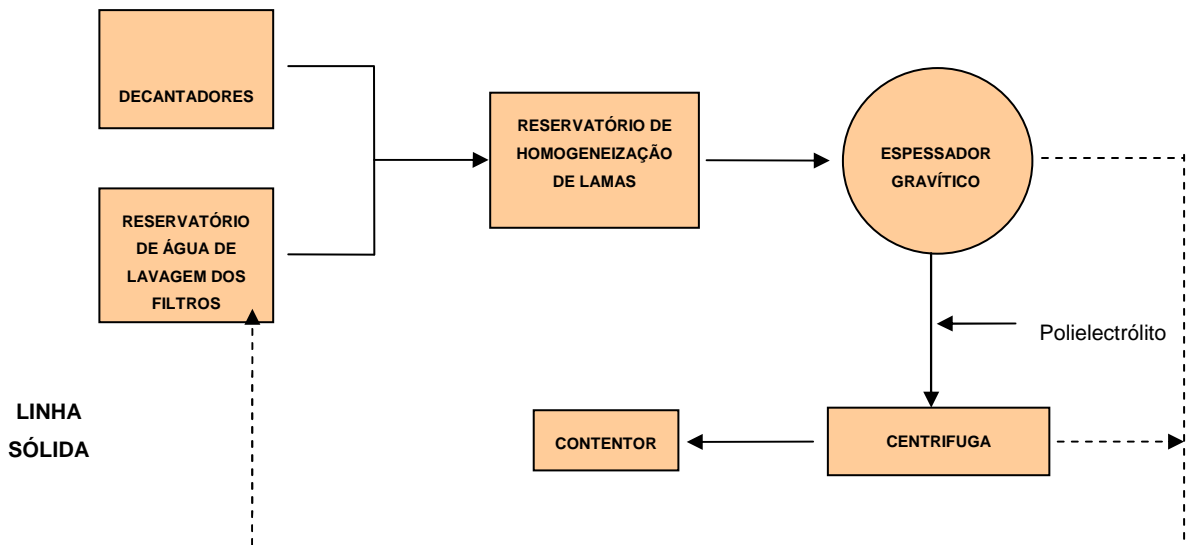
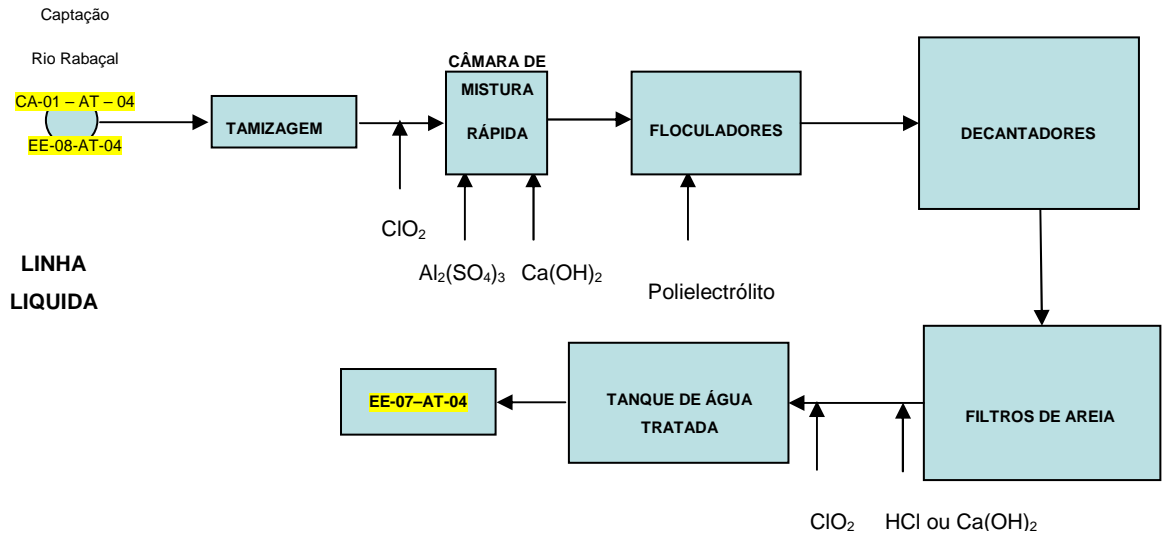


**ANEXO III - Tipo de tratamento da água nas várias ETA
onde foram recolhidas as lamas para estudo**

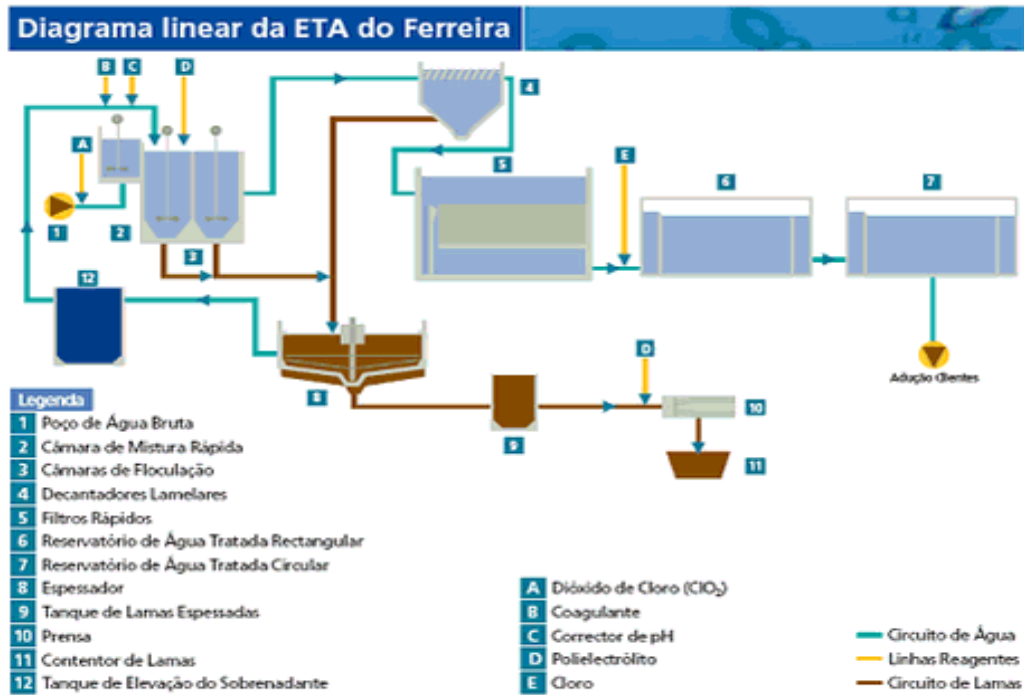
Esquema de Tratamento da ETA A da Albufeira do Alto Rabagão



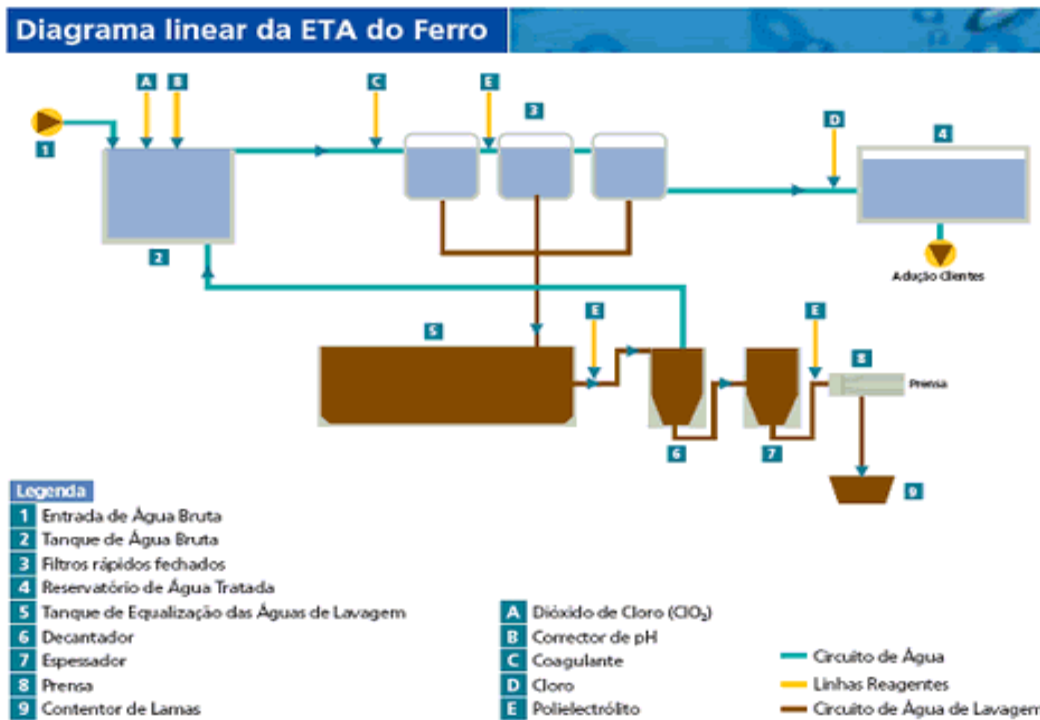
Esquema de Tratamento da ETA B do rio Rabaçal



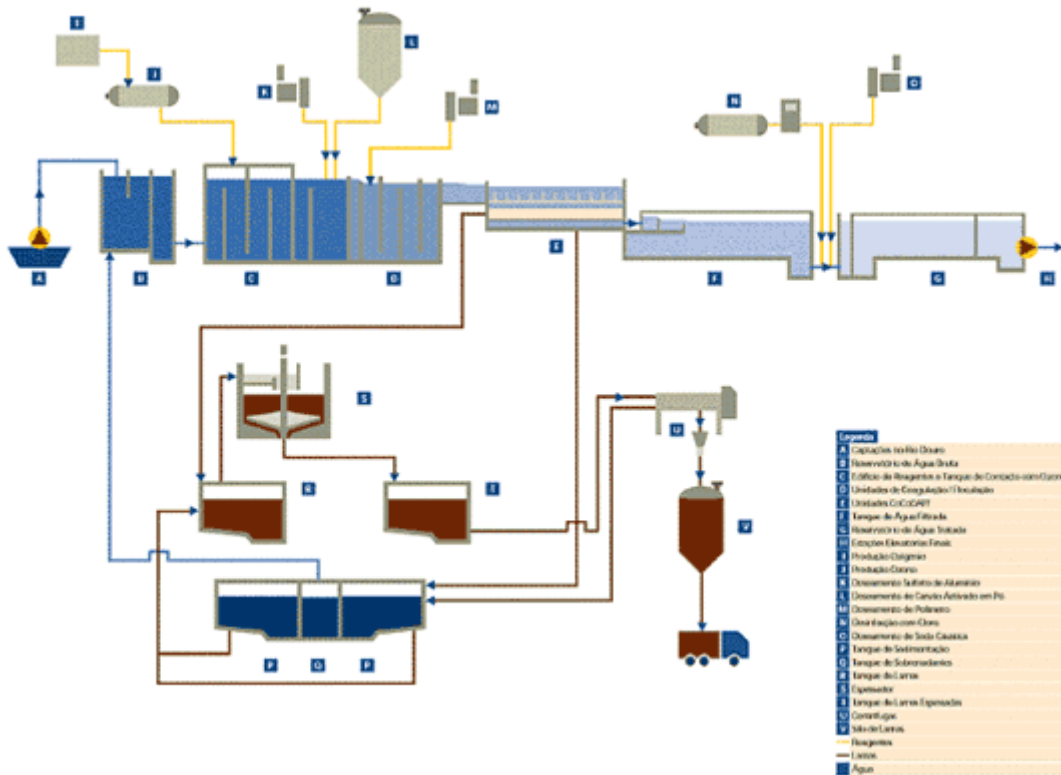
Esquema de Tratamento da ETA C do rio Ferreira



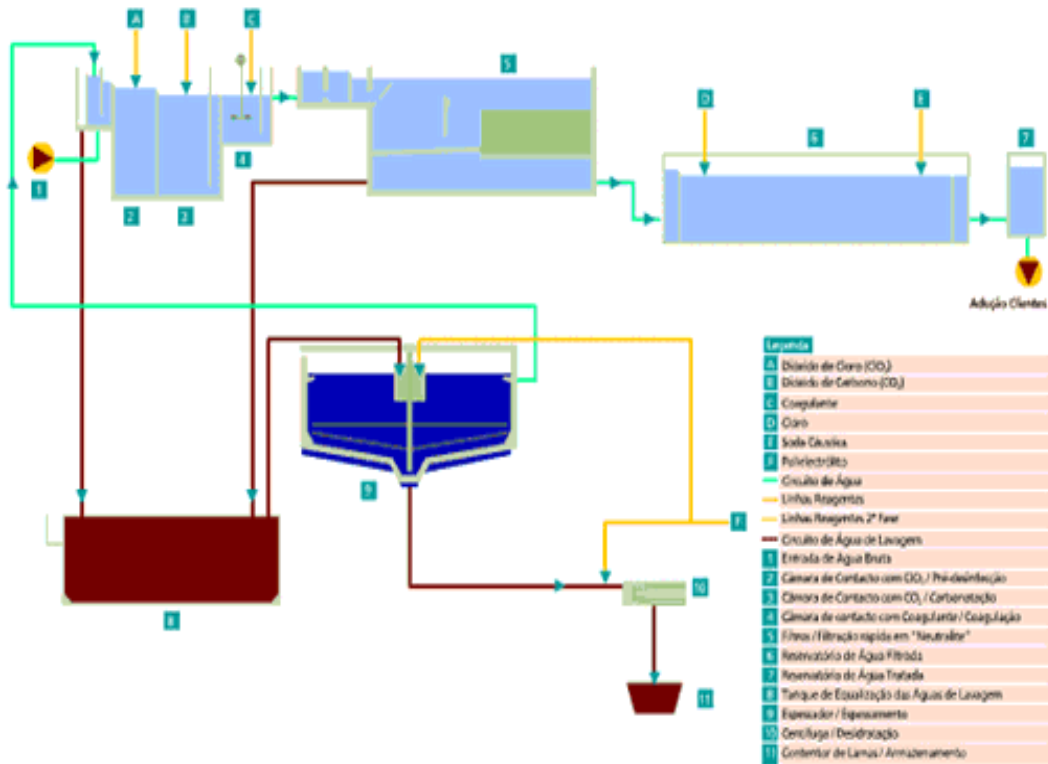
Esquema de Tratamento da ETA D do Rio Ferro e Vizela



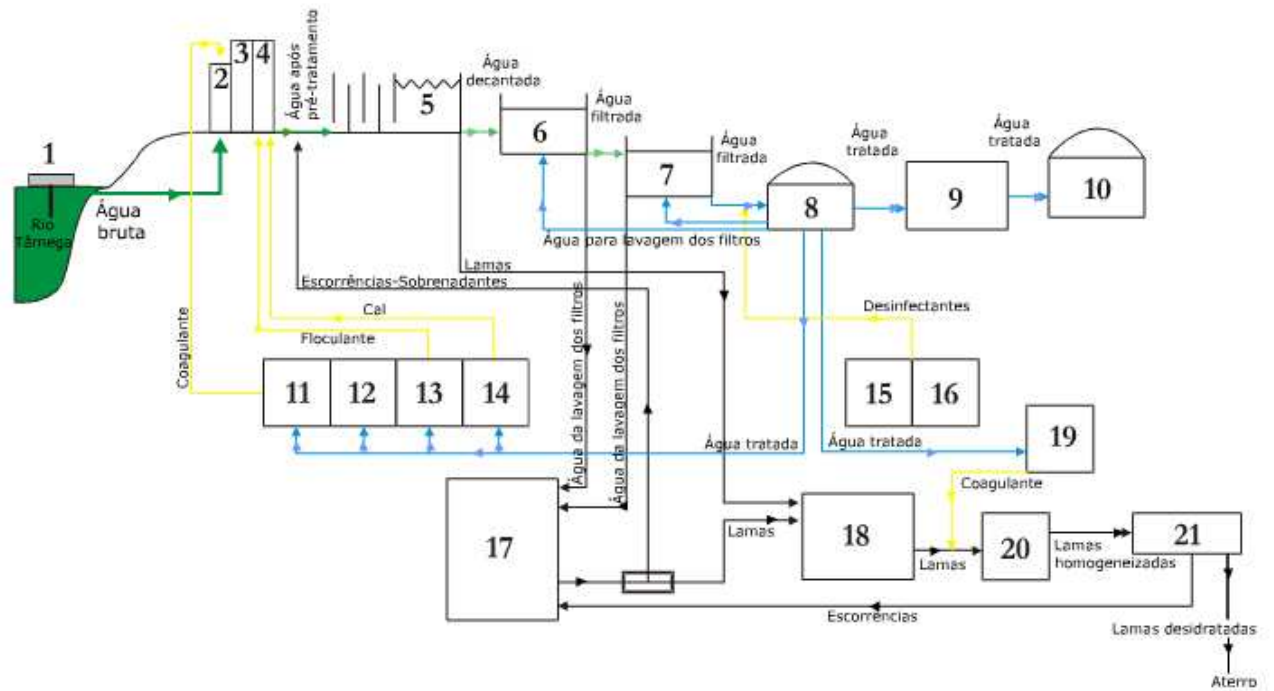
Esquema de Tratamento da ETA E do Rio Douro



Esquema de Tratamento da ETA F do Rio Paiva



Esquema de Tratamento da ETA G do Rio Tâmega



- | | |
|--|-------------------------------------|
| 1 - Plataforma flutuante | 11 - Tanque do coagulante |
| 2 - Microtamizador | 12 - Tanque de reserva |
| 3 - Câmara de Ozono | 13 - Tanque de floculante |
| 4 - Tanque de recepção do floculante e cal | 14 - Tanque da cal |
| 5 - Decantador | 15 - Depósito do desinfetante |
| 6 - Filtro de areia | 16 - Depósito do desinfetante |
| 7 - Filtro de carvão | 17 - Torre de recepção de lamas |
| 8 - Reservatório | 18 - Tanque de lamas |
| 9 - Estação Elevatória | 19 - Tanque do coagulante das lamas |
| 10- Reservatório | 20 - Tanque de agitação |
| | 21 - Prensa |

**ANEXO IV - Extracto do Decreto-Lei n.º 276/2009 de 2 de
Outubro, que estabelece o regime jurídico da utilização
agrícola das lamas de depuração**

Artigo 30.º

Regiões Autónomas

O presente decreto-lei aplica-se às Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira, com as devidas adaptações, nos termos da respectiva autonomia político-administrativa, cabendo a sua execução administrativa aos serviços e organismos das respectivas administrações regionais autónomas com atribuições e competências no âmbito do presente decreto-lei, sem prejuízo das atribuições das entidades de âmbito nacional.

Artigo 31.º

Norma revogatória

É revogado o Decreto-Lei n.º 118/2006, de 21 de Junho.

Artigo 32.º

Entrada em vigor

1 — Sem prejuízo do disposto no n.º 2, o presente decreto-lei entra em vigor no dia seguinte ao da sua publicação.

2 — Os artigos 5.º e 6.º entram em vigor um ano após a data de entrada em vigor do presente decreto-lei.

Visto e aprovado em Conselho de Ministros de 30 de Julho de 2009. — José Sócrates Carvalho Pinto de Sousa — João Titterington Gomes Cravinho — Francisco Carlos da Graça Nunes Correia — Luis Medeiros Vieira.

Promulgado em 18 de Setembro de 2009.

Publique-se.

O Presidente da República, ANIBAL CAVACO SILVA.

Referendado em 21 de Setembro de 2009.

O Primeiro-Ministro, José Sócrates Carvalho Pinto de Sousa.

ANEXO I

Valores limite de concentração relativos a metais pesados, compostos orgânicos e dioxinas e microrganismos

QUADRO N.º 1

Valores limite de concentração de metais pesados nos solos em função do seu pH

Parâmetro	mg/kg de matéria seca		
	pH ≤ 5,5	5,5 < pH ≤ 7	pH > 7 (*)
Cádmio	1	3	4
Cobre	50	100	200
Níquel	30	75	110
Chumbo	50	300	450
Zinco	150	300	450
Mercurio	1	1,5	2
Crómio	50	200	300

(*) Aplicável a solos onde se efectuem culturas com fins comerciais e destinadas unicamente ao consumo animal.

As DRAP indicam o número e a natureza dos locais em causa.

QUADRO N.º 2

Valores limite de concentração de metais pesados nas lamas destinadas à aplicação no solo agrícola

Parâmetro	Valores limite (mg/kg de matéria seca)
Cádmio	20
Cobre	1 000
Níquel	300
Chumbo	750
Zinco	2 500
Mercurio	16
Crómio	1 000

QUADRO N.º 3

Valores limite para as quantidades anuais de metais pesados que podem ser introduzidas nos solos cultivados, com base numa média de 10 anos

Parâmetro	Valores limite (kg/ha/ano)
Cádmio	0,15
Cobre	12
Níquel	3
Chumbo	15
Zinco	30
Mercurio	0,1
Crómio	4,5

QUADRO N.º 4

Valores limite de concentração de compostos orgânicos nas lamas destinadas à agricultura (aplicável nos casos previstos no n.º 1.1.5 do anexo II)

Compostos orgânicos	Valores limite (matéria seca)
LAS (alquilo benzenossulfonatos lineares)	5 000 mg/kg
NPE (nonilfenóis e nonilfenóis etoxilados)	450 mg/kg
PAH (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos)	6 mg/kg
PCB (compostos bifenilos policlorados)	0,8 mg/kg
PCDD (policlorodibenzodioxinas)	100 ng TEQ/kg
PCDF (furanos)	

QUADRO N.º 5

Valores limite de microrganismos nas lamas destinadas à agricultura

Microrganismos	Valores limite
<i>Escherichia coli</i>	< 1 000 células/g de matéria fresca.
<i>Salmonella</i> spp.	Ausente em 50 g de material original.

ANEXO II

Análises a efectuar às lamas e aos solos

- 1 — Análise das lamas:
 - 1.1 — Parâmetros a analisar em todas as lamas destinadas a utilização agrícola:
 - 1.1.1 — Parâmetros agronómicos:

- a) Matéria seca;
- b) Matéria orgânica;
- c) pH;
- d) Azoto total;

- e) Azoto nítrico e amoniacal;
- f) Fósforo total;
- g) Potássio total;
- h) Magnésio total;
- i) Cálcio total.

1.1.2 — Metais pesados:

- a) Cádmio;
- b) Cobre;
- c) Níquel;
- d) Chumbo;
- e) Zinco;
- f) Mercúrio;
- g) Crómio.

1.1.3 — Microrganismos patogénicos:

- a) *Salmonella* spp.;
- b) *Escherichia coli*.

1.1.4 — A CCDR e a ARH podem dispensar a realização de análises do cobre, do zinco e do crómio caso nas águas afluentes à estação de tratamento tais parâmetros não se encontrem presentes ou apenas se encontrem presentes em quantidades inferiores ao limite de detecção do método analítico utilizado.

1.1.5 — A CCDR, a ARH e, ou, a DRAP podem exigir a realização de análises a outros parâmetros, nomeadamente compostos orgânicos (LAS, NPE, PAH e PCB, PCDD, PCDF).

1.2 — Frequência das análises:

1.2.1 — As lamas devem ser analisadas com intervalos regulares durante o ano e pelo menos com a frequência que consta do quadro n.º 6.

QUADRO N.º 6

Frequência anual das análises às lamas

Produção anual de lamas — Toneladas de matéria seca	Número mínimo de análises por ano	
	Parâmetros agronómicos e metais pesados	Patogénicos
< 250	2	2
250-5 000	4	4
> 5 000	6	6

1.2.2 — A frequência das análises para cada parâmetro relativo a metais pesados e microrganismos patogénicos pode ser reduzida caso, no período de dois anos consecutivos, seja demonstrado que o valor obtido para esse parâmetro é sistematicamente inferior a 75% do valor limite.

1.2.3 — A frequência das análises para determinado parâmetro agronómico pode ser reduzida caso, no período de dois anos consecutivos, seja demonstrado que cada valor obtido tem um desvio inferior a 20% relativamente à média dos valores obtidos.

1.2.4 — As frequências reduzidas são as que constam do quadro n.º 7.

QUADRO N.º 7

Frequência reduzida das análises às lamas

Produção anual de lamas — Toneladas de matéria seca	Número mínimo de amostragens por ano	
	Parâmetros agronómicos e metais pesados	Patogénicos
≤ 2 500	1	1
> 2 500	2	2

1.2.5 — Sempre que surjam variações significativas na qualidade da água bruta ou alterações no funcionamento da estação de tratamento de águas residuais, deve ser realizada uma análise após a primeira produção de lamas.

1.3 — Métodos de análise:

1.3.1 — Amostragem:

a) As lamas são objecto de amostragem após tratamento e antes da entrega ao utilizador, devendo as amostras ser representativas das lamas produzidas;

b) As amostras devem ser recolhidas na época de maior produção de lamas ou após variações significativas da qualidade dos efluentes;

c) As amostras devem ser recolhidas em vários locais, a diferentes profundidades e horas, sendo posteriormente homogeneizadas antes de se proceder à sua análise.

1.3.2 — Métodos de análise a utilizar:

a) Os métodos de referência a utilizar na análise das lamas são os constantes das normas aplicáveis de acordo com o quadro n.º 8;

b) A análise dos metais pesados (cádmio, cobre, níquel, chumbo, zinco, mercúrio e crómio) é efectuada após digestão com água-régia;

c) O método de referência para a quantificação é a espectrofotometria de absorção atómica;

d) O limite de detecção para cada metal não deve exceder 10% do respectivo valor limite de concentração.

2 — Análise dos solos:

2.1 — Parâmetros a analisar:

2.1.1 — Parâmetros agronómicos:

- a) pH;
- b) Azoto;
- c) Fósforo.

2.1.2 — Metais pesados:

- a) Cádmio;
- b) Cobre;
- c) Níquel;
- d) Chumbo;
- e) Zinco;
- f) Mercúrio;
- g) Crómio.

2.2 — Frequência das análises:

a) Deve ser efectuada uma análise aos parâmetros agronómicos e metais pesados antes de serem aplicadas lamas

**ANEXO V - Extracto do Regulamento (CE) N.º 1881/2006
de 19 de Dezembro de 2006, alterado pelo Regulamento
(CE) N.º 629/2008 de 2 de Julho de 2008, que fixa os
teores máximos de certos contaminantes presentes nos
géneros alimentícios**

Géneros alimentícios (1)		Teores máximos (mg/kg de peso fresco)
3.1.11	Brássicas, produtos hortícolas de folha e cogumelos de cultura (27)	0,30
3.1.12	Frutos, com exceção de bagas e frutos pequenos (27)	0,10
3.1.13	Bagas e frutos pequenos (27)	0,20
3.1.14	Óleos e gorduras, incluindo a matéria gorda do leite	0,10
3.1.15	Sumos de frutos, sumos de frutos concentrados reconstituídos e néctares de frutos (14)	0,050
3.1.16	Vinho (incluindo vinho espumante, com exceção do vinho licoroso), sidra, perada e vinho de frutos (11)	0,20 (28)
3.1.17	Vinho aromatizado, bebidas aromatizadas à base de vinho e cocktails aromatizados de produtos vitivinícolas (13)	0,20 (28)
3.2	Cádmio	
3.2.1	Carne (com exceção de miudezas) de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira (6)	0,050
3.2.2	Carne de cavalo, com exceção de miudezas (6)	0,20
3.2.3	Fígado de bovinos, ovinos, suínos, aves de capoeira e equídeos (6)	0,50
3.2.4	Rim de bovinos, ovinos, suínos, aves de capoeira e equídeos (6)	1,0
3.2.5	Parte comestível do peixe (24) (25), com exceção das espécies referidas nos pontos 3.2.6 e 3.2.7	0,050
3.2.6	Parte comestível dos seguintes peixes (24) (25): biqueirão (<i>Engraulis species</i>) bonito (<i>Sarda sarda</i>) sargo-safia (<i>Diplodus vulgaris</i>) enguia (<i>Anguilla anguilla</i>) tainha-negrão (<i>Mugil labrosus labrosus</i>) chicharro ou carapau (<i>Trachurus species</i>) boquinho (<i>Luvanus imperialis</i>) sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>) sardinops (<i>Sardinops species</i>) atuns (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>) língua (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	0,10
3.2.7	Parte comestível de espadarte (<i>Xiphias gladius</i>) (24) (25)	0,30
3.2.8	Crustáceos, com exceção da carne escura de caranguejo e da carne da cabeça e do tórax da lagosta e de grandes crustáceos similares (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>) (26)	0,50
3.2.9	Moluscos bivalves (26)	1,0
3.2.10	Cefalópodes (sem vísceras) (26)	1,0

Géneros alimentícios ⁽¹⁾		Teores máximos (mg/kg de peso fresco)
3.2.11	Cereais, com excepção de sêmea, gérmen, trigo e arroz	0,10
3.2.12	Sêmea, gérmen, trigo e arroz	0,20
3.2.13	Grãos de soja	0,20
3.2.14	Produtos hortícolas e frutos, com excepção de produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, cogumelos, produtos hortícolas de caule, pinhões, raízes e batatas ⁽²⁷⁾	0,050
3.2.15	Produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, cogumelos de cultura e aipos ⁽²⁷⁾	0,20
3.2.16	Produtos hortícolas de caule, raízes e batatas, com excepção de aipo-rábano ⁽²⁷⁾ . No caso das batatas, o teor máximo aplica-se a batatas descascadas.	0,10
3.3	Mercúrio	
3.3.1	Produtos da pesca ⁽²⁶⁾ e parte comestível do peixe ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾ , com excepção das espécies referidas no ponto 3.3.2. Os teores máximos aplicam-se aos crustáceos, com excepção da carne escura do caranguejo e da carne da cabeça e do tórax da lagosta e de grandes crustáceos similares (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>)	0,50
3.3.2	Parte comestível dos seguintes peixes ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾ : tamboril (<i>Lophius species</i>) peixe-lobo riscado (<i>Anarhichas lupus</i>) bonito (<i>Sarda sarda</i>) enguia (<i>Anguilla species</i>) ronquinhas, olho-de-vidro, olho-de-vidro laranja (<i>Hoplostethus species</i>) lagartixa-da-rocha (<i>Coryphaenoides rupestris</i>) alabote-do-atlântico (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) espadins (<i>Makaira species</i>) areeiros (<i>Lepidorhombus species</i>) salmonetes (<i>Mullus species</i>) lúcio (<i>Esox lucius</i>) palmeta (<i>Oryzopsis unicolor</i>) fanecão (<i>Tricopterus minutus</i>) carocho (<i>Centrosymnus coelolepis</i>) raia (<i>Raja species</i>) peixe-vermelho (<i>Sebastes marinus</i> , <i>S. mentella</i> , <i>S. viviparus</i>) veleiro-do-atlântico (<i>Istiophorus platypterus</i>) peixe-espada (<i>Lepidopus caudatus</i> , <i>Aphanopus carbo</i>) bicas e gorazes (<i>Pagellus species</i>) tubarões (todas as espécies) escolares (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Rivettus pretiosus</i> , <i>Gempylus serpens</i>) esturjão (<i>Acipenser species</i>) espadarte (<i>Xiphias gladius</i>) atuns (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>)	1,0
3.4	Estanho (na forma inorgânica)	
3.4.1	Géneros alimentícios enlatados, com excepção de bebidas	200
3.4.2	Bebidas em lata, incluindo sumos de frutos e de produtos hortícolas	100

ANEXO

O anexo do Regulamento (CE) n.º 1881/2006 é alterado do seguinte modo:

1. Na subsecção 3.1 (**Chumbo**), o ponto 3.1.11 passa a ter a seguinte redacção e é acrescentado um novo ponto 3.1.18:

«3.1.11	Brássicas, produtos hortícolas de folha e cogumelos ⁽²⁷⁾ : <i>Agaricus bisporus</i> (cogumelo comum), <i>Pleurotus ostreatus</i> (pleuroto), <i>Lentinula edodes</i> ("shi-take")	0,30
3.1.18	Suplementos alimentares (*)	3,0

(*) O teor máximo refere-se ao suplemento alimentar tal como é vendido.»

2. A subsecção 3.2 (**Cádmio**) passa a ter a seguinte redacção:

«3.2	Cádmio	
3.2.1	Carne (com excepção de miudezas) de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira ⁽⁶⁾	0,050
3.2.2	Carne de cavalo, com excepção de miudezas ⁽⁶⁾	0,20
3.2.3	Fígado de bovinos, ovinos, suínos, aves de capoeira e equídeos ⁽⁶⁾	0,50
3.2.4	Rim de bovinos, ovinos, suínos, aves de capoeira e equídeos ⁽⁶⁾	1,0
3.2.5	Parte comestível do peixe ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ , com excepção das espécies referidas nos pontos 3.2.6, 3.2.7 e 3.2.8	0,050
3.2.6	Parte comestível dos seguintes peixes ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ : bonito (<i>Sarda sarda</i>) sargo-safia (<i>Diplodus vulgaris</i>) enguia (<i>Anguilla anguilla</i>) tainha-negrão (<i>Chelon labrosus</i>) chicharro ou carapau (<i>Trachurus species</i>) boquinho (<i>Luvarus imperialis</i>) sardas/cavalas (<i>Scomber species</i>) sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>) sardinops (<i>Sardinops species</i>) atuns (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>) língua (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	0,10
3.2.7	Parte comestível dos seguintes peixes ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ : judeu (<i>Auxis species</i>)	0,20
3.2.8	Parte comestível dos seguintes peixes ⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ : biqueirão (<i>Engraulis species</i>) espadarte (<i>Xiphias gladius</i>)	0,30
3.2.9	Crustáceos, com excepção da carne escura de caranguejo e da carne da cabeça e do tórax da lagosta e de grandes crustáceos similares (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>) ⁽²⁶⁾	0,50
3.2.10	Moluscos bivalves ⁽²⁶⁾	1,0
3.2.11	Cefalópodes (sem vísceras) ⁽²⁶⁾	1,0
3.2.12	Cereais, com excepção de sêmea, gérmen, trigo e arroz	0,10
3.2.13	Sêmea, gérmen, trigo e arroz	0,20
3.2.14	Grãos de soja	0,20
3.2.15	Produtos hortícolas e frutos, com excepção de produtos hortícolas de folha, plantas aromáticas frescas, cogumelos, produtos hortícolas de caule, raízes e batatas ⁽²⁷⁾	0,050

3.2.16	Produtos hortícolas de caule, raízes e batatas, com excepção de aipo-rábano ⁽²⁷⁾ . No caso das batatas, o teor máximo aplica-se a batatas descascadas.	0,10
3.2.17	Produtos hortícolas de folha e plantas aromáticas frescas, aipo-rábano e os seguintes cogumelos ⁽²⁷⁾ : <i>Agaricus bisporus</i> (cogumelo comum), <i>Pleurotus ostreatus</i> (pleuroto) e <i>Lentinula edodes</i> ("shi-take")	0,20
3.2.18	Cogumelos, com excepção dos referidos no ponto 3.2.17 ⁽²⁷⁾	1,0
3.2.19	Suplementos alimentares (*), com excepção dos suplementos referidos no ponto 3.2.20	1,0
3.2.20	Suplementos alimentares (*) que consistam exclusiva ou principalmente em algas secas ou em produtos derivados de algas	3,0

(*) O teor máximo refere-se ao suplemento alimentar tal como é vendido.»

3. Na subsecção 3.3 (Mercúrio), o ponto 3.3.2 passa a ter a seguinte redacção e é acrescentado um novo ponto 3.3.3:

«3.3.2	Parte comestível dos seguintes peixes ⁽²⁴⁾ (²⁵): tamboril (<i>Lophius species</i>) peixe-lobo riscado (<i>Anarhichas lupus</i>) bonito (<i>Sarda sarda</i>) enguia (<i>Anguilla species</i>) ronquinhas, olho-de-vidro, olho-de-vidro laranja (<i>Hoplostethus species</i>) lagartixa-da-rocha (<i>Coryphaenoides rupestris</i>) alabote-do-atlântico (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) maruca-do-cabo (<i>Genypterus capensis</i>) espadins (<i>Makaira species</i>) areiros (<i>Lepidorhombus species</i>) salmonetes (<i>Mullus species</i>) abadejos rosados (<i>Genypterus blacodes</i>) lúcio (<i>Esox lucius</i>) palmeta (<i>Orcynopsis unicolor</i>) fanecão (<i>Trisopterus minutus</i>) carocho (<i>Centroscygnus coelolepis</i>) raia (<i>Raja species</i>) peixe-vermelho (<i>Sebastes marinus</i> , <i>S. mentella</i> e <i>S. viviparus</i>) veleiro-do-atlântico (<i>Istiophorus platypterus</i>) peixe-espada (<i>Lepidopus caudatus</i> , <i>Aphanopus carbo</i>) bicas e gorazes (<i>Pagellus species</i>) tubarões (todas as espécies) escolares (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettus pretiosus</i> , <i>Gempylus serpens</i>) esturção (<i>Acipenser species</i>) espadarte (<i>Xiphias gladius</i>) atuns (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>)	1,0
3.3.3	Suplementos alimentares (*)	0,10

(*) O teor máximo refere-se ao suplemento alimentar tal como é vendido.»

4. Na nota de pé de página ⁽¹⁾ é aditada a seguinte frase:

«O teor máximo para os frutos não é aplicável aos frutos de casca rija».

5. A nota de pé de página ⁽⁸⁾ passa a ter a seguinte redacção:

«⁽⁸⁾ Géneros alimentícios enumerados nesta categoria, tal como definidos na Directiva 2006/141/CE da Comissão (JO L 401 de 30.12.2006, p. 1).».