



Avaliação da ecotoxicidade de águas residuais antes e após tratamentos terciários usando *Daphnia magna*

ÂNGELA MANUELA PINTO GUEDES

Setembro de 2023

**Avaliação da ecotoxicidade de águas residuais antes e após
tratamentos terciários usando *Daphnia magna***



**Dissertação Submetida como requisito parcial para a obtenção de grau de
Mestre em Engenharia Química, área de especialização Qualidade**

Ângela Manuela Pinto Guedes

Orientação:

Professora Valentina Domingues

Doutora Maria da Luz Maia

Professora Cristina Delerue-Matos

Agradecimentos

Terminada esta etapa importante da minha vida académica, queria expressar os meus profundos agradecimentos a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho mas também a todos os que me acompanharam e apoiaram durante todo este percurso.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto OXI-e3D financiado pela Agência Nacional de Inovação. Assim, gostaria de agradecer o apoio financeiro proporcionado por este projeto. Agradeço também à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pela atribuição de uma bolsa de investigação no âmbito do projeto “Verão com Ciência”.

À Professora Valentina Domingues, agradeço o conhecimento transmitido ao longo do curso e a disponibilidade demonstrada no decorrer deste trabalho. Uma palavra de agradecimento à Doutora Maria da Luz Maia pelo apoio que me deu no laboratório e cuja experiência e conhecimento foram determinantes para o sucesso deste trabalho. À Prof^a Cristina por me ter apresentado este desafio.

Agradeço também a todos os colegas do GRAQ que tive a oportunidade de conhecer, pela colaboração, disponibilidade e simpatia que manifestaram.

Aos meus amigos, pelo apoio e companheirismo que sempre revelaram para comigo e sem o qual este percurso teria sido muito diferente.

Por último, quero também agradecer aos meus pais pelo amor e apoio incondicional que me transmitem desde sempre.

A todos, o meu obrigada!

Resumo

Na sua definição, toxicologia é o estudo dos efeitos adversos de produtos químicos sobre organismos vivos. A *Daphnia magna* é um dos organismos largamente utilizados para averiguar a toxicidade devido à sua elevada sensibilidade a tóxicos. O principal objetivo deste trabalho foi averiguar a ecotoxicidade de águas residuais tratadas usando, para o efeito, *D. magna*. Foram analisados cinco efluentes, entre os quais um efluente secundário e quatro efluentes terciários [ultravioleta (UV), ultrafiltração (UF), ozonização e plasma não-térmico].

Foram realizados ensaios agudos e ensaios crónicos. Nos ensaios agudos, as dáfrias com menos de 24 h ao início do teste, foram expostas à substância a ser testada, numa gama crescente de concentrações, registando-se a morte das dáfrias ao fim de 24 h e de 48 h. Em contraste, os ensaios crónicos, implicam a exposição de dáfrias juvenis à substância de teste por um período aproximado de 21 dias, com o objetivo de monitorizar o seu comportamento reprodutivo quando expostas a substâncias tóxicas.

Uma parte fulcral deste projeto foi o estudo das condições mais favoráveis à realização dos ensaios crónicos. Foram testados parâmetros como o local para a realização dos ensaios, alimentação dos organismos teste (*D. magna*) e meio de cultura. Por causa do tempo despendido nesta otimização, foram apenas realizados ensaios crónicos aos efluentes terciários tratados por UV e UF. Devido a fatores externos não identificados, não foi possível a realização de um controlo, pelo que foram usados dois controlos disponíveis na literatura para comparar comportamentos reprodutivos.

Dos ensaios agudos, averiguou-se que o tratamento por ozonização foi o que provocou maior mortalidade nos organismos de teste, tendo sido possível calcular um EC_{50} de 85,75%. Nos restantes efluentes, não foi possível calcular o EC_{50} , uma vez que a mortalidade das dáfrias não foi significativa, assim, foi oportuna a realização de ensaios crónicos.

Dos ensaios crónicos realizados aos efluentes tratados por UV e UF, verificou-se uma disparidade notável do número de descendentes produzidos pelas dáfrias submetidas ao efluente tratado por UV relativamente às submetidas ao efluente tratado por UF, indicando a presença de algum composto que possa estar a atuar como um disruptor endócrino, levando a uma alteração reprodutiva das dáfrias.

Palavras-chave: *D. magna*, ecotoxicidade, tratamentos terciários, ensaios agudos, ensaios crónicos

Abstract

In its definition, toxicology is the study of the adverse effects of chemical products on living organisms. *Daphnia magna* is one of the most widely used organisms for ascertaining toxicity due to its high sensitivity to toxicants. The main goal of this work was to assess the ecotoxicity of treated wastewater using *D. magna*. Five effluents were analysed, including a secondary effluent and four tertiary effluents [ultraviolet (UV), ultrafiltration (UF), ozonation and non-thermal plasma].

Acute tests and chronic tests were performed. In the acute tests, *Daphnia* less than 24h old at the start of the test were exposed to the test substance at a range of concentrations for a period of 48h, with the death of *Daphnia* occurring after 24 and 48 hours. In contrast, chronic tests involve exposing juvenile *Daphnia* to the test substance for a period of approximately 21 days, with the aim of monitoring their reproductive behaviour when exposed to toxic substances.

A key part of this project was the study of the most favourable conditions for the chronic tests. Parameters such as test site, feeding of test organisms (*D. magna*) and culture medium were tested. Because of the time spent on this study, only chronic tests were performed on tertiary effluents treated by UV and UF. Due to unidentified external factors, it was not possible to perform a control test, so a control available in the literature was used to compare reproductive behaviours.

From the acute tests, it was found that the ozonation treatment caused the highest mortality in the test organisms, and it was possible to calculate an EC₅₀ of 85.75%. In the remaining effluents, it was not possible to calculate this value since the mortality of *Daphnia* was not significant. To ascertain the real effect of these effluents on *Daphnia*, chronic tests were necessary.

From the chronic tests performed on UV and UF treated effluents, there was a remarkable disparity in the number of offspring produced by *Daphnia* submitted to UV treated effluent compared to those submitted to UF treated effluent, indicating the presence of some compound that may be acting as an endocrine disruptor, leading to a reproductive abnormality of *Daphnia*.

Key words: *D. magna*, ecotoxicity, tertiary treatments, acute tests, chronic tests

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	V
Abstract.....	VII
Índice.....	IX
Índice de figuras.....	XIII
Índice de tabelas.....	XVII
Siglas e Abreviaturas.....	XIX
1. Enquadramento.....	1
1.1. Projeto FARMASENSE – Inovações na deteção e tratamento de fármacos em águas residuais.....	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Estrutura do relatório.....	2
2. Introdução.....	3
2.1. Poluentes emergentes: fármacos.....	3
2.2. Tratamentos de águas.....	4
Radiação ultravioleta.....	4
Ozonização.....	5
Plasma não-térmico.....	5
Ultrafiltração.....	6
2.3. <i>Daphnia magna</i>	6
2.3.1. Morfologia e fisiologia.....	6
2.3.2. Ciclo de vida.....	9
2.3.3. Habitat da <i>D. magna</i>	11
2.4. Testes de toxicidade.....	11
2.4.1. <i>D. magna</i> em ensaios de toxicidade.....	12
3. Materiais e métodos.....	14

3.1.	Materiais	14
3.2.	Equipamentos	14
3.3.	Preparação do meio	14
3.4.	Eclosão das <i>ephippias</i>	15
3.5.	Pré-alimentação das dáfnias	15
3.6.	Características das águas de teste	15
3.7.	Testes de toxicidade aguda.....	16
	Preparação das diluições das amostras – teste do dicromato de potássio	16
	Preparação das diluições das amostras – águas teste	17
	Preenchimento da placa de teste.....	17
	Transferência das dáfnias para a placa de teste.....	18
3.8.	Cultura da <i>Chlorella vulgaris</i>	18
3.9.	Testes preliminares – local e alimentação	20
3.10.	Ensaio Crónicos.....	23
4.	Resultados	26
4.1.	Testes de Toxicidade Aguda – Teste do Dicromato.....	26
4.2.	Testes de Toxicidade Aguda – Águas de Teste	27
4.3.	Ensaio intermédios – Testes de reprodução	32
	4.3.1. Alimentação e local – 1ª fase	32
	4.3.2. Local – 2ª fase	39
	4.3.3. Meio de cultura – 3ª fase	42
4.4.	Ensaio Crónicos	45
	4.4.1. Radiação ultravioleta.....	45
	4.4.2. Ultrafiltração	47
	4.4.3. Radiação ultravioleta vs Ultrafiltração.....	48
5.	Conclusões	52
6.	Limitações e propostas de trabalho futuro	54

Bibliografia.....	55
Anexos.....	59
A – Preparação da solução de spirulina em pó.....	59
B – Preparação da solução de fermento de padeiro	59
C – Ensaios de reprodução preliminares	60
C1 – Teste 1: Alimentação	60
C2 – Teste 2: Local	66
C3 – Teste 3: Meio de cultura	72

Índice de figuras

Figura 2. 1- Anatomia funcional da <i>D. magna</i> (Ebert, 2005).	8
Figura 2. 2- <i>D. magna</i> com ovos partenogénicos (Ebert, 2005).	10
Figura 2. 3- Ciclo de vida <i>D. magna</i> (Ebert, 2005).	10
Figura 3. 1- Esquema da placa de teste usada nos testes de toxicidade aguda.	18
Figura 3. 2- Cultura de <i>C. vulgaris</i>	19
Figura 3. 3- Local A: incubadora.	21
Figura 3. 4- Local B: mesa junto de janela virada a sul.	21
Figura 3. 5- Local C: janela virada a sul sem proteção da folhagem das árvores.	21
Figura 3. 6- Local D: janela virada a sul com proteção da folhagem das árvores.	21
Figura 3. 7- Local E: laboratório de aulas do DEQ.....	21
Figura 3. 8- Local F: laboratório de microbiologia do GRAQ.....	22
Figura 3. 9- Esquema ilustrativo da numeração dos copos de acordo com as gerações de dáfrias.	24
Figura 4. 1- Curva de mortalidade ao fim de 24h.	27
Figura 4. 2- Curva de mortalidade ao fim de 48h.	27
Figura 4. 3- Curva para a determinação do EC ₅₀ , ao fim de 48 h, inerente ao teste do efluente com tratamento de ozonização.	30
Figura 4. 4- a) dáfnia de controlo e b) dáfnia exposta ao efluente tratado por ozonização ao 100% após 48 h de ensaio.	31
Figura 4. 5- Evolução do número de descendentes ao longo do tempo usando uma alimentação à base de <i>C. vulgaris</i> (A – incubadora, B – mesa junto a janela voltada a sul, C – janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores e E – laboratório de aulas).	33
Figura 4. 6- Evolução do número de descendentes ao longo do tempo usando uma alimentação à base de <i>C. vulgaris</i> e fermento de padeiro (A – incubadora, B – mesa junto a janela voltada a sul, C – janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores e E – laboratório de aulas).	33
Figura 4. 7- Evolução do número de mortes ao longo do tempo usando uma alimentação à base de <i>C. vulgaris</i> (A – incubadora, B – mesa junto a janela voltada a sul, C – janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores e E – laboratório de aulas).....	34
Figura 4. 8- Evolução do número de mortes ao longo do tempo usando uma alimentação à base de <i>C. vulgaris</i> e fermento de padeiro (A – incubadora, B – mesa junto a janela voltada a sul, C – janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores e E – laboratório de aulas)..	34

Figura 4. 9- Evolução do número de dáfnias mortas no local A (incubadora) com os dois tipos de alimentação testados.	36
Figura 4. 10- Evolução do número de dáfnias mortas no local B (mesa junto a janela voltada a sul) com os dois tipos de alimentação testados.	36
Figura 4. 11- Evolução do número de dáfnias mortas no local C (janela orientada a sul) com os dois tipos de alimentação testados.	37
Figura 4. 12- Evolução do número de dáfnias mortas no local D (janela virada a sul com árvores) com os dois tipos de alimentação testados.	38
Figura 4. 13- Evolução do número de dáfnias mortas no local E (laboratório de aulas) com os dois tipos de alimentação testados.	38
Figura 4. 14- Evolução do número de dáfnias vivas ao longo do tempo nos novos locais selecionados (F – laboratório de microbiologia, B – mesa junto a janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores).	39
Figura 4. 15- Evolução do número de dáfnias mortas ao longo do tempo nos novos locais selecionados (F – laboratório de microbiologia, B – mesa junto a janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores).	40
Figura 4. 16- Evolução do número de dáfnias vivas e de mortes ao longo do tempo no local F.	40
Figura 4. 17- Evolução do número de dáfnias vivas e de mortes ao longo do tempo no local B.	41
Figura 4. 18- Evolução do número de dáfnias vivas e de mortes ao longo do tempo no local D.	41
Figura 4. 19- Copos com dáfnias no local D numa fase mais avançada do ensaio.	42
Figura 4. 20- Evolução do número global de dáfnias em estudo ao longo do tempo e das diferentes gerações produzidas a partir da dáfnia colocada no copo 4.	43
Figura 4. 21- Evolução do aparecimento de novos descendentes ao longo do tempo no ensaio relativo ao efluente com tratamento terciário de ultravioleta.	47
Figura 4. 22- Evolução do aparecimento de novos descendentes ao longo do tempo no ensaio relativo ao efluente com tratamento terciário de ultrafiltração.	48
Figura 4. 23- Resultados obtidos dos dois ensaios realizados com um controlo 1 (Eltemsah & Bøhn, 2019) e um controlo 2 (Barmiento et al., 2015) presentes na literatura.	49
Figura A. 1- Spirulina usada para alimentar as dáfnias na primeira fase de ensaios preliminares (Celeiro, 2023).	59

Figura C. 1- Composição do meio de cultura Elendt M4 (OECD, 2011). 72

Índice de tabelas

Tabela 2. 1- Hierarquia taxonómica da D. magna (ITIS, 2022).....	9
Tabela 3. 1- Composição do efluente secundário em comparação com os valores limite de emissão presentes no Decreto-Lei nº 152/97 de 19 de junho.	16
Tabela 3. 2- Composição das quatro soluções necessárias para a preparação do meio para crescimento das microalgas (CE, 2008).	19
Tabela 3. 3- Composição das soluções stock usadas para a preparação do meio Elendt M4. .	22
Tabela 3. 4- Informações referentes à preparação das soluções de vitaminas.	23
Tabela 3. 5- Dados e considerações gerais sobre a realização dos ensaios crónicos.	25
Tabela 4. 1- Percentagem de mortalidade das dáfnias ao fim de 24h e 48h.	26
Tabela 4. 2- Resultados obtidos no teste de toxicidade aguda relativo ao efluente secundário.	28
Tabela 4. 3- Resultados obtidos do teste de toxicidade aguda relativo ao efluente com tratamento terciário de ultravioleta.	28
Tabela 4. 4- Resultados obtidos no teste de toxicidade aguda relativo ao efluente com tratamento terciário de ultrafiltração.	29
Tabela 4. 5- Resultados obtidos no teste de toxicidade aguda relativo ao efluente com tratamento terciário de plasma não-térmico.	29
Tabela 4. 6- Resultados obtidos no teste de toxicidade aguda relativo ao efluente com tratamento terciário de ozonização.....	30
Tabela 4. 7- Primeiro grupo de descendentes da primeira geração no ensaio efetuado ao efluente tratado por radiação ultravioleta.	46
Tabela 4. 8- Primeiro grupo de descendentes da primeira geração no ensaio efetuado ao efluente tratado por ultrafiltração.	47
Tabela C. 1- Resultados obtidos do ensaio referente à alimentação das dáfnias nos locais A e B.	61
Tabela C. 2- Resultados obtidos do ensaio referente à alimentação das dáfnias nos locais C e D.	62
Tabela C. 3- Resultados obtidos do ensaio referente à alimentação das dáfnias no local E. ...	63
Tabela C. 4- Resultados obtidos da monitorização da 1ª geração de descendentes nos locais A e B no período entre 18 de janeiro e 10 de fevereiro de 2023.....	64

Tabela C. 5- Resultados obtidos da monitorização da 1ª geração de descendentes nos locais C, D e E no período entre 18 de janeiro e 10 de fevereiro de 2023.	65
Tabela C. 6- Resultados gerais obtidos do ensaio referente ao local no período entre 27 de fevereiro e 17 de março de 2023.	67
Tabela C. 7- Resultados gerais obtidos do ensaio referente ao local no período entre 20 de março e 8 de abril de 2023.	68
Tabela C. 8- Resultados obtidos da monitorização da 1ª geração de descendentes no local B no período entre 8 e 24 de março de 2023.	69
Tabela C. 9- Resultados obtidos da monitorização da 1ª geração de descendentes no local D no período entre 15 de março e 10 de abril de 2023.	70
Tabela C. 10- Resultados obtidos da monitorização da 1ª geração de descendentes no local F no período entre 8 de março e 3 de abril de 2023.	71
Tabela C. 11- Resultados gerais obtidos do ensaio referente ao local D no período entre 17 de abril e 13 de maio de 2023.	73
Tabela C. 12- Resultado da monitorização da 1ª geração de descendentes no período compreendido entre 21 de abril e 15 de maio no local D.....	74
Tabela C. 13- Resultado da monitorização da 2ª geração de descendentes da dáfnia colocada no copo 4 no período entre 3 e 15 de maio de 2023.....	74

Siglas e Abreviaturas

CBOx	Carência Bioquímica de Oxigénio
CQO	Carência Química de Oxigénio
DEQ	Departamento de Engenharia Química
EC ₅₀	Concentração estimada para imobilizar 50% das dáfnias dentro do período estipulado de exposição à substância de teste
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
GRAQ	Grupo de Reação e Análises Químicas
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
SST	Sólidos Suspensos Totais
UF	Ultrafiltração
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
UV	Ultravioleta

1. Enquadramento

A água é um dos recursos naturais mais valiosos do planeta, o que significa que a sua conservação é um pilar crucial para o desenvolvimento sustentável. Nas regiões em que a escassez de recursos hídricos é uma realidade comum e naquelas em que não só o crescimento demográfico, mas também as alterações climáticas perspetivam essa escassez, a gestão sustentável dos recursos hídricos torna urgente a conservação destes recursos, incluindo a sua reutilização (Albuquerque, 2010).

Com a industrialização e urbanização, a poluição dos meios aquáticos tem-se tornado um problema alarmante. A má gestão da água contaminada está associada a vários desequilíbrios ecológicos e até doenças transmitidas pela água (Murugesan et al., 2020). O consumo de água não segura não só prejudica a saúde humana, como leva a outras preocupações, nomeadamente a questão de os esgotos não tratados contaminarem as águas subterrâneas e superficiais utilizadas para consumo humano, irrigação, higiene pessoal e para fins domésticos. A contaminação química da água continua a representar um problema para a saúde, quer seja de origem natural, como o arsénico e o flúor, ou antropogénica, como o nitrato (WHO, 2023).

O tratamento de águas residuais urbanas em Portugal é regulado pelo Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de junho, aprovando as disposições aplicáveis à recolha, tratamento e descarga de águas residuais urbanas no meio aquático assim como a lista de identificação de zonas sensíveis e de zonas menos sensíveis para o território continental (APA, 2021).

1.1. Projeto FARMASENSE – Inovações na deteção e tratamento de fármacos em águas residuais

O projeto FARMASENSE tem por principal objetivo desenvolver uma metodologia analítica de deteção de fármacos em águas residuais suficientemente sensível e seletivo para a deteção e quantificação de fármacos geralmente presentes nas águas em quantidades vestigiais. Foi investigada a aplicação de um tratamento à base de plasma não-térmico como uma alternativa mais eficaz aos tratamentos de efluentes já praticados (Wedotech, 2023).

Este projeto é liderado pela WEDOTECH em parceria com a AST-Ambiente e o Instituto Superior de Engenharia do Porto.

1.2. Objetivos

O presente trabalho teve como principal objetivo a avaliação da ecotoxicidade de efluentes tratados, nomeadamente, um efluente secundário e quatro efluentes sujeitos a tratamentos terciários, entre os quais, radiação ultravioleta, ultrafiltração, ozonização e plasma não-térmico.

Para o efeito, foram realizados ensaios agudos e crónicos recorrendo a pequenos crustáceos zooplancónicos da espécie *Daphnia magna*. Para a realização destes ensaios, foram seguidos os procedimentos normativos presentes nas diretivas da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD, 2004, 2011, 2012, 2018)

1.3. Estrutura do relatório

O presente relatório encontra-se estruturado em 6 capítulos. O primeiro capítulo destina-se ao enquadramento do trabalho. O segundo, à introdução teórica do trabalho, onde são explorados os temas dos poluentes emergentes, os diferentes tratamentos estudados, a biologia e morfologia da *D. magna* e os fundamentos dos estudos de ecotoxicidade. O capítulo 3 pretende descrever os materiais e os métodos usados no desenvolvimento do trabalho. No capítulo 4, são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos ensaios efetuados. O capítulo 5 apresenta as principais conclusões a reter deste trabalho e, por fim, no capítulo 6, estão presentes as limitações do método usado para a determinação da ecotoxicidade dos efluentes em estudo e propostas para trabalho futuro.

2. Introdução

2.1. Poluentes emergentes: fármacos

Os poluentes emergentes podem ser entendidos como “qualquer substância química sintética ou natural ou qualquer microrganismo que não é normalmente monitorizado ou regulado no ambiente com efeitos ecológicos e de saúde humana potencialmente conhecidos ou suspeitos de efeitos adversos” (UNESCO, 2019). Estes contaminantes incluem essencialmente químicos encontrados em produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, pesticidas, produtos industriais e domésticos, metais, tensoativos, aditivos industriais e solventes. Muitos deles são utilizados e continuamente libertados no ambiente que, mesmo em quantidades muito baixas, podem causar toxicidade crónica, distúrbios endócrinos nos seres humanos e na vida selvagem aquática para além do desenvolvimento de resistência bacteriana patogénica.

Os poluentes emergentes representam um novo desafio global de qualidade da água com ameaças potencialmente graves para a saúde humana e para os ecossistemas. A água de boa qualidade é essencial para garantir o bem-estar humano, a subsistência e um ambiente saudável para o desenvolvimento sustentável.

O projeto, implementado no âmbito da Iniciativa Internacional UNESCO-IHP sobre a Qualidade da Água (IIWQ), tem como objetivo responder a esta necessidade urgente e apoiar os Estados-membros da UNESCO a reforçar as suas capacidades científicas, técnicas e políticas para gerir os riscos para a saúde humana e ambientais causados por estes poluentes. O reforço destas capacidades dos Estados-Membros visa ajudar a melhorar a qualidade da água e a gestão das águas residuais, incluindo a sua reutilização segura e aumentar a segurança da água e dos alimentos em geral (UNESCO, 2019).

Atualmente, os contaminantes emergentes têm recebido especial atenção por parte de organismos reguladores em todo o mundo devido à sua deteção nas águas. Os fármacos de uso humano estão incluídos na lista de contaminantes emergentes. A sua deteção e eliminação foram inclusive incorporados na Agenda para as metas de Desenvolvimento Sustentável para 2030 (Castillo-Zacarías et al., 2021; UNESCO, 2019).

O conhecimento científico e a compreensão dos potenciais riscos para a saúde humana e dos ecossistemas, provocados por estes poluentes emergentes é ainda muito escasso, assim

como a sua presença nos recursos hídricos e nas águas residuais, nos seus percursos e acumulação no ambiente. A maioria dos poluentes emergentes não está regulamentada nas normas ambientais de qualidade da água e de descarga de águas residuais. Assim, existe uma necessidade urgente de reforçar o conhecimento científico e adotar abordagens tecnológicas e políticas apropriadas para monitorizar os poluentes emergentes nos recursos hídricos e nas águas residuais, avaliar os seus potenciais riscos para a saúde humana e para o ambiente, prevenindo e controlando a sua eliminação para os recursos hídricos (UNESCO, 2019).

2.2. Tratamentos de águas

Existem pelo menos quatro etapas de tratamentos de águas: tratamento preliminar, primário, secundário e, por último, tratamento terciário. Numa primeira fase, as águas residuais são submetidas a processos de separação, como filtração, para remover resíduos de maiores dimensões. Seguidamente, estas águas passam por uma decantação primária, onde ficam retidas, por ação da gravidade, as partículas sólidas em suspensão. Numa terceira fase, as águas são submetidas a tratamentos biológicos, com bactérias digestoras, que digerem a matéria orgânica presente no efluente, passando de seguida pela decantação secundária, que leva ao depósito das lamas resultantes da ação bacteriológica. Por último, os efluentes sofrem tratamentos de desinfecção e remoção de nutrientes, isto é, as bactérias, os sólidos em suspensão, os nutrientes em excesso e compostos tóxicos específicos, são removidos. Após este tipo de tratamento, a água pode adquirir qualidade que permita ser utilizada na agricultura, na rega de espaços verdes, na lavagem de pavimentos e ruas, entre muitas outras (SIMDOURO, 2017).

Neste trabalho foram realizados testes de toxicidade em efluentes com tratamento secundário e quatro tipos de tratamentos terciários, entre os quais, desinfecção por radiação ultravioleta, ozonização e plasma não térmico e separação por ultrafiltração.

Radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) é a radiação eletromagnética de comprimento de onda compreendido entre 290 e 400 nm, correspondente à banda do espectro entre os raios X e a radiação visível. Ao penetrar nas células a radiação UV danifica o seu material genético, levando deste modo à eliminação ou inativação de microrganismos (Monte et al., 2016).

A desinfecção por radiação UV já é usada desde o início do século XX. A descoberta do potencial cancerígeno dos compostos organoclorados produzidos pela combinação de matéria orgânica com o cloro, levou à procura de uma alternativa com menor impacto. Desta forma a desinfecção por radiação UV ganhou popularidade, principalmente no domínio da desinfecção de águas residuais tratadas destinadas a reutilização.

A inativação pela radiação UV atinge a generalidade dos microrganismos patogénicos e a eficiência deste tipo de desinfecção depende da quantidade de radiação e do tempo de exposição, que é da ordem dos segundos (Monte et al., 2016)

Ozonização

A ozonização é o processo de desinfecção da água por adição de ozono e é o processo de desinfecção com custos mais elevados (Monte et al., 2016).

O ozono inativa os microrganismos por oxidação dos compostos que formam a sua membrana celular e o citoplasma e por destruição do seu ADN. A injeção de ozono na água dá origem à sua decomposição parcial em radicais OH^- , que são altamente reativos, mas não alteram a carga microbiana, em vez disso, reagem com compostos orgânicos e inorgânicos presentes na água. Assim, este processo proporciona a oxidação de poluentes presentes na água a níveis vestigiais, nomeadamente compostos não biodegradáveis, como pesticidas, corantes, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal.

A desinfecção por ozono é feita a jusante do tratamento secundário, sendo geralmente finalizado com filtração em areia ou em carvão ativado, de modo a reduzir a exigência de ozono originada por teores residuais de compostos orgânicos e inorgânicos (Monte et al., 2016).

Plasma não-térmico

Define-se por plasma não-térmico, um gás parcial ou totalmente ionizado onde a energia é armazenada principalmente nos eletrões livres e a temperatura permanece globalmente baixa. O plasma pode ser produzido a partir de descargas elétricas em gases, não só à pressão atmosférica, mas também a pressões mais baixas (Scholtz et al., 2015). A interação do plasma com a água produz diversas espécies reativas, entre as quais, OH^- , H^+ , O_3 , H_2O_2 , que emitem simultaneamente luz UV e geram ondas de choque, não implicando

investimentos em adição de produtos químicos dispendiosos e lâmpadas UV (Iervolino et al., 2019).

As principais aplicações do plasma não-térmico dizem respeito a tratamentos de águas, tratamentos de superfícies, processos de esterilização e desativação de microrganismos (Iervolino et al., 2019).

Ultrafiltração

A ultrafiltração (UF) é uma forma de tratamento de águas que recorre a um processo de membranas. Este tipo de processo começou a ser usado para desmineralizar e dessalinizar água, mas atualmente são aplicados na afinação de efluentes secundários e terciários (Monte et al., 2016).

Os processos de membranas utilizam uma membrana fina, que funciona como uma barreira física seletiva à passagem de alguns constituintes das águas residuais, opondo-se à passagem de outros. A seletividade da membrana permite separar um permeado, que corresponde à água tratada e um concentrado que contém os poluentes removidos.

O mecanismo que explica a seletividade das membranas de UF aos constituintes cuja passagem é permitida, resulta da combinação de uma ação de filtração com a de uma força motriz que separa as moléculas de água (Monte et al., 2016).

2.3. *Daphnia magna*

2.3.1. Morfologia e fisiologia

As dáfrias são pequenos crustáceos zooplantónicos (1 a 5 mm de comprimento) caracterizados por possuírem pernas achatadas semelhantes a folhas. Podem ser encontradas em pequenos charcos ou lagos. Estes crustáceos, alimentam-se de pequenas partículas em suspensão, que são recolhidas com a ajuda de um sistema semelhante a um aparelho de filtragem, constituído pelos filópodes, que são pernas com aspeto de folha que produzem uma corrente de água (Ebert, 2005).

À medida que a corrente flui, a *D. magna* capta as partículas que são transferidas nesse fluxo. Apesar de o seu sistema de filtragem ser altamente eficiente (ao ponto de até bactérias poderem ser captadas), estes organismos alimentam-se à base de algas planctónicas. As algas verdes estão entre os melhores alimentos para a *D. magna*. Geralmente, estes organismos

consomem partículas com diâmetros que vão entre 1 μm e 50 μm , apesar de, em indivíduos de maiores dimensões, já terem sido encontradas partículas com 70 μm de diâmetro.

Abaixo de uma determinada concentração de alimento no meio (nível limite incipiente), a absorção de alimento (taxa de alimentação) é proporcional à concentração do mesmo e, por sua vez, a taxa de filtração (quantidade de água filtrada por unidade de tempo) é máxima nestas condições. Acima desse nível, a taxa de filtração é constante uma vez que a capacidade de filtração tende a diminuir com o aumento da concentração de alimento na água (Ebert, 2005).

O tubo digestivo é constituído por três partes: o esófago, o intestino grosso e o delgado. Curiosamente, a cor da *D. magna* adapta-se à cor do seu alimento predominante, ou seja, organismos que se alimentam de algas verdes, são transparentes com uma tonalidade verde ou amarela, ao contrário dos que se alimentam de bactérias, que passam a ter uma tonalidade mais branca ou rosada. Organismos melhor alimentados tendem a ter uma tonalidade mais forte do que os organismos em privação de alimento.

A *D. magna* tem uma circulação sanguínea aberta e o coração é localizado na sua zona dorsal. A 20 °C, o coração bate cerca de 200 vezes por minuto, abrandando a temperaturas mais baixas (Ebert, 2005).

Na Figura 2.1, está presente a anatomia funcional da *D. magna*.

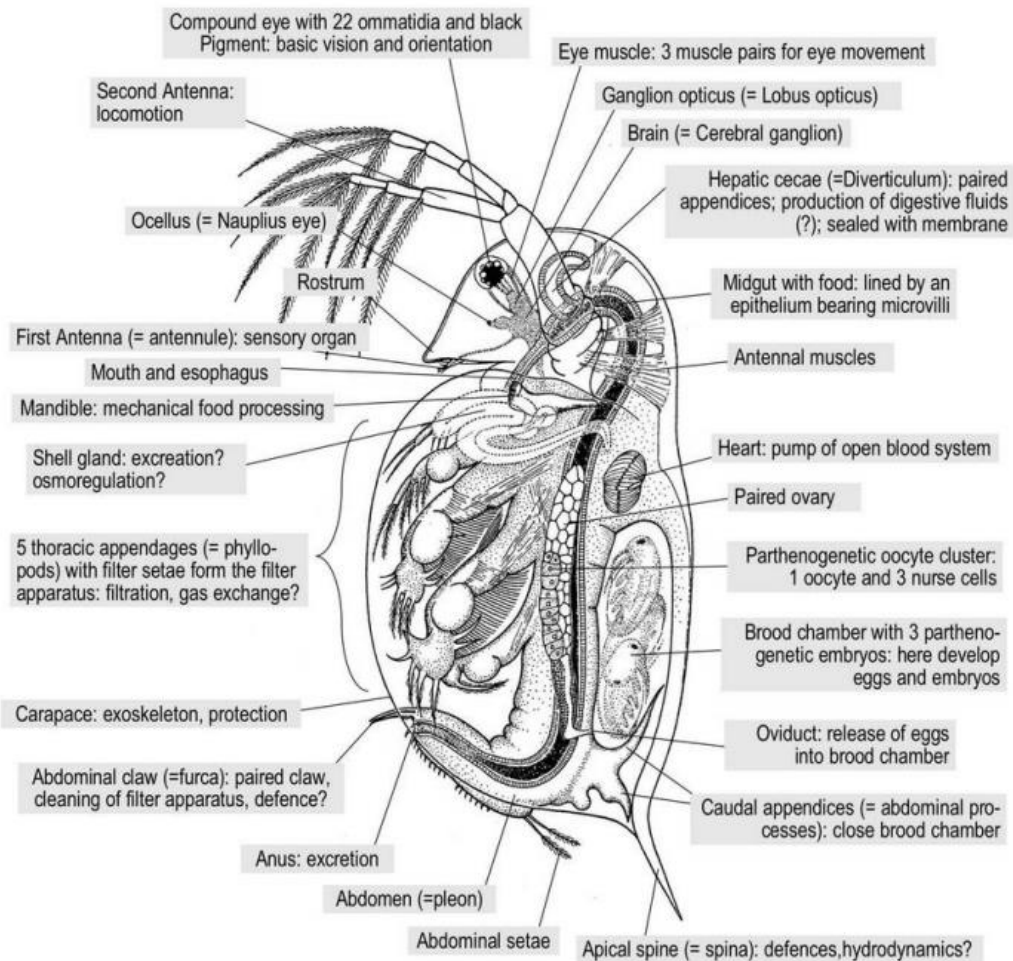


Figura 2. 1- Anatomia funcional da *D. magna* (Ebert, 2005).

A nível taxonómico, a *D. magna* pertence à classe Branchiopoda (ou Cladocera como aparece em alguma literatura), que é caracterizada por apresentar uma carapaça. Esta carapaça tem uma dupla parede, entre a qual flui a hemolinfa, sendo proeminentemente constituída por quitina (um polissacarídeo). Os organismos pertencentes a esta classe têm até 10 pares de apêndices que incluem antenas para nadar, maxilas e mandíbulas seguidas de 5 (como é o caso da *D. magna*) ou 6 membros no tronco. Os membros formam um aparelho para a alimentação e respiração (Ebert, 2005). A Tabela 2.1, apresenta a hierarquia taxonómica da *D. magna*.

Tabela 2. 1- Hierarquia taxonómica da *D. magna* (ITIS, 2022).

Hierarquia taxonómica	
Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Classe	Branchiopoda
Ordem	Diplostraca
Família	Daphniidae
Género	<i>Daphnia</i>
Espécie	<i>Daphnia magna</i>

O género *Daphnia* inclui mais de 100 espécies conhecidas de organismos zooplantónicos distribuídos por todas as partes do globo.

2.3.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida da *D. magna* durante a época de crescimento é caracterizado pelo seu modo de reprodução assexuada. A fêmea produz ovos partenogénicos a cada muda de adulto, se as condições de alimentação assim o permitirem. A uma temperatura de 20 °C, os embriões eclodem após cerca de 1 dia, mas permanecem dentro da dáfnia “mãe” por mais 3 dias para um maior desenvolvimento. Ao fim desse tempo, as dáfnias “filhas” são libertadas para o exterior (Ebert, 2005).

Em condições de alimentação favoráveis e a uma temperatura de 20 °C, por volta dos 5-10 dias de vida da *D. magna*, os ovos partenogénicos são depositados num género de câmara localizada na parte posterior da *D. magna* (Figura 2.2). Uma fêmea adulta pode produzir ovos deste tipo a cada 3 ou 4 dias até à sua morte. No laboratório, a esperança média de vida das fêmeas ronda os 2 meses.



Figura 2. 2- *D. magna* com ovos partenogénicos (Ebert, 2005).

Apesar de numa altura típica de crescimento, a *D. magna* produzir ovos diplóides (2N) que se desenvolvem diretamente, sem um período de descanso, podem também ser gerados ovos diferentes, produzidos para épocas de crescimento reduzido ou de condições ambientais adversas. Estes ovos são encapsulados numa estrutura protetora chamada *ephippia*. Na grande parte dos casos, estes ovos são produzidos sexualmente. Na maioria das dáfrias sexuais (com partenogénese cíclica), após produção de ovos em repouso, segue-se a produção assexuada de machos diploides que são necessários para fertilizar os ovos haploides. Um clone sexual tem a capacidade de produzir machos e fêmeas e é capaz de desempenhar uma auto-fertilização. Dos ovos produzidos para épocas de descanso (*ephippia*), apenas as fêmeas eclodem para dar continuidade a um ciclo de reprodução assexuada em condições favoráveis de crescimento (Ebert, 2005). A Figura 2.3 representa esquematicamente o ciclo reprodutivo da *D. magna*.

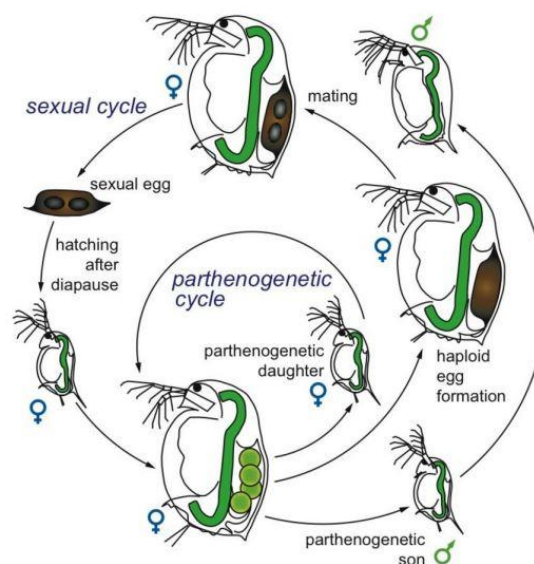


Figura 2. 3- Ciclo de vida *D. magna* (Ebert, 2005).

2.3.3. Habitat da *D. magna*

A *D. magna* é geralmente encontrada em águas doces estagnadas, que vão desde pequenas piscinas a grandes lagos. Apesar de poderem colonizar lagos de água salgada ou estuários, não é comum colonizarem água do mar.

Estes crustáceos são frequentemente uma espécie chave em charcos e lagos, onde são o principal consumidor primário, filtrando pequenas partículas em suspensão, em particular, algas unicelulares. Como tal, desempenham um papel importante nas cadeias alimentares aquáticas, uma vez que elas próprias são predadas por peixes de maior dimensão ou por diversos predadores invertebrados (Ebert, 2022).

Mesmo dentro das diferentes espécies de *Daphnia*, a variação dos habitats ocupados pode ser considerável. As populações destes crustáceos têm sido tradicionalmente subdivididas em três tipos: populações intermitentes de charcos com frequentes extinções da população ativa e renovação da população através dos ovos dormentes, populações permanentes de charcos, que são mais estáveis, em que se assume que se reproduzem sexualmente de forma esporádica e populações de lagos (Vanoverbeke et al., 2007). A diferença entre estes três tipos de habitat pode ser expressa em termos de duração da fase partenogénica e da dimensão do habitat.

2.4. Testes de toxicidade

Na sua definição, toxicologia é o estudo dos efeitos adversos de produtos químicos sobre organismos vivos. Passa pela examinação da natureza desses efeitos e avaliação da sua probabilidade de ocorrência (Eaton & Gilbert, 2022).

A toxicologia moderna vai além da sua definição técnica e assimila conhecimentos da maioria dos ramos da bioquímica, química, genética, farmacologia, medicina, entre outras, e aplica conceitos sobre avaliação de risco. Em todos os ramos da toxicologia, são explorados mecanismos pelos quais as substâncias químicas produzem efeitos adversos nos sistemas biológicos (Gallo, 2022).

A toxicologia como hoje é entendida, começou com o aparecimento dos anestésicos e desinfetantes no final da década de 1850. O uso prevalente de medicamentos “patenteados” levou a inúmeros incidentes de envenenamento que, quando associados à resposta à exposição

de certas embalagens de carne, culminaram na aprovação da primeira de muitas leis americanas sobre comida livre de tóxicos e medicamentos (Gallo, 2022).

Durante a década de 1890 e início do século XX, a descoberta da radioatividade e das vitaminas, levou à utilização dos primeiros bioensaios em grande escala (estudos múltiplos com animais) para determinar se estas “novas” substâncias químicas seriam benéficas ou prejudiciais para os animais de laboratório (Gallo, 2022).

A toxicologia ambiental foca-se no impacto de poluentes químicos no ambiente e nos organismos biológicos. Estuda especificamente os impactos de químicos em peixes, aves, animais terrestres e plantas. A ecotoxicologia é uma área específica, que se foca fundamentalmente nos impactos das substâncias tóxicas nas populações dinâmicas de um ecossistema.

O âmbito dos testes de toxicologia aquática é vasto. Existem milhões de espécies relevantes que poderiam ser expostas aos mais variados tipos de poluentes de água doce existentes para avaliar os seus efeitos nos ecossistemas aquáticos. Para evitar a tarefa impossível de tentar escolher o organismo mais adequado para determinado teste toxicológico, a OCDE delineou um conjunto de testes sobre um subconjunto de organismos para avaliar a ecotoxicologia. Para os sistemas aquáticos, estes testes são realizados em espécies representativas de três níveis tróficos: produtores primários (algas), consumidores primários (*Daphnia*) e consumidores secundários (peixes e anfíbios) (White, 2013).

2.4.1. *D. magna* em ensaios de toxicidade

A *D. magna* é um dos organismos mais largamente utilizados para averiguar a toxicidade de uma vasta gama de fármacos, entre os quais, antibióticos, antidepressivos, anti-inflamatórios, entre muitos outros. Estes organismos são usados em testes de ecotoxicidade aquática devido à sua elevada sensibilidade a tóxicos e a sua forma de reprodução assexuada (Baird et al., 1989). Atualmente, os testes de toxicidade com dáfnias baseiam-se na imobilização ou morte dos organismos, normalizados pela OCDE, os ensaios agudos e crónicos são os testes toxicológicos mais usados (Tkaczyk et al., 2021).

Nos ensaios agudos (teste de imobilização), as dáfnias com menos de 24 h no início do teste, são expostas à substância de teste, numa gama de concentrações crescentes, durante um período de 48 h. A imobilização (ou morte) é registada ao fim de 24 h e de 48 h e comparado

com o controlo. Os resultados são analisados com o objetivo de calcular o EC₅₀ (concentração estimada para imobilizar 50% das dáfrias dentro do período estipulado de exposição à substância de teste) às 24 e às 48 horas de teste. Por imobilização, entende-se que os organismos não têm capacidade de nadar durante 15 segundos depois de agitação suave da placa de teste (OECD, 2004).

Para garantir a fiabilidade dos testes agudos, é recomendado ensaiar uma substância teste (no caso do presente trabalho, dicromato de potássio). Os testes são considerados válidos se, no controlo, menos de 10% das dáfrias são imobilizadas ou mortas até ao final do teste (OECD, 2004).

Relativamente aos ensaios crónicos, o seu objetivo primário é averiguar o efeito de químicos na capacidade reprodutiva da *D. magna*. Para esse efeito, as dáfrias com menos de 24 h de idade no início do ensaio, são expostas à substância de teste numa gama de concentrações. O ensaio tem uma duração de 21 dias. No final do teste, é avaliado o número total de descendentes vivos produzidos. O produto da reprodução dos progenitores (dáfrias femininas) pode ser expressa de outras formas (nomeadamente, o número de descendência viva produzida por organismo por dia desde o primeiro dia de descendência) mas estes números devem ser reportados em adição ao número total de descendentes vivos produzidos até ao final do teste (OECD, 2012).

Devido à particularidade deste teste comparado com outros estabelecidos nas diretrizes da OCDE, é também possível contar o número de descendentes vivos por cada progenitor. Quando a mortalidade dos organismos não segue um padrão de reposta à concentração, as réplicas com mortalidade parental devem ser excluídas da análise do resultado do teste. Caso contrário, se a mortalidade seguir uma resposta padrão, a mortalidade dos progenitores deve ser atribuída ao efeito da substância em estudo e os replicados não devem ser excluídos da análise.

Os resultados dos ensaios agudos, são úteis para averiguar a gama de concentrações mais adequada para a realização dos ensaios crónicos. Para validar o ensaio crónico, a mortalidade dos progenitores não deve exceder 20% no final do teste e o número médio de descendentes vivos de um único progenitor no final do teste deve ser igual ou superior a 60 (OECD, 2012).

3. Materiais e métodos

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos usados para a realização dos ensaios para a determinação da toxicidade de efluentes usando *D. magna* (Brunelli, 2020).

3.1. Materiais

Para a realização deste trabalho experimental, foi utilizado um kit *Daphtoxkit F*. Assim, foi necessário:

1. Cinco tubos de plástico de 1 mL com *ephippias* (o número de organismos presente em cada frasco, é suficiente para a realização de um ensaio agudo completo);
2. Cinco tubos de espirulina em pó para pré-alimentar os organismos de teste;
3. Cinco placas de Petri para a eclosão das *ephippias*;
4. Cinco placas de ensaio compostas por 6 poços de lavagem e 24 poços para as diluições das amostras de águas tratadas;
5. Peneira de malha fina para o enxaguamento das *ephippias*;
6. Material corrente de laboratório;
7. Soluções concentradas de sais para a preparação do meio (água doce padrão):
 - NaHCO_3 (2,71 g/L)
 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,76 g/L)
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,93 g/L)
 - KCl (0,23 g/L)

3.2. Equipamentos

- Câmara incubadora com luz e temperatura controlada (Binder, KBWF 240, USA)
- Centrífuga (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R)
- Balança analítica (Kern, ACJ-200-4M)
- Câmara de fluxo laminar (Faster Two 30)

3.3. Preparação do meio

Foi preparada uma água doce padrão, que foi utilizada como meio tanto para a incubação das *ephippias* como para a preparação da série de diluições das águas testadas (Brunelli, 2020).

Para a preparação de 2 L de meio, procedeu-se do seguinte modo:

1. Num balão volumétrico de 2000 mL, colocar 50 mL de cada uma das soluções concentradas de sais (concentração dos sais em 2000 mL de meio: NaHCO_3 – 67,75 mg/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 294 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 123,25 mg/L; KCl – 5,75 mg/L);
2. Preencher o volume com água desionizada e homogeneizar a solução;
3. Armazenar a solução em frascos devidamente identificados, no frigorífico.

3.4. Eclosão das *ephippias*

A eclosão das *ephippias* deve ser iniciada 3 dias antes do início dos testes de toxicidade e procede-se do seguinte modo:

1. Transferir as *ephippias* para uma peneira de malha fina;
2. Lavar com água da torneira para eliminar todos os vestígios do meio em que estavam armazenadas;
3. Transferir as *ephippias* para uma placa de Petri com 25 mL de meio;
4. Tapar a placa de Petri e incubar durante 72 h a 80 h, a 20 °C sob iluminação contínua.

3.5. Pré-alimentação das dáfnias

1. Preencher o frasco de spirulina em pó com meio;
2. Homogeneizar o conteúdo do frasco;
3. Colocar a suspensão de spirulina na placa de Petri 2 h antes da realização dos testes agudos;
4. Agitar cuidadosamente o conteúdo da placa de Petri de forma a distribuir o alimento uniformemente.

3.6. Características das águas de teste

Na Tabela 3.1, está presente a composição do efluente secundário em comparação com os valores limite estipulados no Decreto-Lei nº 152/97 de 19 de junho de 1997 (Diário da República, 1997). Os valores apresentados no referido decreto, estão afetos a uma ETAR que sirva uma população superior a 100 000 habitantes equivalentes. Estes parâmetros foram determinados no dia 26 de maio de 2022 por parte da ETAR em questão.

Tabela 3. 1- Composição do efluente secundário em comparação com os valores limite de emissão presentes no Decreto-Lei nº 152/97 de 19 de junho.

	Valor medido	Valor limite de emissão	Unidades
CQO	47	125	mg/L O ₂
CBO5	11	25	mg/L O ₂
Azoto total	50	10	mg/L N
Fósforo	2,3	1	mg/L P
pH	7,52	-	-
Temperatura	23	-	°C
Condutividade	2172	-	µS/cm
SST	16	-	mg/L

3.7. Testes de toxicidade aguda

No presente trabalho, foram analisados 5 efluentes diferentes, sendo eles, um efluente secundário e quatro efluentes que sofreram tratamentos terciários: desinfecção por ultravioleta, ozonização, plasma não-térmico e separação por ultrafiltração.

Os testes de toxicidade aguda baseiam-se na avaliação da mortalidade dos organismos de teste quando expostos a um ambiente tóxico, em diferentes concentrações, durante 48 h. O objetivo desta avaliação passa pela determinação do EC₅₀, isto é, a concentração estimada capaz de imobilizar (ou matar) 50% das dáfnias dentro do período de exposição especificado.

Preparação das diluições das amostras – teste do dicromato de potássio

Como forma de verificar a execução correta do procedimento e a sensibilidade das dáfnias, é aconselhado executar um teste de referência, neste caso, foi realizado o teste com dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), usando uma série de diluições entre 0,32 e 3,2 mg/L. As concentrações das soluções usadas foram as que se apresentam:

- C1 = 0,32 mg/L
- C2 = 0,56 mg/L
- C3 = 1,0 mg/L
- C4 = 1,8 mg/L

- $C5 = 3,2 \text{ mg/L}$

As soluções foram preparadas da seguinte forma:

1. Preparou-se uma solução mãe de dicromato de potássio, de concentração 523 mg/L. Pesaram-se 26,15 mg de reagente que foram dissolvidos em 50,00 mL.
2. A partir da solução mãe, foram preparadas as soluções C4 e C5, em balões volumétricos de 100 mL.
3. As soluções C1 a C3, foram preparadas a partir da solução C5, em balões volumétricos de 50 mL.

Para esta preparação, o dicromato de potássio foi seco na estufa a 80 °C, 24h antes da realização do teste. É de notar que as diluições foram feitas com o meio preparado para as dáfnias.

Preparação das diluições das amostras – águas teste

Para os efluentes, foi preparada uma série de diluições entre 30% e 100%. Todas as soluções foram preparadas com meio, em balões de 50 mL. As diluições usadas foram as que se apresentam:

- $C1 = 30\%$
- $C2 = 45\%$
- $C3 = 60\%$
- $C4 = 75\%$
- $C5 = 100\%$

Preenchimento da placa de teste

A placa de teste é constituída por 5 colunas e 6 linhas (Figura 3.1). Cada linha é composta por 5 células. A primeira célula de cada linha, é destinada à lavagem das dáfnias e as restantes são réplicas para cada concentração testada.

Para preencher a placa de teste, transferiram-se 10 mL de meio para cada célula da primeira linha (linha de controlo) e 10 mL das soluções teste para cada célula das restantes linhas, numa sequência de concentrações crescente.

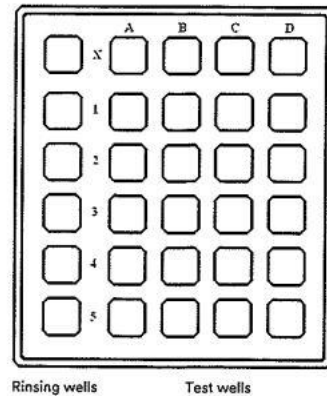


Figura 3. 1- Esquema da placa de teste usada nos testes de toxicidade aguda.

Transferência das dáfrias para a placa de teste

O processo de transferência das dáfrias para a placa de teste foi realizado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e é composto por dois passos. Primeiramente, retiram-se dáfrias claramente ativas e pré-alimentadas da caixa de Petri e colocam-se, cuidadosamente, nas células de lavagem. De seguida, transferem-se as dáfrias da célula de lavagem para as seguintes. Por cada célula da placa de teste, foram colocadas 5 dáfrias (perfazendo um total de 20 organismos por linha).

Este processo deve ser realizado com algum cuidado e atenção, de forma a não causar danos aos organismos de teste.

3.8. Cultura da *Chlorella vulgaris*

Numa determinada fase do trabalho, a alimentação das dáfrias foi feita recorrendo a *C. vulgaris*, pelo que foi necessário proceder à sua cultura no laboratório.

A cultura foi mantida em dois balões de fundo redondo de 2 L sob iluminação e arejamento constante (Figura 3.2). Aproximadamente a cada duas semanas, foi renovado cerca de um quarto do meio de cultura, adicionando água esterilizada e nutrientes. Na Tabela 3.2, está presente a composição de cada uma das soluções de reserva de nutrientes a serem adicionadas ao meio de cultura das microalgas (CE, 2008).

Tabela 3. 2- Composição das quatro soluções necessárias para a preparação do meio para crescimento das microalgas (CE, 2008).

Nutrientes	Concentração na solução de reserva	Concentração final na solução de ensaio
Solução de reserva n.º 1: macro-nutrientes		
NH ₄ Cl	1,5 g/l	15 mg/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2 g/l	12 mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,8 g/l	18 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g/l	15 mg/l
KH ₂ PO ₄	0,16 g/l	1,6 mg/l
Solução de reserva n.º 2:		
FeCl ₃ .6H ₂ O	80 mg/l	0,08 mg/l
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	100 mg/l	0,1 mg/l
Solução de reserva n.º 3: micro-nutrientes		
H ₃ BO ₃	185mg/l	0,185 mg/l
MnCl ₂ .4H ₂ O	415 mg/l	0,415 mg/l
ZnCl ₂	3 mg/l	3 x 10 ⁻³ mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,5 mg/l	1,5 x 10 ⁻³ mg/l
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,01 mg/l	10 ⁻⁵ mg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7 mg/l	7 x 10 ⁻³ mg/l
Solução de reserva n.º 4: NaHCO₃		
NaHCO ₃	50 g/l	50 mg/l



Figura 3. 2- Cultura de *C. vulgaris*.

Por cada litro de meio, foram adicionados 10 mL da solução de reserva n.º 1 e 1 mL das soluções de reserva n.º 2 a n.º 4. As soluções de reserva são esterilizadas por filtração através de membrana ou por tratamento em autoclave e devem ser armazenadas no escuro à

temperatura de 4 °C. A solução de reserva nº 4 deve ser esterilizada apenas por filtração através de membrana.

O procedimento de adição de nutrientes deve ser feito no interior de uma câmara de fluxo laminar para garantir condições assépticas.

3.9. Testes preliminares – local e alimentação

Antes de dar início aos ensaios crónicos, foram realizados testes preliminares para determinar qual o local e a alimentação mais adequados para garantir a validade dos ensaios. Numa primeira fase, foi testada a alimentação mais adequada para as dáfnias. Estes ensaios foram executados somente dentro da estufa incubadora, tendo-se dividido em duas fases: inicialmente foi testada a alimentação recorrendo a uma solução de spirulina em pó (Anexo A) e, numa fase posterior, as dáfnias foram alimentadas com uma suspensão de *C. vulgaris*.

Foram definidos outros parâmetros, nomeadamente, a seleção de diversos locais e dois tipos de alimentação diferentes para determinar quais as condições mais favoráveis à manutenção de uma cultura viável. Foram selecionados cinco locais distintos, entre os quais o local A (incubadora), B (mesa próxima de uma janela com orientação sudeste sem luz solar direta nas horas de maior calor), C (parapeito de uma janela com orientação sul com exposição solar direta), D (parapeito de uma janela também orientada para sul mas protegida pela folhagem de árvores existentes na zona exterior) e E (laboratório de aulas do Departamento de Engenharia Química virado a sul) (Figuras 3.3 a 3.7). Foi testada a alimentação com uma suspensão de *C. vulgaris* e outra alimentação com *C. vulgaris* e um complemento de uma solução de fermento de padeiro (Heckmann & Connon, 2007).

Foram criados dois grupos para testar a alimentação: um grupo de dáfnias alimentadas somente com *C. vulgaris*, e outro grupo alimentado com *C. vulgaris* e 0,5 mL de uma solução de fermento de padeiro (Heckmann & Connon, 2007) (Anexo B).



Figura 3. 3- Local A: incubadora.



Figura 3. 4- Local B: mesa junto de janela virada a sul.



Figura 3. 5- Local C: janela virada a sul sem proteção da folhagem das árvores.



Figura 3. 6- Local D: janela virada a sul com proteção da folhagem das árvores.



Figura 3. 7- Local E: laboratório de aulas do DEQ.

Os ensaios foram expandidos para uma segunda fase de testes, nos locais B, D e um novo local, o laboratório de microbiologia onde decorreram os trabalhos (Figura 3.8) ao qual se atribuiu a letra F, mantendo a alimentação com *C. vulgaris* e fermento de padeiro. O local F conta com temperatura controlada de 21 °C e, na ausência da existência de uma janela próxima, foi usada uma lâmpada com temporizador para garantir 8 horas de escuro e 16 horas de luz.



Figura 3. 8- Local F: laboratório de microbiologia do GRAQ.

Com base nos ensaios anteriores, foi selecionado o local D como sendo o mais viável. No entanto, apesar dos esforços, não foi possível a realização de um ensaio controlo adequado. Nesse seguimento, foi decidido alterar a composição do meio de cultura para um mais completo descrito na literatura (Elendt M4) (OECD, 2011; Samel et al., 1999) o qual contém a composição presente na Tabela 3.3. Informações mais detalhadas relativas a este meio estão presentes no Anexo C3.

Tabela 3. 3- Composição das soluções stock usadas para a preparação do meio Elendt M4.

Composto	Concentração (mg/L)	Concentração no meio (mg/L)	mL/L
NaHCO ₃	2,710	293,8	25,00
KCl	0,230	123,3	25,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	11,76	5,750	25,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	4,930	67,75	25,00
NaSiO ₃ .9H ₂ O	1000	10,00	10,00
NaNO ₃	137,5	0,2740	1,00
KH ₂ PO ₄	140,0	0,1400	0,50
K ₂ HPO ₄	184,0	0,1840	0,50
Tiamina	750	0,075	0,10
B12	10	0,001	
Biotina	7,5	0,00075	

A solução de vitaminas (Timina, B12 e Biotina) foi preparada a partir de uma “solução mãe”, que foi posteriormente diluída 4 vezes. Na Tabela 3.4, estão presentes as quantidades pesadas de cada vitamina, a concentração da solução “mãe” e da solução stock. Esta última foi armazenada no congelador em alíquotas de 1 mL.

Tabela 3. 4- Informações referentes à preparação das soluções de vitaminas.

	Massa a pesar (mg)	Solução “mãe”		Solução stock	
		Volume final (mL)	Concentração (mg/L)	Volume final (mL)	Concentração (mg/L)
Tiamina	300	100,00	3 000	100,00	750
B12	4	100,00	40	100,00	10
Biotina	3	100,00	30	100,00	7,5

Neste último ensaio, não foi usado fermento de padeiro uma vez que, como foram solicitadas novas dáfrias a um laboratório externo, o objetivo deste ensaio foi manter as condições de cultura o mais próximo possível das condições de origem.

3.10. Ensaio Crónicos

O principal objetivo da realização de ensaios crónicos foi avaliar o efeito de químicos ou poluentes na capacidade reprodutiva das dáfrias. Para isso, dáfrias com menos de 24 horas de idade no início do ensaio foram expostas à substância de teste, durante cerca de 30 dias. Durante o ensaio, foram contabilizados todos os descendentes vivos produzidos (OECD, 2012). No arranque dos ensaios, contou-se com 20 dáfrias com menos de 24 horas de idade, as quais foram divididas em dois grupos de 10 indivíduos, um grupo de controlo e outro grupo de teste.

Foram usados copos para manter as dáfrias em cultura durante os ensaios e, a cada nova geração, as dáfrias foram distribuídas por copos individuais para monitorizar o número de descendentes produzidos por cada uma. A alimentação das dáfrias e a renovação do meio de cultura foram efetuadas todas as segundas, quartas e sextas-feiras.

A título explanatório, na Figura 3.9, está presente um esquema da numeração feita para monitorizar o avanço das gerações de dáfias ao longo do tempo, onde o copo A contém a geração zero, que corresponde à dáfia reprodutora, o copo A.1 contém os seus primeiros descendentes (primeira geração), o copo A.1.1 contém a segunda geração de descendentes e assim sucessivamente.

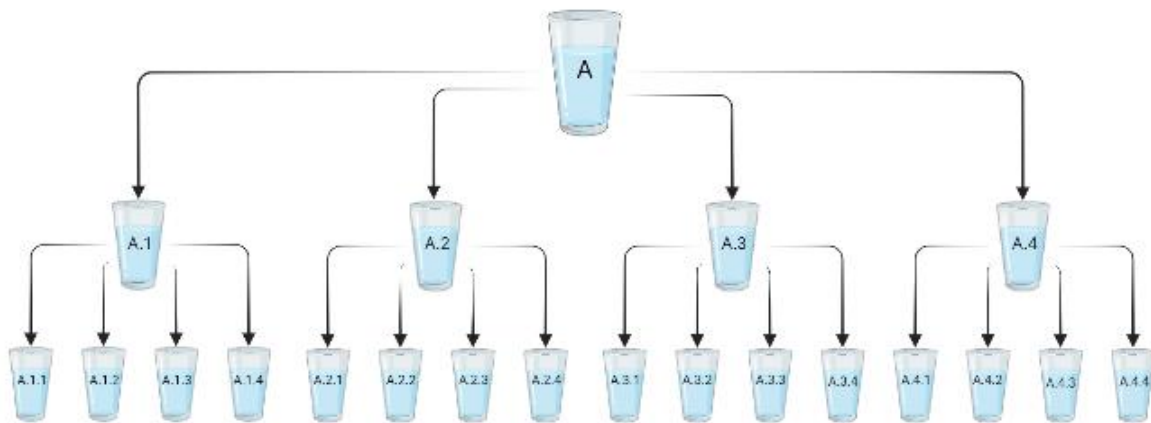


Figura 3. 9- Esquema ilustrativo da numeração dos copos de acordo com as gerações de dáfias.

Foram realizados ensaios crónicos aos efluentes sujeitos a tratamento com radiação UV e UF (Tabela 3.5). Não foram realizados ensaios ao efluente secundário por falta de disponibilidade de amostra suficiente para o efeito. Em relação ao efluente com tratamento de plasma não-térmico, não houve dáfias suficientes para dar início ao ensaio a tempo. Relativamente ao efluente tratado por ozonização, não foi considerado relevante a necessidade da realização do ensaio crónico, uma vez que o ensaio agudo indicou logo uma toxicidade excessiva da amostra.

Em relação ao controlo, foram iniciados diversos controlos durante o decorrer dos ensaios aos efluentes, no entanto, por motivos desconhecidos, não foi possível realizar um ensaio de controlo até ao fim, ou porque as progenitoras morriam antes de produzirem a 1ª geração, ou então porque a 1ª geração produzida não gerou mais descendentes. Posto isto, recorreu-se a dados recolhidos da literatura para analisar o comportamento dos resultados obtidos dos restantes dois ensaios (Eltemsah & Bøhn, 2019).

Tabela 3. 5- Dados e considerações gerais sobre a realização dos ensaios crónicos.

Água de teste	Início do ensaio	Fim do ensaio	Considerações
Ultravioleta	17 de maio de 2023	16 de junho de 2023	-
Ultrafiltração	9 de junho de 2023	5 de julho de 2023	-
Ozonização	-	-	O efluente revelou ser o mais tóxico nos ensaios agudos, pelo que não foi realizado o ensaio crónico a este efluente.
Plasma não-térmico	-	-	Não foi obtido o número mínimo de dáfias (10) para dar início ao ensaio.
Efluente secundário	-	-	Não houve disponibilidade de amostra suficiente para realizar o ensaio crónico a este efluente.

Verificou-se uma falta de quantidade de amostra suficiente para realizar os ensaios exatamente como proposto na norma (OECD, 2012), onde está especificado que as dáfias devem ser separadas por copos individuais (com 50 mL) como forma de monitorizar o seu comportamento reprodutivo ao pormenor, assim, os ensaios foram realizados da seguinte forma:

- Os ensaios foram iniciados com 10 dáfias com menos de 24 horas de idade, separadas por copos individuais;
- Na 1^a geração de descendentes, foram separadas, em média, 2 dáfias por copo;
- Na 2^a geração, foi contabilizado o número de descendentes total, o qual foi dividido pelo número de progenitoras presentes por copo;
- Para a 3^a geração, procedeu-se da mesma forma.

Para além desta alteração ao procedimento normativo, foi testado o efluente a 75% e não a 100% como forma de prolongar a disponibilidade de amostra por tempo suficiente para alcançar 3 gerações de descendentes.

4. Resultados

4.1. Testes de Toxicidade Aguda – Teste do Dicromato

Da realização dos testes agudos com o dicromato de potássio obtiveram-se os valores da Tabela 4.1, que correspondem aos resultados ao fim de 24 h e 48 h de exposição às soluções de dicromato.

Tabela 4. 1- Percentagem de mortalidade das dáfias ao fim de 24 h e 48 h.

	24 h				48 h			
	% mortalidade				% mortalidade			
Controlo	0	0	0	0	0	0	0	0
0,32	0	0	0	0	0	0	0	0
0,56	0	0	0	0	20	0	0	40
1,0	20	60	100	80	60	100	100	100
1,8	100	80	80	100	100	100	80	100
3,2	100	100	100	100	100	100	100	100

Da informação detida na tabela, verifica-se uma mortalidade acentuada ao fim das primeiras 24 h do teste nas linhas correspondentes às concentrações mais elevadas. Ao fim de 48 h, não se registou qualquer mortalidade nem no controlo nem na linha da concentração de 0,32 mg/L. A partir da concentração de 1,0 mg/L registou-se a morte de praticamente todos os organismos de teste.

Partindo destes resultados, foi possível traçar a curva que permite calcular o EC₅₀ (que corresponde à concentração estimada capaz de imobilizar 50% das dáfias em 24 h e 48 h de exposição às soluções de dicromato de potássio). Os gráficos obtidos com recurso ao programa “GraphPad Prism”, encontram-se nas Figuras 4.1 e 4.2.

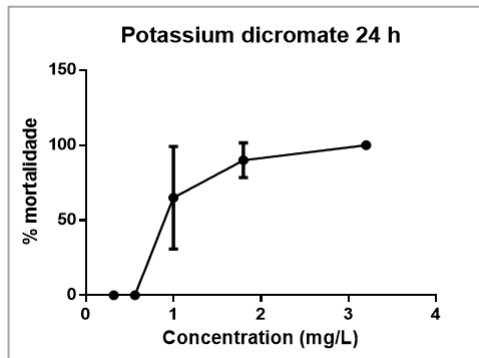


Figura 4. 1- Curva de mortalidade ao fim de 24h.

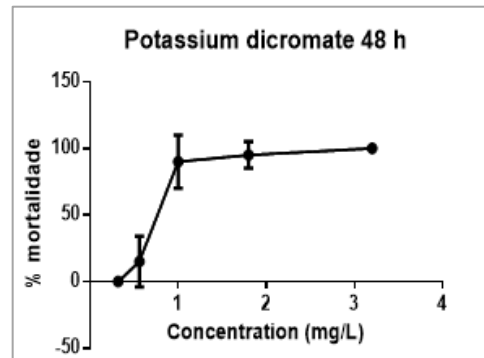


Figura 4. 2- Curva de mortalidade ao fim de 48h.

Das curvas apresentadas, obteve-se um EC_{50} de 0,898 mg/L ao fim de 24 horas e 0,766 mg/L ao fim de 48 horas. De acordo com a ISO 6341:2012 (ISO, 2012), a gama de aceitabilidade para o EC_{50} ao fim de 24 horas é de 0,6 a 2,1 mg/L. Assim, comparando a concentração obtida de EC_{50} ao fim das primeiras 24 horas com a gama de valores impostos pela norma, nota-se que o valor obtido, encontra-se dentro dos valores estabelecidos, viabilizando desta forma o ensaio realizado.

4.2. Testes de Toxicidade Aguda – Águas de Teste

Neste subcapítulo, estão apresentados os resultados obtidos para a determinação da toxicidade aguda nas águas de teste, sendo elas um efluente secundário e quatro efluentes que sofreram tratamentos terciários distintos: ultravioleta, ultrafiltração, plasma não-térmico e ozonização.

Com base na composição do efluente secundário descrita na Tabela 3.1., é de realçar que os valores de azoto total e fósforo (correspondentes a micronutrientes) encontram-se acima do valor limite estabelecido no referido Decreto-Lei. Este facto pode ter sido um fator a ter em consideração aquando da análise dos resultados. Os restantes parâmetros encontram-se de acordo com o valor limite de emissão legislado. Na Tabela 4.2, estão presentes as percentagens de mortalidade obtidas no teste relativo ao efluente secundário.

Tabela 4. 2- Resultados obtidos no teste de toxicidade aguda relativo ao efluente secundário.

24 h					48 h			
	% mortalidade				% mortalidade			
Controlo	0	0	0	0	0	0	0	0
30%	0	0	0	0	0	20	0	0
45%	0	0	0	0	0	0	0	0
60%	0	0	0	20	0	0	0	20
75%	0	0	0	0	0	0	0	0
100%	0	20	0	0	0	20	0	0

Destes resultados, concluiu-se que a mortalidade das dáfnias não foi significativa, não tendo sido possível calcular o EC₅₀. Não houve mortes no controlo, o que reitera a validade do teste.

Nas Tabelas 4.3 a 4.6, estão descritos os resultados obtidos nos testes realizados aos efluentes com tratamentos terciários, UV, UF, plasma não-térmico e ozonização, respetivamente.

Tabela 4. 3- Resultados obtidos do teste de toxicidade aguda relativo ao efluente com tratamento terciário de ultravioleta.

24 h					48 h			
	% mortalidade				% mortalidade			
Controlo	0	0	0	0	0	0	0	0
30%	0	0	0	0	0	0	0	0
45%	0	0	0	0	0	0	0	0
60%	0	0	0	0	0	0	16,7	0
75%	0	0	0	0	0	0	0	0
100%	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 4. 4- Resultados obtidos no teste de toxicidade aguda relativo ao efluente com tratamento terciário de ultrafiltração.

24 h					48 h			
	% mortalidade				% mortalidade			
Controlo	0	0	0	0	0	0	0	0
30%	0	0	0	0	0	0	0	0
45%	0	0	0	0	0	0	0	0
60%	0	0	0	0	0	0	0	0
75%	0	0	0	0	0	0	16,7	0
100%	0	0	0	0	20	0	20	20

Tabela 4. 5- Resultados obtidos no teste de toxicidade aguda relativo ao efluente com tratamento terciário de plasma não-térmico.

24 h					48 h			
	% mortalidade				% mortalidade			
Controlo	0	0	0	0	0	0	0	0
30%	0	0	0	0	0	0	0	0
45%	0	0	0	0	0	20	0	0
60%	0	0	0	0	0	0	0	0
75%	0	0	0	0	0	0	0	0
100%	0	0	0	0	0	0	20	0

À semelhança do teste de toxicidade realizado ao efluente secundário, também nos ensaios referentes aos tratamentos terciários de desinfeção por radiação UV e plasma não-térmico e separação por UF, os organismos de teste apresentaram uma mortalidade reduzida. Para averiguar de forma mais rigorosa a eficácia destes tratamentos, foi necessária a realização de testes de reprodução (ou ensaios crónicos).

Relativamente ao ensaio de toxicidade aguda executado no efluente terciário de ozonização, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4. 6- Resultados obtidos no teste de toxicidade aguda relativo ao efluente com tratamento terciário de ozonização.

	24h				48h			
	% mortalidade				% mortalidade			
Controlo	0	0	0	0	0	0	0	0
30%	0	0	0	0	0	0	0	0
45%	0	0	0	0	0	0	0	0
60%	0	0	0	0	0	0	0	20
75%	0	0	0	0	20	0	20	40
100%	40	40	0	40	100	100	80	80

Ao contrário do verificado nos ensaios efetuados aos efluentes anteriores, o ensaio do efluente tratado por ozonização apresentou uma mortalidade acentuada e notória. Ao fim de 48 h de exposição, na fila com o efluente não diluído (100%), verificou-se a morte de praticamente todos os organismos de teste. Estes resultados refletem a toxicidade excessiva do meio, o que leva a concluir que este tipo de tratamento não será o mais adequado para afinação de tratamentos secundários.

A partir destes resultados, foi possível determinar o EC_{50} relativo ao teste de toxicidade aguda do efluente com tratamento de ozonização (Figura 4.3).

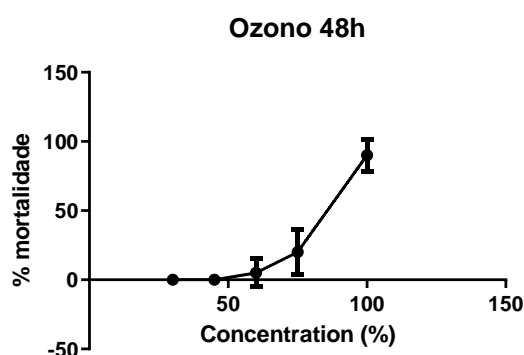


Figura 4. 3- Curva para a determinação do EC_{50} , ao fim de 48 h, inerente ao teste do efluente com tratamento de ozonização.

Por interpolação da curva apresentada na Figura 4.3, é possível concluir que o valor da concentração estimada capaz de matar 50% das dáfias num período de 48 h é de 85,75%.

A título demonstrativo do efeito do efluente tratado por ozonização (concentração a 100%) no organismo da dafnia, na Figura 4.4 está presente a comparação entre uma dafnia do controlo e uma dafnia submetida ao efluente tratado por ozonização ao fim de 48 horas. É possível observar um abdómen inchado e desfigurado na dafnia exposta ao efluente quando comparado com a dafnia controlo.

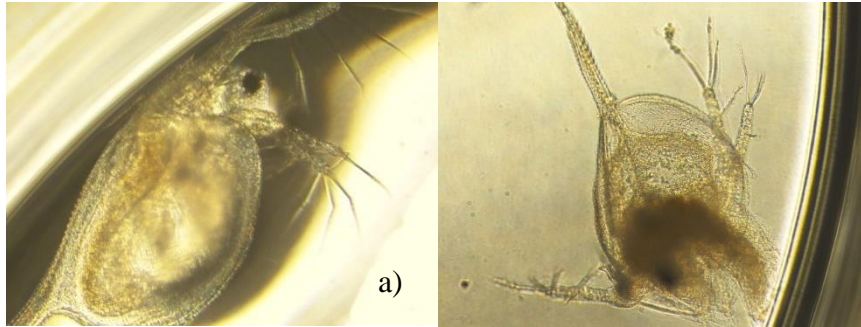


Figura 4. 4- a) dafnia de controlo e b) dafnia exposta ao efluente tratado por ozonização ao 100% após 48 h de ensaio.

4.3. Ensaio intermédios – Testes de reprodução

4.3.1. Alimentação e local – 1ª fase

Numa primeira fase, os ensaios preliminares foram executados somente dentro da incubadora recorrendo-se a uma solução de spirulina em pó para alimentar as dáfrias (Anexo A). No decorrer destes testes, verificou-se uma mortalidade anormal das dáfrias ao fim de algum tempo. Considerou-se que a alimentação não seria a mais adequada, pelo que foi decidido alimentar os organismos com *C. vulgaris*. A alteração da alimentação das dáfrias não teve qualquer impacto positivo na sua mortalidade uma vez que, ao fim de pouco tempo, a população de dáfrias em cultura decresceu de forma abrupta, sem justificação aparente.

Perante este fenómeno anormal e repetitivo, foram definidos novos parâmetros para averiguar quais as melhores condições possíveis. Assim, foram selecionados vários locais distintos (A a E) e dois tipos de alimentação diferentes. Foram criados dois grupos para testar a alimentação: um grupo de dáfrias alimentadas somente com *C. vulgaris*, e outro grupo alimentado com *C. vulgaris* e 0,5 mL de uma solução de fermento de padeiro (Heckmann & Connon, 2007; Venkatachalam et al., 2016) (Anexo B). O fermento de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*) contém proteínas solúveis e tem sido sugerido que as proteínas solúveis estão mais disponíveis para a digestão e absorção das dáfrias do que as proteínas insolúveis (Venkatachalam et al., 2016).

Foram incubadas novas dáfrias para a realização do ensaio. Inicialmente, em cada local, foram colocados dois copos (um com fermento e outro sem fermento), contendo cada um entre nove e dez dáfrias. Foi observado o comportamento dos organismos no período entre 9 de janeiro e 13 de fevereiro de 2023. Os resultados detalhados obtidos deste primeiro estudo preliminar estão presentes no Anexo C1.

Nas Figuras 4.5 a 4.8, está presente o panorama geral relativamente à evolução do aparecimento de novos descendentes e de mortes ao longo do tempo do ensaio.

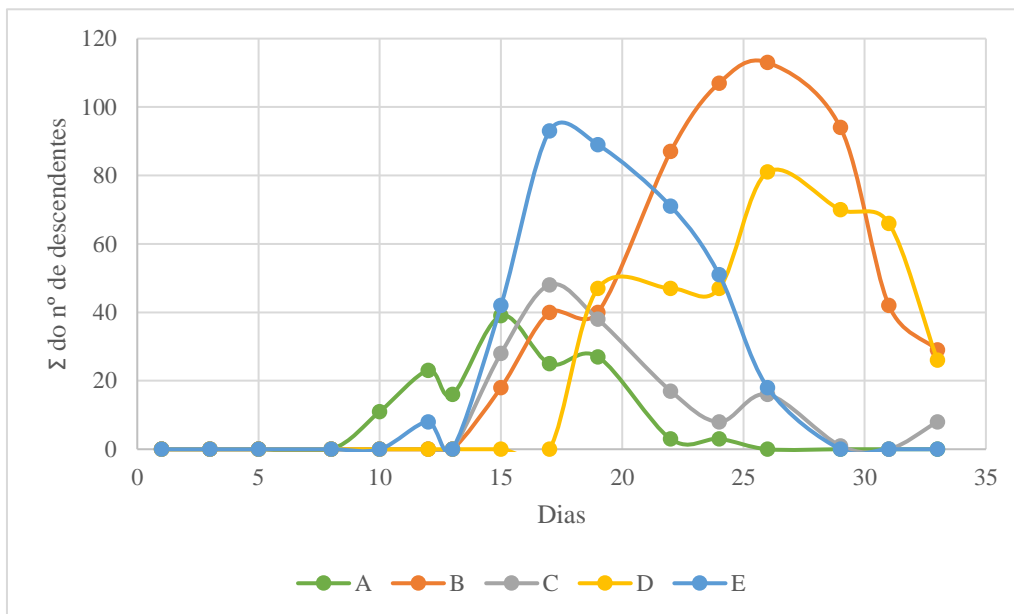


Figura 4. 5- Evolução do número de descendentes ao longo do tempo usando uma alimentação à base de *C. vulgaris* (A – incubadora, B – mesa junto a janela voltada a sul, C – janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores e E – laboratório de aulas).

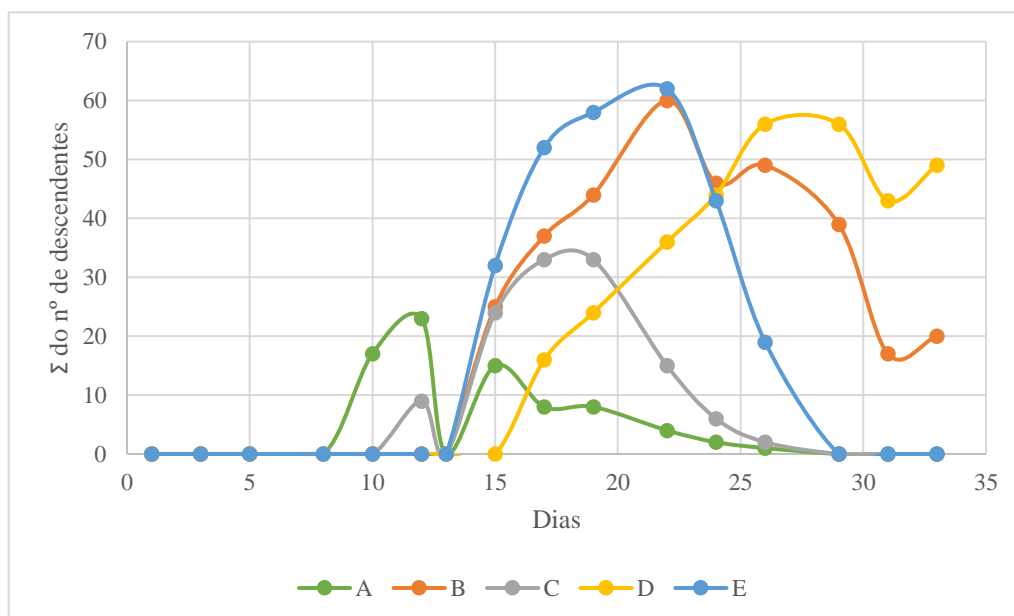


Figura 4. 6- Evolução do número de descendentes ao longo do tempo usando uma alimentação à base de *C. vulgaris* e fermento de padeiro (A – incubadora, B – mesa junto a janela voltada a sul, C – janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores e E – laboratório de aulas).

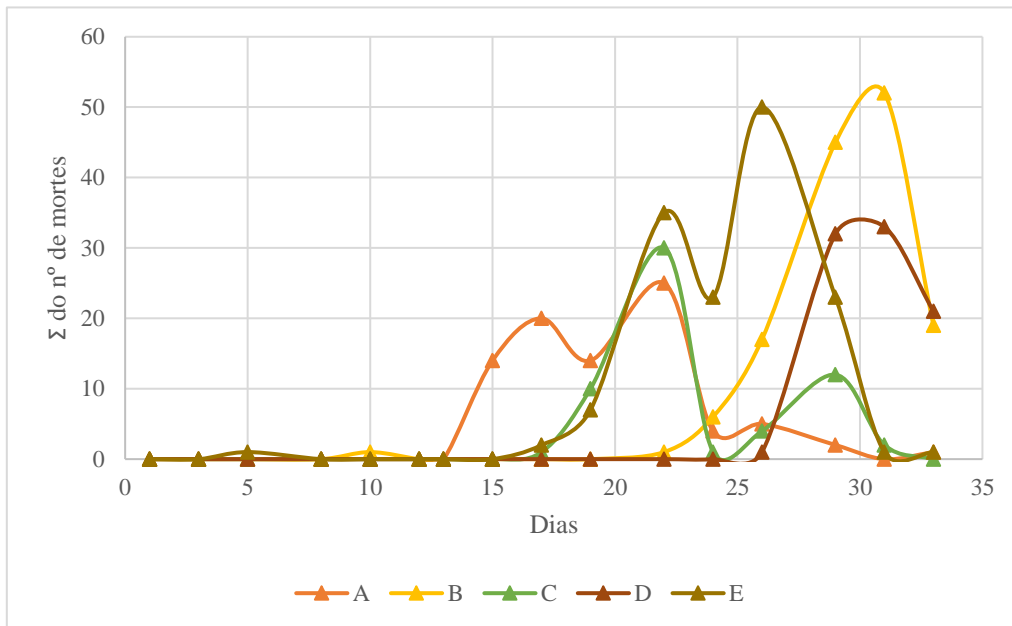


Figura 4. 7- Evolução do número de mortes ao longo do tempo usando uma alimentação à base de *C. vulgaris* (A – incubadora, B – mesa junto a janela voltada a sul, C – janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores e E – laboratório de aulas).

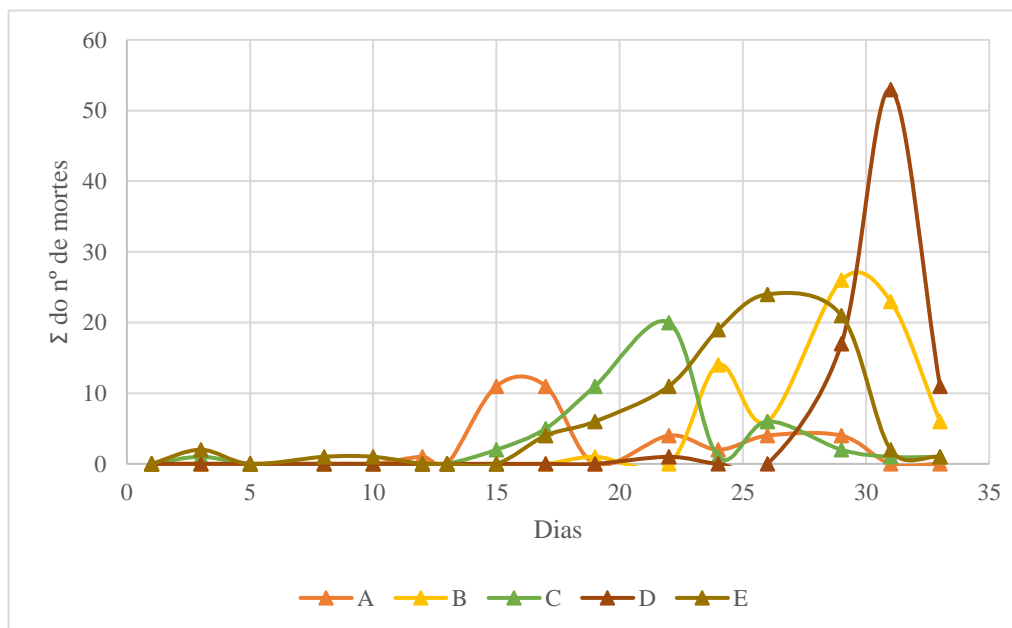


Figura 4. 8- Evolução do número de mortes ao longo do tempo usando uma alimentação à base de *C. vulgaris* e fermento de padeiro (A – incubadora, B – mesa junto a janela voltada a sul, C – janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores e E – laboratório de aulas).

Apurou-se, de uma forma geral, uma menor taxa de mortalidade nos copos onde foi usado fermento de padeiro, no entanto, as dáfias em questão, produziram menos descendentes do que as dáfias mantidas apenas com *C. vulgaris*. Com base neste primeiro

ensaio, averiguou-se que as culturas que tiveram maior sucesso no final do ensaio foram as colocadas nos locais B e D. Apesar de terem sido estes os resultados mais satisfatórios deste ensaio preliminar, não foi possível manter estas culturas após o seu término, tendo sido registada a morte de todos os organismos dentro de poucos de dias.

Como forma de analisar com maior pormenor os resultados obtidos deste ensaio, foi realizada uma comparação entre o número de mortes para cada tipo de alimentação (apenas *C. vulgaris* ou *C. vulgaris* e fermento de padeiro) para todos os locais individualmente.

No local A (incubadora com temperatura e fotoperíodo controlado), verificou-se uma mortalidade excessiva das dáfnias, fenómeno para o qual não se obteve explicação. No início do ensaio, foi o grupo que se desenvolveu com maior rapidez, tendo produzido os primeiros descendentes ao fim de sete dias. No entanto, a partir da terceira semana de teste, verificou-se um declínio acentuado na cultura. Ao fim de 31 dias, confirmou-se a morte de todas as dáfnias em cultura (Figura 4.9). Colocou-se a hipótese da presença de resíduos de trabalhos anteriores, mas mesmo após uma limpeza profunda, os resultados não se alteraram, levando a ponderar na hipótese de o equipamento não estar a funcionar devidamente, pelo que os ensaios foram abandonados neste local. É de salientar que, após o nascimento da primeira geração de descendentes, estas não produziram uma nova geração como seria de esperar. O facto de não ter havido renovação de gerações, não só contribuiu para o desaparecimento da população como inviabilizou a realização de ensaios crónicos neste local, onde o objetivo é monitorizar a reprodução das dáfnias ao longo de pelo menos 21 dias. Seria expectável que as dáfnias produzissem a primeira linha de descendentes ao fim de 8 a 10 dias, o que não foi verificado na primeira geração de descendentes produzida neste ensaio (Heckmann & Connon, 2007).

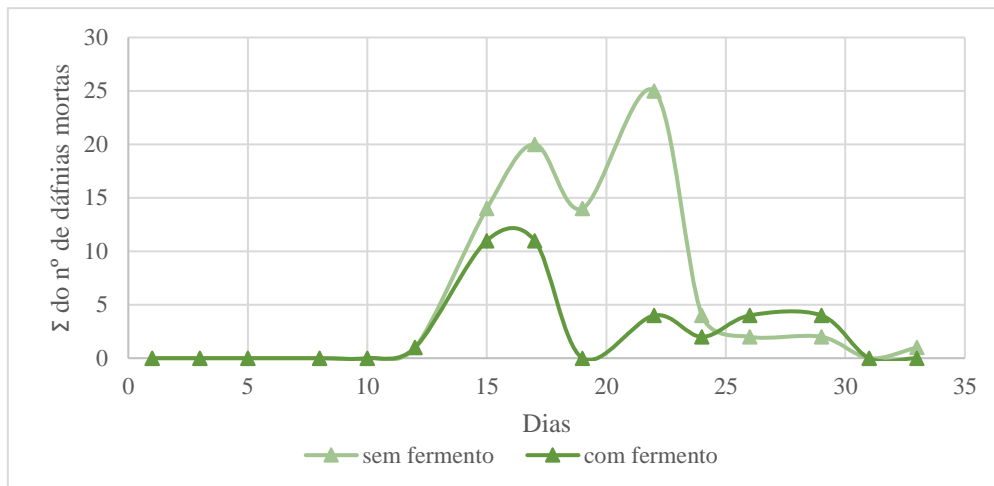


Figura 4. 9- Evolução do número de dáfias mortas no local A (incubadora) com os dois tipos de alimentação testados.

No local B, apurou-se o aparecimento da primeira geração de descendentes ao fim de 15 dias, mais tarde do que o expectável, mas fenómeno que pode ser justificado pela temperatura ambiente abaixo de 20 °C. Em termos de mortalidade, verificou-se um declínio da população a partir do dia 25 do ensaio (Figura 4.10). Apesar disso, o número total de descendentes produzidos ao longo do tempo e o relativo afastamento da janela, foi tomado em consideração como um local de possível sucesso.

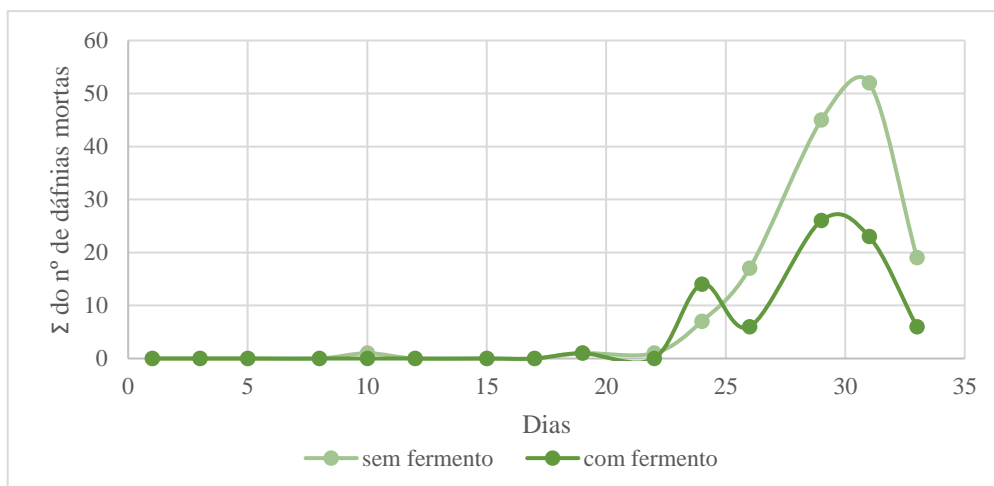


Figura 4. 10- Evolução do número de dáfias mortas no local B (mesa junto a janela voltada a sul) com os dois tipos de alimentação testados.

O local C, tornou-se inviável potencialmente devido à incidência de luz solar direta nos copos durante longos períodos durante o dia. A reprodução das dáfias neste local foi reduzida e, em certos dias, foi possível observar algumas dáfias mortas à superfície da água. A evolução do número de mortes ao longo do tempo está representada na Figura 4.11.

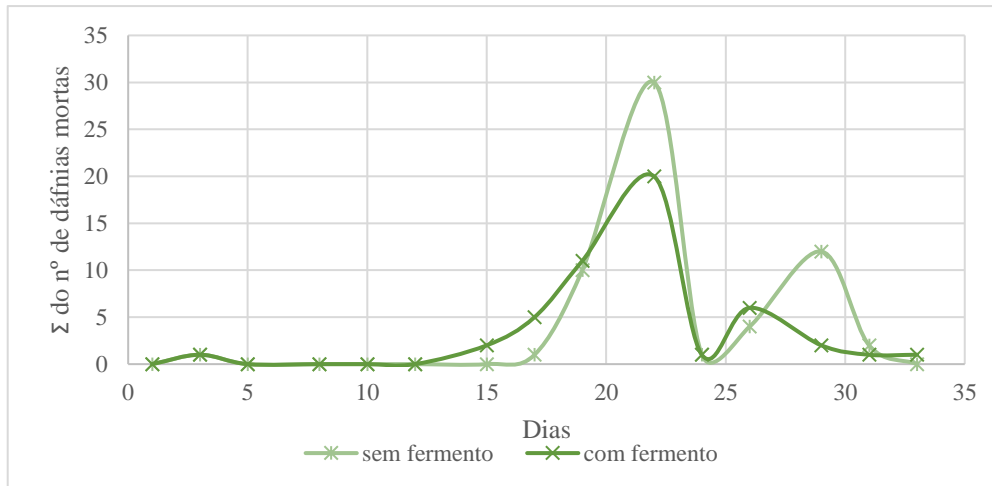


Figura 4. 11- Evolução do número de dáfias mortas no local C (janela orientada a sul) com os dois tipos de alimentação testados.

No local D, apesar de a janela ser orientada a sul, com a presença de árvores no exterior, a incidência de luz solar direta não foi tão determinante como no local C. No entanto, por o ensaio ter sido realizado no Inverno, da parte da manhã, os copos encontravam-se mais frios do que os restantes. Coincidentemente, as dáfias colocadas neste local foram as últimas a gerar a primeira geração de descendentes, muito provavelmente devido às variações de temperatura do meio ao longo do dia. No entanto e contrariamente ao expectável, com o avançar da estação e com o progressivo aumento das temperaturas mínimas no exterior, foi o grupo de dáfias que se desenvolveu de forma mais consistente dentro do grupo experimental. Ao contrário dos restantes, este foi o único ensaio em que as dáfias alimentadas com o suplemento de fermento de padeiro apresentaram maior mortalidade do que as alimentadas somente com *C. vulgaris* (Figura 4.12). Mais uma vez, à semelhança do verificado no local B, apesar de se ter terminado o ensaio com dáfias vivas, não foi possível manter as dáfias em cultura durante muito tempo, tendo-se extinguido dias após o fim do ensaio.

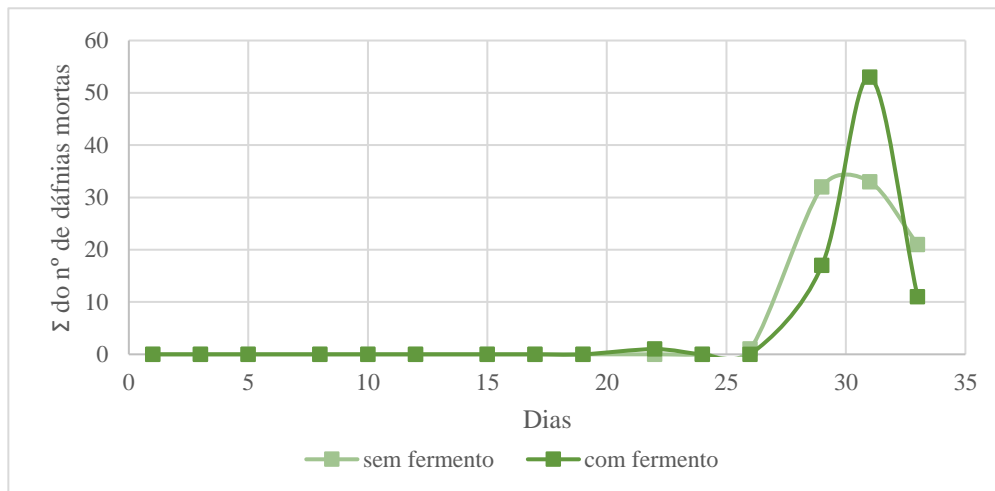


Figura 4. 12- Evolução do número de dáfias mortas no local D (janela virada a sul com árvores) com os dois tipos de alimentação testados.

Por último, apesar de o local E ter parecido promissor numa fase inicial do teste tanto a nível reprodutivo como a nível de sobrevivência, em dias de sol intenso, a temperatura sentida no laboratório ascendia a temperaturas superiores a 24 °C (temperatura registada na *hotte* do laboratório), inviabilizando os ensaios, uma vez que a temperatura ideal para a manutenção das culturas de dáfias ronda os 20 °C (Figura 4.13).

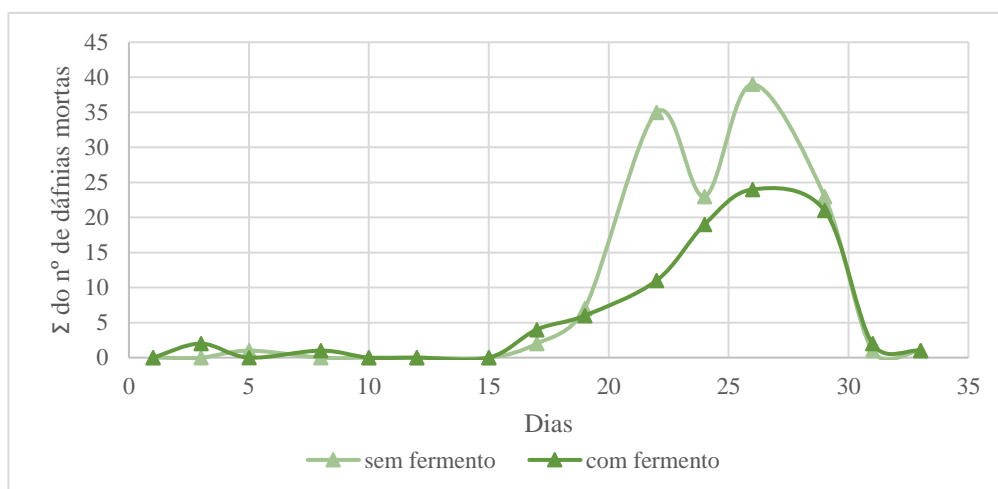


Figura 4. 13- Evolução do número de dáfias mortas no local E (laboratório de aulas) com os dois tipos de alimentação testados.

Com base neste ensaio, foi então possível selecionar os locais B e D onde, à partida, seria maior a probabilidade da manutenção da cultura por períodos mais prolongados. Assim, procedeu-se à realização de um novo teste para averiguar, entre os dois, qual seria o local mais apropriado.

4.3.2. Local – 2ª fase

Na segunda fase de testes, foram incubadas novas dáfias e foram testados os locais B, D e um novo local, F (correspondente ao laboratório de microbiologia onde decorreram os trabalhos), mantendo a alimentação com *C. vulgaris* e fermento de padeiro. O ensaio decorreu ao longo de 42 dias (de 27 de fevereiro a 10 de abril de 2023).

No início do teste, foram colocados quatro copos, cada um com uma dáfia, nos locais B e F e três copos no local D. O local F contou com temperatura controlada de 21 °C e foi usada uma lâmpada com temporizador para garantir um ciclo de 8 h de escuro e 16 h de luz. Os resultados deste ensaio, estão demonstrados pormenorizadamente no Anexo C2.

No panorama geral do ensaio, verificou-se que foi no local D onde houve um maior desenvolvimento das dáfias a nível reprodutivo. O ensaio no local B, foi o primeiro a terminar devido à morte de todos os organismos em estudo. A Figura 4.14, apresenta a evolução do número de dáfias ao longo do tempo em cada local estudado.

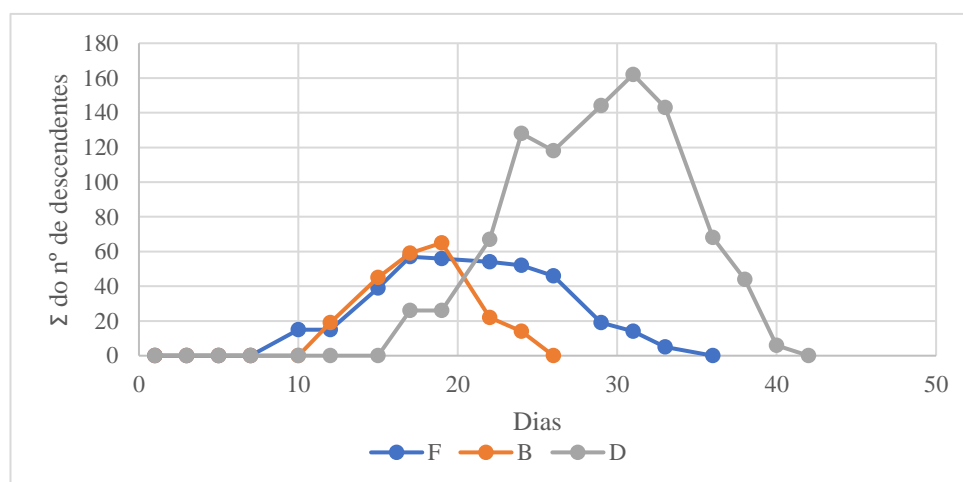


Figura 4. 14- Evolução do número de dáfias vivas ao longo do tempo nos novos locais selecionados (F – laboratório de microbiologia, B – mesa junto a janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores).

Paralelamente, é possível observar na Figura 4.15 a evolução da mortalidade dos organismos em estudo. Apesar de as mortes no local D aparentarem ser mais expressivas, vale reforçar que foi também nesse local onde houve uma maior reprodução das dáfias.

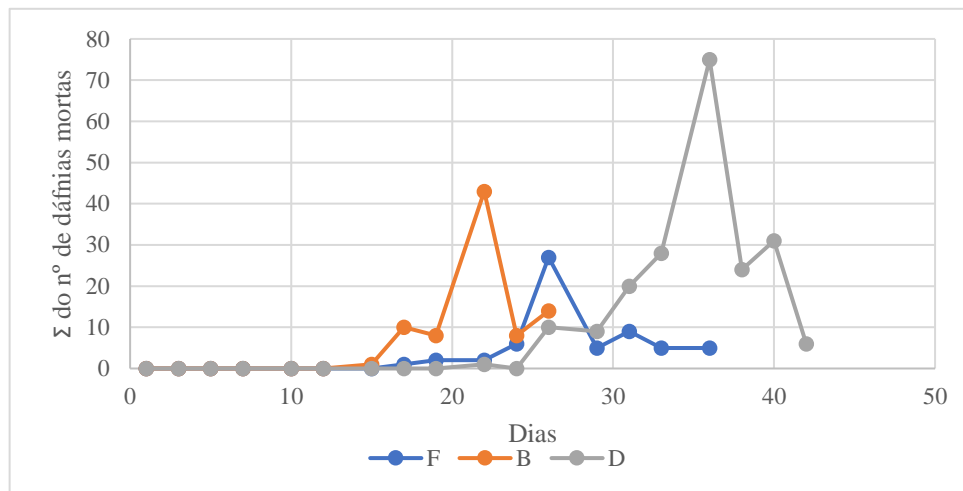


Figura 4. 15- Evolução do número de dáfnias mortas ao longo do tempo nos novos locais selecionados (F – laboratório de microbiologia, B – mesa junto a janela virada a sul, D – janela virada a sul com árvores).

Numa primeira fase do ensaio, as dáfnias colocadas no local F, tiveram um comportamento concordante com o expectável. As progenitoras tiveram a primeira geração de descendentes ao fim de oito/nove dias, fenómeno que se prolongou durante algum tempo (último grupo de descendentes foi registado no dia 15 de março), no entanto, a primeira linha de descendentes não chegou a produzir uma nova geração dáfnias. Como consequência, registou-se um declínio da população em estudo (Figura 4.16). Desta forma, determinou-se que o local F não seria adequado para executar os testes.

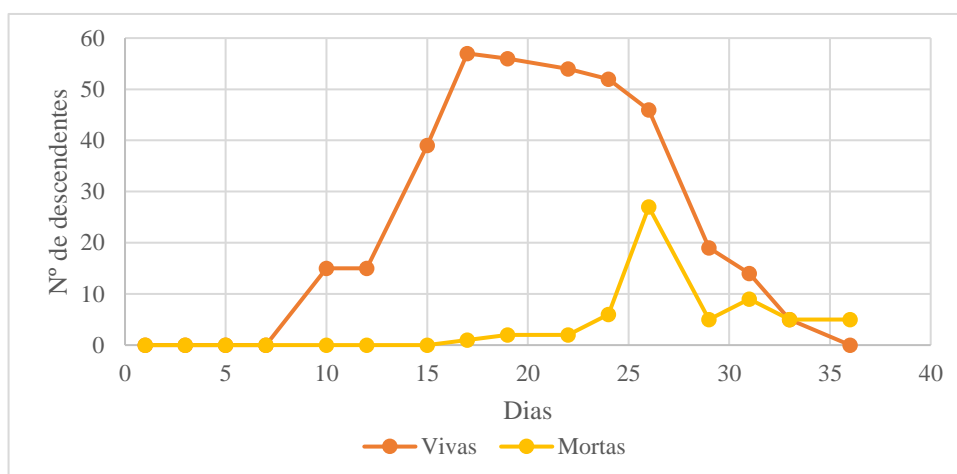


Figura 4. 16- Evolução do número de dáfnias vivas e de mortes ao longo do tempo no local F.

À semelhança do ocorrido no local F, também no local B o teste não foi bem sucedido. Houve uma renovação consistente da população na primeira geração, mas as mesmas não

tiveram a capacidade de se reproduzirem, tornando assim o ensaio inviável. Na Figura 4.17 está presente a evolução do número de descendentes e de mortes ao longo do tempo. O ensaio neste local foi dado como finalizado ao fim de 26 dias.

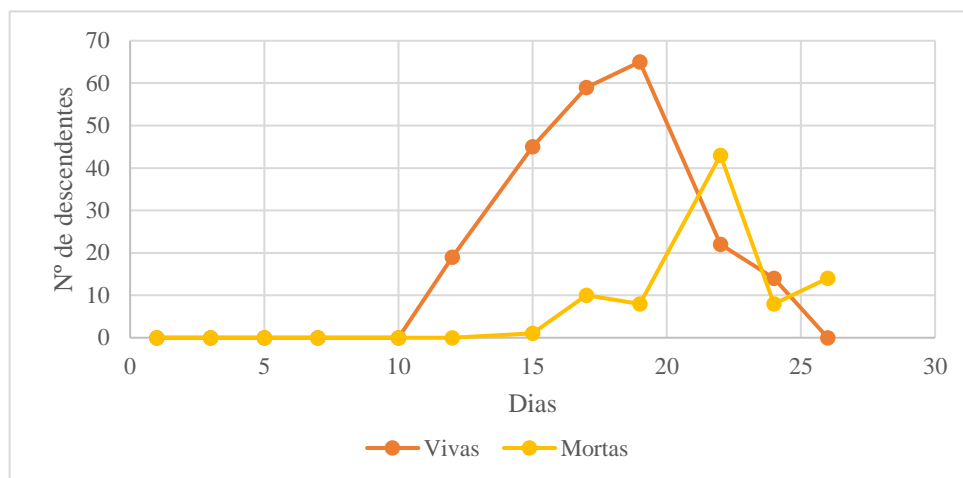


Figura 4. 17- Evolução do número de dáfias vivas e de mortes ao longo do tempo no local B.

Por outro lado e contrariamente ao verificado nos restantes locais, ao fim de 31 dias de ensaio no local D, foi registada a produção dos primeiros descendentes da segunda geração de dáfias. Apesar de ter havido reprodução dentro da primeira geração, o novo grupo de dáfias não teve uma longevidade significativa, tendo sucedido a morte dos organismos no dia 33 do ensaio (Figura 4.18). Inevitavelmente, a cultura acabou por declinar rapidamente.

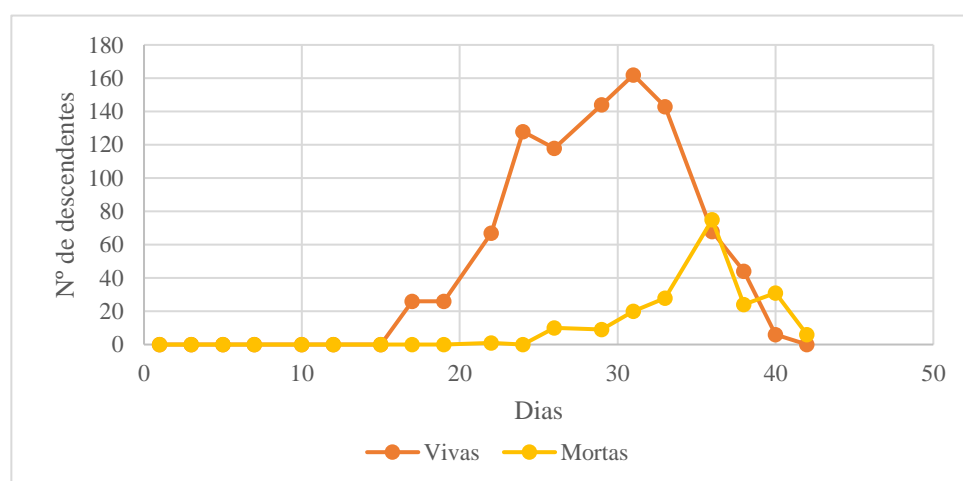


Figura 4. 18- Evolução do número de dáfias vivas e de mortes ao longo do tempo no local D.

Uma vez que foi registada uma segunda geração de dáfias, considerou-se que o local D seria, à partida, o local mais adequado para a realização dos ensaios crónicos. No entanto, foi ainda necessário efetuar ajustes, nomeadamente, à composição do meio de cultura.

4.3.3. Meio de cultura – 3ª fase

Perante as informações recolhidas dos ensaios preliminares anteriores e tendo avaliado vários possíveis, houve a necessidade de executar um novo teste. Aqui, foi selecionado o local D como sendo o mais promissor à realização dos ensaios crónicos e, desta vez, foram solicitadas novas dáfnias a um laboratório de outra instituição. Nestes testes, a principal variável foi o meio usado para manter a cultura, ou seja, em vez de usar o meio preparado inicialmente, foi preparado o meio de cultura Elendt M4 de composição descrita no Anexo C3 (OECD, 2011).

A alimentação foi feita recorrendo apenas a *C. vulgaris*, para garantir condições semelhantes às de origem. Foram também colocados copos num laboratório do DEQ do ISEP com orientação a norte, como forma de comparação dos resultados. No entanto, a monitorização mais atenta foi realizada no local D (Figura 4.19), até porque a reprodução do grupo colocado no laboratório do DEQ foi muito mais lenta e pouco significativa.



Figura 4. 19- Copos com dáfnias no local D numa fase mais avançada do ensaio.

O ensaio decorreu no período de 17 de abril a 13 de maio (27 dias) e contou com nove dáfnias, as quais foram distribuídas por copos individuais, com a exceção de duas de menores dimensões que por isso foram colocadas juntas (copo 8). Ao fim de cinco dias de ensaio (21 de abril) surgiram os primeiros descendentes (copo 4), cinco dos quais foram separados em copos diferentes passados sete dias, com o objetivo de monitorizar o seu desenvolvimento e eventual produção de uma segunda geração de descendentes. Este fenómeno foi registado após doze dias (3 de maio) do surgimento da primeira geração de descendentes. À semelhança

da geração anterior, a segunda geração também produziu uma nova linhagem de descendentes ao fim de doze dias (15 de maio)¹. A título de exemplo, na Figura 4.20, está demonstrado o aparecimento gradual de novas gerações, a partir da dáfnia colocada no copo 4.

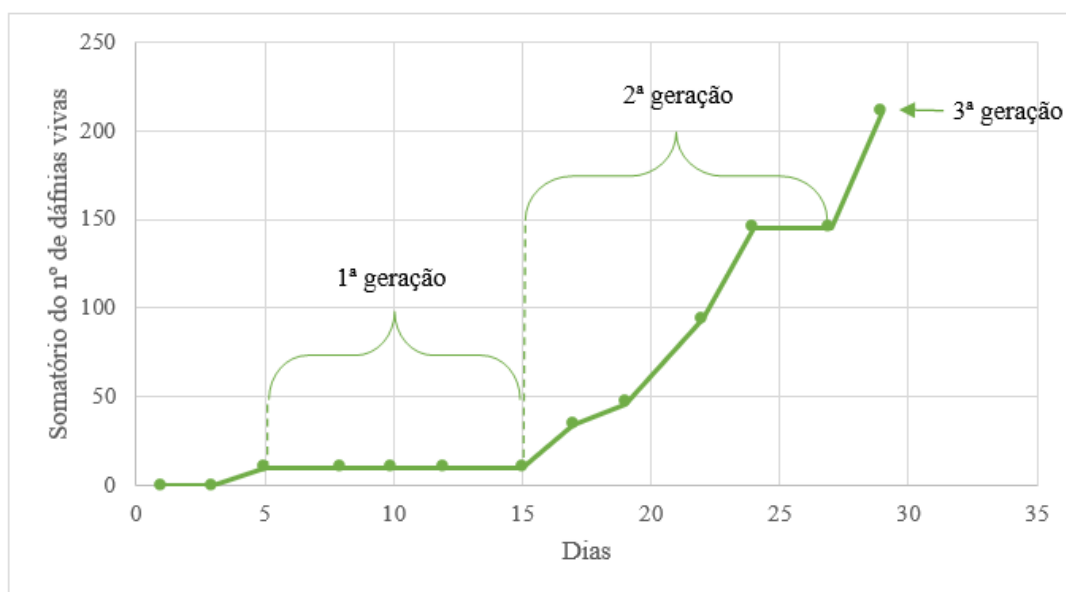


Figura 4. 20- Evolução do número global de dáfias em estudo ao longo do tempo e das diferentes gerações produzidas a partir da dáfnia colocada no copo 4.

No período do ensaio, a primeira geração, em vários copos com a exceção do copo 5, manteve um padrão sensivelmente constante de reprodução, tendo tido vários grupos de descendentes. Também as duas gerações seguintes se reproduziram a um ritmo relativamente constante e de acordo com o expectável para este tipo de ensaios (OECD, 2012).

Para além disto, foi também constatado que a mortalidade das dáfias diminuiu de forma significativa, não tendo sido registadas mortes consideráveis durante o período do ensaio. É de referir que as Tabelas que contêm toda a informação dos descendentes gerados a partir de cada copo, estão presentes no Anexo C3.

Deste último ensaio, foi possível concluir que o meio Elendt M4 para dáfias é mais adequado do que o meio de cultura que estava a ser usado anteriormente, o que permitiu o sucesso do teste. Assim, para avançar com os ensaios crónicos, foi decidido usar o meio Elendt M4, recorrer a uma suspensão de *C. vulgaris* para alimentar os organismos e realizar os testes no local D.

¹ Apesar de o ensaio ter sido dado como terminado no dia 13 de maio, no dia 15 ainda foram contabilizados os descendentes da terceira geração.

Com estes ensaios foi possível também averiguar que as dáfnias provenientes do kit *Daphtoxkit F* não deverão ser aptas para a realização de ensaios crónicos uma vez que começou por se verificar maior sucesso nos testes quando foram solicitadas dáfnias ao laboratório externo e não se recorreu às *ephippias* do kit. No entanto, seria necessário desenvolver novos testes, no sentido de averiguar a veracidade deste pressuposto.

4.4. Ensaios Crónicos

Neste subcapítulo, estão presentes os resultados obtidos dos ensaios crónicos realizados aos efluentes sujeitos aos tratamentos terciários com radiação UV e UF. Não foi possível testar o efluente secundário por falta de amostra suficiente e o efluente submetido ao tratamento com plasma não-térmico não foi realizado por falta de organismos disponíveis para iniciar o teste a tempo uma vez que os organismos em cultura foram declinando à medida que as temperaturas no exterior aumentaram.

Os ensaios decorreram no local D, recorrendo a uma alimentação à base de *C. vulgaris*. Foram monitorizados os descendentes de cada geração e, aquando do seu aparecimento, foi cessado o acompanhamento das dáfnias que lhes deram origem.

Numa outra nota relevante, o controlo realizado inicialmente, aquando do início do ensaio à água de teste com tratamento UV, não foi bem sucedido. Não foram encontradas causas viáveis para esse fenómeno, foram feitas várias tentativas para recomeçar o ensaio, mas sem sucesso. Assim, para manter a relevância dos resultados dos testes efetuados às amostras, foi feita a comparação dos resultados obtidos para a amostra, com dois controlos experimentais da literatura (Barmantlo et al., 2015; Eltemsah & Bøhn, 2019).

4.4.1. Radiação ultravioleta

O ensaio crónico efetuado à água de teste com tratamento terciário de desinfecção por radiação UV teve início no dia 17 de maio e decorreu até ao dia 16 de junho de 2023.

Dos ensaios realizados, constatou-se que a primeira geração teve o seu primeiro grupo de descendentes ao fim de 9 dias (Tabela 4.7) e não foi registada nenhuma morte dentro da geração zero.

Tabela 4. 7- Primeiro grupo de descendentes da primeira geração no ensaio efetuado ao efluente tratado por radiação ultravioleta.

Dia	Data	Copo	Nº Dáfnias Vivas	Nº Dáfnias Mortas	Nº de descendentes
9	25/05/2023	UV1	1	-	1
		UV2	1	-	11
		UV3	1	-	2
		UV4	1	-	11
		UV5	1	-	10
		UV6	1	-	10
		UV7	1	-	12
		UV8	1	-	10
		UV9	1	-	10
		UV10	1	-	11

Ao décimo dia do ensaio (26 de maio), registou-se a morte das duas descendentes da dáfnia colocada no copo UV3. Ao fim de sete dias (29 de maio) do aparecimento da primeira geração, as dáfnias foram distribuídas por copos diferentes, tendo sido colocadas, em média, duas dáfnias por copo.

As primeiras filhas da segunda geração foram registadas no dia 18 do ensaio (3 de junho), 12 dias após o aparecimento da primeira geração. Como em cada copo estavam presentes duas dáfnias, a observação do aparecimento de novas filhas foi efetuada até dia 7 de junho, correspondente ao 22º dia do ensaio, como forma de tentar assegurar que ambas as dáfnias presentes no copo tenham tido descendentes.

A terceira geração de dáfnias surgiu no dia 12 de junho (dia 27 do ensaio) e foram contabilizadas novas dáfnias até ao dia 16 de junho, último do ensaio. No gráfico da Figura 4.21 está presente a evolução do aparecimento de novos descendentes ao longo do tempo.

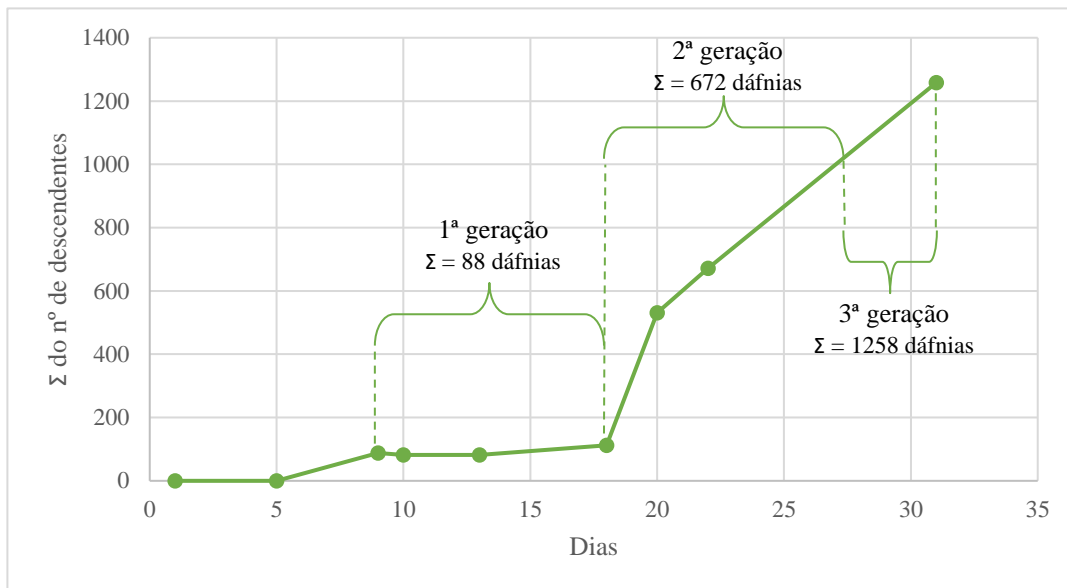


Figura 4. 21- Evolução do aparecimento de novos descendentes ao longo do tempo no ensaio relativo ao efluente com tratamento terciário de ultravioleta.

4.4.2. Ultrafiltração

O ensaio relativo à água de teste submetida a tratamento terciário de separação por UF, decorreu no período entre 9 de junho e 5 de julho de 2023. O aparecimento do primeiro grupo de descendentes foi registado ao fim de 9 dias (Tabela 4.8), não tendo havido mortes das progenitoras neste período.

Tabela 4. 8- Primeiro grupo de descendentes da primeira geração no ensaio efetuado ao efluente tratado por ultrafiltração.

Dia	Data	Copo	Nº Dáfias Vivas	Nº Dáfias Mortas	Nº de descendentes
9	17/06/2023	UF1	1	-	6
		UF2	1	-	5
		UF3	1	-	6
		UF4	1	-	6
		UF5	1	-	3
		UF6	1	-	6
		UF7	1	-	6
		UF8	1	-	4
		UF9	1	-	6
		UF10	1	-	5

A primeira geração teve descendência ao fim de 9 dias, tendo sido registadas as primeiras dáfias da segunda geração no dia 26 de junho (18º dia do ensaio), período o qual

se encontra dentro do expectável. Vale referir que não foram registadas mortes dentro da segunda geração.

Foram observadas as primeiras dáfrias da terceira geração no dia 3 de julho (dia 25 do ensaio), sete dias após o aparecimento da segunda geração, e a sua monitorização manteve-se até ao dia 5 de julho (dia 27). Na Figura 4.22, está presente o gráfico que demonstra a progressão do aparecimento de novas dáfrias neste ensaio.

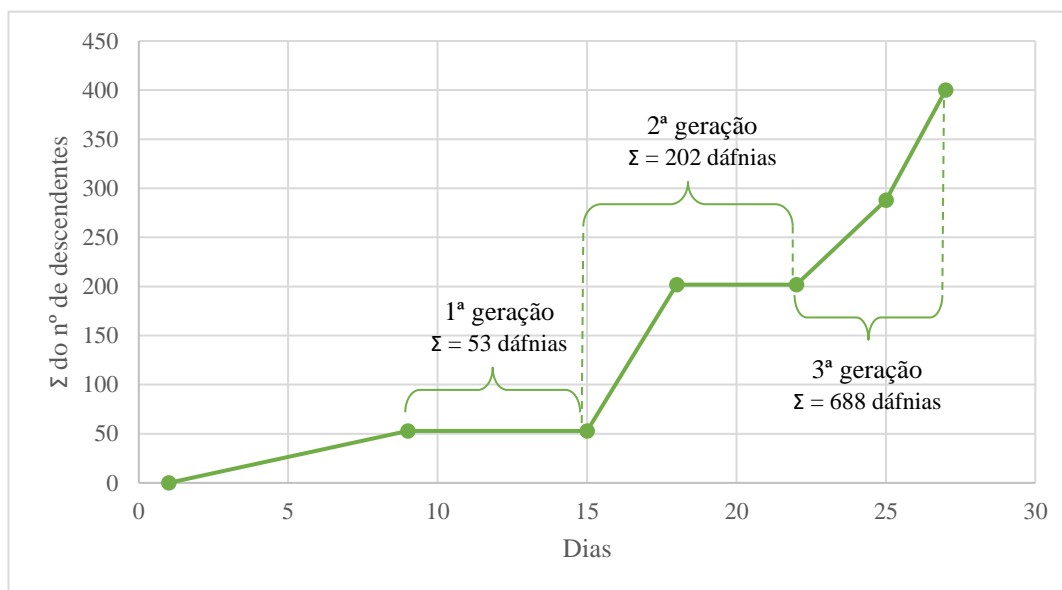


Figura 4. 22- Evolução do aparecimento de novos descendentes ao longo do tempo no ensaio relativo ao efluente com tratamento terciário de ultrafiltração.

4.4.3. Radiação ultravioleta vs Ultrafiltração

Como forma de validação dos resultados obtidos dos ensaios realizados na ausência de um controlo válido, procedeu-se à comparação dos resultados com dois controlos experimentais presentes na literatura (Barmiento et al., 2015; Eltemsah & Bøhn, 2019). É necessário ter em consideração que as condições em que foram realizados os ensaios variam consideravelmente das condições em que foram realizados os controlos apresentados. Assim, a comparação com os controlos foi efetuada no sentido de analisar o comportamento reprodutivo das dáfrias de teste ao longo do tempo e não fazer essa avaliação por períodos ou gerações.

É de notar que a semelhança entre controlos no período de 21 dias (menor tempo ensaiado), realizados em diferentes condições e alturas, corrobora o comportamento tendencial das dáfrias quando mantidas em meio e condições adequadas.

No entanto, quando comparados os resultados obtidos em ambos os ensaios realizados, é notória a discrepância do número de descendentes produzidos por geração. No ensaio realizado ao efluente terciário tratado com radiação UV, registou-se um número de descendentes de terceira geração muito superior ao registado na terceira geração do ensaio relativo ao efluente terciário tratado por UF. Na Figura 4.23, estão presentes os resultados obtidos dos ensaios efetuados, em comparação com o controlo 1 (Eltemsah & Bøhn, 2019) e com o controlo 2 (Barmentlo et al., 2015) da literatura.

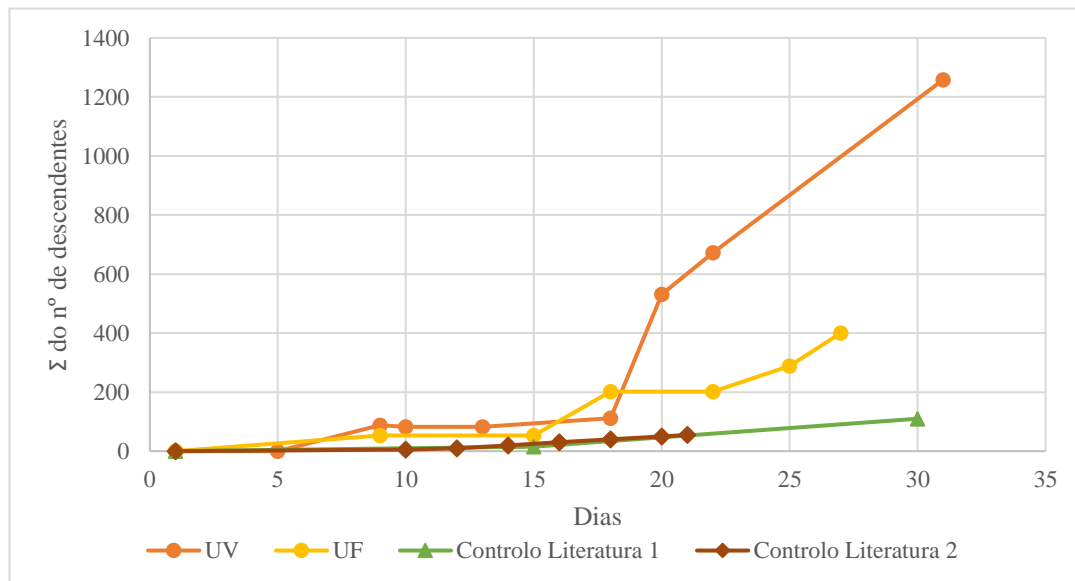


Figura 4. 23- Resultados obtidos dos dois ensaios realizados com um controlo 1 (Eltemsah & Bøhn, 2019) e um controlo 2 (Barmentlo et al., 2015) presentes na literatura.

De uma forma geral, o comportamento reprodutivo das dáfias submetidas ao efluente com tratamento de UF foi o mais semelhante ao comportamento dos controlos presentes na literatura.

Uma justificação para o comportamento tão diferente das dáfias expostas ao efluente tratado por UV pode passar pela presença de contaminantes com efeito desregulador nas dáfias, o que se reflete numa alteração reprodutiva.

Os contaminantes derivam inevitavelmente do crescimento industrial e evolução tecnológica, estão presentes em quantidades praticamente residuais nos ecossistemas e perturbam os organismos a eles expostos. Os contaminantes detetados geralmente em águas superficiais, apesar de poderem ser encontrados em pequenas quantidades, têm potencial para causar efeitos adversos nos ecossistemas aquáticos (Lima et al., 2017).

Na maioria dos casos, na presença de desreguladores endócrinos, a reprodução das dáfrias tende a diminuir. No entanto, existem compostos como o epofenonano ($C_{20}H_{32}O_2$) (Tatarazako & Oda, 2007) ou o bisfenol A (Mansilha et al., 2013), que se desviam desta regra, ao estimular o aumento da reprodução das dáfrias, a determinadas concentrações. O epofenano, pode ser encontrado em pesticidas usados na agricultura e funciona como um regulador hormonal de insetos, que interfere no seu normal desenvolvimento e crescimento. Por outro lado, o bisfenol A é usado como plastificante em embalagens alimentares.

Segundo Barmento et al (Barmentlo et al., 2015), o efeito de compostos perfluorados em dáfrias, foi também verificado um aumento significativo do número de descendentes em concentrações mais baixas do composto. Este fenómeno será indicativo de que o composto em estudo (ácido perfluorohexanóico – PFHxA), em concentrações não letais, estimula a reprodução das dáfrias. Este tipo de compostos são amplamente utilizados na indústria do papel e cartão (materiais que geralmente entram em contacto com alimentos), têxteis técnicos como equipamento individual de proteção, têxteis-lar e vestuário e até mesmo espumas de combate a incêndios (ECHA, 2021). Os PFHxA são um subgrupo de substâncias per- e polifluoroalquílicas. Como muitos compostos perfluorados de cadeia longa (C8 e C14) começam a ser restringidos a nível europeu, começaram a ser utilizados compostos de cadeia mais curta como o PFHxA (C6) (ECHA, 2021).

Tem-se vindo a observar frequentemente que os PFHxA contaminam águas subterrâneas, as águas superficiais e o solo. Uma vez que a sua remoção é dispendiosa, se a sua libertação continuar, estes compostos vão continuar a acumular-se no ambiente, nas águas de consumo e ainda nos alimentos (ECHA, 2023).

Apesar de não terem sido encontradas muitas situações em que as dáfrias tenham tido uma reprodução superior à esperada, pela informação reunida é possível prever a presença de compostos no efluente tratado por radiação UV que, embora em concentrações reduzidas por não ter sido provocada a morte, tenham provocado um desequilíbrio na reprodução das dáfrias.

Tendo em consideração a possível presença de contaminantes desreguladores no efluente tratado por UV, pode afirmar-se que a diferença clara entre os resultados obtidos para ambos os ensaios é coerente. Isto é, uma vez que o processo de tratamento com radiação UV tem por objetivo eliminar a carga microbiana do efluente, não deverá ser eficaz na remoção de

contaminantes de outro tipo. Por outro lado, o processo de UF implica a passagem dos efluentes por um sistema de membranas finas que funciona como uma barreira física seletiva à passagem de alguns constituintes das águas residuais.

Pelos resultados obtidos, é possível deduzir que alguns destes constituintes nocivos deverão ficar retidos no sistema de membranas usado no tratamento por UF, ao contrário do que acontece no tratamento por radiação UV, onde o foco é eliminar microrganismos patogénicos.

5. Conclusões

A toxicologia pode ser definida como sendo o estudo dos efeitos adversos de produtos químicos sobre organismos vivos. A *D. magna* é um dos organismos mais largamente utilizados para averiguar a toxicidade devido à sua elevada sensibilidade a componentes tóxicos e à sua forma de reprodução assexuada. O principal objetivo deste trabalho foi estudar a ecotoxicidade de águas residuais tratadas usando, para o efeito, *D. magna*. Foram analisados cinco efluentes, entre os quais um efluente secundário e quatro efluentes terciários, sendo eles recolhidos após tratamento por radiação UV, separação por UF, desinfecção por ozonização e por aplicação de plasma não-térmico.

Uma parte crucial deste trabalho foi o estudo das condições mais favoráveis à realização dos ensaios crónicos. Foram testados diversos parâmetros nomeadamente o local para a realização dos ensaios, alimentação e meio de cultura, dividindo esta etapa de trabalho em três ensaios preliminares sucessivos. Foram testados seis locais no GRAQ e no DEQ, tendo sido selecionado como mais promissor, o local D, no GRAQ, que corresponde a uma janela voltada a sul com proteção da folhagem das árvores que se encontram no exterior. Definiu-se o meio de cultura Elendt M4 como sendo o mais apropriado para manter as dáfnias em cultura por períodos mais prolongados, aliado a uma alimentação à base de uma suspensão de *C. vulgaris*. Com estes ensaios foi possível também averiguar que as dáfnias provenientes do kit *Daphtoxkit F* não deverão ser aptas para a realização de ensaios crónicos uma vez que começou por se verificar maior sucesso nos testes quando foram solicitadas dáfnias a um laboratório externo e não se recorreu às *ephippias* do kit.

Por causa do tempo dedicado a esta otimização, foram apenas realizados ensaios crónicos aos efluentes terciários tratados por UV e UF. Devido a fatores externos não identificados, não foi possível a realização de um controlo, pelo que foram usados controlos encontrados na literatura para comparar comportamentos reprodutivos. É de notar que não foram realizados ensaios crónicos ao efluente secundário por falta de amostra suficiente disponível.

Dos ensaios agudos, averiguou-se que o tratamento por ozonização foi o que provocou maior mortalidade nos organismos de teste, tendo sido possível calcular um EC_{50} de 85,75%, levando a afirmar que este será o tratamento menos eficaz, no sentido em que aumenta a toxicidade da água. Nos restantes efluentes, não foi possível calcular este valor, uma vez que

a mortalidade das dáfnias não foi significativa. Para averiguar o real efeito destes efluentes nas dáfnias, foi necessária a realização de ensaios crónicos como forma de avaliar o seu padrão reprodutivo, procurando anomalias.

Dos ensaios crónicos realizados aos efluentes tratados por UV e UF, verificou-se uma diferença notável no número de descendentes produzidos pelas dáfnias submetidas ao efluente tratado por radiação UV relativamente às submetidas ao efluente tratado por UF, indicando a presença de compostos que possam estar a atuar como disruptor endócrino, levando a uma anomalia reprodutiva das dáfnias.

Assim, conclui-se que, dos efluentes submetidos a ensaios crónicos, o tratamento terciário de UF deverá ter um maior sucesso ao limitar a toxicidade das águas resultantes. O tratamento por radiação UV, a longo prazo, tem o potencial de trazer problemas aos ecossistemas uma vez que deverá conter compostos desreguladores do padrão normal de reprodução da *D. magna*.

6. Limitações e propostas de trabalho futuro

As principais limitações inerentes a este trabalho prenderam-se com a dificuldade em manter uma cultura de dáfnias viável e saudável. Ao manter as dáfnias fora da incubadora, tornou-se impossível manter uma temperatura constante favorável ao seu desenvolvimento, dificultando assim todo o processo. O facto de todos os locais testados estarem incorporados no laboratório de química, relativamente próximos de reagentes químicos, pode ter dificultado a escolha do local ideal para a realização dos ensaios. O comportamento variável e inesperado das dáfnias a determinada altura dos ensaios também dificultou a sua realização, o que levou a tempos de espera relativamente prolongados principalmente entre ensaios preliminares e também a várias tentativas de realização de um controlo viável, levando à impossibilidade de ser realizado.

No futuro, propõe-se a conclusão dos ensaios crónicos ao efluente terciário tratado por plasma não-térmico e a repetição do ensaio controlo para validar corretamente os resultados obtidos para os efluentes terciários tratados por UV e UF.

Estes ensaios deverão ser realizados no local selecionado como o mais adequado, o local D, recorrendo ao novo meio de cultura Elendt M4 e usando *C. vulgaris* como forma de alimentação. Espera-se que, com o avançar da estação e a amenização das temperaturas exteriores, seja possível a conclusão deste trabalho.

Bibliografia

- Albuquerque, A. (2010). *Reutilização de Águas Residuais*.
<https://www.researchgate.net/publication/232430294>
- APA. (2021). *Águas Residuais Urbanas*. <https://www.apambiente.pt/agua/aguas-residuais-urbanas>
- Baird, D. J., Barber, I., Bradley, M., Calow, P., & Soares, A. M. V. M. (1989). The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia*, 188–189(1), 403–406.
<https://doi.org/10.1007/BF00027806>
- Barmantlo, S. H., Stel, J. M., Van Doorn, M., Eschauzier, C., De Voogt, P., & Kraak, M. H. S. (2015). Acute and chronic toxicity of short chained perfluoroalkyl substances to *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 198, 47–53.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.025>
- Brunelli, M. (2020). *Ecotoxicity evaluation , using Daphnia magna , of deltamethrin and the major metabolite (3-PBA) ; -Acute and chronic toxicity test*. Università degli studi di camerino ; Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- Castillo-Zacarías, C., Barocio, M. E., Hidalgo-Vázquez, E., Sosa-Hernández, J. E., Parra-Arroyo, L., López-Pacheco, I. Y., Barceló, D., Iqbal, H. N. M., & Parra-Saldívar, R. (2021). Antidepressant drugs as emerging contaminants: Occurrence in urban and non-urban waters and analytical methods for their detection. *Science of the Total Environment*, 757. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143722>
- CE. (2008). Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão de 30 de Maio de 2008 que estabelece métodos de ensaio nos termos do Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH). *Jornal Oficial da União Europeia*, 466.
- Celeiro. (2023). *Spirulina Bio | Celeiro*. <https://www.celeiro.pt/246798-spirulina-bio-125-gramas-kg-iswari>
- Diário da República. (1997). Decreto-Lei n.º 152/97 de 19 de junho de 1997 do Ministério do Ambiente. *Diário da República*, N.º 139(I Série-A).
- Eaton, D. L., & Gilbert, S. G. (2022). *Chapter 2. Principles of Toxicology | Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, 2nd edition*. McGraw Hill Medical.

<https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=449§ionid=39910767#6479039>

Ebert, D. (2005). *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>

Ebert, D. (2022). Daphnia as a versatile model system in ecology and evolution. *EvoDevo*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13227-022-00199-0>

ECHA. (2021). *All news- Scientific committees support further restrictions of PFAS*.

<https://www.echa.europa.eu/-/scientific-committees-support-further-restrictions-of-pfas>

ECHA. (2023). *Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS)*.

<https://www.echa.europa.eu/hot-topics/perfluoroalkyl-chemicals-pfas>

Eltemsah, Y. S., & Bøhn, T. (2019). Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 254.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.087>

Gallo, M. A. (2022). *Chapter 1. History and Scope of Toxicology | Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, 2nd edition*. McGraw Hill Medical.

<https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=449§ionid=39910766#6479024>

Heckmann, L.-H., & Connon, R. (2007). *Culturing of Daphnia Magna - Standard Operating Procedure*. Daphnia Research group. <https://docslib.org/doc/7154387/culturing-of-daphnia-magna-standard-operating-procedure>

Iervolino, G., Vaiano, V., & Palma, V. (2019). *Enhanced removal of water pollutants by dielectric barrier discharge non-thermal plasma reactor*.

<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.01.007>

ISO. (2012). *ISO 6341:2012 - Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test*.

<https://www.iso.org/standard/54614.html>

Lima, D. R. S., Tonucci, M. C., Libânio, M., & Aquino, S. F. (2017). *Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção*.

<https://doi.org/10.1590/S1413-41522017165207>

- Mansilha, C., Silva, P., Rocha, S., Gameiro, P., Domingues, V., Pinho, C., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2013). Bisphenol A migration from plastic materials: Direct insight of ecotoxicity in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(9), 6007–6018. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1614-0>
- Monte, H. M., Santos, M. T., Barreiros, A. M., & Albuquerque, A. (2016). *Tratamento de águas residuais: operações e processos de tratamento físico e químico*. www.ersar.pt
- Murugesan, P., Evanjalin Monica, V., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2020). Water decontamination using non-thermal plasma: Concepts, applications, and prospects. Em *Journal of Environmental Chemical Engineering* (Vol. 8, Número 5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104377>
- OECD. (2004). Test Guideline no 202 - OECD guideline for testing of chemicals - *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test. *OECD guidelines*, April, 1–12. <https://www.artsdatabanken.no/Pages/214456/?Key=1485163897>
- OECD. (2011). *Proposal for updated guideline 211 - Daphnia magna Reproduction Test*. December.
- OECD. (2012). Test Guideline no 211 - OECD Guideline for the testing of chemicals - *Daphnia magna* Reproduction Test. *OECD Guidelines*, October, 1–25.
- OECD. (2018). *Guidance Document on Aqueous-Phase Aquatic Toxicity Testing of Difficult Test Chemicals*. 23(23), 1–81.
- Samel, A., Ziegenfuss, M., Goulden, C. E., Banks, S., & Baer, K. N. (1999). Culturing and bioassay testing of *Daphnia magna* using Elendt M4, Elendt M7, and COMBO media. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43(1), 103–110. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1777>
- Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., & Julak, J. (2015). *Nonthermal plasma-A tool for decontamination and disinfection*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.002>
- SIMDOURO. (2017). *Tratamento de Águas Residuais*. SIMDOURO Grupo Águas de Portugal. <https://www.simdouro.pt/dados.php?ref=tratamento-aguas-residuais>
- Tatarazako, N., & Oda, S. (2007). The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects

- on crustaceans. Em *Ecotoxicology* (Vol. 16, Número 1, pp. 197–203).
<https://doi.org/10.1007/s10646-006-0120-2>
- Tkaczyk, A., Bownik, A., Dudka, J., Kowal, K., & Ślaska, B. (2021). *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of the Total Environment*, 763. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143038>
- UNESCO, S. and C. O. (2019). *Emerging Pollutants in Water and Wastewater*.
Www.En.Unesco.Org. <https://en.unesco.org/emergingpollutants>
- Vanoverbeke, J., de Gelas, K., & de Meester, L. (2007). Habitat size and the genetic structure of a cyclical parthenogen, *Daphnia magna*. *Heredity*, 98(6), 419–426.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800958>
- Venkatachalam, U., Munirasu, S., Uthayakumar, V., Arunkumar, P., & Ramasubramanian, V. (2016). The effect of different feeds such as *Chlorella vulgaris*, *Azolla pinnata* and yeast on the population growth of *Daphnia magna* commonly found in freshwater systems. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(6), 5–10.
<https://www.researchgate.net/publication/324438856>
- Wedotech. (2023). *Projeto FARMASENSE*. <http://www.wedotech.pt/pt-pt/farmasense/>
- White, T. A. (2013). *Assessing toxicity in Daphnia magna : an oxidative lipidomic approach* (Número September). University of Birmingham.
- WHO. (2023). *Water, sanitation and hygiene (WASH)*. https://www.who.int/health-topics/water-sanitation-and-hygiene-wash#tab=tab_1

Anexos

A – Preparação da solução de spirulina em pó

Procedeu-se à preparação de uma solução de spirulina em pó de 1000 mg/L. Para o efeito, pesaram-se 100 mg de spirulina em pó, dissolveu-se em água e passou-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL. A solução foi armazenada e congelada em alíquotas de 1,8 mL.

A spirulina usada para a alimentação das dáfrias encontra-se na Figura A1.



Figura A. 1- Spirulina usada para alimentar as dáfrias na primeira fase de ensaios preliminares (Celeiro, 2023).

B – Preparação da solução de fermento de padeiro

Foi preparada uma solução *stock* de fermento de padeiro de 100 mg/L, de acordo com o procedimento (Heckmann & Connon, 2007):

- Pesar 10 mg de fermento de padeiro e dissolver em água desionizada;
- Transferir a solução para um balão volumétrico de 100 mL e acertar o volume;

A solução foi preparada a cada 1-2 semanas. Aquando da troca de meio da cultura, foram adicionados 0,5 mL desta solução.

C – Ensaios de reprodução preliminares

Neste capítulo, estão apresentados todos os resultados obtidos dos ensaios preliminares realizados com a intenção de averiguar quais as melhores condições ambiente para manter uma cultura de dáfrias saudável, com capacidade de gerar resultados confiáveis para a realização de ensaios de reprodução, no âmbito da avaliação da ecotoxicidade de efluentes tratados.

C1 – Teste 1: Alimentação

Numa primeira fase, foram desenvolvidos ensaios no sentido de determinar a alimentação mais adequada para as dáfrias. Assim, foram testadas duas hipóteses de alimentação e cinco locais distintos.

Nas Tabelas C.1 a C.5, estão presentes os resultados obtidos após 5 semanas do 1º ensaio preliminar.

Tabela C. 1- Resultados obtidos do ensaio referente à alimentação das dáfias nos locais A e B.

Local	Dia	Alimentação	Copo	Vivas	Mortas	Novas Filhas	Local	Dia	Alimentação	Copo	Vivas	Mortas	Novas Filhas
Local A	09/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	9	-	-	Local B	09/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	9	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	9	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	9	-	-
	11/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	9	-	-		11/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	9	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	9	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	9	-	-
	13/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	9	-	-		13/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	9	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	9	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	9	-	-
	16/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	9	-	-		16/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	9	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	9	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	9	-	-
	18/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	9	-	11		18/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	8	1	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	9	-	17			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	9	-	-
	20/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	9	-	12		20/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	8	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	9	-	7			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	9	-	-
	23/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	9	-	14		23/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	8	-	18
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	9	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	9	-	25
	25/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	9	-	6		25/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	8	-	22
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	9	-	4			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	9	-	12
	27/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	7	2	14		27/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	8	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	9	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	8	1	7
	30/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	6	1	11		30/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	8	-	48
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	6	3	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	8	-	16
	01/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	5	1	-		01/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	8	-	26
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	6	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	8	-	-
	03/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	3	2	-		03/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	8	-	23
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	3	3	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	8	-	9
06/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	0	3	-	06/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	7	1	25		
	<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	1	2	-		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	8	-	16		
08/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	-	-	-	08/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	7	-	-		
	<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	1	-	-		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	7	1	-		
10/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	1	-	-	-	10/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	3	7	-	6		
	<i>C. vulgaris</i> + Fermento	2	0	1	-		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	4	5	2	7		

Tabela C. 2- Resultados obtidos do ensaio referente à alimentação das dáfias nos locais C e D.

Local	Dia	Alimentação	Copo	Vivas	Mortas	Novas Filhas	Local	Dia	Alimentação	Copo	Vivas	Mortas	Novas Filhas
Local C	09/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	9	-	-	Local D	09/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	9	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	9	-	-
	11/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	9	-	-		11/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	8	1	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	9	-	-
	13/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	9	-	-		13/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	8	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	9	-	-
	16/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	9	-	-		16/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	8	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	9	-	-
	18/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	9	-	-		18/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	8	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	9	-	-
	20/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	9	-	-		20/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	8	-	9			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	9	-	-
	23/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	9	-	-		23/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	7	1	16			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	9	-	-
	25/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	9	-	21		25/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	7	-	14			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	9	-	16
	27/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	9	-	-		27/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	47
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	7	-	11			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	8	1	8
	30/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	9	-	9		30/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	5	2	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	8	-	12
	01/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	9	-	-		01/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	5	-	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	8	-	8
	03/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	7	2	10		03/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	35
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	3	2	-			<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	8	-	12
06/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	4	3	-	06/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	10	-	21		
	<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	3	-	-		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	7	1	16		
08/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	3	1	-	08/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	9	1	28		
	<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	2	1	-		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	6	1	14		
10/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	5	3	-	-	10/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	8	8	1	-		
	<i>C. vulgaris</i> + Fermento	6	1	1	-		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	9	6	-	17		

Tabela C. 3- Resultados obtidos do ensaio referente à alimentação das dáfias no local E.

Local	Dia	Alimentação	Copo	Vivas	Mortas	Novas Filhas
Local E	09/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	9	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	9	-	-
	11/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	9	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	7	2	-
	13/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	8	1	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	6	1	-
	16/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	8	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	6	-	-
	18/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	8	-	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	6	-	-
	20/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	8	-	8
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	6	-	-
	23/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	8	-	34
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	6	-	32
	25/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	8	-	53
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	6	-	24
	27/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	8	-	3
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	6	-	12
	30/01/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	8	-	17
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	6	-	15
	01/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	8	-	9
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	6	-	-
	03/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	7	1	5
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	6	-	-
	06/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	2	5	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	4	2	-
	08/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	1	1	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	2	2	-
	10/02/2023	<i>C. vulgaris</i>	7	0	1	-
		<i>C. vulgaris</i> + Fermento	10	1	1	-

Tabela C. 4- Resultados obtidos da monitorização da 1ª geração de descendentes nos locais A e B no período entre 18 de janeiro e 10 de fevereiro de 2023.

Local	Copo	18/01/2023		20/01/2023		21/01/2023		23/01/2023		25/01/2023		27/01/2023		30/01/2023		01/02/2023		03/02/2023		06/02/2023		08/10/2023		10/02/2023		
		Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	
A	1.1	11		11	-			6	5	6	-	6	-	0	6											
	1.2			12				7	5	2	5	0	2													
	1.3					16		12	4	7	5	5	2	0	5											
	1.4							14		4	10	0	4													
	1.5									6		2	4	0	2											
	1.6												14		3	11	0	3								
	1.7																3		0	3						
	2.1	17		16	1			5	11	1	4	1	-	1	-	1	-	0	1							
	2.2			7				7	-	0	7															
	2.3					3		3	-	3	-	3	-	0												
	2.4									4		4	-	3	1	1	2	1	-	0	1					
B	3.1							18		18	-	18	-	18	-	16	2	10	6	5	5	2	3	0	2	
	3.2									22		22	-	21	1	17	4	6	11	1	5	0	1			
	3.3													48		48	-	48	-	22	26	7	15	7	-	
	3.4														26		26	-	23	3	9	14	2	7		
	3.5																23		18	5	8	10	4	4		
	3.6																	25			16	9	10	6		
	3.7																							6		
	4.1							25		25	-	25	-	25	-	15	10	9	6	2	7	1	1	1	-	
	4.2									12		12	-	12	-	8	4	8	-	5	3	3	2	2	1	
	4.3											7		7	-	7	-	7	-	6	1	6	0	6	-	
	4.4													16		16	-	16	-	7	9	1	6	1	-	
	4.5																	9		3	6	0	3			
	4.6																			16		6	10	3	3	
	4.7																							7		

Tabela C. 5- Resultados obtidos da monitorização da 1ª geração de descendentes nos locais C, D e E no período entre 18 de janeiro e 10 de fevereiro de 2023.

Local	Copo	18/01/2023		20/01/2023		21/01/2023		23/01/2023		25/01/2023		27/01/2023		30/01/2023		01/02/2023		03/02/2023		06/02/2023		08/10/2023		10/02/2023	
		Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas
C	5.1							28		27	1	24	3	0	24										
	5.2									21		14	7	8	6	0									
	5.3													9		8	1	6	2	0					
	5.4																	10		1	9	0	1		
	5.5																							8	
	6.1			9				8	1	3	5	0	3												
	6.2							16		16	-	8	8	0	8										
	6.3									14		14	-	8	6	0									
6.4											11		7	4	6	1	2	4	0	2					
D	8.1											47		47	-	47		46	1	15	31	1	14	1	-
	8.2																	35		34	1	33	1	15	18
	8.3																		21		4	17	2	2	
	8.4																				28		8		
	9.1								16		16	-	16	-	16	-	16	-	4	12	0	4			
	9.2										8		8	-	8	-	8	-	8	-	5	8	2	3	
	9.3													12		12	-	12	-	12	-	5	12	4	1
	9.4															8		8	-	8	-	8	8	8	-
	9.5																	12		8	4	7	4	3	4
9.6																		16		4	16	2	2		
9.7																					14		13	1	
9.8																							17		
E	7.1			8			8	-	8	-	8	-	8	-	7	1	3	4	0	3					
	7.2						34		32	2	25	7	6	19	0										
	7.3								53		53	-	37	16	17	20	7	10	0	7					
	7.4										3		3	-	3	-	3	-	0	3					
	7.5													17		15	2	0	15						
	7.6															9		0	9						
	7.7																	5		0	5				
10.1							32		28	4	22	6	11	11	7	4	2	5	0	2					
10.2									24		24	-	24	-	10	14	6	4	0	6					
10.3											12		12	-	11	1	10	1	0	10					
10.4														15		15	0	1	14	0	1				

C2 – Teste 2: Local

Numa segunda fase, tendo definido como mais viável a alimentação com suplemento de fermento de padeiro, foi realizado um teste com o objetivo de definir o local mais adequado para manter a cultura de dáfrias. Foram testados os locais B, D e F (laboratório de microbiologia). Os resultados deste estudo estão presentes nas Tabelas C.6 a C.10.

Tabela C. 6- Resultados gerais obtidos do ensaio referente ao local no período entre 27 de fevereiro e 17 de março de 2023.

dia	data	Local	Copo	Vivas	Mortas	Novas Filhas	dia	data	Local	Copo	Vivas	Mortas	Novas Filhas	dia	Data	Local	Copo	Vivas	Mortas	Novas Filhas						
1	27/02/23	B	A	1	-	-	8	06/03/23	B	A	1	-	-	15	13/03/23	B	A	1	-	-	16					
			B	1	-	-				B	1	-	-				B	1	-	-						
			C	1	-	-				C	1	-	-				C	1	-	11						
			D	1	-	-				D	1	-	-				D	1	-	-						
		D	A	1	-	-			D	A	1	-	-			D	A	1	-	-	F	A	1	-	-	-
			B	1	-	-				B	1	-	-				B	1	-	-		B	1	-	-	
			C	1	-	-				C	1	-	-				C	1	-	-		C	1	-	-	
			D	1	-	-				D	1	-	-				D	1	-	-		D	1	-	-	
		F	A	1	-	-			F	A	1	-	-			F	A	1	-	-	F	A	1	-	-	13
			B	1	-	-				B	1	-	-				B	1	-	-		B	1	-	-	
			C	1	-	-				C	1	-	-				C	1	-	-		C	1	-	-	11
			D	1	-	-				D	1	-	-				D	1	-	-		D	1	-	-	-
3	01/03/23	B	A	1	-	-	10	08/03/23	B	A	1	-	-	17	15/03/23	B	A	0	1	-	-	-				
			B	1	-	-				B	1	-	-				B	1	-	-	13					
			C	1	-	-				C	1	-	-				C	1	-	-	C	1	-	-		
			D	1	-	-				D	1	-	-				D	1	-	-	D	1	-	-	11	
		D	A	1	-	-			D	A	1	-	-			D	A	1	-	-	F	A	1	-	-	10
			B	1	-	-				B	1	-	-				B	1	-	-		B	1	-	-	7
			C	1	-	-				C	1	-	-				C	1	-	-		C	1	-	-	9
			D	1	-	-				D	1	-	-				D	1	-	-		D	1	-	-	15
		F	A	1	-	-			F	A	1	-	-			F	A	1	-	-	F	A	1	-	-	-
			B	1	-	-				B	1	-	8				B	1	-	-		B	1	-	-	5
			C	1	-	-				C	1	-	-				C	1	-	-		C	1	-	-	-
			D	1	-	-				D	1	-	7				D	1	-	-		D	1	-	-	15
5	03/03/23	B	A	1	-	-	12	10/03/23	B	A	1	-	8	19	17/03/23	B	A	1	-	-	-					
			B	1	-	-				B	1	-	5				B	1	-	-	B	1	-	-		
			C	1	-	-				C	1	-	-				C	1	-	-	C	1	-	-	14	
			D	1	-	-				D	1	-	6				D	1	-	-	D	1	-	-	-	
		D	A	1	-	-			D	A	1	-	-			D	A	1	-	-	F	A	1	-	-	-
			B	1	-	-				B	1	-	-				B	1	-	-		B	1	-	-	-
			C	1	-	-				C	1	-	-				C	1	-	-		C	1	-	-	-
			D	1	-	-				D	1	-	-				D	1	-	-		D	1	-	-	-
		F	A	1	-	-			F	A	1	-	-			F	A	1	-	-	F	A	1	-	-	-
			B	1	-	-				B	1	-	-				B	1	-	-		B	1	-	-	-
			C	1	-	-				C	1	-	-				C	1	-	-		C	1	-	-	-
			D	1	-	-				D	1	-	-				D	1	-	-		D	1	-	-	-

Tabela C. 7- Resultados gerais obtidos do ensaio referente ao local no período entre 20 de março e 8 de abril de 2023.

dia	data	Local	Copo	Vivas	Mortas	Novas Filhas
22	20/03/2023	B	A			
			B	0	1	
			C	0	1	
			D	1	-	-
		D	A	1	-	19
			B	1	-	11
			C	1	-	12
		F	A	1	-	-
			B	1	-	-
			C	1	-	-
			D	1	-	-
		24	22/03/2023	B	A	
B						
C						
D	1				-	-
D	A			1	-	21
	B			1	-	15
	C			1	-	25
F	A			1	-	-
	B			1	-	-
	C			1	-	-
	D			1	-	-
26	24/03/2023			B	A	
		B				
		C				
		D	1		-	-
		D	A	1	-	-
			B	1	-	-
			C	1	-	-
		F	A	0	1	
			B	0	1	
			C	0	1	
			D	1	-	-
		29	27/03/2023	B	A	
B						
C						
D	0				1	
D	A			1	-	188
	B			1	-	5
	C			1	-	12
F	A			1	-	-
	B			1	-	-
	C			1	-	-
	D			0	1	
31	29/03/2023			B	A	
		B				
		C				
		D				
		D	A	1	-	-
			B	1	-	-
			C	1	-	15
		F	A			
			B			
			C			
			D			
		33	31/03/2023	B	A	
B						
C						
D						
D	A			1	-	9
	B			1	-	-
	C			1	-	-
F	A					
	B					
	C					
	D					
36	03/04/2023			B	A	
		B				
		C				
		D				
		D	A	1	-	-
			B	1	-	-
			C	1	-	-
		F	A			
			B			
			C			
			D			
		38	05/04/2023	B	A	
B						
C						
D						
D	A			1	-	-
	B			0	1	
	C			1	-	-
F	A					
	B					
	C					
	D					
40	08/04/2023			B	A	
		B				
		C				
		D				
		D	A			
			B			
			C			
		F	A	0	1	
			B			
			C	0	1	
			D			

Tabela C. 8- Resultados obtidos da monitorização da 1ª geração de descendentes no local B no período entre 8 e 24 de março de 2023.

Local	Copo	08/03/2023		10/03/2023		13/03/2023		15/03/2023		17/03/2023		20/03/2023		22/03/2023		24/03/2023	
		Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas
B	A1			8	-	8	-	4	4	0	4						
	B1			5	-	4	1	3	1	3	-	1	2	0	1		
	C1					11	-	11	-	9	2	0	9				
	D1			6	-	6	-	1	5	1	-	0	1				
	A2					16	-	16	-	15	1	2	13	0	2		
	B2							13	-	12	1	0	12				
	C2									14	-	14	-	12	2	0	12
	D2							11	-	11	-	5	6	2	3	0	2

Tabela C. 9- Resultados obtidos da monitorização da 1ª geração de descendentes no local D no período entre 15 de março e 10 de abril de 2023.

Local	Copo	15/03/2023		17/03/2023		20/03/2023		22/03/2023		24/03/2023		27/03/2023		29/03/2023			31/03/2023		03/04/2023		05/04/2023		08/04/2023		10/04/2023	
		Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Novas filhas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas
D	A1	10	-	10	-	9	1	9	-	9	-	9	-	9	-	19	9	-	6	3	2	4				
	B1	7	-	7	-	7	-	7	-	7	-	7	-	7	-	4	6	1	5	1	3	2				
	C1	9	-	9	-	9	-	9	-	9	-	9	-	9	-	-	9	-	7	2	7	-	1	6	0	1
	A2					19		19	-	19	-	15	4	0	15	-										
	B2					11		11	-	10	1	8	2	4	4	-	2	2	0	2						
	C2					12		12	-	12	-	11	1	11	-	-	11	-	0	11						
	A3							21		20	1	18	2	18	-	-	18	-	16	2	13	3	2	11	0	2
	B3							15		11	4	11	-	11	-	-	11	-	9	2	2	7				
	C3							25		21	4	21	-	20	1	-	20	-	19	1	17	2	3	14	0	3
	A4													18		-	17	1	0	17						
	B4													5		-	5	-	0	5						
	C4													12		-	12	-	0	12						
	A5																9		6	3	0	6				
	C5													15			14	1	0	14						

Tabela C. 10- Resultados obtidos da monitorização da 1ª geração de descendentes no local F no período entre 8 de março e 3 de abril de 2023.

Local	Copo	08/03/2023		10/03/2023		13/03/2023		15/03/2023		17/03/2023		20/03/2023		22/03/2023		24/03/2023		27/03/2023		29/03/2023		31/03/2023		03/04/2023	
		Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas
F	B1	8	-	8	-	8	-	8	-	8	-	8	-	8	-	6	2	1	5	0	1				
	D1	7	-	7	-	7	-	6	1	6	-	6	-	5	1	4	1	1	3	0	1				
	B2					13		12	1	12	-	12	-	12	-	12	-	11	1	9	2	2	7	0	2
	D2					11		11	-	10	1	10	-	9	1	8	1	0	8						
	B3							5		5	-	5	-	5	-	5	-	5	-	5	-	3	2	0	3
	D3							15		15	-	13	2	13	-	11	2	1	10	0	1				

C3 – Teste 3: Meio de cultura

Tendo seleccionado o local mais adequado para manter a cultura de dáfnias, foram solicitadas novas dáfnias para testar o meio de cultura. Este novo meio de cultura foi preparado de acordo com uma proposta de atualizaao ao protocolo estabelecido pela OECD para a realizaao destes ensaios (OECD, 2011).

A Figura C.1 indica quais os compostos usados para a preparaao do novo meio de cultura. Para efeitos deste trabalho, foi preparado o meio Elendt M4.

	Amount added to water mg/l	Concentration (related to medium M4)	Amount of stock solution added to prepare medium	
			ml/l	
			M 4	M 7
Stock solution II (combined trace elements)		20-fold	50	50
Macro nutrient stock solutions (single substance)				
CaCl ₂ •2 H ₂ O	293 800	1 000-fold	1.0	1.0
MgSO ₄ •7 H ₂ O	246 600	2 000-fold	0.5	0.5
KCl	58 000	10 000-fold	0.1	0.1
NaHCO ₃	64 800	1 000-fold	1.0	1.0
Na ₂ SiO ₃ •9 H ₂ O	50 000	5 000-fold	0.2	0.2
NaNO ₃	2 740	10 000-fold	0.1	0.1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000-fold	0.1	0.1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000-fold	0.1	0.1
Combined Vitamin stock	-	10 000-fold	0.1	0.1
The combined vitamin stock solution is prepared by adding the 3 vitamins to 1 litre water, as shown below:				
	mg/l			
Thiamine hydrochloride	750	10 000-fold		
Cyanocobalamine (B ₁₂)	10	10 000-fold		
Biotine	7.5	10 000-fold		

Figura C. 1- Composiao do meio de cultura Elendt M4 (OECD, 2011).

As tabelas C.13 a C.15, revelam os resultados da monitorizaao realizada aos novos grupos de dáfnias. Como consequência do elevado número de organismos em estudo, foi cessada a monitorizaao de alguns grupos a partir do dia 10 de maio, não so como forma de aliviar o trabalho no laboratório (por se traduzir num número excessivamente elevado de copos utilizados), mas também para que fosse possível focar atentamente apenas na evoluao de 2 grupos.

Tabela C. 11- Resultados gerais obtidos do ensaio referente ao local D no período entre 17 de abril e 13 de maio de 2023.

dia	data	Local	Copo	Vivas	Mortas	Novas Filhas
1	17/04/2023	D	4	1	-	-
			5	1	-	-
			6	1	-	-
			7	1	-	-
3	19/04/2023	D	8	2	-	-
			4	1	-	-
			5	1	-	-
			6	1	-	-
5	21/04/2023	D	7	1	-	-
			8	2	-	-
			4	1	-	10
			5	1	-	-
8	24/04/2023	D	6	1	-	6
			7	1	-	2
			8	2	-	-
			4	1	-	-
10	26/04/2023	D	5	1	-	-
			6	1	-	-
			7	1	-	-
			8	2	-	11
12	28/04/2023	D	4	1	-	-
			5	1	-	-
			6	1	-	5
			7	1	-	-
15	01/05/2023	D	8	2	-	8
			4	1	-	11
			5	1	-	-
			6	1	-	12
17	03/05/2023	D	7	1	-	-
			8	2	-	15
			4	1	-	17
			5	1	-	-
19	05/05/2023	D	6	1	-	-
			7	1	-	-
			8	2	-	19
			4	1	-	11
22	08/05/2023	D	5	1	-	3
			6	1	-	-
			7	1	-	9
			8	2	-	19
24	10/05/2023	D	4	1	-	11
			5	²	-	-
			6	1	-	-
			7	-	-	-
27	13/05/2023	D	8	-	-	-
			4	1	-	13
			5	-	-	-
			6	1	-	9

² Fim da monitorização do comportamento dos grupos de dáfneas assinalados na tabela sombreados a verde.

Tabela C. 12- Resultado da monitorização da 1ª geração de descendentes no período compreendido entre 21 de abril e 15 de maio no local D.

Local	Copo	21/04/2023		24/04/2023		26/04/2023		28/04/2023		01/05/2023		03/05/2023		05/05/2023		08/05/2023		10/05/2023		10/05/2023		13/05/2023			15/05/2023			
		Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Novas filhas	Vivas	Mortas	Novas filhas	
D	4.1	10		10	-	10	-	10	-	10	-	10	-	10	-	10	-	10	-	10	-	10	-	36	10	-	-	
	4.2					6		6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	34	6	-	8	
	4.3									11		11		11		11		11		11		11		3	11		-	
	4.4											17		13	4	13		13		13		13		-	13		-	
	6.1			6		6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	6	-	21	6	-	10	
	6.2								5		5		5		5		5		5		5		5		20	5	-	26
	6.3										12		12		12		12		12		12		12		14	12	-	-
	6.4															12		12		12		12		-	12	-	-	
	7.1			2		2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-					
	8.1						11		11		11		11		11		11		11		11							
	8.2							6		6		6		6		6		6		6		6						
	8.3										15		15		15		15		15		15							
	8.4											9		9		9		9		9		9						
8.5												15		15		15		15		15								

Tabela C. 13- Resultado da monitorização da 2ª geração de descendentes da dáfnia colocada no copo 4 no período entre 3 e 15 de maio de 2023.

Local	Copo	03/05/2023		05/05/2023		08/05/2023		10/05/2023		13/05/2023		15/05/2023			
		Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Novas filhas	
D	4.1.1	7		7	-	7	-	7	-	7	-	7	-	15	
	4.1.2			9		9		9		9		9		-	
	4.1.3					9		9		9		9		-	
	4.1.1 A	5		5	-	5	-	5	-	5	-	5	-	-	
	4.1.1 B	4		4	-	4	-	4	-	4	-	4	-	15	
	4.1.1 C			4		4		4		4		4		14	
	4.1.1 D	4		3	1	3		3		3		3		11	
	4.1.1 E	4		4	-	4	-	4	-	4	-	4	-	11	
	4.1.2 A					9		9		9		9		-	
	4.1.2 B					11		11		11		11		-	
	4.1.2 C							11		11		11		-	
	4.1.2 D						8		8		8		8		-
	4.1.2 E							8		8		8		-	
	4.1.3 A							9		9		9		-	
	4.1.3 B							13		13		13		-	
	4.1.3 C							12		12		12		-	
4.1.3 D							9		9		9		-		