



Rita Durão Correia

Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Contribuição para o estudo da degradação
do 17 β -Estradiol e do 17 α -Etinilestradiol
com recurso ao tratamento de discos
biológicos em *batch***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária

Orientador: Prof. Doutora Leonor Miranda Monteiro do Amaral,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Prof. Doutor João Paulo da Costa de Noronha,
Professor Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente e Arguente: Prof. Doutor António Pedro de Macedo Coimbra Mano
Vogais: Prof. Doutora Leonor Miranda Monteiro do Amaral
Prof. Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa
Doutora Maria Isabel Araújo Pinto



Rita Durão Correia

Licenciada em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Contribuição para o estudo da degradação
do 17 β -Estradiol e do 17 α -Etinilestradiol
com recurso ao tratamento de discos
biológicos em *batch***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária

Orientador: Prof. Doutora Leonor Miranda Monteiro do Amaral,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Prof. Doutor João Paulo da Costa de Noronha,
Professor Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente e Arguente: Prof. Doutor António Pedro de Macedo Coimbra Mano
Vogais: Prof. Doutora Leonor Miranda Monteiro do Amaral
Prof. Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa
Doutora Maria Isabel Araújo Pinto



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro de 2016

Contribuição para o estudo da degradação do 17 β -Estradiol e do 17 α -Ethinilestradiol com recurso ao tratamento de discos biológicos em *batch*

Copyright © Rita Durão Correia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

À VALORMED pelo apoio financeiro ao projecto que permitiu reunir os meios para a realização desta dissertação;

À minha orientadora, Professora Doutora Leonor Amaral, por todo o suporte dado ao longo desta fase desde a sua orientação, a sua disponibilidade, a sua capacidade de incentivar e apoiar e claro, pela sua amizade;

Ao meu co-orientador, Professor Doutor João Paulo Noronha, por todos os seus ensinamentos de química e por se prontificar para ajudar e esclarecer qualquer questão sobre esta matéria;

À Professora Doutora Rita Maurício que também me acompanhou nesta fase e sempre demonstrou o seu apoio e disponibilidade para qualquer situação;

À Doutora Isabel Pinto que foi uma ajuda incansável ao longo do percurso laboratorial e por me ensinar todos os aspetos que dizem respeito ao HPLC-DAD; à Doutora Helena também pela sua ajuda no laboratório;

À Dona Luísa e Dona Adélia, pela sua disponibilidade e disposição em auxiliar em todos os aspetos analíticos e pela sua grande companhia diária ao longo da fase laboratorial;

À Carolina e à Sandra, por todas as bases fornecidas para a realização deste trabalho;

Às minhas colegas de laboratório, e não só, pela partilha, união e amizade;

À minha família que sempre me apoiou e em especial aos meus pais, por me transmitirem os melhores conselhos, por acreditarem em mim, por lutarem de forma diferente para que eu alcançasse esta meta e por serem quem são...obrigada;

Ao Pedro por me apoiar e incentivar em cada desafio;

A todos os amigos que fiz nesta casa e que me acompanharam desde o 1º ano, em especial à Lisandra e à Vânia.

Resumo

O presente trabalho estudou a biodegradação do 17 β -Estradiol (E2) e do 17 α -Ethinilestradiol (EE2) em função da concentração inicial do composto, da concentração inicial em CQO e de diferentes estados de biofilme. Para as condições experimentadas foram determinadas as respectivas constantes cinéticas (k) de degradação. Para tal, utilizou-se uma instalação piloto de discos biológicos operando em modo *batch*, com uma solução de alimentação que permitiu simular este processo como sendo uma etapa de tratamento terciário/avançado.

Os ensaios foram divididos em duas fases: a fase A que inclui os ensaios de 1 a 3 e estudou apenas o composto E2 e a fase B que inclui os ensaios 4 a 6 em que foram avaliados ambos os compostos.

Foram ainda realizados testes auxiliares para avaliar a possibilidade de fotodegradação, tendo-se constatado que não existia para ambos os compostos.

Nas experiências realizadas em *batch* a degradação dos compostos mostrou uma correlação inversa com o aumento da concentração inicial em CQO.

Em condições com baixa concentração de CQO a degradação do E2 foi total ao fim de três dias. Por outro lado, com uma CQO elevada e com biofilme desenvolvido atingiu uma degradação de 80% de E2 nas primeiras 24 horas, mas só é totalmente degradado ao 4^o dia. A remoção do E2 na presença de uma CQO elevada e com fraco desenvolvimento de biofilme parece exigir um mínimo de 4 dias. As constantes cinéticas do E2 são de primeira ordem e variaram entre 0,5275 a 0,8152 d⁻¹.

Relativamente ao EE2 obteve-se uma remoção máxima de 20% e constantes cinéticas de primeira ordem que variaram entre 0,0522 a 0,0622 d⁻¹, sendo que a constante mais alta está associada a baixas concentrações quer de CQO quer do composto.

Considerando a CQO, tal como se verificou para E2 e EE2, obtiveram-se reações de primeira ordem com as constantes cinéticas a variarem de 0,8155 a 1,1394 d⁻¹. Os valores obtidos neste estudo para o E2, EE2 e a CQO foram comparados com os valores existentes na bibliografia, tendo-se verificado a sua concordância para condições de ensaio semelhantes.

TERMOS-CHAVE: 17 β -Estradiol (E2); 17 α -Ethinilestradiol (EE2); Reator de discos biológicos; *Batch*; Constante cinética (k).

Abstract

This thesis studied the biodegradation of 17 β -Estradiol (E2) and 17 α -Ethinylestradiol (EE2) in function of its initial concentration, COD initial concentration and different biofilm states. For the conditions experienced, the respective degradation kinetic constants (k) were determined. To achieve this, we used a pilot installation of rotating biological contactors operating in batch, with a supply solution through which we simulated this process as a stage of a tertiary/advanced treatment.

The tests were divided into two phases: phase A which includes tests 1-3 focused on studying compound E2 and phase B which includes test 4-6 where both compounds were evaluated.

Auxiliary tests were performed to evaluate the possibility of photodegradation, and it was found that there was no photodegradation on both compounds.

In the experiments carried out in batch the compounds showed an inverse correlation with the increase of the initial concentration in COD.

Under conditions with low COD concentration, degradation of E2 was total after three. On the other hand, with a high COD and with developed biofilm reached an 80% degradation of E2 within 24 hours, but it's just totally degraded on the 4th day; The removal of E2 in the presence of high COD and with poor biofilm development seems to need at least the 4 days. E2s kinetic constants are first order and range from 0.5275 to 0.8152 d⁻¹.

With regard to EE2, a maximum removal of 20% was reached and first order kinetic constants varying between 0.0522 to 0.0622 d⁻¹, being the highest constant associated to low concentrations of either COD or the compound.

Considering the COD, just like in E2 and EE2, we obtained first order reactions with kinetic constants between 0.8155 to 1.1394 d⁻¹. The obtained results in this study for E2, EE2 and the COD were compared with the existing values on the bibliography, after having verified similar test conditions.

KEYWORDS: 17 β -Estradiol (E2); 17 α -Ethinylestradiol (EE2); Rotating biological contactor; Batch; Kinetic constant (k).

Índice

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 Introdução | 1 |
| 2 Estado de Arte | 3 |
| 2.1 Poluentes Prioritários..... | 3 |
| 2.1.1 Definição | 3 |
| 2.1.2 Identificação de poluentes prioritários | 3 |
| 2.1.3 Lista de poluentes prioritários | 4 |
| 2.1.4 Lista de vigilância de poluentes prioritários | 4 |
| 2.2 Desreguladores endócrinos..... | 5 |
| 2.2.1 Definição | 5 |
| 2.2.2 Identificação e classificação de EDC..... | 6 |
| 2.2.3 Problemática dos EDC..... | 7 |
| 2.2.4 Impactes dos EDC nos seres vivos | 8 |
| 2.2.5 Poluentes Prioritários com propriedades de desregulação endócrina | 9 |
| 2.3 Caracterização do grupo estradiol (E2 e EE2)..... | 11 |
| 2.3.1 Propriedades químicas | 11 |
| 2.3.2 Origens e funções | 12 |
| 2.3.3 Transporte para o ambiente..... | 12 |
| 2.3.4 Problemática no ambiente | 13 |
| 2.4 Sistema de remoção de fármacos em ETAR | 15 |
| 2.4.1 Processos convencionais | 15 |
| 2.4.2 Discos Biológicos | 17 |
| 2.4.3 Tratamento avançado/terciário | 19 |
| 2.4.4 Constantes cinéticas de biodegradação - Ensaios em <i>Batch</i> | 22 |
| 3 Objetivos | 25 |
| 4 Plano experimental | 27 |
| 5 Materiais e métodos | 29 |
| 5.1 Materiais | 29 |
| 5.1.1 Instalação Piloto: Reator Laboratorial de Biomassa Fixa | 29 |
| 5.1.2 Soluções de fármacos..... | 30 |
| 5.1.3 Efluente doméstico simulado | 31 |
| 5.1.4 Material utilizado no decorrer dos ensaios | 32 |
| 5.2 Modo operativo..... | 32 |
| 5.2.1 Reator em <i>Batch</i> | 32 |
| 5.2.2 Amostragens | 33 |
| 5.3 Métodos Analíticos | 34 |
| 5.3.1 Carência Química de Oxigénio (CQO) | 34 |
| 5.3.2 Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)..... | 34 |
| 5.3.3 Identificação dos compostos pelo método SBSE | 34 |
| 5.3.4 Curva de calibração | 39 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.3.5 Determinação da ordem das reações..... | 40 |
| 5.3.6 Testes auxiliares pelo método SBSE..... | 41 |
| 6 Resultados | 45 |
| 6.1 Biofilme | 45 |
| 6.2 Curva de calibração | 48 |
| 6.3 Ensaio de biodegradabilidade | 50 |
| 6.3.1 Biodegradabilidade do 17 β -Estradiol..... | 54 |
| 6.3.2 Biodegradabilidade do 17 α -Ethinilestradiol | 55 |
| 6.4 Parâmetros cinéticos dos processos de biodegradação..... | 57 |
| 6.4.1 Ordem das reações para o E2 e EE2 | 57 |
| 6.4.2 Ordem das reações para a CQO | 61 |
| 6.5 Resumo dos resultados | 64 |
| 6.6 Testes auxiliares pelo método SBSE | 65 |
| 7 Conclusões | 71 |
| 8 Perspectivas de trabalho futuro | 73 |
| 9 Referências | 75 |
| Anexo I- Lista original de substância prioritárias..... | 83 |
| Anexo II- Lista de substâncias prioritárias atual | 85 |
| Anexo III- Ficha de segurança do composto 17β-Estradiol (E2)..... | 87 |
| Anexo IV- Ficha de segurança do composto 17α-Ethinilestradiol (EE2)..... | 95 |
| Anexo V- CQO associada aos compostos..... | 103 |
| Anexo VI- Determinação da Carência Química de Oxigênio (CQO)..... | 105 |
| Anexo VII- Determinação dos Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) | 107 |
| Anexo VIII- Cromatogramas para a obtenção das curvas de calibração | 109 |
| Anexo IX- Limite de detecção e quantificação para o E2 e o EE2..... | 111 |
| Anexo X- Cromatogramas dos ensaios | 113 |
| Anexo XI- Resultados de SST e SSV | 115 |
| Anexo XII. Ordem das reações para o E2 e EE2 | 117 |
| Anexo XIII- Ordem das reações para a CQO | 119 |
| Anexo XIV- Teste direto com Acrodisc | 121 |
| Anexo XV- Teste direto em diferentes tipos de águas com Acrodisc e filtração | 123 |
| Anexo XVI- Cromatogramas dos ensaios de fotodegradação | 125 |
| Anexo XVII- Curva de calibração direta | 127 |
| Anexo XVIII- Ensaio em branco | 129 |

Índice de Tabelas

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 2.1 Lista de vigilância de substâncias para monitorização | 5 |
| Tabela 2.2 Principais substâncias de cada classe de EDC..... | 7 |
| Tabela 2.3 Impactes dos EDC sobre mamíferos, pássaros, répteis, peixes e invertebrados. | 8 |
| Tabela 2.4 Impactes dos EDC sobre o homem. | 9 |
| Tabela 2.5 Poluentes Prioritários com propriedades de desregulação endócrina | 10 |
| Tabela 2.6 Propriedades químicas do 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol..... | 11 |
| Tabela 2.7 Concentração de E2 e EE2 em afluentes e efluentes de ETAR | 14 |
| Tabela 2.8 Eficiências de remoção no tratamento secundário. | 16 |
| Tabela 2.9 Eficiência de remoção nos tratamentos avançados ou terciários..... | 20 |
| Tabela 2.10 Constantes de degradação através de lamas ativadas sob diferentes temperaturas e SSV | 22 |
| Tabela 2.11 Parâmetros cinéticos obtidos em biorreatores de membrana inoculados com lamas ativadas aclimatadas enão aclimatadas | 23 |
| Tabela 2.12 Constantes de degradação de primeira ordem..... | 24 |
| Tabela 4.1 Plano Experimental | 27 |
| Tabela 5.1 Compostos utilizados para obter o substrato..... | 31 |
| Tabela 5.2 Características dos ensaios | 33 |
| Tabela 6.1 CQO objetivo e CQO em cada ensaio. | 45 |
| Tabela 6.2 Limite de deteção e quantificação para o E2 e o EE2. | 50 |
| Tabela 6.3 Degradação dos fármacos e da CQO de cada ensaio. | 51 |
| Tabela 6.4 Resultado das ordens de reação para o E2 e EE2..... | 59 |
| Tabela 6.5 Valores iniciais de E2 e CQO | 60 |
| Tabela 6.6 Resultado das ordens de reação para a CQO..... | 63 |
| Tabela 6.7 Resumo dos resultados..... | 64 |
| Tabela 6.8 Teste direto com Acrodisc..... | 65 |
| Tabela 6.9 Teste direto com diferentes tipos de águas com Acrodisc e filtração..... | 65 |
| Tabela 6.10 “Ruído” calculado pela solução de alimentação | 68 |

Anexos

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela I.1- Lista original de substâncias prioritárias..... | 83 |
| Tabela II.1- Lista de substâncias prioritárias atual..... | 85 |
| Tabela V.1- CQO associada ao composto para a fase A..... | 103 |
| Tabela V.2- CQO associada ao composto para a fase B..... | 103 |
| Tabela VII.1- Resumo das áreas obtidas para a curva de calibração..... | 110 |
| Tabela IX.1- Resumo das áreas obtidas para o LOD e LOQ..... | 111 |
| Tabela XI.1- Resultados dos SST e SSV para a fase A..... | 115 |
| Tabela XI.2- Resultados dos SST e SSV para a fase B..... | 116 |
| Tabela XII.1- Ensaio 3: Valores base para determinar as constantes cinéticas do E2..... | 117 |
| Tabela XII.2- Ensaio 4: Valores base para determinar as constantes cinéticas do E2 e EE2..... | 117 |
| Tabela XII.3- Ensaio 5: Valores base para determinar as constantes cinéticas do E2 e EE2..... | 117 |
| Tabela XII.4- Ensaio 6: Valores base para determinar as constantes cinéticas do E2 e EE2..... | 118 |
| Tabela XIII.1- Ensaio 3: Valores base para determinar as constantes cinéticas da CQO..... | 119 |
| Tabela XIII.2- Ensaio 4: Valores base para determinar as constantes cinéticas da CQO..... | 119 |
| Tabela XIII.3- Ensaio 5: Valores base para determinar as constantes cinéticas da CQO..... | 119 |
| Tabela XIII.4- Ensaio 6: Valores base para determinar as constantes cinéticas da CQO..... | 120 |
| Tabela XIV.5- Resumo das áreas obtidas pelo teste direto com Acrodisc..... | 121 |
| Tabela XV.1- Resumo das áreas obtidas pelo teste direto com diferentes tipos de água..... | 123 |
| Tabela XVI.1- Resumos dos valores obtidos durante o ensaio de fotodegradação..... | 126 |
| Tabela XVII.1- Resumo das áreas obtidas para a curva de calibração direta..... | 128 |

Índice de Figuras

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2.1 Fontes de hormonas excretadas | 13 |
| Figura 2.2 Principal entrada de estrogénios para o meio aquático | 14 |
| Figura 2.3 Módulo de discos biológicos..... | 18 |
| Figura 5.1 Esquema da instalação: Reator de discos biológicos em modo <i>batch</i> | 29 |
| Figura 5.2 Instalação: Reator de discos biológicos em modo batch. | 30 |
| Figura 5.3 Esquema geral da metodologia da identificação dos compostos pelo método SBSE | 34 |
| Figura 5.4 Esquema de preparação da amostra. | 35 |
| Figura 5.5 Esquema de adsorção..... | 35 |
| Figura 5.6 Esquema de dessorção..... | 36 |
| Figura 5.7 Esquema de preparação da solução sonicada. | 36 |
| Figura 5.8 Barra SBSE. | 38 |
| Figura 6.1 Discos biológicos ao iniciar o 1º ensaio. | 45 |
| Figura 6.2 Crescimento de biofilme no 3º ensaio. | 46 |
| Figura 6.3 Crescimento de biofilme no 4º ensaio. | 47 |
| Figura 6.4 Crescimento de biofilme no 5º ensaio. | 47 |
| Figura 6.5 Crescimento de biofilme no 6º ensaio. | 48 |
| Figura 6.6 Curva de calibração do E2 utilizada na fase A e B dos ensaios..... | 49 |
| Figura 6.7 Curva de calibração do EE2 utilizada na fase B, ensaios 4, 5 e 6..... | 49 |
| Figura 6.8 Degradação dos fármacos e da CQO de cada ensaio..... | 52 |
| Figura 6.9 Curva de degradação do 17β-Estradiol ao longo dos ensaios de 3 a 6. | 54 |
| Figura 6.10 Curva de degradação do 17α-Etinilestradiol ao longo da fase B, ensaios 4 a 6. . | 56 |
| Figura 6.11- Ensaio 3: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação para E2 | 57 |
| Figura 6.12- Ensaio 4: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação para E2 e EE2..... | 57 |
| Figura 6.13- Ensaio 5: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação para E2 e EE2..... | 58 |
| Figura 6.14- Ensaio 6: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação para E2 e EE2..... | 58 |
| Figura 6.15- Ensaio 3 a 6: Ajustamento do modelo de 1ª ordem para o composto E2..... | 60 |
| Figura 6.16- Ensaio 3: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação da CQO | 62 |
| Figura 6.17- Ensaio 4: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação da CQO | 62 |
| Figura 6.18- Ensaio 5: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação da CQO | 62 |
| Figura 6.19- Ensaio 6: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação da CQO | 63 |
| Figura 6.20 Resultados dos ensaios de fotodegradação para o E2..... | 66 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 6.21 Resultados dos ensaios de fotodegradação para o EE2. | 66 |
| Figura 6.22 Curva de calibração direta para o E2 | 67 |
| Figura 6.23 Curva de calibração direta para o EE2..... | 68 |
| Figura 6.24- Curva de calibração do E2 com metanol e água desmineralizada..... | 69 |
| Figura 6.25- Curva de calibração do EE2 com metanol e água desmineralizada | 69 |

Anexos

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura VI.1- Aparelho de refluxo para a ebulição. Determinação CQO. | 106 |
| Figura VI.2- Montagem para titulação | 106 |
| Figura VII.1- Estufa | 108 |
| Figura VII.2- Mufla | 108 |
| Figura VIII.1- Cromatogramas da curva de calibração para o padrão de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 109 |
| Figura X.1- Cromatogramas para o E2 do ensaio 5. | 113 |
| Figura X.2- Cromatogramas para o EE2 do ensaio 5. | 113 |
| Figura XV.1- Cromatogramas da água desmineralizada | 123 |
| Figura XVI.1- Ensaio de fotodegradação: cromatogramas do dia 0 para o E2 e EE2 | 125 |
| Figura XVI.2- Ensaio de fotodegradação: cromatogramas do dia 5 para o E2 e EE2..... | 126 |
| Figura XVII.1- Cromatograma da curva de calibração direta para o padrão de 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 127 |
| Figura XVII.2- Espectro de absorção do padrão direto de 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 127 |
| Figura XVIII.1- Cromatogramas dos ensaios em branco. | 129 |
| Figura XVIII.2- Cromatogramas da solução de alimentação..... | 129 |

Lista de abreviaturas

| | |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AOP | Processos oxidativos avançados |
| APA, I. P. | Agência Portuguesa do Ambiente I. P. |
| CH ₃ CN | Acetonitrilo |
| CBO | Carência bioquímica de oxigénio |
| HCOOH | Ácido fórmico |
| CH ₃ OH | Metanol |
| COMMPS | <i>(Combined Monitoring-based e Modelling-based Priority Setting)</i> |
| CQO | Carência Química de Oxigénio |
| DDD | Diclorodifenildicloroetano |
| DDE | Diclorodifenildicloroetileno |
| DDT | Diclorodifeniltricloroetano |
| DES | Dietilestilbestrol |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| D.P. | Desvio padrão |
| DQA | Diretiva-Quadro da Água |
| E1 | Estrona |
| E2 | 17 β -Estradiol |
| E3 | Estriol |
| EE2 | 17 α -Etinilestradiol |
| EDC | Composto desregulador endócrino (<i>Endocrine Disruptors Compounds</i>) |
| EC | Comissão Europeia (<i>European Commission</i>) |
| EINECS | <i>(European Inventory Commercial Chemical Substances)</i> |
| EPA | <i>(Environmental Protection Agency)</i> |
| ETAR | Estação de tratamento de águas residuais |
| HAP | Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos |
| HClO | Ácido hipocloroso |
| HPLC-DAD | Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detetor de Fotodíodos (<i>High performance liquid chromatography with Diode-Array Detection</i>) |
| HRT | Tempo de retenção hidráulico |

| | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| LOD | Limite de Detecção |
| Log K_{ow} | Coefficiente de partição octanol-água |
| Log K_{oc} | Coefficiente de partição carbono-água |
| LOQ | Limite de Quantificação |
| NQA | Normas de Qualidade Ambiental |
| O ₃ | Ozono |
| PCB | Bifenilos Policlorados (<i>Polychlorinated Biphenyl</i>) |
| PDMS | Polidimetilsiloxano |
| PE | Poluentes emergentes |
| R | Coefficiente de correlação |
| Rpm | Rotações por minuto |
| SBSE | Extração sortiva em barra de agitação (<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>) |
| SP | Substância prioritária |
| SPP | Substância perigosa prioritária |
| SRT | Tempo de retenção de sólidos |
| SST | Sólidos Suspensos Totais |
| SSV | Sólidos Suspensos Voláteis |
| TBT | Tributilestanho |
| TCDD | 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina |
| TiO ₂ | Dióxido de Titânio |
| WHO | (<i>World Health Organization</i>) |

1 Introdução

A poluição da água é considerada uma prioridade nos domínios ambientais (Muñoz *et al.*, 2008). O impacto da poluição química, durante os últimos 30 anos, centrou-se essencialmente sobre os poluentes prioritários que apresentam riscos tanto para a saúde humana como para os ecossistemas aquáticos (Viladomat, 2010). A Diretiva-Quadro da Água (DQA) surgiu assim ao nível da União Europeia, como um instrumento da política da água, com estratégias que incidem sobre as substâncias prioritárias (Directiva 2000/60/CE), tendo algumas destas substâncias a capacidade de desregulação endócrina (Duarte, 2008).

A presença de compostos desreguladores endócrinos (EDC) no ambiente tem sido alvo de vários estudos (Comissão Europeia, 2001; Nogueira, 1999; Roast, 2007; U.S. Environmental Protection Agency, 1997). Em 1999 a Comissão Europeia apresentou uma *Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos* que incidia sobre a necessidade de “novos estudos, cooperação internacional, informação do público e medidas políticas adequadas, apresentando recomendações para ações a curto, médio e longo prazo” (Comissão Europeia, 2001).

Os EDC resultam essencialmente da atividade antropogénica (Auriol *et al.*, 2006; Cook *et al.*, 2016), e podem ser encontrados em águas superficiais, em águas subterrâneas, em sedimentos marinhos e no solo (Bila & Dezotti, 2007). A contaminação destas águas pode ocorrer a partir de duas fontes: fontes pontuais nomeadamente os efluentes das estações de tratamento de águas residuais (ETAR), efluentes industriais e efluentes de atividade agrícola; e fontes difusas através da infiltração destes compostos no solo que podem intersectar lençóis freáticos e recarga de aquíferos (Rosa, 2008).

Esta classe de micropoluentes pode provocar efeitos adversos ao nível do sistema endócrino, tanto na saúde humana como nos animais (Bila & Dezotti, 2007; Cook *et al.*, 2016). De acordo com os mesmos autores, estas consequências dependem não só da concentração destes compostos, mas também de outros fatores como a persistência no ambiente.

As principais classes dos compostos desreguladores endócrinos são os estrogénios naturais, os estrogénios sintéticos, os fitoestrogénios e os compostos químicos industriais. Sendo as duas primeiras as classes dos estrogénios, como as hormonas naturais e sintéticas, as mais nocivas para o ambiente e as principais classes encontradas nos efluentes de ETAR (Auriol *et al.*, 2006).

Estas hormonas após serem administradas, são excretadas pelo ser humano e conduzidas até às estações de tratamento (Bila & Dezotti, 2003). No entanto, os processos das ETAR não têm capacidade para remover completamente os compostos destas águas, sendo descarregados no meio aquático de forma contínua (Auriol *et al.*, 2006; Bila & Dezotti, 2007; Cook *et al.*, 2016).

De forma a mitigar os impactes dos EDC no ambiente, existem duas perspetivas que permitem maximizar a remoção de estrogénios nas ETAR, uma será otimizar as tecnologias dos processos

de tratamento existentes, uma vez que os compostos não são totalmente removidos; Ou implementar novas tecnologias nas ETAR que funcionem como tratamento final e permitam a sua remoção (Koh *et al.*, 2008; Metcalf & Eddy, 2003).

Esta dissertação utiliza as duas perspetivas, ou seja, permite testar o uso de processos já existentes nomeadamente os discos biológicos, mas simulando um tratamento avançado. Este estudo dá continuidade às experiências realizadas por Fernandes, (2016) e Vicente, (2016), mas incide essencialmente sobre o comportamento dos compostos com base nos parâmetros em estudo.

2 Estado de Arte

2.1 Poluentes Prioritários

2.1.1 Definição

A Lei da Água, Lei n.º 58, de 29 de Dezembro de 2005, transpõe para ordem jurídica nacional a Diretiva Quadro da Água (2000/60/CE), que apresenta a definição dos conceitos de substância prioritária (SP) e de substância perigosa prioritária (SPP):

Substâncias prioritárias: “as substâncias definidas como tal em normativo próprio por representarem risco significativo para o ambiente aquático ou por seu intermédio, (...)” (Lei n.º 58/2005).

Substâncias perigosas prioritárias: “as substâncias identificadas como apresentando um risco acrescido em relação às substâncias prioritárias, sendo a sua seleção feita com base em normativo próprio relativo a substâncias perigosas ou nos acordos internacionais relevantes” (Lei n.º 58/2005).

2.1.2 Identificação de poluentes prioritários

De forma a combater a poluição da água e alcançar o bom estado químico das águas superficiais, a DQA apresenta estratégias que visam, de forma gradual, reduzir as emissões, descargas e perdas de substâncias prioritárias e também eliminar as emissões, descargas e perdas de substâncias perigosas prioritárias. Dentro das estratégias incluem-se a sua identificação e o estabelecimento de Normas de Qualidade Ambiental (NQA) (Diretiva 2000/60/CE).

A seleção de SP é feita através do procedimento COMMPS (*Combined Monitoring-based e Modelling-based Priority Setting*) que permite definir uma hierarquia de prioridades. A primeira etapa deste procedimento consistiu em selecionar todas as substâncias candidatas a SP obtendo-se no final, 658 elementos (Pio *et al.*, 2000).

Segundo o mesmo autor, a metodologia que atribui prioridade às substâncias “que apresentam um risco significativo para ou através do meio aquático”, tem em conta os seguintes pontos:

- O perigo intrínseco da substância especialmente a ecotoxicidade aquática e toxicidade para o homem;
- Quando os dados de monitorização indicam contaminação ambiental alargada;
- E outros fatores que indicam possibilidade de contaminação ambiental alargada, nomeadamente o volume de uso, a produção da substância e os padrões de uso.

2.1.3 Lista de poluentes prioritários

A primeira lista de substâncias prioritárias, com 33 elementos, foi definida através da Decisão n.º 2455/2001/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Novembro de 2001 (Decisão n.º 2455/2001/CE). As 33 SP incluem 14 elementos que pertencem à lista do EINECS (*European Inventory Commercial Chemical Substances*), 10 fitofármacos, dois biocidas, quatro metais entre outros (Pio *et al.*, 2000).

Dentro das 33 SP estão ainda incluídas 13 SPP, pelas suas características “à persistência, à bioacumulação e à toxicidade” (Comissão Europeia (DG Ambiente), 2008) e 11 substâncias com provas de desregulação endócrina ou de potencial desregulação endócrina (Comissão Europeia, 2001). O Anexo I apresenta a primeira lista de substâncias prioritárias.

Posteriormente a Diretiva n.º 2013/39/EU alterou a DQA (Diretiva 2000/60/CE) e a NQA (2008/105/CE). Esta Diretiva mais recente, que diz respeito às SP no domínio da política da água, nomeadamente na revisão da lista de substâncias prioritárias, permitiu a identificação de novas substâncias existentes (Diretiva 2013/39/UE). Às 33 SP foram adicionados 12 produtos químicos, tendo atualmente 45 elementos esta lista, dos quais 21 são SPP (Parlamento Europeu, 2013). A lista atual de substâncias prioritárias está presente no Anexo II.

2.1.4 Lista de vigilância de poluentes prioritários

Muitos dados de monitorização sobre substâncias em especial poluentes emergentes (PE), que podem apresentar risco significativo para o meio aquático, são de fraca qualidade o que não permite uma identificação futura de substâncias prioritárias. De forma a melhorar tais condições, isto é, obter dados com elevada qualidade sobre as suas concentrações no meio aquático, criou-se um mecanismo (lista de vigilância) que consiste na monitorização de 10 substâncias (Diretiva 2013/39/UE).

Assim e através da informação disponível, a lista foi elaborada com base no risco que estas apresentam no domínio da água para a União Europeia e aquando os dados não são suficientes. A informação disponível teve em conta a Diretiva 2000/60/CE, nomeadamente o artigo 16.º, n.º 4 e 5, o artigo 5.º e 8.º, projetos de investigação e “dados sobre os volumes de produção, padrões de utilização, propriedades intrínsecas, concentrações no ambiente e feitos das substâncias (...)”. Esta lista deve ser atualizada de dois em dois anos e a monitorização contínua de uma substância não pode exceder quatro anos (Diretiva 2013/39/UE).

A primeira lista de vigilância presente na Tabela 2.1 inclui PE e substâncias farmacêuticas, como a hormona natural 17β-Estradiol (E2) e a hormona sintética 17α-Etinilestradiol (EE2), ambas com propriedades de desregulação endócrina (Parlamento Europeu, 2013). A integração do E2 e do EE2 nesta lista tem como objetivo a recolha de dados de monitorização, e facilitar deste modo a toma de medidas adequadas face ao risco que apresentam (Diretiva 2013/39/UE). A Agência

Portuguesa do Ambiente I. P. (APA, I. P.), é a entidade responsável pela monitorização destes elementos, que deu início em 2015 e irá decorrer num período mínimo de 12 meses (Decreto-Lei n.º 218/2015).

Tabela 2.1 Lista de vigilância de substâncias para monitorização (Decisão de Execução (UE) 2015/495).

| Nome da substância/grupo de substâncias | Número CAS (1) | Número UE (2) | Método analítico indicativo (3) (4) (5) | Limite de deteção máximo aceitável do método (ng.L ⁻¹) |
|--------------------------------------------|--------------------|---------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 17alfa-etinilestradiol (EE2) | 57-63-6 | 200-342-2 | SPE grande volume — LC-MS-MS | 0,035 |
| 17beta-estradiol (E2), Estrona (E1) | 50-28-2 53-16-7 | 200-023-8 | SPE — LC-MS-MS | 0,4 |
| Diclofenac | 15307-86-5 | 239-348-5 | SPE — LC-MS-MS | 10 |
| 2,6-ditert-butil-4-metilfenol | 128-37-0 | 204-881-4 | SPE — GC-MS | 3 160 |
| 4-metoxicinamato de 2-etil-hexilo | 5466-77-3 | 226-775-7 | SPE — LC-MS-MS ou GC-MS | 6 000 |
| Antibióticos da família dos macrólidos (6) | | | SPE — LC-MS-MS | 90 |
| Metiocarbe | 2032-65-7 | 217-991-2 | SPE — LC-MS-MS ou GC-MS | 10 |
| Neonicotinoides (7) | | | SPE — LC-MS-MS | 9 |
| Oxadiazão | 19666-30-9 | 243-215-7 | LLE/SPE — GC-MS | 88 |
| Trialato | 2303-17-5 | 218-962-7 | LLE/SPE — GC-MS ou LC-MS-MS | 670 |

(1) Chemical Abstracts Service.

(2) Número da União Europeia — inexistente para algumas substâncias.

(3) Para assegurar a comparabilidade dos resultados provenientes de diferentes Estados-Membros, todas as substâncias devem ser monitorizadas em amostras integrais de água.

(4) Métodos de extração:

LLE — extração líquido-líquido; SPE — extração em fase sólida

Métodos analíticos:

GC-MS — Cromatografia gasosa-espectrometria de massa; LC-MS-MS — Cromatografia em fase líquida (em tandem) espectrometria de massa de triplo quadropólo

(5) Para a monitorização do 4-metoxicinamato de 2-etil-hexilo na matéria particulada em suspensão (SPM) ou no sedimento (dimensão < 63 µm), é indicado o seguinte método analítico: SLE (extração sólido-líquido) — GC-MS, com um limite máximo de deteção de 0,2 mg/kg.

(6) Eritromicina (n.º CAS 114-07-8, n.º UE 204-040-1), claritromicina (n.º CAS 81103-11-9), azitromicina (n.º CAS 83905-01-5, n.º UE 617-500-5) n.º CAS 114-07-8, n.º UE 204-040-1, claritromicina (n.º CAS 81103-11-9), azitromicina (n.º CAS 83905-01-5, n.º UE 617-500-5)

(7) Imidaclopride (n.º CAS 105827-78-9/138261-41-3, n.º UE 428-040-8), tiaclopride (n.º CAS 111988-49-9), tiametoxame (n.º CAS 153719-23-4, n.º UE 428-650-4), clotianidina (n.º CAS 210880-92-5, n.º UE 433-460-1), acetamipride (n.º CAS 135410-20-7/160430-64-8).

2.2 Desreguladores endócrinos

2.2.1 Definição

Os Compostos Disruptores Endócrinos são denominados por *Endocrine Disruptors Compounds* (EDCs) na literatura anglo-saxónica. O seu termo foi utilizado pela primeira vez em 1991, no Centro de Conferências Wingspread em Racine, Wisconsin, nos Estados Unidos (Eldridge & Stevens, 2010; Fernandes, 2012).

De acordo com Birkett & Lester, (2003) e Eldridge & Stevens, (2010) uma das definições mais claras de desregulador endócrino foi proposta no Workshop Europeu em 1996, que define: ¹Um disruptor endócrino é uma substância exógena que causa efeitos adversos na saúde de organismos intactos, ou nos seus descendentes, subsequentes a alterações na função endócrina.

Em 1997 a agência de proteção do ambiente dos Estados Unidos, *Environmental Protection Agency* (USEPA), propôs uma definição mais detalhada sobre estes compostos: ² Um agente exógeno que interfere com a síntese, ligação, ação ou eliminação de hormonas naturais do corpo que são responsáveis pela manutenção de homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento (U.S. Environmental Protection Agency, 1997).

Mais tarde, diferentes organizações a nível mundial, como a *World Health Organization* (WHO) e *European Commission* (EC), utilizaram outro conceito. A necessidade de criar uma definição para estes compostos surgiu pela sua elevada presença no meio ambiente. Apesar de existirem várias definições na bibliografia, atualmente, esta ainda não é consensual (Howard *et al.*, 2001; Rosa, 2008).

2.2.2 Identificação e classificação de EDC

Com o objetivo de identificar estes compostos, a Comissão Europeia no ano 2000, propôs uma lista com 564 substâncias, de modo a avaliar o seu papel como desreguladores endócrinos. Dentro das 564 substâncias, 66 apresentaram evidências de desregulação endócrina, 52 provas de potencial desregulação, 435 não tinham dados suficientes para a toma de decisão e 11 não foram consideradas como desreguladores endócrinos (Comissão Europeia, 2001).

Foram realizados novos estudos em 2002 e 2005 com o objetivo de determinar as propriedades de desregulação endócrina dos compostos com dados insuficientes e identificar também novos compostos com essas propriedades. Atualmente, a lista inclui 428 substâncias, das quais 194 apresentam evidência de desregulação endócrina, 125 evidência de potencial desregulação e 109 não apresentam dados suficientes para a tomada de decisão (European Commission, 2007).

As substâncias com propriedades de desregulação endócrina podem ser classificadas em duas classes, a classe de substâncias naturais e a classe de substâncias sintéticas. A Tabela 2.2 apresenta as principais substâncias de cada classe de EDC.

¹ “An endocrine disrupter is an exogenous substance that causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, subsequent to changes in endocrine function” (Birkett & Lester, 2003; Eldridge & Stevens, 2010).

² “An exogenous agent that interferes with the synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones in the body that are responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development, and/or behavior” (U.S. Environmental Protection Agency, 1997).

Tabela 2.2 Principais substâncias de cada classe de EDC.

| Tipos de substância | Classe | Exemplos de compostos | Características | Referência | |
|---------------------|----------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Naturais | Não esteróides | Fitoestrogénio | Isoflavonas | São compostos encontrados em plantas. Possuem atividade similar aos estrogénios, mas mais fraca. | (Antunes, 2008) |
| | Esteróides | Progesterona Testosterona Estrogénios naturais | 17β-estradiol (E2) Estrona (E1) | Hormonas naturais muito utilizadas nas indústrias para efeitos de acelerar o crescimento de animais. | |
| Sintéticas | Esteróides | Estrogénios sintéticos | DES | Hormonas sintéticas utilizadas a nível farmacêutico para contraceptivos orais (EE2) e prevenção de aborto (DES). | (Bila & Dezotti, 2007) |
| | | | 17α-etinilestradiol (EE2) | Utilizadas na agricultura e inclui o maior grupo de substância classificadas como EDC. | |
| | Não esteróides | Substâncias químicas artificiais | Bifenilos Policlorados (PCB) | Utilizados na indústria devido à sua elevada estabilidade. Apresentam atividade estrogénica e capacidade de bioacumulação. | (Antunes, 2008); (Bila & Dezotti, 2007) |
| | | | Dioxinas | Utilizadas na indústria que resultam da combustão de outros materiais. São compostos persistentes e com capacidade de bioacumulação. | (Antunes, 2008) |
| | | | Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP) | Utilizados na indústria com potencial de bioacumulação e atividade estrogénica. | (Bila & Dezotti, 2007) |
| | | | Ftalatos | Utilizados na indústria química como aditivos de certos plásticos. São persistentes no ambiente e contêm atividade estrogénica entre 6 a 7 vezes menor que o (E2). | (Antunes, 2008); (Bila & Dezotti, 2007) |
| | | Bisfenol A | Utilizados na indústria para produção de plásticos. Contêm atividade estrogénica entre 4 a 6 vezes menor que o (E2). | (Antunes, 2008) | |

2.2.3 Problemática dos EDC

A preocupação com EDCs tem aumentado nos últimos anos. Segundo Bila & Dezotti, (2007) vários estudos relatam que estes compostos mesmo presentes em baixas concentrações no ambiente, entre $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} , podem causar alterações no sistema endócrino. Contudo, os efeitos que os EDC provocam no ambiente não dependem apenas da sua concentração.

Outras características que lhes estão associadas e determinam os seus efeitos são: a persistência no ambiente, lipofilicidade, bioacumulação, tempo de exposição e mecanismos de biotransformação, que podem resultar em subprodutos ainda mais nocivos (Bila & Dezotti, 2007; Cook *et al.*, 2016; Venade, 2013).

2.2.4 Impactes dos EDC nos seres vivos

Em certas espécies a associação entre a exposição aos EDC e as alterações no sistema endócrino é claro, ao contrário do que acontece em outros casos (de Mes *et al.*, 2005). Até agora, a análise dos dados em humanos não forneceu uma relação clara e evidente entre a exposição dos EDC e os efeitos adversos na saúde (Comissão Europeia, 1999; Damstra *et al.*, 2002). As principais dificuldades surgem ao nível do tempo, nomeadamente em que os dados são recolhidos em períodos diferentes, através de modelos e condições diferentes, e ao nível da exposição que é relativa a várias substâncias e efetuada por diferentes modos (Damstra *et al.*, 2002; Rosa, 2008).

A Tabela 2.3 apresenta os principais impactes a que os animais estão sujeitos quando expostos aos EDC e a Tabela 2.4 apresenta os principais impactes a que o homem está sujeito quando exposto também aos EDC.

Tabela 2.3 Impactes dos EDC sobre mamíferos, pássaros, répteis, peixes e invertebrados.

| | Espécies | EDC em exposição | Impactos | Referência |
|----------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Mamíferos | Focas e Baleias | Organoclorados, PCBs | Distúrbios na fertilidade. | (Howard <i>et al.</i> , 2001) |
| | Ursos pretos, polares e cinzentos | | Diminuição da população que pode estar associada à diminuição da capacidade reprodutiva. Patologias no sistema reprodutor e imunológico. | (Rosa, 2008) |
| Pássaros | Falcão peregrino | DDT | Cascas de ovos mais frágeis e alteração no desenvolvimento das gónadas. | (World Health Organization, 2002) e (Howard <i>et al.</i> , 2001) |
| | Gaivotas | DDT | Aumento da mortalidade precoce, nidificação com elementos do mesmo sexo e feminização e masculinização. | (Nogueira, 1999) e (Howard <i>et al.</i> , 2001) |
| | | PCB | Patologias no sistema reprodutor e no desenvolvimento em geral. | (Rosa, 2008) |
| Répteis | | Organoclorados | Anomalias nas gónadas e no desenvolvimento. | (World Health Organization, 2002) |
| | Crocodilos e Jacarés | DDD, DDE e Cloro DDT | Malformações a nível genital e diminuição da população juvenil. | (Nogueira, 1999) e (Rosa, 2008) |
| Peixes | Salmão | | Diminuição da taxa de reprodução. | (Nogueira, 1999) |
| | Linguado | Químicos dos efluentes industriais e domésticos de ETAR | Alteração da função endócrina reprodutiva e contribuição para a alteração no desenvolvimento reprodutivo: feminização/intersexualidade dos peixes machos. | (World Health Organization, 2002) e (Howard <i>et al.</i> , 2001) |
| | Truta arco-íris | Estrogénios | Casos de "intersex", produção de vitelogenina e desenvolvimento testicular anormal. | (Howard <i>et al.</i> , 2001) |
| Invertebrados | Gastrópodes | | Casos de pseudohermafroditismo ou "imposex". | (Nogueira, 1999) |
| | Moluscos | TBT (biocida) | Casos de "imposex" e "intersex" que resulta numa virilização das fêmeas. | (Rosa, 2008) e (Howard <i>et al.</i> , 2001) |

Tabela 2.4 Impactes dos EDC sobre o homem.

| | EDC em exposição | Efeito | Impactes | Referência |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Efeitos Cancerígenos | Compostos antropogénicos com propriedades de desregulação endócrina | Cancro dos testículos e da próstata. Estes EDC também estão associados ao sistema reprodutivo masculino: Diminuição da quantidade e qualidade de esperma ¹ . | | (Rosa, 2008) |
| | | Disfunções ao nível dos ovários. | | (Nogueira, 1999) |
| Efeitos Reprodutivos | DDT, PCBs, Metais pesados entre outros | Alterações no sistema reprodutor de adultos. | | (Rosa, 2008) |
| | | Infertilidade nas mulheres, malformações congénitas nos fetos, entre outros. | | (Nogueira, 1999) |
| Efeitos Neurológicos | PCBs | Interferência com o Sistema Nervoso Central. | Alteração da função neurológica (memória e atenção) em crianças, cujas mães comeram peixes contaminados por este EDC. | |
| | PCBs, DDT, Dioxinas, Esteróides sintéticos entre outros | Efeitos sobre as glândulas endócrinas: tireóide, pâncreas, eixo hipotálamo-hipófise e órgãos sexuais que pode alterar o estado hormonal e afetar o sistema nervoso. | Alteração da taxa metabólica e dos comportamentos reprodutivos. Alteração do desenvolvimento psicomotor e da função sensorial. | (Howard <i>et al.</i> , 2001) |
| Efeitos Imunológicos | DES | Aumento das taxas de síndrome autoimune. | | |
| | DES, TCDD, PCBs, Organoclorados, Metais pesados entre outros | Alteração dos fenótipos. | | |

¹ Não há dados concretos sobre a diminuição da qualidade de esperma e a exposição aos EDC (World Health Organization, 2002).

“Vários estudos descreveram os potenciais efeitos dos EDC nos humanos e em várias espécies de organismos, dando sempre muita ênfase à necessidade de um melhor entendimento e conhecimento sobre a presença e persistência de EDC” (Rosa, 2008).

2.2.5 Poluentes Prioritários com propriedades de desregulação endócrina

Dentro da lista atual de poluentes prioritários, abordados no subcapítulo anterior, alguns elementos possuem ainda propriedades de desregulação endócrina. Os poluentes prioritários com características de EDC estão presentes na Tabela 2.5. A tabela foi construída com base na informação fornecida pelo relatório *Endocrine disruption horizon scanning: priority and new endocrine disrupting chemicals* (Roast, 2007).

Tabela 2.5 Poluentes Prioritários com propriedades de desregulação endócrina.

| Número | Nome da substância prioritária | Substância Perigosa Prioritária | Razão | Persistência |
|--------|------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| 1 | Alacloro | Não | Elevado volume de produção | Não persistente |
| 3 | Atrazina | Não | Elevado volume de produção | Persistente |
| 5 | Éteres difenílicos bromados | Sim* | | |
| 6 | Cádmio e compostos de cádmio | Sim | Elevado volume de produção/ Metal | Metal |
| 8 | Clorfenvinfos | Não | | Não persistente |
| 9 | Clorpirifos (Clorpirifos -etilo) | Não | | Não persistente |
| 12 | Ftalato de di(2-etil-hexil) (DEHP) | Sim | Elevado volume de produção | Não persistente |
| 13 | Diurão | Não | Elevado volume de produção | Não persistente |
| 16 | Hexaclorobenzeno | Sim | Elevado volume de produção | Persistente |
| 18 | Hexaclorociclohexano | Sim | | Persistente |
| 20 | Chumbo e compostos de chumbo | Não | Elevado volume de produção/ Metal | Metal |
| 21 | Mercúrio e compostos de mercúrio | Sim | Metal | Metal |
| 24 | Nonilfenol | Sim* | Elevado volume de produção | Não persistente |
| 25 | Octilfenóis ¹ | Não | | |
| 26 | Pentaclorobenzeno | Sim | | Persistente |
| 27 | Pentaclorofenol | Não | | Persistente |
| 28 | Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ² | Sim | | |
| 29 | Simazina | Não | Elevado volume de produção | Não persistente |
| 30 | Compostos de tributilestanho | Sim* | Metal | Metal |
| 31 | Triclorobenzenos | Não | | Não persistente |
| 33 | Trifluralina | Sim | | Persistente |
| 34 | Dicofol | Sim | Elevado volume de produção | Persistente |
| 37 | Dioxinas e compostos semelhantes a dioxinas | Sim* | | |
| 41 | Cipermetrina ³ | Não | | Não persistente |
| 42 | Diclorvos | Não | | Não persistente |
| 44 | Heptacloro | Sim | Elevado volume de produção | Persistente+ |
| 45 | Terbutrina | Não | | Persistente |

* Apenas algumas substâncias

¹ Octilfenol (n.º CAS 1806-26-4, n.º UE 217-302-5), incluindo o isómero 4-(1,1',3,3'-tetrametilbutil)fenol (n.º CAS 140-66-9, n.º UE 205-426-2).

² Inclui o benzo(a)pireno (n.º CAS 50-32-8, n.º UE 200 -028 -5), mas não o antraceno, o fluoranteno e o naftaleno, que são enumerados separadamente.

³ O n.º CAS 52315-07-8 refere-se a uma mistura de isómeros de cipermetrina, sendo o isómero zeta -cipermetrina (n.º 52315-07-8) o único desregulador endócrino.

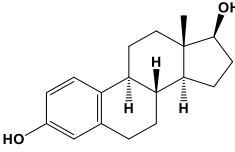
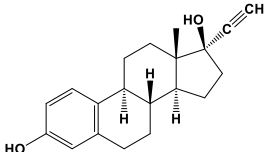
Relativamente à lista de vigilância dos poluentes prioritários apenas o grupo esteróide apresenta propriedades de desregulação endócrina. Este grupo inclui o 17 α -Etinilestradiol (EE2), 17 β -Estradiol (E2) e o Estrona (E1) (Roast, 2007). Alguns elementos que compõem este grupo serão fundamentais para a realização deste trabalho nomeadamente, o 17 α -Etinilestradiol e o 17 β -Estradiol.

2.3 Caracterização do grupo estradiol (E2 e EE2)

2.3.1 Propriedades químicas

Como já referido, ambas as hormonas são classificadas como EDC e estão incluídas na lista de vigilância de poluentes prioritários. A Tabela 2.6 apresenta as propriedades químicas de ambos os compostos.

Tabela 2.6 Propriedades químicas do 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol.

| Nome | 17 β -Estradiol (E2) | 17 α -Etinilestradiol (EE2) | Referência |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Estrutura química |  |  | |
| Fórmula | C ₁₈ H ₂₄ O ₂ | C ₂₀ H ₂₄ O ₂ | |
| CAS ¹ -nº | 50-28-2 | 57-63-6 | |
| Peso molecular (g/mol) | 272,4 | 296,4 | |
| Solubilidade em água (mg.L ⁻¹) | 12,96 | 4,83 | (Birkett & Lester, 2003) |
| Log K _{ow} ² | 3,94 | 4,15 | (Birkett & Lester, 2003); (de Mes <i>et al.</i> , 2005) |
| Log K _{oc} ³ | 5,28 | 5,22 | (de Mes <i>et al.</i> , 2005) |
| pKa ⁴ | 10,4 | 10,7 | |

¹- Chemical Abstract services; ²- Coeficiente de partição octanol-água; ³- Coeficiente de partição carbono-água; ⁴- Constante de acidez.

O coeficiente de partição octanol-água (Log K_{ow}) permite avaliar a associação de um composto com a fase sólida, pode definir-se como a razão da sua concentração no equilíbrio, após dissolução num sistema de duas fases, a água e octanol, dois solventes imiscíveis. O seu valor é diretamente proporcional com a lipofilicidade e inversamente proporcional com a solubilidade (Birkett & Lester, 2003; Silva & Ferreira, 2003). Outro parâmetro de adsorção é o coeficiente de partição carbono-água (Log K_{oc}) que pode ser calculado a partir do primeiro coeficiente ou através da solubilidade (Birkett & Lester, 2003).

Analisando os dois compostos relativamente aos coeficientes anteriores, a hormona natural 17 β -Estradiol apresenta um valor relativamente mais baixo quando comparada com a hormona sintética 17 α -Etinilestradiol, indicando assim uma menor absorção a superfícies sólidas e consequentemente uma maior solubilidade. No entanto, segundo Birkett & Lester, (2003) estes compostos caracterizam-se predominantemente por serem hidrofóbicos de baixa volatilidade, isto é, quando dissolvidos podem ligar-se a sólidos em suspensão. Este mecanismo é importante especialmente para o EE2, mais estável e persistente relativamente ao E2.

O 17 β -Estradiol E2 pode ser convertido em Estrona E1, e este por sua vez pode ser 4% convertido em Estriol E3 o metabolito final (Birkett & Lester, 2003). O E2 é até 12 e 80 vezes mais ativo que o E1 e o E3 respetivamente (Américo *et al.*, 2012). Cook *et al.*, (2016) considera que o metabolito final apenas tem 10% da potência do E2.

2.3.2 Origens e funções

Os estrogénios naturais são hormonas produzidas pelas glândulas humanas essencialmente pelos ovários e testículos que atuam ao nível do crescimento, desenvolvimento, diferenciação e função dos tecidos periféricos do sistema reprodutivo (de Mes *et al.*, 2005). São das hormonas mais poderosas, sendo que uma pequena quantidade pode induzir o desenvolvimento de características sexuais femininas (Duarte, 2008). No entanto, vão também atuar no sistema imunológico, no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central (Américo *et al.*, 2012; de Mes *et al.*, 2005; Yilmaz & Kadioglu, 2013) nomeadamente em diminuir os níveis de colesterol e o risco de osteoporose (Duarte, 2008).

Esta hormona natural para além de ser produzida pelo ser humano tem ainda um papel importante para fins medicinais. O seu uso farmacêutico pode ser aplicado para terapia de reposição hormonal, distúrbios ginecológicos e tratamento de cancro da mama e da próstata. É também utilizado na medicina veterinária para promover o crescimento (Johnson, 2002).

A hormona sintética 17 α -Ethinilestradiol, também tem sido utilizada para fins medicinais, nomeadamente em distúrbios ginecológicos e na reposição hormonal na menopausa (Américo *et al.*, 2012; Johnson, 2002). No entanto, a sua maior aplicação é em contraceptivos orais, onde a concentração desta hormona na pilula pode variar entre 20 a 50 μ g, sendo 35 μ g o valor mais prescrito (Johnson, 2002).

2.3.3 Transporte para o ambiente

A principal entrada destes compostos no ambiente aquático é através dos excreta quer humanos quer de alguns animais como suínos e bovinos. A quantidade hormonal excretada vai depender do sexo, idade, estado fisiológico, estado hormonal (menopausa, menstruação, gravidez) e do uso da pilula contraceptiva (Américo *et al.*, 2012; Johnson, 2002). Na Figura 2.1 apresentam-se as percentagens das hormonas excretadas pelo ser humano.

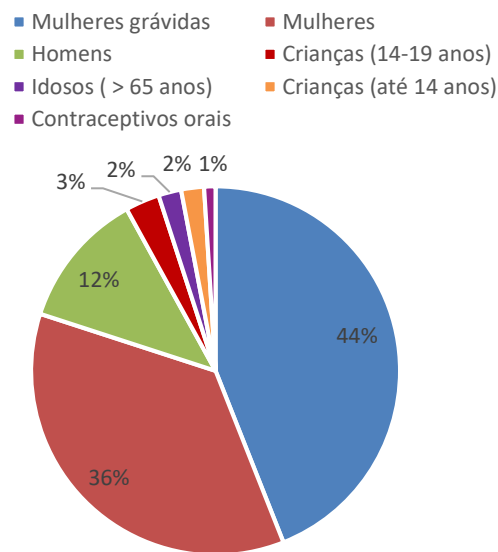


Figura 2.1 Fontes de hormonas excretadas (Adaptado de de Mes *et al.*, 2005).

A hormona E2 quando utilizada para efeitos terapêuticos, apresenta uma carga extra para o ambiente inferior a 5% relativamente à excreção natural (de Mes *et al.*, 2005; Johnson, 2002).

Relativamente à hormona EE2, de uma dose diária é excretado através da urina entre 22 a 50%, e pelas fezes 30%. De uma forma geral, este composto contribui apenas com 1% para a quantidade total de estrogénios eliminados, no entanto, é caracterizado por ser mais persistente no ambiente quando comparado com o 17 β -Estradiol (de Mes *et al.*, 2005). Outra forma de entrada mais remota do EE2 para o ambiente é através da eliminação inadequada de medicamentos (Américo *et al.*, 2012; Johnson, 2002).

2.3.4 Problemática no ambiente

Posteriormente à sua exteriorização, estas hormonas têm como destino as estações de tratamento de água residual. Os processos convencionais das ETAR foram inicialmente concebidos para promover a remoção de carga orgânica, de nutrientes, de sólidos suspensos e de carga microbiológica, mas atualmente novos desafios se colocam sendo que aspetos associados à toxicidade e à saúde pública assumiram uma dimensão muito significativa, impondo a necessidade de encontrar formas de acomodar a remoção destes novos compostos (Antunes, 2008).

Em todo o mundo, concentrações detetáveis do 17 β -Estradiol e do 17 α -Ethinilestradiol são encontrados nos efluentes das ETAR e introduzidos de forma contínua no ambiente (Bila & Dezotti, 2007). A presença destes compostos nos efluentes são as principais fontes de entrada de estrogénios para o meio aquático (Bila & Dezotti, 2007; de Mes *et al.*, 2005) que podem ser encontrados em águas superficiais, como rios e estuários (Auriol *et al.*, 2006). A Figura 2.2 esquematiza a entrada dos compostos para o ambiente.

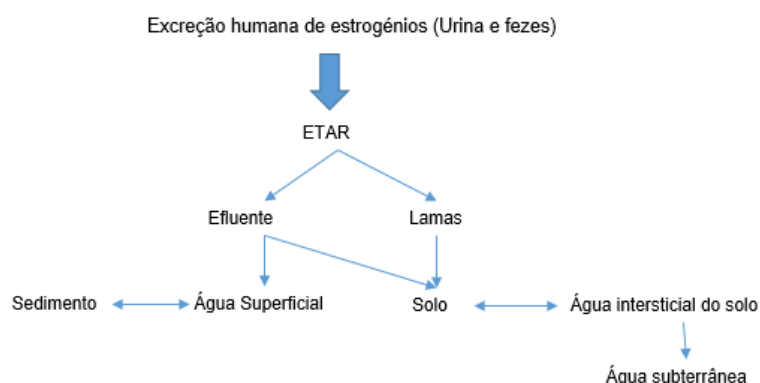


Figura 2.2 Principal entrada de estrogénios para o meio aquático (Adaptado de de Mes *et al.*, 2005).

As concentrações presentes em afluentes de ETAR variam de acordo com a localização geográfica e a população servida. Por outro lado, as concentrações efluentes variam de acordo com os processos de tratamento existentes em cada ETAR (Cook *et al.*, 2016). Na Tabela 2.7 apresentam-se dados relativos a concentrações, afluentes e efluentes de ETAR de vários países.

Tabela 2.7 Concentração de E2 e EE2 em afluentes e efluentes de ETAR (Adaptado de Can *et al.*, 2014).

| Composto | País | Concentração (ng.L ⁻¹) | |
|----------------------------|------------|------------------------------------|------------------------|
| | | Afluente | Efluente |
| 17β-Estradiol | Inglaterra | - | 2,7 - 48 |
| | Alemanha | 22,7 | 4,6 |
| | Espanha | < 5 - 30,4 | < 5 - 14,5 |
| | França | 11,1 - 17,4 | 4,5 - 8,6 |
| | Holanda | 17 - 150 | < 0,8 |
| | Itália | 0,5 - 20 | n.d. ¹ - 7 |
| | Itália | 4,0 - 25 | 0,35 - 3,5 |
| | Japão | 13,3 - 25,8 | 0,49 - 16,7 |
| | Japão | 3,9 - 23,4 | < LOD ² - 7 |
| | Áustria | 14 - 125 | < LOD - 30 |
| | Suíça | 4,9 - 11 | 0,5 - 1 |
| 17α-Etinilestradiol | Inglaterra | - | < LOD - 4,3 |
| | Espanha | < 5 | < 5 |
| | França | 4,9 - 7,1 | 2,7 - 4,5 |
| | Holanda | < 0,3 - 5,9 | < 0,3 - 2,6 |
| | Itália | 0,5 - 10 | n.d. - 2,2 |
| | Itália | 0,4 - 13 | n.d. - 2,2 |
| | Japão | < LOD | < LOD |
| | Áustria | 3,0 - 70 | < LOD - 5,0 |
| | Suíça | 0,7 - 5,2 | ≤ LOD - 2,8 |

¹ - Sem dados; ² - Limite de deteção

A persistência destes compostos no ambiente poderá estar associada com a atividade estrogénica, que tem o valor de 1 para o E2 e de 2 para o EE2, e pode ser definida com a seguinte ordem crescente: E1, E2 e EE2 (de Mes *et al.*, 2005; Vicente, 2016). De acordo com a

perigosidade no ambiente, que envolve três critérios, a persistência, a bioacumulação e a toxicidade o EE2 numa escala de 0 a 9 tem uma classificação de 9 valores (Vicente, 2016).

2.4 Sistema de remoção de fármacos em ETAR

De acordo com Birkett & Lester, (2003) as eficiências de remoção dos sistemas de tratamento das ETAR dependem das propriedades físicas e químicas dos poluentes e do tipo de tratamento envolvido. Outros parâmetros que também vão influenciar o mecanismo de remoção são: o tempo de retenção hidráulico (HRT), o tempo de retenção de sólidos (SRT), a temperatura e o pH (Birkett & Lester, 2003; Chambel, 2011).

2.4.1 Processos convencionais

Como já referido, as estações de tratamento não tinham como objetivo a remoção de estrogénios, no entanto, através dos processos que as constituem, verifica-se uma diminuição na concentração destes compostos. De forma geral, a remoção numa ETAR convencional pode ocorrer através de quatro vias: 1) Adsorção de sólidos em suspensão, de gorduras e óleos presentes na água residual; 2) Biodegradação aeróbia ou anaeróbia; 3) Degradação química recorrendo a processos de hidrólise; e 4) Volatilização (Birkett & Lester, 2003), ainda que segundo de Mes *et al.*, (2005) esta última via não será significativa na remoção dos compostos em estudo.

Os processos convencionais numa ETAR incluem três etapas base: O tratamento preliminar, o tratamento primário e o tratamento secundário, seguindo-se em alguns casos o tratamento terciário (de Mes *et al.*, 2005).

Tratamento Preliminar - Nesta primeira etapa removem-se os materiais flutuantes e os sólidos de grandes dimensões (Rosa, 2008). A remoção de E2 e EE2, se existir, ocorre em pequenas quantidades consideradas insignificantes (Koh *et al.*, 2008; Rosa, 2008).

Tratamento Primário - A remoção nesta etapa ocorre através da adsorção aos sólidos, que depende da hidrofobicidade dos compostos (Koh *et al.*, 2008), da temperatura, da quantidade de sólidos removidos, das características de sedimentação das partículas, do tempo de retenção e da carga hidráulica (Rosa, 2008).

Koh *et al.*, (2008) cita alguns estudos que concluem que o E1 e o E2 não são removidos ou, se são é de forma pouco significativa. No entanto, uma ETAR do Japão verificou uma remoção de 10% para o E2 (Ifelebuegu, 2011), e uma ETAR na Austrália uma remoção de 14% e 5% para o E1 e E2, respetivamente (Braga *et al.*, 2005).

Tratamento Secundário - Os processos biológicos mais comuns nesta etapa são os processos aeróbios, apesar de existirem também processos anaeróbios (Rosa, 2008). A capacidade de

remoção nestes processos está associada à biodegradação ou adsorção à biomassa (Chambel, 2011). De acordo com os dados atuais o tratamento secundário caracteriza-se por ser a etapa mais importante para a remoção dos estrogênios, quando comparada com as etapas anteriores. A Tabela 2.8 apresentada algumas opções para este tipo de tratamento e a respectiva percentagem de remoção.

Tabela 2.8 Eficiências de remoção no tratamento secundário.

| Tipo de tratamento | Observação | Concentração | SRT (d) | HRT (h) | Composto | Remoção (%) | Referência | |
|--------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|---------|---------|------------|--------------------|------------------------------------------------------|------------------------|
| Leito Percolador ¹ | Inverno | | 1,9 | 6 a 8 | E1 | -62,4 ^a | (Koh <i>et al.</i> , 2008) | |
| | | | | | E2 | -18,5 ^a | | |
| Leito Percolador | 2 estágios + 2 estágios após sedimentação | | | | E1 | 58 | | |
| | | | | | E2 | 82 | | |
| Leito Percolador ² | | 5 g/dia | | | E1 | 67 | | (Bila & Dezotti, 2007) |
| | | 2,5 g/dia | | | E2 | 92 | | |
| | | 0,6 g/dia | | | EE2 | 64 | | |
| Lamas Ativadas ² | | 5 g/dia | | | E1 | 83 | | |
| | | 2,5 g/dia | | | E2 | 99,9 | | |
| | | 0,6 g/dia | | | EE2 | 78 | | |
| Lamas Ativadas ³ | Inverno ⁴ | | 6 | 12 | E2 | 70 | (Koh <i>et al.</i> , 2008) | |
| | Verão ⁵ | | 8,2 | 10 | E1 | -11 ^a | | |
| Lamas Ativadas ⁶ | Análise a 6 ETAR | | | | E2 | 87 | (Birkett & Lester, 2003); (Koh <i>et al.</i> , 2008) | |
| | | | | | E1 | 61 | | |
| | | | | | E2 | 87 ^b | | |
| | | | | | E3 | 95 | | |
| Lamas Ativadas ⁷ | | | | | E1 | [11 - 83] | (Ifelebuegu, 2011) | |
| | | | | | E2 | 86 | | |
| Lamas Ativadas | 2 instalações piloto | | | | E1 | 60 | (Koh <i>et al.</i> , 2008) | |
| | | | | | E2 | > 94 | | |
| | | | | | EE2 | 65 | | |
| Bioreatores de membranas | | | | | E1 | 98 | (Chambel, 2011) | |
| | | | | | E2 | 98 | | |
| | | | | | EE2 | 71 | | |
| Bioreatores de membranas | Com nitrificação e desnitrificação | | 12 a 15 | | Esteróides | > 90 | (Koh <i>et al.</i> , 2008) | |
| Discos Biológicos ⁸ | | 50,1 - 69,1 ng.L ⁻¹ | | | | E1 | 20 | (Ifelebuegu, 2011) |
| | | 12,3 - 20,9 ng.L ⁻¹ | | | | E2 | 24 | |

¹-Canadá; ²- Brasil, Rio de Janeiro; ³- Água residual doméstica e industrial (10%); ⁴- Temperatura do afluente: 16,4 °C; ⁵- Temperatura do afluente: 26,7 °C; ⁶- Itália, Roma; ⁷- Japão; ⁸- Inglaterra, Midlands; ^a- Sem remoção, a concentração até aumenta; ^b- (Koh *et al.*, 2008) apresenta uma eficiência de remoção de 86%;

Analisando a Tabela 2.8 verifica-se alguma discrepância nas eficiências de remoção dos compostos em estudo. O composto sintético, 17 α -Ethinilestradiol, possui uma estabilidade que lhe permite resistir aos processos de tratamento existentes em ETAR (Birkett & Lester, 2003). O 17 β -

Estradiol apresenta eficiências de remoção mais elevadas, por outro lado, o seu metabolito apresenta eficiências menores devido à oxidação de E2 em E1 (Auriol *et al.*, 2006; Birkett & Lester, 2003).

Dentro dos sistemas de tratamento apresentados observa-se que o leito percolador apresenta menores eficiências de remoção quando comparadas com os sistemas de lamas ativadas. A diferença poderá ser explicada pelo tempo de retenção hidráulico, que em leitos percoladores pode ser inferior a 1 hora e nas lamas ativadas entre 4 a 14 horas. Quanto maior for o HRT maior será o tempo para processos de adsorção e biodegradação (Koh *et al.*, 2008). O mesmo autor refere ainda outros estudos que comprovam a associação entre elevadas eficiências de remoção e elevados HRT.

Relativamente aos Bioreatores de membrana a Tabela 2.8 indica que este é um dos processos que permite obter remoções mais significativas para E1 e E2. No entanto, num estudo citado por Koh *et al.*, (2008) foram avaliados dois sistemas de tratamento que funcionavam em paralelo, lamas ativadas e bioreatores de membrana. Os sistemas não apresentaram diferença na remoção de EE2 e concluiu-se que a sua remoção ocorreu por biodegradação e não por adsorção a partículas ou ao material. Outro estudo numa ETAR Alemã também demonstrou que a biodegradação foi o principal parâmetro na remoção dos estrogénios (Ifelebuegu, 2011).

Observa-se que os processos de lamas ativadas apresentam menores eficiências de remoção de E1 e de EE2. Outros estudos citados por Koh *et al.*, (2008) confirmam a persistência de EE2 e referem que a remoção de EDC pode aumentar com o aumento do tempo de retenção dos sólidos, sendo o ideal entre 10 a 12,5 dias.

De todos os processos existentes os discos biológicos são o sistema que evidenciam uma menor eficiência de remoção para os estrogénios, embora a eficiência destes processos também tenha sido estudada para remover outros poluentes prioritários. Hassard *et al.*, (2015) apresenta alguns casos em que a variância dos resultados está associada às características da água residual podendo assumir valores diferentes consoante se apresente como composto único ou quando na presença de outros compostos.

2.4.2 Discos Biológicos

Os discos biológicos também designados por biodiscos, são uma alternativa para os processos de lamas ativadas. Estes sistemas apresentam vantagens como a operação num espaço mais reduzido, apresentam um consumo energético relativamente baixo e uma simplicidade de operação e manutenção (Metcalf & Eddy, 2003; Tonde *et al.*, 2015).

São formados por uma série de discos circulares paralelos ligados através de um eixo horizontal que passa pelos seus centros. Esta estrutura está inserida dentro dum reator, em que o eixo horizontal está a uma cota superior da superfície do líquido de forma a que 40% do disco fique

imerso (Metcalf & Eddy, 2003; Tonde *et al.*, 2015). Em funcionamento, os microrganismos presentes na água residual fixam-se e multiplicam-se na superfície dos discos, e começam a formar uma película, designada por biofilme (Martínez, 2001).

O biofilme pode definir-se como uma estrutura coerente onde uma superfície sólida permite a união das células microbianas. O biofilme é composto por água (80 a 95%), pelos produtos de excreção dos microrganismos (70 a 95%) e pelos microrganismos (inferior a 10%). A sua composição depende das características do meio, nomeadamente o pH, a temperatura, o oxigénio dissolvido e a composição do meio. A formação do biofilme ocorre de forma natural em ambientes aquosos como resultado de processos físicos, químicos e biológicos. São necessárias quatro etapas para a sua formação: adesão, fixação, maturação e dispersão (Rolim, 2014). A Figura 2.3 mostra a imagem de um módulo de discos biológico.



Figura 2.3 Módulo de discos biológicos (<http://www.tecdepur.com/blog/tecnologias-blandas-2-contactores-biologicos-rotativos-cbr-o-biodiscos>).

A rotação dos discos permite que a água residual entre em contacto com o ar atmosférico e incorpore oxigénio, mantendo a biomassa em condições aeróbias (Martínez, 2001; Metcalf & Eddy, 2003). As eficiências de remoção podem ser condicionadas tendo em consideração os fundamentos cinéticos e biológicos associados à transferência de massa (Metcalf & Eddy, 2003).

Segundo Metcalf & Eddy, (2003) os discos biológicos podem ser utilizados como tratamento secundário ou como tratamento avançado. Estes sistemas estão associados a uma perda de carga reduzida o que facilita a sua integração nas ETAR como estágio de afinação (Vicente, 2016). Estudos à escala laboratorial demonstraram que o recurso a discos biológicos como tratamento avançado permite obter uma eficiência de remoção de aproximadamente 50% e de 80% para o EE2 e E2, respetivamente (Fernandes, 2016; Vicente, 2016).

2.4.3 Tratamento avançado/terciário

A necessidade de tratamentos avançados ou terciários tem como objetivo remover a matéria suspensa, coloidal e dissolvida que não foi eliminada pelo tratamento secundário. Algumas dessas substâncias podem ser iões simples ou compostos mais complexos, em que a sua remoção por processos convencionais ou avançados ainda é alvo de estudo (Metcalf & Eddy, 2003). Os estrogénios tal como outros EDC, nomeadamente os pesticidas, são formados por moléculas complexas o que impossibilita a sua completa remoção através de processos convencionais (Ranade & Bhandari, 2014).

Algumas das tecnologias utilizadas como tratamento avançado, e as suas eficiências de remoção, são apresentadas na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 Eficiência de remoção nos tratamentos avançados ou terciários.

| Tratamento | Observações | Concentração | Dosagem | Tempo de retenção | Composto | Eficiência de remoção (%) | Referências |
|-----------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|-------------------------------|
| Ozonização | Efluente doméstico de uma ETAR | 0,015 µg.L ⁻¹ | 5 mg O ₃ L ⁻¹ | 18 min | E1 | > 80 | (Auriol <i>et al.</i> , 2006) |
| | Água residual após tratamento secundário | 9,7 - 28 ng.L ⁻¹ 3,0 - 21 ng.L ⁻¹ | 5 mg O ₃ L ⁻¹ | 10 min | E1 E2 | 95 | |
| Ozonização | | | | | E2 EE2 | > 97 > 97 | (Chambel, 2011) |
| | | | | | E1 E3 | 62 - 98 57 - 100 | |
| Ozonização | | | | | E1 E2 EE2 | | (Koh <i>et al.</i> , 2008) |
| | | | 2 x 10 ⁻³ mg.min.L ⁻¹ | | | > 95 | |
| | | | | | | | |
| Cloro | Água sintética | 50 µg.L ⁻¹ | 1,46 mg.L ⁻¹ de Hipoclorito de Sódio | 10 min | E2 | 100 | (Auriol <i>et al.</i> , 2006) |
| | | 10 ⁻⁷ M | 1,5 mg.L ⁻¹ de Cloro | 36 h | E2 | 100 | |
| | | 0,2 mmol.L ⁻¹ | 1 mmol.L ⁻¹ de Cloro | 5 min | EE2 | 100 | |
| Fotocatálise (TiO ₂) | Água sintética (TiO ₂) | 0,05 - 3 µmol/L | | 3,5 h | E2 | 98 | |
| | Água sintética (TiO ₂)+UV | 10 ⁻⁶ M | 1 g.L ⁻¹ de TiO ₂ em suspensão | 30 min | E2 | 99 | |
| Microfiltração + Osmose inversa | | | | | E2 EE2 | 95 | (Birkett & Lester, 2003) |
| | Filtração com areia | | | | | 70 | |
| Eletrocoagulação | Escala laboratorial | | | | E1 E2 EE2 | 62 60 68 | (Cook <i>et al.</i> , 2016) |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| Dióxido de Manganês (MnO ₂) | Água sintética | 15 µg.L ⁻¹ | | 1,12 h | EE2 | 81,7 | (Rudder <i>et al.</i> , 2004) |

A utilização do ozono (O_3) pode relacionar-se com a etapa de desinfecção ou com a oxidação. A ozonização consiste na decomposição do O_3 com OH, e como resultado formam-se radicais hidroxilo (OH^*) (Ranade & Bhandari, 2014). No entanto, a sua eficiência depende da quantidade de radicais hidroxilo formados (Ranade & Bhandari, 2014) pois, ao contrário destes radicais o ozono é muito seletivo e apenas reage com aminas, fenóis e ligações duplas nos compostos alifáticos (Koh *et al.*, 2008). Consequentemente muitos compostos não são destruídos através deste oxidante convencional (Ranade & Bhandari, 2014), o que implica um acompanhamento com processos oxidativos avançados (AOP) (Koh *et al.*, 2008).

Os AOP podem ser formados por: O_3/H_2O_2 , O_3/UV e H_2O_2/UV (de Mes *et al.*, 2005; Koh *et al.*, 2008). Devido à presença de dois grupos hidroxilos o E2 fica altamente reativo com o O_3 , facilitando assim a sua remoção (de Mes *et al.*, 2005).

O cloro é um desinfetante muito utilizado no tratamento de águas. Contudo, os três estudos citados por Auriol *et al.*, (2006) demonstram ainda a sua capacidade em degradar estrogénios. Estes compostos são totalmente removidos quando reagem rapidamente com o HClO (Auriol *et al.*, 2006).

A fotólise direta (UV) e a fotocatalise com Dióxido de Titânio (TiO_2) vão incidir sobre as moléculas de compostos em estudo. A primeira quando aplicada no E2 e no E1, provoca a quebra e a oxidação dos seus anéis benzeno. A fotocatalise com TiO_2 , deve inserir sobre o anel de fenol da molécula E2, e deste modo a atividade estrogénica do composto poderá ser insignificante (Auriol *et al.*, 2006).

As eficiências de remoção da eletrocoagulação de alumínio não são elevadas, quando comparadas com os restantes tratamentos da tabela. A sua remoção pode ter ocorrido através da adsorção aos flocos de hidróxido de alumínio. Estes flocos apresentam uma área relativamente grande, o que promove a adsorção. Esta investigação testou ainda a utilização deste equipamento em afluentes de ETAR, as eficiências de remoção obtidas neste ponto foram muito próximas às eficiências obtidas como tratamento avançado (Cook *et al.*, 2016).

A capacidade de adsorção do dióxido de manganês juntamente com as suas propriedades catalíticas permitiu remover 81,7% do EE2. No entanto, também poderá ter sido degradado em outros compostos, com pouca ou nenhuma atividade estrogénica. Nesta experiência não foram identificados a existência de metabolitos de EE2 (Rudder *et al.*, 2004).

Apesar dos processos avançados exibirem eficiências de remoção elevadas apresentam ainda duas desvantagens. Estes processos podem formar subprodutos com uma atividade estrogénica igual ou superior ao seu precursor (Auriol *et al.*, 2006) e implicam elevados custos de fabricação e manutenção, que os tornam economicamente inviável (Ranade & Bhandari, 2014).

2.4.4 Constantes cinéticas de biodegradação - Ensaios em *Batch*

Estando em causa processos de degradação por via biológica, é importante que sejam determinados os respetivos parâmetros cinéticos de biodegradação dos compostos alvo do estudo. O modo mais comum de determinação das referidas constantes é através da realização de ensaios em *batch*.

Os ensaios em *batch* têm como objetivo determinar as constantes cinética de biodegradação, isto é, determinar a velocidade de degradação de substratos e de crescimento da respetiva biomassa. Este tipo de ensaios é caracterizado por uma operação não contínua, em que os reagentes são adicionados ao reator e a reação se desenvolve sem mais nenhuma interferência do ponto de vista de entradas ou saídas de fluxos no sistema.

A maioria dos estudos, com estes compostos, que foram realizados em *batch* relacionam-se, essencialmente, com processos de lamas ativadas. Estes estudos têm sido muito importantes para uma melhor compreensão do comportamento dos estrogénios (Li *et al.*, 2005).

Li *et al.*, (2005) estudaram a degradação do 17 β -Estradiol através de lamas ativadas sob diferentes condições. As experiências demonstraram que quanto maior for a temperatura e os níveis de SSV maior é a velocidade da sua remoção. A Tabela 2.10 apresenta os valores das constantes de degradação de primeira ordem calculados por Li *et al.*, (2005).

Tabela 2.10 Constantes de degradação através de lamas ativadas sob diferentes temperaturas e SSV (Adaptado de Li *et al.*, 2005).

| Tratamento | Composto | Concentração inicial | SSV | Temperatura (°C) | k (h ⁻¹) | | |
|----------------------------------|----------|-------------------------|------|------------------|----------------------|------|------|
| Lamas Ativadas Reator em copo | E2 | 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ | 1750 | 5 | 2,12 | | |
| | | | | 20 | 3,26 | | |
| | | | | 35 | 4,79 | | |
| | E2 | | | 850 | 5 | 0,55 | |
| | | | | | 20 | 1,3 | |
| | | | | | 35 | 3,28 | |
| | E2 | | | | 435 | 5 | 0,23 |
| | | | | | | 20 | 0,85 |
| | | | | | | 35 | 1,47 |

No entanto, outros processos têm sido estudados na biodegradação destes compostos. Clouzot *et al.*, (2010) utilizaram bioreatores de membrana em escala laboratorial para estudar a biodegradação do 17 α -Ethinilestradiol sob diferentes condições. Verificou-se que lamas ativadas aclimatadas, com grande atividade nitrificante, têm maior influência na biodegradação e remoção deste composto. A Tabela 2.11 apresenta os parâmetros cinéticos determinados e a Tabela 2.12 apresenta outras constantes de degradação existentes na literatura.

Tabela 2.11 Parâmetros cinéticos obtidos em bioreatores de membrana inoculados com lamas ativadas aclimatadas e não aclimatadas (Adaptado de Clouzot *et al.*, 2010).

| Tratamento | Composto | Parâmetro | Concentração inicial (mgL ⁻¹) | k (h ⁻¹) |
|-----------------------------|----------|---------------|-------------------------------------------|----------------------|
| Lamas ativadas climatizadas | EE2 | Sorção | 0,5 | 5,3 |
| | | Biodegradação | | 0,009 |
| | | Sorção | 1 | 5,3 |
| | | Biodegradação | | 0,009 |
| Lamas ativadas de uma ETAR | EE2 | Sorção | 0,5 | 5,1 |
| | | Biodegradação | | |
| | | Sorção | 1 | 5,2 |
| | | Biodegradação | | |

A associação entre a nitrificação e a biotransformação do 17 α -Ethinilestradiol também foi estudado por Yi & Harper (2007), onde utilizaram culturas enriquecidas com bactérias oxidantes de amônio. As experiências em *batch* demonstraram que o anel A do EE2 é o local de iniciação das reações e que a nitrificação e a remoção de EE2 têm uma relação linear direta.

Também Tran *et al.*, (2009) utilizaram culturas nitrificantes enriquecidas com amônio para estudar a biodegradação de outros dez produtos farmacêuticos. O resultado do estudo indica que a nitrificação pode aumentar a biotransformação de substâncias farmacêuticas e que estas culturas apresentaram melhores resultados de degradação relativamente ao processo convencional de lamas ativadas.

Experiências sobre cinética de degradação também têm sido aplicadas em tratamentos com utilização de UV e em processos oxidativos avançados como UV/H₂O₂ (Baeza & Knappe, 2011; Salgado, 2011). No entanto, os estudos citados não analisaram a degradação e a biotransformação dos compostos da presente dissertação.

As ordens das reações podem variar: ser de ordem zero quando a taxa da reação é independente da concentração do reagente, de primeira ordem quando a taxa de reação é diretamente proporcional à concentração do reagente; e de segunda ordem em que a taxa de reação é proporcional ao quadrado da concentração do reagente. No âmbito do tratamento de água residuais as reações de primeira ordem são as mais abundantes, no entanto, também se podem encontrar reações de ordem zero (Pinheiro, 2006).

Tabela 2.12 Constantes de degradação de primeira ordem (Adaptado de de Mes *et al.*, 2005).

| Processo | Temperatura (°C) | Concentração inicial | Composto | k (h ⁻¹) |
|-------------------------------------------|------------------|--------------------------|----------|----------------------|
| Lamas Ativadas ¹ | 16 | 500 ng.L ⁻¹ | E1 | 8,44 |
| | | | E2 | 16 |
| | | | EE2 | 0,063 |
| Lamas Ativadas ² | 30 | 1 mg.L ⁻¹ | E1 | |
| | | | E2 | |
| | | | EE2 | |
| Lamas Ativadas + ATU ⁵ | 30 | 0,2 mg.L ⁻¹ | E1 | |
| | | | E2 | |
| | | | EE2 | |
| Cultura pura de <i>Nitrosomas europea</i> | 30 | 0,4 mg.L ⁻¹ | E1 | 0,0084 |
| | | | E2 | 0,0091 |
| | | | EE2 | 0,0078 |
| Lamas Ativadas - nitrificação | 20 | 50 µg.L ⁻¹ | EE2 | 0,025 |
| Lamas Ativadas - baixa nitrificação | | | EE2 | 0 |
| Lamas Ativadas | 16 | 500 ng.L ⁻¹ | E1 | 2,025 |
| | | | E2 | 4,375 |
| | | | EE2 | 0,1 |
| Bioreatores de membrana | 16 | 500 ng.L ⁻¹ | E1 | 5,1958 |
| | | | E2 | 11,4792 |
| | | | EE2 | 0,0725 |
| Lamas Ativadas ² | 30 | 20-25 mg.L ⁻¹ | E1 | 0,013 |
| | | | E2 | 0,0183 |
| | | | EE2 | 0 |
| Lamas Ativadas ³ | - | 1 mg.L ⁻¹ | E1 | 0,042 |
| | | | E2 | 1,08 |
| | | | EE2 | 0 |
| Lamas Ativadas ³ | - | 1 µg.L ⁻¹ | E1 | 0,48 |
| | | | E2 | 10,3 |
| | | | EE2 | 0 |
| Lamas Ativadas ⁴ com ph = 6,7 | | | E1 | 0,109 |
| | | | E2 | 6,84 |
| | | | EE2 | 0,013 |
| Lamas Ativadas ⁴ com pH = 5,6 | 20 | 100 µg.L ⁻¹ | E1 | 0,263 |
| | | | E2 | 8,39 |
| | | | EE2 | 0,105 |
| Lamas Ativadas ⁴ com pH = 4,4 | | | E1 | 0,167 |
| | | | E2 | 13,33 |
| | | | EE2 | 0,088 |
| Lamas Ativadas ³ | 20 | 16 µg.L ⁻¹ | E1 | 4,19 ^a |
| | | | E2 | 5,85 ^a |
| Lamas Ativadas ³ | 5 a 20 | 58 µg.L ⁻¹ | E2 | 0,174 |
| | | 72 µg.L ⁻¹ | EE2 | 0,006 |
| | 22 a 25 | 58 µg.L ⁻¹ | E2 | 0,252 |
| | | 72 µg.L ⁻¹ | EE2 | 0,012 |

¹- Água residual sintética, [CQO]_i=100 mgO₂L⁻¹ e [CQO]_f=25 mgO₂L⁻¹ por dia; ²- Meio de sais minerais;

³- Sem alimentação; ⁴- Água residual sintética; ⁵- Químicos para inibir a nitrificação; ^a- Inclui a adsorção

3 Objetivos

Esta dissertação teve como objetivo contribuir para o estudo da degradação do 17 β -Estradiol (E2) e 17 α -Ethinilestradiol (EE2) em discos biológicos, nomeadamente avaliar a degradação e as constantes cinéticas com base nas diferentes condições analisadas. O comportamento de degradação foi analisado atendendo essencialmente às condições de concentração inicial do fármaco e da CQO da água residual e no estado de desenvolvimento do biofilme.

Pretende-se, no limite avaliar a viabilidade de utilização de discos biológicos, como tratamento terciário para a remoção complementar do 17 β -Estradiol (E2) e 17 α -Ethinilestradiol (EE2).

4 Plano experimental

Para realizar os objetivos do presente trabalho, adaptou-se o seguinte Plano Experimental, (Tabela 4.1)

Tabela 4.1 Plano Experimental

| Fase | Ensaio | Descrição | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | Manutenção do Biofilme ¹ |
|------|--------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|
| A | 1 | | 125 | Não |
| | 2 | Ensaio de biodegradação com o 17β-Estradiol | 250 | Sim |
| | 3 | | 250 | Sim |
| B | 4 | | 210 | Não |
| | 5 | Ensaio de biodegradação com o 17β-Estradiol e o 17α-Etinilestradiol | 100 | Não |
| | 6 | | 100 | Sim |

¹- A presença de biofilme nos ensaios 2, 3 e 6 resultou do seu crescimento no(s) ensaio(s) anterior(es). Quando o ensaio seguinte não tinha como objetivo a presença de biofilme, todos os discos eram lavados.

5 Materiais e métodos

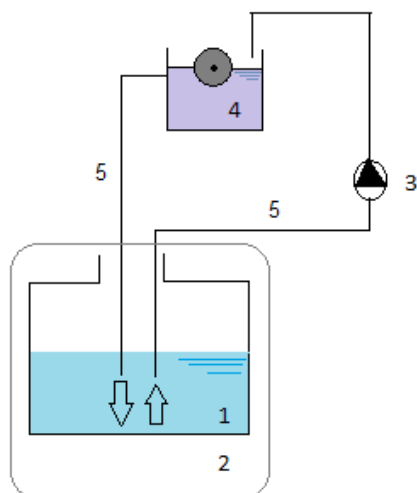
5.1 Materiais

5.1.1 Instalação Piloto: Reator Laboratorial de Biomassa Fixa

Para a realização dos ensaios foi utilizado um reator de discos biológicos, à escala laboratorial, com um regime de funcionamento em *batch*, isto é, em modo descontínuo. As Figuras 5.1 e 5.2 mostram o esquema da instalação.

Este sistema integra os seguintes equipamentos:

- Um reator piloto de discos biológicos com um volume unitário de 0,9 litros, que inclui: 4 discos com um diâmetro de 0,12 metros e movidos com uma velocidade de 10 rotações por minuto (rpm) através de moto-reductor da marca *Oriental Motor* (Japão);
- Um reservatório para armazenar a solução de alimentação, com uma capacidade de 20 litros, inserido num frigorífico da marca *Sharp* (Japão);
- Uma bomba peristáltica da marca *Lead Fluid*, para transportar a solução de alimentação desde o reservatório até ao reator;
- Tubos de silicone para permitir a alimentação e recirculação da solução: reservatório-reator e reator-reservatório.



Legenda:

- 1 - Reservatório de armazenamento do efluente doméstico simulado;
- 2 - Frigorífico;
- 3 - Bomba Peristáltica;
- 4 - Reator piloto de discos biológicos;
- 5 - Tubos de silicone.

Figura 5.1 Esquema da instalação: Reator de discos biológicos em modo *batch*.



Legenda:

- 1 - Reservatório de armazenamento do efluente doméstico simulado;
- 2 - Frigorífico;
- 3 - Bomba Peristáltica;
- 4 - Reator piloto de discos biológicos;
- 5 - Tubos de silicone.

Figura 5.2 Instalação: Reator de discos biológicos em modo *batch*.

5.1.2 Soluções de fármacos

Foram preparadas duas soluções, em metanol, uma apenas com o 17 β -Estradiol e outra com os 17 β -Estradiol (E2) e 17 α -Etinilestradiol (EE2). Ambos os fármacos utilizados são de marca *Sigma Aldrich*, sendo a pureza do EE2 maior ou igual a 98% e a pureza do E2 de 99%. O Anexo III e o Anexo IV apresentam as fichas técnicas destes compostos.

A dificuldade da operação de pesagem, a perigosidade de estar em contacto com os fármacos, devido às suas propriedades de desregulação endócrina, e o fato destes se tornarem mais solúveis na presença de metanol foram os motivos que levaram à preparação das soluções.

Outros trabalhos de investigação que decorreram em simultâneo com o presente estudo, já tinham preparado estas duas soluções, onde os fármacos estavam a uma concentração de 1400 000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A partir destas soluções, e através da fórmula $C_1V_1=C_2V_2$, calculou-se a quantidade a adicionar para obter a concentração desejada, isto é, o volume a adicionar para obter 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em 17 L (volume do efluente simulado). O volume a adicionar foi de 1,21 mL que está associado a uma concentração de CQO 86 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$. O anexo V apresenta os cálculos realizados para obter a CQO associada ao composto.

5.1.3 Efluente doméstico simulado

O efluente doméstico foi simulado através de uma solução de alimentação (substrato), adaptado de Dang *et al.* (1989) e Domingos (1999). A Tabela 5.1 apresenta os compostos utilizados na solução e as suas concentrações para uma CQO de 8000 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$.

Tabela 5.1 Composição do substrato (Adaptado de Domingos, 1999; Dang *et al.*, 1989)

| Composto | g.L^{-1} |
|--------------------------|-------------------|
| Glucose | 5,000 |
| Peptona Bacteriológica | 1,000 |
| Extrato de Levedura | 0,500 |
| Fosfato de Monopotássico | 0,800 |
| Sulfato Amónio | 1,500 |
| Sulfato de Magnésio | 0,200 |
| Cloreto Cálcio | 0,020 |
| Cloreto de Ferro | 0,001 |
| Sulfato de Manganês | 0,010 |

Através dos dados da Tabela 5.1 foi possível obter as concentrações de CQO desejadas no início de cada ensaio, isto é, para concentrações de 100, 125, 210 e 250 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$. Para o seu cálculo teve-se em conta a CQO associada ao fármaco (86 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$).

A utilização de soluções de alimentação com valores elevados de CQO, tais como 210 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$ ou 250 $\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$, tinha como intuito promover o crescimento de biofilme. As diferentes concentrações de CQO e o estado de desenvolvimento do biofilme tinha como objetivo analisar se estes parâmetros influenciam ou não, na degradação dos compostos em estudo e determinar as respetivas constantes de degradação.

5.1.4 Material utilizado no decorrer dos ensaios

Todo o material utilizado no decorrer dos ensaios apresenta-se descrito abaixo:

- Balança de marca *Kern*, Máx 2000 g e Min 0,5 g;
- Balança de marca *Mettler Toledo*, Máx 210 g;
- Barras SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*) de marca *Gerstel Twister*, com a espessura do filme de 1 mm e o comprimento da barra de 20 mm;
- Sistema de filtração a vácuo, que incorpora:
 - Bomba de vácuo, de marca *Millipore Waters*, com uma pressão de 1200 bar;
 - Filtros *Filter-Lab* de porosidade 1,2 µm, 47 mm;
 - Filtros *Macherey-Nagel* de porosidade 0,4 µm, 45 mm;
 - Filtros *Millipore* de porosidade 0,22 µm, 47mm.
- Agitadores magnéticos, de marca *J.P. Selecta*, tipo *Agitamatic-N* ou *Agitamatic-E*;
- Aquecimento em banho-maria, de marca *SBS*;
- Sistema de limpeza digital por ultrassons, de marca *Axtor by Lovango*;
- Sistema de limpeza por ultrassons, de marca *Julabo*;
- Acrodisc LC 13 - PVDF da marca *Gelman* de porosidade 0,2 µm;
- Garrafa de Azoto, de marca *Micromass*;
- Garrafa de Azoto, de marca *Alphagaz*;
- Micropipeta de marca *Autoclavable*;
- Vortex de marca *Fisher Bioblock Scientific*;
- Sistema de HPLC-DAD (cromatografia líquida de alta resolução com detetor de fotodíodos), que incorpora:
 - Cromatógrafo, de marca *Waters Alliance*, modelo 2690 de bomba quaternária associado a um detetor de fotodíodos, marca *Waters*, modelo 996;
 - Pré-coluna C18, de marca *Phenomenex*, KJ0-4282;
 - Coluna Luna 5µm C18 (2) 100 Å (OOF-4252-YO) (2).
- Programa *MassLynx V4.0* para adquirir/processar os cromatogramas.

5.2 Modo operatório

5.2.1 Reator em *Batch*

Para a presente investigação efetuaram-se seis ensaios laboratoriais com os compostos 17β-Estradiol e o 17α-Etinilestradiol, divididos em duas fases. Sendo a fase A para o 17β-Estradiol e a fase B para ambos os compostos.

No início de cada ensaio adicionou-se ao reator 100 µg.L⁻¹ do composto em estudo e as respetivas soluções de alimentação, de modo a obter-se as concentrações iniciais de CQO

desejadas. Alguns ensaios iniciaram-se com biofilme, que resultou dos ensaios anteriores. As diferentes concentrações iniciais de CQO e o estado de biofilme permite avaliar o modo como estes parâmetros contribuem para a degradação dos compostos em estudo. A Tabela 5.2 indica as características de cada ensaio.

Tabela 5.2 Características dos ensaios.

| Fase | Ensaio | Descrição | Volume de alimentação (L) | Concentração de fármaco ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | CQO ($\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$) | Manutenção do Biofilme ¹ | Duração (dias) |
|------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| A | 1 | | | | 125 | Não | 6 |
| | 2 | Ensaio de biodegradação com o 17 β -Estradiol | | | 250 | Sim | 3 |
| | 3 | | | | 250 | Sim | 4 |
| | | | 17 | 100 | | | |
| B | 4 | | | | 210 | Não | 3 |
| | 5 | Ensaio de biodegradação com o 17 β -Estradiol e o 17 α -Ethinilestradiol | | | 100 | Não | 3 |
| | 6 | | | | 100 | Sim | 3 |

¹- A presença de biofilme no ensaio 2, 3 e 6 resultou do seu crescimento no(s) ensaio(s) anterior(es). Quando o ensaio seguinte não tinha como objetivo a presença de biofilme, todos os discos eram lavados.

Os ensaios 4 e 5 visam comparar a degradação dos compostos com valores de CQO iniciais diferentes, para a mesma concentração de fármaco e para um biofilme no mesmo estado. Por outro lado, os ensaios 5 e 6 objetivam comparar a degradação dos compostos com diferentes estados de desenvolvimento de biofilme, para valores de CQO iniciais iguais e para a mesma concentração de fármaco. Após cada ensaio e quando o seguinte não tinha como objetivo a presença de biofilme, todo o sistema era lavado com água e lixívia.

As dificuldades encontradas na primeira fase para detetar o 17 β -Estradiol foram determinantes para a introdução do 17 α -Ethinilestradiol na fase seguinte. Uma explicação para as dificuldades encontradas poderá estar associada a diferenças metodológicas e/ou à fotodegradação do 17 β -Estradiol, que também se colocou em causa e foi analisada.

5.2.2 Amostragens

Para todos os ensaios a primeira amostra era recolhida no início da experiência, sendo que a recolha das restantes amostras ocorria com intervalos de 24 horas. As amostras permitiram

análises cromatográficas e análises de CQO, SST e SSV. O pH da solução de substrato de alimentação foi analisado uma vez no final da fase B.

5.3 Métodos Analíticos

5.3.1 Carência Química de Oxigênio (CQO)

A determinação da CQO, da fase solúvel das amostras, foi efetuada pelo método de refluxo aberto conforme o procedimento descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) (Anexo VI).

5.3.2 Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

A determinação dos SST e SSV foi efetuada conforme o procedimento descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) (Anexo VII).

A determinação do pH foi efetuada pelo método potenciométrico, através de um equipamento de marca WTW series - *Inolab*, modelo ION 735.

5.3.3 Extração dos compostos pelo método SBSE

A extração dos compostos foi efetuada pelo método SBSE (Extração sortiva em barra de agitação), sendo a metodologia adaptada de Fernandes (2016) e Vicente (2016). O método encontra-se descrito abaixo e a Figura 5.3 apresenta um esquema geral da metodologia.



Figura 5.3 Esquema geral da metodologia da extração dos compostos pelo método SBSE.

- 1) Preparação da amostra: (Na Figura 5.4 apresenta-se o esquema de preparação).
 - a) Recolha de 250 mL de amostra;
 - b) Colocar no sistema de filtração a vácuo com filtros de porosidade de 0,4 µm;
 - c) Adicionar 25 g de NaCl às amostras (*Salting out*).

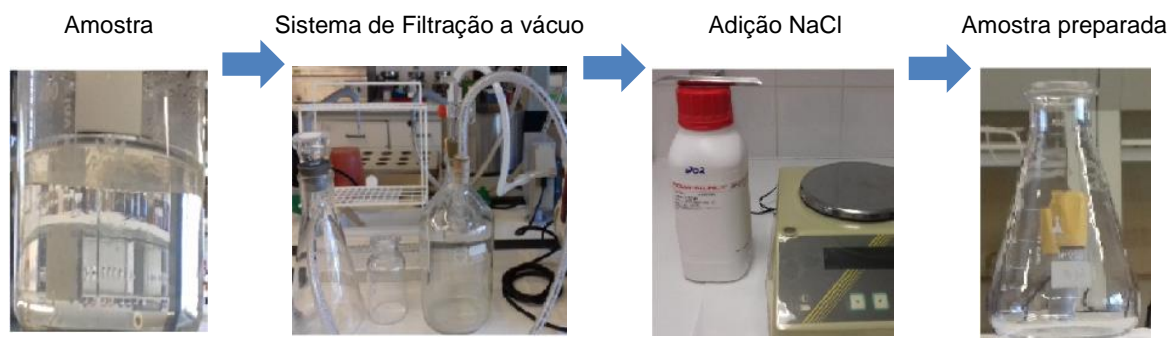


Figura 5.4 Esquema de preparação da amostra.

2) Adsorção dos compostos à barra: (Figura 5.5).

- a) Mergulhar a barra SBSE na amostra preparada, em *Erlenmeyer*;
- b) Proteger da luz e levar a agitar;
 - i) Agitar durante 3 horas a uma velocidade de rotação de 900 rpm.



Figura 5.5 Esquema de adsorção.

3) Dessorção dos compostos: (Figura 5.6).

- a) Extrair a barra SBSE para 3 mL de CH_3CN ;
 - i) Agitar durante 30 minutos a uma velocidade de rotação de 300 rpm.
- b) Colocar em banho de água durante 10 minutos a $60\text{ }^\circ\text{C}$;
- c) Sonicar a solução resultante.



Figura 5.6 Esquema de dessorção.

4) Lavagem e condicionamento da barra SBSE:

- a) Remover a barra SBSE da solução sonicada;
- b) Inserir em 3 mL de DMSO- dimetilsulfóxido;
 - i) Agitar durante 1 hora a uma velocidade de rotação de 100 rpm.
- c) Inserir em 3 mL de CH_3CN ;
 - i) Agitar aproximadamente durante 12 horas a uma velocidade de rotação de 100 rpm.

5) Preparação da solução sonicada para injetar no HPLC-DAD: (Figura 5.7).

- a) Concentrar até à secura a solução sonicada sob fluxo de azoto;
- b) Retomar com 200 μL de CH_3OH e passar pelo Vortex;
- c) Colocar em *vials* para injetar no HPLC-DAD.

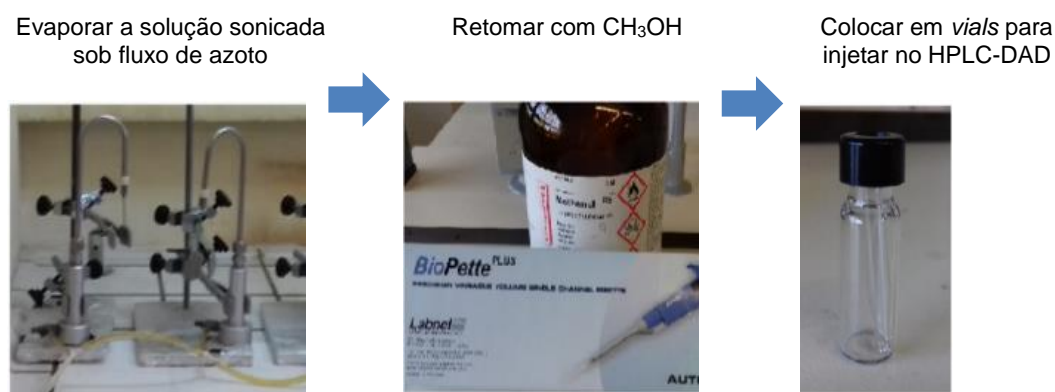


Figura 5.7 Esquema de preparação da solução sonicada.

- 6) Análise da amostra extraída por HPLC-DAD nas seguintes condições:
- a) Volume de injeção: 20 μ L;
 - b) Coluna utilizada: Luna 5 μ m C18 (2) 100 Å (OOF-4252-YO) (2);
 - c) Fluxo: 0,5 mL/min;
 - d) Tempo de corrida: 10 minutos;
 - e) Eluição Isocrática:
 - i) 50% de H₂O com 0,1% HCOOH;
 - ii) 50% de CH₃CN.
- 7) Quantificação dos compostos:
- a) Analisar o cromatograma, pelo programa *MassLynx* V4.0, no comprimento de onda 281 nm;
 - b) Identificar o pico do composto através do espectro de absorção ($\lambda = 230 - 315$ nm) e do tempo de retenção (aproximadamente 4,46 min e 5,64 min para o E2 e EE2 respetivamente);
 - c) Quantificar a área do pico de cada composto;
 - d) Determinar a concentração do composto através da fórmula obtida pela curva de calibração, descrita no ponto 5.3.4.

A metodologia acima descrita foi aplicada para a fase B. Para a fase A utilizou-se a mesma metodologia, mas com duas adições: utilizaram-se dois filtros consecutivos no sistema de filtração a vácuo de 1,2 μ m e de 0,22 μ m e um Acrodisc de 0,45 μ m antes da solução sonicada ir à secura sob fluxo de azoto. O uso destes filtros tinha como objetivo melhorar a visibilidade no HPLC-DAD, no entanto, a sua baixa porosidade poderá estar na origem do composto não ser detetado, ficando retidos nos respetivos filtros. De forma a despistar o erro, foram realizados testes com os Acrodisc e testes de fotodegradação, descritos no ponto 5.3.6.

O método de extração através de sorção em barra de agitação (SBSE) tem sido cada vez mais utilizado para pré-concentrar o composto em estudo (Pintado-herrera *et al.*, 2014). Este processo baseia-se na utilização de uma barra de agitação magnética, inserida em vidro, que é coberta por uma camada de polidimetilsiloxano (PDMS) (Fernandes, 2006; Silva, 2007).(Figura 5.8).

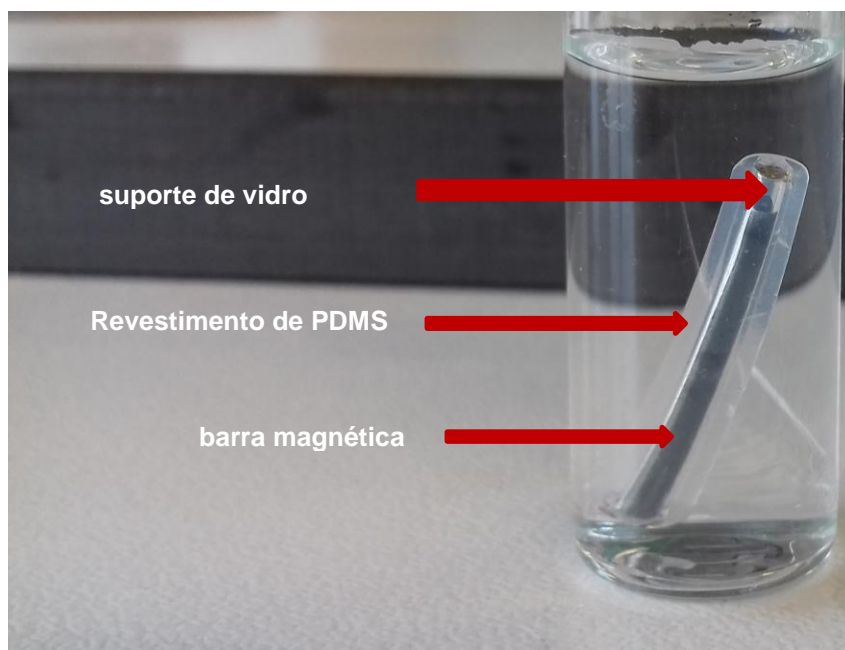


Figura 5.8 Barra de SBSE.

O material de revestimento da barra (PDMS), tem a capacidade de adsorver compostos que sejam entre moderada a altamente hidrofóbicos, como é o caso dos fármacos em estudo (Pintado-Herrera *et al.*, 2014; Silva, 2007). De acordo com experiências realizadas por Pintado-Herrera *et al.*, (2014) a quantidade de composto extraído depende ainda do volume da amostra, do tamanho da barra e da quantidade de NaCl adicionada. Os melhores resultados foram obtidos com um volume de 250 mL, uma barra com tamanho de 20 mm (com uma diferença de 15% de extração para o tamanho de 10 mm, na maioria dos casos) e uma adição de 100 gL^{-1} de NaCl.

O sal permite aumentar a extração dos compostos através do efeito “*salting out*”, isto é, as moléculas de água formam esferas de hidratação à volta dos iões de sal, reduzindo assim a sua disponibilidade para dissolver os compostos, facilitando deste modo a sua extração. No entanto, este efeito só ocorre até determinada concentração de sal, a partir desse limite os iões de sal começam também a interagir com os compostos, dificultando a sua extração (Fernandes, 2006; Silva, 2007).

As técnicas cromatográficas têm como vantagem, em relação a outras técnicas, a capacidade de separar com grande precisão os componentes de amostras complexas. Estes componentes são separados através de interações quando percorrem duas fases imiscíveis, a fase estacionária (enchimento da coluna cromatográfica) e a fase móvel (eluente que percorre a coluna cromatográfica) (Carvalho, 2012; Fernandes, 2012; Rangel, 2010; Silva, 2007).

Dentro das várias técnicas cromatográficas existentes, para o presente estudo utilizou-se a cromatografia líquida de alta resolução em coluna de fase reversa. Nesta técnica os compostos são separados através da migração destes na coluna, contudo, o nível de definição depende da fase estacionária. A afinidade que a fase estacionária tem pelos diferentes compostos a serem

analisados permite um arrastamento destes ao longo da coluna a diferentes velocidades, e deste modo obtêm-se uma melhor leitura (Rangel, 2010).

Para o presente trabalho utilizou-se a cromatografia líquida de alta resolução com detetor de fotodíodos (HPLC-DAD), esta técnica apresenta vantagens ao nível da rapidez dos resultados, no grande poder de resolução e na deteção de compostos com concentrações vestigiais. Normalmente, a separação dos compostos ocorre em fase reversa, ou seja, a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar (Rangel, 2010; Silva, 2007). No presente trabalho utilizou-se uma coluna cromatográfica de fase reversa (C18).

O processo inicia-se com a injeção da amostra no início da coluna cromatográfica, e por intermédio das bombas de alta pressão a fase móvel (eluente) promove a passagem da amostra pela coluna, onde ocorre a separação dos componentes, e no final do trajecto cromatográfico o detetor de fotodíodos permite a deteção dos componentes da amostra (espectro de absorção UV-Vis). Cada componente eluído da coluna é registado sob a forma de pico, no respetivo tempo de retenção (Carvalho, 2012).

5.3.4 Curva de calibração

A curva de calibração permite calcular as concentrações dos compostos a partir das áreas obtidas nos cromatogramas de cada ensaio. Para a sua determinação prepararam-se padrões mistos com água desmineralizada com concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os padrões foram realizados em triplicado para aumentar a viabilidade das curvas de calibração e para a sua preparação utilizou-se a metodologia descrita no ponto 5.3.3.

Determinação do limite de deteção e quantificação

A determinação do limite de deteção (LOD) tem como objetivo calcular a concentração mínima a partir da qual é possível detetar a presença do composto com uma certeza razoável, mas não é necessariamente quantificada como um valor exato. O seu conceito, em termos qualitativos, está associado à concentração mínima que é possível distingui-lo de uma amostra em branco, isto é, uma amostra que contenha a mesma matriz, mas sem composto. A determinação do limite de quantificação (LOQ) tem como objetivo calcular a menor concentração a partir da qual é possível quantificar o composto com determinada exatidão e precisão. Normalmente é utilizado na determinação de produtos em degradação (Huber, 2007; International Conference on Harmonization ICH, 1996).

O LOD e o LOQ do E2 e do EE2 foram determinados com base nas amostras realizadas em branco e em triplicado. Para a sua determinação retirou-se a área dos cromatogramas associada aos respetivos tempos de concentração e calculou-se a concentração obtida através da curva de calibração. Essa área calculada denomina-se por “ruído”, uma vez que os compostos não estavam presentes.

Para determinar o limite de detecção e quantificação do HPLC-DAD, através da coluna de fase reversa Luna 5 µm C18 (2) 100 Å (OOF-4252-YO) (2), utilizaram-se as seguintes equações, adaptadas de (Shrivastava & Gupta, 2011). Onde S_{b1} corresponde ao desvio padrão e X_{b1} a média das concentrações.

$$\text{LOD} = 3 \times S_{b1} + X_{b1} \quad \text{Eq. 5.1}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times S_{b1} + X_{b1} \quad \text{Eq. 5.2}$$

5.3.5 Determinação da ordem das reações

Para determinar a cinética das reações e as respectivas constante utilizaram-se dados da concentração (C) e do tempo (t), sendo a expressão geral:

$$\frac{dC}{dt} = KC^n \quad \text{Eq. 5.3}$$

Onde:

K - Constante de reação;

C - Concentração do composto;

n - Ordem de reação.

A identificação da ordem de reação para os ensaios foi determinada com base em duas hipóteses: ser de ordem zero ou de primeira ordem. Assim, a partir da expressão geral e para cada ensaio testou-se a hipótese $n=0$ ou $n=1$, resultando nas equações 5.4 e 5.5. Posteriormente seguiu-se a sua integração para obtenção dos resultados, visível nas equações 5.6 e 5.7.

$$-\frac{dC}{dt} = K \quad \text{Ordem zero Eq. 5.4}$$

$$-\frac{dC}{dt} = KC \quad \text{Primeira Ordem Eq. 5.5}$$

$$C = C_0 - kt \quad \text{Integral da ordem zero Eq. 5.6}$$

$$\text{Ln}C = \text{Ln}C_0 - kt \quad \text{Integral da primeira ordem Eq. 5.7}$$

A partir dos resultados obtidos, isto é, através de uma análise gráfica e de uma análise ao coeficiente de correlação (R) determina-se a ordem de reação. Segundo (Li *et al.*, 2005), se a degradação for de primeira ordem o gráfico entre $\ln(C/C_0)$ e o tempo deve apresentar um elemento linear independente das suas concentrações iniciais.

5.3.6 Testes auxiliares pelo método SBSE

1) Testar o sistema de filtração com Acrodisc

a) Teste direto com Acrodisc:

Este teste teve como objetivo detectar se o Acrodisc interfere ou não com as leituras dos resultados no HPLC-DAD. Este teste está descrito abaixo:

- i) Preparar um balão com $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ do fármaco misto e perfazer com água desmineralizada;
- ii) A partir do balão, $200 \mu\text{L}$ passam diretamente para os *vials*, e outros $200 \mu\text{L}$ passaram primeiro pelo Acrodisc;
- iii) Injetar no HPLC-DAD, segundo a alínea 6) do ponto 5.3.3.

b) Teste direto em diferentes tipos de águas com Acrodisc e filtração

Este teste teve como objetivo perceber se diferentes tipos de águas (com ou sem filtração) influenciam a leitura dos resultados. Foram testados três tipos de águas: água sintética, água residual e água desmineralizada com $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ do fármaco misto. Este teste está descrito abaixo:

- i) Colocar $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ do fármaco misto em três balões de 100 mL e perfazer com água sintética, desmineralizada e residual;
- ii) Passar cada balão por um sistema de filtração a vácuo, com filtros de porosidade $0,4 \mu\text{m}$;
- iii) De cada balão, $200 \mu\text{L}$ passam diretamente para os *vials* e outros $200 \mu\text{L}$ passaram primeiro pelo Acrodisc;
- iv) Injetar no HPLC-DAD segundo a alínea 6) do ponto 5.3.3.

2) Ensaio de fotodegradação direto:

Este ensaio teve como objetivo estudar a possível degradação dos fármacos, expostos a fatores físicos como a temperatura e a exposição à luz. Foram preparadas duas soluções mãe tendo uma sido deixada exposta à luz no laboratório e outra guardada num armário protegido da exposição da luz, igualmente no laboratório. O ensaio teve a duração de cinco dias e está descrito abaixo:

- i) Colocar $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ do fármaco misto em dois balões de 10 mL;
- ii) Colocar todos os dias $200 \mu\text{L}$ de cada frasco em *vials*;
- iii) Injetar no HPLC-DAD segundo a alínea 6) do ponto 5.3.3.

3) Curva de calibração com injeção direta

A curva de calibração direta teve como objetivo obter uma equação, para cada composto, que analisasse os resultados dos testes diretos descritos nos pontos 1) e 2), uma vez que não se podia analisar testes diretos sem a respetiva curva. Este teste está descrito abaixo:

- i) Colocar 2000, 1000, 500 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ do fármaco misto em balões de 10 mL e perfazer com CH_3OH . As amostras foram feitas em duplicado;
- ii) De cada balão colocar 200 μL em *vials*;
- iii) Injetar no HPLC-DAD segundo a alínea 6) do ponto 5.3.3.

A partir de concentrações, normalmente superiores a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, os fármacos tornam-se facilmente visíveis no HPLC-DAD. Devido à facilidade em detectá-los, estas concentrações são normalmente utilizadas em testes, como descrito nas alíneas anteriores. As barras SBSE têm como função extrair e concentrar o fármaco e por isso, são utilizadas para concentrações inferiores a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, como decorreu durante os ensaios e nas alíneas abaixo 5) e 6).

Como foi um teste direto, isto é, sem utilização da barra, seria “indiferente” usar água desmineralizada ou CH_3OH , uma vez que é a barra que condiciona a absorção dos compostos.

Contudo, optou-se por utilizar CH_3OH pois o fármaco é mais solúvel neste meio e deste modo mais facilmente detetável.

4) Ensaio para determinar a adsorção dos fármacos aos materiais da instalação

Para avaliar a degradação dos fármacos no reator é necessário realizar uma série de ensaios que permitam concluir que estes compostos não ficam adsorvidos em diferentes materiais da instalação piloto. Os materiais de possível adsorção são o reservatório de armazenamento e os tubos de alimentação.

No entanto, estes ensaios não foram realizados, uma vez que o material já tinha sido testado nos trabalhos de (Fernandes, 2016; Vicente, 2016). Os materiais e os compostos utilizados por estas autoras são os mesmos utilizados na presente investigação.

5) Ensaio em branco

Os ensaios em branco tinham como objetivo analisar o padrão dos cromatogramas na ausência dos fármacos e conseqüentemente determinar o LOQ e LOD mencionados no ponto 5.3.4. Foram realizadas três análises à água desmineralizada e uma ao efluente doméstico simulado, para determinar a existência de algum composto que pudesse interferir com a leitura dos resultados. Para tal, foram utilizadas barras SBSE segundo a metodologia do ponto 5.3.3 e a sua leitura foi feita com base na curva de calibração com água desmineralizada obtida pelo ponto 5.3.4.

6) Curva de calibração com metanol

A preparação da curva de calibração em metanol teve como objetivo confirmar que neste meio os fármacos têm uma menor tendência em aderir à barra SBSE, justificando assim o uso de uma curva de calibração em água desmineralizada. A determinação da curva de calibração em

metanol seguiu a mesma metodologia aplicada à curva de calibração em água desmineralizada no ponto 5.3.4.

6 Resultados

6.1 Biofilme

A Tabela 6.1 apresenta as concentrações de CQO objetivo e as obtidas em cada ensaio no dia zero.

Tabela 6.1 CQO objetivo e CQO em cada ensaio.

| Fase | Ensaio | CQO ($\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$) | | Volume Reator (L) | Crescimento de Biofilme |
|------|--------|-------------------------------------|--------|-------------------|-------------------------|
| | | Objetivo | Obtido | | |
| A | 1 | 125 | 89 | 17 | Não |
| | 2 | 250 | 182 | | Sim |
| | 3 | 250 | 231 | | Sim |
| B | 4 | 210 | 193 | 17 | Não |
| | 5 | 100 | 90 | | Não |
| | 6 | 100 | 92 | | Sim |

a) Crescimento de biofilme na fase A

O primeiro ensaio decorreu com uma concentração inicial de CQO de $125 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$, durante os seis dias de ensaio o crescimento de biofilme não foi notório. A Figura 6.1 apresenta uma imagem dos discos biológicos ao iniciar o 1º ensaio.

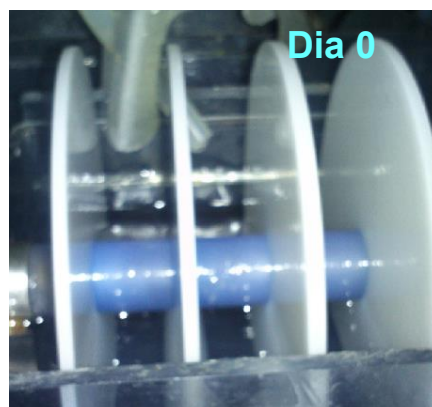


Figura 6.1 Discos biológicos ao iniciar o 1º ensaio.

Para o 2º ensaio manteve-se o biofilme criado pelo ensaio anterior, ou seja, não houve remoção do biofilme desenvolvido nos discos. De modo a obter-se um desenvolvimento maior do biofilme, utilizou-se uma concentração inicial de CQO de $250 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$.

De forma a encontrar melhores resultados no crescimento do biofilme não houve, novamente, remoção do biofilme já desenvolvido nos discos. O 3º ensaio iniciou-se com uma concentração de CQO de $250 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ e os seus resultados foram já visíveis. A Figura 6.2 apresenta algumas imagens do crescimento de biofilme no 3º ensaio.

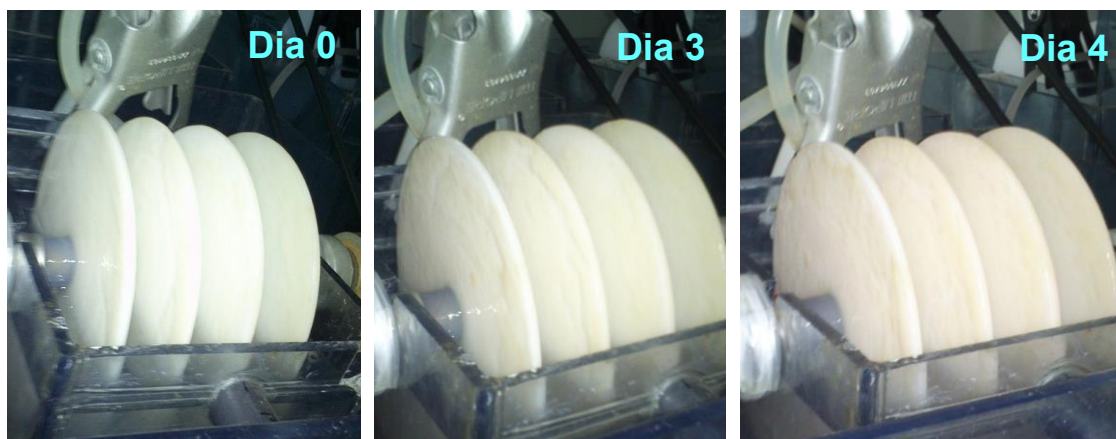


Figura 6.2 Crescimento de biofilme no 3º ensaio.

As elevadas concentrações de CQO introduzidas no reator, ao longo dos três ensaios, permitiram um crescimento significativo do biofilme com um aumento na sua espessura. Durante o 3º ensaio observou-se ainda uma alteração na cor do biofilme, de um tom branqueado para um tom mais rosado, esta mudança pode estar associada à proliferação de alguma bactéria ou fungo.

Experiências realizadas por Fernandes, (2016) e Vicente, (2016) demonstram que a proliferação destes microrganismos ocorre nos meses mais quentes, visto que no Inverno o tom do biofilme nas suas experiências manteve-se branco/amarelado.

b) Crescimento de biofilme na fase B

Após a fase A o reator foi lavado com água e lixívia para que a nova fase se iniciasse sem biofilme. O 4º ensaio iniciou-se com uma concentração inicial de CQO de $210 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ e a Figura 6.3 apresenta algumas imagens deste ensaio.

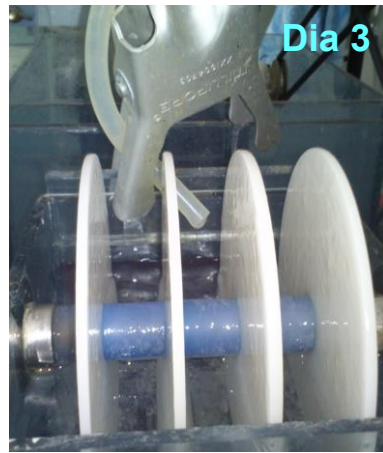


Figura 6.3 Crescimento de biofilme no 4º ensaio.

Os vestígios de biofilme formados pelo 4º ensaio foram removidos, para que o 5º ensaio se iniciasse novamente sem biofilme, mas como uma concentração de CQO inicial mais baixa, de $100 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$. A Figura 6.4 apresenta algumas imagens do 5º ensaio.



Figura 6.4 Crescimento de biofilme no 5º ensaio.

Para o 6º ensaio optou-se por manter os vestígios de biofilme formados pelo ensaio anterior e manteve-se a mesma concentração de CQO. A Figura 6.5 apresenta algumas imagens do 6º ensaio.

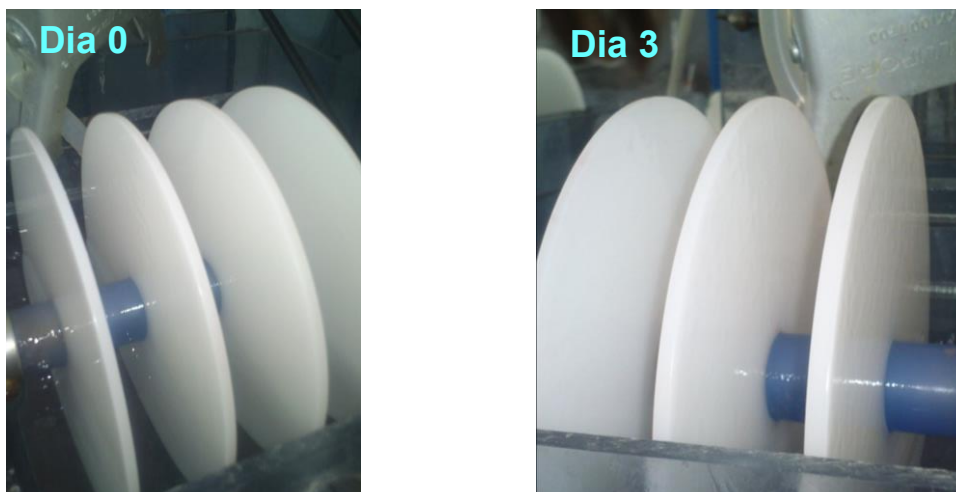


Figura 6.5 Crescimento de biofilme no 6º ensaio.

Na fase B o crescimento de biofilme só foi visível no 4º ensaio que, comparando com os outros ensaios, tinha uma concentração de CQO de alimentação superior. As baixas concentrações de CQO durante o 5º e o 6º ensaio estão associadas ao fraco desenvolvimento do biofilme, mesmo tendo este sido mantido no 6º ensaio. Não se observou uma clara mudança de cor nesta fase, provavelmente devido ao fraco desenvolvimento de biofilme.

O modo operatório em *batch*, em que os reagentes são introduzidos no reator apenas uma vez, é outro parâmetro que poderá estar na origem de uma fraca formação de biofilme e associada à rápida degradação do substrato obtido.

6.2 Curva de calibração

A curva de calibração e a respetiva equação para E2 e para EE2 apresentam-se nas Figuras 6.6 e 6.7, respetivamente. A curva de calibração do E2 foi utilizada para as duas fases dos ensaios e a curva de calibração do EE2 apenas foi utilizada na fase B, ensaios 4, 5 e 6.

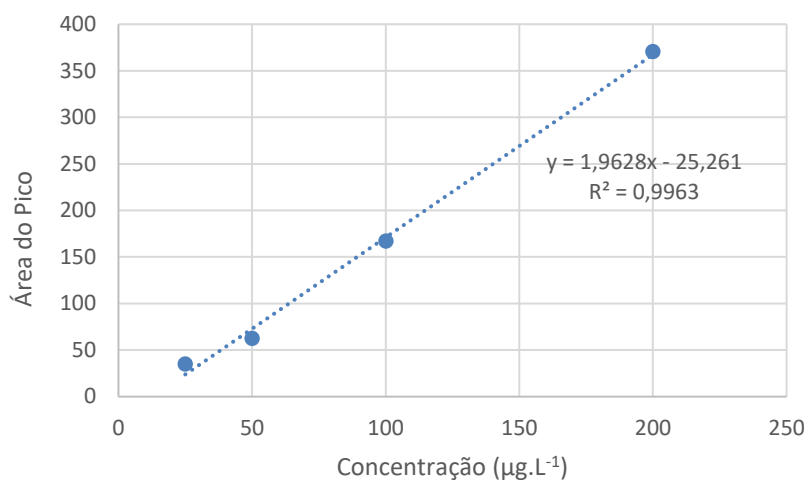


Figura 6.6 Curva de calibração do E2 utilizada na fase A e B dos ensaios.

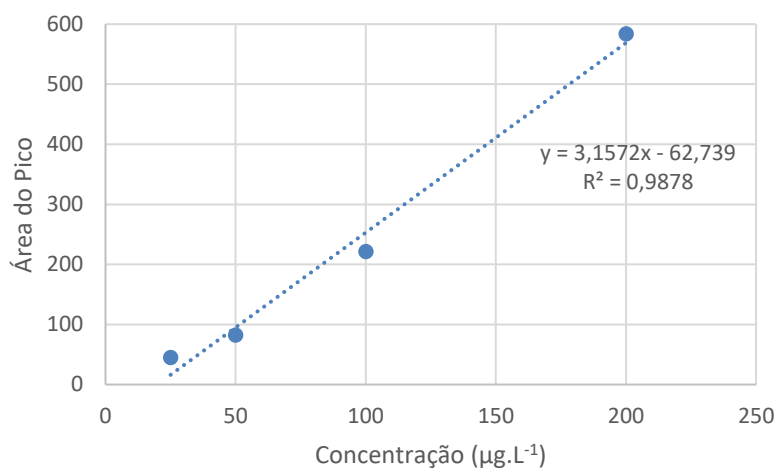


Figura 6.7 Curva de calibração do EE2 utilizada na fase B, ensaios 4, 5 e 6.

A curva de calibração para o E2 apresenta a equação de $y = 1,9628x - 25,261$ e um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9963$. A equação da curva de calibração do EE2 é $y = 3,1572x - 62,739$ e apresenta um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9878$. Estas equações permitem calcular a concentração dos fármacos no reator, e deste modo avaliar a sua remoção.

As curvas de calibração, para os dois compostos, foram elaboradas com concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg.L⁻¹. Cada padrão foi injetado em triplicado. O Anexo VIII apresenta um exemplo de cromatograma analisado para a obtenção das curvas de calibração com as áreas obtidas.

Determinação do limite de detecção e quantificação

O limite de detecção e quantificação do HPLC-DAD, utilizando uma coluna Luna 5 μ m C18 (2) 100 Å (OOF-4252-YO) (2), é apresentado na Tabela 6.2. O Anexo IX apresenta mais pormenores da sua determinação.

Tabela 6.2 Limite de detecção e quantificação para o E2 e o EE2.

| | 17 β (μ g.L ⁻¹) | 17 α (μ g.L ⁻¹) |
|--------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| Limite de Detecção | 24,06 | 22,10 |
| Limite de Quantificação | 42,47 | 24,51 |

Durante os ensaios, e para alguns dias, a concentração de E2 foi inferior ao limite de quantificação e detecção. No entanto, o fato de ser inferior não significa a ausência do composto, mas sim que a sua leitura não é tão credível como as restantes.

6.3 Ensaios de biodegradabilidade

Após a realização dos ensaios foi analisada a degradação dos fármacos, associada às diferentes concentrações de CQO e aos diferentes estados de desenvolvimento do biofilme. A Tabela 6.3 e a Figura 6.8 apresentam a degradação dos fármacos e da CQO ao longo de cada ensaio. O Anexo X apresenta um exemplo de cromatograma analisado para determinação das concentrações dos fármacos.

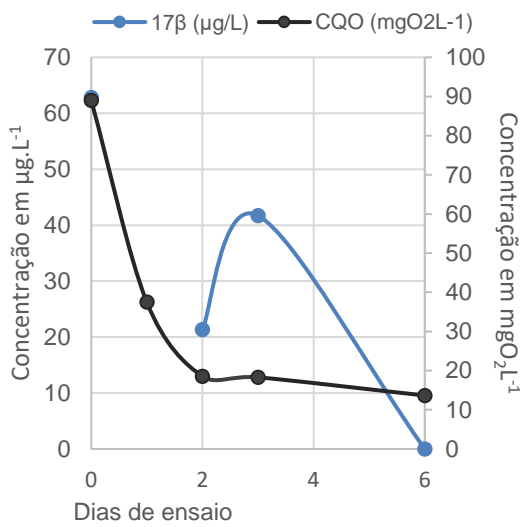
Durante os ensaios foram ainda determinados os SST e os SSV, que podem ser consultados no Anexo XI.

Tabela 6.3 Degradação dos fármacos e da CQO de cada ensaio.

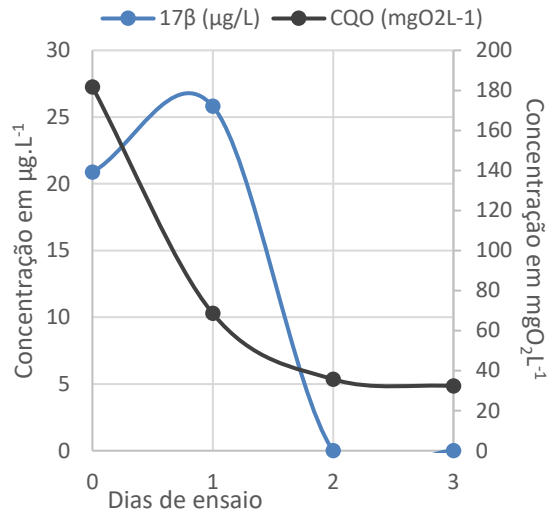
| Ensaio 1 | | | | Ensaio 2 | | | |
|------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|--|------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|--|
| Biofilme ao iniciar o ensaio | Não | | | Biofilme ao iniciar o ensaio | Sim (pouco desenvolvido) | | |
| Objetivo | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μg.L ⁻¹) | | Objetivo | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μg.L ⁻¹) | |
| | 125 | 100 | | | 250 | 100 | |
| Tempo (d) | | | | Tempo (d) | | | |
| 0 | 89 | 63 | | 0 | 182 | 21 | |
| 1 | 37 | | | 1 | 69 | 26 | |
| 2 | 19 | 21 | | 2 | 36 | 0 | |
| 3 | 18 | 42 | | 3 | 32 | 0 | |
| 6 | 14 | 0 | | | | | |

| Ensaio 3 | | | | Ensaio 4 | | | |
|------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|--|------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Biofilme ao iniciar o ensaio | Sim (desenvolvido) | | | Biofilme ao iniciar o ensaio | Não | | |
| Objetivo | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μg.L ⁻¹) | | Objetivo | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μg.L ⁻¹) | 17α (μg.L ⁻¹) |
| | 250 | 100 | | | 210 | 100 | 100 |
| Tempo (d) | | | | Tempo (d) | | | |
| 0 | 231 | 149 | | 0 | 193 | 99 | 106 |
| 1 | 74 | 31 | | 1 | 100 | 49 | 92 |
| 2 | 60 | 17 | | 2 | 23 | 19 | 91 |
| 3 | 14 | 24 | | 3 | 18 | 24 | 89 |
| 4 | 9 | 0 | | | | | |

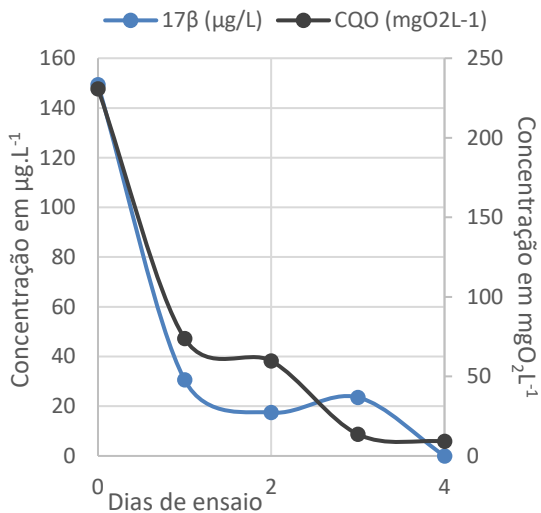
| Ensaio 5 | | | | Ensaio 6 | | | |
|------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Biofilme ao iniciar o ensaio | Não | | | Biofilme ao iniciar o ensaio | Sim (pouco desenvolvido) | | |
| Objetivo | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μg.L ⁻¹) | 17α (μg.L ⁻¹) | Objetivo | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μg.L ⁻¹) | 17α (μg.L ⁻¹) |
| | 100 | 100 | 100 | | 100 | 100 | 100 |
| Tempo (d) | | | | Tempo (d) | | | |
| 0 | 90 | 83 | 99 | 0 | 92 | 97 | 103 |
| 1 | 47 | 45 | 92 | 1 | 32 | | |
| 2 | 9 | 27 | 88 | 2 | 9 | 19 | 91 |
| 3 | 0 | 0 | 81 | 3 | 5 | 0 | 87 |



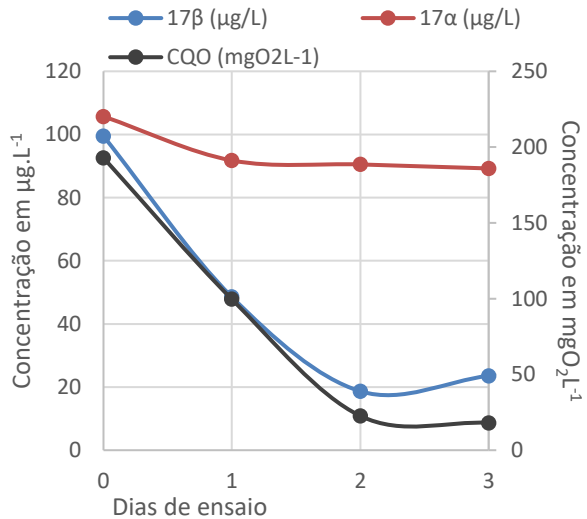
Ensaio 1



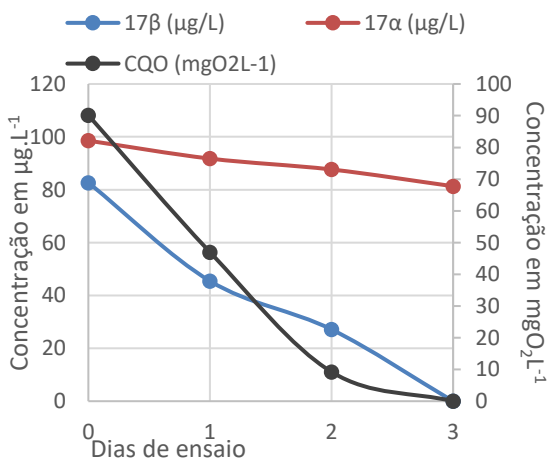
Ensaio 2



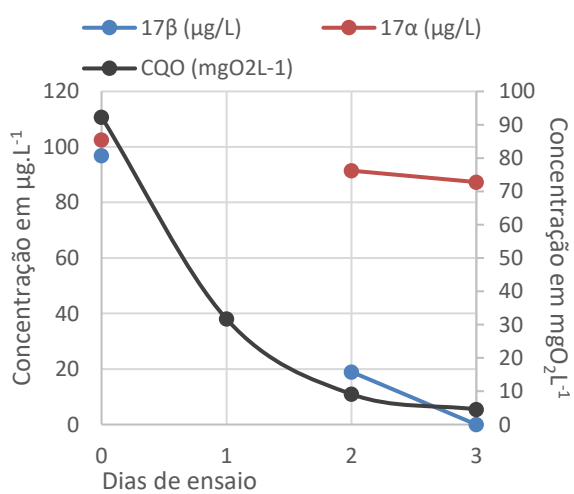
Ensaio 3



Ensaio 4



Ensaio 5



Ensaio 6

Figura 6.8 Degradação dos fármacos e da CQO em cada ensaio.

Todos os ensaios iniciaram-se com a mesma concentração de E2, sendo esta de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. No entanto, os ensaios da fase A apresentam valores iniciais muito diferentes do valor objetivo.

O ensaio 1 apresenta uma concentração inicial de $63 \mu\text{g.L}^{-1}$ e passadas 24 horas não foi possível obter o resultado da sua concentração devido às interferências existentes no seu cromatograma, podendo supor-se sim ou não que o composto tivesse sido integralmente biodegradado. As oscilações encontradas entre o dia 0 e o dia 3 não permitem tirar conclusões. Outro fator muito importante refere-se ao último dia, o 3º dia de análises ocorreu numa sexta-feira e o 6º dia de análises ocorreu na segunda-feira seguinte, ou seja, não é conclusivo o tempo que o fármaco demorou para ser removido do reator.

O ensaio 2 é o que apresenta resultados mais descontínuos, a concentração inicial de $21 \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentou o valor mais distante do valor objetivo. Passadas 24 horas a concentração aumentou ligeiramente e nos últimos dois dias a concentração de fármaco não foi detetada, possivelmente pela sua baixa concentração inicial. Os resultados apresentados no ensaio 1 e 2, devido à falta de robustez, não foram comparados com os restantes ensaios.

O ensaio 3 apesar de apresentar uma concentração inicial de $149 \mu\text{g.L}^{-1}$ mostrou uma degradação completa do fármaco, que no 4º dia já não foi detetado. Este é o único ensaio da fase A comparável com as restantes experiências.

De forma geral, os ensaios da fase B iniciaram-se com valores de E2 próximos ao objetivo e apresentaram uma eficiência de remoção constante de tal forma que ao 3º dia o fármaco já não é detetado. O ensaio 4 constitui-se como uma exceção, pois é o único que ao 3º dia o fármaco não só é detetado como a sua concentração ainda parece aumentar.

Relativamente ao EE2 da fase B os valores iniciais também se aproximam ao valor objetivo de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$, mas nunca há uma remoção completa do fármaco. Para o dia 1 do 6º ensaio não foi possível obter o valor da concentração de E2 e de EE2 devido às interferências existentes no seu cromatograma.

6.3.1 Biodegradabilidade do 17 β -Estradiol

A curva de degradação do 17 β -Estradiol ao longo dos ensaios 3 a 6 encontra-se na Figura 6.9.

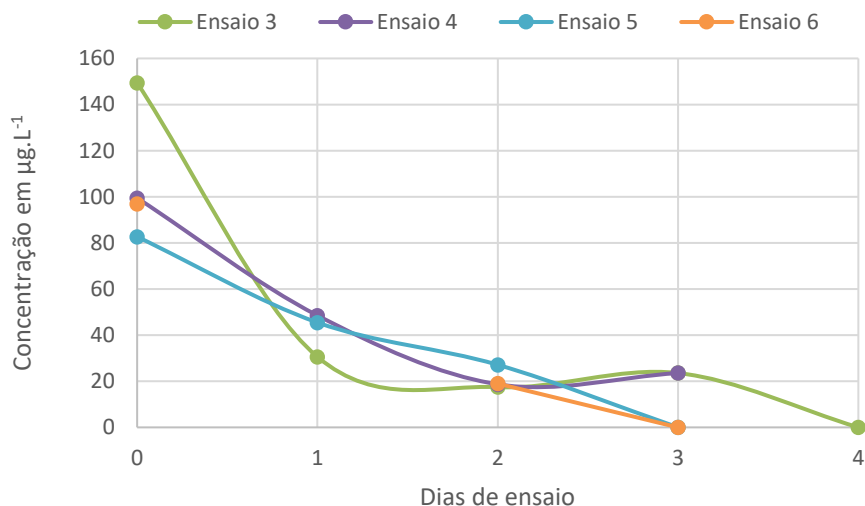


Figura 6.9 Curva de degradação do 17 β -Estradiol ao longo dos ensaios de 3 a 6.

Apesar das concentrações iniciais não serem as esperadas a remoção do fármaco foi sempre eficaz, à exceção do que se registou no ensaio 4. Este ensaio provavelmente necessitaria de mais um dia para remover o fármaco de forma completa.

Para analisar de forma correta as remoções diárias do E2, teve-se em conta as suas diferentes concentrações iniciais para cada ensaio. Através de uma análise à Figura 6.9, verifica-se que passado 24 horas após o início de cada ensaio no máximo 79% (ensaio 3) e no mínimo 46% (ensaio 5) do composto foi removido. Passado 48 horas do início dos ensaios a remoção máxima foi de 89% (ensaio 3) e a mínima foi aproximadamente 68% (ensaio 5).

Li *et al.* (2005), estudou a remoção do E2 num sistema de lamas ativadas em *batch*, em que a concentração inicial deste composto variou entre 10 a 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e obteve passado 1,5 h eficiências de remoção aproximadamente de 99%. Por outro lado Layton *et al.* (2000), observou uma remoção de E2 de 75% em 24 horas com concentrações iniciais mais comparáveis nomeadamente de 58 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

É ainda necessário compreender melhor como ocorre a remoção do fármaco sob diferentes condições, isto é, o papel da concentração inicial da CQO, da concentração inicial do fármaco e da quantidade de biofilme presente. Uma análise da Figura 6.9 permite constatar que os ensaios 5 e 6 foram os que obtiveram melhores resultados na remoção do E2, que ao 3º dia já não foi detetado. As características em comum de ambos os ensaios são a fraca presença de biofilme e uma concentração de CQO inicial baixa. Estes ensaios apresentam uma CQO inicial semelhante e uma diferença de 14 $\mu\text{g.L}^{-1}$ na concentração inicial de fármaco, o que permite

concluir que para uma baixa CQO as concentrações de fármacos não são relevantes (dentro de certo intervalo) para a sua remoção e que o pouco substrato disponível conduz a uma remoção mais eficaz. Li *et al.* (2005), nos seus trabalhos, também concluiu, que o fator concentrações de E2 não seria determinante, ainda que esses ensaios tivessem uma duração de apenas 16,5 h.

Relativamente aos ensaios 3 e 4 a diferença entre as suas concentrações iniciais e as concentrações passadas 24 horas é superior quando comparadas com os restantes ensaios. Por outro lado, entre o 1º e o 3º dia as concentrações estabilizam entre 17 e 49 µg.L⁻¹, aumentando em ambos os casos no 3º dia. Só no 4º dia é que existe remoção completa do fármaco, no entanto, não existem valores concretos que o possam comprovar para o ensaio 4.

Apesar destes ensaios terem concentrações elevadas de CQO, têm uma diferença que reside na concentração inicial de E2 e no estado do biofilme. Como uma CQO elevada prejudica na remoção do fármaco, pode-se concluir que o biofilme no ensaio 3 foi fundamental para uma rápida remoção de E2 quando comparado com o ensaio 4 que apresentava menos fármaco e menos CQO. A presença de um biofilme desenvolvido poderá estar associada a uma degradação de 80% nas primeiras 24 horas.

Fernandes (2016), em ensaios laboratoriais em tudo semelhantes, mas a funcionar em regime de fluxo contínuo e para a mesma concentração inicial de E2 atingiu eficiências de remoção médias diárias semelhantes ao presente estudo, (70%). Ifelebuegu (2011), também analisou a eficiência de remoção do E2 em discos biológicos, mas como tratamento secundário, no entanto as concentrações deste composto ensaiadas são de ordem de grandeza 1000 vezes superiores pelo que as eficiências alcançadas não devem ser comparadas.

Conforme já assinalado a diferença entre os ensaios 3 e 4 e os ensaios 5 e 6 reside na concentração de CQO da alimentação, sendo possível afirmar que quanto menor a CQO inicial maior será a eficiência de degradação. Ensaios em que a presença do biofilme é mais evidente mostram eficiências de degradação superiores, mas apenas nas primeiras 24 horas, quando comparado com ensaios com menores desenvolvimentos de biofilmes.

6.3.2 Biodegradabilidade do 17α-Etinilestradiol

Na figura 6.10 encontram-se os resultados da degradação do 17α-Etinilestradiol ao longo dos ensaios 4 a 6 da fase B.

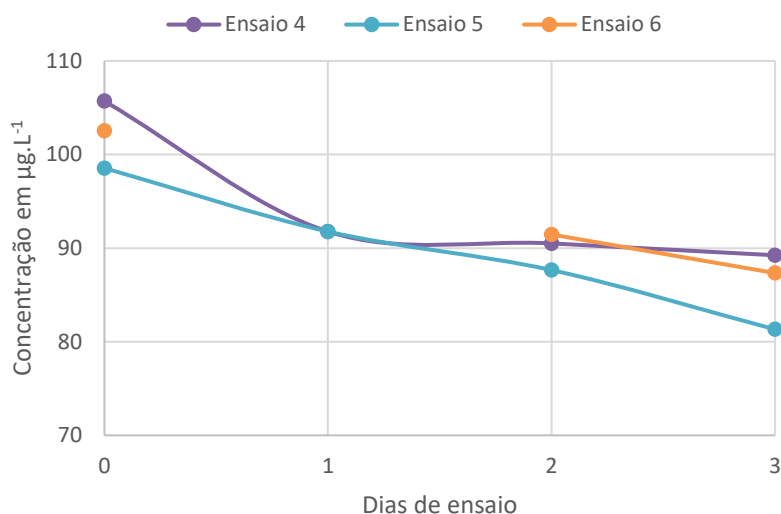


Figura 6.10 Curva de degradação do 17 α -Ethinilestradiol ao longo da fase B, ensaios 4 a 6.

Conforme se pode constatar através da Figura 6.10, verifica-se que ao longo dos três ensaios a degradação varia entre aproximadamente 10 a 20%, nunca se obtendo uma remoção completa do EE2.

Analisando a Figura 6.10 verifica-se que passado 24 horas após o início de cada ensaio aproximadamente 10% do composto foi removido, passado 48 horas houve pouca variação e só no 3º dia é que a remoção se aproximou dos 20% (ensaio 5). Por outro lado, Vader *et al.* (2000), observou em culturas nitrificantes enriquecidas com amónio que a degradação do EE2 é eficiente durante 48 horas, a partir do 3º dia vai estabilizando e só é removido ao 6º dia. Contrariamente à experiência citada, estudos em *batch* indicam que não há uma remoção completa de EE2 em processos de lamas ativadas (Koh *et al.*, 2008). A remoção de EE2 é ainda um assunto em aberto, no entanto, vários estudos apontam para que a atividade nitrificante seja um fator chave na sua degradação (Clouzot *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2009; Yi & Harper, 2007).

Os resultados do presente estudo não se afastam dos valores obtidos por Layton *et al.* (2000), que apresenta uma remoção de 20% para uma concentração inicial de 72 µg.L⁻¹, ao fim de 24 horas.

Uma análise da sua remoção deve incidir-se sobre os diferentes parâmetros analisados nomeadamente, as concentrações iniciais de CQO e de fármaco. Quando as concentrações iniciais de fármaco são semelhantes e as concentrações de CQO diferentes (ensaio 4 e 6) verifica-se que a degradação é superior quando a CQO é inferior. Para concentrações de CQO semelhantes e de fármaco diferentes, sendo uma diferença mínima entre o ensaio 5 e 6, observa-se que a degradação é superior quando a concentração de fármaco é inferior.

Nenhum ensaio da fase B tinha biofilme visível o que não permite comparar a remoção do EE2 em situações de diferentes estádios de crescimento de biofilme. No entanto, as experiências de Vicente (2016), em fluxo contínuo apresentaram em geral eficiências de remoção inferiores a

50%, o que permite concluir que para a remoção de EE2 o biofilme bem desenvolvido será um parâmetro essencial.

6.4 Parâmetros cinéticos dos processos de biodegradação

6.4.1 Ordem das reações para o E2 e EE2

Após os ensaios de biodegradabilidade foi determinada a ordem das reações e as suas constantes cinéticas. Neste ponto tal como no 6.3 apenas serão comparados os ensaios de 3 a 6. No Anexo XII apresentam-se as tabelas utilizadas na sua determinação. As Figuras de 6.11 a 6.14 apresentam o resultado das hipóteses para ordem 0 e 1ª ordem e a Tabela 6.4 o resultado das ordens de reação para cada ensaio.

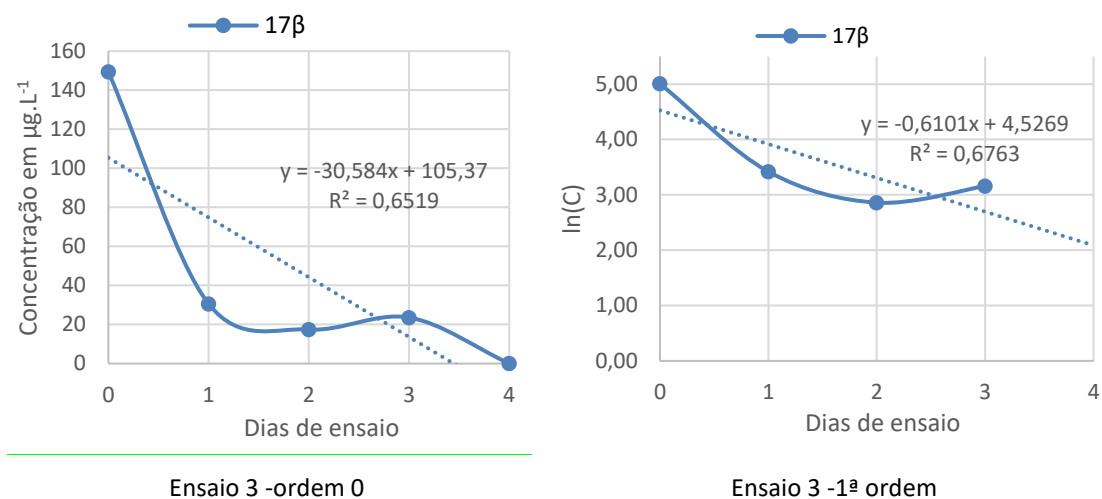


Figura 6.11 Ensaio 3: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação para E2.

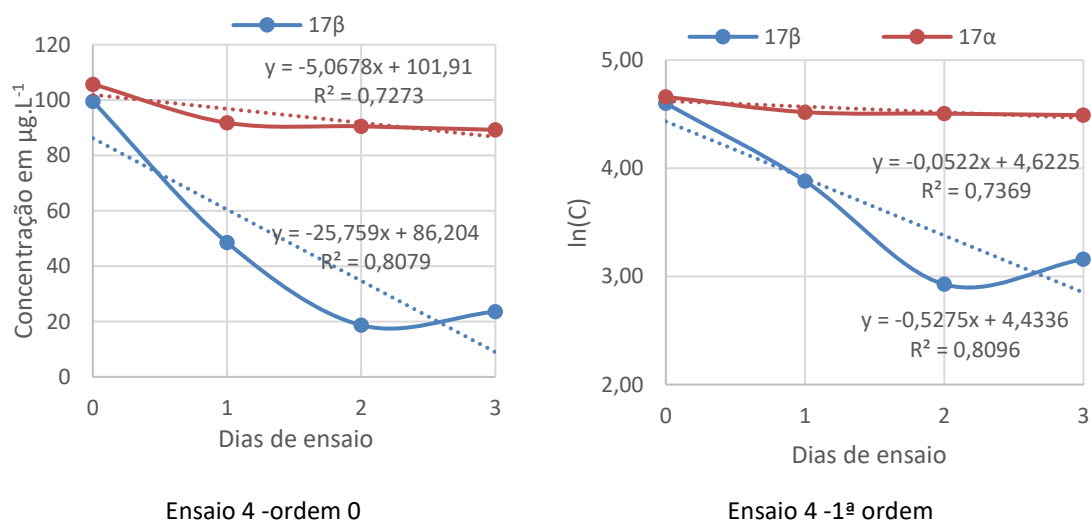


Figura 6.12 Ensaio 4: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação para E2 e EE2.

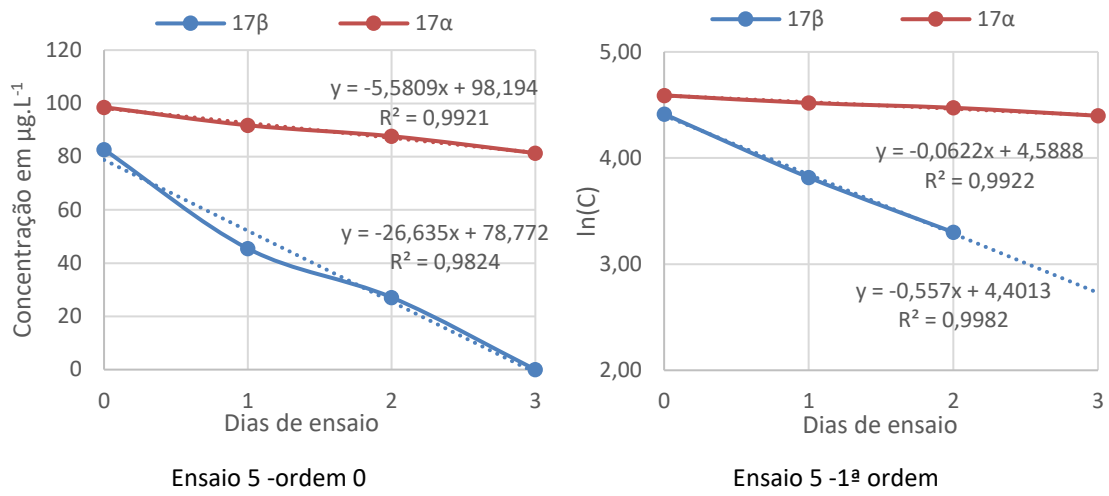


Figura 6.13 Ensaio 5: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação para E2 e EE2.

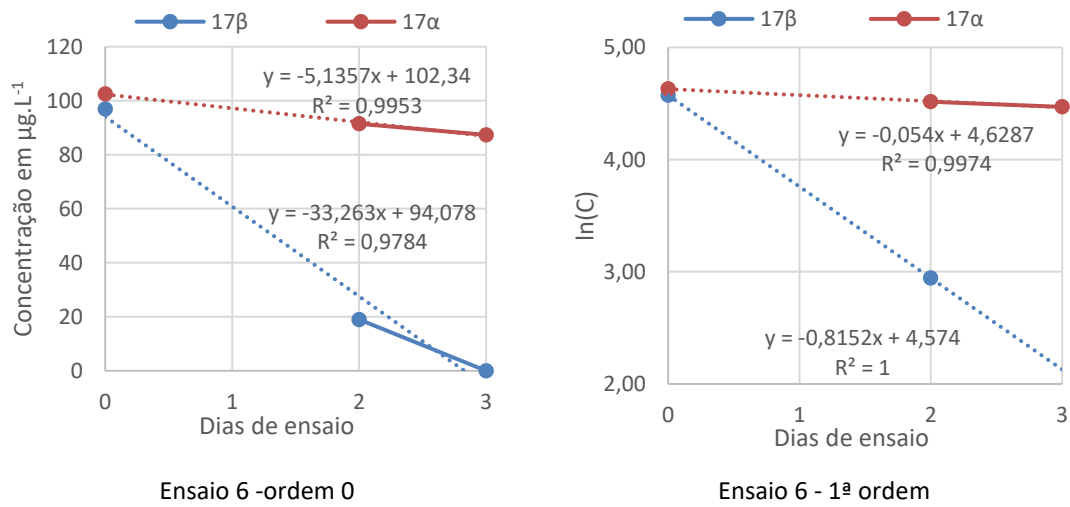


Figura 6.14 Ensaio 6: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação para E2 e EE2.

Tabela 6.4 Resultado das ordens de reação para o E2 e EE2.

| Ensaio | Fármaco | Constante | Ordem 0 | Ordem 1 |
|--------|---------|-----------|------------------------------------------------|---------------------------|
| 3 | (β) | k | 30,5840 (μg.L ⁻¹ .d ⁻¹) | 0,6101 (d ⁻¹) |
| | | R | -0,8074 | -0,8224 |
| 4 | (β) | k | 25,7591 (μg.L ⁻¹ .d ⁻¹) | 0,5275 (d ⁻¹) |
| | | R | -0,8988 | -0,8998 |
| | (α) | k | 5,0678 (μg.L ⁻¹ .d ⁻¹) | 0,0522 (d ⁻¹) |
| | | R | -0,8528 | -0,8584 |
| 5 | (β) | k | 26,6346 (μg.L ⁻¹ .d ⁻¹) | 0,5570 (d ⁻¹) |
| | | R | -0,9912 | -0,9991 |
| | (α) | k | 5,5809 (μg.L ⁻¹ .d ⁻¹) | 0,0622 (d ⁻¹) |
| | | R | -0,9960 | -0,9961 |
| 6 | (β) | k | 27,1817 (μg.L ⁻¹ .d ⁻¹) | 0,8152 (d ⁻¹) |
| | | R | -0,7599 | -1,0000 |
| | (α) | k | 5,1357 (μg.L ⁻¹ .d ⁻¹) | 0,0540 (d ⁻¹) |
| | | R | -0,9977 | -0,9987 |

Através de uma análise ao coeficiente de correlação dos ensaios apresentados pode constatar-se que este é sempre superior para a ordem 1, o que significa uma degradação de primeira ordem em todos os ensaios. Estes resultados estão de acordo com experiências realizadas e citadas por outros autores com os mesmos compostos (Clouzot *et al.*, 2010; de Mes *et al.*, 2005; Layton *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005).

Segundo Li *et al.*, (2005), para verificar se a degradação é de primeira ordem o gráfico entre $\ln(C/C_0)$ e o tempo deve apresentar um elemento linear independente das suas concentrações iniciais. De forma a analisar a ordem de reação por este método construiu-se a Figura 6.15. O gráfico foi construído apenas para o E2 uma vez que é o único composto que apresenta concentrações iniciais muito diferentes, a Tabela 6.5 apresenta esses valores para uma melhor compreensão da Figura 6.15.

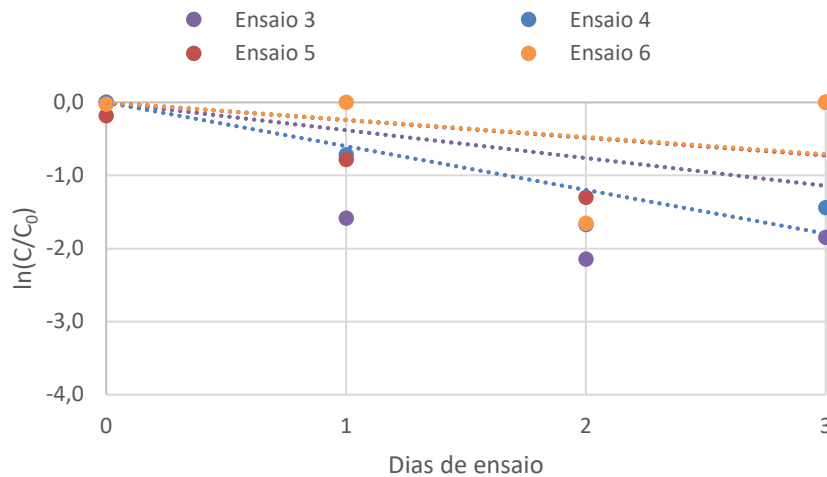


Figura 6.15 Ensaios 3 a 6: Ajustamento do modelo de 1ª ordem para o composto E2.

Tabela 6.5 Valores iniciais de E2 e CQO.

| Parâmetros | Ensaio | | | |
|-------------------------------------------------------------------|------------|------------|-----------|-----------|
| | 3 | 4 | 5 | 6 |
| E2 _{inicial} (µg.L ⁻¹) | 149 | 99 | 83 | 97 |
| CQO _{inicial} (mgO ₂ L ⁻¹) | 231 | 193 | 90 | 92 |

O ensaio 3 e o ensaio 5 apresentam uma diferença de 66 µg.L⁻¹ de concentração inicial e pela Figura 6.15 verifica-se uma tendência relativamente similar ao longo do tempo. A linha de tendência do ensaio 5 está sobreposta com a linha de tendência do ensaio 6.

Sendo reações de primeira ordem indicam que a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração do reagente. O ensaio 3 apresenta um bom exemplo de uma reação de primeira ordem, inicialmente a velocidade de remoção é elevada e à medida que a sua concentração diminui a velocidade de remoção também vai diminuindo.

Analisando as constantes cinéticas apresentadas com a degradação do composto EE2 verifica-se que há uma concordância com os resultados apresentados no ponto 6.3.2. Ao analisar as constantes cinéticas para o E2 os resultados já não são tão lineares quando comparados com o EE2. Os ensaios 5 e 6 foram os únicos que removeram o composto em 3 dias, no entanto, o ensaio 6 apresenta uma constante cinética muito superior ao ensaio 5 e a única diferença entre os ensaios é a sua concentração inicial de fármaco de 14 µg.L⁻¹. A constante cinética apresentou piores resultados para o ensaio 4, em que o composto não foi removido ao fim de 3 dias. O ensaio 3 que apesar de demorar mais 1 dia a remover o composto relativamente ao ensaio 5 apresenta uma constante cinética superior, o que pode ser explicado pela elevada concentração de fármaco neste ensaio e de como o biofilme aumentou a eficiência de remoção no 1º dia.

Na literatura existente não foi encontrada nenhuma experiência sobre as constantes cinéticas de degradação destes compostos em discos biológicos, no entanto, os resultados obtidos são comparáveis com outros processos. Como as constantes de degradação dependem dos fatores ambientais dos ensaios antes de proceder a uma comparação é necessário identificar 5 desses fatores:

- A temperatura nunca foi controlada, podendo variar aproximadamente entre 20 a 30 °C;
- Os SSV obtidos são muito inferiores relativamente aos SSV de lamas ativadas;
- A solução de alimentação simula uma água residual;
- O pH da água residual sintética é de 5,81;
- O reator funciona em *batch*.

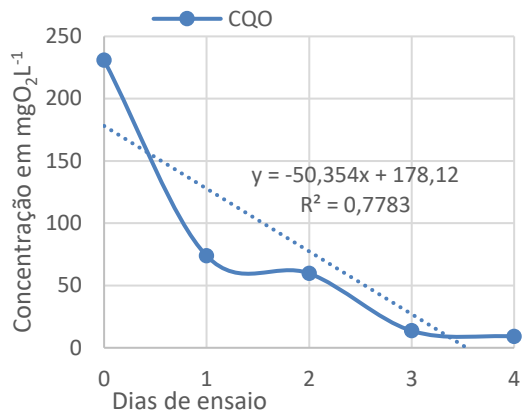
As constantes de degradação para o E2 variam entre 0,5275 a 0,8152 d⁻¹, e para o EE2 variam entre 0,0522 a 0,0622 d⁻¹. Comparando os resultados de E2 com as experiências em lamas ativadas de Li *et al.* (2005), verifica-se que há uma proximidade de valores quando alguns parâmetros como a temperatura e SSV são semelhantes. De acordo com Li *et al.* (2005), quando a temperatura é de 20 °C e a concentração de SSV de 435 mg.L⁻¹ a constante de degradação apresenta um valor de 0,85 h⁻¹.

Analisando os dois compostos relativamente às constantes de degradação apresentadas por de Mes *et al.* (2005), observa-se que também existe uma semelhança de valores em condições similares. Em lamas ativadas em *batch*, quando a concentração inicial é de 58 µg.L⁻¹ e a temperatura varia de 22 a 25 °C o E2 apresenta uma constante de degradação de 0,252 h⁻¹ e o EE2 de 0,012 h⁻¹.

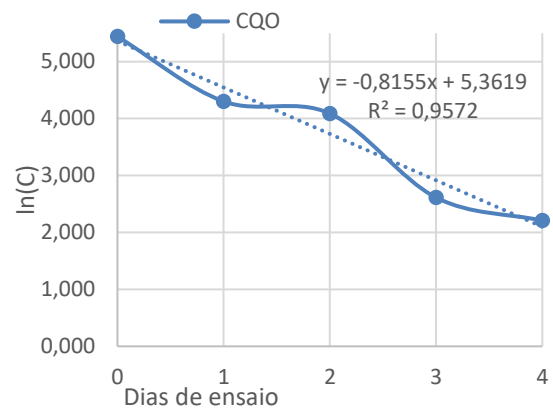
Outra experiência citada pelo mesmo autor que também apresenta condições muito próximas às deste estudo, (pH de 5,6, uma temperatura de 20 °C e uma concentração inicial de 100 µg.L⁻¹) a constante de degradação para E2 tem um valor de 8,39 h⁻¹ e para o EE2 um valor de 0,105 h⁻¹.

6.4.2 Ordem das reações para a CQO

A ordem de reação também foi calculada para a CQO de cada ensaio. No Anexo XIII, apresentam-se as tabelas utilizadas na sua determinação. Nas Figuras de 6.16 a 6.19 o resultado das hipóteses para ordem 0 e 1ª ordem e a Tabela 6.6 o resultado das ordens de reação para cada ensaio.

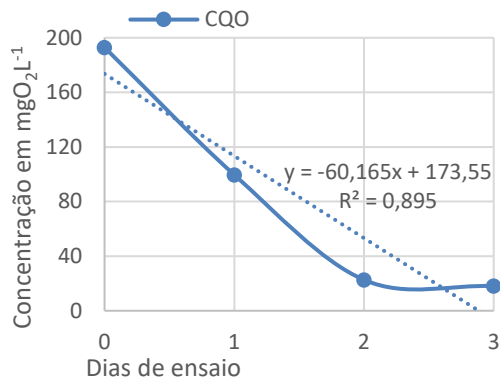


Ensaio 3 -ordem 0

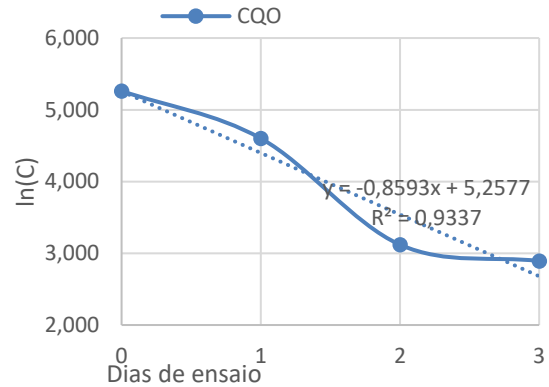


Ensaio 3 -1ª ordem

Figura 6.16 Ensaio 3: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação da CQO.

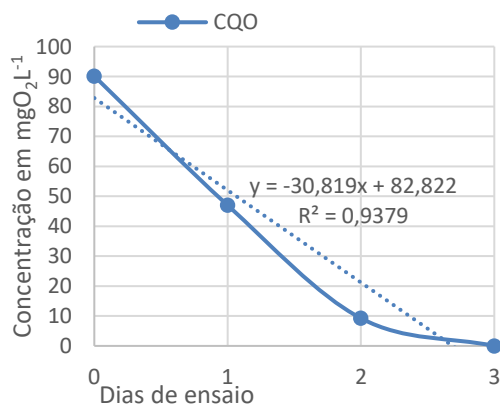


Ensaio 4 -ordem 0

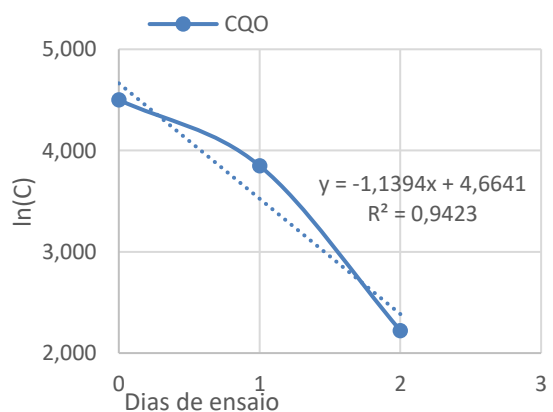


Ensaio 4 -1ª ordem

Figura 6.17 Ensaio 4: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação da CQO.



Ensaio 5 -ordem 0



Ensaio 5 -1ª ordem

Figura 6.18 Ensaio 5: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação da CQO.

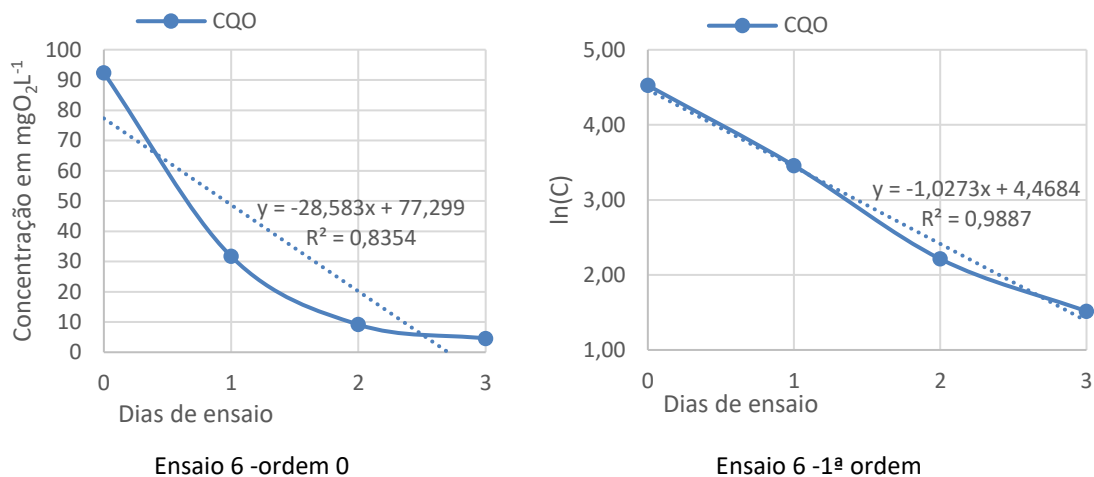


Figura 6.19 Ensaio 6: Ajustamento gráfico para determinação da ordem de reação da CQO.

Tabela 6.6 Resultado das ordens de reação para a CQO.

| Ensaio | Constante | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | |
|--------|-----------|------------------------------------------------|---------------------------|
| | | Ordem 0 | Ordem 1 |
| 3 | k | 50,3536 (µg.L ⁻¹ .d ⁻¹) | 0,8155 (d ⁻¹) |
| | R | -0,8822 | -0,9784 |
| 4 | k | 60,1653 (µg.L ⁻¹ .d ⁻¹) | 0,8593 (d ⁻¹) |
| | R | -0,9460 | -0,9663 |
| 5 | k | 30,8192 (µg.L ⁻¹ .d ⁻¹) | 1,1394 (d ⁻¹) |
| | R | -0,9685 | -0,9707 |
| 6 | k | 28,5829 (µg.L ⁻¹ .d ⁻¹) | 1,0273 (d ⁻¹) |
| | R | -0,9140 | -0,9943 |

Através de uma análise ao coeficiente de correlação dos ensaios apresentados pode constatar-se que este é sempre superior para a primeira ordem, o que significa uma degradação de primeira ordem em todos os ensaios. Estes resultados estão de acordo com a experiência realizada por Pinheiro (2006), em que as reações para a CQO também eram de 1ª ordem.

As constantes cinéticas da CQO neste estudo podem ser comparadas com dois parâmetros sendo estes a concentração inicial dos compostos e a concentração inicial da CQO, que variaram a cada ensaio. Para uma melhor compreensão devem-se analisar ensaios com as mesmas concentrações iniciais de CQO como o ensaio 5 e 6. Estes ensaios contêm uma concentração de CQO idêntica, mas, com base nas diferentes concentrações de fármacos a sua constante cinética variou, sendo superior para o ensaio 5 que contém menor fármaco.

6.5 Resumo dos resultados

Tabela 6.7 Resumo dos resultados

| Avaliação | | Ensaio 1 | | Ensaio 2 | | Ensaio 3 | | Ensaio 4 | | | Ensaio 5 | | | Ensaio 6 | | |
|--------------------|------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Valores iniciais | Manutenção de Biofilme | Não | | Sim | | Sim | | Não | | | Não | | | Sim | | |
| | Objetivo | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μgL ⁻¹) | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μgL ⁻¹) | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μgL ⁻¹) | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μgL ⁻¹) | 17α (μgL ⁻¹) | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μgL ⁻¹) | 17α (μgL ⁻¹) | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | 17β (μgL ⁻¹) | 17α (μgL ⁻¹) |
| | | 125 | 100 | 250 | 100 | 250 | 100 | 210 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Biodegradabilidade | Tempo (d) | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 89 | 63 | 182 | 21 | 231 | 149 | 193 | 99 | 106 | 90 | 83 | 99 | 92 | 97 | 103 |
| | 1 | 37 | | 69 | 26 | 74 | 31 | 100 | 49 | 92 | 47 | 45 | 92 | 32 | | |
| | 2 | 19 | 21 | 36 | 0 | 60 | 17 | 23 | 19 | 91 | 9 | 27 | 88 | 9 | 19 | 91 |
| | 3 | 18 | 42 | 32 | 0 | 14 | 24 | 18 | 24 | 89 | 0 | 0 | 81 | 5 | 0 | 87 |
| | 4 | | | | | 9 | 0 | | | | | | | | | |
| | 6 | 14 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| Constante cinética | R ₀ CQO | -0,8573 | | -0,8869 | | -0,8822 | | -0,9460 | | | -0,9685 | | | -0,9140 | | |
| | k ₀ CQO | 16,9830 | | 48,1170 | | 50,3536 | | 60,1653 | | | 30,8192 | | | 28,5829 | | |
| | R ₁ CQO | -0,9341 | | -0,9475 | | -0,9784 | | -0,9663 | | | -0,9707 | | | -0,9943 | | |
| | k ₁ CQO | 0,4467 | | 0,5834 | | 0,8155 | | 0,8593 | | | 1,1394 | | | 1,0273 | | |
| | R ₀ 17β | -0,8353 | | -0,8377 | | -0,8074 | | -0,8988 | | | -0,9912 | | | -0,7599 | | |
| | k ₀ 17β | 13,1814 | | 8,8417 | | 30,5840 | | 25,7591 | | | 26,6346 | | | 27,1817 | | |
| | R ₁ 17β | -0,5437 | | 1,0000 | | -0,8224 | | -0,8998 | | | -0,9991 | | | -1,0000 | | |
| | k ₁ 17β | 0,1940 | | -0,2125 | | 0,6101 | | 0,5275 | | | 0,5570 | | | 0,8152 | | |
| | R ₀ 17α | | | | | | | -0,8528 | | | -0,9960 | | | -0,9977 | | |
| | k ₀ 17α | | | | | | | 5,0678 | | | 5,5809 | | | 5,1357 | | |
| | R ₁ 17α | | | | | | | -0,8584 | | | -0,9961 | | | -0,9987 | | |
| | k ₁ 17α | | | | | | | 0,0522 | | | 0,0622 | | | 0,0540 | | |

6.6 Testes auxiliares pelo método SBSE

1) Testar o sistema de filtração com Acrodisc

a) Teste direto com Acrodisc:

Neste teste de filtração direto com/sem Acrodisc os resultados não foram claros para perceber se a utilização deste equipamento dificulta ou não as leituras no HPLC-DAD. Além disso, durante a análise do cromatograma com Acrodisc, no comprimento de onda 281 nm, não era perceptível se era realmente o composto que aparecia. A Tabela 6.8 apresenta os resultados deste teste e o Anexo XIV apresenta as áreas obtidas pelos cromatogramas.

Tabela 6.8 Teste direto com Acrodisc.

| Filtro | 17 β ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | 17 α ($\mu\text{g.L}^{-1}$) |
|--------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Com Acrodisc | 32 | 68 |
| Sem Acrodisc | 61 | 56 |

b) Teste direto em diferentes tipos de águas com Acrodisc e filtração

O resultado do teste de filtração para diferentes tipos de águas também não foi conclusivo, o seu motivo está associado às dificuldades encontradas nas leituras dos resultados. De forma geral, também não era perceptível se era realmente o composto que aparecia no comprimento de onda 281 nm e em alguns casos o composto não aparecia ou não era possível analisar. A Tabela 6.9 apresenta os resultados deste teste e o Anexo XV apresenta um exemplo de cromatograma analisado e as áreas obtidas.

Tabela 6.9 Teste direto com diferentes tipos de águas com Acrodisc e filtração.

| Tipo de água | Filtro | Acrodisc | 17 β ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | 17 α ($\mu\text{g.L}^{-1}$) |
|----------------------|--------|----------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Água desmineralizada | Sim | Sim | 43 | 38 |
| Água desmineralizada | Sim | Não | 25 | 36 |
| Água Sintética | Sim | Sim | 36 | 62 |
| Água Sintética | Sim | Não | 29 | - |
| Água residual | Sim | Sim | 23 | 45 |
| Água residual | Sim | Não | - | - |

Apesar do teste b) obter resultados mais favoráveis quando se utiliza Acrodisc, estes resultados não podem ser tomados como certos devido às interferências encontradas nos cromatogramas. Para além da incerteza que se manteve após a realização do teste a) e b) os resultados obtidos não são consistentes, uma vez que só existe uma amostra de cada. Seriam necessários mais ensaios que comprovassem que realmente os filtros têm potencial de adsorção dos fármacos.

Assim, e através destes resultados inconclusivos, achou-se que o melhor método seria excluir este passo e utilizar apenas a metodologia adaptada de (S. Fernandes, 2016; Vicente, 2016) para a fase B.

2) Ensaio de fotodegradação direto:

Para determinar a possível degradação dos fármacos, expostos a fatores físicos como a temperatura e a exposição à luz, foram preparadas duas soluções mãe guardadas em locais com condições deferentes. As Figuras 6.20 e 6.21 apresentam os resultados para o E2 e o EE2, e os seus cromatogramas do dia 0 e do dia 5 podem ser consultados no Anexo XVI.

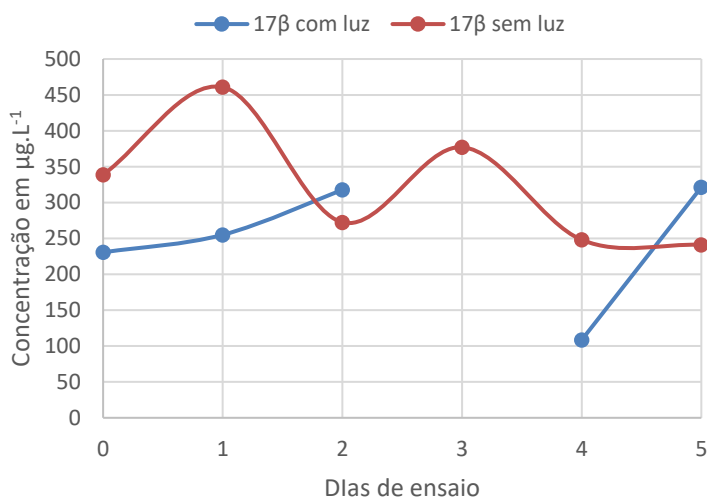


Figura 6.20 Resultados dos ensaios de fotodegradação para o E2.

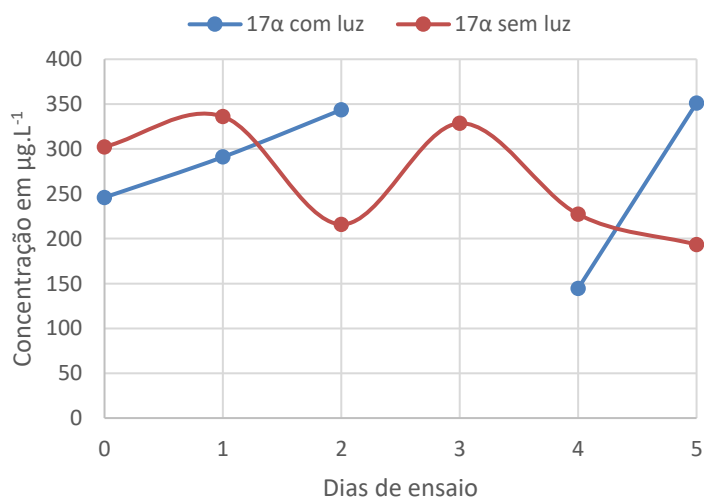


Figura 6.21 Resultados dos ensaios de fotodegradação para o EE2.

Os resultados da fotodegradação dos fármacos apresentam algumas oscilações durante os cinco dias de ensaio. Comparando a fotodegradação do E2 e do EE2 observa-se que as oscilações diárias com e sem luz são idênticas. De forma geral, e há exceção do 3º e 4º dia, pode constatar-se que os padrões de E2 e de EE2 quando expostos à luz e à temperatura ambiente não se degradam.

3) Curva de calibração com injeção direta

A curva de calibração direta teve como objetivo calcular as concentrações dos fármacos em todos os testes diretos, acima descritos. A Figura 6.22 e 6.23 apresenta a equação para a curva de calibração do E2 e EE2 respetivamente e o Anexo XVII apresenta um exemplo de cromatograma analisado e as áreas obtidas.

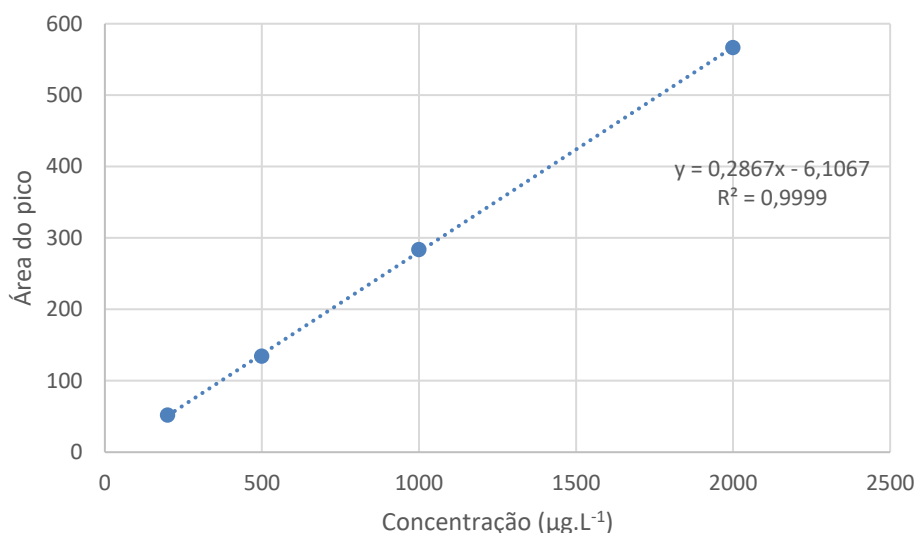


Figura 6.22 Curva de calibração direta para o E2.

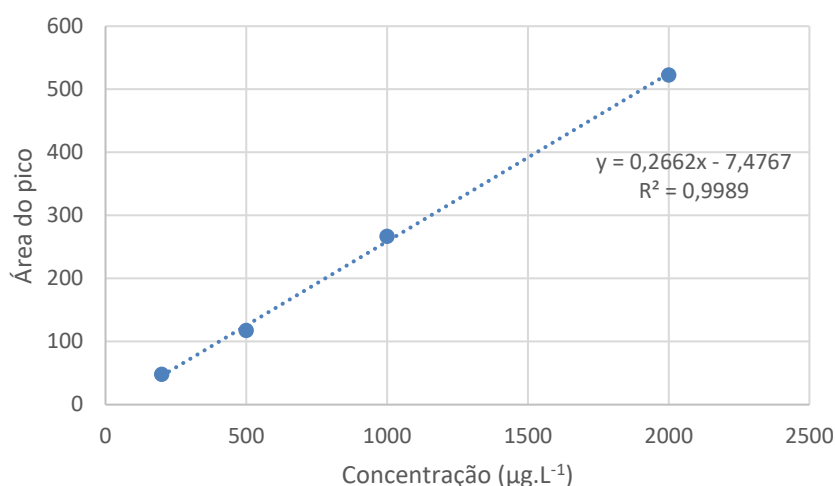


Figura 6.23 Curva de calibração direta para o EE2.

4) Ensaio para determinar a adsorção dos fármacos aos materiais da instalação

Os ensaios de adsorção dos compostos aos materiais da instalação foram realizados por (Fernandes, 2016; Vicente, 2016). Os seus resultados demonstram que o EE2 e o E2 não ficam adsorvidos aos reservatórios de armazenamento de alimentação nem às mangueiras.

5) Ensaio em branco

Nos ensaios em branco foram realizadas análises à água desmineralizada e ao efluente doméstico simulado, para identificar se existe algo nas suas matrizes que pudesse interferir com a leitura dos resultados.

Nos três ensaios realizados em branco com água desmineralizada identificou-se um pico aos 8,9 minutos. No entanto, este pico não vai interferir com as leituras dos fármacos uma vez que o seu tempo de retenção é aproximadamente aos 4,46 min e 5,64 min para o E2 e EE2 respetivamente. A partir dos ensaios em branco calculou-se o LOQ e o LOD e os seus resultados podem ser consultados no ponto 6.2.

O efluente doméstico simulado não apresenta nenhum pico que pudesse interferir com as leituras, mas de forma a garantir este resultado calculou-se o “ruído” existente no seu cromatograma. A Tabela 6.10 apresenta o “ruído” calculado pela solução de alimentação.

Tabela 6.10 “Ruído” calculado pela solução de alimentação

| | Área | Concentração (µg.L ⁻¹) |
|-----|------|------------------------------------|
| 17β | 17 | 21,53 |
| 17α | 3 | 20,82 |

Como o “ruído” obteve valores inferiores ao LOD significa que há garantias que esta solução não vai interferir com os resultados. O Anexo XVIII apresenta os cromatogramas analisados para a água desmineralizada e para a solução de alimentação sem fármaco.

6) Curva de calibração com metanol

Este ensaio provou que na presença de metanol os fármacos têm menor tendência em aderir à barra SBSE. Para uma melhor comparação a Figura 6.24 e 6.25 apresenta o movimento dos compostos com barra SBSE nos meios em estudo (metanol e água desmineralizada).

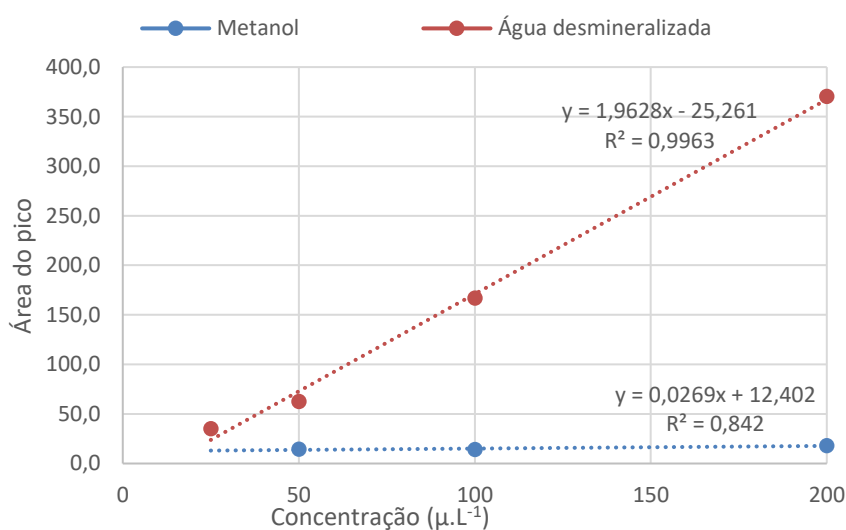


Figura 6.24 Curva de calibração do E2 com metanol e água desmineralizada.

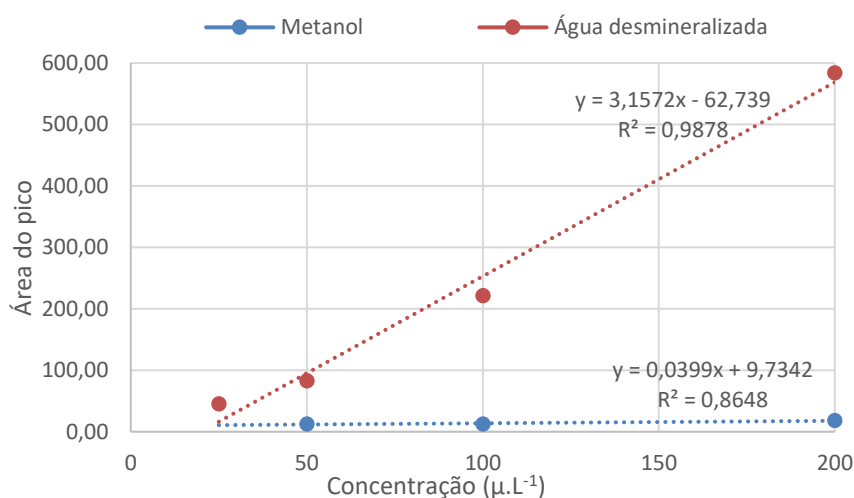


Figura 6.25 Curva de calibração do EE2 com metanol e água desmineralizada.

Através das Figuras 6.24 e 6.25 verifica-se que na presença de água desmineralizada os fármacos têm tendência a entrar na barra SBSE, pois são compostos pouco solúveis em água e hidrofóbicos. Por outro lado, estes compostos são mais solúveis em metanol e conseqüentemente a sua tendência para entrar na barra será menor, sendo por isso as áreas dos seus picos muito reduzidas. Assim, para determinar a concentração dos compostos em estudo utilizou-se uma curva de calibração em água desmineralizada.

7 Conclusões

A eficiência de degradação de E2 é inversamente proporcional com a concentração inicial de CQO. Nas experiências realizadas em *batch* a degradação do E2 ocorreu de forma mais rápida na presença de uma CQO mais baixa, traduzindo uma degradação linear de E2 ao fim de três dias. Para estas condições as concentrações iniciais de fármaco não são relevantes, dentro de certo intervalo, para a sua degradação. Por outro lado, uma CQO elevada e com biofilme visivelmente desenvolvido só é eficiente na degradação de E2 nas primeiras 24 horas apresentando um valor de 80%, a partir do 1º dia a sua concentração estabiliza e só é totalmente degradado no 4º dia. Este fato pode indicar que a presença de biofilme desenvolvido é fundamental na degradação do E2, mas mais estudos necessitam de ser efetuados. O E2 apresentou constantes cinéticas de primeira ordem que variaram entre 0,5275 a 0,8152 d⁻¹, consentâneos com os referidos na literatura para ensaios em *batch*.

Nos ensaios que foram realizados em *batch* verificou-se que a degradação do EE2 é inversamente proporcional com a sua concentração inicial e com concentração inicial de CQO, no entanto, a máxima degradação que este composto apresenta é de apenas 20%. A presença de biofilme desenvolvido poderá ser um parâmetro fundamental para degradar o EE2, contudo, este estudo não apresenta resultados sólidos para a sua conclusão. O EE2 também apresentou constantes cinéticas de primeira ordem que variaram entre 0,0522 a 0,0622 d⁻¹.

Para a CQO, tal como nos compostos, obtiveram-se reações de primeira ordem com as constantes cinéticas a variarem de 0,8155 a 1,1394 d⁻¹. Os valores obtidos para o E2, EE2 e a CQO identificam-se com os valores existentes na bibliografia, quando as condições de ensaio são semelhantes.

Apesar do processo de lamas ativadas em *batch* ser mais rápido na degradação destes compostos relativamente aos discos biológicos em *batch*, observou-se que ao fim de três dias o E2 foi totalmente degradado e o EE2 apresentou uma degradação de 20%. No entanto, mais estudos devem ser feitos para analisar outros parâmetros que possam influenciar na degradação destes compostos. Contudo, pelos resultados acima descritos pode-se afirmar que os discos biológicos podem ter grande aplicabilidade como tratamento terciário/avançado.

8 Perspectivas de trabalho futuro

- Com as mesmas condições do presente trabalho recolher amostras de hora em hora, para uma melhor compreensão da evolução da degradação dos compostos;
- Investigar a remoção de EE2 em *batch* com a presença de biofilme com espessuras ou tempos de desenvolvimento controlados, de forma a confirmar se este parâmetro tem influência na sua remoção; e o mesmo procedimento para o E2 com CQO inferiores a $100 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ para confirmar o seu potencial de degradação nas primeiras 24 horas;
- Com as mesmas condições realizar ensaios com concentrações de E2 e EE2 inferiores, para aproximar o mais possível das concentrações encontradas em águas residuais;
- Aplicar o mesmo processo em água residual para comprovar se o comportamento dos compostos é o mesmo e concluir da sua aplicabilidade em ETAR;
- Realizar ensaios em *batch* onde os parâmetros apresentem diferentes condições, para perceber qual a forma mais eficaz de remover os compostos. Alguns exemplos poderão ser: ensaios a diferentes temperaturas, variações na concentração inicial do composto e testar meios com diferentes pH;
- Analisar se durante a biodegradação do E2 este não se oxida em E1.

9 Referências

- American Public Health Association (APHA). (2005). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21st Edition.
- Américo, J. H. P., Messias, T. G., Torres, N. H., & Américo, G. H. P. (2012). **Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana**. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia E Meio Ambiente*, 22, 17–34.
- Antunes, M. G. (2008). **Contributo para a Avaliação do Balanço Associado à Degradação de Compostos Disruptores Endócrinos em Águas Residuais Domésticas**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil de Engenharia Sanitária. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R. D., Adams, C. D., & Surampalli, R. Y. (2006). **Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge**. *Process Biochemistry*, 41(3), 525–539.
- Baeza, C., & Knappe, D. R. U. (2011). **Transformation kinetics of biochemically active compounds in low-pressure UV Photolysis and UV/H₂O₂ advanced oxidation processes**. *Water Research*, 45(15), 4531–4543.
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2003). **Fármacos no meio ambiente**. *Química Nova*, 26(4), 523–530.
- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2007). **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências**. *Química Nova*, 30(3), 651–666.
- Birkett, J. W., & Lester, J. N. (2003). **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes**. Lewis Publishers.
- Braga, O., Smythe, G. A., Schäfer, A. I., & Feitz, A. J. (2005). **Steroid estrogens in primary and tertiary wastewater treatment plants**. *Water Science & Technology*, 52, 8, 273–278.
- Can, Z. S., Firlak, M., Kerç, A., & Evcimen, S. (2014). **Evaluation of different wastewater treatment techniques in three WWTPs in Istanbul for the removal of selected EDCs in liquid phase**. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(1), 525–539.
- Carvalho, A. R. M. De. (2012). **Monitorização de Desreguladores Endócrinos em águas de rede e águas residuais por SPE-UPLC-ESI-MS / MS - Empresa Portuguesa das Águas Livres (EPAL)**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Chambel, J. H. de M. (2011). **Contribuição para o estudo da remoção em ETAR de 17 β - estradiol e de 17 α - etinilestradiol no tratamento biológico**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente – Perfil Engenharia Sanitária, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Clouzot, L., Doumenq, P., Roche, N., & Marrot, B. (2010). **Kinetic parameters for 17 α -ethinylestradiol removal by nitrifying activated sludge developed in a membrane bioreactor**. *Bioresource Technology*, 101(16), 6425–6431.
- Comissão Europeia. (1999). **Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos - substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais. Comunicação da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu**. *Comissão Das Comunidades Europeias. COM 706 Final. Bruxelas*.
- Comissão Europeia. (2001). **Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos - substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais**. In *Relatório de progresso sobre a Comunicação COM*

- (1999) 706 da Comissão. *Comissão das Comunidades Europeias* (Vol. 53, pp. 1689–1699). Bruxelas.
- Comissão Europeia (DG Ambiente). (2008). Água - Notas sobre a aplicação da Directiva-Quadro Água. Água - Nota 8. Poluição: Reduzir os produtos químicos perigosos nas águas da Europa, 1–2.
- Cook, M., Symonds, E., Gerber, B., Hoare, A., Van Vleet, E., & Breitbart, M. (2016). **Removal of Six Estrogenic Endocrine-Disrupting Compounds (EDCs) from Municipal Wastewater Using Aluminum Electrocoagulation.** *Water*, 8, 128.
- Dang, J. S.; Harvey, D. M.; Jobbagy, A.; Grady Jr., C. P. L. (1989) **Evaluation of Biodegradation Kinetics with Respirometric data.** *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, 61 (11-12), pp. 1711-1721.
- de Mes, T., Zeeman, G., & Lettinga, G. (2005). **Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol in STPs for domestic wastewater.** *Reviews in Environmental Science and Bio/technology*, (4), 275–311.
- Decisão de Execução (UE) 2015/495 de 20 de Março de 2015 da Comissão, **que estabelece uma lista de vigilância das substâncias para monitorização a nível da União no domínio da política da água nos termos da Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho.** In *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Decisão nº 2455/2001/CE de 20 de Novembro de 2001 do Parlamento Europeu e do Conselho, **que estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água e altera a Directiva 2000/60/CE.** In *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.
- Decreto-Lei n.º 218/2015 de 7 de Outubro de 2015 do Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e Energia. In *Diário da República*, 1.ª série - N.º196.
- Diretiva 2000/60/CE de 23 de Outubro de 2000 do Parlamento Europeu e do Conselho, **Estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política de água.** In *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.
- Diretiva 2013/39/UE de 12 de Agosto de 2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, **que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água.** In *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Domingos I. J. (1999). **Contribuição para o Estudo da Biodegradação Aeróbia de Ácido Abiótico e Terpeneol.** Dissertação para obtenção de Grau de Doutor, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa Lisboa.
- Duarte, P. A. F. (2008). **Novos poluentes. Principais impactes de compostos desreguladores endócrinos na saúde pública.** Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Eldridge, J. C., & Stevens, J. T. (2010). **Endocrine Toxicology.** *CRC Press (Third Edit)*.
- European Commission. (2007). **On the implementation for the “Community Strategy for Endocrine Disrupters”- a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife.** SEC (2007) 1635. In *Commission Staff Working Document. (COM (1999) 706), (COM (2001) 262) and (SEC (2004) 1372)* (pp. 1–37). Brussels.
- Fernandes, C. (2006). **Otimização da extração , separação cromatográfica , identificação e quantificação de fármacos em fluidos biológicos.** Tese para obtenção do título de doutor em Ciências, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Fernandes, S. (2016). **Contribuição para o Estudo da Remoção Biológica de 17 β -estradiol em Águas Residuais.** Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia do

Ambiente - Perfil Engenharia Sanitária, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

- Fernandes, T. (2012). **Contribuição para o estudo da presença de disruptores endócrinos em lamas de ETAR.** Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente – Perfil Engenharia Sanitária, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Hassard, F., Biddle, J., Cartmell, E., Jefferson, B., Tyrrel, S., & Stephenson, T. (2015). **Rotating biological contactors for wastewater treatment - A review.** *Process Safety and Environmental Protection*, 94, 285–306.
- Howard, C. V., Nicolopoulou-Stamati, P., & Hens, L. (2001). **Endocrine disrupters. Environmental Health and Policies.** (Vol.18). Springer Science & Business Media. ((Vol.18) ed.).
- Huber, L. (2007). **Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Interpharm, Informa Healthcare.** New York, USA.
- Ifelebuegu, a O. (2011). **The fate and behavior of selected endocrine disrupting chemicals in full scale wastewater and sludge treatment unit processes.** *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8(2), 245–254.
- International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Text and Methodology.* (1996). ICH-Q2B. Geneva.
- Johnson I., H. P. (2002). European Commission. **Study on the scientific evaluation of 12 substances in the context of endocrine disrupter priority list of actions,** (November).
- Koh, Y. K. K., Chiu, T. Y., Boobis, A., Cartmell, E., Scrimshaw, M. D., & Lester, J. N. (2008). **Treatment and Removal Strategies for Estrogens From Wastewater.** *Environmental Technology*, 29(3), 245–267.
- Layton, A. C., Gregory, B. W., Seward, J. R., Schultz, T. W., & Sayler, G. S. (2000). **Mineralization of steroidal hormones by Bbsoilids in wastewater treatment systems in Tennessee U.S.A.** *Environmental Science & Technology*, 34, 3925–3931.
- Lei n.º 58/2005. (n.d.). de 29 de Dezembro que Aprova a Lei da Água, transpondo para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro, e estabelecendo as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das água. In *Diário da República — I Série - A N.º 249.* Assembleia da República.
- Li, F., Yuasa, A., Obara, A., & Mathews, A. P. (2005). **Aerobic batch degradation of 17- b estradiol (E2) by activated sludge : Effects of spiking E2 concentrations , MLVSS and temperatures.** *Water Research*, 39, 2065–2075.
- Martínez, A. D. (2001). **Biodiscos : Una alternativa de tratamiento biológico para aguas residuales cuando no se dispone de grandes extensiones de terreno.** *Tecnología En Marcha*, 13(3), 57–59.
- Metcalf, E., & Eddy, H. (2003). **Wastewater engineering: treatment and reuse.** McGraw-Hill Publishing Company Limited, 4th edition.
- Muñoz, I., Gómez, M. J., Molina-díaz, A., Huijbregts, M. A. J., Fernández-alba, A. R., & García-calvo, E. (2008). **Ranking potential impacts of priority and emerging pollutants in urban wastewater through life cycle impact assessment.** *Chemosphere*, 74(1), 37–44.
- Nogueira, J. M. F. (1999) **Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitorização dos Sistemas Aquáticos.** *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química.* (65-71).
- Parlamento Europeu. (2013). **Sessão plenária de julho: orçamento da UE, Croácia,**

cibersegurança (pp. 1–30).

- Pinheiro, D. M. (2006). **Influência da velocidade de recirculação no tratamento anaeróbio de esgoto sintético em biorreator operado em batelada sequencial contendo biomassa granulada**. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário, Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul.
- Pintado-herrera, M. G., González-mazo, E., & Lara-martín, P. A. (2014). **Atmospheric pressure gas chromatography – time-of-flight-mass spectrometry (APGC – ToF-MS) for the determination of regulated and emerging contaminants in aqueous samples after stir bar sorptive extraction (SBSE)**. *Analytica Chimica Acta*, 851, 1–13.
- Pio, S., West, C., & Henriques, A. (2000). **Protecção das águas de superfície contra a poluição por substâncias perigosas no âmbito da directiva-quadro da água**. 5º Congresso da água, Lisboa, 16.
- Ranade, V. V., & Bhandari, V. M. (2014). **Industrial Wastewater Treatment, Recycling, and Reuse**.
- Rangel, J.F.P.G.F. (2010) **Análise Quantitativa de Monómeros Existentes na Saliva Através de Técnicas Cromatográficas**, Dissertação para Obtenção de Grau de Mestre em Medicina Dentária, pelo Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Caparica.
- Rolim, M. F. (2014). **Contribuição para o estudo da caracterização de biofilmes de diferentes idades**. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente - perfil Engenharia Sanitária, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Rosa, R. M. R. (2008). **Contribuição para o estudo de compostos desreguladores endócrinos (EDC) em estações de tratamento de águas residuais (ETAR): Estudo da remoção de EDC's numa ETAR com tratamento terciário**. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente - Perfil Engenharia Sanitária, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Rudder, J. De, Wiele, T. Van De, Dhooge, W., Comhaire, F., & Verstraete, W. (2004). **Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17 α -ethynylestradiol (EE2)**, 38, 184–192.
- Roast, S. D. (2007). **Endocrine disruption horizon scanning: priority and new endocrine disrupting chemicals**. Environment Agency.
- Salgado, R. M. N. (2011). **The removal of xenobiotic compounds from wastewater through the use of biological processes and advanced oxidation technologies**. Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Shrivastava, A., & Gupta, V. B. (2011). **Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods**. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21–25.
- Silva, L. R. da, & Ferreira, M. M. C. (2003). **Estudo do coeficiente de partição octanol-água de Bifenilas Policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos**. *Quim. Nova*, 26(3), 312–318.
- Silva, S. M. (2007). **Padronização e validação do método extração sortiva em barra de agitação e cromatografia líquida de alta eficiência (SBSE/HPLC) para a determinação de antidepressivos em amostras de plasma**. Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., & Kraak, G. Van Der. (2002). **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors**. Chapter 1: Executive

Summary. (pp. 1–4). Geneva: World Health Organization.

- Tonde, M. R., Patil, S. B., & Mali, J. R. (2015). **Review Paper on Study of Rotating Biological Contactor for Wastewater Treatment Process.** *International Journal of Current Engineering and Technology*, 5(3), 1539–1541.
- Tran, N. H., Uruse, T., & Kusakabe, O. (2009). **The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds.** *Journal of Hazardous Materials*, 171(1-3), 1051–1057.
- U.S. Environmental Protection Agency. (1997). **SPECIAL REPORT ON ENVIRONMENTAL ENDOCRINE DISRUPTION: AN EFFECTS ASSESSMENT AND ANALYSIS.**
- Vader, J. S., Van Ginkel, C. G., Sperling, F. M. G. M., De Jong, J., De Boer, W., De Graaf, J. S., ... Stokman, P. G. W. (2000). **Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge.** *Chemosphere*, 41(8), 1239–1243.
- Venade, C. S. G. (2013). **Contaminação ambiental por disruptores endócrinos - Estuário do rio Minho.** Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto.
- Vicente, A. C. (2016). **Contribuição para o Estudo da Remoção do Fármaco 17 α - Etinilestradiol de Água Residual Urbana Tratada com Recurso ao Processo de Discos Biológicos.** Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente - Perfil Engenharia Sanitária, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Viladomat, M. R. (2010). **Effects of priority and emerging pollutants on river biofilms. Programa de Doctorat en Ciències Experimentals i Sostenibilitat.** Institut d'Ecologia Aquàtica - Universitat de Girona, Girona.
- Yi, T., & Harper, J. W. F. (2007). **The link between nitrification and biotransformation of 17 α -ethinylestradiol.** *Environmental Science & Technology*, 41(12), 4311–4316.

Sítios na Internet consultados

<http://www.tecdepur.com/blog/tecnologias-blandas-2-contactores-biologicos-rotativos-cbr-o-biodiscos> (Consultado a 27/09/2016)

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=B-ESTRADIOL&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=pt®ion=PT&focus=product> (Consultado a 20/10/2016)

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=ethinylestradiol&N=0&mode=match%20partialmax&focus=product&lang=pt®ion=PT&cm_re=Did%20You%20Mean--ethinylestradiol--ETINILESTRADIOL (Consultado a 20/10/2016)

ANEXOS

Anexo I - Lista original de substâncias prioritárias (Adaptado de Decisão nº 2455/2001/CE)

A lista original de substâncias prioritárias com 33 elementos foi definida através da Decisão n.º 2455/2001/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Novembro de 2001, e encontra-se representada na Tabela I.

Tabela I.1 - Lista original de substâncias prioritárias.

| | Número CAS (°) | Número UE (°) | Designação da substância prioritária | Identificada como substância perigosa prioritária |
|------|----------------|---------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------|
| (1) | 15972-60-8 | 240-110-8 | Alachloro | |
| (2) | 120-12-7 | 204-371-1 | Antraceno | (X) (***) |
| (3) | 1912-24-9 | 217-617-8 | Atrazina | (X) (***) |
| (4) | 71-43-2 | 200-753-7 | Benzeno | |
| (5) | não aplicável | não aplicável | Éteres difenilicos bromados (**) | X (****) |
| (6) | 7440-43-9 | 231-152-8 | Cádmio e compostos de cádmio | X |
| (7) | 85535-84-8 | 287-476-5 | C ₁₀₋₁₁ -cloroalquenos (**) | X |
| (8) | 470-90-6 | 207-432-0 | Clorfenvinfos | |
| (9) | 2921-88-2 | 220-864-4 | Clorpirifos | (X) (***) |
| (10) | 107-06-2 | 203-458-1 | 1,2-Dicloroetano | |
| (11) | 75-09-2 | 200-838-9 | Diclorometano | |
| (12) | 117-81-7 | 204-211-0 | Di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) | (X) (***) |
| (13) | 330-54-1 | 206-354-4 | Diuron | (X) (***) |
| (14) | 115-29-7 | 204-079-4 | Endosulfan | (X) (***) |
| (15) | 206-44-0 | 205-912-4 | (Fluoranteno) (****) | |
| (16) | 118-74-1 | 204-273-9 | Hexaclorbenzeno | X |
| (17) | 87-68-3 | 201-765-5 | Hexaclorbutadieno | X |
| (18) | 608-73-1 | 210-158-9 | Hexaclorciclohexano | X |
| (19) | 34123-59-6 | 251-835-4 | Isoproturon | (X) (***) |
| (20) | 7439-92-1 | 231-100-4 | Chumbo e composto de chumbo | (X) (***) |
| (21) | 7439-97-6 | 231-106-7 | Mercúrio e composto de mercúrio | X |
| (22) | 91-20-3 | 202-049-5 | Naftaleno | (X) (***) |
| (23) | 7440-02-0 | 231-111-4 | Níquel e composto de níquel | |
| (24) | 25154-52-3 | 246-672-0 | Nonilfenóis | X |
| (25) | 1806-26-4 | 217-302-5 | Octilfenóis | (X) (***) |
| (26) | 608-93-5 | 210-172-5 | Pentaclorbenzeno | X |
| (27) | 87-86-5 | 201-778-6 | Pentaclorfenol | (X) (***) |
| (28) | não aplicável | não aplicável | Hidrocarbonetos poliaromáticos | X |

Tabela I.2 - Lista original de substâncias prioritárias (Cont.).

| | | | | |
|------|------------|-----------|------------------------------|-----------|
| (29) | 122-34-9 | 204-535-2 | Simazina | (X) (***) |
| (30) | 688-73-3 | 211-704-4 | Composto de tributileno | X |
| (31) | 12002-48-1 | 234-413-4 | Triclorbenzenos | (X) (***) |
| (32) | 67-66-3 | 200-663-8 | Triclorometano (Clorofórmio) | |
| (33) | 1582-09-8 | 216-428-8 | Trifluralina | (X) (***) |

(*) Nos casos em que foram seleccionados grupos de substâncias, mencionam-se entre parêntesis representantes típicos individuais, como parâmetros indicativos (entre parêntesis e sem número). O estabelecimento de medidas de controlo será feito em função destas substâncias, sem prejuízo da eventual inclusão de outros representantes individuais, se for caso disso.

(**) Estes grupos de substâncias incluem em geral um grande número de compostos individuais. Não é actualmente possível apontar parâmetros indicativos adequados.

(***) Esta substância prioritária está sujeita a um exame para identificação como eventual "substância perigosa prioritária". A Comissão apresentará ao Parlamento Europeu e ao Conselho uma proposta para a sua classificação final num prazo não superior a 12 meses após a aprovação desta lista. Esta revisão não afectará o calendário estabelecido no artigo 16.º da Directiva 2000/60/CE para as propostas de controlos da Comissão.

(****) Apenas éter pentabromodifenílico (número CAS 32534-81-9).

(*****) O fluoranteno figura na lista como indicador de outros hidrocarbonetos mais perigosos.

(1) CAS: Chemical Abstract Services.

(2) Número UE: Inventário Europeu das substâncias químicas notificadas (ELINCS).

Anexo II - Lista de substâncias prioritárias atual (Adaptado da Diretiva 2013/39/UE)

A Diretiva n.º 2013/39/EU que diz respeito às SP no domínio da política da água, nomeadamente na revisão da lista de substâncias prioritárias, permitiu a identificação de novas substâncias existentes. A Tabela II apresenta a lista de substâncias prioritárias atual.

Tabela II.1 - Lista de substâncias prioritárias atual.

| Número | Número CAS ⁽¹⁾ | Número UE ⁽²⁾ | Nome da substância prioritária ⁽³⁾ | Identificada como substância perigosa prioritária |
|--------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| (1) | 15972-60-8 | 240-110-8 | Alacloro | |
| (2) | 120-12-7 | 204-371-1 | Antraceno | X |
| (3) | 1912-24-9 | 217-617-8 | Atrazina | |
| (4) | 71-43-2 | 200-753-7 | Benzeno | |
| (5) | Não aplicável | Não aplicável | Éteres difenilicos bromados | X ⁽⁴⁾ |
| (6) | 7440-43-9 | 231-152-8 | Cádmio e compostos de cádmio | X |
| (7) | 85535-84-8 | 287-476-5 | Cloroalcanos, C ₁₀₋₁₃ | X |
| (8) | 470-90-6 | 207-432-0 | Clorfenvinfos | |
| (9) | 2921-88-2 | 220-864-4 | Clorpirifos (Clorpirifos-etilo) | |
| (10) | 107-06-2 | 203-458-1 | 1,2-Dicloroetano | |
| (11) | 75-09-2 | 200-838-9 | Diclorometano | |
| (12) | 117-81-7 | 204-211-0 | Ftalato de di(2-etil-hexilo) (DEHP) | X |
| (13) | 330-54-1 | 206-354-4 | Diurão | |
| (14) | 115-29-7 | 204-079-4 | Endossulfão | X |
| (15) | 206-44-0 | 205-912-4 | Fluoranteno | |
| (16) | 118-74-1 | 204-273-9 | Hexaclorobenzeno | X |
| (17) | 87-68-3 | 201-765-5 | Hexaclorobutadieno | X |
| (18) | 608-73-1 | 210-168-9 | Hexaclorociclo-hexano | X |
| (19) | 34123-59-6 | 251-835-4 | Isoproturão | |
| (20) | 7439-92-1 | 231-100-4 | Chumbo e compostos de chumbo | |
| (21) | 7439-97-6 | 231-106-7 | Mercúrio e compostos de mercúrio | X |
| (22) | 91-20-3 | 202-049-5 | Naftaleno | |
| (23) | 7440-02-0 | 231-111-4 | Níquel e compostos de níquel | |
| (24) | Não aplicável | Não aplicável | Nonilfenóis | X ⁽⁵⁾ |
| (25) | Não aplicável | Não aplicável | Octilfenóis ⁽⁶⁾ | |
| (26) | 608-93-5 | 210-172-0 | Pentaclorobenzeno | X |
| (27) | 87-86-5 | 201-778-6 | Pentaclorofenol | |
| (28) | Não aplicável | Não aplicável | Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ⁽⁷⁾ | X |
| (29) | 122-34-9 | 204-535-2 | Simazina | |
| (30) | Não aplicável | Não aplicável | Compostos de tributilestanho | X ⁽⁸⁾ |

Tabela II.2 - Lista de substâncias prioritárias atual (Cont.).

| | | | | |
|------|-------------------|---------------------|---------------------------------------------------------|-------------------|
| (31) | 12002-48-1 | 234-413-4 | Triclorobenzenos | |
| (32) | 67-66-3 | 200-663-8 | Triclorometano (clorofórmio) | |
| (33) | 1582-09-8 | 216-428-8 | Trifluralina | X |
| (34) | 115-32-2 | 204-082-0 | Dicofol | X |
| (35) | 1763-23-1 | 217-179-8 | Ácido perfluorooctanossulfônico e seus derivados (PFOS) | X |
| (36) | 124495-18-7 | Não aplicável | Quinoxifena | X |
| (37) | Não aplicável | Não aplicável | Dioxinas e compostos semelhantes a dioxinas | X ⁽⁹⁾ |
| (38) | 74070-46-5 | 277-704-1 | Aclonifena | |
| (39) | 42576-02-3 | 255-894-7 | Bifenox | |
| (40) | 28159-98-0 | 248-872-3 | Cibutrina | |
| (41) | 52315-07-8 | 257-842-9 | Cipermetrina ⁽¹⁰⁾ | |
| (42) | 62-73-7 | 200-547-7 | Diclorvos | |
| (43) | Não aplicável | Não aplicável | Hexabromociclododecanos (HBCDD) | X ⁽¹¹⁾ |
| (44) | 76-44-8/1024-57-3 | 200-962-3/213-831-0 | Heptacloro e epóxido de heptacloro | X |
| (45) | 886-50-0 | 212-950-5 | Terbutrina | |

(1) CAS: Chemical Abstracts Service.

(2) Número UE: Inventário Europeu das Substâncias Químicas Existentes no Mercado (EINECS) ou Lista Europeia das Substâncias Químicas Notificadas (ELINCS).

(3) Nos casos em que foram selecionados grupos de substâncias, e a menos que sejam explicitamente indicados numa nota, definem-se representantes característicos dos mesmos quando se estabelecem as normas de qualidade ambiental.

(4) Apenas os éteres tetra, penta, hexa e heptabromodifenílicos (n.º CAS 40088-47-9, 32534-81-9, 36483-60-0, 68928-80-3, respetivamente).

(5) Nonilfenol (n.º CAS 25154-52-3, n.º UE 246-672-0), incluindo os isómeros 4-nonilfenol (n.º CAS 104-40-5, n.º UE 203-199-4) e 4-nonilfenol ramificado (n.º CAS 84852-15-3, n.º UE 284-325-5).

(6) Octilfenol (n.º CAS 1806-26-4, n.º UE 217-302-5), incluindo o isómero 4-(1,1',3,3'-tetrametilbutil)fenol (n.º CAS 140-66-9, n.º UE 205-426-2).

(7) Inclui o benzo(a)pireno (n.º CAS 50-32-8, n.º UE 200-028-5), o benzo(b)fluoranteno (n.º CAS 205-99-2, n.º UE 205-911-9), o benzo(g,h,i)perileno (n.º CAS 191-24-2, n.º UE 205-883-8), o benzo(k)fluoranteno (n.º CAS 207-08-9, n.º UE 205-916-6), o indeno(1,2,3-cd)pireno (n.º CAS 193-39-5, n.º UE 205-893-2), mas não o antraceno, o fluoranteno e o naftaleno, que são enumerados separadamente.

(8) Inclui o catião tributilestanho (n.º CAS 36643-28-4).

(9) Refere-se aos seguintes compostos:

Sete dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD): 2,3,7,8-T4CDD (n.º CAS 1746-01-6), 1,2,3,7,8-P5CDD (n.º CAS 40321-76-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDD (n.º CAS 39227-28-6), 1,2,3,6,7,8-H6CDD (n.º CAS 57653-85-7), 1,2,3,7,8,9-H6CDD (n.º CAS 19408-74-3), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDD (n.º CAS 35822-46-9), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDD (n.º CAS 3268-87-9).

Dez dibenzofuranos policlorados (PCDF): 2,3,7,8-T4CDF (n.º CAS 51207-31-9), 1,2,3,7,8-P5CDF (n.º CAS 57117-41-6), 2,3,4,7,8-P5CDF (n.º CAS 57117-31-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDF (n.º CAS 70648-26-9), 1,2,3,6,7,8-H6CDF (n.º CAS 57117-44-9), 1,2,3,7,8,9-H6CDF (n.º CAS 72918-21-9), 2,3,4,6,7,8-H6CDF (n.º CAS 60851-34-5), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDF (n.º CAS 67562-39-4), 1,2,3,4,7,8,9-H7CDF (n.º CAS 55673-89-7) e 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDF (n.º CAS 39001-02-0).

Doze bifenilos policlorados semelhantes a dioxinas (PCB-DL): 3,3',4,4'-T4CB (PCB 77, n.º CAS 32598-13-3), 3,3',4',5-T4CB (PCB 81, n.º CAS 70362-50-4), 2,3,3',4,4'-P5CB (PCB 105, n.º CAS 32598-14-4), 2,3,4,4',5-P5CB (PCB 114, n.º CAS 74472-37-0), 2,3',4,4',5-P5CB (PCB 118, n.º CAS 31508-00-6), 2,3',4,4',5'-P5CB (PCB 123, n.º CAS 65510-44-3), 3,3',4,4',5-P5CB (PCB 126, n.º CAS 57465-28-8), 2,3,3',4,4',5-H6CB (PCB 156, n.º CAS 38380-08-4), 2,3,3',4,4',5'-H6CB (PCB 157, n.º CAS 69782-90-7), 2,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 167, n.º CAS 52663-72-6), 3,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 169, n.º CAS 32774-16-6), 2,3,3',4,4',5,5'-H7CB (PCB 189, n.º CAS 39635-31-9).

(10) O n.º CAS 52315-07-8 refere-se a uma mistura de isómeros de cipermetrina, α -cipermetrina (n.º CAS 67375-30-8), β -cipermetrina (n.º CAS 65731-84-2), teta-cipermetrina (n.º CAS 71697-59-1) e zeta-cipermetrina (n.º 52315-07-8).

(11) Refere-se ao 1,3,5,7,9,11-hexabromociclododecano (n.º CAS 25637-99-4), 1,2,5,6,9,10-hexabromociclododecano (n.º CAS 3194-55-6), α -hexabromociclododecano (n.º CAS 134237-50-6), β -hexabromociclododecano (n.º CAS 134237-51-7) e γ -hexabromociclododecano (n.º CAS 134237-52-8).

Anexo III - Ficha de segurança do composto 17 β -Estradiol (E2)

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006

Versão 5.2 Data de revisão 21.06.2014

Data de impressão 23.10.2016

SECÇÃO 1: Identificação da substância/mistura e da sociedade/empresa

1.1 Identificadores do produto

Nome do produto : B-ESTRADIOL

Referência do Produto : E8875

Marca : Sigma

No. REACH : Um número de registo não está disponível para esta substancia, já que a substancia ou os seus usos estão isentos do registo, a tonelagem anual não requer registo ou este registo está previsto para uma data posterior

No. CAS : 50-28-2

1.2 Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas

Utilizações identificadas : Produtos químicos de laboratório, Fabrico de substâncias

1.3 Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurança

Companhia : Sigma-Aldrich Química, S.L.
Sucursal em Portugal
Caixa Postal 131
Av. Almirante Gago Coutinho,
132-134,
P-2711 901 SINTRA

Telefone : +351219242555

Número de Fax : +351219242610

Email endereço : eurtechserv@sial.com

1.4 Número de telefone de emergência

Número de Telefone de Emergência : +(351)-308801773 (CHEMTREC)

SECÇÃO 2: Identificação dos perigos

2.1 Classificação da substância ou mistura

Classificação de acordo com el Regulamento (CE) 1272/2008

Carcinogenicidade (Categoria 2), H351

Toxicidade reprodutiva (Categoria 1A), H360Fd

Efeitos na ou por lactação, H362

Para o pleno texto das DECLARAÇÕES H mencionadas nesta Secção, ver a Secção 16.

Classificação de acordo com as Directivas da EU 67/548/CEE ou 1999/45/CE

T Tóxico R60, R40, R63, R64

Para o texto completo sobre as frases R mencionadas nesta Secção, ver a Secção 16.

2.2 Elementos do rótulo

Rotulagem de acordo com o Regulamento (CE) 1272/2008

Pictograma



Palavra-sinal

Perigo

| | |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Declaração de perigo | |
| H351 | Suspeito de provocar cancro. |
| H360Fd | Pode afectar a fertilidade. Suspeito de afectar o nascituro. |
| H362 | Pode ser nocivo para as crianças alimentadas com leite materno. |
| declaração de precaução | |
| P201 | Pedir instruções específicas antes da utilização. |
| P263 | Evitar o contacto durante a gravidez/ o aleitamento. |
| P281 | Usar o equipamento de protecção individual exigido. |
| P308 + P313 | EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. |
| Declarações de Perigo Adicionais | nenhum(a) |
| Reservado aos utilizadores profissionais. | |

2.3 Outros Perigos - nenhum(a)

SECÇÃO 3: Composição/informação sobre os componentes

3.1 Substâncias

Sinónimos : 3,17β-Dihydroxy-1,3,5(10)-estratriene
1,3,5-Estratriene-3,17β-diol
Dihydrofolliculin
17β-Estradiol

Fórmula : C₁₈H₂₄O₂
Peso molecular : 272,38 g/mol
No. CAS : 50-28-2
No. CE : 200-023-8

Ingredientes perigosos de acordo com o Regulamento (CE) N° 1272/2008

| Componente | Classificação | Concentração |
|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------|
| Estradiol | | |
| No. CAS : 50-28-2 No. CE : 200-023-8 | Carc. 2; Repr. 1A; Lact. ; H351, H360Fd, H362 | <= 100 % |

Ingrediente perigoso de acordo com a Directiva 1999/45/CE

| Componente | Classificação | Concentração |
|-----------------------------------------|--------------------------|--------------|
| Estradiol | | |
| No. CAS : 50-28-2 No. CE : 200-023-8 | T, R60 - R40 - R63 - R64 | <= 100 % |

Para ver o texto completo das frases de riscos e segurança mencionadas nesta secção, ver secção 16

SECÇÃO 4: Primeiros socorros

4.1 Descrição das medidas de primeiros socorros

Recomendação geral

Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.

Se for inalado

Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, dar respiração artificial. Consultar um médico.

No caso dum contacto com a pele

Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.

No caso dum contacto com os olhos

Lavar os olhos com água como precaução.

Se for engolido

Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

4.2 Sintomas e efeitos mais importantes, tanto agudos como retardados

Os sintomas e efeitos mais importantes conhecidos descrevem-se na etiqueta (ver secção 2.2) e / ou na secção 11

4.3 Indicações sobre cuidados médicos urgentes e tratamentos especiais necessários dados não disponíveis

SECÇÃO 5: Medidas de combate a incêndios

5.1 Meios de extinção

Meios adequados de extinção

Utilizar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

5.2 Perigos especiais decorrentes da substância ou mistura

Óxidos de carbono

5.3 Recomendações para o pessoal de combate a incêndios

Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.

5.4 Outras informações

dados não disponíveis

SECÇÃO 6: Medidas a tomar em caso de fugas acidentais

6.1 Precauções individuais, equipamento de protecção e procedimentos de emergência

Usar equipamento de protecção individual. Evitar a formação de poeira. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Assegurar ventilação adequada. Evacuar o pessoal para áreas de segurança. Evitar de respirar o pó.

Para a protecção individual ver a secção 8.

6.2 Precauções a nível ambiental

Prevenir dispersão ou derramamento ulterior se for mais seguro assim. Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.

6.3 Métodos e materiais de confinamento e limpeza

Apanhar os resíduos sem levantar poeiras. Varrer e apanhar com uma pá. Manter em recipientes fechados adequados, para eliminação.

6.4 Remissão para outras secções

Para eliminação de resíduos ver secção 13.

SECÇÃO 7: Manuseamento e armazenagem

7.1 Precauções para um manuseamento seguro

Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização. Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a formação de pó e aerossóis.

Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras.

Ver precauções na secção 2.2

7.2 Condições de armazenagem segura, incluindo eventuais incompatibilidades

Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado.

7.3 Utilizações finais específicas

Aparte dos usos mencionados na secção 1.2 não se estipulam outros usos específicos

SECÇÃO 8: Controlo da exposição/protecção individual

8.1 Parâmetros de controlo

Componentes a controlar com relação ao local de trabalho

Não contem substâncias com valores limites de exposição profissional.

8.2 Controlo da exposição

Controlos técnicos adequados

Manusear de acordo com as boas práticas industriais de higiene e segurança. Lavar as mãos antes de interrupções, e no final do dia de trabalho.

Protecção individual

Protecção ocular/ facial

Óculos de protecção com um lado protector de acordo com EN 166 Use equipamento de protecção ocular testado e aprovado de acordo com as normas governamentais adequadas, tais como NIOSH (US) ou EN 166 (EU).

Protecção da pele

Manusear com luvas. As luvas devem ser inspectadas antes da utilização. Use uma técnica adequada para a remoção das luvas (sem tocar a superfície exterior da luva) para evitar o contacto da pele com o produto. Descarte as luvas contaminadas após o uso, em conformidade com as leis e boas práticas de laboratório . Lavar e secar as mãos.

As luvas de protecção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/689/CEE e a norma EN 374 derivada dela.

Contacto total

Substância: Borracha de nitrilo

espessura mínima da capa: 0,11 mm

Pausa através do tempo: 480 min

Material ensaiado: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Tamanho M)

Contacto com salpicos

Substância: Borracha de nitrilo

espessura mínima da capa: 0,11 mm

Pausa através do tempo: 480 min

Material ensaiado: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Tamanho M)

fonte de dados: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, Telefone +49 (0)6659 87300, e-mail

sales@kcl.de, Método de ensaio: EN374

Se for utilizado em solução, ou misturado com outras substâncias, e sob condições que diferem da EN 374, contactar o fornecedor de luvas da CE. Esta recomendação é apenas desejável e deve ser avaliada por um responsável de segurança e higiene industrial familiarizado com a situação específica de utilização pretendida pelos nossos clientes. Não deve ser interpretado como uma oferta de aprovação para qualquer cenário de uso específico

Protecção do corpo

roupas impermeáveis, O genero de equipamento de protecção deve ser escolhido de acordo com a concentração e a quantidade da substância perigosa no lugar de trabalho.

Protecção respiratória

Nos casos em que a avaliação de risco mostrar que os respiradores purificadores do ar são apropriados, use um respirador de partículas do tipo N100 (E.U.A.) ou cartuchos de respiração do tipo P2 (EN 143) como apoio a controlos de engenharia. Se o respirador for o único meio de protecção, usa um respirador de ar de cobertura facial total. Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).

Controlo da exposição ambiental

Prevenir dispersão ou derramamento ulterior se for mais seguro assim. Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.

SECÇÃO 9: Propriedades físicas e químicas

9.1 Informações sobre propriedades físicas e químicas de base

- | | |
|------------|--------------------------|
| a) Aspecto | Forma: pó Cor: branco |
| b) Odor | dados não disponíveis |

| | |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| c) Limiar olfactivo | dados não disponíveis |
| d) pH | dados não disponíveis |
| e) Ponto de fusão/ponto de congelação | Ponto/intervalo de fusão: 176 - 180 °C - lit. |
| f) Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição | dados não disponíveis |
| g) Ponto de inflamação | dados não disponíveis |
| h) Taxa de evaporação | dados não disponíveis |
| i) Inflamabilidade (sólido, gás) | dados não disponíveis |
| j) limites de inflamabilidade superior / inferior ou explosivas | dados não disponíveis |
| k) Pressão de vapor | dados não disponíveis |
| l) Densidade de vapor | dados não disponíveis |
| m) Densidade relativa | dados não disponíveis |
| n) Hidrossolubilidade | dados não disponíveis |
| o) Coeficiente de partição n-octanol/água | dados não disponíveis |
| p) Temperatura de auto-ignição | dados não disponíveis |
| q) Temperatura de decomposição | dados não disponíveis |
| r) Viscosidade | dados não disponíveis |
| s) Propriedades explosivas | dados não disponíveis |
| t) Propriedades comburentes | dados não disponíveis |

9.2 Outra informação de segurança
dados não disponíveis

SECÇÃO 10: Estabilidade e reactividade

10.1 Reactividade
dados não disponíveis

10.2 Estabilidade química
Estável sob as condições recomendadas de armazenamento.

10.3 Possibilidade de reacções perigosas
dados não disponíveis

10.4 Condições a evitar
dados não disponíveis

10.5 Materiais incompatíveis
Agentes oxidantes fortes

10.6 Produtos de decomposição perigosos
Outros produtos de decomposição perigosos - dados não disponíveis
Em caso de incêndio: veja-se secção 5

SECÇÃO 11: Informação toxicológica

11.1 Informações sobre os efeitos toxicológicos

Toxicidade aguda

dados não disponíveis

Corrosão/irritação cutânea

dados não disponíveis

Lesões oculares graves/irritação ocular

dados não disponíveis

Sensibilização respiratória ou cutânea

dados não disponíveis

Mutagenicidade em células germinativas

ratazana

Outros tipos celulares

Danificação do DNA

ratazana

Transformação morfológica.

Carcinogenicidade

O programa Nacional de Toxicologia (decima reportagem de carcinogéneos) determinou que os estrógenos esteroidais são conhecidos como carcinogéneos humanos baseando-se em evidências suficientes de carcinogenicidade em humanos o qual indica uma relação causa/efeito entre exposição a estrógenos esteroidais e cancro em humanos. Este produto é ou contém um componente que foi relatado como sendo carcinogénico segundo sua classificação pela IARC, OSHA, ACGIH, NTP ou EPA.

Carcinogénos suspeitos para os humanos

IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinogénio provável, possível ou confirmado pelo IARC.

Toxicidade reprodutiva

Tóxico reprodutivo suspeito para os humanos Prejuízos para o feto não podem ser excluídos.

Tóxico reprodutivo conhecido para os humanos Efeitos na ou por lactação Pode afectar a fertilidade. Suspeito de afectar o nascituro.

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única

dados não disponíveis

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição repetida

dados não disponíveis

Perigo de aspiração

dados não disponíveis

Informação adicional

RTECS: KG2975000

Até onde sabemos, as propriedades químicas, físicas e toxicológicas não foram minuciosamente investigadas.

Fígado - Irregularidades - Baseado na prova sobre os humanos

SECÇÃO 12: Informação ecológica

12.1 Toxicidade

Toxicidade em peixes CL50 - *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) - > 0,5 mg/l - 96 h

12.2 Persistência e degradabilidade

dados não disponíveis

Lact. Efeitos na ou por lactação
Repr. Toxicidade reprodutiva

Texto integral das frases R referidas nos pontos 2 e 3

T Tóxico
R40 Possibilidade de efeitos cancerígenos.
R60 Pode comprometer a fertilidade.
R63 Possíveis riscos durante a gravidez com efeitos adversos na descendência.
R64 Pode causar danos às crianças alimentadas com leite materno.

Outras informações

Direitos exclusivos, 2014, da Sigma-Aldrich Co. LLC. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.

Acredita-se que as informações acima estejam correctas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A informação contida neste documento esta baseada no presente estado do nosso conhecimento e é aplicável às precauções de segurança apropriadas para o produto. Não representa nenhuma garantia das propriedades do produto. A Corporação Sigma-Aldrich e as suas companhias afiliadas, não responderão por nenhum dano resultante do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar www.sigma-aldrich.com e/ou o verso da factura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.

Anexo IV - Ficha de segurança do composto 17 α -Ethinilestradiol (EE2)

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006

Versão 5.2 Data de revisão 13.11.2012

Data de impressão 23.10.2018

1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA/MISTURA E DA SOCIEDADE/EMPRESA

1.1 Identificadores do produto

Nome do produto : 17A-ETINILESTRADIOL

Referência do Produto : E4876

Marca : Sigma

No. CAS : 57-63-6

1.2 Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas

Utilizações identificadas : Produtos químicos de laboratório, Fabrico de substâncias

1.3 Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurança

Companhia : Sigma-Aldrich Química, S.L.
Sucursal em Portugal
Caixa Postal 131
Av. Almirante Gago Coutinho,
132-134,
P-2711 901 SINTRA

Telefone : +351219242555

Número de Fax : +351219242610

Email endereço : eurtechserv@sial.com

1.4 Número de telefone de emergência

Número de Telefone de Emergência : +(351)-308801773 (CHEMTREC)

2. IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS

2.1 Classificação da substância ou mistura

Classificação de acordo com el Regulamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]

Toxicidade aguda, Oral (Categoria 4)

Carcinogenicidade (Categoria 1B)

Classificação de acordo com as Directivas da EU 67/548/CEE ou 1999/45/CE

Pode causar cancro. Nocivo por ingestão.

2.2 Elementos da etiqueta

Rotulagem de acordo com o Regulamento (CE) 1272/2008 [UE-GHS/CLP]

Pictograma



Palavra-sinal

Perigo

Declaração de perigo

H302

Nocivo por ingestão.

H350

Pode provocar cancro.

declaração de precaução

P201

Pedir instruções específicas antes da utilização.

P308 + P313

EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

Declarações de Perigo

nenhum(a)

Adicionais

Reservado aos utilizadores profissionais.

De acordo com a directiva Europeia 67/548/CEE, e emendas.
símbolo de perigosidade



Frase(s) - R

R45 Pode causar cancro.
R22 Também nocivo por ingestão.

Frase(s) - S

S53 Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização.
S45 Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).
S36/37/39 Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados.

Reservado aos utilizadores profissionais.

2.3 Outros Perigos - nenhum(a)

3. COMPOSIÇÃO/ INFORMAÇÃO SOBRE OS COMPONENTES

3.1 Substâncias

Sinónimos : 17 α -Ethinyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol
19-Nor-1,3,5(10),17 α -pregnatrien-20-yne-3,17-diol
Ethinylestradiol

Fomula : C₂₀H₂₄O₂

Peso molecular : 296,40 g/mol

| Componente | Concentração |
|-----------------------------------------------|--------------|
| 17α-Ethinylestradiol | |
| No. CAS | 57-63-6 |
| No. CE | 200-342-2 |

4. PRIMEIROS SOCORROS

4.1 Descrição das medidas de primeiros socorros

Recomendação geral

Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.

Se for inalado

Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, dar respiração artificial. Consultar um médico.

No caso dum contacto com a pele

Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.

No caso dum contacto com os olhos

Lavar os olhos com água como precaução.

Se for engolido

Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

4.2 Sintomas e efeitos mais importantes, tanto agudos como retardados

4.3 Indicações sobre cuidados médicos urgentes e tratamentos especiais necessários dados não disponíveis

5. MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIOS

5.1 Meios de extinção

Meios adequados de extinção

Utilizar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

5.2 Perigos especiais decorrentes da substância ou mistura

Óxidos de carbono

5.3 Recomendações para o pessoal de combate a incêndios

Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.

5.4 Outras informações

dados não disponíveis

6. MEDIDAS A TOMAR EM CASO DE FUGAS ACIDENTAIS

6.1 Precauções individuais, equipamento de protecção e procedimentos de emergência

Usar equipamento de protecção individual. Evitar a formação de poeira. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Assegurar ventilação adequada. Evacuar o pessoal para áreas de segurança. Evitar de respirar o pó.

6.2 Precauções a nível ambiental

Prevenir dispersão ou derramamento ulterior se for mais seguro assim. Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos. A descarga no meio ambiente deve ser evitada.

6.3 Métodos e materiais de confinamento e limpeza

Apanhar os resíduos sem levantar poeiras. Varrer e apanhar com uma pá. Manter em recipientes fechados adequados, para eliminação.

6.4 Remissão para outras secções

Para eliminação de resíduos ver secção 13.

7. MANUSEAMENTO E ARMAZENAGEM

7.1 Precauções para um manuseamento seguro

Evitar o contacto com a pele e os olhos. Evitar a formação de pó e aerossóis. Evitar a exposição - obter instruções específicas antes da utilização.
Providenciar uma adequada ventilação em locais onde se formem poeiras. Medidas usuais de protecção preventiva contra incêndio.

7.2 Condições de armazenagem segura, incluindo eventuais incompatibilidades

Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado.
Sensível à luz.

7.3 Utilizações finais específicas

dados não disponíveis

8. CONTROLO DA EXPOSIÇÃO/ PROTECÇÃO INDIVIDUAL

8.1 Parâmetros de controlo

Componentes a controlar com relação ao local de trabalho

Não contem substâncias com valores limites de exposição profissional.

8.2 Controlo da exposição

Controlos técnicos adequados

Manusear de acordo com as boas práticas industriais de higiene e segurança. Lavar as mãos antes de interrupções, e no final do dia de trabalho.

Protecção individual

Protecção ocular/ facial

Óculos de protecção com um lado protector de acordo com EN 166 Use equipamento de protecção ocular testado e aprovado de acordo com as normas governamentais adequadas, tais como NIOSH (US) ou EN 166 (EU).

Protecção da pele

Manusear com luvas. As luvas devem ser inspectadas antes da utilização. Use uma técnica adequada para a remoção das luvas (sem tocar a superfície exterior da luva) para evitar o contacto da pele com o produto. Descarte as luvas contaminadas após o uso, em conformidade com as leis e boas práticas de laboratório. Lavar e secar as mãos.

As luvas de protecção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/689/CEE e a norma EN 374 derivada dela.

Protecção do corpo

Fato completo de protecção para produtos químicos, O genero de equipamento de protecção deve ser escolhido de acordo com a concentração e a quantidade da substância perigosa no lugar de trabalho.

Protecção respiratória

Nos casos em que a avaliação de risco mostrar que os respiradores purificadores do ar são apropriados, use um respirador de partículas do tipo N100 (E.U.A.) ou cartuchos de respiração do tipo P2 (EN 143) como apoio a controlos de engenharia. Se o respirador for o único meio de protecção, usa um respirador de ar de cobertura facial total. Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).

9. PROPRIEDADES FISICAS E QUIMICAS

9.1 Informações sobre propriedades físicas e químicas de base

| | |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| a) Aspecto | Forma: sólido |
| b) Odor | dados não disponíveis |
| c) Limiar olfactivo | dados não disponíveis |
| d) pH | dados não disponíveis |
| e) Ponto de fusão/ponto de congelação | Ponto/intervalo de fusão: 182 - 183 °C - lit. |
| f) Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição | dados não disponíveis |
| g) Ponto de inflamação | não aplicável dados não disponíveis |
| h) Taxa de evaporação | dados não disponíveis |
| i) Inflamabilidade (sólido, gás) | dados não disponíveis |
| j) limites de inflamabilidade superior / inferior ou explosivas | dados não disponíveis |
| k) Pressão de vapor | dados não disponíveis |
| l) Densidade de vapor | dados não disponíveis |
| m) Densidade relativa | dados não disponíveis |
| n) Hidrossolubilidade | dados não disponíveis |
| o) Coeficiente de partição n-octanol/água | dados não disponíveis |
| p) Temperatura de auto-ignição | dados não disponíveis |
| q) Temperatura de decomposição | dados não disponíveis |
| r) Viscosidade | dados não disponíveis |
| s) Propriedades explosivas | dados não disponíveis |

| | | |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| t) | Propriedades comburentes | dados não disponíveis |
| 9.2 | Outra informação de segurança dados não disponíveis | |
| <hr/> | | |
| 10. ESTABILIDADE E REACTIVIDADE | | |
| 10.1 | Reactividade dados não disponíveis | |
| 10.2 | Estabilidade química dados não disponíveis | |
| 10.3 | Possibilidade de reacções perigosas dados não disponíveis | |
| 10.4 | Condições a evitar dados não disponíveis | |
| 10.5 | Materiais incompatíveis Agentes oxidantes fortes | |
| 10.6 | Produtos de decomposição perigosos Outros produtos de decomposição perigosos - dados não disponíveis | |
| <hr/> | | |
| 11. INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA | | |
| 11.1 | Informações sobre os efeitos toxicológicos | |
| | Toxicidade aguda DL50 Oral - ratazana - 960 mg/kg | |
| | Corrosão/irritação cutânea dados não disponíveis | |
| | Lesões oculares graves/irritação ocular dados não disponíveis | |
| | Sensibilização respiratória ou cutânea dados não disponíveis | |
| | Mutagenicidade em células germinativas dados não disponíveis | |
| | Carcinogenicidade | |
| | Há provas suficientes da carcinogenicidade do etinilestradiol em animais experimentais. Na ausência de dados adequados em seres humanos, é razoável, para fins práticos, que se considere o etinilestradiol como se apresentasse um risco carcinogénico para os seres humanos. Os estudos em seres humanos sugerem vivamente que a administração de estrogénios está casualmente relacionada com uma incidência aumentada de carcinoma endometrial; não há provas de que o etinilestradiol seja diferente de outros estrogénios a este respeito. | |
| | Carcinogénio humano possível | |
| | IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinogénio provável, possível ou confirmado pelo IARC. | |
| | Toxicidade reprodutiva As experiências no laboratório mostraram efeitos teratogénicos | |
| | Tendo em base experimentos com animais de laboratório, a exposição excessiva pode provocar desordem(ns) reprodutiva(s). | |
| | Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única dados não disponíveis | |

14.5 Perigos para o ambiente
ADR/RID: sim IMDG Marine pollutant: yes IATA: yes

14.6 Precauções especiais para o utilizador

Outras informações

Marca-EHS requerida (códigos ADR 2.2.9.1.10 e IMDG 2.10.3) para embalagens únicas e embalagens combinadas que contenham embalagens interiores com Mercadorias Perigosas > 5L para líquidos ou > 5Kg para sólidos.

15. INFORMAÇÃO SOBRE REGULAMENTAÇÃO

Esta folha de dados de segurança obedece aos requerimentos da Regulamento (CE) No. 1907/2006

15.1 Regulamentação/legislação específica para a substância ou mistura em matéria de saúde, segurança e ambiente
dados não disponíveis

15.2 Avaliação da segurança química
dados não disponíveis

16. OUTRAS INFORMAÇÕES

Outras informações

Direitos exclusivos, 2012, da Sigma-Aldrich Co. LLC. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.

Acredita-se que as informações acima estejam correctas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A informação contida neste documento esta baseada no presente estado do nosso conhecimento e é aplicável às precauções de segurança apropriadas para o produto. Não representa nenhuma garantia das propriedades do produto. A Corporação Sigma-Aldrich e as suas companhias afiliadas, não responderão por nenhum dano resultante do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar www.sigma-aldrich.com e/ou o verso da factura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.

Anexo V - CQO associada aos compostos

Tabela V.1 - CQO associada ao composto para a fase A.

| CQO associado ao composto Fase A | | | | | |
|------------------------------------------------|--------------|------------------|--------------|---------------------------|----------------|
| Solução stock fármaco | Volume (ml) | Densidade (Kg/L) | Produto (gr) | Conversão CQO (gr CQO/gr) | CQO (gr) |
| Balão | 10 | | | | |
| Metanol | 10 | 0,8 | 8 | 1,5 | 12 |
| Fármaco | | | 0,014 | 2,71 | 0,0379 |
| | | | | TOTAL | 12,0379 |
| <hr/> | | | | | |
| Fármaco E2 (g.L ⁻¹) | 1,4 | | | | |
| Concentração do balão (mg.L ⁻¹ CQO) | 1203794 | | | | |
| Fármaco balão adicionado/dia | 0,00121 | | | | |
| CQO balão (mgO ₂ .L ⁻¹) | 1456,6 | | | | |
| Q diário (L/dia) | 17 | | | | |
| CQO (mgO₂.L⁻¹) | 85,68 | | | | |

Tabela V.2 - CQO associada ao composto para a fase B.

| CQO associado ao composto Fase B | | | | | |
|------------------------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|---------------------------|----------------|
| Solução stock fármaco | Volume (ml) | Densidade (Kg.L ⁻¹) | Produto (gr) | Conversão CQO (gr CQO/gr) | CQO (gr) |
| Balão | 10 | | | | |
| Metanol | 10 | 0,8 | 8 | 1,5 | 12 |
| Fármaco E2 | | | 0,014 | 2,71 | 0,0379 |
| Fármaco EE2 | | | 0,014 | 2,71 | 0,0379 |
| Fármaco E2 (g.L ⁻¹) | 1,4 | | | TOTAL | 12,0759 |
| Fármaco E22 (g.L ⁻¹) | 1,4 | | | | |
| <hr/> | | | | | |
| Concentração do balão (mg.L ⁻¹ CQO) | 1207588 | | | | |
| Fármaco balão adicionado/dia | 0,00121 | | | | |
| CQO balão (mgO ₂ .L ⁻¹) | 1461,2 | | | | |
| Q diário (L/dia) | 17 | | | | |
| CQO (mgO₂.L⁻¹) | 85,95 | | | | |

Anexo VI - Determinação da Carência Química de Oxigênio (CQO)

A determinação da CQO, da fase solúvel das amostras, foi efetuada pelo método de refluxo aberto conforme o procedimento descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

A fração solúvel das amostras foi obtida a partir de um sistema de filtração a vácuo, utilizando filtros Macherey-Nagel de porosidade 0,4 µm e de diâmetro 45 mm. A determinação da CQO está descrita abaixo:

- Adicionar 10 mL da amostra para um balão de refluxo;
- Juntar ao balão 5 mL de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e 15 mL da mistura de ácido sulfúrico-sulfato de prata ($H_2SO_4-Ag_2SO_4$);
- Levar a mistura à ebulição durante 2 horas a aproximadamente 150 °C. A ebulição ocorreu num aparelho de marca G. Vittadini Recod/6, visível na Figura VI.1.
- Após a ebulição, titular o excesso de dicromato com a solução de sulfato de ferro (II) e amônio $[(NH_4)_2Fe(SO_4)_2]$, na presença de uma ou duas gotas da solução indicadora de ferroína, Figura VI.2.
- Determinar o ponto de viragem, por observação, através da mudança brusca de cor de cinzento-azulado para castanho-avermelhado;
- Em paralelo foi realizado um ensaio em branco, seguindo o mesmo modo operatório, substituindo a amostra por água destilada.

A CQO, expressa em mgO_2L^{-1} , é determinada pela seguinte fórmula:

$$CQO (mgO_2L^{-1}) = \left(\frac{8000 \times C \times (V_1 - V_2)}{V_0} \right)$$

Onde:

C – Concentração (mol/L) da solução de sulfato de ferro (II) e amônio calculada;

V_0 – Volume (mL) da toma de amostra para o ensaio, antes da diluição;

V_1 – Volume (mL) da solução de sulfato de ferro (II) e amônio consumido no ensaio em branco;

V_2 – Volume (mL) da solução de sulfato de ferro (II) e amônio consumido no ensaio com a amostra;

8000 – Massa molar ($mg.L^{-1}$) de $\frac{1}{2}$ de O_2 .

A concentração da solução de sulfato de ferro (II) e amônio é determinada pela seguinte fórmula:

$$C (mol/L) = \frac{10 \times 0,04 \times 6}{V} = \frac{2,4}{V}$$

Onde:

V – Volume (mL) da solução de sulfato de ferro (II) e amônio, consumido na titulação.



Figura VI.1 - Aparelho de refluxo para a ebulição. Determinação CQO.



Figura VI.2 - Montagem para titulação.

Anexo VII - Determinação dos Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

A determinação dos SST e SSV foi efetuada conforme o procedimento descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). A sua determinação está descrita abaixo:

- Preparar e pesar uma cápsula de porcelana;
- Filtrar 50 mL da amostra com uma membrana de microfibras de vidro da marca Filter-Lab, tipo MFV3, com porosidade de 1,2 µm e 47 mm de diâmetro;
- Colocar a cápsula com a membrana em estufa (Figura VII.1) a 103°C-105°C, durante uma ou duas horas. Voltar a pesar a cápsula com a membrana no final deste ponto.
- Colocar a cápsula com a membrana filtrante e os SST secos na mufla (Figura VII.2) a 550 °C, durante uma hora. Voltar a pesar a cápsula com a membrana no final deste ponto.

Os SST e os SSV, expressos em mgL⁻¹, são determinados pelas seguintes fórmulas:

$$\text{SST (mgL}^{-1}\text{)} = \frac{(B' - A')}{V} \times 10^6$$

Onde:

V - Volume (mL) da amostra;

A' - Peso da cápsula de porcelana (g) com a membrana de microfibras de vidro;

B' - Peso da cápsula de porcelana (g) com a membrana de microfibras de vidro após sair da estufa.

$$\text{SSV (mgL}^{-1}\text{)} = \frac{(B' - C')}{V} \times 10^6$$

Onde:

V - Volume (mL) da amostra;

B' - Peso da cápsula de porcelana (g) com a membrana de microfibras de vidro após sair da estufa.

C' - Peso da cápsula de porcelana (g) com a membrana de microfibras de vidro após sair da mufla.

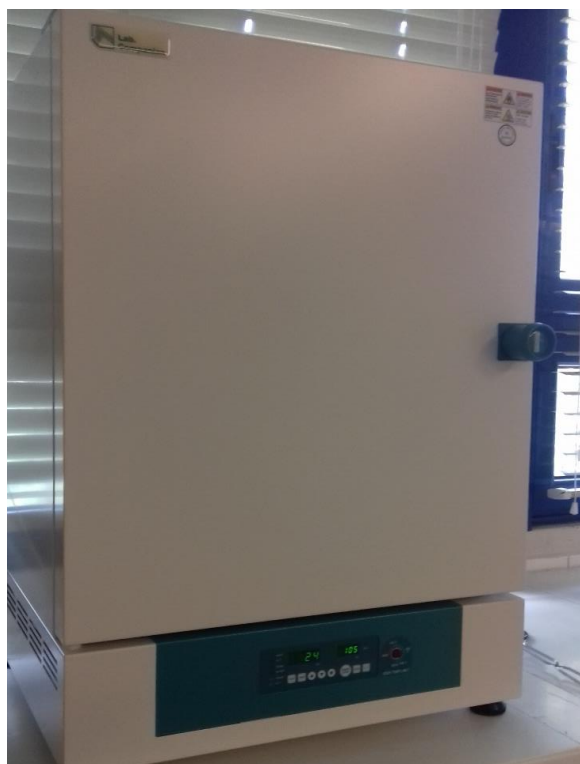


Figura VII.1- Estufa.



Figura VII.2 - Mufla.

Anexo VIII - Cromatogramas para a obtenção das curvas de calibração

Para determinar a curva de calibração prepararam-se padrões mistos em triplicado com concentrações de 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Obtiveram-se três cromatogramas para cada concentração, no entanto, durante a análise aos cromatogramas observou-se que um dos ensaios, para cada concentração, apresentava valores muito distantes dos outros dois, o que levou à sua exclusão. A Figura VIII.1 apresenta um exemplo de cromatograma analisado e a Tabela VIII.1 apresenta o resumo das áreas obtidas, os valores a vermelho não foram incluídos na curva de calibração por se distanciarem muito dos restantes valores.

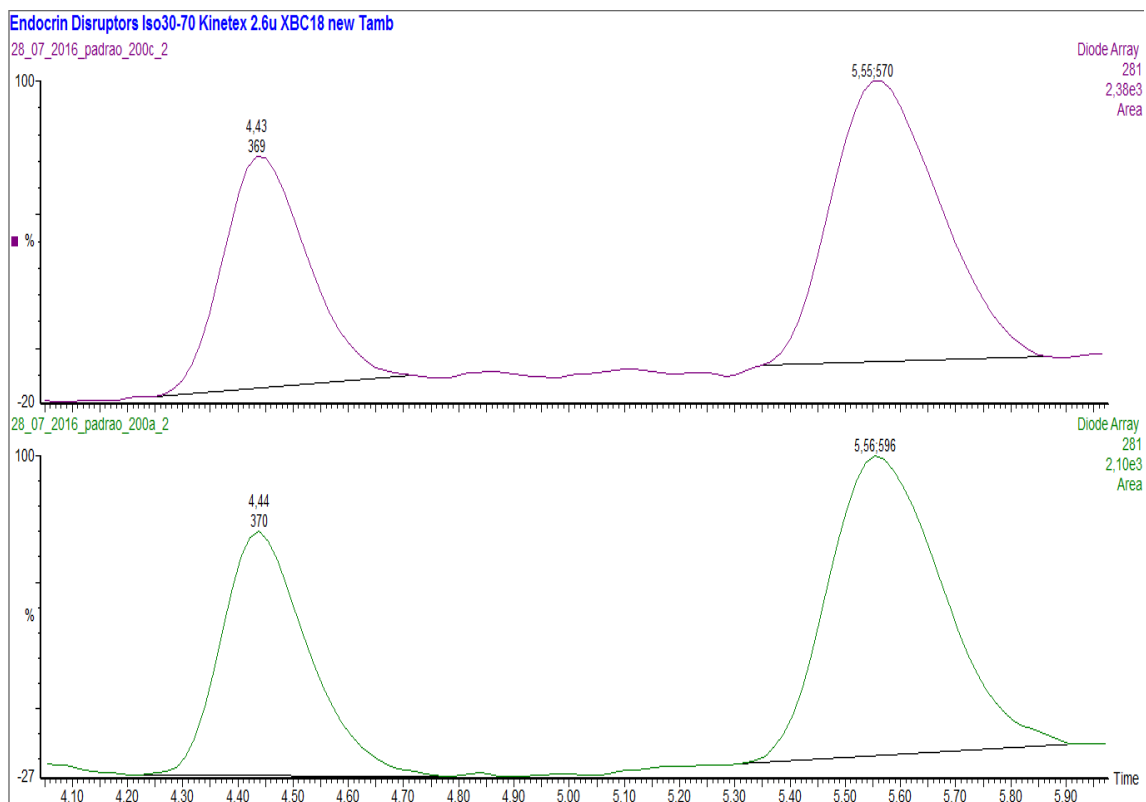


Figura VIII.1 - Cromatogramas da curva de calibração para o padrão de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

Tabela VIII.1 - Resumo das áreas obtidas para a curva de calibração.

| Padrão | 17 β | | 17 α | |
|--------|------------|-------|-------------|-------|
| | Área | Média | Área | Média |
| 25 | 28 | 35,0 | 51 | 45,0 |
| | 42 | | 39 | |
| | 4 | | 18 | |
| 50 | - | 62,5 | - | 82,5 |
| | 70 | | 94 | |
| | 55 | | 71 | |
| 100 | 175 | 167,0 | 199 | 221,5 |
| | 94 | | 130 | |
| | 159 | | 244 | |
| 200 | 370 | 370,5 | 598 | 584,0 |
| | 193 | | 281 | |
| | 371 | | 570 | |

Anexo IX - Limite de detecção e quantificação para o E2 e o EE2

O limite de detecção e quantificação de E2 e EE2 foi determinado com base nas amostras realizadas em branco e em triplicado, os seus cromatogramas podem ser consultados no Anexo XVIII. A Tabela IX.1 apresenta o resumo das áreas obtidas pelos cromatogramas e a concentração respetiva de cada composto, o valor a vermelho não foi incluído por se distanciar muito dos restantes valores.

Tabela IX.1 - Resumo das áreas obtidas para o LOD e LOQ.

| Área | 17 β ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Área | 17 α ($\mu\text{g.L}^{-1}$) |
|--------------|-------------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| 2,83 | 14,31 | 2,52 | 20,67 |
| 10,13 | 18,03 | 3,78 | 21,07 |
| 56,71 | 41,76 | 4,68 | 21,35 |
| Média | 16,17 | Média | 21,07 |
| D.P. | 2,63 | D.P. | 0,34 |

Anexo X - Cromatogramas dos ensaios

Este anexo apresenta um exemplo de um cromatograma analisados durante os ensaios. A Figura X.1 e Figura X.2 apresentam os cromatogramas do ensaio 5 para o E2 e EE2 respectivamente.

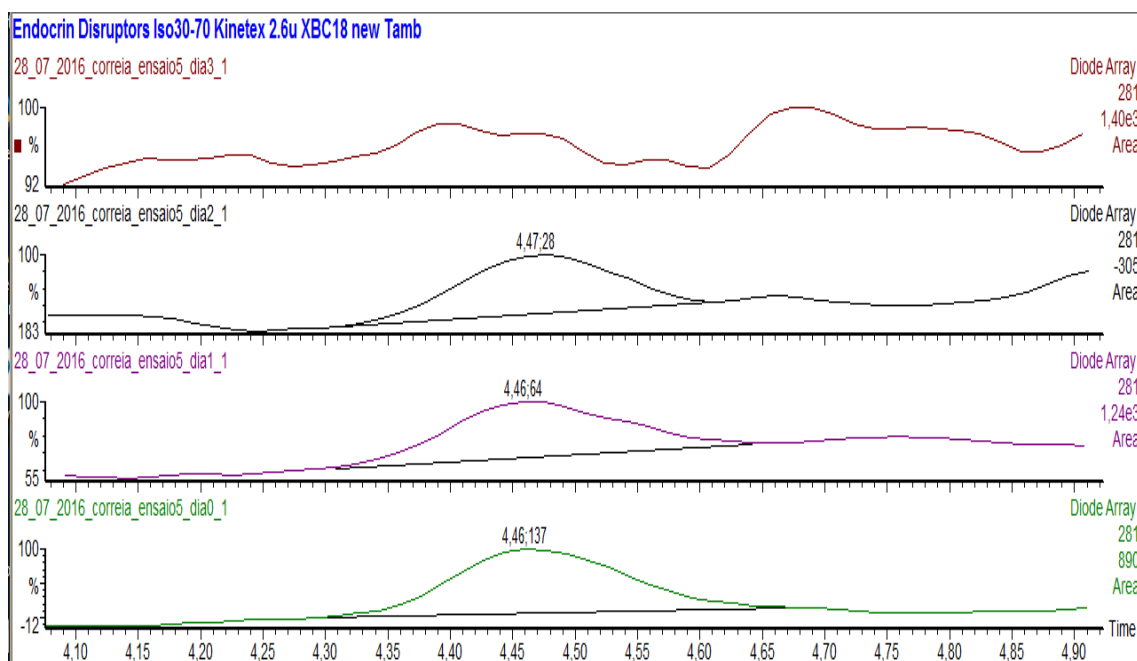


Figura X.1 - Cromatogramas para o E2 do ensaio 5 ($\lambda = 281$ nm).

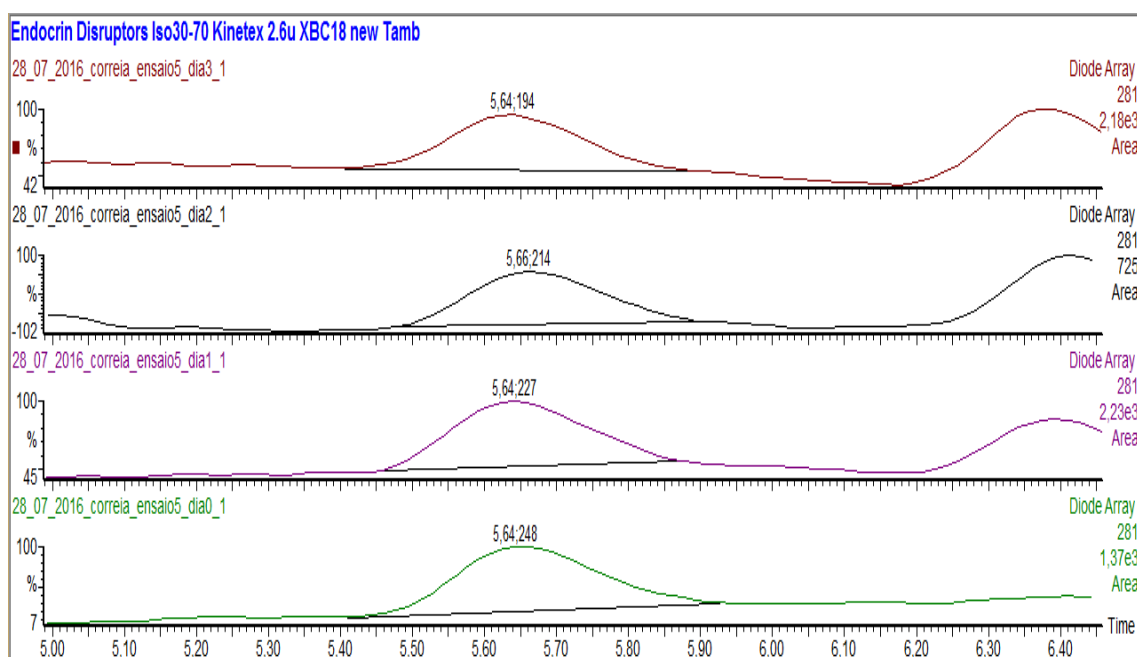


Figura X.2 - Cromatogramas para o EE2 do ensaio 5 ($\lambda = 281$ nm).

Anexo XI - Resultados de SST e SSV

Os resultados dos sólidos suspensos totais durante a fase A dos ensaios estão representados na Tabela XI.1 e na Figura XI.1. Os resultados da fase B encontram-se na Tabela XI.2 e na Figura XI.2.

Tabela XI.1- Resultados dos SST e SSV para a fase A.

| Dias | Fase A | | | | | |
|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Ensaio 1 | | Ensaio 2 | | Ensaio 3 | |
| | SST (mgL ⁻¹) | SSV (mgL ⁻¹) | SST (mgL ⁻¹) | SSV (mgL ⁻¹) | SST (mgL ⁻¹) | SSV (mgL ⁻¹) |
| 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 0 | 0 |
| 1 | 22 | 22 | 10 | 10 | 36 | 28 |
| 2 | 30 | 24 | 26 | 46 | 2 | 2 |
| 3 | 92 | 84 | 36 | 36 | 30 | 24 |
| 4 | 38 | 38 | | | 16 | 12 |

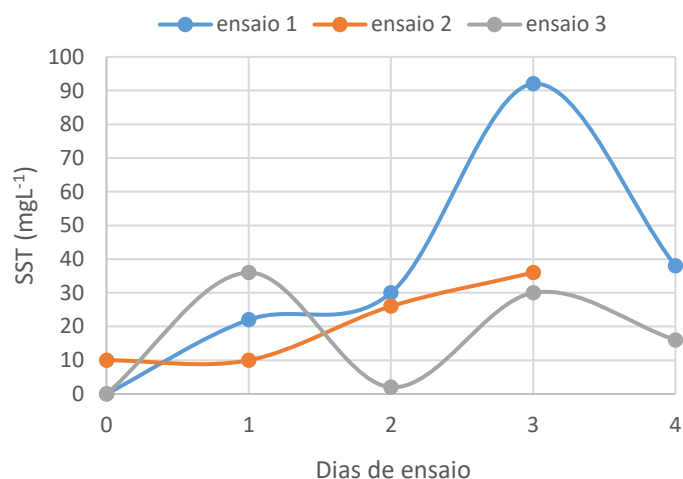


Figura XI.1 - Apresentação gráfica dos SST para a fase A.

Tabela XI.2 - Resultados dos SST e SSV para a fase B.

| Dias | Fase B | | | | | |
|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Ensaio 4 | | Ensaio 5 | | Ensaio 6 | |
| | SST (mgL ⁻¹) | SSV (mgL ⁻¹) | SST (mgL ⁻¹) | SSV (mgL ⁻¹) | SST (mgL ⁻¹) | SSV (mgL ⁻¹) |
| 0 | 12 | 12 | 8 | 8 | 6 | 6 |
| 1 | 4 | 4 | 10 | 4 | 10 | 6 |
| 2 | 8 | 8 | 6 | 6 | 8 | 6 |
| 3 | 8 | 8 | 36 | 36 | 8 | 6 |

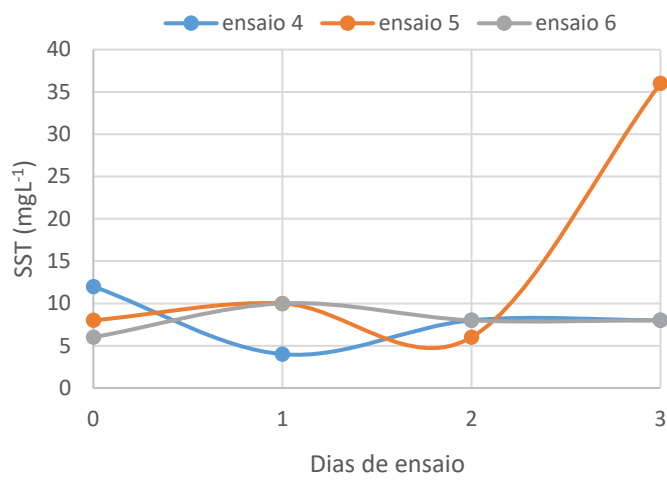


Figura XI.2 - Apresentação gráfica dos SST para a fase B.

Anexo XII. Ordem das reações para o E2 e EE2

Na determinação da ordem das reações e das suas constantes cinéticas utilizaram-se os valores base da Tabela XII.1 até à Tabela XII.4.

Tabela XII.1 - Ensaio 3: Valores base para determinar as constantes cinéticas do E2.

| Ensaio 3 | | |
|----------|------------------------------------|----------------------|
| | Ordem 0 | Ordem 1 |
| Tempo | 17β ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | $\text{Ln}(17\beta)$ |
| 0 | 149 | 5,01 |
| 1 | 31 | 3,42 |
| 2 | 17 | 2,86 |
| 3 | 24 | 3,16 |
| 4 | 0 | |

Tabela XII.2- Ensaio 4: Valores base para determinar as constantes cinéticas do E2 e EE2.

| Ensaio 4 | | | | |
|----------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| | Ordem 0 | | Ordem 1 | |
| Tempo | 17β ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | 17α ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | $\text{Ln}(17\beta)$ | $\text{Ln}(17\alpha)$ |
| 0 | 99 | 106 | 4,60 | 4,66 |
| 1 | 49 | 92 | 3,88 | 4,52 |
| 2 | 19 | 91 | 2,93 | 4,51 |
| 3 | 24 | 89 | 3,16 | 4,49 |

Tabela XII.3 - Ensaio 5: Valores base para determinar as constantes cinéticas do E2 e EE2.

| Ensaio 5 | | | | |
|----------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| | Ordem 0 | | Ordem 1 | |
| Tempo | 17β ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | 17α ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | $\text{Ln}(17\beta)$ | $\text{Ln}(17\alpha)$ |
| 0 | 83 | 99 | 4,41 | 4,59 |
| 1 | 45 | 92 | 3,82 | 4,52 |
| 2 | 27 | 88 | 3,30 | 4,47 |
| 3 | 0 | 81 | | 4,40 |

Tabela XII.4 - Ensaio 6: Valores base para determinar as constantes cinéticas do E2 e EE2.

| Ensaio 6 | | | | |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | Ordem 0 | | Ordem 1 | |
| Tempo | 17β ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | 17$\alpha$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | Ln(17$\beta$) | Ln(17$\alpha$) |
| 0 | 97 | 103 | 4,57 | 4,63 |
| 1 | 0 | | | |
| 2 | 19 | 91 | 2,94 | 4,52 |
| 3 | 0 | 87 | | 4,47 |

Anexo XIII - Ordem das reações para a CQO

Na determinação da ordem das reações e das suas constantes cinéticas utilizaram-se os valores base da Tabela XIII.1 até à Tabela XIII.4.

Tabela XIII.1 - Ensaio 3: Valores base para determinar as constantes cinéticas da CQO.

| Ensaio 3 | | |
|----------|-----------------------------------------|---------|
| | Ordem 0 | Ordem 1 |
| Tempo | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | Ln(CQO) |
| 0 | 231 | 5,44 |
| 1 | 74 | 4,30 |
| 2 | 60 | 4,09 |
| 3 | 14 | 2,61 |
| 4 | 9 | 2,21 |

Tabela XIII.2 - Ensaio 4: Valores base para determinar as constantes cinéticas da CQO.

| Ensaio 4 | | |
|----------|-----------------------------------------|---------|
| | Ordem 0 | Ordem 1 |
| Tempo | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | Ln(CQO) |
| 0 | 193 | 5,26 |
| 1 | 100 | 4,60 |
| 2 | 23 | 3,12 |
| 3 | 18 | 2,89 |

Tabela XIII.3 - Ensaio 5: Valores base para determinar as constantes cinéticas da CQO.

| Ensaio 5 | | |
|----------|-----------------------------------------|---------|
| | Ordem 0 | Ordem 1 |
| Tempo | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | Ln(CQO) |
| 0 | 90 | 4,50 |
| 1 | 47 | 3,85 |
| 2 | 9 | 2,22 |
| 3 | 0 | |

Tabela XIII.4 - Ensaio 6: Valores base para determinar as constantes cinéticas da CQO.

| Ensaio 6 | | |
|----------|-----------------------------------------|---------|
| | Ordem 0 | Ordem 1 |
| Tempo | CQO (mgO ₂ L ⁻¹) | Ln(CQO) |
| 0 | 92 | 4,53 |
| 1 | 32 | 3,46 |
| 2 | 9 | 2,21 |
| 3 | 5 | 1,52 |

Anexo XIV - Teste direto com Acrodisc

De forma a perceber se a utilização dos Acrodisc interferiam com as leituras no HPLC realizaram-se testes com e sem a sua utilização. A Tabela XIV.1 apresenta o resumo das áreas obtidas.

Tabela XIV.5 - Resumo das áreas obtidas pelo teste direto com Acrodisc.

| Filtro | Área | |
|--------------|------------|-------------|
| | 17 β | 17 α |
| Com Acrodisc | 3,06 | 10,56 |
| Sem Acrodisc | 11,42 | 7,53 |

Anexo XV - Teste direto em diferentes tipos de águas com Acrodisc e filtração

Este teste teve como objetivo perceber se diferentes tipos de águas (com ou sem filtração) influenciam na leitura dos resultados. A Figura XV.1 apresenta um exemplo de cromatograma analisado, em cima sem filtro e em baixo com filtro, e a Tabela XV.1 o resumo das áreas obtidas para todas as águas analisadas.

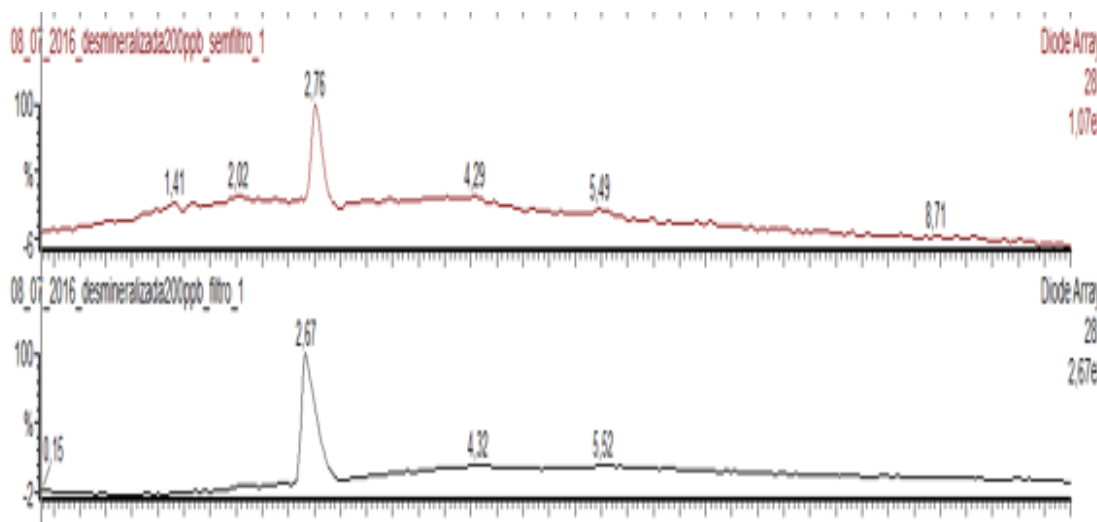


Figura XV.1 - Cromatogramas da água desmineralizada ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

Tabela XV.1 - Resumo das áreas obtidas pelo teste direto com diferentes tipos de água.

| Tipo de água | Filtro | Acrodisc | Área | |
|----------------------|--------|----------|------------|-------------|
| | | | 17 β | 17 α |
| Água desmineralizada | Sim | Sim | 6,32 | 2,63 |
| Água desmineralizada | Sim | Não | 1 | 2,03 |
| Água Sintética | Sim | Sim | 4,23 | 9 |
| Água Sintética | Sim | Não | 2,13 | - |
| Água residual | Sim | Sim | 0,59 | 4,58 |
| Água residual | Sim | Não | - | - |

Anexo XVI - Cromatogramas dos ensaios de fotodegradação

Para determinar a possível degradação dos fármacos, expostos a fatores físicos como a temperatura e a exposição à luz, foram realizados ensaios durante cinco dias. A Figura XVI.1 apresenta os cromatogramas para o dia 0 e a Figura XVI.2 apresenta os cromatogramas para o dia 5, em cima sem luz e em baixo expostos à luz. A Tabela XVI.1 apresenta o resumo dos valores obtidos durante o ensaio.

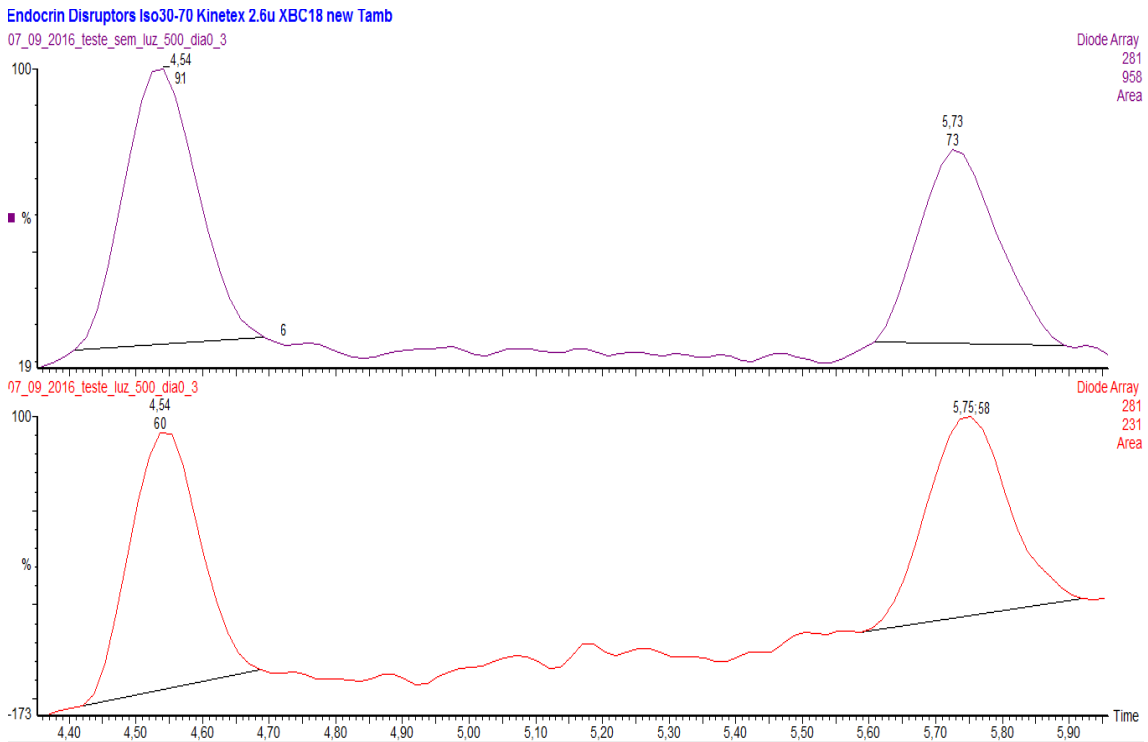


Figura XVI.1 - Ensaio de fotodegradação: cromatogramas do dia 0 para o E2 e EE2 ($\lambda = 281$ nm).

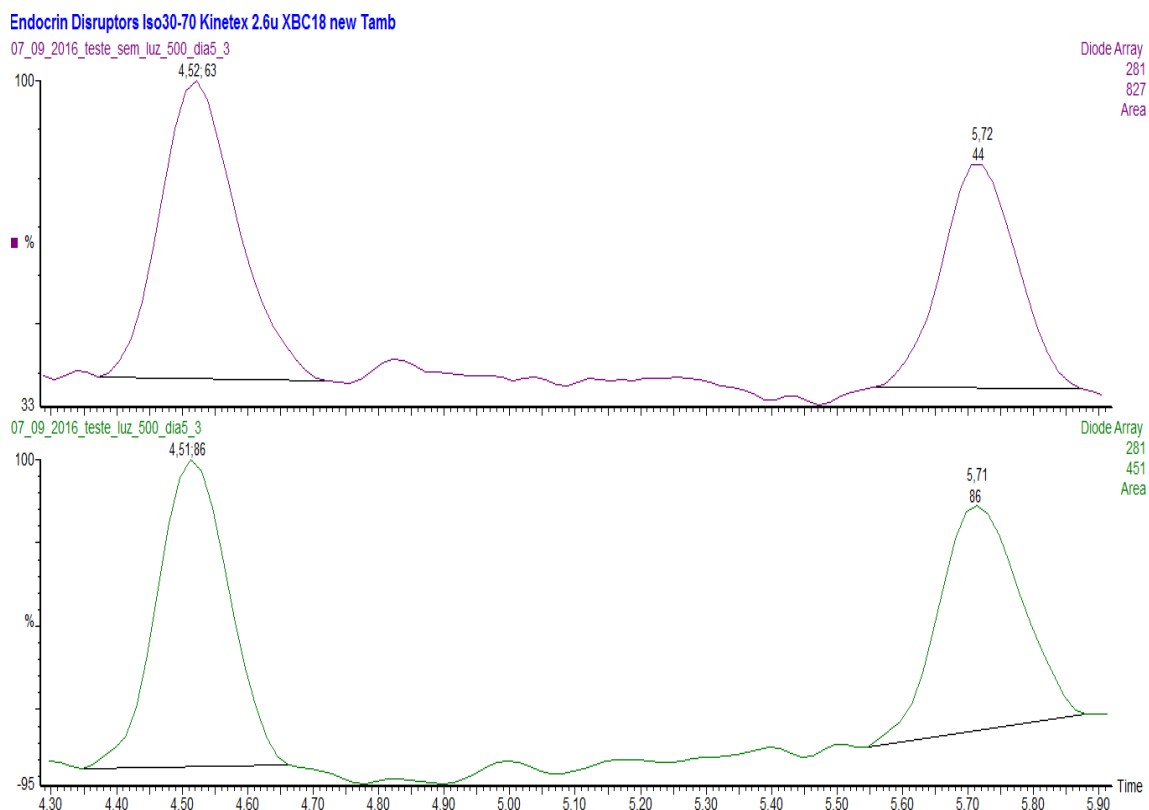


Figura XVI.2 - Ensaio de fotodegradação: cromatogramas do dia 5 para o E2 e EE2 ($\lambda = 281$ nm).

Tabela XVI.1 - Resumos dos valores obtidos durante o ensaio de fotodegradação.

| Dia | Com luz | | Sem luz | |
|-----|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| | 17 β ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | 17 α ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | 17 β ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | 17 α ($\mu\text{g.L}^{-1}$) |
| 0 | 231 | 246 | 339 | 302 |
| 1 | 255 | 291 | 461 | 336 |
| 2 | 318 | 344 | 272 | 216 |
| 3 | | | 377 | 329 |
| 4 | 108 | 145 | 248 | 227 |
| 5 | 321 | 351 | 241 | 193 |

Anexo XVII - Curva de calibração direta

Para determinar a equação prepararam-se padrões mistos em duplicado com concentrações de 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A Figura XVII.1 e a Figura XVII.2 apresentam um exemplo de cromatograma analisado e a Tabela XVII.1 apresenta o resumo das áreas obtidas.

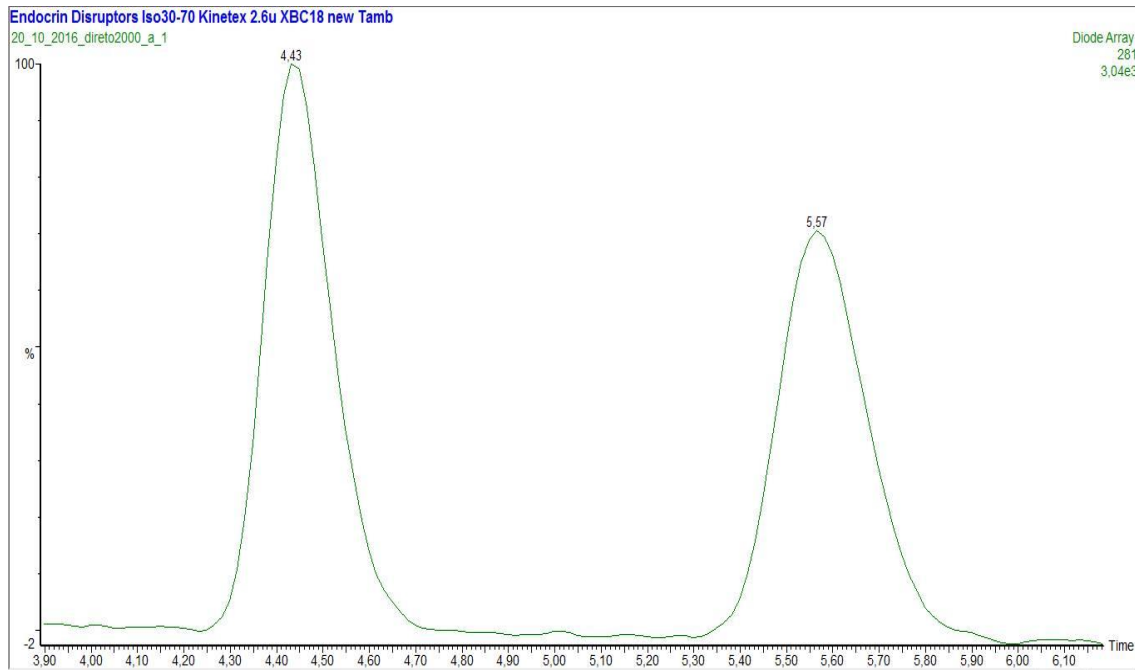


Figura XVII.1 - Cromatograma da curva de calibração direta para o padrão de 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

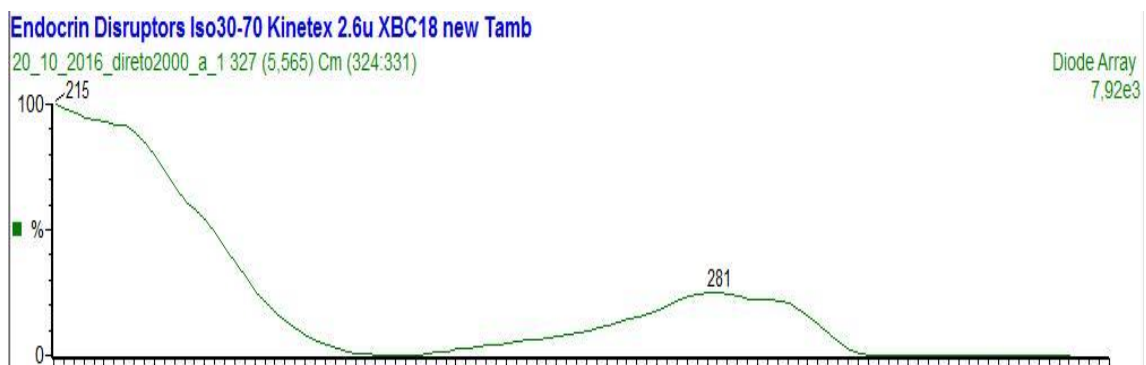


Figura XVII.2 - Espectro de absorção do padrão direto de 2000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($\lambda = 281 \text{ nm}$).

Tabela XVII.1 - Resumo das áreas obtidas para a curva de calibração direta.

| Padrão | 17β | | 17α | |
|--------|--------|-------|--------|-------|
| | Área | Média | Área | Média |
| 200 | 51,35 | 51,9 | 55,33 | 48,1 |
| | 52,36 | | 40,88 | |
| 500 | 122,03 | 134,5 | 118,63 | 117,5 |
| | 146,94 | | 116,37 | |
| 1000 | 267,28 | 283,5 | 251,13 | 266,7 |
| | 299,78 | | 282,19 | |
| 2000 | 522,33 | 566,4 | 481,59 | 522,7 |
| | 610,37 | | 563,83 | |

Anexo XVIII - Ensaio em branco

Os ensaios em branco tinham como objetivo analisar o padrão dos cromatogramas na ausência dos fármacos. A Figura XVIII.1 apresenta os cromatogramas para a água desmineralizada e a Figura XVIII.2 para a solução de alimentação, em cima pela vista geral e em baixo aproximado para o tempo de retenção dos compostos.

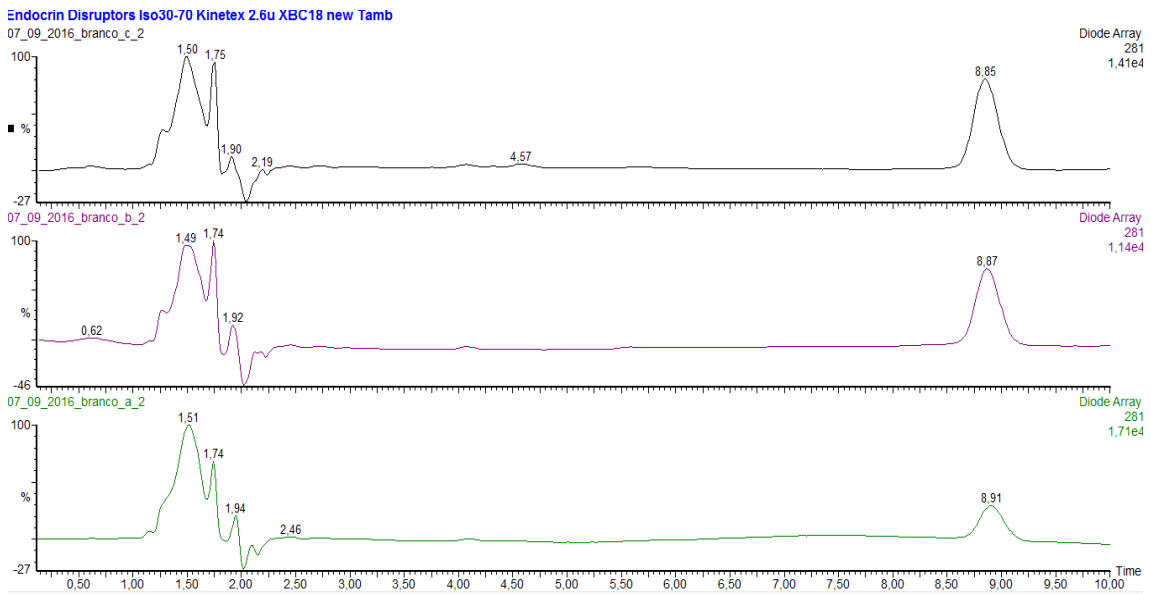


Figura XVIII.1 - Cromatogramas dos ensaios em branco ($\lambda = 281$ nm).

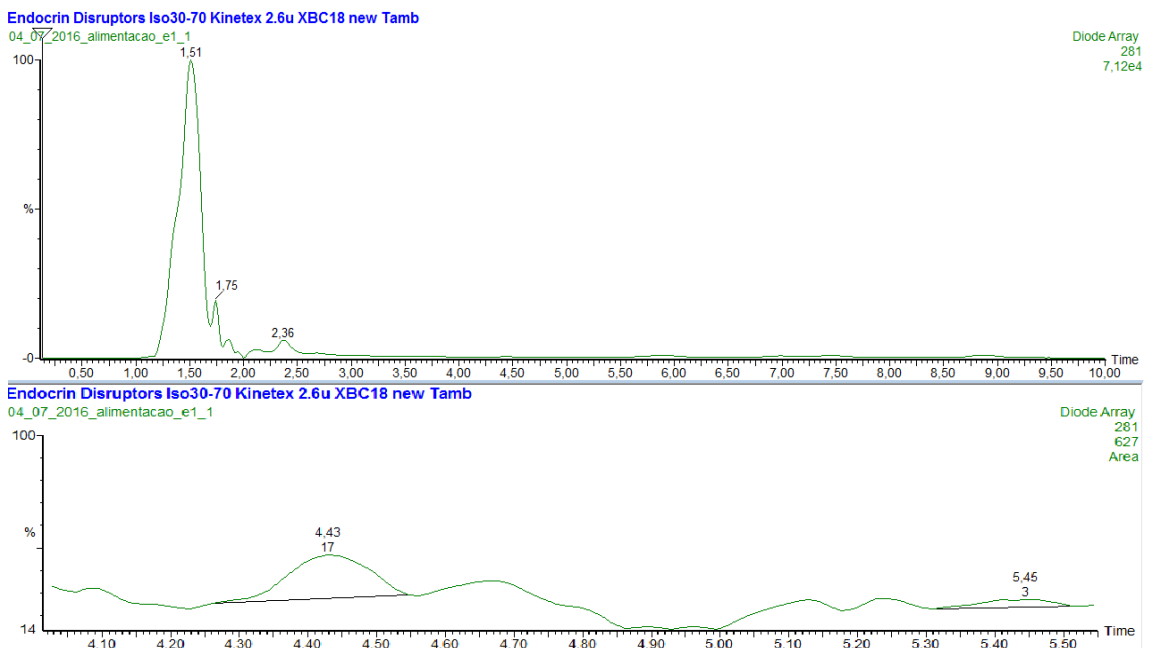


Figura XVIII.2 - Cromatogramas da solução de alimentação ($\lambda = 281$ nm).

