

# Avaliação Ecotoxicológica de Solos Contaminados por Ibuprofeno

Diana Sofia Gouveia Mendes Rede

Novembro de 2011

Orientação: Doutora Susana Sousa  
Co-Orientação: Mestre Cristina Antão





## **Agradecimentos**

A realização desta Tese de Mestrado teve o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projecto nº PEst-C/EQB/LA0006/2011 e Projecto nº PTDC/ECM/103141/2008.

A elaboração da mesma não teria sido possível sem a contribuição de várias pessoas a quem devo agradecer.

Em primeiro lugar gostava de agradecer à Doutora Susana Sousa e à Mestre Cristina Antão, minha orientadora e co-orientadora, pelas importantes sugestões que foram fazendo no decurso deste trabalho e pela disponibilidade e dedicação que sempre demonstraram.

Agradeço à Doutora Cristina Matos, enquanto responsável pelo GRAQ/REQUIMTE, pela disponibilização dos meios necessários para executar toda a parte experimental.

Aos elementos do GRAQ/REQUIMTE em especial à Engenheira Paula Paíga pelo apoio prestado e à Idalina Bragança, não só pelo apoio, mas também pelo companheirismo e espírito de entreajuda.

A todos os meus amigos que ao longo destes anos fizeram parte do meu dia a dia no ISEP e se revelaram sempre muito disponíveis.

Finalmente, um agradecimento muito especial, e não menos importante, ao Sid e à minha família por todo o apoio e total compreensão. Sem o seu apoio não teria conseguido chegar até aqui.

A todos, bem hajam.



## Resumo

Os produtos farmacêuticos são substâncias químicas muito utilizados em medicina, veterinária e ainda na agricultura. Nos anos 90, foi descoberta a presença de fármacos em meio aquático, verificando-se que a sua remoção nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) não era completa. Durante as duas últimas décadas foi identificada a presença de mais de oitenta compostos no meio ambiente e actualmente são considerados poluentes emergentes. Podem contaminar solos e águas, depois de serem usados e excretados (inalterados ou metabolizados) por humanos e animais, ou quando são indevidamente lançados directamente no meio ambiente. Os estudos ecotoxicológicos efectuados com estes poluentes têm sido direccionados, sobretudo, para as águas, existindo uma ausência de trabalhos sobre solos.

O Ibuprofeno (IB) é um anti-inflamatório não esteróide, utilizado também como analgésico e antipirético, sendo um dos produtos farmacêuticos mais vendidos em todo o mundo, o que justifica a sua forte presença no meio ambiente. Por isso, e dada a ausência de trabalhos ecotoxicológicos de solos contaminados por fármacos, o IB foi o produto farmacêutico seleccionado para a realização deste trabalho.

A ecotoxicidade pode ser avaliada através de bioensaios. Estes têm a capacidade de avaliar a toxicidade de uma determinada substância de forma global, usando organismos vivos que funcionam como bio-indicadores.

O presente trabalho tem como objectivos avaliar o impacte causado nos solos pelo IB, testar a toxicidade de dois processos de descontaminação para remover o referido fármaco dos solos assim como avaliar a toxicidade provocada por águas residuais, de três unidades hospitalares e de uma indústria farmacêutica. Esta avaliação foi efectuada através de ensaios de toxicidade aguda de germinação e de alongamento de raiz de sementes de alface, variedade bola de manteiga (*Lactuca sativa*), em solo arenoso.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda em solos contaminados por IB foram realizados para uma gama de concentrações entre 0,1 e 1000 µg/L. Verificou-se uma redução do número de sementes germinadas e do comprimento médio da planta no solo contaminado com 0,5 e 20 µg/L de IB. No solo contaminado com 1000 µg/L de IB observou-se uma redução da germinação, acompanhada por uma indução de crescimento da raiz da espécie *Lactuca sativa*.

Os dois tratamentos de descontaminação de solos, reagente de Fenton e Nanopartículas de ferro zero valente, revelaram toxicidade, tendo-se obtido uma percentagem de germinação

entre  $32,2 \pm 3,5$  e  $48,5 \pm 6,2$  e inibição do crescimento da raiz do organismo teste em cerca de 85,0 %.

Em relação às águas residuais hospitalares verificou-se uma redução da percentagem de germinação entre  $31,1 \pm 5,0$  e  $72,3 \pm 12,4$  e uma inibição do crescimento da raiz situada entre  $13,0 \pm 6,4$  e  $20,2 \pm 10,0$  %. Para a água residual industrial ocorreu uma inibição da percentagem de germinação de  $60,5 \pm 13,1$ , contudo nas plantas germinadas observou-se uma indução do crescimento da raiz de  $14,9 \pm 7,7$  %.

**Palavras chave:** Ibuprofeno, solo, ecotoxicologia, bioensaio, *Lactuca sativa*

## Abstract

Pharmaceuticals are chemical substances widely used in human and veterinary treatment, and in agriculture. In the 90's, it has been discovered its presence in aquatic environment and it has been verified that its removal in the Sewage Treatment Plants was incomplete. During the last two decades, it was found the presence of over 80 compounds in the environment and nowadays they are included in the group of emergent pollutants. They can contaminate waters and soils, after being used and excreted (unaltered or metabolized) by humans and animals, and when improperly discharged in the environment. The ecotoxicological studies on this pollutants have been specially directed towards waters, creating an absence of studies on soils.

Ibuprofen is an anti-inflammatory, non-steroid, used also as painkiller and antipyretic, being one of the most sold pharmaceutical products in the whole world, what justifies its great presence in the environment. For that, and due to the absence of studies about the presence of IB on soils, this pharmaceutical has been selected for this study.

Environmental toxicity can be assessed by bioassays. The latter have the capacity to evaluate the overall toxicity using living organisms, which work as biomarkers.

The present work evaluates the impact caused by Ibuprofen in the soil, tests two clean-up strategies designed to remove IB from soils and screens sewage waters from three hospital units and from a pharmaceutical industry. This evaluation was made through bioassays of acute toxicity of germination and root elongation using lettuce seeds var. buttercrunch (*Lactuca sativa*) in sandy soil.

Acute ecotoxicity assays in contaminated soils by IB were assessed using a range of concentrations between 0,1 and 1000 µg/L. In the soil contaminated with 0,5 and 20 µg/L of IB it was verified a reduction in the number of germinated seeds and also in the mean length of the plant. For the soil contaminated with 1000 µg/L of IB it was observed a reduction of the germination, followed by an induction of the root growth of the species *Lactuca sativa*.

Fenton's reagent and the Nanoparticules of iron were the two processes of soils decontamination for which acute toxicity was assessed. The obtained results reveal that both treatments induced an effect in the germination percentage between  $32,2 \pm 3,5$  and  $48,5 \pm 6,2$  and the growth of the root was inhibited of about 85,0 %.

The obtained results for hospital sewage waters indicate a decrease of germination percentage between  $31,1 \pm 5,0$  and  $72,3 \pm 12,4$  and a decrease of its length between  $13,0 \pm$

6,4 and  $20,2 \pm 10,0$  %. For the industrial sewage water, it was verified a decrease of germination percentage of  $60,5 \pm 13,1$  and an increase of length of 14,9 %.

**Key words:** Ibuprofen, soil, ecotoxicology, bioassay, *Lactuca sativa*

## Índice Geral

Agradecimentos .....	V
Resumo .....	VII
Abstract .....	IX
Índice Geral .....	XI
Índice de Tabelas .....	XIII
Índice de Figuras .....	XV
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	XIX
1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento do trabalho .....	1
1.2 Poluição ambiental e impacte humano .....	1
1.3 Tipo de poluentes.....	2
1.3.1 Produtos farmacêuticos mais consumidos a nível mundial e nacional.....	3
1.4 Poluição de solos .....	7
1.4.1 Contaminação de solos por produtos farmacêuticos .....	9
1.4.2 Legislação europeia e portuguesa dos solos.....	10
1.4.3 Análise de Risco Ecológico .....	11
1.5 Toxicologia Ambiental e Ecotoxicologia.....	12
1.5.1 Avaliação da toxicidade.....	13
1.5.2 Utilização de normas em Ecotoxicologia - vantagens e desvantagens da sua aplicação.....	14
1.5.3 Bioensaios .....	15
1.5.4 <i>Lactuca sativa</i> .....	17
2. Parte Experimental.....	19
2.1. Material e equipamento .....	19
2.2. Reagentes.....	20
2.2.1 Estudo da solubilidade do Ibuprofeno em água.....	21
2.3 Caracterização do solo artificial e dos organismos de teste.....	21
2.4 Ensaio de ecotoxicidade aguda .....	21
2.4.1 Estudo da capacidade de retenção de água no solo .....	22
2.4.2 Ensaio preliminares de germinação e alongamento de raiz.....	24
2.4.3 Ensaio de ecotoxicidade aguda em solos contaminados por Ibuprofeno .....	26
2.4.4 Ensaio de ecotoxicidade aguda em solos descontaminados .....	27

2.4.5 Ensaio de ecotoxicidade aguda em solos contaminados por águas residuais hospitalares .....	29
3. Resultados e discussão .....	31
3.1 Estudo da solubilidade do Ibuprofeno.....	31
3.2 Ensaio de ecotoxicidade aguda .....	32
3.2.1 Estudo da capacidade de retenção de água .....	32
3.2.2 Ensaio preliminar de germinação e alongamento de raiz.....	32
3.2.3 Ensaio de ecotoxicidade aguda em solos contaminados por Ibuprofeno.....	34
3.2.4 Ensaio de ecotoxicidade aguda em solos descontaminados .....	37
3.2.5 Ensaio de ecotoxicidade aguda em solos contaminados por águas residuais hospitalares .....	47
4. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro .....	51
Bibliografia.....	53
ANEXO A – Boletim de Análise do Solo.....	57
ANEXO B – Características das Sementes de <i>Lactuca sativa</i> .....	61
ANEXO C – Boletins de Análise das Águas.....	65
ANEXO D – Estudo da Solubilidade do Ibuprofeno.....	71

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Listagem dos vários fármacos existentes em Portugal, cujo princípio activo é o IB. <sup>[19]</sup> .....	6
Tabela 1.2 - Exemplos de espécies de animais e de plantas usadas na avaliação ecotoxicológica de solos. <sup>[10, 34]</sup> .....	16
Tabela 2.1 - Condições gerais de teste de germinação propostas pela norma da EPA 600/3-88-029. <sup>[33]</sup> .....	22
Tabela 2.2 - Condições do teste preliminar de germinação e alongamento da raiz.....	24
Tabela 2.3 - Condições gerais dos testes à água nos ensaios preliminares de germinação e alongamento da raiz.....	25
Tabela 2.4 - Condições gerais seleccionadas para os ensaios de ecotoxicidade aguda.....	26
Tabela 3.1 - Percentagem média de germinação obtida em cada condição testada.....	32
Tabela 3.2 - Percentagem de germinação e comprimento médio da raiz obtidos com os vários tipos de água.....	33
Tabela 3.3 - Variação dos parâmetros analisados nos solos contaminados com IB em relação ao controlo negativo.....	37
Tabela 3.4 - Resumo de todos os parâmetros analisados nos ensaios com solos descontaminados em relação ao controlo negativo.....	47
Tabela 3.5 - Resumo dos parâmetros analisados nos ensaios realizados com águas residuais em relação ao controlo negativo.....	50
Tabela D.1 - Resultados obtidos no estudo de solubilidade do ibuprofeno.....	73



## Índice de Figuras

Figura 1.1 - Estrutura química do Ibuprofeno. <sup>[18]</sup> .....	4
Figura 1.2 - Metabolismo do IB no ser humano. <sup>[18]</sup> .....	5
Figura 1.3 - Representação do perfil típico de um solo. <sup>[9]</sup> .....	7
Figura 1.4 - Triângulo das classes texturais do solo. <sup>[9]</sup> .....	8
Figura 1.5 - Exemplo de uma curva dose-resposta. <sup>[32]</sup> .....	14
Figura 1.6 - Medição do comprimento da raiz da alface. <sup>[36]</sup> .....	18
Figura 2.1 - Câmara de germinação da BINDER, modelo KBWF 240.....	20
Figura 2.2 - Procedimento seguido na preparação dos ensaios em solos descontaminados por reagente de Fenton e Nanopartículas de ferro .....	28
Figura 3.1 - Estudo da solubilidade do Ibuprofeno em água por HPLC.....	31
Figura 3.2 - Percentagem de germinação obtida nos ensaios ecotoxicológicos de solos contaminados com IB. A água foi usada como controlo negativo não estando representado na figura (% G = 95,4 ± 4,6 %). * indica diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo (p ≤ 0,05).....	34
Figura 3.3 - (a) Sementes germinadas no controlo negativo; (b) Sementes germinadas em solo contaminado com 0,1 µg/L de IB; (c) Sementes germinadas em solo contaminado com 500 µg/L de IB; (d) Sementes germinadas em solo contaminado com 1000 µg/L de IB.....	34
Figura 3.4 - Comprimentos médios dos órgãos das plantas de <i>Lactuca sativa</i> na gama de concentrações testada. (a) Comprimento médio da folha e comprimento médio do caule. (b) Comprimento médio da raiz. * indica que existe diferença estatisticamente significativa (p ≤ 0,05) em relação ao controlo negativo.....	35
Figura 3.5 - Percentagem de IG das sementes de alface nos solos contaminados com de IB. A água foi usada como controlo negativo não estando representado na figura (% IG do controlo negativo = 100 %). * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo (p ≤ 0,05).....	36
Figura 3.6 - Percentagem de germinação obtida nos ensaios ecotoxicológicos em solos contaminados com IB (60 µg/L) e posteriormente descontaminados com o reagente de Fenton e com Nanopartículas de ferro. A água foi usada como controlo negativo não estando representado na figura (% G = 95,0 ± 4,1 %). *, # indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo e a 60 µg/L de IB dissolvido em NaOH, respectivamente (p ≤ 0,05).....	37
Figura 3.7 - (a) Sementes germinadas com IB dissolvido em NaOH; (b) Sementes germinadas com IB dissolvido em água.....	38
Figura 3.8 - (a) Sementes germinadas com IB dissolvido em NaOH; (b) Sementes germinadas no controlo negativo.....	38

Figura 3.9 - Comprimentos médios dos órgãos das plantas de <i>Lactuca sativa</i> . (a) ◆ Comprimento médio da folha e ■ comprimento médio do caule. (b) Comprimento médio da raiz. *, # indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo e a 60 µg/L de IB dissolvido em NaOH, respectivamente (p ≤ 0,05).....	39
Figura 3.10 - (a) Alfaces desenvolvidas em solo descontaminado por reagente de Fenton; (b) Alfaces desenvolvidas em solo descontaminado com Nanopartículas de ferro.....	40
Figura 3.11 - Índices de germinação (%) das sementes desenvolvidas em solo contaminado e descontaminado relativamente ao % IG do controlo negativo (100%). *, # indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo e a 60 µg/L de IB, respectivamente (p ≤ 0,05).....	40
Figura 3.12 - Percentagem média de germinação obtida nos ensaios ecotoxicológicos. A água foi usada como controlo negativo não estando representada na figura (% G= 95,0 ± 4,1 %). *, # indicam diferenças estatisticamente significativas da % G em relação ao controlo negativo e ao solo contaminado com NaOH, respectivamente (p ≤ 0,05).....	41
Figura 3.13 - Comprimentos médios dos órgãos das plantas de <i>Lactuca sativa</i> obtidos nos ensaios ecotoxicológicos. (a) ◆ Comprimento médio da folha e ■ comprimento médio do caule. (b) Comprimento médio da raiz. *, #, § indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo, a NaOH e a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , respectivamente (p ≤ 0,05).....	42
Figura 3.14 - Diferença de tamanhos das plantas das várias condições testadas. “CN” refere-se ao controlo negativo. Por “NaOH + FeCl <sub>3</sub> + chá” entenda-se matriz de Nanopartículas de ferro e por “NaOH + FeCl <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ” entenda-se matriz do reagente de Fenton.....	43
Figura 3.15 - Planta germinada em solo contaminado por Nanopartículas de ferro.....	44
Figura 3.16 - Índice de germinação (%) obtido para as condições testadas relativamente ao IG do controlo negativo (100%). #, § assinalam diferenças estatisticamente significativas relativamente a NaOH e a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , respectivamente (p ≤ 0,05).....	44
Figura 3.17 - Percentagem média de germinação obtida nos ensaios ecotoxicológicos com solos descontaminados. A água foi usada como controlo negativo, não estando apresentada na figura (% G= 95,0 ± 4,1 %). *, #, §, +, &, ^ indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo, ao solo contaminado com IB, NaOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , matriz de reagente de Fenton e reagente de Fenton, respectivamente (p ≤ 0,05).....	45
Figura 3.18 - Percentagem de alongamento da raiz obtida, considerando que no controlo negativo o AL foi de 0 %. #, + indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao solo contaminado com IB e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , respectivamente (p ≤ 0,05).....	46
Figura 3.19 - Percentagem do índice de germinação obtido em função das várias condições de ensaio. #, §, + indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao solo contaminado com IB, NaOH e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , respectivamente (p ≤ 0,05).....	46

Figura 3.20 - Percentagem de germinação obtida nos ensaios ecotoxicológicos de solos contaminados por águas residuais de origem hospitalar e industrial. A água foi usada como controlo negativo não estando representada na figura ( $\% G = 98,3 \pm 2,9 \%$ ). \*, #, §, + indicam diferenças estatisticamente significativas da % G em relação à obtida no controlo negativo, ao solo contaminado com ARI, ARH da maternidade e ARH da clínica geral, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).....48

Figura 3.21 - a) Sementes germinadas em solo contaminado com ARI; b) Sementes germinadas em solo contaminado com ARH da maternidade; c) Sementes germinadas em solo contaminado com ARH da clínica geral; d) Sementes germinadas em solo contaminado com ARH da pediatria.....48

Figura 3.22 - Comprimentos médios dos órgãos das plantas de *Lactuca sativa* (a) Comprimento médio da folha e comprimento médio do caule em relação aos valores obtidos no controlo negativo ( $4,33 \pm 0,54$  mm e  $3,46 \pm 1,07$  mm, respectivamente). (b) Comprimento médio da raiz relativamente ao valor do controlo negativo ( $11,96 \pm 4,63$  mm).....49

Figura 3.23 - Percentagem de índice de germinação de *Lactuca sativa* em solos contaminados com águas, considerando % IG do controlo negativo de 100 %. #, §, + indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao solo contaminado com ARI, ARH da maternidade e ARH da clínica geral, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).....50



## Lista de Símbolos e Abreviaturas

- AR – Alongamento da Raiz
- ARI - Água Residual Industrial
- ARH - Água Residual Hospitalar
- CRA – Capacidade de Retenção da Água
- CE<sub>50</sub> - Concentração de efeito para 50 % de organismos
- CENO – Concentração de efeito não observado
- CEMO – Concentração de efeito mínimo observado
- CI<sub>50</sub> – Concentração de inibição para 50 % dos organismos
- CL<sub>50</sub> – Concentração letal para 50 % dos organismos
- D – Massa de solo seco
- DL<sub>50</sub> – Dose letal para 50 % dos organismos
- E - Efeito
- EPA - *Environmental Protection Agency*
- ETAR – Estação de Tratamento de Água Residual
- F - Massa do funil com a massa de papel de filtro hidratado mais massa de solo húmido
- FDA – *Food and Drug Administration*
- G - Germinação
- HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
- I - Massa do funil, do papel de filtro hidratado e de solo seco
- IB - Ibuprofeno
- IG – Índice de Germinação
- M – Massa de solo requerida
- MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
- MSRM - Medicamentos Sujeitos a Receita Médica
- n – número de ensaios viáveis
- OECD - *Organization for Economic Cooperation and Development*
- P<sub>A</sub> – Percentagem de Água
- P<sub>CRA</sub> - Percentagem de Capacidade de Retenção da Água
- RSU – Resíduos Sólidos Urbanos
- TH – Teor de Humidade
- V<sub>A</sub> – Volume de Água
- W - Massa húmida de substrato



## 1. Introdução

### 1.1 Enquadramento do trabalho

Nas últimas duas décadas surgiu uma preocupação com os efeitos tóxicos provocados pelos fármacos no meio ambiente, para registar, legalmente, um novo fármaco (de acordo com a legislação de 1993 da EU ou de 1998 no caso dos EUA é necessário realizar uma análise de risco ecológico.<sup>[1]</sup> Essa análise de risco ecológico é feita através de ensaios toxicológicos agudos e/ou crónicos.<sup>[1, 2]</sup> Contudo, os medicamentos já existentes no mercado não foram abrangidos por estas obrigatoriedades legais.<sup>[3]</sup>

Até agora foram detectados produtos farmacêuticos em águas subterrâneas; rios; sedimentos, oceanos e solos, que embora em quantidades da ordem dos ng/L ou µg/L não podem ser desprezadas dado que a sua exposição a longo prazo poderá ter implicações na vida selvagem e humana.<sup>[4]</sup> Todavia os estudos ecotoxicológicos feitos sobre estes poluentes têm sido mais direccionados para as águas.<sup>[5, 6]</sup>

Este trabalho foi realizado no âmbito de um projecto financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) chamado "Reabilitação de solos contaminados por produtos farmacêuticos" com a referência PTDC/EMC/103141/2008. Daqui resultou uma comunicação oral apresentada no *XVII Encontro Galego-Portugués de Química*, intitulada "*Phytotoxicity evaluation of waste waters on germination and growth of lettuce seeds*" e também um artigo científico, que se encontra em preparação, com o título provisório de "*Soils and effluents evaluation. A bioremediation and ecotoxicological approach*". O objectivo deste estudo consistiu em acrescentar mais algum conhecimento no campo dos efeitos ecotoxicológicos em solos contaminados por produtos farmacêuticos, através de ensaios de germinação e alongamento de raiz, realizados com sementes de alface (*Lactuca sativa*). Foi avaliado o impacte causado nos solos pelo IB, testou-se a toxicidade de dois processos de descontaminação para remover o referido fármaco dos solos e avaliou-se a toxicidade provocada por águas residuais, de três unidades hospitalares e de uma indústria farmacêutica.

### 1.2 Poluição ambiental e impacte humano

A poluição pode definir-se como a acumulação de poluentes que interagem com o ambiente de forma adversa. A principal fonte de contaminação resulta dos resíduos produzidos pelas actividades dos organismos vivos, principalmente dos seres humanos, que podem poluir directa (ex.: aplicação de fertilizantes) ou indirectamente (ex.: interacção com outros seres

vivos).<sup>[7, 8]</sup> A segunda maior fonte de contaminação resulta dos processos naturais, como por exemplo a acumulação de metais resultantes da dissolução das rochas. No entanto, os seres humanos são, de longe, os maiores responsáveis pela degradação do meio ambiente, devido ao *boom* populacional que ocorreu na segunda metade do século XX.<sup>[9]</sup> O ambiente resulta da interligação entre solo, água superficial e atmosfera e funciona como uma entidade contínua, ou seja, quando um poluente é lançado numa fase sofre transformações físicas e químicas, contudo estas transformações ocorrem na interface de duas fases.<sup>[10]</sup> A forma como as substâncias são lançadas no ambiente, a concentração e as transformações que sofrem, determinam o impacto ambiental.<sup>[9]</sup>

É evidente que os problemas associados à poluição se magnificam se associados a problemas económicos ou à falta de recursos financeiros: um país com poucos recursos económicos não tem capacidade para suportar custos associados à gestão e tratamento de resíduos e à descontaminação.<sup>[9]</sup>

A ciência da poluição estuda os processos físicos, químicos e biológicos associados ao transporte e mitigação de contaminantes. O estudo científico da poluição permite dotar os Estados de legislação economicamente prudente, capaz de tornar o ambiente mais saudável.<sup>[9]</sup>

### 1.3 Tipo de poluentes

Os organismos estão geneticamente adaptados para as mudanças naturais que ocorrem nos seus ambientes e que os afectam em termos químicos, físicos e biológicos reflectindo-se no ecossistema. Alguns poluentes podem actuar directamente nos organismos, enquanto outros podem actuar no ambiente, afectando o ecossistema.<sup>[11]</sup> Existem vários tipos de poluentes, sendo eles:

- Matéria orgânica – Constituído principalmente por carboidratos, proteínas e gorduras que estimulam o crescimento dos microrganismos;
- Nutrientes – O crescimento das plantas é estimulado pela presença de elevadas concentrações de fósforo e azoto;
- Tóxicos – Interferem com o metabolismo e actividade fisiológica de forma nociva;
- Sólidos Suspensos – Provocam efeitos semelhantes aos tóxicos interagindo fisicamente;
- Energia – Deve-se sobretudo a descargas térmicas, os efeitos provocados são semelhantes aos tóxicos;
- Microrganismos patogénicos – Provocam efeitos tóxicos nos organismos.

Os metais pesados, os radionuclídeos, os pesticidas, os poluentes atmosféricos e os poluentes emergentes são algumas das classes de tóxicos, presentes no ambiente, que suscitam bastante preocupação na comunidade científica.<sup>[9, 11]</sup>

Os metais pesados (chumbo, mercúrio, cádmio, crómio, arsénio, selénio) abrangem a maior categoria de poluentes inorgânicos. Provêm da indústria e do uso de produtos sintéticos, mas também existem em meio natural. São tóxicos para as plantas e animais e tendem a mover-se ao longo das cadeias alimentares.<sup>[11]</sup>

Radionuclídeos são substâncias radioactivas instáveis que decaem espontaneamente emitindo radiações  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , originando isótopos de menor peso atómico. As substâncias e as radiações podem danificar os tecidos provocando, por exemplo, cancro. O grau do dano dependerá do tipo de radiação e da duração da exposição.<sup>[11]</sup>

Pesticida é uma substância ou mistura de substâncias que é usada para eliminar pragas. Os pesticidas podem ser caracterizados de acordo com o alvo e, nesse caso, podem ser: insecticidas, herbicidas e fungicidas. Também se podem classificar de acordo com o modo de acção, podendo ser sistémicos ou de contacto. Dependendo das suas propriedades físico-químicas, da forma e local de aplicação e condições climatéricas, podem contaminar águas subterrâneas.<sup>[9]</sup>

Poluentes atmosféricos são todos os gases ou partículas de origem natural ou antropogénica que, para níveis de concentração elevados, podem ser perigosos. Os poluentes primários (dióxido de carbono, hidrocarbonetos, partículas, óxidos de azoto e dióxido de enxofre) entram directamente na atmosfera. Os poluentes secundários resultam de reacções entre os primários e constituintes atmosféricos (ex.: vapor de água) e podem levar à formação de nevoeiro fotoquímico.<sup>[9]</sup>

Um poluente emergente é toda e qualquer substância química de origem sintética ou natural, ou algum microrganismo que não é, normalmente, identificado no ambiente, mas com potencial para entrar neste meio e provocar efeitos ecológicos adversos.<sup>[12]</sup> Os fármacos fazem, assim, parte do grupo de poluentes emergentes.<sup>[12, 13]</sup>

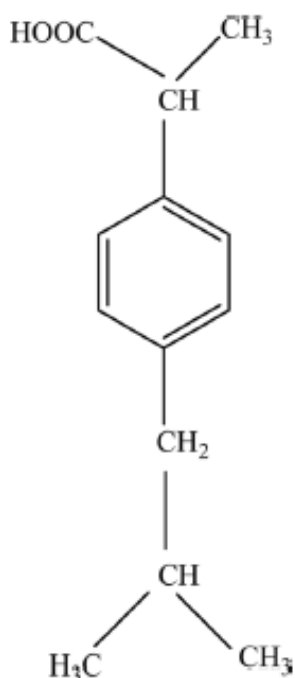
### **1.3.1 Produtos farmacêuticos mais consumidos a nível mundial e nacional**

Anualmente são produzidas toneladas de medicamentos para uso humano e veterinário, para efeitos de terapia, prevenção, diagnóstico e cosmética.<sup>[5, 14]</sup> Estes produtos são desenvolvidos para provocar um efeito biológico, em alguns casos persistente, e o seu impacto no meio ambiente está ainda pouco estudado.<sup>[5, 15]</sup>

Na União Europeia estão disponíveis no mercado cerca de 3000 substâncias para uso medicinal (anti-inflamatórios, contraceptivos, antibióticos, analgésicos, compostos neuroativos, entre outros). No âmbito da medicina veterinária são usados, principalmente, anti-inflamatórios e antibióticos. De um modo geral, na Europa os produtos farmacêuticos de maior aplicação são: ácido acetilsalicílico, paracetamol, naproxeno, ibuprofeno e diclofenac.<sup>[15]</sup>

Em Portugal, o mercado dos medicamentos genéricos e dos medicamentos não sujeitos a receita médica tem sofrido um aumento, sendo as substâncias mais vendidas: paracetamol, ibuprofeno e diclofenac.<sup>[16, 17]</sup>

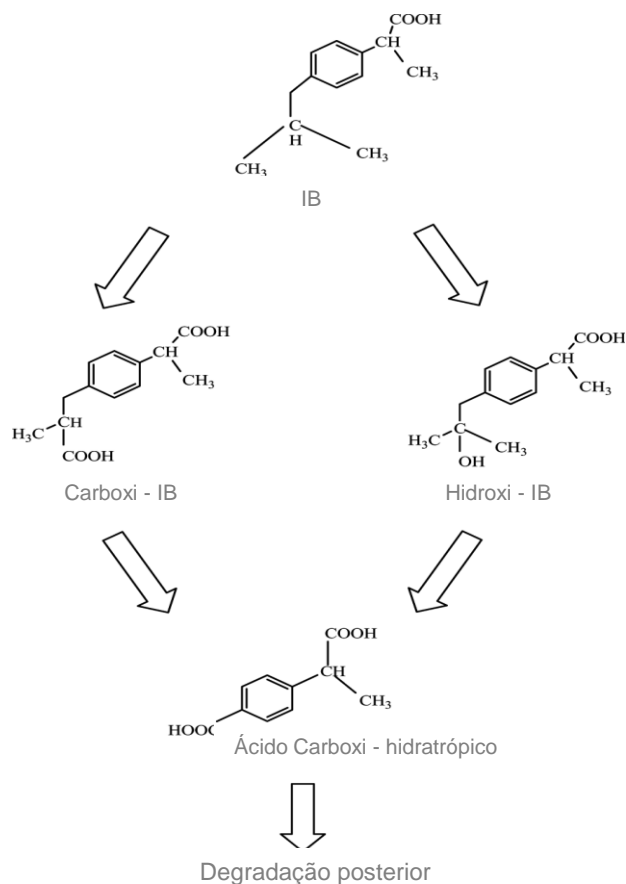
Segundo Ali *et al* (2009)<sup>[18]</sup> o IB foi o terceiro medicamento mais vendido em todo o mundo, o que justifica a sua forte presença no ambiente, nomeadamente em rios, águas residuais e sedimentos. O Ibuprofeno (IB; 2 - (4 - Isobutilfenil) ácido propiónico) - cuja estrutura química se encontra representada na figura 1.1 - é um anti-inflamatório não esteróide (AINE) utilizado também como analgésico e antipirético.<sup>[18, 19]</sup>



**Figura 1.1** - Estrutura química do Ibuprofeno.<sup>[18]</sup>

A estrutura química do IB apresenta um carbono quiral e, por isso, este composto existe como mistura racémica de S – (+) – IB e R – (-) – IB. Nos mamíferos o enantiómero inactivo R sofre uma inversão unidireccional e é convertido no enantiómero activo S. Este último

tem efeitos farmacológicos e degradação lenta quando libertado no meio ambiente. O IB pode ser excretado inalterado ou sob a forma dos seus principais metabolitos (hidróxi-IB, carboxi-IB, ácido carboxi-hidratrópico).<sup>[18]</sup>



**Figura 1.2** - Metabolismo do IB no ser humano.<sup>[18]</sup>

Em Portugal existem no mercado cerca de 40 fármacos (tabela 1.1) com este princípio activo, sendo que, nem todos estão sujeitos a receita médica. Estes podem-se apresentar sob a forma líquida e semi-sólida, e sólida, com diferentes concentrações do princípio activo, IB.<sup>[19]</sup>

**Tabela 1.1** - Listagem dos vários fármacos existentes em Portugal, cujo princípio activo é o IB.<sup>[19]</sup>

Forma	Concentração	Fármaco	Fabricante	MSRM <sup>1</sup>	MNSRM <sup>2</sup>	
Oral líquida e semi-sólida	20 mg/mL	Brufen Suspensão	Abbot	X		
		Ibuprofeno generis 20 mg/mL Suspensão Oral	Generis	X		
		Nurofen	Reckitt		X	
		Trifene	Lab. Medinfar	X		
	200 mg	Kifen			X	
		Trifene dispersível	Lab. Medinfar		X	
	400 mg	Norvectan 400	Lab. Aplic. Farmacodinamicas	X		
		Spidifen	Zambon	X		
	600 mg	Norvectan 600	Lab. Aplic. Farmacodinamicas	X		
		Spidifen	Zambon	X		
Oral sólida	200 mg	Brufen ( <i>comprimidos</i> )	Abbot		X	
		Brufen ( <i>efervescente</i> )	Abbot		X	
		Dolocyl			X	
		Ibuprofeno Ratiopharm 200 mg Comprimidos Revestidos	Ratiopharm	X		
		Moment 200	Angelini		X	
		Nurofen	Reckitt		X	
		Ozonol	GSK Cons. Healthcare		X	
		Solufen	Lab. Azevedos		X	
		Tricalma	Generis		X	
		Trifene 200	Lab. Medinfar		X	
	Zip-a-dol	Labialfarma		X		
	400 mg	Brufen ( <i>comprimidos</i> )	Abbot		X	
		Ibuprofeno Azevedos 400 mg Comprimidos	Lab. Azevedos	X		
		Ibuprofeno Ciclum	Ciclum	X		
		Ibuprofeno Generis 400 mg Comprimidos	Generis	X		
		Ibuprofeno Ratiopharm 400 mg Comprimidos Revestidos	Ratiopharm	X		
		Nurofen 400	Reckitt	X		
		Spidifen 400 mg Comprimidos	Zambon	X		
		Trifene 400	Lab. Medinfar	X		
		600 mg	Brufen ( <i>comprimidos</i> )	Abbot	X	
			Brufen ( <i>efervescente</i> )	Abbot	X	
	Ibuprofeno Alter 600 mg Comprimidos Revestidos		Alter	X		
	Ibuprofeno Azevedos 600 mg Comprimidos		Lab. Azevedos	X		
	Ibuprofeno Ciclum		Ciclum	X		
	Ibuprofeno Generis 600 mg Comprimidos		Generis	X		
	Ibuprofeno Pharmakern		Pharmakern	X		
	Ibuprofeno Ratiopharm 600 mg Comprimidos Revestidos	Ratiopharm	X			

<sup>1</sup> MSRM: Medicamento Sujeito a Receita Médica

<sup>2</sup> MNSRM: Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

## 1.4 Poluição de solos

Por ser o *habitat* de microrganismos, plantas, animais e humanos o solo é um sistema dinâmico, bastante complexo, cuja qualidade é de elevada importância.<sup>[20]</sup> O solo é responsável pelo crescimento das plantas, pelo ciclo dos nutrientes, por manter o balanço oxigênio/dióxido de carbono na atmosfera e é o destino final de grande parte dos resíduos produzidos.<sup>[9, 20]</sup> O solo resulta de uma mistura de partículas rochosas, de matéria orgânica, de água e de organismos vivos, podendo ter uma espessura que pode ir de quinze centímetros até milhares de metros. A formação dos solos gera normalmente várias camadas sobrepostas designadas por horizontes, que conferem a cada solo uma identidade característica. O perfil típico de um solo está representado na figura 1.3. Geralmente a camada superficial dos solos é escura, rica em matéria orgânica e denomina-se horizonte O. Abaixo deste localiza-se o horizonte A, o qual é composto por minerais e matéria orgânica húmida em decomposição. Seguidamente aparece o horizonte E, que resulta da lixiviação de pequenos minerais do horizonte A. O horizonte B é mais rico em minerais, sobretudo argilas, oriundos das camadas superiores. O horizonte C, localizado por baixo do horizonte B, é constituído por materiais não consolidados que não estão sujeitos à influência do clima. Por fim, temos o horizonte R que não é mais do que rocha consolidada. Embora alguns horizontes sejam comuns à maioria dos solos, nem todos os solos possuem os mesmos horizontes.<sup>[9]</sup>

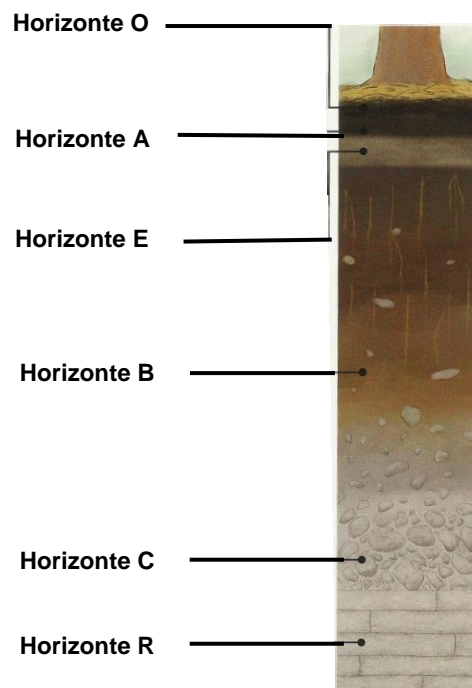


Figura 1.3 - Representação do perfil típico de um solo.<sup>[9]</sup>

Por norma o solo é constituído por cerca de 95 % de matéria inorgânica e entre 1 a 5 % de matéria orgânica. A matéria inorgânica é composta por três partículas primárias de minerais: areia, argila e siltes. A proporção de cada um destes compostos determina o grupo textural a que o solo pertence e afecta as suas propriedades físicas e químicas. Solos ricos em areia têm elevada permeabilidade e baixa capacidade de retenção de água, contrariamente aos solos em que predominam siltes e argilas. Um solo onde não predomina nenhuma classe granulométrica particular é chamado de marga e tem poucos ou nenhuns poros que permitam a difusão de ar ou água. A figura 1.4 ilustra o triângulo das classes texturais do solo.<sup>[9]</sup>

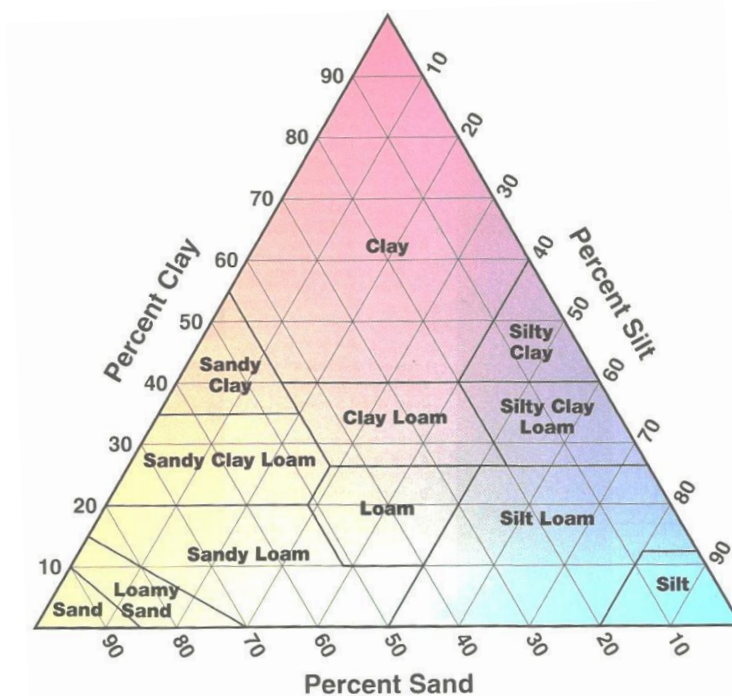


Figura 1.4 - Triângulo das classes texturais do solo.<sup>[9]</sup>

O *habitat* humano localiza-se na superfície terrestre e está fortemente dependente da interligação entre solo, água e atmosfera. Como o solo é composto por sólidos, líquidos e gases e cada um deles está em equilíbrio com a atmosfera e com o meio hídrico, o último destino de um poluente depende do tipo de solo.<sup>[9, 20]</sup> Os contaminantes existentes no subsolo (zona não saturada situada entre a superfície e a água subterrânea) podem estar repartidos em 4 fases: fase orgânica sob a forma de produto livre; fase sólida numa componente sorvida; fase aquosa numa componente dissolvida e fase gasosa. A menor fracção de poluente encontra-se geralmente dissolvida na fase aquosa. No entanto, como esta fase tem uma elevada mobilidade é a que provoca maior impacte ambiental. Os mecanismos associados ao transporte de contaminantes são a convecção, a dispersão axial e a difusão molecular. O principal mecanismo de transporte é a convecção, no qual os contaminantes são transportados

pelo movimento da água.<sup>[9, 20]</sup> A concentração do poluente é alterada pela dispersão, uma vez que este se alastra noutras direcções diferentes daquela da fonte de contaminação. A existência de um gradiente de concentração pode originar difusão molecular.<sup>[9]</sup>

A contaminação do solo é hoje vista como um grave problema de contaminação ambiental, isto porque pode levar à contaminação de águas, pode provocar efeitos de bioacumulação e biomagnificação de tóxicos que, em última análise, pode afectar a saúde humana.<sup>[20]</sup> As células têm a capacidade de bioacumular uma grande variedade de moléculas. Esta característica permite-lhes acumular nutrientes e minerais essenciais, contudo, podem também absorver e reter substâncias tóxicas. Através das cadeias alimentares essas substâncias podem passar para níveis tróficos superiores, ocorrendo assim a biomagnificação.<sup>[11, 21]</sup>

A determinação físico-química da quantidade de poluentes não permite avaliar *per si* o risco ecológico causado pelo poluente.<sup>[9]</sup> Assim, os bioensaios surgem como uma ferramenta indispensável na avaliação da qualidade do solo. Na área da ecotoxicologia do solo têm sido desenvolvidas várias normas para executar ensaios agudos e crónicos com animais e plantas.<sup>[10]</sup> Todavia é necessário ter em linha de conta que a resposta aos estímulos dos tóxicos será diferente consoante a espécie.<sup>[20]</sup>

#### **1.4.1 Contaminação de solos por produtos farmacêuticos**

Desde que foi descoberta a sua presença em ambientes aquáticos, que os produtos farmacêuticos se tornaram num alvo da química ambiental, pois podiam acabar por afectar a saúde humana.<sup>[22 - 24]</sup> Verificou-se que a sua remoção nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR) não era completa e nas duas últimas décadas foram identificada a presença de mais de oitenta compostos. Desde então têm sido feitos variados estudos sobre a presença e os efeitos dos produtos farmacêuticos em águas. Como os anti-inflamatórios não esteróides são ácidos solúveis em água e difíceis de degradar a sua remoção é baixa.<sup>[22, 24]</sup>

Os produtos farmacêuticos são continuamente lançados no meio ambiente resultante das actividades: médica, veterinária, agrícola e industrial.<sup>[13, 22, 23]</sup> A via médica é talvez a que mais pesa nos pratos desta balança, uma vez que, nas sociedades ditas “desenvolvidas” os produtos farmacêuticos contribuem para a melhoria da qualidade de vida. Segundo um estudo realizado, nos Estados Unidos da América, quatro em cada cinco pacientes deixam o consultório com pelo menos uma prescrição.<sup>[13]</sup> Uma vez ingeridos podem ser excretados inalterados e biologicamente activos (mais de 95 % da dose administrada) ou sob a forma de metabolitos activos.<sup>[13, 24]</sup> Por outro lado medicamentos indesejados ou fora de prazo são muitas vezes lançados indevidamente no meio ambiente, quer através dos efluentes

domésticos, quer através dos resíduos sólidos urbanos (RSU).<sup>[13, 24]</sup> Atitudes que, a longo prazo, acabam por ter implicações nas águas e solos. Quando comparada com a influência biomédica, a influência industrial acaba por ser mínima, devido aos elevados custos de produção e leis apertadas em relação aos efluentes industriais.<sup>[13]</sup>

Em Portugal, a VALORMED é a sociedade responsável pela gestão dos resíduos de embalagens e medicamentos fora de uso desde 1999. Depois de uma recolha selectiva (realizada em farmácias comunitárias e hospitalares, em indústrias farmacêuticas, em empresas distribuidoras e armazenistas) os resíduos são separados de acordo com os materiais para reciclagem (caixas, blisters, bulas, ampolas, frascos) e os medicamentos fora de uso são incinerados.<sup>[25]</sup> Segundo informação da página oficial da VALORMED<sup>[25]</sup>, “... em 2010 foram recolhidas 838 toneladas de resíduos de embalagens e medicamentos fora de uso, representando um acréscimo de 17 % relativamente ao ano anterior. Embora o Sector do Medicamento represente menos de 0,5 % dos Resíduos Sólidos Urbanos, o projecto justifica-se em termos de saúde pública e ambiental.”

### 1.4.2 Legislação europeia e portuguesa dos solos

A Directiva 2004/35/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Abril de 2004, tinha por objectivo estabelecer um quadro de responsabilidade ambiental baseado no princípio do "poluidor-pagador" que prevenisse ou reparasse danos ambientais.<sup>[26]</sup> Em Novembro de 2006 foi pedido pelo Parlamento Europeu e do Conselho um parecer ao Comité Económico e Social Europeu (CESE) sobre a «Proposta de Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece um quadro para a protecção do solo e altera a Directiva 2004/35 CE».<sup>[27]</sup> O CESE concluiu que deveria existir uma directiva-quadro que servisse de base comum à protecção dos solos em todos os Estados-Membros. Desse parecer constam, entre outros, os seguintes pontos, os quais são bastante elucidativos da importância do solo como um recurso a ser preservado.<sup>[27]</sup>

“2.1 O solo pode ser considerado um recurso não renovável. A degradação do solo é um problema que se agrava com rapidez na Europa, acentuado por actividades humanas como certas práticas agrícolas e silvícolas, actividades industriais, turismo, desenvolvimento urbano e infra-estruturas de transportes.

2.2 O solo é um recurso de interesse comum para a UE e a inexistência de uma estratégia de protecção ao nível comunitário prejudicará a sustentabilidade e a competitividade da Europa a longo prazo. Diversas políticas comunitárias contribuem já para a protecção do solo, não formando, porém, uma política coerente. Apenas nove Estados-Membros têm legislação

específica sobre protecção do solo, abrangendo muitas vezes uma única ameaça específica, como a contaminação do solo. A degradação do solo tem um forte impacto noutros domínios de interesse comum para a UE, como a água, a saúde humana, as alterações climáticas, a protecção da natureza e da biodiversidade biológica e a segurança dos alimentos.”

A actual lei portuguesa dos solos (Lei dos Solos – Decreto Lei nº 794/76 de 5 de Novembro) vigora desde 1976. Esta lei foi sendo alterada por novos decretos lei ao longo dos anos (DL 313/80 de 19 de Julho; DL 400/84 de 31 de Dezembro; DL 380/99 de 22 de Setembro; DL 307/2009 de 23 de Outubro). No entanto, permanece desactualizada face à realidade e necessidades actuais. A preparação de um novo diploma dos solos começou na anterior legislatura e o projecto de lei tinha edição prevista para meados do presente ano. As bases técnicas deste novo projecto para uma nova Lei dos Solos estão a cargo da Direcção-Geral do Ordenamento do Território e Desenvolvimento Urbano.<sup>[28]</sup>

### 1.4.3 Análise de Risco Ecológico

Uma análise de risco é um processo pelo qual se faz uma estimativa da probabilidade que determinado evento tem de ocorrer e também da magnitude dos efeitos que pode provocar. Efeitos que podem ser sentidos na economia, na saúde, na segurança e na ecologia. A análise de risco, enquanto disciplina, surgiu na década de 1940 acompanhando a emergência da indústria nuclear. A partir dos anos 50 surgiram vários estudos de análise de segurança e perigosidade associados à indústria petrolífera, aeroespacial, nuclear e química.<sup>[9, 11]</sup>

Qualquer que seja o objecto de estudo, a execução de uma análise de risco deve obedecer a quatro etapas:

- **Identificação do perigo:** definir o risco e sua natureza;
- **Análise da exposição:** determinar a concentração do poluente no ambiente e estimar a sua concentração nos organismos alvo;
- **Análise da dose-resposta:** quantificação dos efeitos adversos que resultam da exposição ao poluente;
- **Caracterização do risco:** estimativa do potencial de impacte.

A execução de uma análise de risco ecológico a uma substância requer que as suas propriedades sejam conhecidas, de forma a que o seu comportamento no ambiente e possíveis efeitos que possa causar sejam previstos.<sup>[29]</sup> Esta análise passa por: formular o problema e identificar o perigo; analisar a exposição; analisar os efeitos ecológicos provocados pela exposição; e pela caracterização do risco.<sup>[9, 29]</sup> A formulação do problema é um ponto crítico

que se inicia com a avaliação das características do poluente, o ecossistema em risco e os efeitos ecológicos inerentes. É então seleccionado um *ponto final*, que não é mais do que uma característica que possa ser afectada (ex.: inibição do crescimento da raiz) pelo poluente. A análise da exposição consiste em determinar a gama de concentrações ambientais e a dose que determinado ser vivo recebe. Os efeitos ecológicos são quantificados e, se possível, determina-se uma relação causa-efeito. Combinando os dados obtidos na análise da exposição com os da avaliação ecológica, obtém-se o perfil dose-resposta. A construção deste perfil requer a utilização de extrapolações e modelos matemáticos e, também, que sejam feitas considerações. É, portanto, um processo complexo. Isto porque o efeito dependerá da(s) espécie(s) atingida(s) e, por isso, quando se usam extrapolações filogenéticas para transferir dados de toxicidade de uma espécie para outra, é assumido um grau de similaridade, que deve ficar bem definido. A avaliação de risco é uma comparação da exposição com o perfil dose-resposta, para que a probabilidade que o efeito tem de ocorrer seja estimada. Tratando-se de uma previsão, está intimamente relacionada com o julgamento do profissional envolvido no processo.<sup>[9]</sup>

### 1.5 Toxicologia Ambiental e Ecotoxicologia

A toxicologia ambiental ou ecotoxicologia é um ramo da toxicologia que se dedica ao estudo da influência dos tóxicos na biosfera, incluindo organismos individuais, populações ou ecossistemas, sem nunca excluir os humanos.<sup>[21, 30]</sup> Esta ciência resulta da interacção multidisciplinar entre a Biologia, a Química, a Física e a Matemática.<sup>[31]</sup> Embora os termos usados em toxicologia pareçam sinónimos, torna-se necessário defini-los correctamente para evitar problemas comunicacionais.<sup>[30]</sup> Assim:

- **Veneno** refere-se a uma substância de origem natural ou sintética que mesmo em pequenas doses destrói ou compromete as funções celulares dos organismos;
- **Xenobióticos** são todos os compostos que não são sintetizados naturalmente por um organismo;
- **Toxinas** são substâncias produzidas por plantas (fitotoxinas), por animais (zootoxinas) ou por bactérias (bacteriotoxinas) que destroem ou prejudicam as funções celulares;
- **Tóxicos** são substâncias que produzem efeitos de intoxicação.

O aumento populacional e os avanços na indústria levaram a um aumento na busca e no consumo das fontes de energia, alimento e água. Consequentemente o volume de resíduos

gerados também sofreu um aumento. Todos estes factores acabaram por provocar impactos significativos nos ecossistemas.<sup>[30]</sup>

A toxicidade varia consoante a duração da exposição e a localização da fonte de contaminação, podendo ser aguda, crónica, local ou sistémica. A toxicidade pode ainda ser classificada de acordo com o tempo decorrido entre a exposição ao tóxico e o primeiro sintoma associado essa exposição. Assim, a toxicidade pode ser imediata ou retardada.<sup>[30]</sup>

### 1.5.1 Avaliação da toxicidade

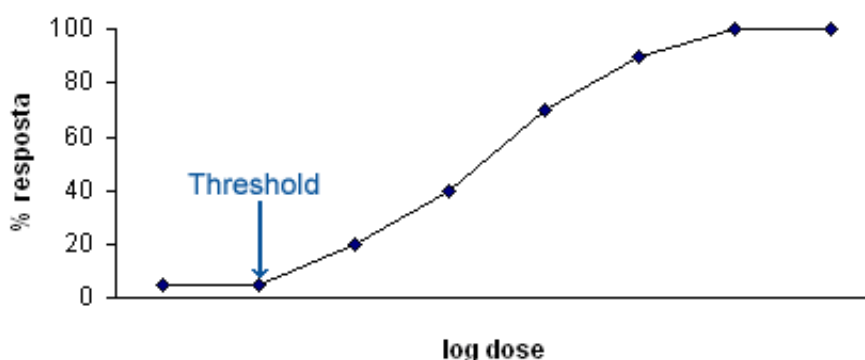
A avaliação de toxicidade, ou seja, a relação causa-efeito do tóxico, é feita através de testes de toxicidade. Para os executar é necessário seleccionar o organismo teste (planta, alga, animal, bactéria), bem como o efeito ou resposta que se pretende avaliar. Este último deve ser de fácil observação e quantificação (ex.: alteração do crescimento). A duração da exposição deve ser devidamente escolhida, devendo ter em conta a fisiologia do organismo e o efeito a observar. A selecção das doses de tóxico a testar é um ponto crítico do teste, porque deve conjugar as características do organismo e o efeito a quantificar.<sup>[30]</sup> Desde que a quantidade de tóxico introduzida no organismo teste seja suficientemente elevada, observar-se-ão efeitos nocivos no mesmo. Em muitos estudos toxicológicos observam-se induções de crescimento para baixas concentrações. Todavia, a simples exposição ao tóxico *per si* pode não provocar efeitos de toxicidade.<sup>[31]</sup>

Dada a elevada variedade de espécies existentes no ecossistema, foram desenvolvidos vários tipos de teste toxicológicos.<sup>[10]</sup> Quanto à duração da exposição, os testes podem ser agudos (o período de exposição é relativamente curto), ou crónicos (o período de exposição aproxima-se do ciclo de vida da espécie testada). Existem ainda testes subcrónicos, cujo período de exposição se situa entre os dois anteriores. Os testes multiespécies envolvem duas ou mais espécies e usam-se para verificar os efeitos tóxicos provocados na dinâmica da população (ex.: interacção presa-predador ou competição por alimentos).<sup>[9, 30]</sup>

Uma das maiores dificuldades da ecotoxicologia é conseguir simular em laboratório sob condições controladas, comunidades artificiais – microcosmos – que representem o ecossistema real em estudo.<sup>[9]</sup>

### 1.5.1.1 Curva dose-resposta

As avaliações ecotoxicológicas feitas a determinada substância iniciam-se por testes agudos de toxicidade. Estes permitem calcular que doses não serão letais para o(s) organismo(s) teste. A partir destes dados, podem ser feitos testes de toxicidade subcrónica ou crónica, onde se avaliam os efeitos sub-letais que a substância provoca.<sup>[9]</sup> É frequente apresentar os dados sob a forma de uma curva dose-resposta (figura 1.5), que traduz a relação entre dose e efeito biológico causado pelo tóxico numa dada população.<sup>[9, 31]</sup>



**Figura 1.5** - Exemplo de uma curva dose-resposta.<sup>[32]</sup>

A partir desta curva pode ser estimada a dose letal que causa efeito em 50 % dos organismos ( $DL_{50}$ ), a concentração letal que causa efeito em 50 % dos organismos ( $CL_{50}$ ), a concentração que afecta 50 % dos organismos ( $CE_{50}$ ) e a concentração que inibe em 50 % a resposta dos organismos ( $CI_{50}$ ).<sup>[31]</sup> Contudo, é também objectivo dos estudos toxicológicos determinar que dose causa efeitos mínimos ou inexistentes na população. Assim, a curva dose-resposta permite saber qual a concentração para a qual não é observado efeito (CENO) e a concentração que provoca o efeito mínimo observado (CEMO).<sup>[9, 31]</sup>

### 1.5.2 Utilização de normas em Ecotoxicologia - vantagens e desvantagens da sua aplicação

Ao longo dos anos, várias entidades têm desenvolvido normas para executar testes ecotoxicológicos.<sup>[10, 31]</sup> A utilização destes testes padronizados permite que os resultados obtidos sejam uniformes e passíveis de comparar, permitindo a tomada de decisões. Em caso de necessidade, como por exemplo uma avaliação de risco ecológico, os resultados obtidos em

diferentes laboratórios podem ser compilados. Apenas se definem linhas base, havendo, portanto, liberdade para fazer as alterações que se considerem necessárias e que melhor se adaptem às condições que se pretendem estudar. No entanto, para questões mais específicas ou substâncias com propriedades invulgares, estes métodos não são fáceis de aplicar. Primeiro, deve identificar-se o problema e só depois se deve seleccionar o método mais apropriado e não o contrário.<sup>[31]</sup>

A norma da *Environmental Protection Agency*, EPA 600/3-88-029 - *Protocols for Short term toxicity screening of hazardous waste sites* - foi publicada pela *Environmental Protection Agency* em 1996 e estabelece métodos a utilizar nos ensaios de toxicidade a: solos, sedimentos, águas superficiais e águas subterrâneas.<sup>[33]</sup>

Em Fevereiro de 2005 foi publicada pelo *Environmental Technology Center Canadiano* o relatório EPS 1/RM/45, intitulado *Biological Test Method: test for measuring emergence and growth of terrestrial plants exposed to contaminants in soil*. Este relatório resulta de um estudo aprofundado das normas utilizadas em ensaios biológicos com plantas e da sua conjugação e foi revisto em Junho de 2007.<sup>[34]</sup>

### 1.5.3 Bioensaios

Os bioensaios são testes toxicológicos que se podem utilizar para determinar, de uma forma global, a ecotoxicidade provocada por determinado químico e os seus metabolitos.<sup>[10, 35, 36]</sup> Uma prática antiga e muito comum da extracção mineira consistia em levar canários para o interior das minas de carvão. Na presença de um gás tóxico, como o monóxido de carbono ou o metano, o canário morreria, o que alertava os mineiros para a presença de perigo. Os canários funcionavam como bio-indicadores. Actualmente a expressão “canário numa mina de carvão” é usada quando existe um indicador de perigo iminente.<sup>[36]</sup>

A utilização de bioensaios padronizados permite não só caracterizar a toxicidade do solo mas também os possíveis efeitos causados no ecossistema.<sup>[10, 35]</sup> Neste tipo de experiências, a toxicidade é aferida comparando a actividade de organismos vivos (bio-indicadores) em condições padronizadas (controlo negativo) com a actividade dos mesmos nas condições que se pretendem estudar.<sup>[10, 36]</sup>

Este tipo de teste permite determinar a toxicidade de águas, solos e sedimentos e pode ser utilizados para complementar as análises físico-químicas. Os bioensaios têm sido utilizados para mapear zonas contaminadas, para projectar e testar processos de descontaminação de solos e para avaliar a toxicidade de efluentes industriais.<sup>[36]</sup>

**1.5.3.1 Os organismos de teste**

Idealmente, a escolha dos organismos de teste deve obedecer a alguns critérios, tais como:

- O organismo de teste deve ser facilmente cultivado no laboratório ou de fácil recolha quando não cultivado no laboratório;
- Devem ser garantidas condições no laboratório para a preservação do organismo de teste;
- Os aspectos genéticos e a morfologia dos organismos de teste devem ser conhecidos de forma a facilitar a análise dos efeitos produzidos;
- De forma a facilitar a observação e medição do grau de toxicidade, a sensibilidade do organismo às várias classes de tóxicos deve ser conhecida;
- A sensibilidade do organismo deve ser representativa da sensibilidade do seu filo ou classe;
- Nos testes de toxicidade multi-espécie a interação entre as espécies envolvidas deve ser tida em conta.<sup>[31]</sup>

Na maioria dos casos desconhece-se qual o organismo mais indicado, isto é, mais sensível, para a realização de um ensaio com um determinado tóxico.<sup>[31]</sup>

São vários os organismos teste recomendados para a realização de bioensaios e no caso da avaliação ecotoxicológica de solos, os organismos teste podem ser animais e plantas (ver tabela 1.2).<sup>[34, 35]</sup>

**Tabela 1.2** - Exemplos de espécies de animais e de plantas usadas na avaliação ecotoxicológica de solos.<sup>[10, 34]</sup>

<b>Animais</b>	<b>Plantas</b>
Anelídeo ( <i>Eisenia andrei</i> )	Cevada ( <i>Hordeum vulgare</i> )
Anelídeo ( <i>Eisenia fetida</i> )	Rabanete ( <i>Raphanus sativus</i> )
Colêmbolo ( <i>Folsomia candida</i> )	Cenoura ( <i>Daucus carota</i> )
Anelídeo ( <i>Lumbricus terrestris</i> )	Pepino ( <i>Cucumis sativus</i> )
Escaravelho ( <i>Aleochara bilineata</i> )	Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )
Tatu-bola ( <i>Porcellio scaber</i> )	Alface ( <i>Lactuca sativa</i> )

Devido às importantes funções ecológicas que desempenham no meio ambiente, as espécies de plantas são por vezes preferidas em relação às espécies animais.<sup>[1]</sup> Para a realização do presente trabalho foi seleccionada a alface por razões que serão enumeradas seguidamente.

#### **1.5.4 *Lactuca sativa***

A alface é uma planta dicotiledónea com germinação epigelial cujo tempo necessário para emergência se situa entre os 3 e os 4 dias. Embora se possa desenvolver em solos arenosos, argilosos ou lamacentos, o seu desenvolvimento é melhor em solos com elevados teores de matéria orgânica. O pH óptimo para a germinação situa-se entre 6,0 e 8,0.<sup>[34]</sup>

A escolha das sementes de alface prende-se com as várias vantagens que advêm da sua utilização. Isto porque, são baratas e fáceis de germinar e não é necessário fazer uma manutenção das culturas entre experiências.<sup>[34, 36]</sup> O tempo de teste não é longo, são sensíveis a substâncias tóxicas (ex. metais pesados, pesticidas ou fármacos) e podem ser aplicadas a testes com água, sedimentos ou solos. Esta espécie tem sido aplicada em estudos ecotoxicológico, nomeadamente na avaliações de poluentes presentes na água. A *Lactuca sativa* variedade bola de manteiga é uma das espécies padrão recomendada pela EPA, pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD).<sup>[36]</sup>

##### **1.5.4.1 Germinação - ensaio de toxicidade aguda**

Este tipo de ensaios avalia os efeitos agudos e imediatos, resultantes da exposição simples, que ainda assim podem ser reversíveis e geralmente têm uma duração de sete dias.<sup>[11]</sup>

No final do ensaio procede-se à contagem do número de sementes germinadas no controlo negativo e nas condições teste. Conta-se também o número de plantas que exibam uma aparência atípica e a as raízes, os caules e as folhas são medidas. Estes dados recolhidos são tratados de forma a determinar: a percentagem de germinação; o comprimento médio de folha, caule e raiz; o índice de germinação; a concentração de efeito não observado (CENO); e a concentração de efeito em 50 % dos organismos (CE<sub>50</sub>).<sup>[33, 34]</sup>

No entanto, o ensaio só será considerado válido se no controlo negativo:

- a percentagem de germinação (% G) for superior a 90 %;

- a percentagem de plantas germinadas que exibam fitotoxicidade e desenvolveram anomalias for inferior a 10 %;
- o comprimento da raiz for superior a 5 mm.<sup>[33, 34, 37]</sup>

A precisão das medições pode influenciar os resultados: o ponto em que se começa a medir o radículo (raiz embrionária) e se este é ou não muito esticado, devem ficar bem definidos e o procedimento deve ser mantido ao longo do teste (figura 1.6).<sup>[36]</sup>

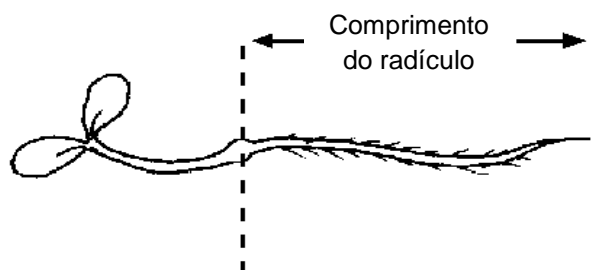


Figura 1.6 - Medição do comprimento da raiz da alfaca.<sup>[36]</sup>

#### 1.5.4.2 Ensaios de toxicidade crónica

Neste tipo de ensaios é feita uma avaliação dos efeitos crónicos, que tanto podem resultar de uma exposição simples a uma dose de substância tóxica, ou de uma exposição prolongada. Os efeitos são duradouros ou permanentes.<sup>[11]</sup>

No final do teste, devem contar-se o número de sementes germinadas; o número de organismos que desenvolveram anomalias; devem medir-se raízes, caules e folhas; e deve determinar-se a massa húmida e seca de raízes, caules e folhas. Com estes dados calcula-se: a percentagem de germinação; o comprimento médio de folha, caule e raiz; a massa de cada órgão da planta (em base seca); o índice de germinação; a CENO; e a concentração letal para 50 % dos organismos (CE<sub>50</sub>).<sup>[33, 34]</sup>

No entanto, o ensaio só será considerado válido se no controlo negativo:

- a percentagem de germinação (% G) for superior a 90 %;
- a percentagem de plantas germinadas que exibam fitotoxicidade e desenvolveram anomalias for inferior a 10 %;
- o comprimento da raiz for superior a 5 mm;
- a massa seca média da raiz deve ser superior a 2,5 mg.<sup>[33, 34, 37]</sup>

## 2. Parte Experimental

### 2.1. Material e equipamento

O solo artificial utilizado nos ensaios de germinação foi seco numa estufa da marca P selecta a uma temperatura de 104 °C. A sua pesagem foi feita numa balança semi-analítica da KERN, modelo EW220-3NW e precisão de 0,01 g. Foi também nesta balança que se pesou o chá usado nos ensaios de descontaminação de solos.

As quantidades de IB necessárias, para fazer as soluções *stock*, foram determinadas numa balança analítica da METTLER TOLEDO, modelo MS205DU e com uma precisão de 0,01 mg. O material de vidro utilizado na preparação das soluções *stock* e nas diluições foi de classe A. Usaram-se também duas micropipetas da marca GILSON, modelo BC64257 (gama 200 a 1000 µL) e modelo Y66016D (gama 1000 A 5000 µL). O pH das soluções foi determinado a partir de um medidor de pH da marca Crison e modelo pH METER GLP 22.

Para preparar uma solução de ácido bórico de concentração 25 g/L também foi usada a balança analítica da METTLER TOLEDO e material de vidro de classe A.

As soluções preparadas foram armazenadas num frigorífico da marca LIEBHERR a uma temperatura de 3 °C. Já o IB foi armazenado num frigorífico da marca SIEMENS a uma temperatura de 5 °C.

As placas de Petri utilizadas eram descartáveis, sem ventilação, com 140 mm de diâmetro e foram adquiridas à empresa VWR International esterilizadas.

Os ensaios de germinação de sementes de alface realizaram-se numa câmara de germinação da BINDER, modelo KBWF 240, que permitiu controlar a temperatura e os ciclos de luz ao longo de cada ensaio. Esta estufa tem capacidade para 16 placas de Petri com o diâmetro das utilizadas (figura 2.1).

A medição de tamanhos de raízes, caules e folhas das alfaces foi efectuada com um paquímetro digital da marca MITUTOYO e modelo 500-182-2 com uma resolução de 0,01 mm.

Para estudar a solubilidade do IB em água foi utilizado o equipamento LC, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão com detecção por matriz de díodos (PAD, SPD-M20 prominence) e fluorescência (FLD, RF-10 AXL). A separação foi efectuada à temperatura ambiente numa coluna cromatográfica C18 Luna (Phenomenex).



**Figura 2.1** - Câmara de germinação da BINDER, modelo KBWF 240.

## 2.2. Reagentes

A água utilizada na preparação de soluções e nos ensaios ecotoxicológicos foi do tipo pura, apresentando uma resistividade  $15,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ .

O ácido bórico usado para preparar a solução do controlo positivo (25 g/L) foi da marca Merck.

Utilizou-se hidróxido de sódio da marca Sigma-Aldrich, com a concentração de 0,01 M, na preparação das soluções stock de IB e nas soluções diluídas.

Foi usado Cloreto de ferro III (0,1 M) da marca Sigma-Aldrich na preparação do reagente de Fenton e na preparação das Nanopartículas de ferro zero valente.

Para a obtenção do reagente de Fenton foi empregue peróxido de hidrogénio a 30 % da Merck numa diluição de dez vezes.

O chá preto usado para a preparação das Nanopartículas de ferro zero valente, foi da marca Tetley.

### **Tóxicos:**

O IB utilizado foi adquirido à Sigma-Aldrich. Prepararam-se soluções stock de concentração aproximada de 1 mg de IB por litro de água, com validade de sete dias.<sup>[13]</sup>

As amostras águas residuais hospitalares foram recolhidas na ETAR de um hospital português, sendo provenientes de três especialidades (maternidade, pediatria e clínica geral) onde são

consumidas grandes quantidades de IB. A amostra de água residual industrial foi recolhida na ETAR de uma indústria farmacêutica.

### 2.2.1 Estudo da solubilidade do Ibuprofeno em água

A determinação da solubilidade do IB em água foi efectuada à temperatura ambiente através do método instrumental de análise *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Foram preparadas várias soluções / suspensões de IB, com concentrações compreendidas entre 0,1 µg/ e 100,2 mg/L de forma a comparar o valor das concentrações preparadas com as concentrações detectadas pelo equipamento.

### 2.3 Caracterização do solo artificial e dos organismos de teste

A escolha do solo artificial e dos organismos de teste encontra-se de acordo com as recomendações da norma EPA 600/3-88/029<sup>[33]</sup>.

Para realizar este estudo utilizou-se um solo artificial do tipo arenoso, que foi cedido pela empresa mineira MIBAL - Minas de Barqueiros S. A. Trata-se de um solo com aproximadamente 90 % de sílica e granulometria compreendida entre 0,5 e 1 mm. O boletim de análise química, mineralógica e granulométrica do solo encontra-se no Anexo A.

Os organismos de teste seleccionados foram as sementes de alface (*Lactuca sativa*) variedade bola de manteiga. Estas foram adquiridas nos armazéns Alípio Dias & Irmão, Lda e as suas características encontram-se descritas no Anexo B.

### 2.4 Ensaios de ecotoxicidade aguda

Os ensaios de ecotoxicidade aguda foram realizados, para avaliar os efeitos causados pelo IB na germinação e no alongamento da raiz da alface, de acordo com da norma EPA 600/3-88-029 (*Protocols for Short term toxicity screening of hazardous waste sites*) - secção A.8.6 "LETTUCE SEED GERMINATION (*Lactuca sativa*)" <sup>[33]</sup> e com o relatório EPS 1/RM/45 (*Biological Test Method: test for measuring emergence and growth of terrestrial plants exposed to contaminants in soil*)<sup>[34]</sup>. Na tabela 2.1 apresentam-se as condições de teste sugeridas pela norma EPA 600/3-88-029.

**Tabela 2.1** - Condições gerais de teste de germinação propostas pela norma da EPA 600/3-88-029.<sup>[33]</sup>

<b>Parâmetro</b>	<b>EPA 600/3-88-029</b>
<b>Tipo de teste</b>	Estático
<b>Temperatura (°C)</b>	24 ± 2
<b>Qualidade de iluminação</b>	Fluorescente
<b>Intensidade da luz (lux)</b>	4300 ± 430
<b>Fotoperíodo</b>	48 h de escuro seguidas de 3 ciclos de 16 h de luz e 8 h de escuro
<b>Recipiente teste</b>	Caixas de Petri (150 mm x 150 mm)
<b>Massa de solo seco (g)</b>	100
<b>Número de sementes/caixa de Petri</b>	40
<b>Volume de solução (mL)</b>	85 % da capacidade de retenção de água do solo
<b>Condições a testar</b>	Controlo negativo e concentrações
<b>Número de réplicas</b>	3
<b>Duração do teste (h)</b>	120
<b>Efeito medido</b>	Germinação

A escolha da norma da EPA teve que ver com o facto de ser muito utilizada em estudos ecotoxicológicos do género e por se considerar apropriada para este trabalho. No entanto, foram feitas as alterações que se consideraram necessárias, sendo elas: número de organismos por caixa, volume de solução, controlo positivo de toxicidade e a disposição das sementes no solo. O controlo positivo com ácido bórico foi efectuado de forma a garantir que as sementes de *Lactuca sativa* não germinavam, havendo assim uma referência de efeito tóxico.

#### **2.4.1 Estudo da capacidade de retenção de água no solo**

Quer no relatório EPS 1/RM/45<sup>[34]</sup>, quer na norma EPA 600/3-88-029<sup>[33]</sup> o volume de água ou tóxico a adicionar deve ser calculado de acordo com a capacidade de retenção de água (CRA), característica de cada solo. Todavia, o relatório vai um pouco mais longe, ao considerar que a percentagem de CRA usada para calcular o volume de solução a adicionar deve variar consoante o tipo de solo. Por esta razão foi seguido o método proposto no referido relatório.

A capacidade de retenção de cada solo de teste deve ser determinada em triplicado. Assim, secaram-se cerca de 100 g de solo, a 105 °C durante 24 h, num cadinho de porcelana. Ao solo seco (ca. 96 g) adicionaram-se 96 mL de água pura misturando-se com uma vareta. Colocou-se um filtro num funil hidratando-se toda a superfície com água. Seguidamente, o filtro hidratado e funil, foram pesados e colocados num balão de Erlenmeyer de 500 mL. Verteu-se então o solo para o filtro e este foi coberto com folha de alumínio. Deixou-se o solo secar

durante 3 h à temperatura ambiente e, no final, o solo, o filtro e o funil foram pesados, obtendo-se a massa do funil, papel de filtro hidratado e solo húmido.

Finalmente, a capacidade de retenção de água para cada amostra, expressa em percentagem de solo seco, foi calculada através da seguinte expressão:

$$CRA = \frac{F - I}{D} \quad (2.1)$$

Onde:

- CRA representa a capacidade de retenção de água (%)
- F refere-se à soma da massa do funil com a massa de papel de filtro hidratado e massa de solo húmido (g)
- I representa a soma das massas do funil, do papel de filtro hidratado e de solo seco (g)
- D representa a massa de solo seco (g)

De seguida calculou-se o teor de humidade do solo (TH) através da expressão:

$$TH = \frac{W - D}{D} * 100 \quad (2.2)$$

Onde W representa a massa húmida de substrato que foi submetida a secagem.

O cálculo do teor de humidade permitiu calcular a percentagem de água a adicionar ao solo ( $P_A$ ) através da seguinte expressão:

$$P_A = \left( CRA * \frac{P_{CRA}}{100} \right) - TH \quad (2.3)$$

Na expressão 2.3,  $P_{CRA}$  representa a percentagem pretendida da capacidade de retenção de água. Utilizando a expressão 1.4 foi determinado o volume de água a adicionar ao solo ( $V_A$ ).

$$V_A = \frac{P_A * M}{100} \quad (2.4)$$

Na expressão anterior a letra M refere-se à massa de solo requerida (expressa em base seca) para realizar os ensaios ecotoxicológicos (100 g).

Segundo o relatório EPS 1/RM/45<sup>[34]</sup> a percentagem óptima de CRA para solos arenosos situa-se entre 45 e 50 %. Calculando  $V_A$  para cada percentagem obtiveram-se 9.96 mL e 11.50 mL,

respectivamente. Contudo, por ser mais fácil de medir e também por se cometer um erro menor, optou-se por usar 10 mL. No entanto, a viabilidade do volume seleccionado foi testada em ensaios preliminares (ponto 2.4.2 Ensaios Preliminares).

Fez-se o cálculo do volume de água a adicionar usando a percentagem de CRA proposta pela norma da EPA<sup>[33]</sup> (85 %) e obtiveram-se 22,35 mL. Este volume foi aproximado a 20 mL e a sua viabilidade também foi testada em ensaios preliminares.

### 2.4.2 Ensaios preliminares de germinação e alongamento de raiz

Os testes preliminares foram realizados com o intuito de otimizar as condições de operação descritas na norma e de obter o melhor rendimento da câmara de germinação. Numa primeira fase testaram-se nove condições possíveis variando o volume e o tipo de água com ou sem arejamento em solo arenoso ou papel de filtro, com o intuito de estudar a viabilidade do ensaio. A tabela 2.2 apresenta todas as condições testadas.

**Tabela 2.2** - Condições do teste preliminar de germinação e alongamento da raiz.

<b>Tipo de teste estático</b>	<b>Solo arenoso</b>	<b>Papel de filtro</b>
<b>Duração do teste (h)</b>	120	120
<b>Temperatura (°C)</b>	24 ± 2	24 ± 2
<b>Tipo de luz</b>	Fluorescente	Fluorescente
<b>Fotoperíodo</b>	48 h de escuro seguidas de 3 ciclos de 16 h de luz e 8 h de escuro	48 h de escuro seguidas de 3 ciclos de 16 h de luz e 8 h de escuro
<b>Massa de solo (g)</b>	100	-
<b>Volume de água (mL)</b>	10 e 20	10 e 5
<b>Tipo de água</b>	Pura e desionizada	Pura e desionizada
<b>Número de sementes/caixa de Petri</b>	20	20
<b>pH do solo</b>	5 – 7	5 – 7
<b>Condições</b>	Controlo negativo	Controlo negativo
<b>Número de réplicas</b>	2 com arejamento e 2 sem arejamento* para 10 mL de água desionizada; 2 sem arejamento para 10 mL de água pura; 2 com arejamento para 20 mL de água desionizada	2 com arejamento e 2 sem arejamento para 5 mL de água desionizada; 2 sem arejamento para 5 mL de água pura; 1 com arejamento e 1 sem arejamento para 10 mL de água desionizada
<b>Efeito medido (%)</b>	Germinação	Germinação

Nota: \* - Caixa selada com parafilme.

Para realizar os testes com solo, este foi seco a 104 °C durante 24 h. Após arrefecimento pesaram-se aproximadamente 100 g para cada caixa de Petri e as superfícies foram uniformizadas com uma espátula.

Fizeram-se 20 furos em cada caixa com o auxílio de um arame e em cada um colocou-se uma semente. Foi colocada uma semente na parte central da caixa de Petri, seis sementes à volta

da primeira e as restantes em torno destas. O arame foi previamente marcado de forma a garantir que todos os furos ficavam à profundidade de duas vezes o diâmetro da semente. As sementes foram então tapadas com a areia circundante.

Mediu-se o volume de água necessário para cada teste e com uma pipeta de Pasteur humedeceu-se a superfície do solo gota a gota. Selaram-se as caixas com parafilme nos ensaios realizados sem arejamento.

No caso dos testes realizados com papel de filtro, colocou-se um disco de papel com cerca de 13 cm de diâmetro em cada caixa de Petri. Com uma pipeta de Pasteur humedeceu-se o papel de filtro com água. Dispuseram-se 20 sementes em cada caixa garantindo que o espaçamento entre elas não fosse inferior a 1 cm e também que não tocassem na extremidade da caixa.

As caixas de Petri foram então colocadas de forma aleatória dentro da câmara de germinação durante 120 h, a uma temperatura de  $24 \pm 2$  °C com 48 h sem luz seguidas de alternância de 16 h de luz e 8 h sem luz. No final registou-se o número de sementes germinadas e calculou-se a % G para cada condição testada.

Numa segunda fase realizaram-se testes à água de forma a obter uma maior % G e um maior alongamento da raiz. Os parâmetros do ensaio encontram-se sistematizados na tabela 2.3 e procedeu-se da mesma forma que nos ensaios anteriores.

**Tabela 2.3** - Condições gerais dos testes à água nos ensaios preliminares de germinação e alongamento da raiz.

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição</b>
<b>Tipo de teste</b>	Estático
<b>Temperatura (°C)</b>	$24 \pm 2$
<b>Qualidade de iluminação</b>	Fluorescente
<b>Intensidade da luz (lux)</b>	$4300 \pm 430$
<b>Fotoperíodo</b>	48 h de escuro seguidas de 3 ciclos de 16 h de luz e 8 h de escuro
<b>Recipiente teste</b>	Caixas de Petri ( $\varnothing = 140$ mm )
<b>Massa de solo seco (g)</b>	100
<b>pH do solo</b>	5 – 7
<b>Número de sementes/caixa de Petri</b>	20
<b>Volume de água (mL)</b>	10
<b>Tipo de água</b>	Água pura; água pura estéril, água desionizada e água desionizada estéril
<b>Número de condições</b>	4 (sem arejamento)
<b>Número de réplicas</b>	3
<b>Duração do teste (h)</b>	120
<b>Efeito medido</b>	Germinação e alongamento da raiz

No final dos ensaios calculou-se a % G e mediram-se as raízes das plantas de forma a calcular a comprimento médio. A água pura e a água desionizada (usada no primeiro ensaio) foram analisadas num laboratório Acreditado. Os boletins de análise encontram-se no Anexo C.

### 2.4.3 Ensaios de ecotoxicidade aguda em solos contaminados por Ibuprofeno

Analisando os resultados obtidos nos ensaios preliminares de germinação e alongamento da raiz concluiu-se que o mais vantajoso seria utilizar água pura e caixas seladas com parafilme. Assim, na tabela 2.4 estão descritos os principais parâmetros seguidos na realização dos ensaios.

**Tabela 2.4** - Condições gerais seleccionadas para os ensaios de ecotoxicidade aguda.

Parâmetro	Condição
Tipo de teste	Estático
Temperatura (°C)	24 ± 2
Qualidade de iluminação	Fluorescente
Intensidade da luz (lux)	4300 ± 430
Fotoperíodo	48 h de escuro seguidas de 3 ciclos de 16 h de luz e 8 h de escuro
Recipiente teste	Caixas de Petri (∅ = 140 mm )
Massa de solo seco (g)	100
pH do solo	5 - 7*
Número de sementes/caixa de Petri	20
Volume de solução (mL)	10
Número de condições	6 (controlo negativo, controlo positivo e 4 concentrações)
Número de réplicas	3
Duração do teste (h)	120
Efeito medido	Germinação e alongamento da raiz

Nota: \* - pH medido com papel indicador universal

O procedimento utilizado na preparação dos ensaios foi igual ao do ponto 2.4.2. Testaram-se concentrações de Ibuprofeno entre 0,1 e 1000 µg/L (0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1000). A gama de concentrações foi seleccionada tendo em conta o limite de solubilidade de IB em água e valores encontrados na bibliografia consultada.<sup>[3, 6, 29]</sup> Cada ensaio foi repetido três vezes e, no final, calcularam-se as percentagens médias de: efeito (E), alongamento da raiz (AR), germinação (G) e índice de germinação (IG).<sup>[2, 34]</sup>

$$E = \frac{\text{n}^\circ \text{ sementes germinadas com tóxico} - \text{n}^\circ \text{ sementes germinadas no controlo negativo}}{\text{n}^\circ \text{ sementes germinadas no controlo negativo}} \times 100 \quad (2.5)$$

$$AR = \frac{\text{comprimento médio raiz com tóxico} - \text{comprimento médio raiz no controlo negativo}}{\text{comprimento médio raiz no controlo negativo}} \times 100 \quad (2.6)$$

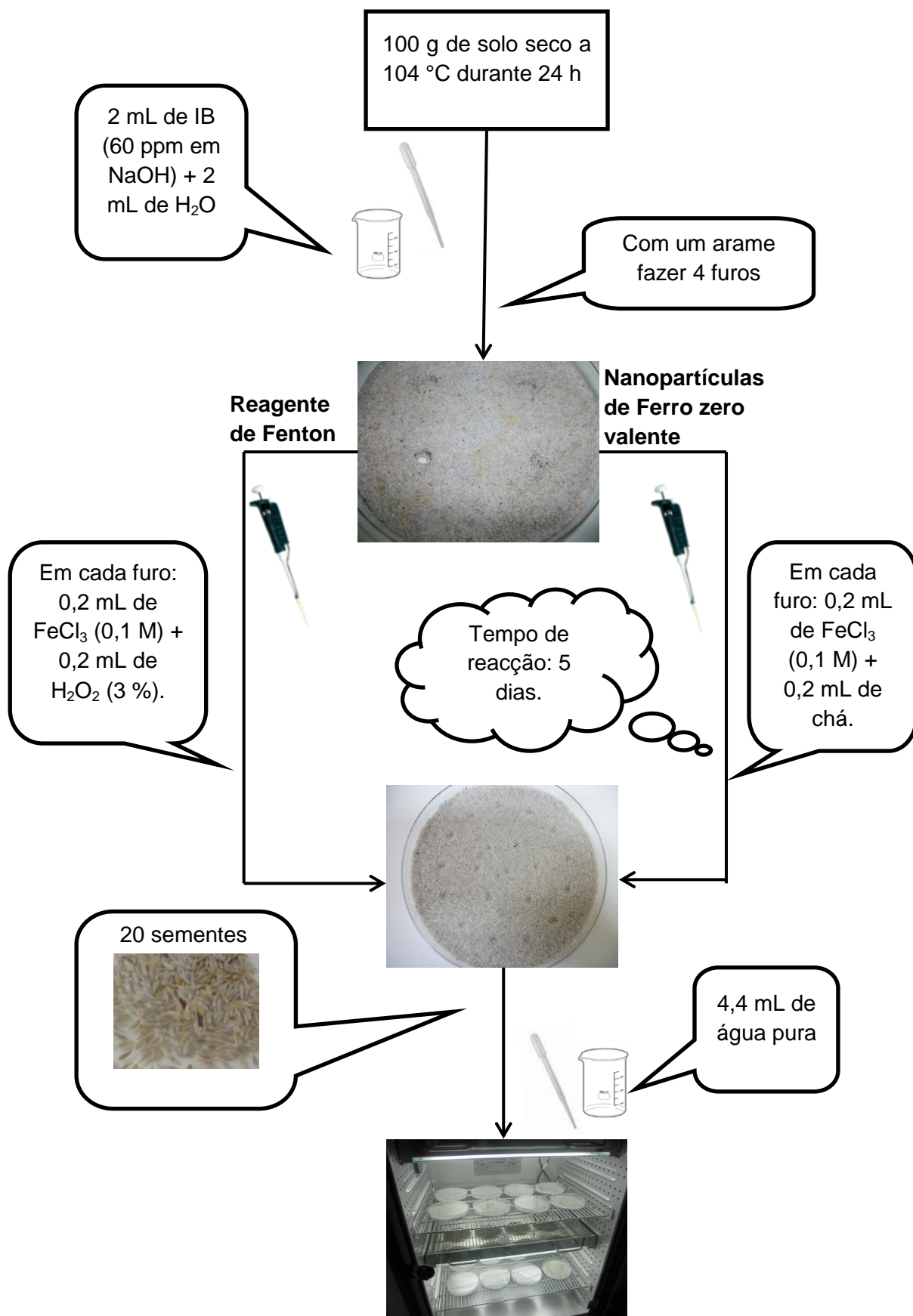
$$G = \frac{\text{n}^\circ \text{ sementes germinadas}}{\text{n}^\circ \text{ sementes total}} \times 100 \quad (2.7)$$

$$IG = \frac{\text{n}^\circ \text{ sementes germinadas com tóxico} * \text{comprimento médio raiz com tóxico}}{\text{n}^\circ \text{ sementes germinadas no controlo} * \text{comprimento médio raiz no controlo}} \times 100 \quad (2.8)$$

O cálculo das incertezas-padrão combinadas foi feito com base no Guia EURACHEM/CITAC<sup>[38]</sup>. A análise estatística foi feita através da folha de cálculo do Excel versão 14.0, do Office 2010. Aplicou-se o teste *t de Student* aos resultados, tomando-se como hipótese nula a não existência de desvios da população relativamente ao controlo negativo para um nível de significância de 0,05.

#### 2.4.4 Ensaios de ecotoxicidade aguda em solos descontaminados

Com o intuito de se avaliar a ecotoxicidade dos tratamentos de descontaminação de solos, reagente de Fenton e Nanopartículas de ferro zero valente, efectuaram-se ensaios de germinação. Os ensaios foram realizados em triplicado e cada bateria de testes foi composta pelo controlo negativo (4 réplicas); o solo contaminado com 60 µg/L de IB dissolvido em NaOH, solo descontaminado por reagente de Fenton e solo descontaminado por Nanopartículas de ferro (usando 3 réplicas para cada uma das referidas condições). O controlo negativo e o solo contaminado com IB dissolvido em hidróxido de sódio foram preparados como descrito em 2.4.3. Na preparação dos ensaios com solos descontaminados seguiu-se o procedimento esquematizado na figura 2.2.



**Figura 2.2** - Procedimento seguido na preparação dos ensaios em solos descontaminados por reagente de Fenton e Nanopartículas de ferro.

O chá preto, usado para produzir Nanopartículas de ferro zero valente foi preparado pesando 0,5 g aos quais se adicionaram 100 mL de água pura em ebulição deixando repousar durante 5 minutos. A produção de Nanopartículas de ferro não é imediata tendo um tempo de reacção de 5 dias.<sup>[39]</sup>

#### **2.4.5 Ensaio de ecotoxicidade aguda em solos contaminados por águas residuais hospitalares**

As águas residuais cuja ecotoxicidade foi estudada foram recolhidas no afluente da ETAR de uma indústria farmacêutica que não produz IB e no afluente da ETAR de três unidades de um hospital português: maternidade, pediatria e clínica geral. A amostragem foi realizada pelos técnicos das respectivas ETAR tendo seguido os procedimentos descritos na norma ISO 5667-10: 1992<sup>[40]</sup>. A determinação das concentrações de IB presente em cada amostra foi realizada por técnica HPLC à temperatura ambiente.<sup>[41]</sup>

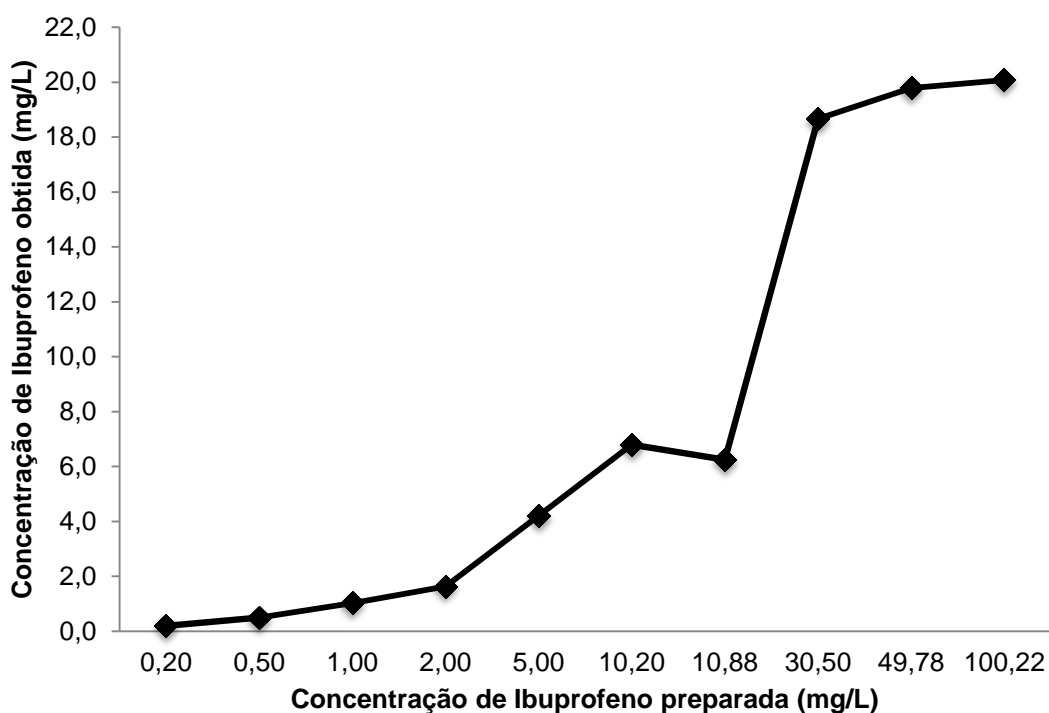
Os ensaios de ecotoxicidade aguda foram preparados seguindo o procedimento indicado nos pontos 2.4.2 e 2.4.3.



### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Estudo da solubilidade do Ibuprofeno

O IB é solúvel em soluções aquosas diluídas de hidróxidos alcalinos e de carbonatos, e também em alguns solventes orgânicos, como: a acetona, o álcool etílico, o éter, o diclorometano e o clorofórmio.<sup>[41]</sup> Relativamente à solubilidade do IB em água, não existem dados na bibliografia. Assim, tornou-se necessário efectuar o estudo do limite de solubilidade do IB em água, de forma a seleccionar a gama de concentrações a usar nos ensaios de ecotoxicidade aguda de solos contaminados (figura 3.1). Os dados referentes ao estudo encontram-se no Anexo D.



**Figura 3.1** - Estudo da solubilidade do Ibuprofeno em água por HPLC (à temperatura ambiente).

De 0,0001 mg/L a 0,2 mg/L o IB encontrava-se abaixo do limite de detecção (LOD = 0,0050 µg de IB por litro de solução). De 0,2 a 1 mg/L as concentrações determinadas apresentavam quantidades concordantes com as preparadas. Acima de 1 mg/L verifica-se que as quantidades detectadas são inferiores àquelas que realmente se preparam, sendo essa diferença mais acentuada a partir de 30,5 mg/L. Atendendo aos resultados obtidos neste estudo pode concluir-se que o limite de solubilidade do IB em água é de 1 mg.

### 3.2 Ensaio de ecotoxicidade aguda

#### 3.2.1 Estudo da capacidade de retenção de água

Através do procedimento descrito no ponto 2.4.1 e da equação 2.1 foi possível calcular a capacidade de retenção de água no solo escolhido para realizar os testes ecotoxicológicos. Tratando-se de um solo arenoso e por isso com elevada porosidade e rápida infiltração de água foi obtido um valor médio de CRA de 30,9 %.

Partindo das percentagens otimizadas de CRA recomendadas pela norma da EPA 600/3-88-029<sup>[33]</sup> e pelo relatório EPS 1/RM/45<sup>[34]</sup> calculou-se o volume de água a usar para cada percentagem de tendo-se obtido o valor de 20 mL e 10 mL, respectivamente. Estes volumes foram testados em ensaios preliminares de germinação e alongamento, cujos resultados obtidos se apresentam no ponto 3.2.2.

#### 3.2.2 Ensaio preliminares de germinação e alongamento de raiz

Tal como já foi referido em 2.4.2 os ensaios de germinação e alongamento de raiz foram realizados no sentido de obter uma % G e um comprimento da raiz otimizado.

Nos primeiros ensaios avaliou-se a % G em solos e em papel de filtro. Para isso, variaram-se os seguintes parâmetros: volume de água, tipo de água e arejamento. A tabela 3.1 apresenta os resultados médios obtidos de % G para cada condição testada.

**Tabela 3.1** - Percentagem média de germinação obtida em cada condição testada.

	Tipo de água	Volume (mL)	Parafilme	% G
<b>Solo</b>	desionizada	20	não	80,0
	desionizada	10	não	65,0
	desionizada	10	sim	87,5
	pura	10	sim	97,5
<b>Papel de filtro</b>	desionizada	10	não	90,0
	desionizada	10	sim	100,0
	desionizada	5	não	82,5
	desionizada	5	sim	97,5
	pura	5	sim	100,0

A norma 600/3-88-029 da EPA indica que os ensaios ecotoxicológicos só podem ser considerados viáveis quando nos controlos negativos a % G for superior a 90.<sup>[33]</sup> Analisando a tabela anterior conclui-se que nos ensaios com solos, essa % G foi atingida quando se usaram: 10 mL de água pura e 10 mL de água desionizada ambos sem arejamento. Os ensaios realizados com papel de filtro foram realizados para garantir que a germinação das sementes independente do tipo de solo. Para estas condições verificou-se que a % G foi inferior a 90 % para 5 mL de água desionizada com arejamento.

Testada a viabilidade do ensaio passou-se ao teste de análise do tipo de água. O solo foi humedecido com 10 mL de água, as caixas foram seladas com parafilme e variou-se o tipo de água: desionizada, desionizada estéril, pura e pura estéril. Os resultados obtidos para a % G e alongamento da raiz são apresentados na tabela que se segue, onde *n* corresponde ao número de ensaios viáveis obtidos para cada condição.

**Tabela 3.2** - Percentagem de germinação e comprimento médio da raiz obtidos com os vários tipos de água.

<b>Tipo de Água</b>	<b>% G</b>	<b>Comprimento médio da raiz (mm)</b>
<b>Pura</b>	92,5 ( <i>n</i> =2)	13,60
<b>Pura estéril</b>	60,0 ( <i>n</i> =0)	-
<b>Desionizada</b>	41,7 ( <i>n</i> =0)	-
<b>Desionizada estéril</b>	100 ( <i>n</i> =1)	10,58

Nota: *n* corresponde ao número de ensaios viáveis

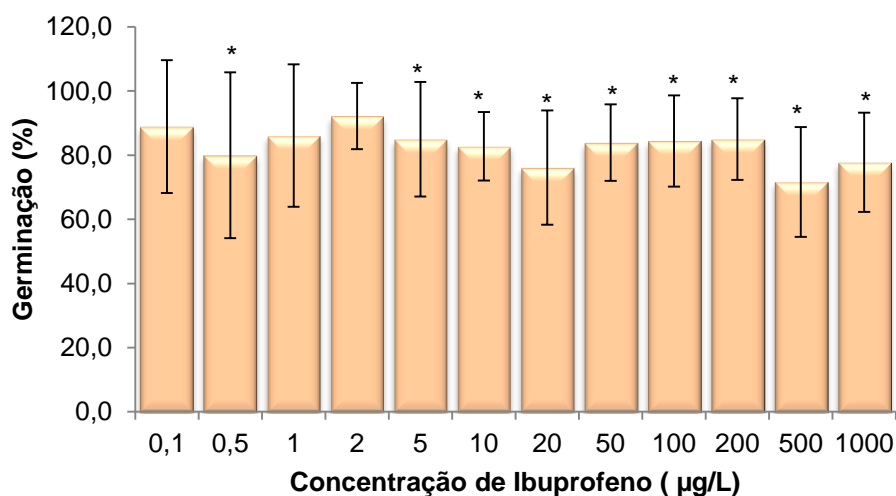
Verifica-se que tanto para a água pura estéril como para a água desionizada não se obteve uma % G viável em nenhuma das réplicas. A % G mais elevada foi obtida nos ensaios realizados com água desionizada estéril, contudo só uma das três réplicas foi viável. Nos ensaios realizados com água pura a % G média das duas réplicas viáveis foi de 92,5.

Em relação ao comprimento médio da raiz, este foi maior nos ensaios realizados com água pura (13,60 mm) do que nos realizados com água desionizada estéril (10,58 mm). Para os outros dois tipos de água (pura estéril e desionizada), como não se obteve uma % G  $\geq 90$  não se fizeram as medições dos comprimentos das raízes das plantas.

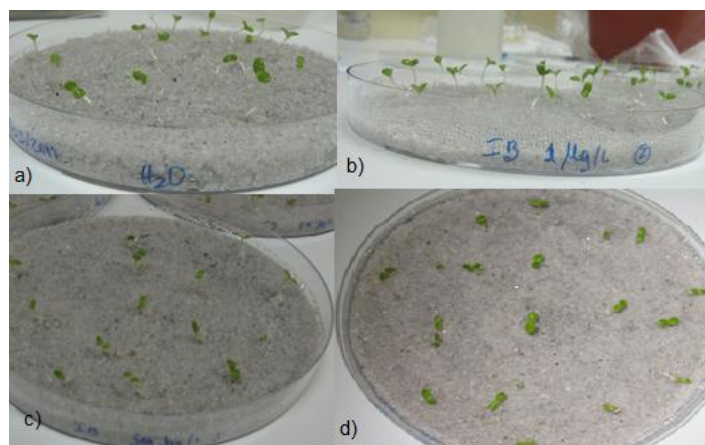
Assim, tendo em conta o número de réplicas viáveis, a % G média e o comprimento médio da raiz, seleccionou-se a água de qualidade pura para realizar os controlos negativos nos ensaios de ecotoxicidade em solos contaminados.

### 3.2.3 Ensaio de ecotoxicidade aguda em solos contaminados por Ibuprofeno

Nas figuras 3.2 - 3.5 são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade realizados em solos contaminados por IB. Tal como já foi referido anteriormente, testaram-se concentrações deste fármaco entre 0,1 e 1000 µg/L. A figura 3.2 ilustra a variação da % G das sementes de *Lactuca sativa* nos solos contaminados com IB relativamente à % G obtida no controlo negativo ( $95,4 \pm 4,6\%$ ). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas da % G nos solos contaminados com 0,1, 1 e 2 µg/L de IB. Para as restantes ocorreu uma redução da germinação entre 10,9 e 24,9 %.

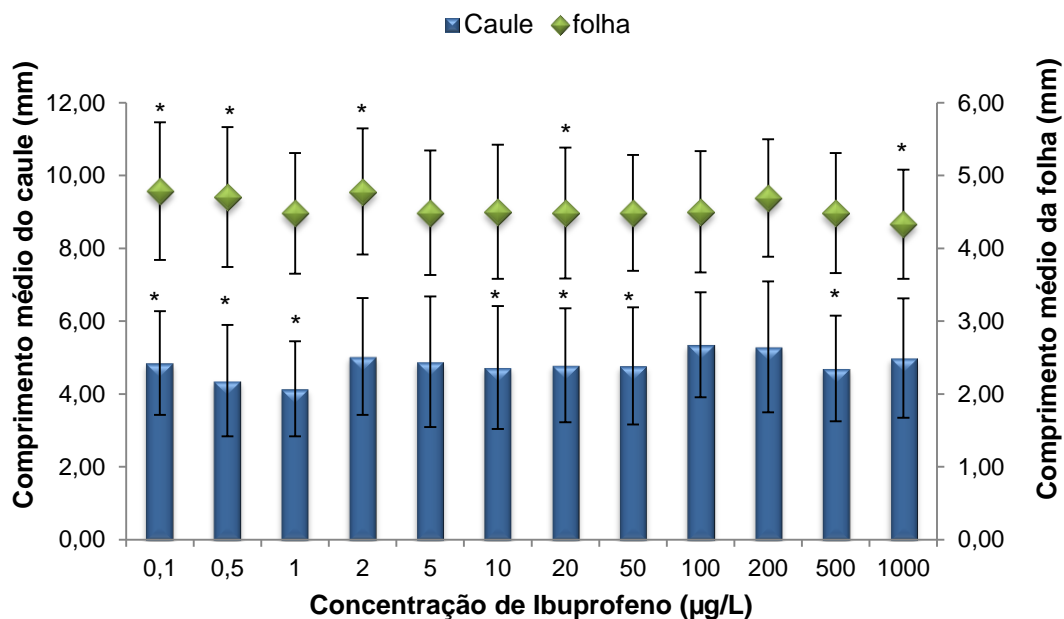


**Figura 3.2** - Percentagem de germinação obtida nos ensaios ecotoxicológicos de solos contaminados com IB. A água foi usada como controlo negativo não estando representado na figura ( $\% G = 95,4 \pm 4,6\%$ ). \* indica diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo ( $p \leq 0,05$ ).

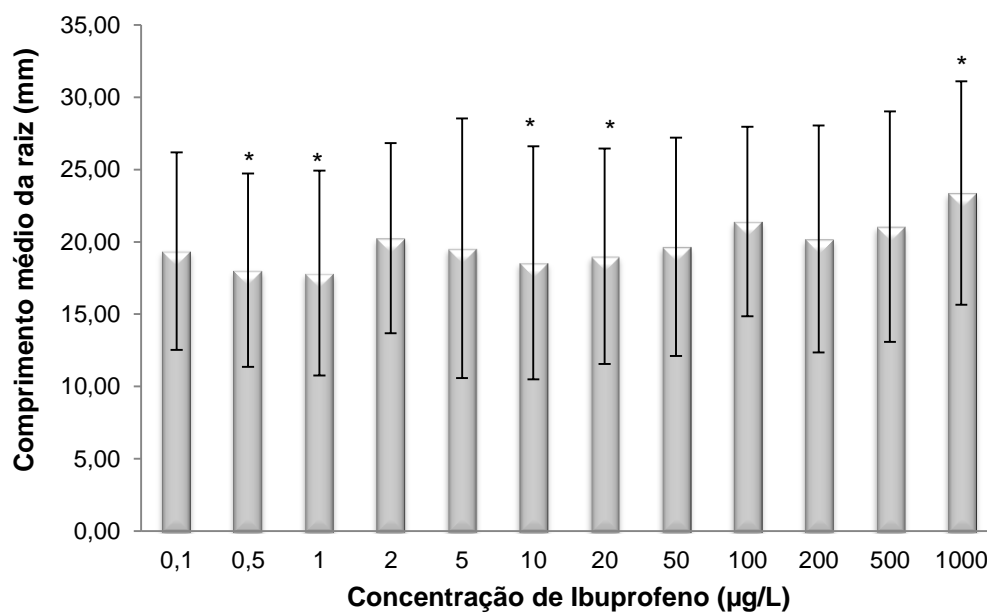


**Figura 3.3** - (a) Sementes germinadas no controlo negativo; (b) Sementes germinadas em solo contaminado com 0,1 µg/L de IB; (c) Sementes germinadas em solo contaminado com 500 µg/L de IB; (d) Sementes germinadas em solo contaminado com 1000 µg/L de IB.

A figura 3.4 apresenta as variações obtidas nos comprimentos dos órgãos das plantas de *Lactuca sativa* (folha, caule e raiz) em relação aos comprimentos do controlo negativo



a)



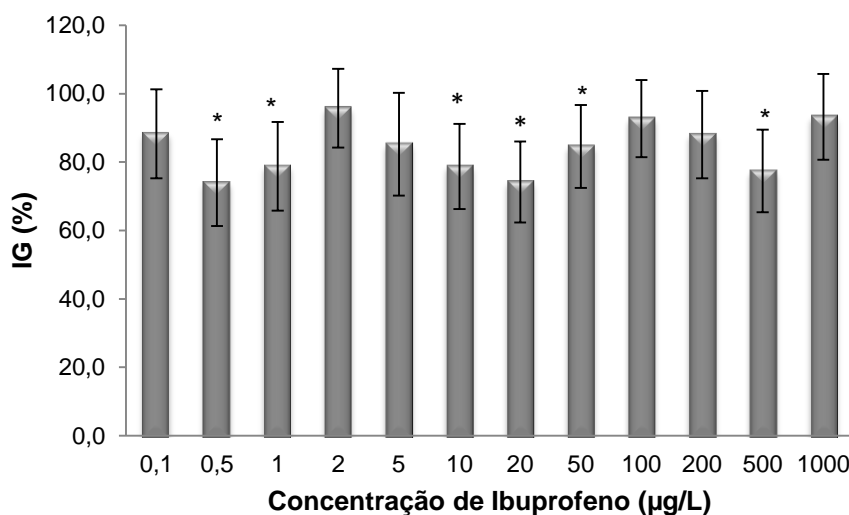
b)

**Figura 3.4** - Comprimentos médios dos órgãos das plantas de *Lactuca sativa* na gama de concentrações testada. (a) ◆ Comprimento médio da folha e ■ comprimento médio do caule. (b) Comprimento médio da raiz. \* indica que existe diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao controlo negativo.

Para a folha verifica-se que não existem diferenças de comprimentos médios ( $p \leq 0,05$ ) entre as plantas dos solos contaminados com: 1; 5; 10; 50; 100; 200 e 500 µg/L de IB e as

plantas do controlo negativo ( $4,53 \pm 0,80$  mm). Em relação ao comprimento médio do caule não existe uma diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os obtidos nos solos contaminados com 2; 5; 100; 200 e 1000  $\mu\text{g/L}$  de IB e os do controlo negativo ( $5,14 \pm 1,67$  mm). No que diz respeito ao comprimento médio da raiz, (figura 3.4 b) nos solos contaminados com 0,5, 1, 10 e 20  $\mu\text{g/L}$  ocorreu uma redução entre 4,33 e 12,7 %, relativamente ao comprimento médio do controlo negativo ( $20,44 \pm 7,06$  mm). Já no solo contaminado com 1000  $\mu\text{g/L}$  ocorreu uma indução do crescimento médio da raiz de cerca de 14,4 %. Nas restantes concentrações de IB a variação do comprimento médio da raiz não é diferente da variação do comprimento médio do controlo negativo, para um nível de significância de 0,05.

Quanto ao IG, representado no gráfico da figura 3.5, para as concentrações de 0,1, 2, 5 100, 200 e 1000  $\mu\text{g/L}$ , não se observam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo ( $p \leq 0,05$ ) não havendo, portanto, indícios de fitotoxicidade.



**Figura 3.5** - Percentagem de IG das sementes de alface nos solos contaminados com de IB. A água foi usada como controlo negativo não estando representada na figura (% IG do controlo negativo = 100 %). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p \leq 0,05$ ).

Assim, face aos resultados obtidos com o fármaco, observa-se que o solo contaminado com 0,5  $\mu\text{g/L}$  e 20  $\mu\text{g/L}$  de IB provoca inibição da germinação e inibição do crescimento da *Lactuca sativa*. Para a concentração de 1000  $\mu\text{g/L}$  existe uma diminuição do número de sementes germinadas, todavia para as que germinam há uma indução do crescimento da raiz. Apenas para as concentrações de 0,5 e 20  $\mu\text{g/L}$  de IB é que se verificam diferenças estatisticamente significativas para todos os parâmetros analisados (tabela 3.3).

Provavelmente a gama de concentrações testada encontra-se no limiar ecotóxico, o que justifica a alternância de efeito observada e a variabilidade dos resultados obtidos.

**Tabela 3.3** - Variação dos parâmetros analisados nos solos contaminados com IB em relação ao controlo negativo.

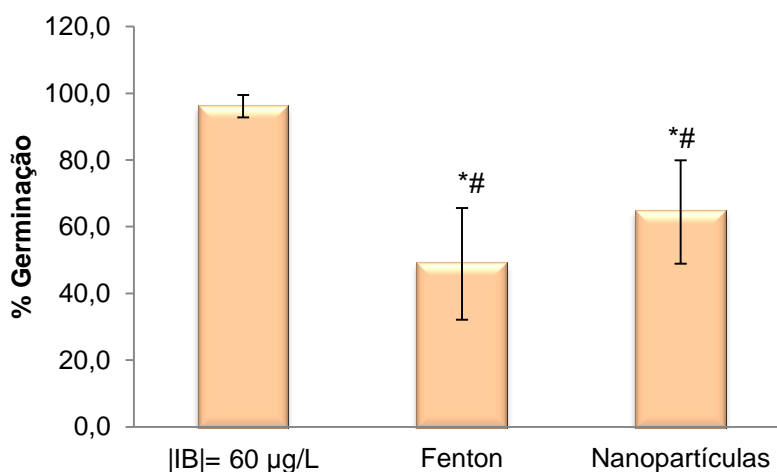
IB  (µg/L)	0,1	0,5	1	2	5	10	20	50	100	200	500	1000
G (%)	-	*	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*
Folha (mm)	*	*	-	*	-	-	*	*	-	-	-	*
Caule (mm)	*	*	*	-	-	*	*	*	-	*	*	-
Raiz (mm)	-	*	*	-	-	*	*	-	-	-	-	*
IG (%)	-	*	*	-	-	*	*	*	-	-	*	-

Nota: (-) não se verifica diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo.

(\*) verifica-se diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo.

### 3.2.4 Ensaio de ecotoxicidade aguda em solos descontaminados

De seguida serão apresentados os resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade aguda em solos contaminados com uma concentração inicial de IB de 60 µg/L e, posteriormente descontaminados por dois processos de oxidação química: reagente de Fenton e Nanopartículas de ferro zero valente. A concentração de IB usada para contaminar os 100 g de solo teste foi determinada tendo por base um estudo realizado por Pinto em 2011<sup>[39]</sup>. A variação da % G obtida nas condições testadas é apresentada na figura 3.6.

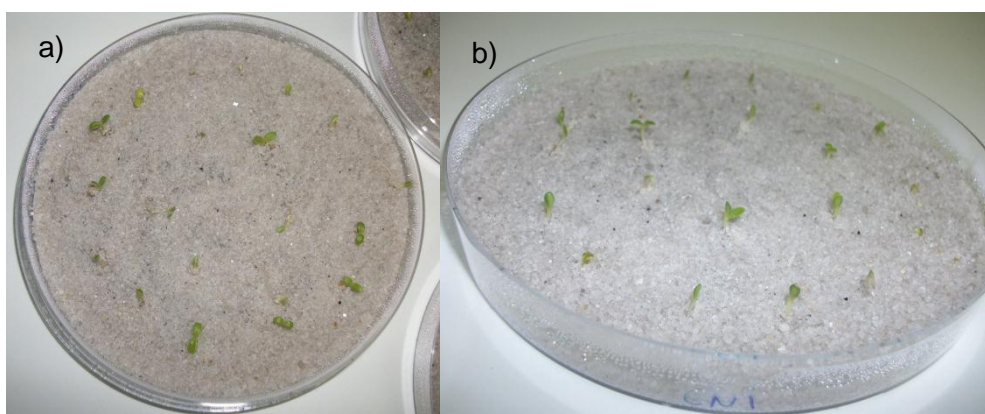


**Figura 3.6** - Percentagem de germinação obtida nos ensaios ecotoxicológicos em solos contaminados com IB (60 µg/L) e posteriormente descontaminados com o reagente de Fenton e com Nanopartículas de ferro. A água foi usada como controlo negativo não estando representado na figura (% G = 95,0 ± 4,1 %). \*, # indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo e a 60 µg/L de IB dissolvido em NaOH, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

### CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

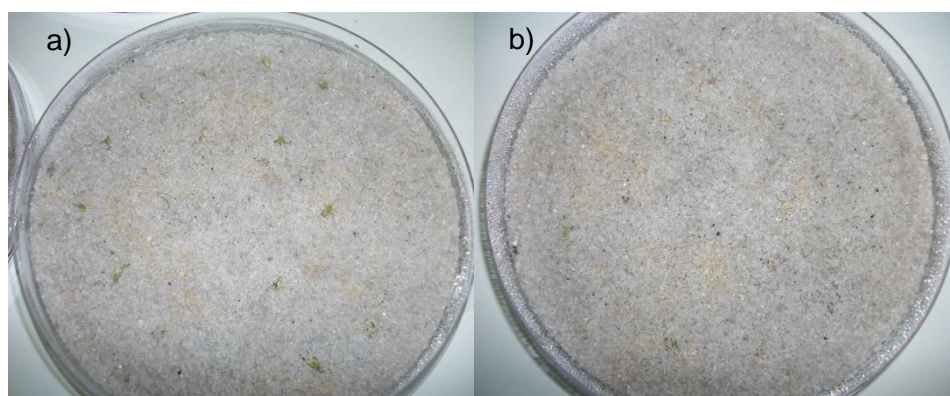
Verificou-se que a % G obtida para 60 µg/L de IB dissolvido em hidróxido não é estatisticamente diferente da % G do controlo negativo ( $95,0 \pm 4,1$  %), para uma significância de 0,05. A % G obtida com o reagente de Fenton e com as Nanopartículas de ferro sofreu uma redução, relativamente ao controlo negativo, de 48,5 e 32,2 %, respectivamente.

A figura 3.7 mostra as diferenças no número de germinações de *Lactuca sativa* entre solo contaminado com IB dissolvido em hidróxido e o controlo negativo (60 µg/L).



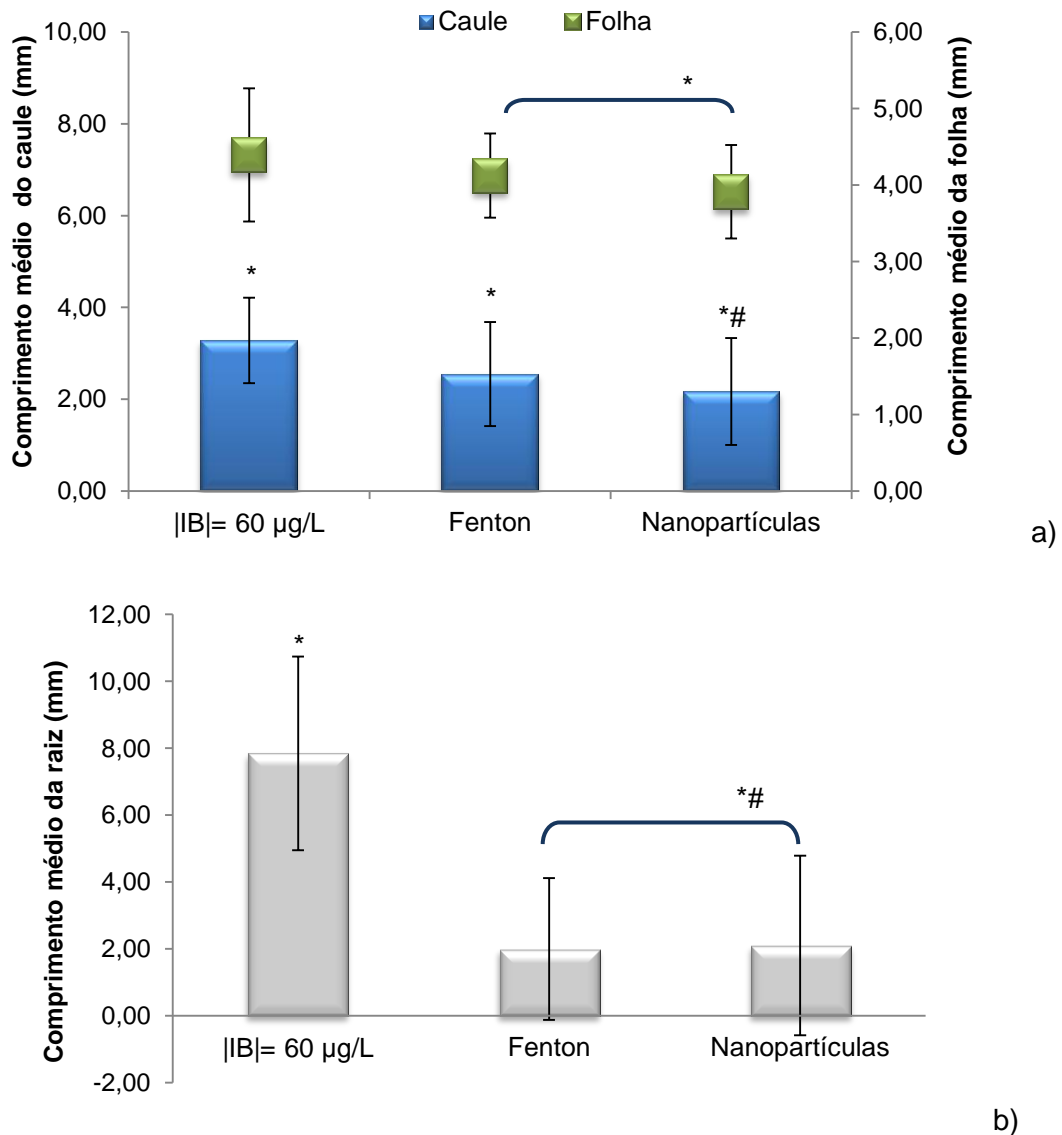
**Figura 3.7** - (a) Sementes germinadas com IB dissolvido em NaOH; (b) Sementes germinadas no controlo negativo.

A figura 3.8 mostra as diferenças observadas no número de germinações do solo descontaminado por Nanopartículas de ferro zero valente e por reagente de Fenton.



**Figura 3.8** - (a) Sementes germinadas em solo descontaminado pelo tratamento com Nanopartículas de ferro; (b) Sementes germinadas em solo descontaminado pelo reagente de Fenton.

Na figura 3.9 são apresentadas as variações obtidas nos comprimentos dos órgãos das plantas de *Lactuca sativa* (folha, caule e raiz) em relação aos comprimentos do controlo negativo.



**Figura 3.9** - Comprimentos médios dos órgãos das plantas de *Lactuca sativa*. (a) ◆ Comprimento médio da folha e ■ comprimento médio do caule. (b) Comprimento médio da raiz. \*, # indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo e a 60 µg/L de IB dissolvido em NaOH, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

No caso do comprimento médio da folha não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as plantas do solo contaminado com IB relativamente ao controlo negativo no ( $4,48 \pm 1,03$  mm), como se pode ver na figura 3.9 a). Para o caule, (figura 3.9 a), observa-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o comprimento médio do caule das plantas obtidas nas três condições testadas e o

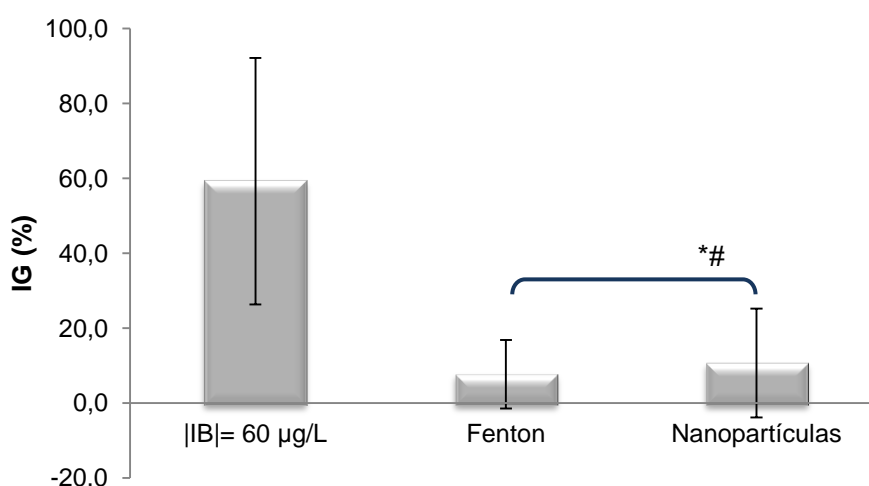
comprimento médio do controlo negativo ( $3,98 \pm 1,55$  mm). No que diz respeito ao comprimento médio da raiz (figura 3.9 b) todas as condições apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo ( $13,40 \pm 5,51$  mm), tendo a raiz sofrido uma redução entre 44,2 e 85,8 %. Os comprimentos médios da raiz dos dois processos de descontaminação não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p \leq 0,05$ ).

A medição dos órgãos das plantas que se desenvolveram em solo descontaminado foi mais difícil, na medida em que, por vezes, os limites do caule e da raiz não eram tão bem definidos como nos restantes ensaios, como se pode observar na figura 3.10. Em ambos os casos, havia alfaces com raízes queimadas ou praticamente inexistentes.



**Figura 3.10** - (a) Alfices desenvolvidas em solo descontaminado por reagente de Fenton; (b) Alfices desenvolvidas em solo descontaminado com Nanopartículas de ferro.

Quanto ao IG, representado na figura 3.11, verifica-se que há uma diferença estatisticamente significativa deste entre o solo descontaminado por ambos os processos e o que se obteve no controlo negativo (100 %).

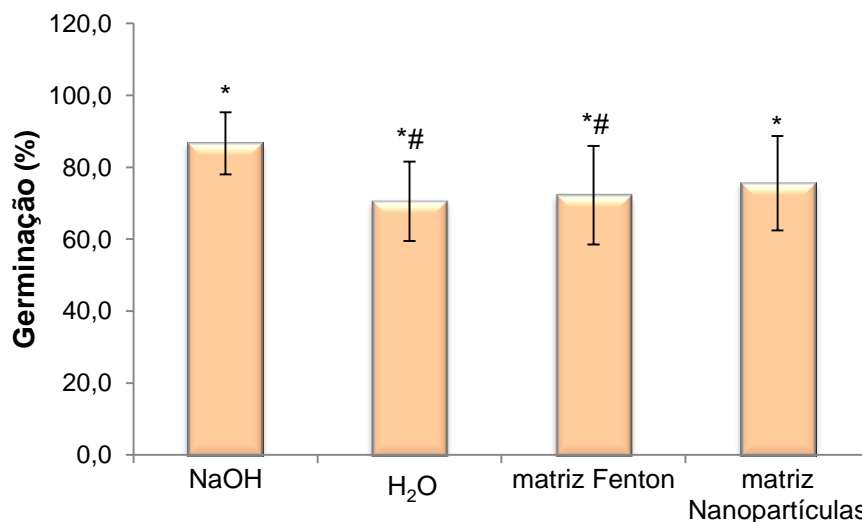


**Figura 3.11** - Índices de germinação (%) das sementes desenvolvidas em solo contaminado e descontaminado relativamente ao % IG do controlo negativo (100%). \*, # indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo e a 60 µg/L de IB, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

Assim, face aos resultados obtidos pode-se dizer que embora no solo contaminado com 60 µg/L de IB dissolvido em hidróxido de sódio não se verifique uma diminuição do número de sementes germinadas o comprimento médio da raiz das plantas que germinam sofreu uma redução em relação ao do controlo negativo. No solo descontaminado com os dois tratamentos houve uma redução no número de germinações e no comprimento médio da raiz, indiciando efeito tóxico. Tal como era de esperar, a maior redução do IG ocorreu no solo descontaminado, uma vez que este parâmetro depende do número médio de germinações e do comprimento médio da raiz, valores que também foram mais reduzidos nos dois processos de descontaminação.

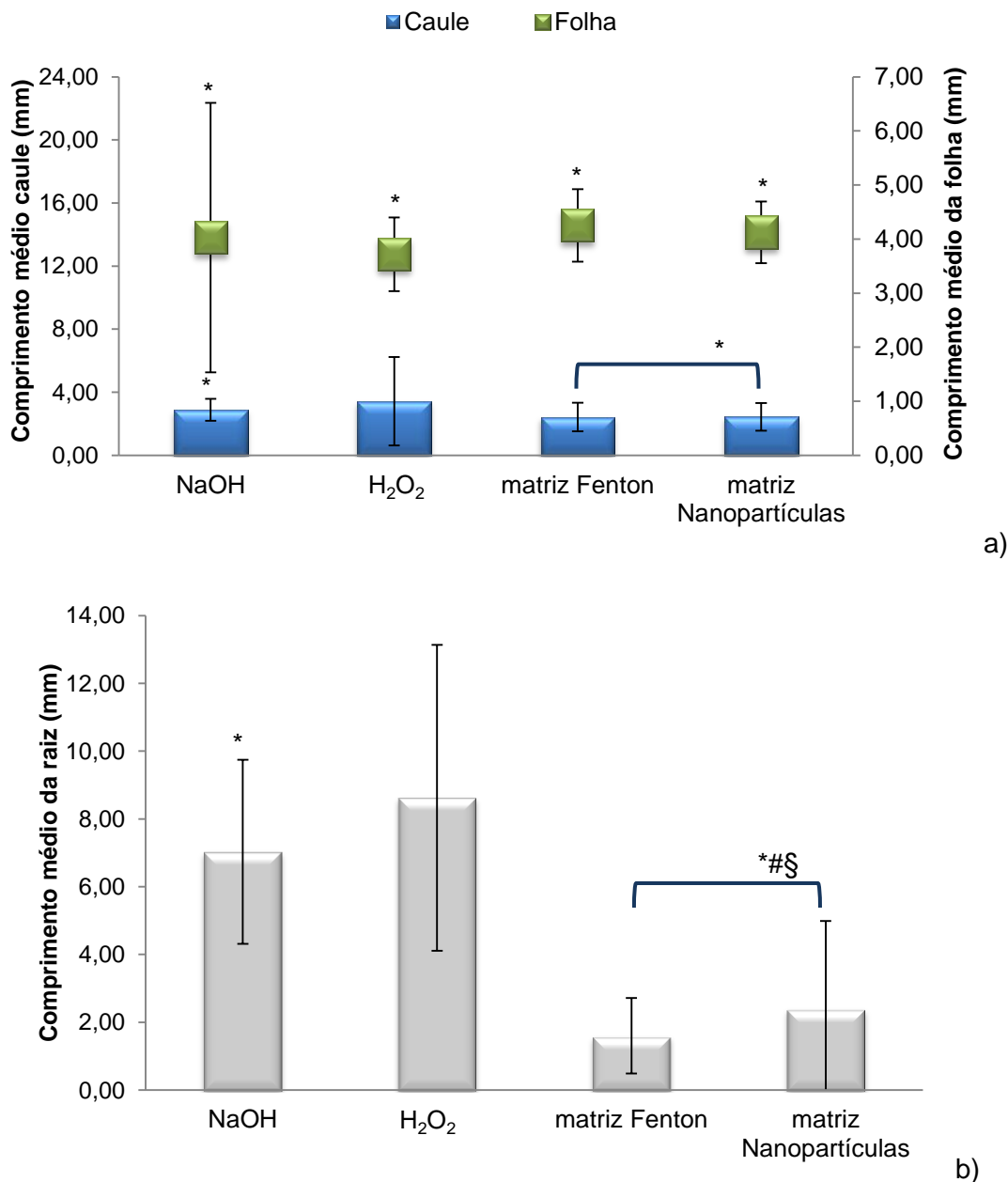
Na tentativa de descobrir a qual das substâncias da matriz dos processos de descontaminação se devia o efeito tóxico causado, realizaram-se ensaios de ecotoxicidade sem IB. As condições a testar passaram a ser o controlo negativo e solo contaminado com: peróxido de hidrogénio (3 %), hidróxido de sódio (0,01 M), matriz do reagente de Fenton e matriz das Nanopartículas de ferro zero valente. As figuras 3.12 - 3.22 apresentam os resultados obtidos nestes ensaios.

Para a % G (figura 3.12) observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre todas as condições testadas e o controlo negativo ( $95,0 \pm 4,1$  %). A % G obtida para o solo contaminado com NaOH e matriz de Nanopartículas não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. O mesmo acontece com a % G obtida para o solo contaminado com:  $H_2O_2$ , matriz de reagente de Fenton e matriz de Nanopartículas.



**Figura 3.12** - Percentagem média de germinação obtida nos ensaios ecotoxicológicos. A água foi usada como controlo negativo não estando representada na figura (% G=  $95,0 \pm 4,1$  %). \*, # indicam diferenças estatisticamente significativas da % G em relação ao controlo negativo e ao solo contaminado com NaOH, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

A figura que se segue ilustra os resultados obtidos para os comprimentos médios dos órgãos das plantas de *Lactuca sativa* em relação aos comprimentos médios obtidos no controlo negativo.

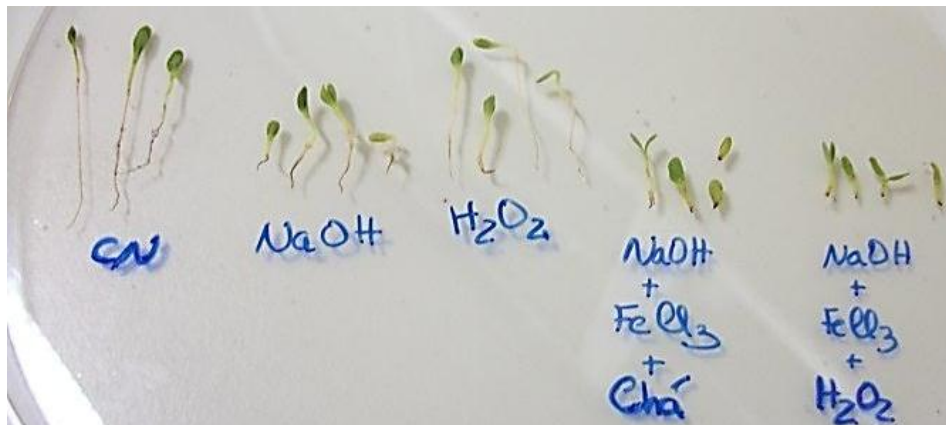


**Figura 3.13** - Comprimentos médios dos órgãos das plantas de *Lactuca sativa* obtidos nos ensaios ecotoxicológicos. (a) ◆ Comprimento médio da folha e ■ comprimento médio do caule. (b) Comprimento médio da raiz. \*, #, § indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo, a NaOH e a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

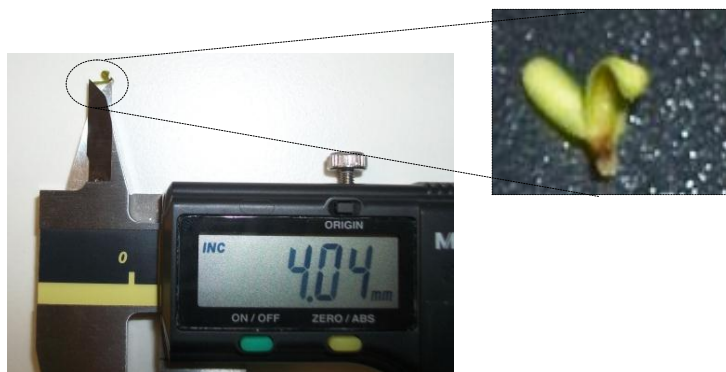
Relativamente ao comprimento médio da folha, ilustrado na figura 3.13 a, pode dizer-se todas as condições apresentam diferenças estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao controlo negativo ( $4,68 \pm 1,03$  mm), sendo que as folhas das plantas do solo

contaminado com NaOH sofreram até uma indução de crescimento. Os comprimentos médios das folhas obtidas nas restantes situações não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. Para o caule (figura 3.13 a), pode dizer-se que apenas as plantas que se desenvolveram em solo contendo  $H_2O_2$  não apresentam diferenças estatisticamente significativas do comprimento médio em relação ao valor obtido no controlo negativo ( $3,98 \pm 1,55$  mm). No caso do comprimento médio da raiz (figura 3.13 b), só para o solo contaminado com  $H_2O_2$  não se observa uma diferença entre o comprimento obtido e o do controlo negativo, para uma significância de 0,05. Nas restantes condições o comprimento médio da raiz sofreu uma redução, sendo esta de 50,0 % no solo contaminado com NaOH e de 88,6 e 83,0 % no solo contaminado com matriz de reagente de Fenton e matriz de Nanopartículas de ferro, respectivamente.

As diferenças de tamanho e aspecto das plantas obtidas, nos diferentes meios, são apresentadas na figura 3.14. Neste ensaios, tal como nos anteriores, houve dificuldades na medição dos órgãos das plantas, neste caso particular, naquelas que se desenvolveram em solo com matriz de Fenton e Nanopartículas de ferro (figura 3.15). Em ambos os casos, havia alfices com raízes queimadas ou praticamente inexistentes.

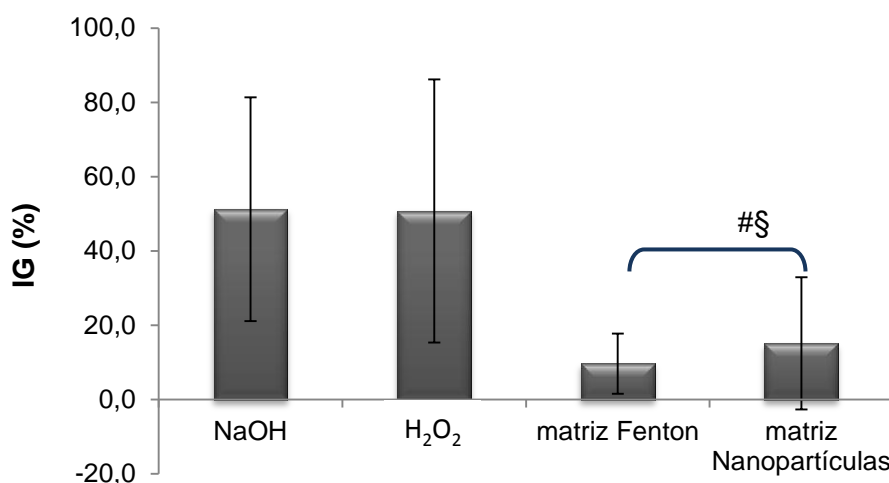


**Figura 3.14** - Diferença de tamanhos das plantas das várias condições testadas. “CN” refere-se ao controlo negativo. Por “NaOH +  $FeCl_3$  + chá” entenda-se matriz de Nanopartículas de ferro e por “NaOH +  $FeCl_3$  +  $H_2O_2$ ” entenda-se matriz do reagente de Fenton.



**Figura 3.15** - Planta germinada em solo contaminado por Nanopartículas de ferro zero valente.

A percentagem de IG que se obteve está ilustrada na figura 3.16. Os índices mais baixos foram obtidos nos solos contaminados com matriz de reagente de Fenton e Nanopartículas de ferro zero valente, que não apresentem diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p \leq 0,05$ ).



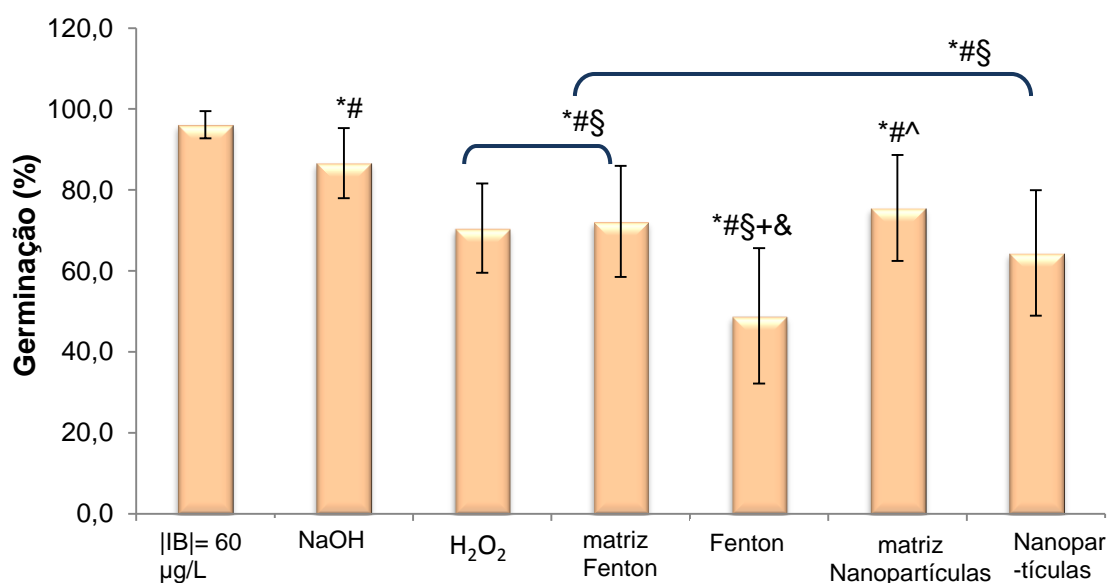
**Figura 3.16** - Índice de germinação (%) obtido para as condições testadas relativamente ao IG do controlo negativo (100%). #, § assinalam diferenças estatisticamente significativas relativamente a NaOH e a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

Pode-se então dizer que ocorreu uma diminuição da % G das sementes de *Lactuca sativa* nos quatro meios. Porém, esta diminuição é menos acentuada no solo contaminado com NaOH, embora se tenha verificado uma inibição do crescimento da raiz nas plantas obtidas neste solo. Inibição que também foi observada no solo contaminado quer com a matriz de reagente de Fenton quer com a matriz de Nanopartículas. Contudo, nestes dois últimos não

ocorreu apenas uma inibição do crescimento da raiz, mas sim uma inibição generalizada no crescimento da planta, como aliás está ilustrado na figura 3.14. Desta forma, também para estes dois tratamentos o IG foi o mais baixo.

Interessa agora estabelecer a comparação entre os resultados obtidos nos ensaios de descontaminação de solos e os resultados obtidos com as matrizes dos processos de descontaminação. Comparação que será feita nas figuras que se seguem.

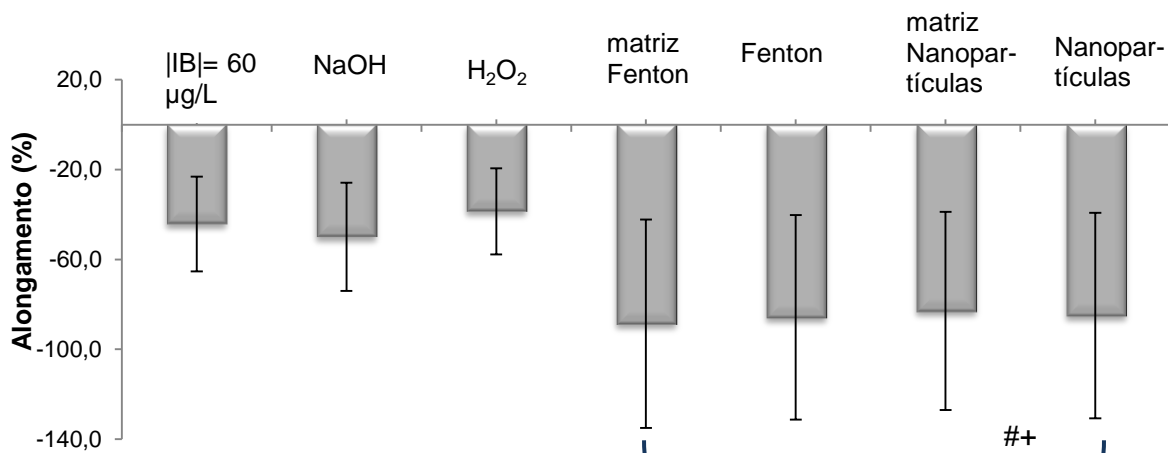
Quanto à % G, ilustrada na figura 3.17, verifica-se que apenas a obtida em solo contaminado por IB dissolvido não apresenta diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo negativo. Da análise do gráfico da figura 3.17 também se conclui que as percentagens de germinação obtidas nos solos contendo  $H_2O_2$ , matriz de reagente de Fenton, matriz de Nanopartículas e Nanopartículas não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si. A maior inibição da % de G ocorreu no solo descontaminado por reagente de Fenton, sendo de 48,5.



**Figura 3.17** - Percentagem média de germinação obtida nos ensaios ecotoxicológicos com solos descontaminados. A água foi usada como controlo negativo, não estando apresentada na figura (% G= 95,0 ± 4,1 %). \*, #, §, +, &, ^ indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo, ao solo contaminado com IB, NaOH,  $H_2O_2$ , matriz de reagente de Fenton e reagente de Fenton, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

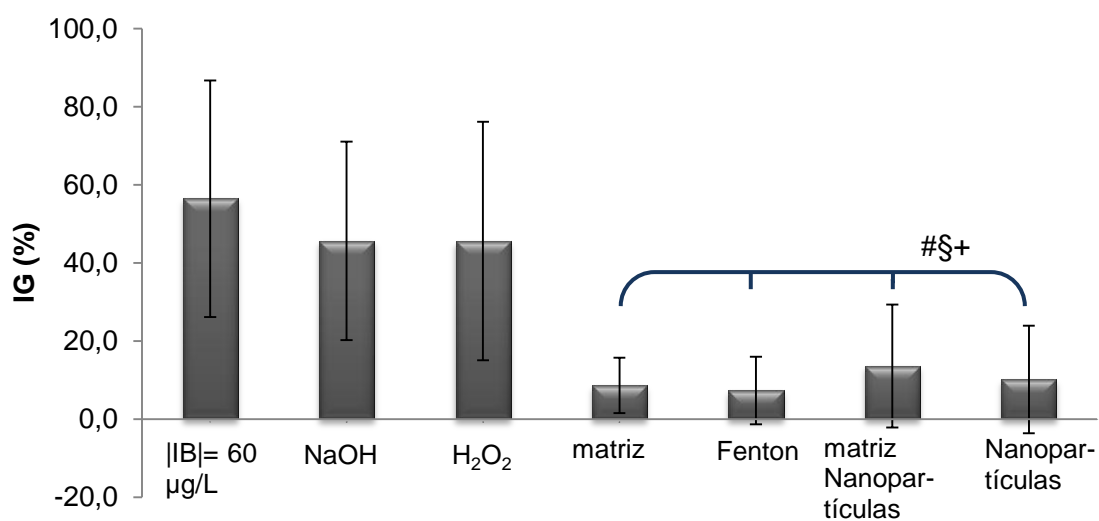
A percentagem de efeito no alongamento da raiz é apresentada na figura 3.18, onde percentagens negativas indicam ocorrência de inibição do crescimento da raiz em relação ao controlo negativo (cujo efeito se considera ser de 0 %). Verifica-se que houve uma

diminuição estatisticamente significativa do comprimento médio nas sete condições testadas, sendo mais acentuada nos solos descontaminados e respectivas matrizes. Entre estas quatro condições não existe uma diferença estatisticamente significativa na redução do comprimento médio da raiz, que foi superior a 80,0 %.



**Figura 3.18** - Percentagem de alongamento da raiz obtida, considerando que no controlo negativo o AL foi de 0 %. #, + indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao solo contaminado com IB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

Na figura seguinte (figura 3.19) são apresentados os resultados obtidos para a % de IG. Verifica-se que para a matriz de Fenton, o reagente de Fenton, a matriz de Nanopartículas e as Nanopartículas o IG obtido é estatisticamente diferente e consideravelmente mais baixo do que IG obtido no solo contaminado com IB.



**Figura 3.19** - Percentagem do índice de germinação obtido em função das várias condições de ensaio. #, §, + indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao solo contaminado com IB, NaOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

Assim, pode dizer-se que apesar do IB dissolvido em hidróxido não provocar efeitos estatisticamente significativos no número de germinações, o comprimento médio das plantas que germinam é inferior ao do controlo negativo, o que indica que a solução provoca efeito tóxico (tabela 3.4). O comprimento da raiz das plantas germinadas no solo contaminado por NaOH não é estatisticamente diferente do comprimento médio das que cresceram em solo contaminado com IB. Nos restantes casos há diminuição do número de germinações, sendo o efeito mais acentuado no tratamento com reagente de Fenton, seguido pelo tratamento com Nanopartículas. Em ambos a percentagem de germinação obtida é inferior à da matriz correspondente, o que poderá indicar que a associação IB-matriz aumenta os efeitos tóxicos. Para estas quatro situações obtiveram-se as maiores percentagens de inibição do crescimento da raiz, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre si ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 3.4** - Resumo de todos os parâmetros analisados nos ensaios com solos descontaminados em relação ao controlo negativo.

	IB 60 µg/L(NaOH)	NaOH (0,01M)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)	Matriz Fenton	Fenton	Matriz Nanopartículas	Nanopartículas
G (%)	-	*	*	*	*	*	*
Folha	-	-	*	*	*	*	*
Caule	*	-	-	*	*	*	*
Raiz	*	*	-	*	*	*	*
IG(%)	-	-	-	*	*	*	*

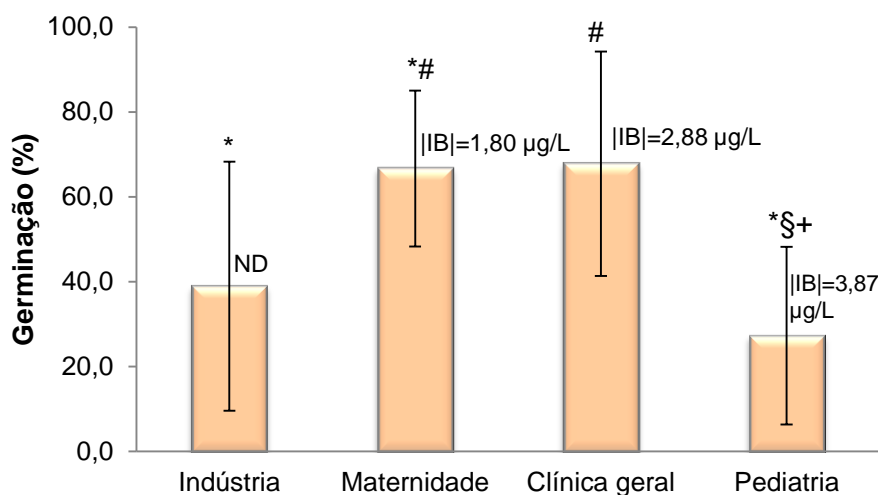
Nota: (-) não se verifica diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo.  
(\* ) verifica-se diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo.

### 3.2.5 Ensaio de ecotoxicidade aguda em solos contaminados por águas residuais hospitalares

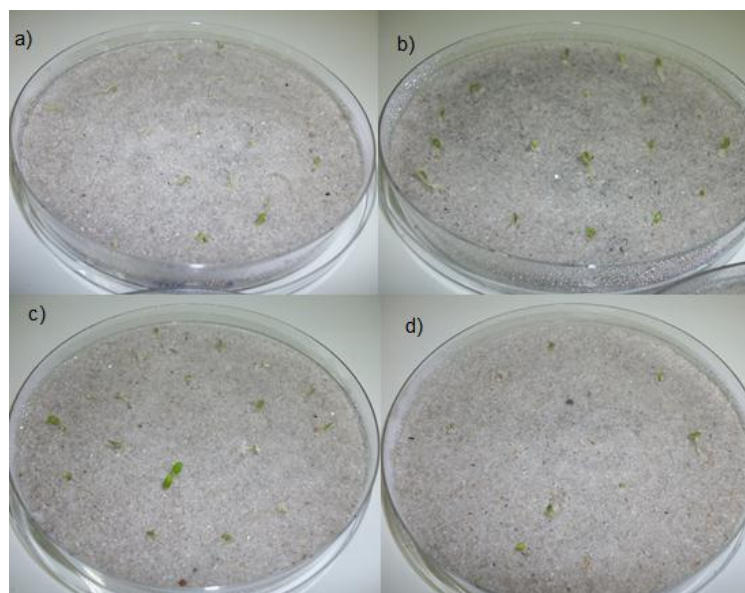
Nesta secção serão apresentados os resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade aguda em solos contaminados por águas residuais hospitalares. Como foi referido em 2.4.5 a concentração de IB presente em cada água residual foi determinada por técnica de HPLC, não tendo sido detectado na água de origem industrial. Quanto às águas residuais de origem hospitalar obtiveram-se concentrações de IB de 1,80, 2,88 e 3,87 µg/L para a maternidade, clínica geral e pediatria, respectivamente.<sup>[41]</sup>

A figura 3.20 ilustra a variação da % G das sementes nos solos contaminados por águas residuais. Não se verificam diferenças estatisticamente significativas da % G nos solos

contaminados com ARH de clínica geral em relação à % G do controlo negativo ( $98,3 \pm 2,9$  %). Na figura 3.21 podem-se observar as diferenças no número de germinações de *Lactuca sativa* entre as várias águas residuais.

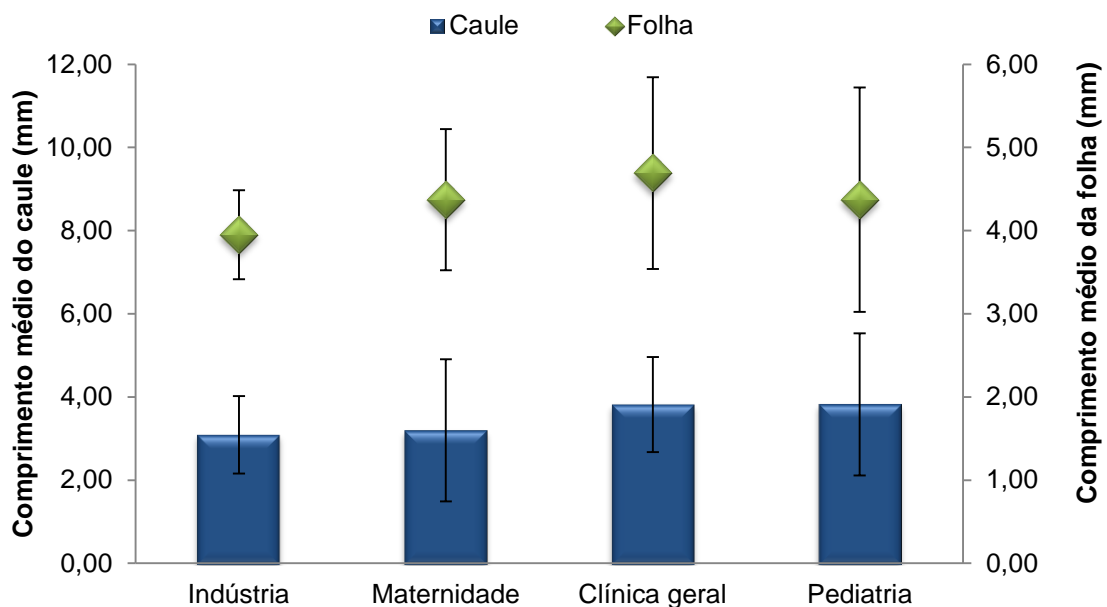


**Figura 3.20** - Percentagem de germinação obtida nos ensaios ecotoxicológicos de solos contaminados por águas residuais de origem hospitalar e industrial. A água foi usada como controlo negativo não estando representada na figura ( $\% G = 98,3 \pm 2,9$  %). \*, #, §, + indicam diferenças estatisticamente significativas da % G em relação à obtida no controlo negativo, ao solo contaminado com ARI, ARH da maternidade e ARH da clínica geral, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

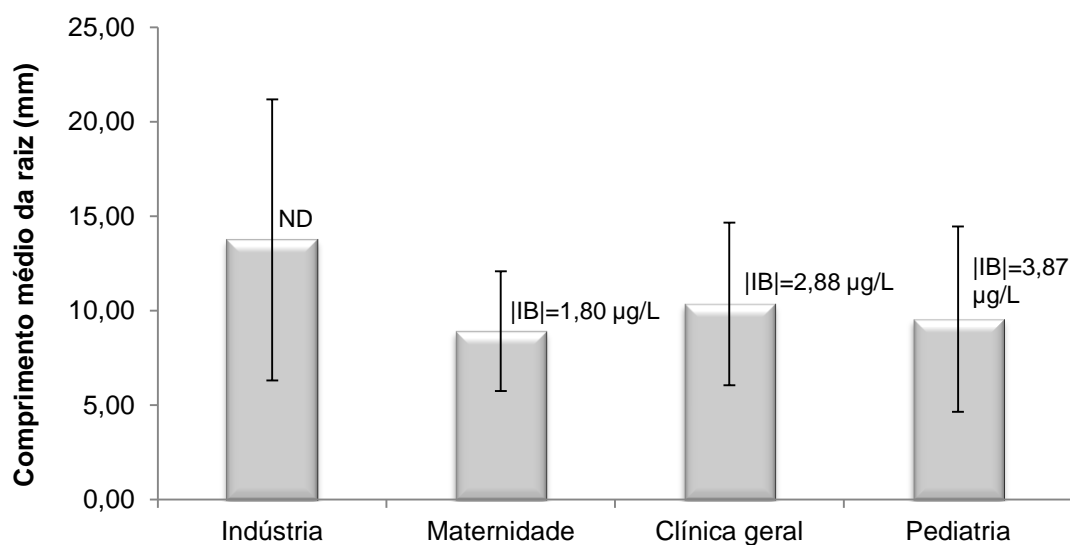


**Figura 3.21** - a) Sementes germinadas em solo contaminado com ARI; b) Sementes germinadas em solo contaminado com ARH da maternidade; c) Sementes germinadas em solo contaminado com ARH da clínica geral; d) Sementes germinadas em solo contaminado com ARH da pediatria.

Na figura 3.22 está representada a variação dos comprimentos médios dos órgãos das plantas (folha, caule e raiz) em relação aos comprimentos médios dos órgãos obtidos no controlo negativo. Não se verificam diferenças estatisticamente significativas quer em relação ao controlo negativo quer entre águas residuais ( $p \leq 0,05$ ).



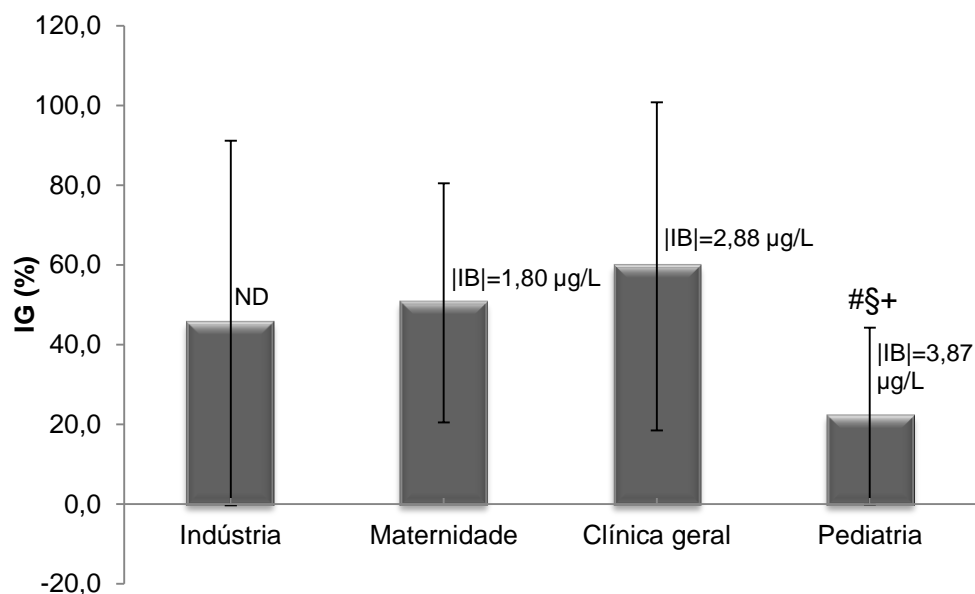
a)



b)

**Figura 3.22** - Comprimentos médios dos órgãos das plantas de *Lactuca sativa* (a) ◆ Comprimento médio da folha e ■ comprimento médio do caule em relação aos valores obtidos no controlo negativo ( $4,33 \pm 0,54$  mm e  $3,46 \pm 1,07$  mm, respectivamente). (b) Comprimento médio da raiz relativamente ao valor do controlo negativo ( $11,96 \pm 4,63$  mm).

Quanto ao IG, ilustrado no gráfico da figura 3.23, o menor foi obtido para a ARH da pediatria, sendo estatisticamente diferente das restantes que não diferem entre si ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 3.23** - Percentagem de índice de germinação de *Lactuca sativa* em solos contaminados com águas, considerando % IG do controlo negativo de 100 %. #, §, + indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao solo contaminado com ARI, ARH da maternidade e ARH da clínica geral, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ).

Pode dizer-se que a ARH da pediatria provoca uma inibição da % G da *Lactuca sativa*. Os comprimentos médios dos órgãos obtidos nos solos contaminados não apresentam diferenças estatisticamente significativas dos obtidos no controlo negativo. Apenas para a ARH da clínica geral não se verificam diferenças estatisticamente significativas para todos os parâmetros analisados (tabela 3.5). Comparando os resultados obtidos nestes ensaios com os dos solos contaminados com 1, 2 e 5 µg/L de IB (ponto 3.2.3) não se verifica nenhuma relação entre a concentração e os efeitos observados nos vários parâmetros analisados.

**Tabela 3.5** - Resumo dos parâmetros analisados nos ensaios realizados com águas residuais em relação ao controlo negativo.

	Indústria	IB =1 µg/L	Maternidade ( IB =1,80 µg/L)	IB =2 µg/L	Clínica geral ( IB =2,88 µg/L)	Pediatria ( IB =3,87 µg/L)	IB =5 µg/L
<b>G (%)</b>	*	-	*	-	-	*	*
<b>Folha (mm)</b>	-	-	-	*	-	-	-
<b>Caule (mm)</b>	-	*	-	-	-	-	-
<b>Raiz (mm)</b>	-	*	-	-	-	-	-
<b>IG (%)</b>	-	*	-	-	-	*	-

Nota: (-) não se verifica diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo.  
(\*) observa-se diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo.

#### 4. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

Embora se tenha verificado uma redução do número de sementes germinadas e do comprimento médio da planta no solo contaminado com 0,5 e 20 µg/L de IB e uma redução da germinação acompanhada por uma indução de crescimento da raiz no solo contaminado com 1000 µg/L de IB não se pode dizer que, nas condições testadas, exista uma tendência de toxicidade que afecte o desenvolvimento da espécie *Lactuca sativa*. A bibliografia relativa à contaminação de solos com IB é reduzida. No entanto, em 2007 Gielen<sup>[1]</sup> realizou um estudo onde concluiu que para concentrações de IB inferiores a 160 mg/L ocorre estimulação do crescimento da raiz, situando-se o efeito máximo nos 40 mg/L.

No caso dos ensaios ecotoxicológicos em solos que foram descontaminação pode dizer-se que a % G obtida com IB dissolvido em NaOH não é diferente da observada para o controlo negativo, contudo o comprimento médio da raiz das plantas que germinaram sofreu uma redução. Comparando a % G obtida com IB (dissolvido em NaOH) com a do NaOH, verifica-se que a % G diminui na segunda condição, no entanto os comprimentos médios das raízes não apresentam diferenças estatisticamente significativas. No solo contaminado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorreu uma inibição da germinação das sementes de *Lactuca sativa* em relação ao solo contaminado com NaOH. Porém, no caso do comprimento médio da raiz não se verificou diferença estatisticamente significativa. Assim, de acordo com os resultados obtidos para o IG dos solos contaminados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NaOH o contaminante que provoca maior efeito tóxico é o NaOH.

Face aos resultados obtidos para os processos de descontaminação de solos testados, pode concluir-se que ambos provocam efeitos tóxicos na % G e inibem o crescimento do organismo teste. Comparando as matrizes dos tratamentos com os tratamentos, verifica-se que se a % G é mais reduzida nestes últimos e a inibição do crescimento da raiz não apresenta diferenças estatisticamente significativas. Em qualquer uma das condições anteriores, o efeito tóxico provocado é superior ao observado quando se testa isoladamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou NaOH, provavelmente devido a efeitos sinérgicos ou aditivos entre compostos. Se do ponto de vista químico, estes tratamentos de descontaminação são eficientes, havendo remoção do fármaco, do ponto de vista ecológico essa remoção tem repercussões na germinação e desenvolvimento das sementes de *Lactuca sativa*.

Em relação aos solos contaminados com águas residuais pode-se dizer que apenas a % G obtida para a ARH da clínica geral, não apresenta diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. Verifica-se que a maior inibição da germinação foi observada com a

ARH da pediatria. Para o comprimento médio da plantas germinadas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo negativo. No entanto, enquanto para a ARI ocorreu uma indução do crescimento da raiz, para as ARH houve uma inibição do crescimento da raiz. De acordo o IG apenas a ARH da pediatria provoca efeito tóxico, visto apresentar um valor diferente do obtido no controlo negativo, para uma significância de 0,05.

Sugere-se a realização destes estudos ecotoxicológicos noutra(s) tipo(s) de solo, usando o mesmo organismo de teste ou outros, como por exemplo o pepino (*Cucumis sativus*) ou anelídeos, tal como a *Eisenia andrei*, de forma averiguar se se mantém a tendência dos resultados obtidos. A realização de um teste multiespécie também seria interessante, na medida em que poderia avaliar a interação entre espécies na presença do contaminante. Estudar os efeitos provocados no solo por misturas de fármacos é também uma sugestão para trabalho futuro, uma vez que é o cenário que mais se aproxima daquele que é encontrado no meio ambiente.

**Bibliografia**

- [1] Gielen GLHP, 2007. *The fate and effects of sewage-derived pharmaceuticals in soil*. Tese de Doutorado. University of Canterbury.
- [2] Lallana, MC, Elizalde, JH, Billard, CE e Lallana, VH, 2008. Bioensayo de germinación de *Lactuca sativa* (L.): determinación de calidad de agua en represas para riego. *FCA UNCuyo*, XL(1): 29-38.
- [3] Santos, LHMLM, Araújo, AN, Fachini, A, Pena, A, Delerue-Matos, C e Montenegro, MCBSM, 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175:45-95.
- [4] Madureira, TV, Barreiro JC, Rocha, MJ, Rocha, E, Cass, QB e Tiritan, ME, 2010. Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in Douro River estuary (Portugal). *Science Of The Total Environment*, 408:5513-5520.
- [5] Halling-Sørensen, B, Nielsen, SN, Lanzky, PF, Ingerslev, F, Lützhølf, HCH e Jørgensen, SE, 1997. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment - A Review. *Chemosphere*, 36(2): 357 - 393.
- [6] Jørgensen, SE e Halling-Sørensen, B, 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere*, 40: 691 - 699.
- [7] Baird, C e Cann M, 2008. *Environmental Chemistry*. New York: W. H. Feeman and Company. ISBN 978-0716731535.
- [8] Goudie A, 2000. *The human impact on the natural environment*. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 0-631-19978-0.
- [9] Pepper, IL, Gerba, CP e Brusseau, ML, 1996. *Pollution Science*. San Diego: California, Academic Press. ISBN 0-12-550660-0.
- [10] Crane, M e Byrns, G, 2002. Review of ecotoxicological and biological test methods for the assessment of contaminated land. R & D Technical Report P3000, ISBN 1857058496 (versão em PDF do documento descarregada a 27 de Julho de 2011.).
- [11] Connell ,DW e Miller, GJ, 1984. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-86249-5.
- [12] Kuster, M, Alda, MJL, Hernando, MD, Petrovic, M, Martin-Alonso, J e Barceló, D, 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides

## BIBLIOGRAFIA

in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*, 358:112-123.

[13] Flaherty, CM e Dodson SI, 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, 61: 200 - 207.

[14] Ruhoy, IS e Daughton, CG, 2008. Beyond the medicine cabinet: an analysis of where and why medications accumulate. *Environment International*, 34:1157-1169.

[15] Fent, k, Weston, AA e Caminada, D, 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76: 122 - 159.

[16] INFARMED, Mercado total e mercado de medicamentos genéricos, Ministério da Saúde, 2011 (versão em PDF do documento descarregada em 3 de Novembro de 2011).

[17] INFARMED, Vendas de medicamentos não sujeitos a receita médica fora das farmácias (MNSRM), Ministério da Saúde, 2011 (versão em PDF do documento descarregada em 3 de Novembro de 2011).

[18] Ali, I, Singh, P, Aboul-Enein, HY e Sharma, B, 2009. Chiral Analysis of Ibuprofen Residues in Water and Sediments. *Analytical Letters*, 42 (12): 1747 – 176.

[19] INFARMED, Prontuário Terapêutico, Ministério da Saúde, 2010 (versão em PDF do documento descarregada em 19 de Abril de 2011).

[20] Loureiro, S, Soares, AMVM e Nogueira, AJA, 2005. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution*, 138:121-131.

[21] Cunningham, Cunningham, 2006. *Principles of Environmental Science: Inquiry and Applications*. McGraw Hill. ISBN-10:0071115749.

[22] Bound, JP e Voulvoulis, N, 2006. Predicted and measured concentration for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. *Water Research*, 40: 2885 – 2892.

[23] Debska, J, Kot-Wasik, A e Namiesnik, J, 2005. The termination of nonsteroidal antiinflammatory drugs in water samples using liquid chromatography coupled with diode-array detector and mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 28:2419-2426.

[24] Farré, M, Petrovic e M, Barceló, D, 2007. Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDS in water samples. *Anal Bioanal Chem*, 387: 1203 - 1214.

[25] VALORMED, "VALORMED", 2011. HYPERLINK "<http://www.valormed.pt/>" (acedido em 30 de Outubro de 2011).

[26] Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, Directiva 2004/35/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 21 de Abril de 2004, Relativa à responsabilidade ambiental em termos de prevenção e reparação de danos ambientais, Jornal Oficial da União Europeia, 2004 (versão em PDF do documento descarregada em 3 de Novembro de 2011).

[27] CESE, Parecer do Comité Económico e Social Europeu sobre a Proposta de Directiva do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece um quadro para a protecção do solo e altera a Directiva 2004/35/CE, Jornal oficial da União Europeia, 2007. 2007/C 168/05. (Versão em PDF do documento descarregada em 3 de Novembro de 2011).

[28] Direcção Geral de Ordenamento do Território e Desenvolvimento Urbano, "Nova Lei dos Solos", 2010. HYPERLINK "<http://novaleidosolo.dgotdu.pt/Paginas/default.aspx>" (acedido em 2 de Novembro de 2011).

[29] Stuer-Lauridsen, F, Birkued, M, Hansen, LP, Lützhølf, HCH e Halling-Sørensen, B, 2008. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere*, 40:783-793.

[30] Hughes, WW, 1996. *Essentials of Environmental Toxicology: The Effects of Environmentally Hazardous Substances on Humana Health*. Washington DC: Taylor & Francis. ISBN 1-56032-469-4.

[31] Landis, WG e Yu, MH, 1995. *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*. Florida, Lewis Publisher. ISBN 0-87371-515-2.

[32] Laboratório de Tecnologias Cognitivas, Núcleo de Tecnologia Educacional para a Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, "Toxicologia aplicada", 2006. HYPERLINK "<http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mlil.fase3.htm>" (acedido em 8 de Novembro de 2011).

[33] US EPA, 1996. Protocols for shor term toxicity screening of hazardous waste sites. EPA 600/3-88/029.

[34] Environment Canada, 2005. Biological Test Method: Test for measuring emergence and growth of terrestrial plants exposed to contaminants in soil. EPS 1/RM/45.

[35] Margesin, R e Schinner, F, 2005. *Manual for soil analysis - Monitoring and assessing soil remediation, Soil Biology*, vol. 5. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

## BIBLIOGRAFIA

- [36] University Center for Environmental Inquiry at Cornell, "Environmental Inquiry, Authentic Scientific Research for High School Students", 2009. <http://ei.cornell.edu/index.html> (acedido em 29 de Setembro de 2011).
- [37] US EPA, 1996. *Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test*. EPA 712-6-96-154.
- [38] Camões, MFGFC, 2001. Quantificação da incerteza nas medicos analíticas. Versão em português do guia EURACHEM/CITAC, Tradução e adaptação da 2ª Edição (2000). (versão em PDF do documento descarregada em 14 de Outubro de 2011).
- [39] Pinto, R, 2011. *Remediação de solos contaminados com produtos farmacêuticos - Oxidação/redução química*. Tese de Mestrado em Engenharia Química. Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- [40] ISO 5667-10:1992 Water quality - Sampling - Part 10: Guidance on sampling of waste waters.
- [41] Paíga, P, 2011. Artigo em preparação.
- [42] Rosa, M, Flores, FC, Beck, RCR, Adams, AIH e Silva, CB, 2010. Influências do processo de mistura de pós na preparação magistral de cápsulas de Ibuprofeno. *Saúde*, 36(2): 7-18.

## ANEXO A – Boletim de Análise do Solo



**AREIA CALIBRADA Nº 1****(0.5 – 1 mm)****ANÁLISE QUÍMICA:**

Elemento	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MgO	CaO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	TiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	MnO	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
%	89.83	3.77	0.86	<0.01	0.02	0.12	2.71	0.51	0.029	0.02	<0.002

**ANÁLISE MINERALÓGICA:**

	Quartzo	Feldspato K
%	81	19

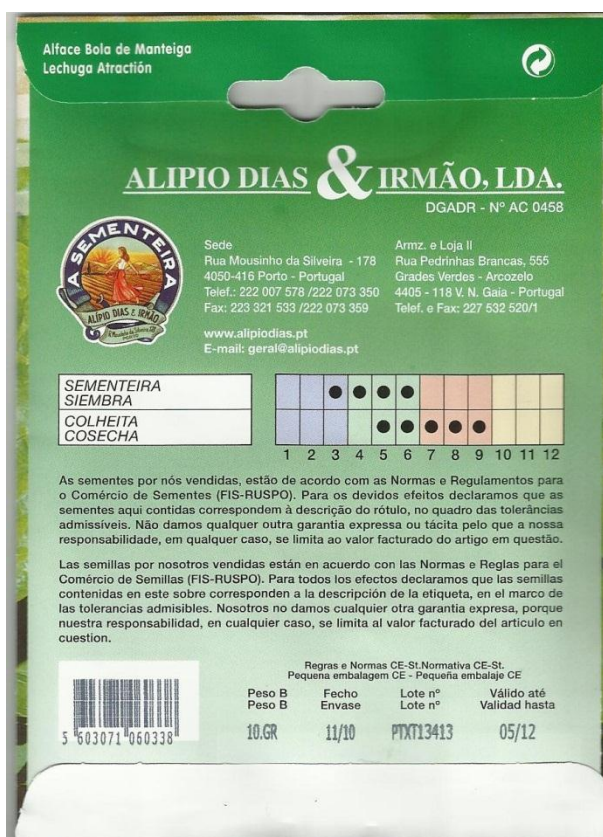
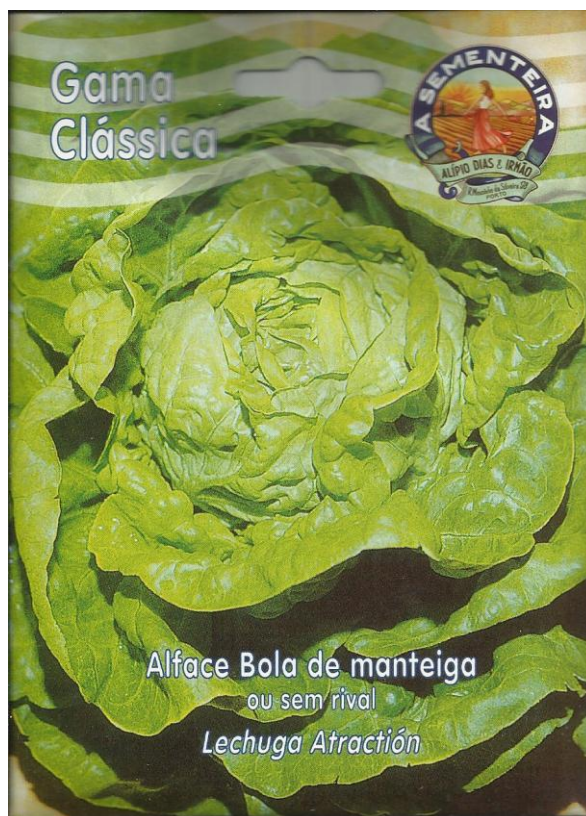
Revisão nº 1

19/03/08



ANEXO B – Características das Sementes de *Lactuca sativa*







## ANEXO C – Boletins de Análise das Águas



ANEXO C – BOLETINS DE ANÁLISE DAS ÁGUAS



<b>Boletim Analítico Nº: 20114538</b>	<b>Versão: 1.0</b>
<b>Âmbito: Determinações em Amostras de Águas de consumo humano</b>	

Boletim Definitivo

<b>Requisitante:</b> ISEP - Instituto Superior de Engenharia do Porto
<b>Morada:</b> Rua Dr. António Bernardino Almeida, n.º 431 - 4200-072

<b>Designação da Amostra:</b> Amostra de água - CH
--

COLHEITA DE AMOSTRAS			
<b>Data:</b>	23-09-2011	<b>Colheita efectuada por:</b>	Cliente
<b>Hora de Colheita:</b>	---	<b>Ponto:</b>	Água Pura: recolhida a 15/09/2011
<b>Tipo de Análise:</b>	MB+FQ	<b>Método de Recolha:</b>	---
<b>Origem:</b>	Água Pura	<b>Tratamento:</b>	---

ANÁLISE		
<b>Data de Entrada:</b> 23-09-2011	<b>Período de Análise:</b> 23-09-2011 a 28-09-2011	<b>Ref. Amostra:</b> 20114538

Descrição	Métodos	Exp. Result.	Resultados	LL/VP (b)	VMR (a)
pH, a 24º C	SMEWW 4500 - H-B	Escala de Sorensen	6.6	6.5 a 9.0	---
Condutividade a 20ºC	MI 55 (2008-05-29) (SMEWW 2510-B)	µS/cm	<38.2 (LQ)	2500	---
Quantificação de Microrganismos a 22ºC	ISO 6222:1999	N/ml, 22ºC	>300	S/alt.anormal	100

APRECIÇÃO
Os parâmetros analisados estão em conformidade com o Decreto Lei 306/07.

<p><b>Obs.:</b></p> <p>O ensaio assinalado com (*) não está incluído no âmbito da acreditação.</p> <p>A amostragem efectuada não se encontra incluída no âmbito da acreditação.</p> <p>NP: Norma Portuguesa; SMEWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed; ISO: International Standard Organization; NF: Norma Francesa; EN: Norma Europeia; MI: Método Interno; DIN: Norma Alemã; LQ: Limite de Quantificação.</p> <p>a) Valor Máximo Recomendado. b) Limite de lei (LL) segundo o Decreto Lei 236/98, à excepção das águas de consumo humano, para as quais Valor Paramétrico (VP) segundo o Decreto Lei 306/07.</p>	<p><b>EMISSÃO</b></p> <p>Porto, 28 de Setembro de 2011</p> <p>O Director do Laboratório</p> <p><i>Maria Cristina Antão S.C.</i></p> <p>Maria Cristina Antão, S.C., Dra.</p> <p><small>(Este Boletim Analítico foi assinado digitalmente)</small></p>
--	--

Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra designada neste Boletim Analítico.  
O Boletim Analítico não deve ser reproduzido, a não ser na íntegra, sem acordo escrito do Laboratório.

ANEXO C – BOLETINS DE ANÁLISE DAS ÁGUAS



<b>Boletim Analítico Nº: 20114539</b>	Versão: 1.0
<b>Âmbito: Determinações em Amostras de Águas de consumo humano</b>	

Boletim Definitivo

<b>Requisitante:</b> ISEP - Instituto Superior de Engenharia do Porto
<b>Morada:</b> Rua Dr. António Bernardino Almeida, n.º 431 - 4200-072

<b>Designação da Amostra:</b> Amostra de água - CH
--

COLHEITA DE AMOSTRAS			
<b>Data:</b>	23-09-2011	<b>Colheita efectuada por:</b>	Cliente
<b>Hora de Colheita:</b>	---	<b>Ponto:</b>	Água Pura: recolhida a 20/09/2011
<b>Tipo de Análise:</b>	MB+FQ	<b>Método de Recolha:</b>	---
<b>Origem:</b>	Água Pura	<b>Tratamento:</b>	---

ANÁLISE		
<b>Data de Entrada:</b> 23-09-2011	<b>Período de Análise:</b> 23-09-2011 a 26-09-2011	<b>Ref. Amostra:</b> 20114539

Descrição	Métodos	Exp. Result.	Resultados	LL/VP (b)	VMR (a)
pH, a 24°C	SMEWW 4500 - H-B	Escala de Sorensen	6.7	6.5 a 9.0	---
Condutividade a 20°C	MI 55 (2008-05-29) (SMEWW 2510-B)	µS/cm	<38.2 (LQ)	2500	---
Quantificação de Microrganismos a 22°C	ISO 6222:1999	N/mL 22°C	41	S/alt.anormal	100

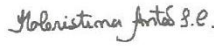
APRECIÇÃO
Os parâmetros analisados estão em conformidade com o Decreto Lei 306/07.

<p><b>Obs.:</b></p> <p><b>O ensaio assinalado com (*) não está incluído no âmbito da acreditação.</b></p> <p><b>A amostragem efectuada não se encontra incluída no âmbito da acreditação.</b></p> <p>NP: Norma Portuguesa; SMEWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed; ISO: International Standard Organization; NF: Norma Francesa; EN: Norma Europeia; MI: Método Interno; DIN: Norma Alemã; LQ: Limite de Quantificação.</p> <p>a) Valor Máximo Recomendado. b) Limite de lei (LL) segundo o Decreto Lei 236/98, à excepção das águas de consumo humano, para as quais Valor Paramétrico (VP) segundo o Decreto Lei 306/07.</p>	<p><b>EMISSÃO</b></p> <p>Porto, 28 de Setembro de 2011</p> <p>O Director do Laboratório</p> <p><i>Maria Cristina Antão S.C.</i></p> <p>Maria Cristina Antão, S.C., Dra.</p> <p><small>(Este Boletim Analítico foi assinado digitalmente)</small></p>
--	--

Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra designada neste Boletim Analítico.  
O Boletim Analítico não deve ser reproduzido, a não ser na íntegra, sem acordo escrito do Laboratório.



<b>Boletim Analítico Nº: 20114540</b>		Versão: 1.0			
<b>Âmbito: Determinações em Amostras de Águas de consumo humano</b>					
Boletim Definitivo					
<b>Requisitante:</b> ISEP - Instituto Superior de Engenharia do Porto					
<b>Morada:</b> Rua Dr. António Bernardino Almeida, n.º 431 - 4200-072					
<b>Designação da Amostra:</b> Amostra de água - CH					
<b>COLHEITA DE AMOSTRAS</b>					
<b>Data:</b>	23-09-2011	<b>Colheita efectuada por:</b> Cliente			
<b>Hora de Colheita:</b>	---	<b>Ponto:</b> Ág. desionizada: recolhida a 20/09			
<b>Tipo de Análise:</b>	MB+FQ	<b>Método de Recolha:</b> ---			
<b>Origem:</b>	Água desionizada	<b>Tratamento:</b> ---			
<b>ANÁLISE</b>					
<b>Data de Entrada:</b> 23-09-2011	<b>Período de Análise:</b> 23-09-2011 a 26-09-2011	<b>Ref. Amostra:</b> 20114540			
<b>Descrição</b>	<b>Métodos</b>	<b>Exp. Result.</b>	<b>Resultados</b>	<b>LL/VP (b)</b>	<b>VMR (a)</b>
pH, a 24°C	SMEWW 4500 - H-B	Escala de Sorensen	<b>4.7</b>	6.5 a 9.0	---
Condutividade a 20°C	MI 55 (2008-05-29) (SMEWW 2510-B)	µS/cm	144	2500	---
Quantificação de Microrganismos a 22°C	ISO 6222:1999	N/ml, 22°C	>300	S/alt.anormal	100
<b>APRECIÇÃO</b>					
Os parâmetros assinalados a <b>bold</b> não estão em conformidade com o Decreto Lei 306/07.					

<b>Obs.:</b>  O ensaio assinalado com (*) não está incluído no âmbito da acreditação.  A amostragem efectuada não se encontra incluída no âmbito de acreditação. NP: Norma Portuguesa; SMEWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed; ISO: International Standard Organization; NF: Norma Francesa; EN: Norma Europeia; MI: Método Interno; DIN: Norma Alemã; LQ: Limite de Quantificação. a) Valor Máximo Recomendado. b) Limite de lei (LL) segundo o Decreto Lei 236/98, à excepção das águas de consumo humano, para as quais Valor Paramétrico (VP) segundo o Decreto Lei 306/07.	<b>EMISSÃO</b>
	Porto, 28 de Setembro de 2011  O Director do Laboratório   Maria Cristina Antão, S.C., Dra.  <small>(Este Boletim Analítico foi assinado digitalmente)</small>

Os resultados apresentados referem-se exclusivamente à amostra designada neste Boletim Analítico.  
O Boletim Analítico não deve ser reproduzido, a não ser na íntegra, sem acordo escrito do Laboratório.



## ANEXO D – Estudo Solubilidade do Ibuprofeno



Na tabela D.1 são apresentados os resultados obtidos no estudo da solubilidade do ibuprofeno. A percentagem de solubilidade foi calculada através do quociente entre a concentração medida e a concentração preparada.

**Tabela D.1** – Resultados obtidos no estudo de solubilidade do Ibuprofeno. (Estudo realizado à temperatura ambiente.)

Concentração Preparada (ppb)	Concentração medida (ppb)	Solubilidade (%)
0,1	ND*	-
1	ND*	-
2	ND*	-
5	ND*	-
10	ND*	-
20	22	111,0
50	50	99,8
100	97	97,4
200	199	99,6
500	497	99,5
1000	1021	102,1
2000	1634	81,7
5000	4201	84,0
10200	6800	66,7
10880	6243	57,4
30500	18670	61,2
49780	19791	39,8
100220	20080	20,0

\* ND - Não Detectado

A concentração de IB em solução foi determinada com base na equação da recta da curva de calibração (área Vs concentração de IB padrão):

$$y = 1467,6 * x - 24431 \text{ (D.1)}$$

Onde y corresponde ao valor da área obtida e x representa a concentração de IB padrão. Dada a elevada solubilidade do IB em solventes orgânicos, as soluções padrão foram preparadas com acetonitrilo.<sup>[41, 42]</sup>





