INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO
MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Testes de ecotoxicidade usando microalgas como complemento da avaliação da eficiência do tratamento de águas residuais

ANA RITA DE BARROS CALHEIROS ALVES
julho de 2023

POLITÉCNICO
DO PORTO

Testes de ecotoxicidade usando microalgas como complemento da avaliação da eficiência do tratamento de águas residuais

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

Ana Rita Alves

Orientação: Sónia Figueiredo

Coorientação: Cristina Delerue-Matos e Andreia Daniela Silva

Julho de 2023

Agradecimentos

A conclusão desta dissertação não seria possível sem importantes apoios e incentivos. Assim, manifesto o meu agradecimento a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Primeiramente, uma palavra de agradecimento à minha orientadora, Doutora Sónia Figueiredo, pela disponibilidade, carinho e por todo o apoio prestado durante este trabalho. Sem o seu apoio não seria possível desenvolver esta dissertação.

Às minhas coorientadoras, Doutora Andreia Silva pela ajuda na parte laboratorial e partilha de conhecimentos e à Doutora Cristina Delerue-Matos pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Doutora Cristina Soares, Doutora Luísa Correia-Sá, Paula Remor e Antón Pazo pela disponibilidade e ajuda no desenvolvimento deste trabalho através dos ensaios realizados no GRAQ.

Aos meus colegas do GRAQ, pela disponibilidade e colaboração no laboratório.

Aos meus amigos, por todas as palavras de incentivo, apoio incondicional e partilha de conhecimentos durantes estes meses.

À minha família, que me acompanhou ao longo do meu percurso académico e que sempre me motivou a alcançar os meus objetivos. Foram eles que me ouviram e apoiaram em todos os momentos.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto FARMASENSE ao abrigo do Sistema de Incentivos à Investigação e Desenvolvimento Tecnológico de Portugal 2020 e do projeto OXI-e3D que foram financiados pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER). Assim, gostaria de agradecer o apoio financeiro proporcionado para a realização destes projetos. Por último, gostaria de agradecer à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pela atribuição de uma bolsa de investigação no âmbito do projeto "Verão com Ciência".

A todos, o meu muito obrigada!

Resumo

A qualidade da água é principalmente influenciada pela presença de poluentes. A seleção dos tratamentos a usar deve ser baseada na otimização da sua eficiência e sustentabilidade.

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da ecotoxicidade utilizando a microalga *Raphidocelis subcapitata*, antes e após diversos tratamentos terciários de águas residuais, de forma a complementar a avaliação da eficiência dos tratamentos. Os ensaios realizados foram baseados no teste de inibição para algas descrito no Regulamento (EU) 2016/266 da Comissão de 7 de dezembro de 2015, que, por sua vez, se baseia no documento "Guidelines for the Testing of Chemicals: Freshwater Alga and Cyanobacteria Growth Inhibition Test", OCDE 2011. A resposta do sistema foi obtida através da comparação do crescimento da cultura exposta a uma determinada concentração com o crescimento das culturas de controlo.

Realizaram-se ensaios com águas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais urbanas: após tratamento secundário e terciário (ultrafiltração, ultravioleta e plasma não térmico). Observou-se que, no caso do tratamento secundário existe inibição de crescimento, obtendo-se uma concentração efetiva que causa 50% de inibição na população (CE_{50}) igual a 49,7%. Para o caso do tratamento UV observou-se uma inibição pouco significativa (CE_{10}= 69,6%). Nos restantes tratamentos terciários avançados, observou-se que todos os tratamentos potenciaram o crescimento da microalga.

Realizaram-se, também, ensaios com águas provenientes de um tratamento eletroquímico avançado (processo eletroquímico 3D) de forma a avaliar os efeitos do tratamento ao nível da ecotoxicidade e capacidade de remoção de fármacos. Inicialmente, testou-se água ultrapura com uma concentração conhecida de NaCl, usado como eletrólito, antes e após o tratamento e verificou-se que o tratamento aumentava a toxicidade (CE_{50}=2,57%), devido à presença de espécies reativas de cloro. De seguida, aplicou-se o mesmo tratamento a água ultrapura, na presença de sulfametoxazol e trimetoprim (e do eletrólito), e observou-se que quanto maior for a densidade de corrente aplicada, maior a taxa de remoção dos fármacos. Por fim, aplicou-se o tratamento eletroquímico 3D a uma água residual na presença e ausência de NaCl, e verificou-se que o tratamento mais eficiente foi na presença do eletrólito, onde se observou uma maior taxa de remoção dos fármacos, no entanto, obteve-se um valor de CE_{50} igual a 2,9% devido às espécies reativas de cloro geradas no tratamento.

Palavras-chave: água residual, ecotoxicidade, microalga, processos avançados de tratamento, tratamentos terciários.

Abstract

Water quality is mainly influenced by the presence of pollutants. The selection of treatments to be used should be based on optimizing their efficiency and sustainability.

This work aimed to evaluate the ecotoxicity, using the microalgae *Raphidocelis subcapitata*, before and after various tertiary treatments of wastewater, to complement the evaluation of the efficiency of the treatments. The tests carried out were based on the inhibition test for algae described in Regulation (EU) 2016/266 of the 7th of December 2015, which was based on the document "Guidelines for the Testing of Chemicals: Freshwater Alga and Cyanobacteria Growth Inhibition Test", OECD 2011. The system response was obtained by comparing the growth of the culture exposed to a certain concentration with the growth of control cultures.

Tests with a wastewater from an urban wastewater treatment plant were performed after conventional secondary and tertiary treatments: ultraviolet (UV), ultrafiltration and non-thermal plasma (PTN). In case of secondary treatment there is growth inhibition, obtaining an effective concentration that causes 50% of inhibition in the population (EC_{50}) equal to 49,7%. For the case of UV treatment, it was observed a little significant inhibition (EC_{10} =69,9%). Regarding the other advanced tertiary treatments, all treatments enhanced the microalgae growth.

Tests with water submitted to advanced electrochemical treatments (3D electrochemical process) were carried out to evaluate the effects on ecotoxicity and pharmaceutical removal capacity of this treatment. Firstly, ultrapure water with a known concentration of NaCl, the used electrolyte, was tested before and after treatment and it was found that the treatment increased the ecotoxicity (EC_{50} = 2,57%) due to the presence of reactive chlorine species. The same treatment was applied to ultrapure water containing sulfamethoxazole and trimethoprim (and the electrolyte). It was observed that the increase of the current density applied, caused an increase in the drug removal rate. Finally, the 3D electrochemical treatment was applied to wastewater in the presence and absence of NaCl and it was verified that the most efficient treatment was in the presence of the electrolyte, corresponding to a higher rate of drug removal, however it was obtained an EC50 value of 2,9% due to reactive chlorine species produced during the treatment.

Keywords: advanced treatment processes**,** ecotoxicity, microalgae, tertiary treatments, wastewater.

Índice

Agradecimentos iii
Resumo v
Abstract vii
Siglas e Abreviaturas xv
1. Introdução 1
1.1. Enquadramento 1
1.2. Objetivos 1
1.3. Estrutura do relatório 2
2. Poluição do meio aquático 3
2.1. Principais contaminantes 3
2.2. Presença de produtos farmacêuticos 4
2.2.1. Antibióticos presentes em afluentes e efluentes de ETARs 10
2.2.2. Antibióticos presentes em águas Superficiais 11
2.2.3. Antibióticos presentes em lençóis freáticos 11
3. Legislação 13
4. Estações de Tratamento de Águas Residuais 17
4.1. Tratamento Preliminar 17
4.2. Tratamento Primário 17
4.3. Tratamento Secundário 17
4.4. Tratamento Terciário 18
4.4.1. Tratamento por Ultravioleta 18
4.4.2. Tratamento por Ultrafiltração 19
4.4.3. Tratamento através de plasma não térmico 20
4.4.4. Tratamento por ozonização 21
4.4.5. Tratamento eletroquímico tridimensional (3D) 22
5. Ecotoxicidade/Ecotoxicologia 23
5.1. Tipos de testes de ecotoxicidade 23
5.2. Organismos Teste 24
5.2.1. Bactérias, Invertebrados e Peixes 25
5.2.2. Microalgas 25
5.2.2.1. Estudos da ecotoxicidade de antibióticos usando a microalga Raphidocelis subcapitata 26

6. Descrição Experimental 29
6.1. Testes de inibição de crescimento da microalga 29
6.2. Organismo de Ensaio 30
6.3. Meio de Cultura 31
6.4. Teste com dicromato de potássio (substância inibidora de referência) 31
6.5. Critérios de validade dos ensaios 32
7. Resultados e Discussão 33
7.1. Tratamentos físico-químicos avançados - efeito ecotoxicológico 34
7.2. Tratamentos eletroquímicos avançados - efeito ecotoxicológico 36
8. Conclusões e sugestões para trabalho futuro 55
Bibliografia 57
Anexos 63
Anexo A – Composição do meio de cultura 63
Anexo B – Resultados do ensaio com dicromato de potássio 65
Anexo C – Variação de pH nas culturas de controlo 67

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Principais contaminantes e as suas fontes, adaptado [9]. 4
Figura 2.2 - Fluxograma das possíveis rotas dos fármacos e os seus resíduos no meio ambiente [18]..... 6
Figura 4.1 - Modos operatórios da ultrafiltração [48]. 20
Figura 4.2 - Esquema de uma instalação de ozonização [42]. 21
Figura 6.1 - Cultura de alga Raphidocelis subcapitata. 30
Figura 7.1 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração do efluente (tratamento secundário, UV, PNT e ultrafiltração). 34
Figura 7.2 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração da solução para o ensaio 1 (NaCl] = 0,02 mol/L e ausência de corrente elétrica) e 2 1 (NaCl] = 0,02 mol/L; presença de corrente elétrica; 0,1 A). 37
Figura 7.3 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração da solução para os ensaios 3 ([NaCl]= 0,015 mol/L; [SMX]= 10 mg/L; [TMP]= 10 mg/L; ausência de corrente elétrica), 4 ([NaCl]= 0,015 mol/L; [SMX]= 10 mg/L; [TMP]= 10 mg/L; presença de corrente elétrica; 0,12 A; 8 mA/cm^2) e 5 ([NaCl]= 0,015 mol/L; [SMX]= 10 mg/L; [TMP]= 10 mg/L; presença de corrente elétrica; 0,06 A; 4 mA/cm^2)..... 40
Figura 7.4 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração da solução para os ensaios 6 ([NaCl]= 0,015 mol/L; [SMX]= 10 mg/L; [TMP]= 10 mg/L; ausência de passagem de corrente elétrica) e 7 ([NaCl]= 0,015 mol/L; [SMX]= 10 mg/L; [TMP]= 10 mg/L; presença de corrente elétrica; 0,17 A; 5 mA/cm^2)..... 42
Figura 7.5 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de solução para ensaios 8 ([NaCl= 0,015 mol/L; ausência de corrente elétrica) e 9 ([NaCl]= 0,015 mol/L; presença de corrente elétrica; 0,12 A; 8 mA/cm^2)..... 46
Figura 7.6 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração da solução para os ensaios 10 (ausência de corrente elétrica) e 11 (presença de corrente elétrica; 0,17 A; 4,74 mA/cm^2). 49
Figura 7.7 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração da solução aquosa para os ensaios 10 (ausência de corrente elétrica), 12 ([NaCl]= 0,015 mol/L; ausência de corrente elétrica) e 13 ([NaCl]=0,015 mol/L; presena de corrente elétrica; 0,27 A; 8 mA/cm^2). 52
Figura B. 1 - Inibição de crescimento (%) em função do logaritmo da concentração. 65

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Classes de fármacos detetados em águas para consumo humano [19]. 7
Tabela 2.2 - Principais classes de antibióticos [11, 23], adaptado. 9
Tabela 4.1 - Dose UV que os microrganismos vivos necessitam de absorver para serem inativados [46]. 19
Tabela 5.1 - Efeitos ecotoxicológicos de antibióticos na microalga Raphidocelis Subcapitata, adaptado [71]. 27
Tabela 7.1 - Resultados obtidos nos ensaios realizados (tratamento secundário, UV, PNT e ultrafiltração). 34
Tabela 7.2 - Caracterização da água proveniente do tratamento secundário. 35
Tabela 7.3 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes ao tratamento secundário e UV. 36
Tabela 7.4 - Condições operatórias do ensaio 1 e 2. 37
Tabela 7.5 - Resultados obtidos para os ensaios 1 e 2. 37
.Tabela 7.6 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes aos ensaios 1 e 2. 38
Tabela 7.7 - Características dos reatores utilizados nos ensaios. 38
Tabela 7.8 - Condições operatórias dos ensaios 3, 4 e 5. 39
Tabela 7.9 - Resultados obtidos para os ensaios 3,4 e 5. 39
Tabela 7.10 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes aos ensaios 3,4 e 5. 40
Tabela 7.11 - Taxas de remoção de SMX e TMP para os ensaios 4 e 5. 40
Tabela 7.12 - Condições operatórias dos ensaios 6 e 7. 41
Tabela 7.13 - Resultados obtidos para os ensaios 6 e 7. 42
Tabela 7.14 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes aos ensaios 6 e 7. 43
Tabela 7.15 - Taxas de remoção de SMX e TMP para o ensaio 7. 43
Tabela 7.16 - Resumo dos resultados obtidos nos diferentes ensaios com água ultrapura. 44
Tabela 7.17 - Condições operatórias do ensaio 8 e 9. 45
Tabela 7.18 - Resultados obtidos para os ensaios 8 e 9. 45
Tabela 7.19 - Caracterização da água residual utilizada nos ensaios 8 e 9. 46
Tabela 7.20 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes aos ensaios 8 e 9. 47
Tabela 7.21 - Taxas de remoção de SMX e TMP para o ensaio 9. 47
Tabela 7.22 - Condições operatórias dos ensaios 10 e 11. 48
Tabela 7.23 - Resultados obtidos para os ensaios 10 e 11. 48
Tabela 7.24 - Caracterização da água residual utilizada no ensaio 10 e 13. 49
Tabela 7.25 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes ao ensaio 11. 50
Tabela 7.26 - Taxas de remoção dos fármacos para o ensaio 11. 50
Tabela 7.27 - Condições operatórias dos ensaios 12 e 13. 51
Tabela 7.28 -Resultados obtidos para os ensaios 12 e 13. 51
Tabela 7.29 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes ao ensaio 13. 52
Tabela 7.30 - Taxas de remoção dos fármacos para o ensaio 13. 53

Tabela 7.31 - Resumo dos resultados obtidos com água residual. 53
Tabela A. 1 - Concentrações de nutrientes [5], adaptado. 63
Tabela B. 1 - Resultados obtidos no ensaio do dicromato de potássio. 65
Tabela C. 1 - Variação de pH nas culturas de controlo para os tratamentos físicos-químicos avançados. 67
Tabela C. 2 - Variação de pH nas culturas de controlo para os tratamentos eletroquímicos avançados. 67

Siglas e Abreviaturas

CBO	Carência Bioquímica de Oxigénio
CE_X	Concentração do produto químico em estudo que resulta numa inibição de x % do crescimento do organismo de ensaio
CQO	Carência Química de Oxigénio
ETARs	Estações de Tratamento de Águas Residuais
EUA	Estados Unidos da América
LOEC	Menor concentração com efeito observável
NOEC	Concentração sem efeitos observáveis
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
PNT	Plasma não térmico
SST	Sólidos Suspensos Totais
SMX	Sulfametoxazol
TMP	Trimetoprim
UF	Ultrafiltração
UV	Ultravioleta

1. Introdução

1.1. Enquadramento

A qualidade da água é muito importante e é influenciada por múltiplos fatores, sendo a emissão de poluentes um dos principais contributos para a poluição da água. Atualmente, com a industrialização e a urbanização, a poluição da água é um problema a nível global [1, 2].

Associados à má gestão da água contaminada estão vários desequilíbrios ecológicos e doenças de transmissão hídrica. Segundo a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 3,1% de todas as mortes estão relacionadas com a poluição da água. A água pura pode ser contaminada por variadas espécies, tais como microrganismos, pesticidas, metais pesados, fármacos, fertilizantes, corantes, entre outros [2].

As águas residuais urbanas são compostas por águas residuais domésticas, águas residuais industriais e pluviais coletadas na rede de drenagem pública, que possuem constituintes químicos e microbiológicos que nem sempre são removidos ou inativados nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs). A descarga de águas residuais tratadas pode representar riscos para a saúde pública e para o meio ambiente devido à complexidade deste tipo de águas e à ineficiência de remoção de alguns poluentes [3].

Desde o século passado que surgiram variados processos de descontaminação de água com a finalidade de remoção e conversão dos poluentes presentes nas águas em produtos finais oxidados. Após o tratamento em ETARs, as mesmas são descarregadas nos meios recetores, obedecendo às condições legais impostas. As operações e os processos utilizados para o tratamento destas águas podem ser agrupados nos seguintes níveis de tratamento: preliminar, primário, secundário e terciário [2, 4].

1.2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ecotoxicidade após o tratamento secundário e após vários tratamentos terciários de águas residuais, alguns inovadores, servindo, assim, como complemento da avaliação da eficiência dos tratamentos.

Os ensaios realizados foram baseados no teste de inibição para algas descrito no Regulamento (EU) 2016/266 da Comissão de 7 de dezembro de 2015, que, por sua vez, se baseia no documento "Guidelines for the Testing of Chemicals: Freshwater Alga and Cyanobacteria Growth Inhibition Test" [5, 6].

1.3. Estrutura do relatório

O presente trabalho encontra-se estruturado em 8 capítulos. O capítulo 1 introduz o trabalho de forma geral, seguido dos objetivos e estrutura do relatório. O capítulo 2 relaciona-se com a poluição do meio aquático, onde se podem destacar os principais contaminantes e os contaminantes emergentes, nomeadamente os produtos farmacêuticos. O capítulo 3 é dedicado à evolução da legislação europeia relativamente à qualidade do meio aquático e aos poluentes presentes. O capítulo 4 foca-se nas estações de tratamento de águas residuais, abordando os tratamentos: preliminar, primário, secundário e terciário. No capítulo 5, é abordada a ecotoxicidade desde os diversos tipos de testes utilizados aos organismos teste. O capítulo 6 é dedicado à descrição experimental do método de avaliação da ecotoxicidade utilizado. No capítulo 7, apresentam-se os resultados obtidos e a respetiva discussão. No capítulo 8, encontram-se as conclusões baseadas nos resultados obtidos e propostas para trabalho futuro.

2. Poluição do meio aquático

A poluição da água está fortemente associada à atividade do ser humano. Os fatores responsáveis pela poluição da água são a descarga de águas residuais domésticas, o derrame de substâncias tóxicas, as descargas de efluentes industriais e o uso de pesticidas na agricultura. Estas descargas descontroladas no meio ambiente são extremamente prejudiciais para o meio aquático e, também, para a saúde humana [7, 8].

Com o aumento populacional e a crescente industrialização, tem-se verificado um aumento da poluição da água. Nas zonas costeiras, verifica-se o aumento dos níveis de compostos tóxicos das águas provenientes do desenvolvimento industrial insustentável [7, 8].

2.1. Principais contaminantes

A qualidade da água do meio recetor encontra-se fortemente relacionada com as fontes de poluição, o tipo de contaminante e concentração do mesmo [9].

A presença de elevadas concentrações de matéria orgânica solúvel biodegradável nas águas corresponde a uma elevada carência bioquímica de oxigénio (CBO), acompanhada da presença de macronutrientes como o nitrogénio e o fósforo, poderá causar um elevado consumo de oxigénio nas águas superficiais. Este fator resulta na desoxigenação das águas, o que leva à morte de peixes, ao crescimento exagerado da vida aquática e ao aparecimento de odores indesejáveis. Também a presença excessiva de nutrientes, azoto e fósforo, leva à eutrofização (crescimento exponencial das algas) e, simultaneamente, à contaminação das águas, perturbando o equilíbrio biológico. Outro poluente que interfere no meio aquático são os sólidos suspensos, uma vez que diminuem a transparência da água e, consequentemente, afetam os processos fotossintéticos, reduzindo a produtividade primária dos ecossistemas aquáticos e com consequências ao longo de toda a cadeia trófica [9, 10].

Na figura 2.1 encontram-se esquematizados os principais contaminantes e as suas fontes.

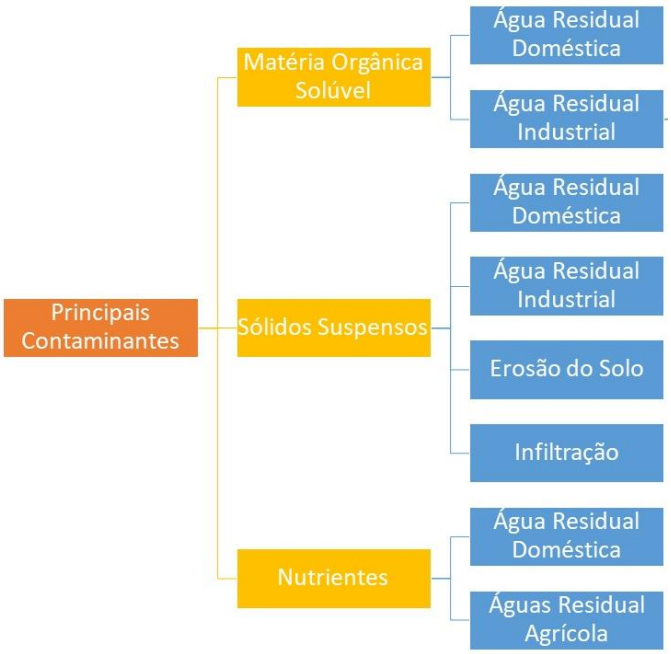

Figura 2.1 - Principais contaminantes e as suas fontes, adaptado [9].

2.2. Presença de produtos farmacêuticos

Atualmente, verifica-se um aumento dos contaminantes emergentes presentes nas águas, constituindo um novo e grave problema ambiental. Os contaminantes emergentes são produtos químicos como compostos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal e pesticidas, que possuem potencial para causar efeitos nocivos na vida aquática e saúde humana e geralmente não são monitorizados devido a ausência de regulamentação [8, 11, 12].

De todos os poluentes emergentes, os que suscitam mais preocupação são os fármacos, pelo seu crescente consumo e consequente aumento da presença no ambiente. Estes compostos aplicados tanto na medicina humana como na veterinária têm efeitos adversos a nível ecotoxicológico em organismos do meio aquático e, também, nos seres humanos. A exposição a fármacos pode provocar efeitos agudos nos organismos expostos como alterações endócrinas e indução ou inibição de enzimas [13, 14, 15, 16].

Nos países da União Europeia, o consumo de medicamentos é estimado em toneladas por ano, sendo os antibióticos utilizados em quantidades semelhantes às dos pesticidas. Os produtos farmacêuticos das águas residuais acabam por chegar ao meio ambiente. Assim, existe uma preocupação com os efeitos compostos possam ter no meio ambiente [13].

A introdução destas substâncias no ambiente está fortemente relacionada com o seu uso intensivo no tratamento de doenças em humanos e animais, sendo os mais usados os analgésicos/anti-inflamatórios, os antibióticos, entre outros. Apenas uma parte do medicamento é assimilada pelo organismo, sendo o restante excretado sob a forma de metabolitos, ou na forma original. Estima-se que 50 a 90% da dosagem de cada fármaco que é excretada permanece inalterável e persistente no meio ambiente. Diversos ramos de atividade são responsáveis pela introdução destas substâncias no ambiente, tais como [15]:

→ Indústria Farmacêutica – os efluentes gerados possuem concentrações residuais dos compostos sintetizados que podem não ser biodegradáveis e, por isso, apresentam riscos para o ambiente devido à sua toxicidade [15].

→ Aquicultura e Pecuária – a utilização frequente de antibióticos, promotores de crescimento e aditivos alimentares contribui para deposição de fármacos de uso veterinário no solo e contaminação das águas superficiais e subterrâneas [15].

→ Aterros – a deposição de resíduos contendo fármacos origina a contaminação de águas do subsolo [15].

→ Agricultura – o uso de estrume como fertilizante contendo compostos farmacêuticos origina a contaminação das águas superficiais e do subsolo [15].

Uma vez libertados no meio ambiente, os fármacos dispersam-se através do ar, água e solo. A quantidade destas substâncias nos diferentes recetores depende da capacidade de absorção dos mesmos [17].

Na figura 2.2, verificam-se as possíveis rotas dos fármacos quando descartados.

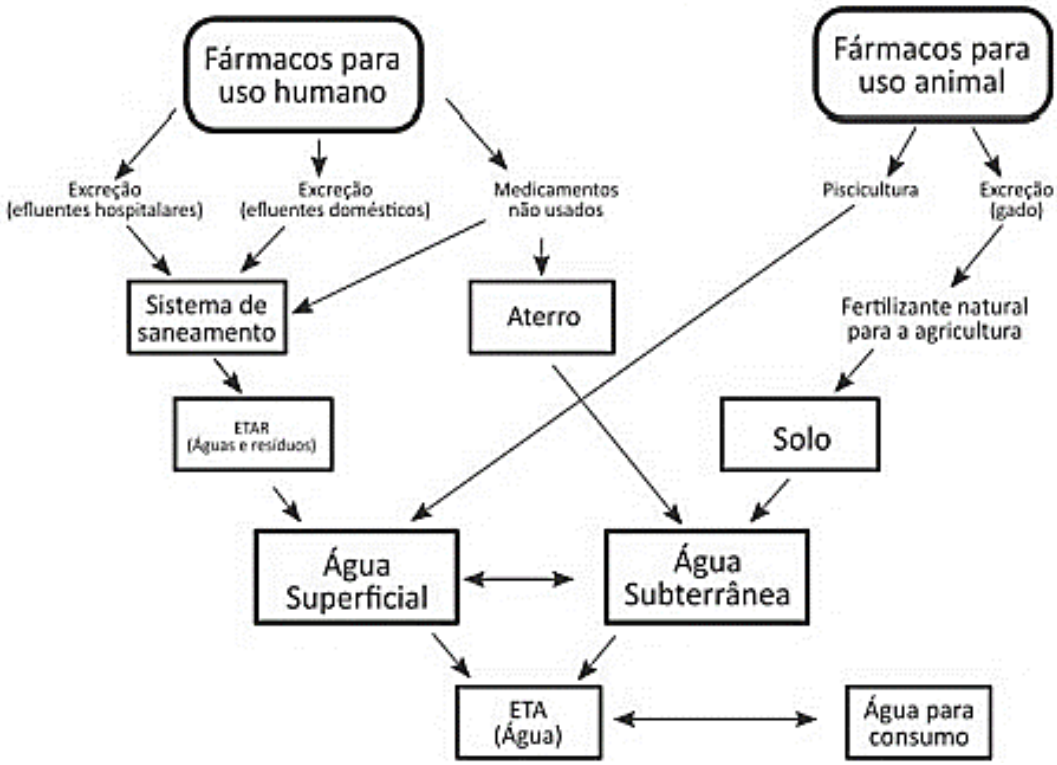

Figura 2.2 - Fluxograma das possíveis rotas dos fármacos e os seus resíduos no meio ambiente [18].

Estudos realizados a nível mundial detetaram a presença de fármacos em águas destinadas para consumo humano. Na tabela 2.1, encontram-se os resultados obtidos relativamente às classes de fármacos detetados em águas para consumo humano.

Tabela 2.1 - Classes de fármacos detetados em águas para consumo humano [19].

Classe Terapêutica	Composto	Concentração máxima detetada (ng/L)	País
Antibióticos	Eritromicina	4,90	EUA
	Sulfametoxazol	22,0	Holanda
		3,00	EUA
	Tilosina	1,70	Itália
	Fenitoína	1,30	EUA
Antidepressivos	Amitriptilina	1,40	França
	Diazepam	23,5	Itália
	Fluoxetina	0,820	EUA
		10,0	Holanda
	Meprobamato	5,90	EUA
Meios de contraste radiológico	Diatrizoato	1200	Alemanha
Anti-inflamatórios/ Analgésicos	Acetaminofeno	210	França
	Diclofenac	6,00 – 35,0	Alemanha
		2,50	França
	Ibuprofeno	3,00	Alemanha
		0,600	França
		8,50	Finlândia
		1350	EUA
	Cetoprofeno	8,00	Finlândia
		3,00	França
	Fenazona	250 – 400	Alemanha
	Propifenazona	80,0 - 240	Alemanha

Através dos diversos estudos realizados, concluiu-se que o sulfametoxazol foi o antibiótico com a maior concentração (22 ng/L) encontrado na Holanda. No que toca à classe dos antidepressivos, o diazepam apresenta a maior concentração (23,5 ng/L), encontrado em Itália. O meio de contraste radiológico com a maior concentração foi o diatrizoato (1200 ng/L). Na classe dos anti-inflamatórios e analgésicos, identificou-se o ibuprofeno com uma concentração de 1350 ng/L nos Estados Unidos da América (EUA) [19].

É importante salientar que as classes apresentadas na tabela 2.1 não são as únicas a ser detetadas em águas para consumo humano, são, também, detetados compostos farmacêuticos anticonvulsivantes, anti-hipertensores, reguladores lipídicos, citotóxicos, antitússicos e psicoestimulantes [19].

Nas ETARs, as águas residuais são submetidas a variados tratamentos. No entanto, os fármacos e respetivos metabolitos podem resistir a todos os processos de tratamento ou então degradarem-se total ou parcialmente, podendo haver formação de produtos de degradação. Estes produtos são também considerados compostos preocupantes, uma vez que poderão possuir uma toxicidade equivalente ou superior quando comparados com o fármaco inicial [19].

Desde o final da década de 90, que os antibióticos têm recebido uma especial atenção, devido ao aumento da presença destes fármacos no meio ambiente [20].

Os antibióticos constituem um grupo bastante heterogéneo quimicamente e possuem um papel inibidor no que toca ao crescimento de outros microrganismos. Esta inibição do crescimento dum microrganismo provocada por um antibiótico corresponde a uma inibição temporária ou permanente da capacidade de reprodução do microrganismo interrompendo, assim, o crescimento da população bacteriana [21].

Estes fármacos podem ser agrupados segundo a sua estrutura química (classes) como quinolonas, sulfonamidas, trimetoprim, macrólidos, beta-lactâmicos e tetraciclinas, entre outros, como se pode observar na tabela 2.2 [22].

Tabela 2.2 - Principais classes de antibióticos [11, 23], adaptado.

Classe de antibiótico	Antibiótico
Quinolonas	Enrofloxacina
	Ciprofloxacina
	Norfloxacina
	Ofloxacina
Sulfonamidas	Sulfametazina
	Sulfametoxazol
	Sulfadiazina
	Sulfatiazol
	Sulfametazina
Trimetoprim	Trimetoprim
Macrólidos	Claritromicina
	Eritromicina
	Roxitromicina
	Azitromicina
Beta-lactâmicos	Amoxicilina
	Ampicilina
Tetraciclinas	Tetraciclina
	Clortetraciclina
	Oxitetraciclina

Os antibióticos são caracterizados por, maioritariamente, serem constituídos por moléculas complexas e, por isso, podem apresentar diversas funcionalidades na mesma molécula. A funcionalidade desta pode ser afetada, por exemplo, pelo pH. Assim, a atividade antibiótica, toxicidade, propriedades físico-químicas e biológicas podem ser afetadas pelo pH [22].

O uso de antibióticos leva ao aumento da resistência bacteriana a antibióticos que podem ser transferidos do ambiente para os seres humanos. Consequentemente, pode influenciar nos tratamentos médicos nomeadamente nas infeções provocadas por bactérias resistentes a antibióticos, aumentando, assim, a duração da doença, morbidade ou mortalidade. Na União Europeia, morrem cerca de 33 000 pessoas anualmente devido a infeções por bactérias resistentes a antibióticos [24].

Os antibióticos são considerados "substâncias persistentes ou pseudopersistentes", uma vez que a sua taxa de entrada no ambiente é superior à taxa de eliminação. Assim, a compreensão da degradação dos antibióticos no meio ambiente é um fator bastante importante [24]. O crescente consumo de antibióticos, acompanhado pela contínua excreção e libertação para o meio ambiente, levou a que nos últimos anos, vários países como a China, Japão, África do Sul, Portugal, Alemanha e EUA verificassem a ocorrência de antibióticos no ambiente [25].

Através da recolha de dados relacionados com a concentração de antibióticos detetados em variados compartimentos ambientais durante 10 anos (2011-2021), concluiu-se que a ocorrência de antibióticos no meio ambiente tornou-se num problema global, tendo sido identificados antibióticos de várias classes como beta-lactâmicos, trimetoprim, macrólidos, quinolonas, tetracilinas e sulfonamidas, em diferentes tipos de águas, como afluentes e efluentes de ETARs, águas superficiais (rios e estuários) e lençóis freáticos, e em diversos países, tais como Singapura, Quénia, França, África do Sul, EUA, China, Portugal, Suécia, Israel, Canadá e Bolívia [25].

2.2.1. Antibióticos presentes em afluentes e efluentes de ETARs

Verificou-se que os antibióticos presentes em afluentes e efluentes de ETARs apresentam concentrações altas, variando entre centenas de ng/L a algumas dezenas de µg/L [25].

Os antibióticos detetados com uma maior frequência são a eritromicina, a ciprofloxacina, a norfloxacina, a tetraciclina, a oxitetraciclina, o sulfametoxazol e o trimetoprim. Os estudos realizados demonstram que há uma remoção incompleta de alguns antibióticos nas águas residuais durante o tratamento, consequentemente existe uma maior concentração de antibióticos nas águas a jusante das descargas das ETARs comparativamente as respetivas zonas a montante. É importante salientar que também são detetados produtos de degradação em efluentes como ácido penicilóico, eritromicina-H_2O e N-acetilsulfametoxazol [25].

A presença destes compostos farmacêuticos nos efluentes irá afetar o meio hídrico recetor. Para além disso, observa-se que os níveis de antibióticos no rio onde existe maior densidade populacional, áreas urbanas, são maiores em relação aos meios rurais, uma vez que existe a entrada de um maior volume de águas residuais nos rios. É de notar que se observam elevadas concentrações de antibióticos nos países subdesenvolvidos, onde os processos de tratamento de águas residuais não são tão eficazes comparativamente aos tratamentos adotados nos países desenvolvidos [25].

2.2.2. Antibióticos presentes em águas Superficiais

Uma vez presentes nas águas residuais tratadas, os antibióticos acabam por chegar às águas superficiais. Assim, as classes de antibióticos detetadas nas águas superficiais são as mesmas detetadas nas águas residuais. No entanto, as concentrações detetadas neste meio são relativamente baixas, variando de ND[1] a vários milhares de ng/L, devido aos efeitos de diluição pela água do rio e adsorção por sólidos em suspensão e sedimentos. [25].

As classes de antibióticos mais detetadas nas águas superficiais são as dos macrólidos (eritromicina, roxitromicina e claritromicina), as quinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina e norfloxacina), as tetraciclinas (tetraciclina, clortetraciclina e oxiteraciclina) e as sulfonamidas (sulfametoxazol, sulfadiazina e sulfametazina) e trimetoprim. Além disso, verifica-se que a presença de antibióticos nas águas superficiais se altera sazonalmente, devido por um lado à sazonalidade de algumas doenças e por outro lado devido ao efeito das estações chuvosas, que facilitam a entrada de antibióticos depositados nos sedimentos presentes nos leitos de águas superficiais [25].

2.2.3. Antibióticos presentes em lençóis freáticos

São frequentemente detetados antibióticos nas águas subterrâneas com concentrações que variam desde ND[1] a alguns milhares de ng/L, sendo os macrólidos, quinolonas, tetraciclinas e sulfonamidas as principais classes de antibióticos encontradas. Além disso, é de notar a presença de quantidades vestigiais (0,2 – 200 ng/L)de trimetoprim nestas águas [25].

A concentração de antibióticos neste tipo de águas encontra-se associada à variabilidade sazonal. Através de um estudo realizado na China central, concluiu-se que as concentrações na água subterrânea das classes quinolonas e tetraciclinas variam sazonalmente, sendo a primavera a estação com a concentração mais elevada. Na primavera, verifica-se o aumento das chuvas o que leva à renovação dos lençóis freáticos através das águas superficiais, potenciando a lixiviação do solo [26].

Atualmente, são detetadas concentrações muito baixas de antibióticos em águas de consumo que, no entanto, podem causar efeitos adversos crónicos na saúde humana [25].

[1] **ND** – não detetável

3. Legislação

A Diretiva 91/271/CEE do Conselho Europeu, conhecida por Diretiva das Águas Residuais Urbanas, tinha como objetivo a proteção do ambiente dos efeitos nefastos das descargas de águas residuais urbanas. Assim, esta diretiva protegia o ambiente na União Europeia através da definição de regras relativas à recolha, tratamento e eliminação das águas residuais. Posteriormente, esta diretiva foi alterada pela Diretiva 98/15/CE e pelos regulamentos (CE) nº. 1882/2003 [27, 28].

Em 2000, através da Diretiva 2000/60/CE, definiu-se um enquadramento para a proteção das águas tanto superficiais interiores, costeiras como de transição e subterrâneas. Denominou-se esta diretiva como Diretiva Quadro da Água. Considerou-se que "a água não é um produto comercial como outro qualquer, mas um património que deve ser protegido, defendido e tratado como tal", assim, apresentou-se uma abordagem abrangente e integradora para a proteção e gestão sustentável de recursos hídricos com o objetivo de alcançar o bom estado das massas de águas superficiais e subterrâneas. Este documento abordou assuntos como, por exemplo: a monitorização do estado das águas de superfície, subterrâneas e das zonas protegidas (artigo 8); planos de gestão de bacia hidrográfica (artigo 13); estratégias de combate à poluição (artigo 16) [29].

Através da Decisão 2455/2001/CE, criou-se a primeira lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água alterando, assim, a diretiva anteriormente referida. Nesta lista, incluíram-se substâncias prioritárias identificadas como substâncias perigosas prioritárias e 33 substâncias prioritárias como metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos halogenados e pesticidas/herbicidas. Note-se que nenhum fármaco constava nesta lista [30].

A Diretiva 2006/118/CE relaciona-se com a proteção das águas subterrâneas contra a poluição e a deterioração das mesmas surgindo, assim, a Diretiva das Águas Subterrâneas, que estabelece que "as águas subterrâneas são um recurso natural valioso que, enquanto tal, deverá ser protegido da deterioração e da poluição química. Tal proteção é particularmente importante no que respeita aos ecossistemas dependentes das águas subterrâneas e à utilização destas águas para o abastecimento de água destinada ao consumo humano" e incluiu critérios para a avaliação do bom estado químico das águas subterrâneas; para a identificação e inversão de tendências significativas e persistentes para o aumento das concentrações de poluentes; para a definição dos pontos de partida para inversão destas tendências significativas e persistentes;

para o aumento das concentrações de poluentes e para a definição dos pontos de partida para inversão destas tendências. Posteriormente, surgiu a Diretiva 2014/80/EU que alterou o anexo II da Diretiva 2006/118/CE, relacionado com a proteção das águas subterrâneas contra a poluição e a deterioração [31, 32].

A Diretiva 2008/105/CE, conhecida por Diretiva das Substâncias Prioritárias (DSP), estabeleceu normas de qualidade ambiental focadas nas substâncias reportadas na Decisão 2455/2001/CE, alterando e, subsequentemente, revogando as Diretivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE e alterou a Diretiva 2000/60/CE. Esta diretiva considera que "a poluição química das águas de superfície representa uma ameaça para o ambiente aquático, com efeitos como toxicidade aguda e crónica para os organismos aquáticos, acumulação no ecossistema e perdas de habitats e de biodiversidade, além de constituir uma ameaça para a saúde humana". Além disso, a identificação das causas da poluição é de extrema importância e as emissões devem ser tratadas com caráter prioritário [33].

A Diretiva 2009/90/CE decretou as especificações técnicas para monitorização do estado químico da água e os critérios de desempenho mínimo para os métodos analíticos utilizados na monitorização do estado da água, garantindo, assim, a obtenção de dados importantes relativos usando métodos analíticos suficientemente sensíveis que garantam uma deteção fiável dos valores que ultrapassem as normas de qualidade ambiental [34].

A Diretiva 2013/39/EU alterou as diretivas mencionadas anteriormente, Diretiva 2000/60/CE e 2008/105/CE, no que toca às substâncias prioritárias no domínio da água. Face à evolução científica e tecnológica, esta diretiva reviu a lista de substâncias prioritárias presentes na Diretiva Quadro da Água, identificou novas substâncias para ação prioritária, estabeleceu as Normas de Qualidade Ambiental relativas às novas substâncias e atualizou as mesmas. A nova lista relativa às substâncias prioritárias incluiu 45 compostos, salientando três fármacos presentes nesta (diclofenac, 17alfa-etinilestradiol e 17beta-estradiol) [35].

A Decisão de Execução (UE) 2015/495 da comissão, de 20 de março de 2015, estabeleceu uma lista de vigilância das substâncias para a sua monotorização, incluindo um maior número de fármacos como eritromicina, claritromicina e azitromicina. A Decisão de Execução (UE) 2018/840 da Comissão, de 5 de junho de 2018, estabeleceu uma 2ª lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União Europeia, revogando a Decisão apresentada anteriormente. Neste documento, foram incluídos mais compostos, entre eles, fármacos como a amoxicilina e a ciprofloxicina. Posteriormente, surgiu a 3ª lista de vigilância das substâncias

a monitorizar a nível da União Europeia através da Decisão UE 2020/1161. Neste documento foram incluídos novos compostos como sulfametoxazol, trimetoprim, compostos azólicos, clotrimazol, fluconazol e miconazol [36, 37, 38].

Atualmente, encontra-se em vigor a Decisão UE 2022/1307, que apresenta a 4ª lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União Europeia e que inclui novas substâncias, tais como clindamicina, ofloxacina, metformina e guanilureia [39].

Outro ponto importante a referir é a proposta de Diretiva do Parlamento Europeu e do Conselho relativa ao tratamento de águas residuais urbanas (reformulação), de 26 de outubro de 2022, que tem como principal objetivo a reformulação da Diretiva 91/271/CEE, devido à simplicidade dos requisitos propostos. Assim, identificaram-se três conjuntos de desafios relacionados com os problemas da avaliação de impacto:

- → Poluição remanescente proveniente de fontes urbanas, onde se destacam os valores-limite definidos para os tratamentos de determinados poluentes, que se encontram desatualizados devido aos progressos tecnológicos existentes em 1991 e ao aparecimento de novos poluentes (microplásticos e micropoluentes);
- → Alinhamento da diretiva com o Pacto Ecológico Europeu, propondo novos objetivos no setor das águas residuais, como redução das emissões dos gases de efeito de estufa, diminuição do consumo de energia, melhoria na gestão das lamas e a reutilização segura da água tratada;
- → Governação insuficiente e desigual, uma vez que diversos estudos demonstram que os níveis de desempenho e de transparência das entidades gestoras são bastante variáveis [40].

Assim, introduziram-se novos artigos e substituíram-se outros da antiga Diretiva, de forma a assegurar a aplicação e o cumprimento adequados dos seus requisitos [40].

4. Estações de Tratamento de Águas Residuais

As águas residuais são tratadas em ETARs que são compostas por uma sequência de processos unitários (processos químicos e biológicos). O processo de tratamento de águas residuais engloba as seguintes etapas: tratamento preliminar, tratamento primário, secundário e terciário [41].

4.1. Tratamento Preliminar

O tratamento preliminar corresponde a uma sequência de operações unitárias que têm como objetivo a remoção de sólidos grosseiros, areias e gorduras. A finalidade desta etapa é evitar obstruções/danos nas tubagens ou equipamentos usados nos tratamentos seguintes havendo, assim, o aumento de eficiência da cadeia de tratamento. Assim, esta etapa engloba operações unitárias como gradagem, desarenação e remoção de óleos e gorduras [42].

4.2. Tratamento Primário

Segundo o Decreto-Lei nº 152/97, o tratamento primário corresponde ao processo físico e/ou químico que reduza no mínimo 20% da CBO_5 e 50% das partículas sólidas em suspensão nas águas residuais. As águas residuais passam por um processo físico denominado decantação primária onde as partículas sólidas em suspensão sedimentam por ação da gravidade e são removidas sob a forma de lamas primárias [10, 43].

4.3. Tratamento Secundário

O tratamento secundário é definido pela legislação como tratamento biológico com decantação secundária associada, que permite alcançar os valores legislados, reduzido a matéria orgânica biodegradável dissolvida ou em suspensão coloidal que não foi removida até esta etapa. Este tratamento biológico consiste na utilização de microrganismos, de forma a haver a degradação da matéria orgânica presente nas águas [10, 43].

4.4. Tratamento Terciário

O último nível de tratamento é o terciário que é composto por processos e operações unitárias adicionais utilizadas para a remoção específica de outros constituintes (por exemplo microrganismos patogénicos, sólidos em suspensão, nutrientes, compostos tóxicos). As águas provenientes deste tratamento podem ser reutilizadas para rega se cumprirem os requisitos estabelecidos pelo Decreto-Lei nº 119/2019. Em alternativa, existe a descarga das águas residuais tratadas no meio ambiente desde que sejam cumpridos os valores limites de emissão impostos pela licença de descarga da ETAR, emitida pelo Ministério do Ambiente com base na legislação em vigor [41, 43, 44].

Existem variados tratamentos terciários avançados como, por exemplo, tratamento por ultravioleta (UV), por ultrafiltração (UF), por plasma não térmico (PNT), por ozonização e processo eletroquímico tridimensional (3D).

4.4.1. Tratamento por ultravioleta

Uma das principais características das águas residuais é o facto de conterem uma elevada quantidade de organismos patogénicos que podem causar doenças e gerar efeitos adversos no meio ambiente. Assim, é importante eliminar estes organismos através da desinfeção das águas recorrendo, por exemplo, ao tratamento por ultravioleta [45].

Nesta etapa, recorre-se à radiação ultravioleta de forma a inativar microrganismos (vírus, bactérias, algas, fungos, bolores). O comprimento de onda ótimo utilizado para a inativação é de 254 nm, pois existe penetração da radiação no interior do ADN, perturbando o metabolismo das células. Assim, todos os microrganismos são desativados, impossibilitando a sua reprodução [46].

Na tabela 4.1, observa-se a dose de radiação UV que equivale à energia que os microrganismos vivos necessitam de absorver de forma a serem inativados. É importante salientar que a tabela representa níveis de dose de UV-C necessários para erradicar 99,9% dos microrganismos [46].

Tabela 4.1 - Dose UV que os microrganismos vivos necessitam de absorver para serem inativados [46].

Microrganismos		**Doses UV (mJ/cm^2)**
Bactérias	*E.coli*	10,5
	Legionnella pneumohila	6,90
	Salmonella enteridis	9,00
Alga	*Chlorella vulgaris*	22,0
Vírus	*Hepatitis*	8,00

A eficácia deste tratamento é influenciada por variados fatores, tais como: a presença de sólidos em suspensão que podem dispersar a radiação tornando o processo menos eficiente; o estado das lâmpadas, pois a sujidade ou envelhecimento reduzem a emissão de radiação; o caudal, quanto maior for o caudal, menor será o tempo de contacto e portanto menor será a eficiência do tratamento; e a configuração do reator onde se dá a operação, que deve otimizar o contacto entre a radiação UV emitida e a água residual [47].

4.4.2. Tratamento por ultrafiltração

Este tratamento é uma técnica de separação por membranas que se baseia na sua permeabilidade e tem como objetivo remover partículas com um tamanho superior à gama entre 0,001 e 0,1 μm. Assim, solventes e sais de baixo peso molecular passam através das membranas. Por outro lado, quando são moléculas maiores como as proteínas e as bactérias, estas são retidas. Uma das principais vantagens da utilização do processo de UF é o facto de este ser eficaz na remoção de bactérias, protozoários, vírus e de macromoléculas responsáveis pela cor e turbidez da água [48].

As membranas utilizadas são constituídas por uma camada de suporte de 100 μm de espessura e uma camada acima mais fina com 0,1 a 1,0 μm de espessura. O módulo de ultrafiltração é constituído por membranas, uma estrutura de suporte de pressão, alimentação, drenagem de concentrado e drenagem de permeado [49].

Este processo pode ser realizado em dois modos operatórios: circuito fechado ou com recirculação. No circuito fechado, a corrente de alimentação passa pela membrana havendo, assim, a acumulação de resíduos na superfície da membrana, consequentemente, obtém-se um

permeado relativamente limpo. Além disso, não existe a recirculação do concentrado. No que toca ao circuito com recirculação, a água filtrada é reencaminhada novamente para a entrada da membrada, promovendo a homogeneização do concentrado na superfície das membranas [48]. Na figura 4.1, encontram-se representados de forma esquemática os dois modos operatórios da ultrafiltração.

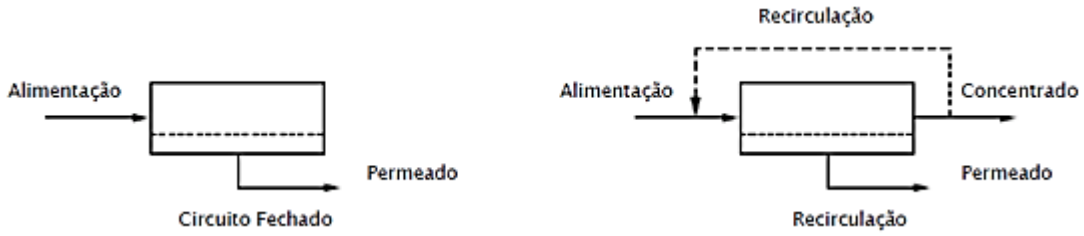

Figura 4.1 - Modos operatórios da ultrafiltração [48].

O modo de operação em circuito fechado é caracterizado por consumir menos energia, contudo a eficácia da filtração decresce rapidamente, visto que o concentrado não sofre mistura. Assim, existe a formação de um gradiente de concentração junto à membrana, aumentando a pressão necessária devido à elevada concentração existente [48].

4.4.3. Tratamento através de plasma não térmico

A aplicação do tratamento com plasma não térmico a águas contendo antibióticos começou a ser investigada há uma década e caracteriza-se por ser um processo de degradação de contaminantes em geral [50].

O plasma não térmico é produzido através de descargas elétricas em gases tanto a pressão atmosférica como a pressões mais baixas. As descargas elétricas para produzir plasma não térmico (PNT) são, geralmente, realizadas em ar atmosférico. Este reage com a água de circulação, formando radicais altamente reativos e emite, simultaneamente, luz violeta que provoca a degradação de bactérias filamentosas e oxida a maioria dos compostos orgânicos e inorgânicos [51, 52].

O plasma não térmico produzido através de ar atmosférico é constituído por uma mistura de vários agentes oxidantes como radicais livres ou moléculas e átomos excitados. Estas espécies formadas dependem da fonte de ar utilizada, sendo as principais espécies formadas: moléculas de azoto e oxigénio no estado excitado; espécies reativas de oxigénio (ROS), como

o ozono; espécies reativas de azoto (RNS), como o óxido nítrico. É importante salientar que, caso exista humidade no ar, há formação de radicais de hidroxilo (•OH) ou de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) [52].

A maior parte dos estudos realizados acerca da degradação de antibióticos através do tratamento de plasma não térmico recorre a descargas em barreira dielétrica e descargas em corona. No reator de descarga em barreira dielétrica, a descarga elétrica ocorre entre dois elétrodos separados por um material dielétrico, produzindo corrente. No reator de descarga em corona, a descarga elétrica ocorre através da ionização de um gás entre dois elétrodos [50, 52].

4.4.4. Tratamento por ozonização

A ozonização é bastante utilizada graças ao seu elevado potencial de oxidação total ou parcial dos compostos resistentes que não são degradados nos sistemas biológicos de tratamento, tais como, pesticidas, produtos farmacêuticos e de higiene pessoal, tendo ainda um efeito de desinfeção da água. Este processo inativa os microrganismos através da oxidação dos compostos presentes na membrana celular e citoplasma destruindo, consequentemente, o ADN destes. Os elevados custos deste processo fazem com que seja preferencialmente utilizado em instalações de grandes dimensões [42, 53].

O tratamento por ozonização é praticado a jusante do processo secundário e pode ser complementado com uma filtração com areia ou carvão ativado. O ozono é produzido através de ar ou de oxigénio puro. O equipamento destinado à produção deste componente é composto por várias unidades, como se pode observar na figura 4.2, tais como, sistema de preparação do gás de alimentação, gerador de ozono, sistema de transferência para água, equipamento para a destruição do ozono residual e equipamento de segurança [42].

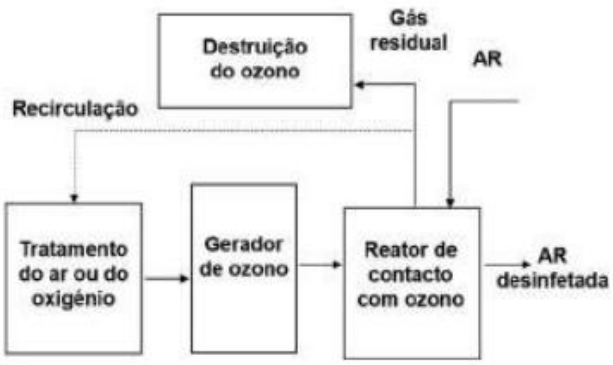

Figura 4.2 - Esquema de uma instalação de ozonização [42].

4.4.5. Tratamento eletroquímico tridimensional (3D)

O tratamento eletroquímico tridimensional (3D) é baseado no processo eletroquímico bidimensional (2D), que corresponde ao processo convencional. Esta tecnologia é um processo de tratamento de águas residuais bastante eficaz, possui um baixo consumo de energia e é capaz de mineralizar completamente poluentes orgânicos não biodegradáveis [54, 55].

O reator 3D é composto por um ânodo, um cátodo, tal como no processo 2D, e além disso possui um terceiro elétrodo, sob a forma de partículas. O elétrodo de partículas é constituído por materiais granulares ou fragmentados, sendo geralmente materiais porosos com excelente condutividade elétrica e atividade catalítica, grande área de superfície específica e alta estabilidade mecânica e química. Neste tipo de tratamento são utilizados diversos tipos de elétrodos particulados como por exemplo *biochar* e cortiça. O primeiro apresenta bom desempenho na remoção de fármacos em termos de fatores energéticos, eficiência de remoção e tempo de reação. Já no caso da cortiça, esta é caracterizada por ser um material sustentável e biodegradável e possui um potencial como bioadsorvente no que toca no tratamento de águas. Um dos fatores mais importantes neste tipo de sistemas é a tensão de corrente, uma vez que influencia a oxidação eletroquímica e o comportamento de polarização dos elétrodos das partículas [54, 55].

O mecanismo deste tratamento caracteriza-se por ser complexo e depende de diversos fatores, tais como, os contaminantes presentes nas águas residuais, os materiais utilizados em elétrodos e, também, o elétrodo de partículas utilizado [54].

As partículas localizadas entre o ânodo e o cátodo não possuem um contacto elétrico direto, atuam simultaneamente como microeléctrodos, aumentam a distribuição da carga iónica, e possivelmente como adsorventes. É na superfície do elétrodo que ocorrem as principais reações de oxidação direta e indireta [54].

5. Ecotoxicidade/Ecotoxicologia

A ecotoxicologia engloba os princípios de várias ciências como a ecologia, a toxicologia, a química, entre outras. Esta ciência tem como principal objetivo estudar e avaliar os efeitos de agentes físicos e químicos sobre os organismos nos seus ecossistemas [56].

5.1. Tipos de testes de ecotoxicidade

Os testes de ecotoxicidade têm como principal objetivo estudar e avaliar os efeitos de agentes físicos e químicos sobre os organismos e seus ecossistemas. Assim, através da realização deste tipo de ensaios, existe um rastreio de potenciais perigos de contaminantes aquáticos, o desenvolvimento de critérios da qualidade da água e a monitorização da toxicidade dos efluentes [56, 57].

Os bioensaios realizados em microrganismos para avaliar a ecotoxicidade devem assentar nos seguintes pontos: o que significam os resultados obtidos a nível ambiental; os resultados obtidos em laboratório podem ser alcançados num sistema recetor; o bioensaio é suficientemente sensível de modo a evitar resultados falsos excessivos; a precisão do teste é suficiente para as análises pretendidas; a repetibilidade do ensaio [58].

Os testes de avaliação da ecotoxicidade podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição (agudo ou crónico), tipo de efeito (morte, crescimento e reprodução) ou resposta efetiva (letal ou subletal). A escolha do tipo de teste a utilizar é um fator bastante importante, pois a escolha acertada leva à obtenção de resultados confiáveis [59].

Começa-se por realizar um teste padrão de forma a verificar o procedimento de ensaio após mudanças relacionadas com as condições ambientais como o pH, tempo de exposição, entre outros. Uma substância inibidora de referência é o 3,5-diclorofenol que pode ser utilizado num estudo interlaboratorial comparativo. No caso das microalgas verdes, recorre-se ao dicromato de potássio como substância de referência [6, 59].

No final de cada teste, os resultados obtidos podem ser analisados através da comparação da percentagem de efeito para organismos expostos ao ambiente contaminado e a correspondente verificada para os organismos que não foram expostos ao ambiente contaminado, que funcionam como teste de controlo [8].

Os resultados obtidos são utilizados para determinar a menor concentração com efeito observável (LOEC), concentração sem efeitos observáveis (NOEC) e a concentração efetiva

que causa redução de x% de efeito na população (CE_X). A LOEC corresponde à concentração mais baixa na qual se observa que o produto químico em estudo, num determinado período de

exposição, tem um efeito estatisticamente significativo na redução do crescimento comparando com o controlo. É de esperar que as concentrações superiores à LOEC devem possuir um efeito prejudicial igual ou superior verificado com a LOEC. A NOEC corresponde à concentração de ensaio imediatamente inferior à LOEC. Por último, CE_X corresponde à concentração do produto químico em estudo que resulta numa redução de x% do crescimento do organismo após um determinado período de exposição. No entanto, desenvolvimentos científicos recentes recomendam o abandono do conceito de NOEC e a substituição deste conceito por estimativas pontuais, CE_X , que se baseiam numa regressão. Não foi estabelecido nenhum valor apropriado para x, mas dependendo da variável de resposta escolhida, o intervalo de 10 a 20% é adequado. Assim, tanto o CE_{10} como CE_{20} devem ser relatados [5, 6].

5.2. Organismos Teste

Outro fator a ter em conta são os organismos teste a utilizar. Estes podem ser agrupados em diversos níveis tróficos: microrganismos, produtores (plantas e algas), consumidores primários (invertebrados) e consumidores secundários (peixes) [8].

A toxicidade do meio aquático interfere com o desenvolvimento dos organismos presentes e, por isso, são utilizados organismos de diferentes níveis tróficos como indicares biológicos de poluição na água [60].

É importante salientar que os ensaios com organismos que pertencem a um nível trófico baixo servem como indicador de alerta precoce relativamente aos potenciais efeitos nos níveis tróficos mais elevados [58].

5.2.1. Bactérias, Invertebrados e Peixes

A bactéria marinha *Vibrio fischeri* é uma espécie luminescente, sendo sensível a uma vasta gama de substâncias tóxicas. Quando exposta a uma determinada substância tóxica, existe a interrupção do processo respiratório, que, consequentemente, afeta o processo metabólico que converte energia química em luz visível. Este organismo é usado para avaliar a ecotoxicidade nas águas residuais industriais e urbanas [60, 61].

No grupo dos invertebrados (consumidores primários) recorre-se à *Daphnia magna*, uma espécie de dáfnias utilizada para a avaliação da ecotoxicidade. Este organismo é bastante sensível a variações ambientais naturais (variações de temperatura, concentração de sais do meio, entre outros) e variações resultantes da atividade humana (contaminação do meio aquático, por exemplo). Assim, sendo sensíveis a qualquer alteração do meio, podem prever potenciais consequências para o restante ecossistema aquático, sendo usadas para avaliar a ecotoxicidade em águas residuais [60, 62].

O grupo dos peixes (consumidores secundários) inclui o peixe-zebra, *Danio rerio*, usado na avaliação da ecotoxicidade de águas residuais industriais. Este peixe de água doce possui uma elevada tolerância a variações ambientais como pH (5,9 a 8,5) e temperatura (16 a 38 ºC). Outra espécie incluída neste grupo é a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, utilizada em ensaios de avaliação da ecotoxicidade da água potável desinfetada e águas residuais urbanas tratadas. Esta espécie tolera uma vasta gama de ambientes, uma vez que se move da água doce para a salgada [60, 63, 64].

5.2.2. Microalgas

No grupo plantas e algas são utilizadas dois tipos de microalgas: *Scenedesmus subspicatus* e *Raphidocelis subcapitata, s*endo a primeira mais usada para a avaliação da toxicidade das águas residuais industriais, e a *Raphidocelis subcapitata* mais utilizada para a avaliação da toxicidade das águas residuais urbanas e industriais [60].

As microalgas são seres microscópicos e unicelulares predominantemente aquáticos. Estes organismos são providos de clorofila e realizam a fotossíntese, sendo seres autotróficos recorrem a CO_2 como fonte de carbono e produzem O_2. Outra característica destes seres é o facto de se multiplicarem de forma exponencial sob condições ambientais favoráveis [65, 57, 66].

As algas são encontradas na natureza em rios, lagos e oceanos, sendo fonte de alimento e produzindo cerca de 50% do oxigénio do mundo [67].

Estes seres unicelulares são utilizados como indicadores biológicos, uma vez que se encontram na base da cadeia alimentar em ambientes aquáticos. Por constituírem a base de várias cadeias alimentares e fornecerem energia aos níveis tróficos superiores, um efeito tóxico que afete esta base terá consequências nos restantes níveis. Assim, têm sido muito utilizados para avaliar o impacto ecológico devido à sua alta sensibilidade [57, 68, 69].

A *Raphidocelis subcapitata*, anteriormente conhecida por *Pseudokirchneriella subcapitata*, é uma microalga verde de água doce e é uma das espécies mais utilizadas em testes de inibição do crescimento de algas, tanto em ensaios de ecotoxicidade em águas residuais como na avaliação do risco ambiental dos compostos químicos. A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) recomenda a utilização desta espécie devido à sua elevada taxa de crescimento, sensibilidade a compostos tóxicos e à boa reprodutibilidade em comparação com outras espécies [57, 70].

5.2.2.1. Estudos da ecotoxicidade de antibióticos usando a microalga Raphidocelis subcapitata

Devido à preocupação crescente em torno da presença de antibióticos nos ecossistemas, têm sido realizados vários estudos ecotoxicológicos com a microalga *R. subcapitata*. Na tabela 5.1, apresenta-se uma revisão de alguns desses estudos. Os estudos focam-se, sobretudo, nas seguintes classes: quinolonas, sulfonamidas e macrólidos. Observa-se que a microalga tem uma elevada sensibilidade ao sulfametoxazol, à claritromicina, à eritromicina, à azitromicina e à oxitetracilina, com valores de CE_{50} abaixo de 1 mg/L [71].

Tabela 5.1 - Efeitos ecotoxicológicos de antibióticos na microalga *Raphidocelis Subcapitata*, adaptado [71].

Classe de antibiótico	Antibiótico	Ensaio	Ponto Final [2]	Resposta	Referência
Quinolonas	Enrofloxacina	Inibição de crescimento, 72 h	CE_{50}	18,70 mg/L	[72]
	Ciprofloxacina	Inibição de crescimento, 72 h	CE_{50}	113 mg/L	[73]
				187 mg/L	[72]
	Norfloxacina	Inibição de crescimento, 72 h	CE_{50}	16,6 mg/L	[74]
	Ofloxacina	Inibição de crescimento, 72 h	CE_{50}	12,1 mg/L	[72]
				1,44 mg/L	[75]
Sulfonamidas	Sulfametazina	Inibição de crescimento, 96 h	CE_{50}	3,235 mg/L	[67]
	Sulfametoxazol	Inibição de crescimento, 96 h	CE_{50}	0,6120 mg/L	[67]
		Inibição de crescimento, 72 h	CE_{50}	0,52 mg/L	[75]
Trimetoprim	Trimetoprim	Inibição de crescimento, 72 h	CE_{50}	129 mg/L	[76]
				80,3 mg/L	[74]
		Inibição de crescimento, 96 h	CE_{50}	83,8 mg/L	[77]
Macrólidos	Claritromicina	Inibição de crescimento, 72 h	CE_{50}	0,046 mg/L	[78]
				0,002 mg/L	[75]
	Eritromicina	Inibição de crescimento, 96 h	CE_{50}	0,056 mg/L	[67]
		Inibição de crescimento, 72 h	CE_{50}	0,35 mg/L	[79]
				0,02 mg/L	[75]
				0,0366 mg/L	[74]
	Azitromicina	Inibição de crescimento, 72 h	CE_{10}	0,018 mg/L	[80]
			CE_{20}	0,026 mg/L	
			CE_{50}	0,051 mg/L	
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	Inibição de crescimento, 72 h	CE_{50}	1,04 mg/L	[76]
			CE_{50}	0,342 mg/L	[74]

Na revisão realizada por Välito *et al.* [71], encontra-se uma lista dos antibióticos de elevada preocupação em termos ecotoxicológicos. Esta lista teve em atenção os seguintes parâmetros: o elevado consumo, deteção frequente no meio ambiente, persistência e efeitos tóxicos detetados a baixas concentrações. Os antibióticos detetados no meio ambiente com

[2] **CEx** corresponde à concentração do produto químico em estudo que resulta numa redução de x% do crescimento do organismo após um determinado período de exposição (concentração efetiva).

concentrações mais elevadas foram a enrofloxacina, a ciprofloxacina, a norfloxacina, o sulfametoxazol, o trimetoprim, a azitromicina, a eritromicina e a oxitetracilina. É importante salientar que as concentrações detetadas destes excedem 1 μg/L. No que toca aos efluentes de águas residuais, verificou-se que a ofloxacina e claritromicina também apresentam concentrações acima de 1 μg/L [71].

Os efeitos tóxicos destes fármacos nas algas verdes estão possivelmente relacionados com a inibição ou interferência na atividade dos cloroplastos que são responsáveis pelo processo da fotossíntese. Assim, existem perturbações no processo fotossintético da microalga, que consequentemente afetam o crescimento celular [71].

Através dos resultados obtidos nestes ensaios, verifica-se que o antibiótico mais tóxico para esta espécie de microalga é a claritromicina, apresentando a menor concentração do antibiótico em estudo que resulta numa redução de 50% do crescimento da microalga (CE_{50} = 0,002 mg/L). De seguida, a azitromicina com um CE_{50} igual a 0,018 mg/L e a eritromicina com um CE_{50} igual a 0,02 mg/L, sendo os segundos mais tóxicos. O antibiótico que apresenta o maior valor de CE_{50} é a ciprofloxacina, com um CE_{50} igual a 187 mg/L, tornando-se o menos tóxico da lista apresentada.

Em alguns casos, como o sulfametoxazol e a ciprofloxacina, observou-se que as concentrações obtidas em águas superficiais foram maiores do que as concentrações obtidas em efluentes de estações de tratamento de águas residuais. Este facto pode ser explicado através da bioacumulação em organismos aquáticos e da acumulação proveniente de fontes adicionais como escorrências de zonas agrícolas que acabam por ser introduzidas nas águas superficiais. Nem todos os antibióticos encontrados no meio ambiente são prejudiciais, no entanto, é necessário identificar os que apresentam maiores riscos. Mundialmente, as sulfonamidas, macrolídeos e quinolonas são as classes de antibióticos mais consumidas [71].

É de notar que antibióticos com elevada toxicidade como a enrofloxacina, a eritromicina e a azitromicina se encontram incluídos na 1ª lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União Europeia [36]. Já a ciprofloxacina encontra-se na 2ª lista de vigilância estabelecida pela União Europeia [37]. Na última lista, incluiu-se o sulfametoxazol e o trimetoprim [38].

6. Descrição Experimental

6.1. Testes de inibição de crescimento da microalga

Os ensaios de ecotoxicidade foram realizados utilizando a microalga de água doce *Raphidocelis subcapitata*, tendo como objetivo determinar possíveis efeitos inibidores no seu crescimento.

Os organismos-teste devem encontrar-se sob condições ideais de fornecimento de nutrientes, iluminação e temperatura. Eles são expostos à substância em teste em culturas durante 72 horas, correspondendo a um teste crónico pois abrange várias gerações de microalgas.

A resposta do sistema é avaliada em função da concentração de exposição em comparação com o crescimento das culturas de controlo. É importante salientar que as culturas de controlo não se encontram expostas à substância em teste. Para se obter uma caracterização completa do sistema relativamente aos efeitos tóxicos, é necessário que exista o crescimento exponencial não limitado das culturas. Assim, é necessária uma quantidade suficiente de nutrientes e condições de iluminação constante durante um período suficiente [5].

Estes ensaios foram realizados de acordo com o teste de inibição para algas que se encontra descrito no Regulamento (UE) nº 2016/266, 7 de dezembro de 2015, que segue o documento "Guidelines for the Testing of Chemicals: Freshwater Algas and Cyanobacteria Growth Inhinition Test", OCDE 2011 [5; 6].

O procedimento experimental destes ensaios foi realizado numa câmara de fluxo laminar (Faster, modelo Two 30) e consistiu na adição da substância de ensaio a matrazes de 250 mL, de seguida, na adição do meio de cultura e, por último, a microalga. É importante salientar que o volume de microalga (inóculo) adicionado em todos os matrazes possui um valor igual (5 mL). Assim, obtém-se em cada matraz um volume total de 50 mL. Note-se que todo o material utilizado neste ensaio foi previamente esterilizado numa autoclave (AJC, Uniclave 88) a 121 ºC, durante 20 minutos.

Foram testadas águas residuais provenientes do tratamento secundário e quatro tratamentos terciários (UV, UF, PNT e processo eletroquímico 3D). Foram realizadas quatro réplicas de cada concentração testada e dos ensaios de controlos (meio de cultura e microalga).

De forma a evitar contaminações e haver trocas gasosas, os matrazes foram incubados com uma rolha estéril de algodão cardado e gaze que, por sua vez, foram protegidos com papel de alumínio.

De maneira a promover a agitação contínua, recorreu-se a um agitador orbital (Busen AO-400) a uma velocidade de 70 rpm durante as 72 h de ensaio.

Os ensaios decorreram a uma temperatura na gama 22 ± 2 °C, utilizando ar condicionado (Haice), iluminação contínua (intensidade luminosa 6400-6500 lux, luxímetro LX-1102) proporcionada por quatro lâmpadas fluorescentes geradoras de luz branca universal como definido no Regulamento (UE) 2016/266 [5].

No início do ensaio, foram retiradas amostras dos matrazes correspondentes à 4ª réplica do ensaio para cada concentração a fim de efetuar a medição da fluorescência, recorrendo a um leitor de microplacas (Biotek Synergy HT, software Gen5, versão 2.0.18 (EUA)). Também se mediu-se o pH (Consort C861). Após as 72 h, foram retiradas amostras de todos os matrazes e efetuou-se a medição da fluorescência e do pH nos equipamentos anteriormente referidos.

6.2. Organismo de Ensaio

A cultura da alga utilizada, *Raphidocelis subcapitata*, pertence à estirpe 278/4 e é proveniente do *Culture Centre of Algae and Protozoa* (Reino Unido).

Realizou-se a transferência da microalga para matrazes de vidro esterilizados com uma rolha de algodão cardado e gaze que foram envolvidos com papel de alumínio (figura 6.1), de forma a permitir as trocas gasosas e evitar as contaminações com outros microrganismos.

Figura 6.1 - Cultura de alga *Raphidocelis subcapitata*.

6.3. Meio de Cultura

O meio de cultura tem como objetivo promover o crescimento das culturas de algas. Este meio foi preparado de acordo com as diretrizes do regulamento referido anteriormente que, por sua vez, segue as diretrizes da OCDE. Assim, na tabela A.1 presente no anexo A, encontram-se apresentadas as composições de cada uma das soluções utilizada para a preparação do meio de cultura [5].

É importante salientar que as soluções apresentadas na tabela A.1 foram esterilizadas na autoclave a 120 °C, durante 20 minutos. As soluções de reserva foram guardadas num frigorífico a uma temperatura de 4 °C. Para além das soluções preparadas, todos os materiais utilizados na preparação das soluções foram esterilizados na autoclave. A preparação do meio de cultura foi realizada em condições asséticas e, para isso, recorreu-se a uma câmara de fluxo laminar, de forma a evitar contaminações das culturas de algas.

6.4. Teste com dicromato de potássio (substância inibidora de referência)

Previamente, foi realizado um ensaio com uma substância de referência, o dicromato de potássio. Este ensaio teve como objetivo demonstrar que, nas condições de ensaio, a sensibilidade da espécie de alga utilizada não se alterou significativamente, isto é, as culturas de controlo apresentam uma taxa de crescimento de acordo com os valores de referência definidos [5].

A sensibilidade da alga *Raphidocelis subcapitata* foi verificada e obteve-se um valor para CE_{50} (0-72h) de 0,50 mg/L, que se encontra dentro dos limites definidos pelo Regulamento (EU) nº 2016/266, 7 de dezembro de 2015, (0,20-0,75 mg/L) [5].

Os resultados obtidos neste ensaio encontram-se no Anexo B.

6.5. Critérios de validade dos ensaios

É necessário ter em conta os seguintes critérios de validade: a variação do pH (medidor de pH *Crison*, micropH 2002) deve ser medida no início do ensaio e decorridas as 72 horas, sendo que esta variação nos ensaios de controlo não deverá variar mais do que 1,5 unidades; as culturas deverão ser mantidas a uma temperatura controlada compreendida entre 21 e 24 ºC (± 2 ºC); os matrazes deverão ser colocados de forma aleatória no agitador orbital e esta posição deve ser alterada diariamente; as culturas deverão ser incubadas com uma iluminação fluorescente contínua e uniforme; a variação da % inibição de crescimento entre réplicas não deve ter um desvio superior a 20% [5].

A variação do pH no início e decorridas as 72 horas encontra-se apresentada no Anexo C.

7. Resultados e Discussão

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ecotoxicidade antes e após diversos tratamentos terciários de águas residuais como complemento da avaliação da eficiência dos tratamentos.

A eficiência destes tratamentos foi avaliada através da percentagem de inibição de crescimento que é dada pela seguinte equação:

$$I(\%) = \frac{\Delta F_C - \Delta F}{\Delta F_C} \times 100 \quad [1]$$

Onde I é a percentagem de inibição de crescimento, ΔF_c corresponde à variação da fluorescência nas culturas de controlo e ΔF é a variação da fluorescência nas culturas expostas à substância de teste.

As águas residuais testadas são provenientes do tratamento secundário e de quatro tratamentos terciários: UV, ultrafiltração, plasma não térmico e eletroquímico 3D.

Seguindo as diretrizes presentes na norma 201 da OCDE (2011), recorreu-se à representação gráfica da percentagem de inibição de crescimento versus o logaritmo da concentração testada. Nos casos em que verificou inibição, foram estimadas as concentrações efetivas para 50, 20 e 10% de inibição, CE_{10}, CE_{20} e CE_{50}, respetivamente, através da interpolação linear, ou em alguns casos por extrapolação dos resultados obtidos [6].

7.1. Tratamentos físico-químicos avançados - efeito ecotoxicológico

De forma a concluir a avaliar eficiência de diversos tratamentos terciários, estes foram comparados com o tratamento secundário. Os resultados das concentrações utilizadas (C), logaritmo das mesmas (log C) e inibição de crescimento (I %) obtidos apresentam-se na tabela 7.1.

Tabela 7.1 - Resultados obtidos nos ensaios realizados (tratamento secundário, UV, PNT e ultrafiltração).

		Tratamento Secundário	UV	PNT	Ultrafiltração
C (%)	**log C**	**I (%)**	**I (%)**	**I (%)**	**I (%)**
2,5	0,398	-14,9	-49,4	-23,8	-79,7
5	0,698	-37,5	-27,9	-59,0	-26,5
10	1,00	-62,4	-56,9	-49,2	-66,1
20	1,30	-55,7	-74,4	-26,1	-73,6
40	1,60	24,8	0,11	-6,6	-66,3

Os resultados apresentados na tabela 7.1 encontram-se ilustrados na figura 7.1.

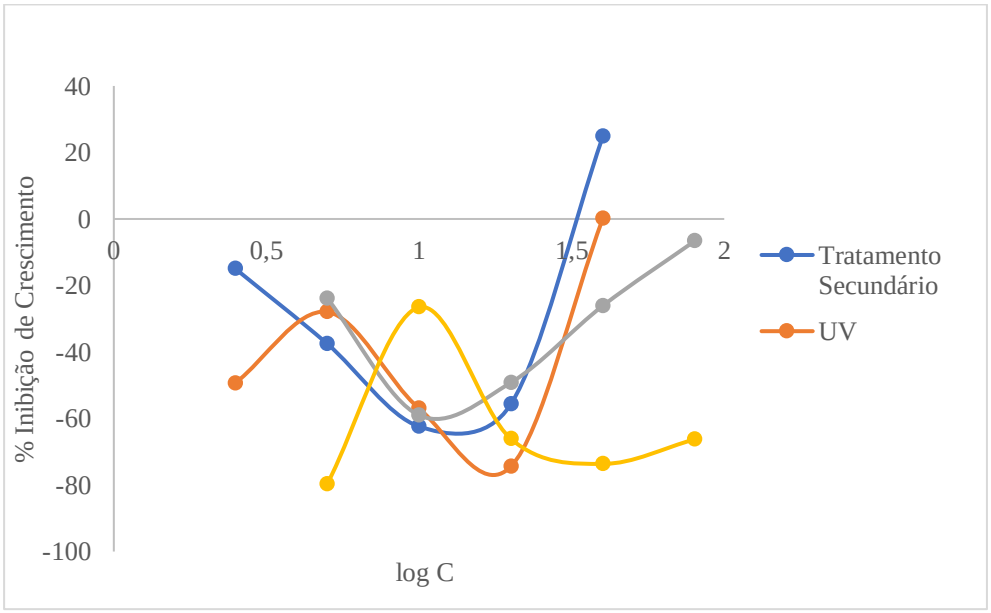

Figura 7.1 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração do efluente (tratamento secundário, UV, PNT e ultrafiltração).

Na tabela 7.2, apresenta-se a caracterização da água proveniente do tratamento secundário. Os valores apresentados do Decreto-Lei 152/97 destinam-se a uma ETAR que serve uma população com mais de 100 000 habitantes equivalentes, uma vez que a ETAR em estudo possui uma população de 300 000 habitantes equivalentes [10].

Tabela 7.2 - Caracterização da água proveniente do tratamento secundário.

Parâmetros	Água Residual	Valor limite de emissão[1]
Azoto Total (mg/L N)	41,0	10
Fósforo Total (mg/L P)	3,6	1
Condutividade (µS/cm)	1506	-
CQO (mg/L O_2)	75,0	125
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	4,00	35

[1] Valores definidos pelo Decreto-Lei 152/97.

Através dos resultados apresentados é possível observar que todos os tratamentos potenciam o crescimento da alga, uma vez que as concentrações de nutrientes (azoto e fósforo) presentes nas águas residuais são bastante elevados. Além disso, verifica-se que estes valores se encontram acima dos definidos pelo Decreto-Lei 152/97. Observa-se que para o azoto total é definido um valor limite de 10 mg/L N e o valor obtido para o tratamento secundário é de 41 mg/L N. Já para o fósforo total, o valor estipulado é de 1 mg/L P e o obtido para as águas provenientes do tratamento secundário é de 3,6 mg/L P [10]. No tratamento secundário, é possível verificar que para uma concentração de 40% existe inibição de crescimento ($\approx$ 24,8%), esta situação pode ser justificada devido à presença de sólidos suspensos totais (SST) na solução, pois a presença destes afeta o processo da fotossíntese que, consequentemente, afeta o desenvolvimento da microalga. No caso do tratamento UV, também para uma concentração de 40%, existe uma inibição de crescimento aproximadamente igual a 0,1%. É importante salientar que, antes da água passar para os tratamentos terciários (UV, PNT e UF), ela é filtrada através de um filtro de areia, o que permite reduzir a presença de sólidos suspensos totais. Devido a esse facto, os tratamentos de PNT e UF não apresentam percentagens de inibição de crescimento relacionadas com a presença de SST e o tratamento por UV apresenta uma percentagem de inibição de crescimento bastante baixa.

Como o tratamento secundário e o tratamento por UV apresentam inibição de crescimento, apenas para estes foi possível estimar os parâmetros ecotoxicológicos (tabela 7.3).

Tabela 7.3 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes ao tratamento secundário e UV.

	Tratamento Secundário	**UV**
CE_{10}	35,2%	69,6%
CE_{20}	38,4%	>100%
CE_{50}	49,7%	

Analisando os resultados presentes na tabela 7.3, verifica-se que o tratamento com mais efeitos ecotoxicológicos é o tratamento secundário, pois possui um CE_{50} superior como esperado. O tratamento por UV também só em concentrações elevadas no meio hídrico recetor (> 70%) é que poderia ter algum efeito, valores que não serão expectáveis em contexto real. Tendo em conta que os restantes tratamentos terciários apresentam potenciação do crescimento da alga, pode afirmar-se que estes tratamentos são mais eficientes em comparação com o tratamento secundário e UV, não deixando de ser preocupantes os níveis de nutrientes que poderão levar à eutrofização do meio recetor.

7.2. Tratamentos eletroquímicos avançados - efeito ecotoxicológico

i. Água ultrapura com NaCl

Uma vez que é comum usar-se um eletrólito nos processos eletroquímicos de tratamento, começou-se por testar uma solução aquosa (água ultrapura) com NaCl com uma concentração de 0,02 mol/L. No tratamento eletroquímico 3D utilizou-se como elétrodo particulado um biochar (podas de vinhas da casta Touriga Nacional pirolisadas, granulomentria 1-2 mm). No ensaio 1 testou-se a solução de eletrólito (NaCl 0,02 mol/L e água ultrapura). No ensaio 2 submeteu-se a mesma solução a uma corrente elétrica, com uma intensidade de corrente de 0,1 A, correspondendo a densidade de corrente de 17 mA/cm^2, durante 30 minutos. O resumo das condições operatórias de cada ensaio encontra-se na tabela 7.4. Com estas duas soluções realizaram-se os testes de inibição de crescimento, cujos resultados, relativamente às concentrações utilizadas (C), logaritmo das mesmas (log C) e inibição de crescimento obtida (I %) se apresentam na tabela 7.5.

Tabela 7.4 - Condições operatórias do ensaio 1 e 2.

Ensaio	[NaCl] mol/L	Intensidade de corrente (A)	Densidade de corrente (mA/cm^2)
1	0,02	-	-
2		0,1	17

Tabela 7.5 - Resultados obtidos para os ensaios 1 e 2.

		Ensaio 1	Ensaio 2
C (%)	**log C**	**I (%)**	
2,5	0,398	56,4	-53,4
5	0,698	63,9	2587
10	1,00	9,73	2436
20	1,30	53,1	2244
40	1,60	18,1	2229

Os resultados obtidos na tabela 7.5 encontram-se representados na figura 7.2.

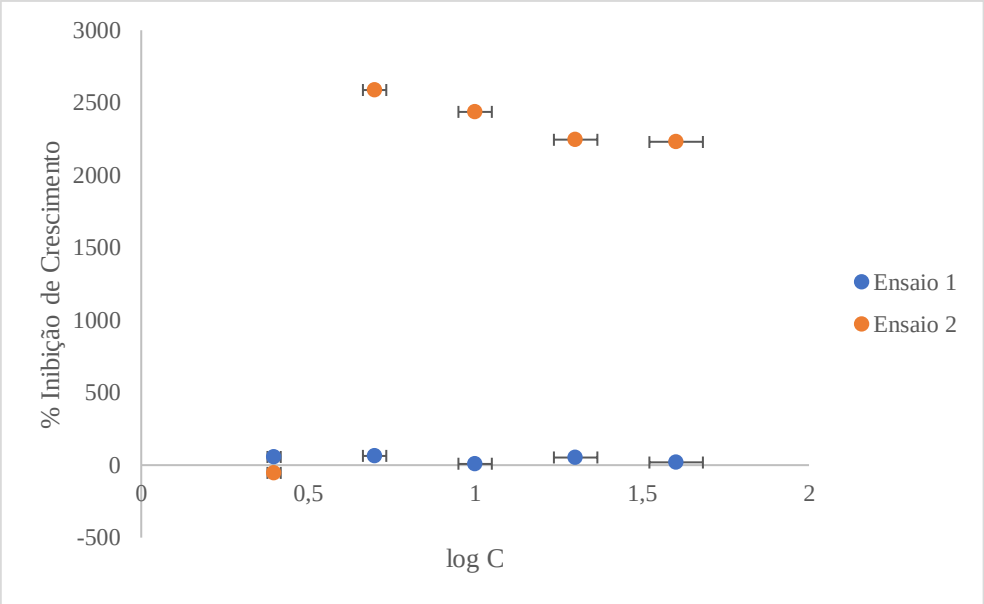

Figura 7.2 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração da solução para o ensaio 1 (NaCl] = 0,02 mol/L e ausência de corrente elétrica) e 2 1 (NaCl] = 0,02 mol/L; presença de corrente elétrica; 0,1 A).

A estimativa dos valores das concentrações efetivas CE_{10}, CE_{20} e CE_{50} apresentam-se na tabela 7.6.

.Tabela 7.6 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes aos ensaios 1 e 2.

	Ensaio 1	**Ensaio 2**
CE_{10}	10,6%	2,54%
CE_{20}	11,8%	2,55%
CE_{50}	19,1%	2,57%

Observando os resultados da tabela 7.6, verifica-se que o ensaio 2 possui uma elevada toxicidade comparativamente ao ensaio 1, pois uma menor concentração da solução aquosa que resulta numa redução de 50% do crescimento da microalga, CE_{50}. A passagem de corrente elétrica pela solução com NaCl causa a produção de espécies reativas de cloro tornando assim a solução extremamente tóxica para a microalga.

ii. Água ultrapura com fármacos

De forma a avaliar a eficiência de remoção de fármacos deste tratamento, procederam-se a ensaios com água ultrapura com uma concentração conhecida de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprim (TMP) e condições de operação diferentes. Utilizaram-se reatores de dimensões diferentes, cujas dimensões se apresentam na tabela 7.7.

Tabela 7.7 - Características dos reatores utilizados nos ensaios.

	Volume (mL)	**Área útil dos elétrodos (cm^2)**
Reator 1	150,0	15,00
Reator 2	750,0	33,75

Para a avaliação da taxa de remoção dos fármacos, determinaram-se as concentrações de SMX e TMP por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *Shimadzu HPLC*) utilizando um detetor de matriz de díodos (SPD-M20A).

Para o ensaio realizado no reator 1, começou-se por testar a ecotoxicidade de uma solução de água ultrapura contendo SMX e TMP (10 mg/L cada) e NaCl com uma concentração de 0,015 mol/L (ensaio 3). De seguida, realizaram-se dois ensaios com soluções com a mesma

composição do ensaio 3, onde se submeteram as mesmas à passagem de corrente elétrica com intensidades diferentes e diferentes quantidades de elétrodo particulado, neste caso usando cortiça (granulomentria 1-2 mm). Na tabela 7.8, apresentam-se as condições usadas em cada ensaio.

Tabela 7.8 - Condições operatórias dos ensaios 3, 4 e 5.

Ensaio	Reator	[NaCl] mol/L	[SMX] mg/L	[TMP] mg/L	Intensidade de corrente (A)	Densidade de corrente (mA/cm^2)	Massa de cortiça (mg)
3	1	0,015	10	10	-	-	-
4					0,12	8	100
5					0,06	4	50

Com as soluções obtidas, procedeu-se à realização dos testes de inibição de crescimento. Na tabela 7.9, mostram-se as concentrações utilizadas (C), o logaritmo das mesmas (log C) e a inibição de crescimento obtida (I%) para cada ensaio.

Tabela 7.9 - Resultados obtidos para os ensaios 3,4 e 5.

		Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
C (%)	**log C**	**I (%)**		
2,5	0,398	0,78	18,6	1,53
5	0,698	31,2	28,1	9,70
10	1,00	41,2	29,6	12,8
20	1,30	(-54,5) [2]	24,5	9,76
40	1,60	57,1	25,4	13,1

[2] Este valor encontra-se apresentado na tabela 7.8 e na figura 7.3, no entanto, não foi utilizado para os cálculos realizados das concentrações efetivas devido ao facto de não haver coerência entre este valor e os valores restantes do ensaio.

Os resultados da tabela 7.9 encontram-se ilustrados na figura 7.3.

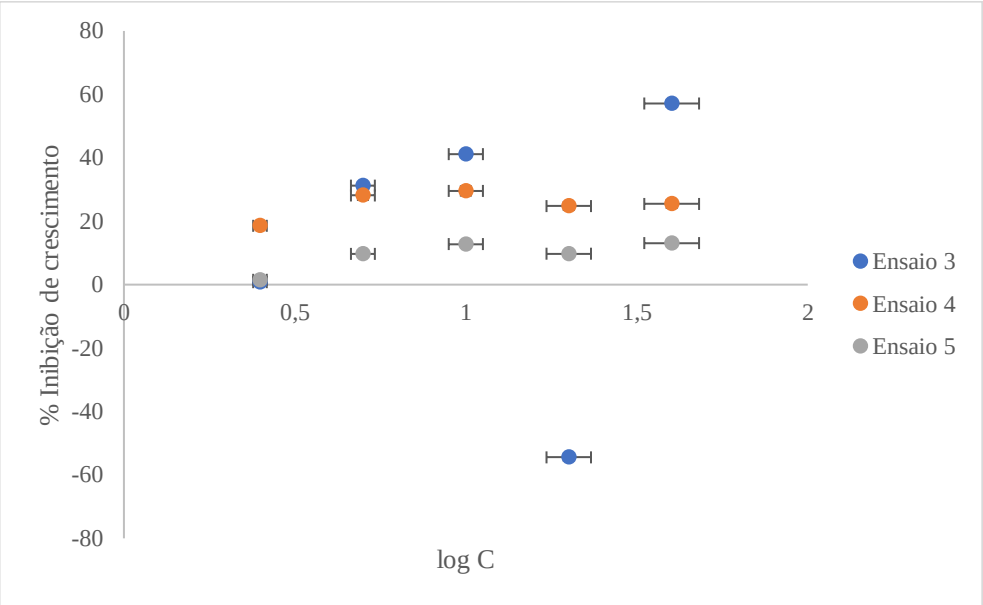

Figura 7.3 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração da solução para os ensaios 3 ([NaCl]= 0,015 mol/L; [SMX]= 10 mg/L; [TMP]= 10 mg/L; ausência de corrente elétrica), 4 ([NaCl]= 0,015 mol/L; [SMX]= 10 mg/L; [TMP]= 10 mg/L; presença de corrente elétrica; 0,12 A; 8 mA/cm^2) e 5 ([NaCl]= 0,015 mol/L; [SMX]= 10 mg/L; [TMP]= 10 mg/L; presença de corrente elétrica; 0,06 A; 4 mA/cm^2).

A estimativa das concentrações efetivas CE_{10}, CE_{20} e CE_{50} apresentam-se na tabela 7.10.

Tabela 7.10 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes aos ensaios 3,4 e 5.

	Ensaio 3	**Ensaio 4**	**Ensaio 5**
CE_{10}	3,1%	1,34%	5,34%
CE_{20}	3,9%	2,78%	>100%
CE_{50}	21,6%	>100%	

Para além da avaliação da ecotoxicidade das soluções, quantificou-se a capacidade de remoção dos fármacos SMX e TMP, os resultados obtidos encontram-se na tabela 7.11.

Tabela 7.11 - Taxas de remoção de SMX e TMP para os ensaios 4 e 5.

	Ensaio 4	**Ensaio 5**
SMX	90%	16%
TMP	61%	12%

O ensaio 3 é aquele que apresenta uma maior ecotoxicidade, pois apresenta uma menor concentração da solução aquosa que resulta numa redução de 50% do crescimento da microalga, (CE_{50}= 21,6%). A elevada toxicidade deste ensaio é justificada pela presença dos fármacos SMX e TMP em concentração mais elevada. Também a presença do NaCl que aumenta a salinidade do meio poderá contribuir para a inibição, uma vez que este organismo pertence a ambientes de água doce.

Através dos resultados dos ensaios 4 e 5, observa-se que com o aumento da intensidade de corrente elétrica, existe um aumento da ecotoxicidade, devido ao aumento da formação de espécies reativas de cloro, que leva ao aumento da percentagem de inibição do crescimento da microalga. Assim, comparando os ensaios 4 e 5, verifica-se que as condições que proporcionam um ambiente menos tóxico para a microalga são as do ensaio 5, visto que possui CE_{20} e CE_{50} superiores a 100%, o que seria impossível de alcançar. Relativamente às taxas de remoção dos fármacos, verifica-se que quanto maior for a intensidade de corrente maior será a remoção, por esse motivo é que se verifica uma maior toxicidade no ensaio 4. No entanto, a redução da concentração de fármacos observada nos ensaios 4 e 5 teve um efeito significativo na diminuição da ecotoxicidade em comparação com o ensaio 3, como se pode verificar através dos correspondentes valores de CE_{50}.

De seguida, testou-se uma solução de água ultrapura contendo SMX e TMP (10 mg/L cada) e NaCl (0,015 mol/L) (ensaio 6) e submeteu-se no reator 2 esta solução à passagem de corrente elétrica com uma intensidade de 0,17 A, com uma densidade de corrente de 5 mA/cm^2 e na presença de 250 mg de cortiça (ensaio 7), condições intermédias em termos de densidade de corrente elétrica e de dosagem às usadas nos ensaios 4 e 5. Na tabela 7.12, encontram-se as condições operatórias de cada ensaio.

Tabela 7.12 - Condições operatórias dos ensaios 6 e 7.

Ensaio	**Reator**	**[NaCl] mol/L**	**[SMX] mg/L**	**[TMP] mg/L**	**Intensidade de corrente (A)**	**Densidade de corrente (mA/cm^2)**	**Massa de cortiça (mg)**
6	2	0,015	10	10	-	-	-
7					0,17	5	250

Com as soluções obtidas realizaram-se os testes de inibição de crescimento. As concentrações utilizadas (C), logaritmo das mesmas (log C) e inibição de crescimento obtida (I%) para cada ensaio encontram-se na tabela 7.13.

Tabela 7.13 - Resultados obtidos para os ensaios 6 e 7.

		Ensaio 6	**Ensaio 7**
C (%)	**log C**	**I (%)**	
2,5	0,398	9,80	20,4
5	0,698	18,5	34,4
10	1,00	25,8	62,6
20	1,30	13,1	189
40	1,60	3,71	244

Com os dados apresentados na tabela 7.13 obteve-se o gráfico presente na figura 7.4.

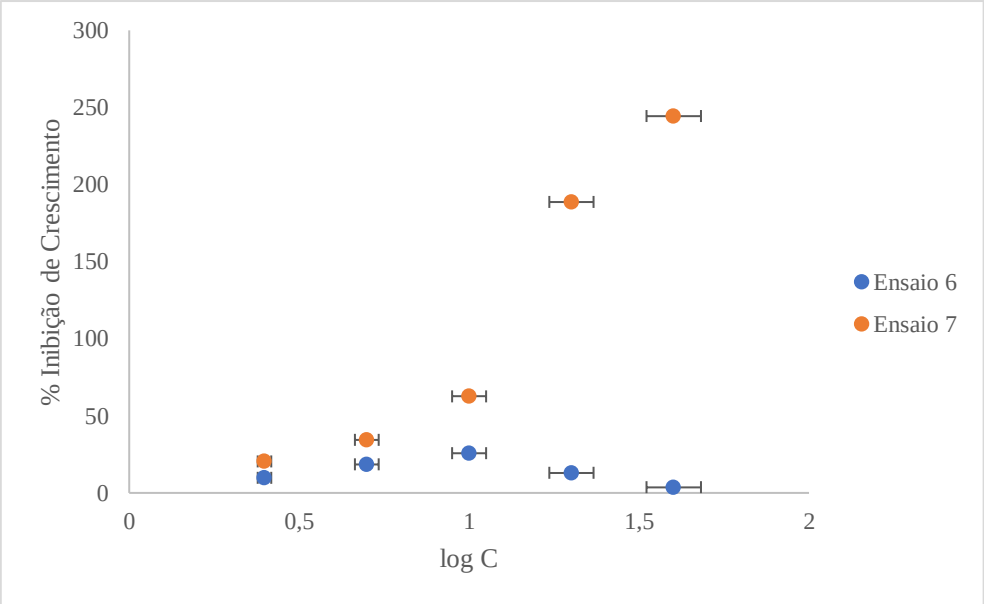

Figura 7.4 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração da solução para os ensaios 6 ([NaCl]= 0,015 mol/L; [SMX]= 10 mg/L; [TMP]= 10 mg/L; ausência de passagem de corrente elétrica) e 7 ([NaCl]= 0,015 mol/L; [SMX]= 10 mg/L; [TMP]= 10 mg/L; presença de corrente elétrica; 0,17 A; 5 mA/cm^2).

Na tabela 7.14, encontram-se as concentrações efetivas (CE_{10}, CE_{20} e CE_{50}) obtidas.

Tabela 7.14 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes aos ensaios 6 e 7.

	Ensaio 6	**Ensaio 7**
CE_{10}	2,28%	1,49%
CE_{20}	5,75%	2,45%
CE_{50}	60,5%	7,33%

Na tabela 7.15, observa-se a capacidade de remoção dos fármacos, SMX e TMP, para o ensaio 7.

Tabela 7.15 - Taxas de remoção de SMX e TMP para o ensaio 7.

	Ensaio 7
SMX	75%
TMP	47%

Observando os resultados obtidos, vemos que existe um aumento de ecotoxicidade após o tratamento, como seria de esperar devido à formação de espécies reativas de cloro, o que leva ao aumento da percentagem de inibição de crescimento da microalga.

A toxicidade verificada no ensaio 7 é confirmada através das concentrações efetivas apresentadas na tabela 7.14, onde se verifica que a menor concentração da solução aquosa que resulta numa redução de 50% do crescimento da microalga, CE_{50}, é o ensaio 7 (CE_{50}= 1,5%), apesar das elevadas taxas de remoção observadas (tabela 7.15).

Com o objetivo de compreender qual dos ensaios realizados com água ultrapura e fármacos foi o mais eficiente em termos ecotoxicológicos, procedeu-se à realização de um quadro resumo de forma a comparar os resultados obtidos (tabela 7.16).

Tabela 7.16 - Resumo dos resultados obtidos nos diferentes ensaios com água ultrapura.

Ensaio	[NaCl] mol/L	[SMX] mg/L	[TMP] mg/L	Intensidade de corrente (A)	Densidade de corrente (mA/cm^2)	Massa de cortiça (mg)	Concentrações efetivas			% Remoção	
							CE_{10} (%)	CE_{20} (%)	CE_{50} (%)	SMX	TMP
3	0,015	10	10	-	-	-	3,1	3,9	21,6	-	-
4				0,12	8	100	1,34	2,78	> 100	90	61
5				0,06	4	50	5,34	> 100		16	12
6				-	-	-	2,28	5,75	60,5	-	-
7				0,17	5	250	1,49	2,45	7,33	75	47

Observando os resultados obtidos, verifica-se que a taxa de remoção dos fármacos SMX e TMP é beneficiada com o aumento da densidade de corrente, uma vez que o ensaio 4 com uma densidade de corrente igual a 8 mA/cm^2 apresenta a maior taxa de remoção (90% para SMX e 61% para TMP) e o ensaio 5 com uma densidade de corrente igual a 4 mA/cm^2 apresenta a menor taxa de remoção (16% para SMX e 12% para TMP), no entanto o ensaio 5, que foi usada menor densidade de corrente é o que provoca menos efeitos ecotoxicológicos.

iii. Água Residual

O tratamento eletroquímico 3D foi também testado em águas residuais, uma matriz muito mais complexa que corresponde às condições reais de aplicação do tratamento, de modo a avaliar a eficiência remoção de fármacos e os efeitos ao nível da ecotoxicidade. Fizeram-se ensaios com água residual com e sem NaCl e condições de operação diferentes, em foram utilizados os reatores descritos na tabela 7.7.

Em primeiro lugar, testou-se a água residual contendo 0,015 mol/L de NaCl (ensaio 8). De seguida no reator 1 realizou-se o ensaio 9 em que se submeteu esta solução à passagem de corrente elétrica com uma intensidade de 0,12 A e uma densidade de corrente de 8 mA/cm^2 na presença de 50 mg de cortiça (elétrodo particulado). As condições operatórias encontram-se na tabela 7.17.

Tabela 7.17 - Condições operatórias do ensaio 8 e 9.

Ensaio	Reator	[NaCl] mol/L	Intensidade de corrente (A)	Densidade de corrente (mA/cm^2)	Massa de cortiça (mg)
8	1	0,015	-	-	-
9			0,12	8	50

Com as soluções obtidas, realizaram-se os testes de inibição de crescimento. As concentrações utilizadas (C), logaritmo das mesmas (log C) e inibição de crescimento obtida (I%) para cada ensaio encontram-se na tabela 7.18.

Tabela 7.18 - Resultados obtidos para os ensaios 8 e 9.

		Ensaio 8	Ensaio 9
C (%)	**log C**	**I (%)**	
2,5	0,398	44,3	-3,39
5	0,698	43,6	-4,59
10	1,00	42,6	-13,3
20	1,30	-23,7[3]	113
40	1,60	60,9	443

[3] Este valor encontra-se apresentado na tabela 7.18 e na figura 7.5, no entanto, não foi utilizado para os cálculos realizados das concentrações efetivas devido ao facto de não haver coerência entre este valor e os valores restantes do ensaio.

Com os resultados apresentados na tabela 7.18 obteve-se a figura 7.5.

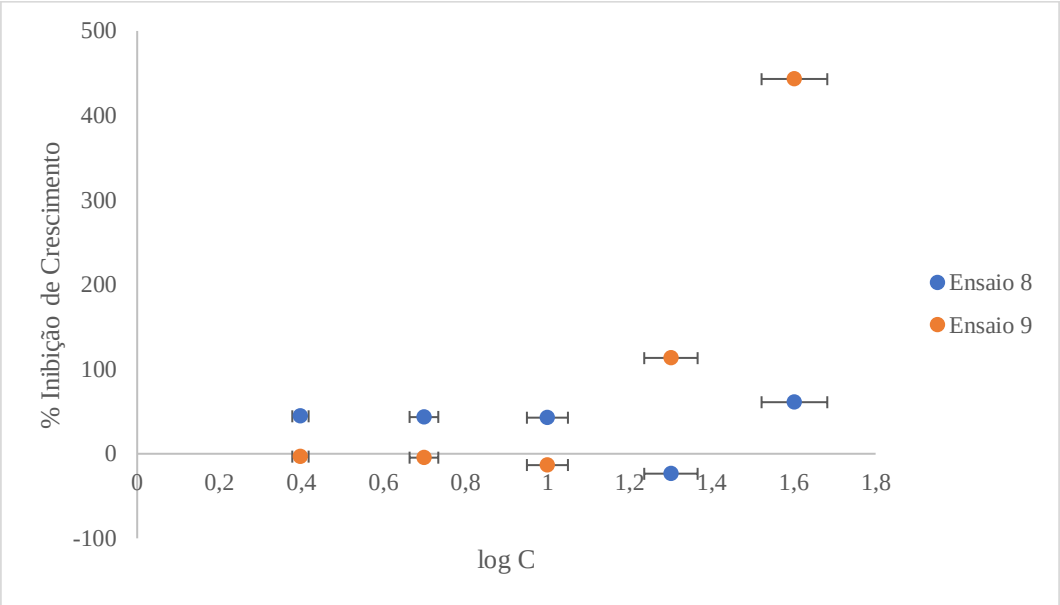

Figura 7.5 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de solução para ensaios 8 ([NaCl= 0,015 mol/L; ausência de corrente elétrica) e 9 ([NaCl]= 0,015 mol/L; presença de corrente elétrica; 0,12 A; 8 mA/cm^2).

Na tabela 7.19, encontra-se a caracterização da água residual. Note-se que os valores apresentados do Decreto-Lei se destinam a uma ETAR que serve uma população superior a 10 000 habitantes equivalentes (e inferior a 100 000 habitantes), uma vez que a ETAR de onde provém a água residual tratada serve uma população de 65 000 habitantes equivalentes [10].

Tabela 7.19 - Caracterização da água residual utilizada nos ensaios 8 e 9.

Parâmetros	Água Residual	Valor limite de emissão [5]
Azoto Total (mg/L N)	66	15
Fósforo Total (mg/L P)	3,0	2,0
Condutividade (µS/cm)	1242	-
CQO (mg/L O_2)	105	125
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	19	35

[5] Valores definidos pelo Decreto-Lei 152/97.

Analisando os dados relativos à caracterização da água residual tratada utilizada no ensaio 8, verifica-se que os valores dos nutrientes (azoto e fósforo) encontram-se acima dos valores estipulados pelo Decreto-Lei 152/97. O valor limite aceitável para o azoto total é de 15 mg/L N, enquanto o valor obtido é de 66 mg/L N. No caso do fósforo total, verifica-se que o valor limite aceitável para este parâmetro é de 3,0 mg/L N. Estes valores elevados potenciam o crescimento da microalga [10].

Os resultados obtidos para as concentrações efetivas (CE_{10},CE_{20} e CE_{50}) encontram-se na tabela 7.20.

Tabela 7.20 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes aos ensaios 8 e 9.

	Ensaio 8	**Ensaio 9**
CE_{10}	0,008%	11,4%
CE_{20}	0,04%	12,0%
CE_{50}	17,5%	14,2%

Para além dos parâmetros ecotoxicológicos, determinou-se a taxa de remoção dos fármacos, SMX e TMP, para o ensaio 9. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela 7.21.

Tabela 7.21 - Taxas de remoção de SMX e TMP para o ensaio 9.

	Ensaio 9
SMX	83%
TMP	53%

Uma vez que as concentrações da solução que resultam numa redução de 50% do crescimento da microalga, CE_{50}, dos dois ensaios se encontram bastante próximos um do outro, decidiu-se comparar as restantes concentrações efetivas. Assim, o ensaio que possui o menor CE_{10} e CE_{20} é o ensaio 8, tornando-se mais tóxico, concluindo-se que o tratamento 9 não provocou um aumento da ecotoxicidade.

Apesar das elevadas concentrações de nutrientes presentes na água residual do ensaio 8 (tabela 7.19), não se verifica a potenciação de crescimento causada pela eutrofização do meio, uma vez que, para além dos compostos presentes na água residual, se adicionou 0,015 mol/L

de NaCl no meio, o que causa um aumento da salinidade do mesmo, tornando-se tóxico para a microalga que é um microrganismo de água doce.

No reator 2, realizaram-se 2 ensaios com água residual sem NaCl. O ensaio 10 consistiu na avaliação da ecotoxicidade da água residual, já o ensaio 11 foi submetido a corrente elétrica com uma intensidade de 0,17 A, 4,74 mA/cm^2 de densidade de corrente e na presença de 250 mg de cortiça. Na tabela 7.22, encontram-se as condições operatórias dos ensaios mencionados anteriormente.

Tabela 7.22 - Condições operatórias dos ensaios 10 e 11.

Ensaio	**Reator**	**[NaCl] mol/L**	**Intensidade de corrente (A)**	**Densidade de corrente (mA/cm^2)**	**Massa de cortiça (mg)**
10	2	-	-	-	-
11			0,17	4,74	250

Com as soluções obtidas, realizaram-se os testes de inibição de crescimento. As concentrações utilizadas (C), logaritmo das mesmas (log C) e inibição de crescimento obtida (I%) para cada ensaio encontram-se na tabela 7.23.

Tabela 7.23 - Resultados obtidos para os ensaios 10 e 11.

		Ensaio 10	**Ensaio 11**
C (%)	**log C**	**I (%)**	
2,5	0,398	-55,7	5,8[4]
5	0,698	-92,3	-27,7
10	1,00	-95,3	-29,3
20	1,30	-91,8	39,8
40	1,60	-117,7	587,6

[4]Este valor encontra-se apresentado na tabela 7.23 e na figura 7.6, no entanto, não foi utilizado para os cálculos realizados das concentrações efetivas devido ao facto de não haver coerência entre este valor e os valores restantes do ensaio.

Com os resultados apresentados na tabela 7.23 obteve-se a figura 7.6.

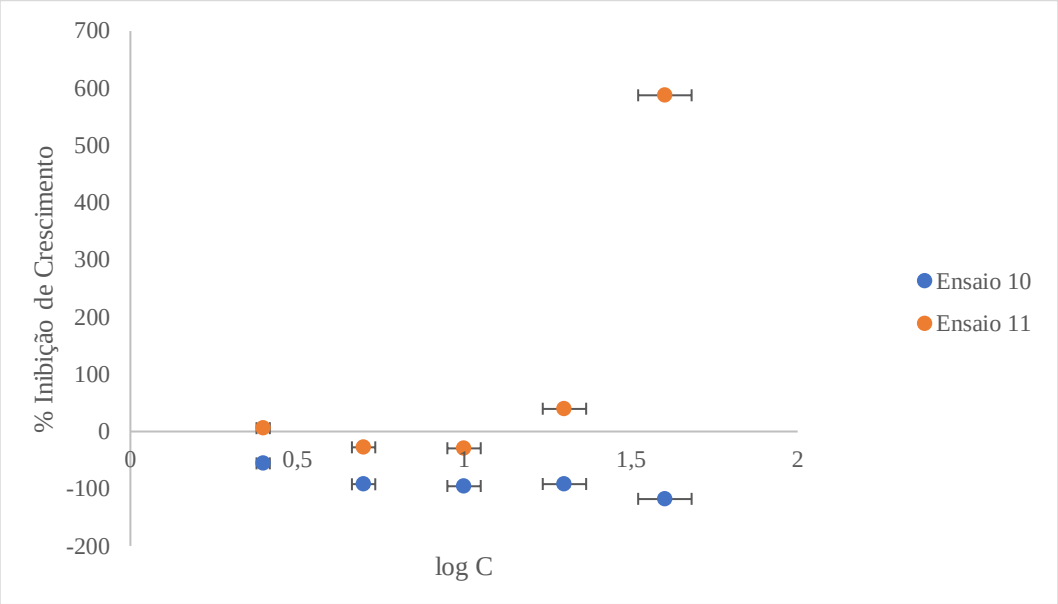

Figura 7.6 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração da solução para os ensaios 10 (ausência de corrente elétrica) e 11 (presença de corrente elétrica; 0,17 A; 4,74 mA/cm^2).

Na tabela 7.24, encontra-se a caracterização da água residual sem passagem de corrente.

Tabela 7.24 - Caracterização da água residual utilizada no ensaio 10 e 13.

Parâmetros	Água Residual	Valor limite aceitável [5]
Azoto Total (mg/L N)	78	15
Fósforo Total (mg/L P)	6,9	2
Condutividade (µS/cm)	1237	-
CQO (mg/L O_2)	98	125
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)	10	35

[5] Valores definidos pelo Decreto-Lei 152/97.

Através dos resultados obtidos verifica-se que no ensaio 10 existe potenciação do crescimento da microalga, uma vez que os valores referentes aos nutrientes (azoto e fósforo) presentes na água residual são bastante elevados . As concentrações de azoto total (78 mg/L N) e fósforo total (6,9 mg/L P) na água residual tratada encontram-se acima dos valores definidos pelo Decreto-Lei 152/97 [10] podendo causando eutrofização do meio hídrico recetor.

Como no ensaio 10 se verificou potenciação do crescimento da microalga, calcularam-se apenas as concentrações efetivas (CE_{10}, CE_{20}, CE_{50}) para o ensaio 11 (tabela 7.25).

Tabela 7.25 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes ao ensaio 11.

	Ensaio 11
CE_{10}	14,8%
CE_{20}	16,4%
CE_{50}	20,3%

Também se determinaram as taxas de remoção dos fármacos SMX e TMP após o ensaio 11 (tabela 7.26).

Tabela 7.26 - Taxas de remoção dos fármacos para o ensaio 11.

	Ensaio 11
SMX	[6]
TMP	37%

[6] Concentração final superior à Concentração inicial.

No ensaio 11, foi necessário aumentar a intensidade de corrente devido à falta do eletrólito (NaCl). No final do ensaio 11, verificou-se que a concentração de SMX era superior à concentração no início. Este fenómeno pode ser justificado pela presença de metabolitos de SMX que, ao serem submetidos ao tratamento eletroquímico 3D, sofrem oxidação e dão origem à espécie inicial.

O ensaio 11 apresenta maior ecotoxicidade do que no ensaio 10, onde se verificou a potenciação de crescimento da microalga devido às elevadas quantidades de nutrientes, o que também corresponde a uma situação de desequilíbrio indesejável nos ecossistemas.

Por fim, realizaram-se dois ensaios com água residual tratada e 0,015 mol/L de NaCl (ensaio 12) e o ensaio 13 que corresponde ao tratamento da mesma solução no reator 2, submetida à passagem de corrente elétrica e na presença de cortiça, condições equivalentes às do ensaio 9 em termos de densidade de corrente e de dosagem de elétrodo particulado. Na tabela 7.27 encontram-se as condições operatórias dos ensaios.

Tabela 7.27 - Condições operatórias dos ensaios 12 e 13.

Ensaio	**Reator**	**[NaCl] mol/L**	**Intensidade de corrente (A)**	**Densidade de corrente (mA/cm^2)**	**Massa de cortiça (mg)**
12	2	0,015	-	-	-
13			0,27	8	250

Na tabela 7.28 encontram-se apresentadas as concentrações utilizadas (C), o logaritmo das mesmas (log C) e a inibição de crescimento obtida (I%) obtidos na realização dos testes de inibição de crescimento.

Tabela 7.28 -Resultados obtidos para os ensaios 12 e 13.

		Ensaio 12	**Ensaio 13**
C (%)	**log C**	**I (%)**	
2,5	0,398	-42,4	5,8
5	0,698	-60,2	209,8
10	1,00	-63,9	534,0
20	1,30	-95,3	428,9
40	1,60	-88,7	418,9

Com os resultados apresentados na tabela 7.28 obteve-se a figura 7.7.

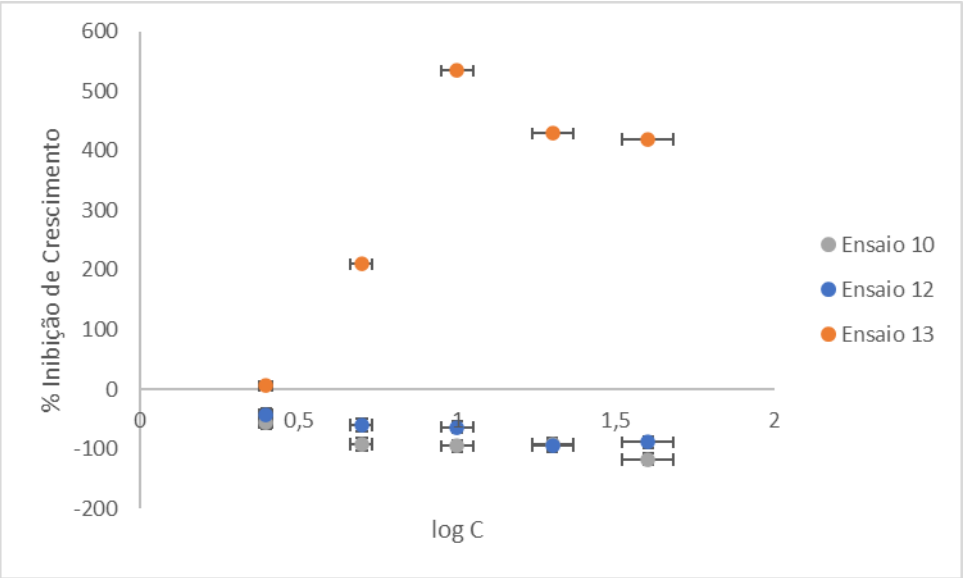

Figura 7.7 - Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração da solução aquosa para os ensaios 10 (ausência de corrente elétrica), 12 ([NaCl]= 0,015 mol/L; ausência de corrente elétrica) e 13 ([NaCl]=0,015 mol/L; presena de corrente elétrica; 0,27 A; 8 mA/cm^2).

Apesar da salinidade provocada no meio pelo NaCl, verifica-se que no ensaio 12 existe potenciação do crescimento da microalga. Como a água residual utilizada é a mesma do ensaio 10 apenas com adição de NaCl, através da observação da tabela 7.24 confirma-se que os valores de azoto e fósforo (nutrientes) se encontram acima dos valores limite definidos pelo Decreto-Lei 152/97, o que causa potenciação do crescimento da microalga [10].

Na tabela 7.29, encontram-se as concentrações efetivas (CE_{10}, CE_{20}, CE_{50}) obtidas para o ensaio 13.

Tabela 7.29 - Parâmetros ecotoxicológicos referentes ao ensaio 13.

	Ensaio 13
CE_{10}	2,5%
CE_{20}	2,6%
CE_{50}	2,9%

Também se determinaram as taxas de remoção dos fármacos SMX e TMP após o ensaio 13. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 7.30.

Tabela 7.30 - Taxas de remoção dos fármacos para o ensaio 13.

	Ensaio 13
SMX	89%
TMP	-[7]

[7] Não detetado por HPLC.

Observando os resultados obtidos, verifica-se que existe um aumento da toxicidade após a passagem de corrente elétrica, uma vez que existe a formação de espécies reativas de cloro, tornando o ensaio 13 mais tóxico.

No ensaio 13, a concentração de TMP não foi detetada por HPLC, o que significa que a concentração de TMP após o tratamento foi menor do que o limite de deteção do método analítico utilizado. Assim, conclui-se que a remoção de TMP foi de aproximadamente 100%.

De forma a compreender quais as condições operatórias que apresentam os melhores resultados para os ensaios com águas residuais reais, resumem-se os resultados obtidos na tabela 7.31.

Tabela 7.31 - Resumo dos resultados obtidos com água residual.

Ensaio	**[NaCl] mol/L**	**Intensidade de corrente (A)**	**Densidade de corrente (mA/cm^2)**	**Massa de cortiça (mg)**	**Concentrações efetivas**			**% Remoção**	
					CE_{10} (%)	**CE_{20} (%)**	**CE_{50} (%)**	**SMX**	**TMP**
8	0,015	-	-	-	0,008	0,04	17,5	-	-
9		0,12	8	50	11,4	12,0	14,2	83	53
10	-	-	-	-	Potenciação			-	-
11	-	0,17	4,74	250	14,8	16,4	20,3	10,7	37,2
12	0,015	-	-	-	Potenciação			-	-
13		0,27	8	250	2,5	2,6	2,9	89	100

Observando os resultados presentes na tabela 7.30, verifica-se que a presença de NaCl combinada com a passagem de corrente elétrica influência favoravelmente as taxas de remoção dos fármacos SMX e TMP, uma vez que na ausência do eletrólito as taxas de remoção obtidas são bastantes baixas (ensaio 11) em comparação com os ensaios onde se utiliza NaCl (ensaios 9 e 13), e quanto maior for a intensidade de corrente na presença de NaCl, maior será a taxa de remoção dos fármacos. A presença de NaCl isoladamente também aumenta a toxicidade devido à salinidade provocada no meio (ensaio 8).

Comparando os ensaios 9 e 13 que têm a mesma densidade de corrente (8 mA/cm^2), verifica-se que o ensaio 13 é o que possui a menor concentração da solução que resulta numa redução de 50% do crescimento da microalga, CE_{50} = 2,9%. No entanto, é o ensaio com os melhores resultados no que toca à eficiência de remoção.

8. Conclusões e sugestões para trabalho futuro

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da ecotoxicidade para a microalga *Raphidocelis Subcapitata* antes e após tratamentos físico-químicos e processos avançados de tratamento de águas residuais, bem como a avaliação da ecotoxicidade a tratamentos pelo processo eletroquímico 3D direcionado para a remoção de antibióticos, o sulfametozaxol e o trimetoprim, servindo como complemento à avaliação da eficiência dos tratamentos.

Nos testes de ecotoxicidade aos tratamentos secundário e terciários, por UV, PNT e UF, verificou-se que todos os tratamentos potenciam o crescimento da alga, devido à elevada concentração de nutrientes (azoto e fósforo) que provocam a potenciação do crescimento da microalga.

O tratamento secundário, apesar da potenciação de crescimento da microalga apresentada, apresenta uma inibição de crescimento de 24,8% para uma concentração de 40%, devido à presença de sólidos suspensos totais na solução que afetam o processo de fotossíntese. Os tratamentos PNT e UF apresentam potenciação de crescimento da microalga para todas as concentrações, uma vez que existe a remoção dos sólidos suspensos totais através da filtração da água. O tratamento UV apresenta uma percentagem de inibição de crescimento de 0,11% para uma concentração de 40%. Só foi possível calcular as concentrações efetivas para o tratamento secundário e UV, pois foram os únicos que apresentaram inibição de crescimento, tendo-se obtido uma inibição pouco significativa para o tratamento UV (CE_{10} =69,6%) e CE_{50} igual a 49,7% para o tratamento secundário. Assim, conclui-se que o tratamento secundário é o que provoca maior toxicidade e os tratamentos por ultrafiltração e PNT são os mais eficientes, apesar de a descarga das águas residuais após estes tratamentos poder levar à eutrofização do meio aquático recetor.

Nos ensaios realizados com o tratamento eletroquímico 3D, para avaliar os efeitos ecotoxicológicos do tratamento e a capacidade de remoção dos fármacos SMX e TMP foi possível observar a influência da presença do eletrólito usado, o NaCl, na remoção dos antibióticos anteriormente mencionados, assim como na ecotoxicidade das soluções.

Nos ensaios com água ultrapura e uma concentração conhecida de NaCl e comparou-se a toxicidade antes e após a passagem de corrente elétrica através das concentrações efetivas calculadas, e concluiu-se que a combinação da presença de NaCl com passagem de corrente elétrica aumenta a toxicidade, devido à produção de espécies reativas de cloro formadas durante a oxidação que tornam a solução extremamente tóxica para a microalga. Conclui-se ainda que

a remoção dos antibióticos SMX e TMP em água ultrapura, e na presença de NaCl aumenta com a densidade de corrente, tendo-se obtido uma taxa de remoção de 90% para SMX e 61% para TMP para uma densidade de 8 mA/cm^2.

Quando se aplicou-se este tratamento à água residual, verificou-se que a presença de NaCl influencia as taxas de remoção dos fármacos, pois as taxas obtidas sem a presença do eletrólito são bastante baixas (10,7% para SMX e 37,2% para TMP). A presença de NaCl e a passagem de corrente também influenciam as taxas de remoção, verificando-se maiores taxas de remoção dos fármacos quanto se usam maiores densidades de corrente elétrica na presença de NaCl. A presença de NaCl sem passagem de corrente aumenta inibe o crescimento da microalga de água doce devido ao aumento de salinidade provocada no meio. O ensaio que se revelou mais eficiente (ensaio 13) na remoção dos fármacos (89% para SMX e 100% para TMP) foi também o ensaio que apresentou maior inibição, isto é menor concentração de solução que resulta na redução de 50% do crescimento da microalga (CE_{50} = 2,9%) o que se deve à presença de espécies reativas de cloro que causam por um lado oxidação dos fármacos, mas também originam a inibição do crescimento da microalga.

Como sugestão para trabalhos futuros seria desejável para o caso dos tratamentos avançados estudados a realização do estudo das taxas de remoção dos fármacos presentes na lista de substâncias prioritárias definida pelo Parlamento Europeu e os seus produtos de degradação, com o objetivo de compreender a sua eficiência global na remoção dos fármacos. No caso do tratamento eletroquímicos 3D seria desejável a sua combinação com uma etapa de tratamento que permitisse a remoção das espécies reativas de cloro, de forma a diminuir os efeitos ecotoxicológicos deste tratamento e a continuação dos estudos de ecotoxicidade para avaliação da viabilidade do tratamento. Por último, seria desejável alargar a realização dos testes crónicos de ecotoxicidade a outros níveis tróficos, de forma a avaliar a sensibilidade de outros organismos aquáticos utilizados neste tipo de testes.

Bibliografia

1. **Chaudhry, F. N. e Malik, M. F.** *Factors Affecting Water Pollution: A Review*, Journal of Ecosystem & Ecography, 2017.

2. **Murugesan, Pramila, et al.**. *Water decontamination usign non-thermal plasma: Concepts, Applications and Propects*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 2020.

3. **Monte, Helena e Alburquerque, António.** *Reutilização de Águas Residuais.* Lisboa : Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2010.

4. **Duarte, D.** *Avaliação da Toxicidade de Lamas de ETAR*, Tese de Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2016

5. **Comissão Europeia.** R*egulamento (UE) 2016/266 da Comissão de 7 de dezembro de 2015*. 2016.

6. **OECD.** *Guidelines for the testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test,* 2011.

7. **Brito, Nuno.** *Efeito de metais pesados na alga Pseudokirchneriella subcapitata,* Tese de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2011.

8. **Morais, Madalena.** *Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de poluentes emergentes usando nanomateriais*, Tese de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2018.

9. **Liu, David H.F. e Liptak, Bela G.** *Wastewater Treatment.* Boca Raton : Taylor & Francis Group, 1999.

10. **Ministério do Ambiente.** Diário da República nº. 139/1997. *Decreto-lei nº. 152/97, de 19 de Junho.* 1997.

11. **Vettorello, Gabriela, et al.** *Micropoluenetes em água - o novo desafio emergente*, Caderno Pedagógico, UNIVATES, pp. 72-83, 2017.

12. **G. Ankley , et al.** *White Paper Aquatic Life Criteria for Contaminants of Emerging Concern Part I, General Challenges and Recommendations*, 2008.

13. **Tejada, Candelaria, Quiñonez , Edgar e Peña, Margaret.** *Contaminantes emergentes en aguas: metabolitos de fármacos: Una revisión*, Revista Facultad de Ciencias Básicas, pp. 80-101, 2014.

14. **Nunes, Bruno.** *A presença de fármacos no ambiente*, Acta Farmacêutica Portuguesa, pp. 43-54, 2011.

15. **Américo, Juliana, et al.** Ocorrência, destino e potenciais impactos dos fármacos no ambiente. *Revista de Saúde e Biologia.* Maio/Agosto de 2013, pp. 59-72.

16. **Soares, Cristina, et al.** Removal of diclofenac and sulfamethoxazole from aqueous solutions and wastewaters using a three-dimensional electrochemical process. *Journal of Environmental Chemical Engineering* Vol. 10, 2022.

17. **Boxall, Alistair.** The environmental side effects of medication, *EMBO reports,* John Wiley & Sons, Ltd,pp. 1103-1186, 2004.

18. **Dinelli, Amanda.** *Logística reversa e os impactos ambientais do descarte inadequado de medicamentos,* São Paulo, 2019.

19. **Gaffney, Vanessa, et al.** *Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS*, Química Nova, pp. 138-149, 2014.

20. **Carvalho, Isabel e Santos, Lúcia.** *Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario,* Environment International, Vol. 94, pp. 736-757, 2016.

21. **Lancini, Giancarlo e Parinti, Francesco.** *Antibiotics: An Integrated View.* Berlim : Springer-Verlag, 1982.

22. **Kümmerer, Klaus.** A*ntibiotics in the aquatic environment – A review – Part I,* Chemosphere, Vol. 75, pp. 417-434, 2009.

23. **Gray, Austin, Todd, Daniel e Hershey, Anne.** *The seasonal distribution and concentration of antibiotics in rural streams and drinking wells in the piedmon of North Carolina,* Science of The Total Environment, Vol. 710, 2020.

24. **Polianciuc, Svetlana, et al.** *Antibiotics in the environment: causes and consequences*, Medicine and Pharmacy Reports, Vol. 93, pp. 231-240, 2020.

25. **Yang, Qiulian, et al.** *Antibiotics: An overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods,* Bioengieered, Vol. 12, pp. 7376-7416, 2021.

26. **Yao, Linlin, et al.** *Occurrence and risk assessment of antibiotics in surface water and groundwater from different depths of aquifers: A case study at Jianghan Plain, central China.* Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 135, pp. 236-242, 2017.

27. **Conselho Europeu.** Jornal Oficial das Comunidades Europeias. *Directiva do Conselho de 21 de Maio de 1991 relativa ao tratamento de águas residuais urbanas (91/271/CEE).* 21 de Maio de 1991.

28. **Agência Portuguesa do Ambiente.** *Legislação Comunitária*. *A*gência Portuguesa do Ambiente, 2021, https://apambiente.pt/agua/legislacao-comunitaria, (acedido em 19 de Abril de 2023).

29. **Parlamento Europeu e do Conselho.** Jornal Oficial das Comunidades Europeias. *Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000 que estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política da água.* 23 de Outubro de 2000.

30. **Parlamento Europeu e do Conselho.** Jornal Oficial das Comunidades Europeias. *Decisão nº 2455/2001/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2001 que estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água e altera a Diretiva 2000/60/CE.* 20 de Novembro de 2001.

31. **Parlamento Europeu e do Conselho.** Jornal Oficial da União Europeia. *Diretiva 2006/118/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de Dezembro de 2006 relativa à proteção das águas subterrâneas contra o combustível e a procura.* 12 de Dezembro de 2006.

32. **Comissão Europeia.** Jornal Oficial da União Europeia. *Diretiva 2014/80/UE da Comissão de 20 de Junho de 2014 que altera o anexo II da Diretiva 2006/118/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, relativa à proteção das águas subterrâneas contra a poluição e a deterioração.* 20 de Junho de 2014.

33. **Parlamento Europeu e do Conselho.** Jornal Oficial da União Europeia. *Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008 relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água.* 16 de Dezembro de 2008.

34. **Comissão Europeia.** Jornal Oficial da União Europeia. *Diretiva 2009/90/CE da Comissão de 31 de Julho de 2009 que estabelece nos termos da Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, especificações técnicas para a análise e monitorização químicas do estado da água.* 31 de Julho de 2009.

35. **Parlamento Europeu e do Conselho.** Jornal Oficial da União Europeia. *Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de Agosto de 2013 no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água.* 12 de Agosto de 2013.

36. **Comissão Europeia.** Jornal Oficial da União Europeia. *Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão de 20 de Março de 2015 que estabelece uma lista de vigilância das substâncias para monitorização a nível da União no domínio da política de água nos termos da Diretiva 2008/105/CE.* 20 de Março de 2015.

37. **Comissão Europeia.** Jornal Oficial da União Europeia. *Decisão de Execução (UE) 2018/840 da Comissão de 5 de Junho de 2018 que estabelece uma lista de vigilância das substâncias a monitorização a nível da União no domínio da política da água.* 5 de Junho de 2018.

38. **Comissão Europeia.** Jornal Oficial da União Europeia. *Decisão de Execução (EU) 2020/1161 da Comissão de 4 de Agosto de 2020 que estabelece uma lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União no domínio da política da água.* 4 de Agosto de 2020.

39. **Comissão Europeia.** Jornal Oficial da União Europeia. *Decisão de Execução (UE) 2022/1307 da Comissão de 22 de Julho de 2022 que estabelece uma lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União no domínio da política da água.* 22 de Julho de 2022.

40. **Comissão Europeia.** *Proposta de Diretiva do Parlamento Europeu e do Conselho relativa ao tratamento de águas residuais urbanas (reformulação).* 26 de Outubro de 2022.

41. **Coelho, Bruno.** *Estudo do tratamento de águas residuais urbanas.* Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. 2008. Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química.

42. **Monte, Helena, et al.** *Tratamento de Águas Residuais - Operações e Processos de Tratamento Físico e Químico*, Lisboa, 2016.

43. **SIMDOURO.** *Tratamento de Águas Residuais*, SIMDOURO- Grupo Águas de Portugal, 2017, https://www.simdouro.pt/dados.php?ref=tratamento-aguas-residuais, (acedido em 19 de Novembro de 2022).

44. **Presidência do Conselho de Ministros.** Diário da República. *Decreto-Lei nº 119/2019 de 21 de agosto.* 21 de Agosto de 2019. 159.

45. **Soares, Maria Fernanda, Leão, Ana Carolina e Salgado, Ricardo.** *Eficiência de desinfeção de águas residuais por radiação UV e por ozônio na ETAR de Setúbal (Portugal)*, Minas Gerais, 2017.

46. **Tecnilab.** *Sistemas de desinfeção por UV*, Lisboa, 2015.

47. **Figueiras, Jorge.** *Otimização da etapa de tratamento terciário da ETAR de Gaia Litoral*, Tese de Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2021.

48. **Sequeira, Marina.** *Utilização de Ultrafiltração para reutilização de águas residuais - Caso de Estudo ETAR Alfa*, Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2017.

49. **Tavares, Miguel.** *Optimização do tratamento por ultrafiltração, de efluente de ETAR, através do pré-tratamento com filtro biológico de CAG e filtro biológico multicamada*, Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2008.

50. **Magureanu, M., et al.** A *review on non-thermal plasma treatment of water contaminated with antibiotics*, Journal of Hazardous Materials, pp. 1-31, 2021.

51. **ORTOCAL.** *Zaawansowana Technologia Utleniania - Technologia C-Ion*. ORTOCAL, 2021, http://ortocal.pl/zaawansowana-technologia-utleniania-technologia-c-ion/?currency=EUR (acedido em 14 de Dezembro de 2022).

52. **Pina, Carolina.** *Estudo de comparação das tecnologias de plasma não térmico e ozonização para a remoção de fármacos das águas residuais através de análise de ciclo de vida*, Tese de Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica, Universidade NOVA de Lisboa, 2021.

53. **Chaves, Gabriela, et al.** *Tratamentos de Águas por Ozonização: Revisão.* Anuário Pesquisa e Extensão Unoesc Videira. 2016, pp. 1-16.

54. **Zhang, Chao, et al.** T*hree-dimensional electrochemical process for wastewater treatment: A general review*, Chemical Engineering Journal, pp. 455-467, 2013.

55. **Ma, Jinsong, et al.** *Progress in research and development of particle electrodes for three-dimensional electrochemical treatment of wastewater: a review*, Environmental Science and Pollution Research, 2021.

56. **Zagatto, P.** *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações.* IV Seminário sobre ecotoxicologia, 2008.

57. **Bastos, Sílvia.** *Avaliação de Ecotoxicidade Usando Microalgas como Complemento de Estudos para a Remoção de Psicofármacos em ETARs*, Tese de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2016.

58. **Calow, Peter.** *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Science, 1993.

59. **Kapanen, A e Itävaara, M.** *Ecotoxicity Tests for Compost Applications - Review*, Ecotoxicology and Environmental Safety, pp. 1-16, 2001.

60. **Rizzo, Luigi.** Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Research.*, Vol. 45, pp. 4311- 4320, 2011.

61. **Bond, Gary e Martin, John.** *Encyclopedia of Toxicology* , Elsevier, EUA, 2005.

62. **Inácio, Ana, et al.** Factores condicionantes da reprodução em *Daphnia Magna*. *CAPTAR - Ciência e Ambiente para Todos*, Aveiro, Vol. 2, pp. 55-66, 2010.

63. **Quintaneiro, Carla, et al.** Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. *CAPTAR - Ciência e Ambiente para Todos*, Aveiro, Vol. 11, 2022.

64. **Lopes, Ana.** *Efeito da origem dos alevins e do maneio alimentar no crescimento inicial de truta arco-íris (Oncorhynchus mykiss)*, Tese de Mestrado em Tecnologias de Produção Animal, Escola Superior Agrária de Viseu, 2018.

65. **Schmitz, R, Magro, C e Colla, L.** *Aplicações ambientais de microalgas*, Revista CIATEC, Vol. 4, pp. 48-60, 2012.

66. **Vale, Miguel, et al.** *CO2 Capture using microalgae*, Advances in Carbon Capture, Woodhead Publishing, pp. 381-405, 2020.

67. **Chang, Fang, et al.** *Freshwater Algae Raphidocelis Subcapitata: Growth Inhibition, Prediction Model, and Environmental Risk Assessmentt*, Toxics, 2022.

68. **Nguyen, Minh, Moon, Ju-Young e Lee, Young-Chul.** *Microalgal ecotoxicity of nanoparticles: an updated review*, Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 1, 2020.

69. **Ragassi, Bruna, Américo-Pinheiro, Juliana e Junior, Osmar.** *Ecotoxicidade de agrotóxicos para algas de água doce*, Revista Científica ANAP Brasil, pp. 45-55, 2017.

70. **Yamagishi, Takahiro, et al.** *Comparative Genome analysis of test algal strain NIVA-CHL1 (Raphidocelis subcapitata) maintained in microalgal culture collections wordwide*, Journals Plos, 9 de Novembro de 2020, https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0241889 (acedido em 17 de Dezembro de 2022).

71. **Välitalo, Pia, et al.** *Toxicological impacts of antibiotics on aquatic micro-organisms: A mini-review*, International Journal of Hygiene and Environmental Health, Vol. 220, pp. 588-569, 2017.

72. **Robinson, April, Belden, Jason e Lydy, Michael.** *Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms*, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 24, pp. 423-430, 2005.

73. **Magdaleno, A, et al.** *Effects of six antibiotics and their binary mixtures on growth of Pseudokirchneriella subcapitata*, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 113, pp. 72-78, 2015.

74. **Eguchi, Kaoru, et al.** *Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae*, Chemosphere, Vol. 57, pp. 1733-1738, 2004.

75. **Isidori, Marina, et al.** *Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms*, Science of The Total Environment, Vol. 346, pp. 87-98, 2005.

76. **Kolar, Boris, et al.** *The toxic effect of oxytetracycline and trimethoprim in the aquatic environment*, Chemosphere, Vol. 115, pp. 75-80, 2014.

77. **Liguoro, Marco De, et al.** *Sublethal effects of trimethoprim on four freshwater organisms*, Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 82, pp. 114-121, 2012.

78. **Yang, L.-H, et al.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 27, pp. 1201-1208, 2008.

79. **González-Pleiter, Miguel, et al.** *Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment*, Water Research, Vol. 47, pp. 2050-2064, 2013.

80. **Almeida, Ana, et al.** *Specific toxicity of azithromycin to the freshwater microalga Raphidocelis subcapitata*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021.

Anexos

Anexo A – Composição do meio de cultura

Na tabela A.1, encontra-se apresentada a composição de nutrientes para cada solução.

Tabela A. 1 - Concentrações de nutrientes [5], adaptado.

Nutrientes	Concentração na solução de reserva	Concentração no meio de cultura
Solução 1		
NH_4Cl	1,5 g/L	15 mg/L
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/L	12 mg/L
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	1,8 g/L	18 mg/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/L	15 mg/L
KH_2PO_4	0,16 g/L	1,6 mg/L
Solução 2		
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	80 mg/L	0,08 mg/L
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/L	0,1 mg/L
Solução 3		
H_3BO_3	185 mg/L	0,185 mg/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/L	0,415 mg/L
$ZnCl_2$	3 mg/L	3×10^{-3} mg/L
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/L	$1{,}5 \times 10^{-3}$ mg/L
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/L	10^{-5} mg/L
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/L	7×10^{-3} mg/L
Solução 4		
$NaHCO_3$	50 g/L	50 mg/L

Anexo B – Resultados do ensaio com dicromato de potássio

Na tabela B.1, encontram-se representados os resultados obtidos no ensaio com a substância teste – dicromato de potássio. Com estes resultados obteve-se o gráfico apresentado na figura B.1.

Tabela B. 1 - Resultados obtidos no ensaio do dicromato de potássio.

C (mg/L)	log C	I (%)
0,125	-0,903	45,3
0,250	-0,602	20,4
0,500	-0,301	61,3
1,00	0,00	53,1
2,00	0,301	77,5

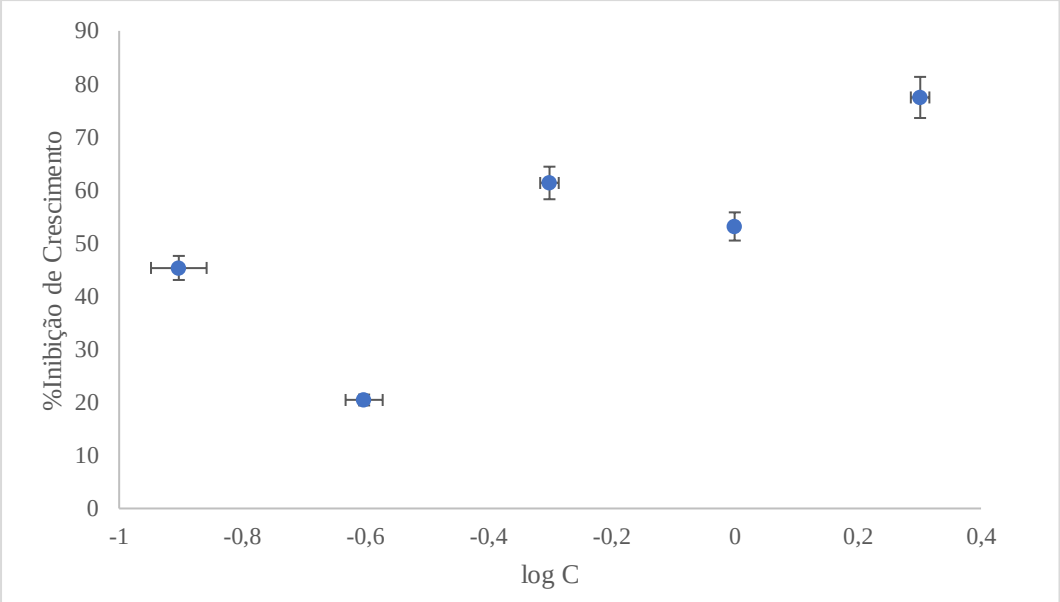

Figura B. 1 - Inibição de crescimento (%) em função do logaritmo da concentração.

Anexo C – Variação de pH nas culturas de controlo

Na tabela C.1, encontra-se apresentada a variação de pH nas culturas de controlo para os ensaios realizados para os tratamentos físico-químicos avançados.

Tabela C. 1 - Variação de pH nas culturas de controlo para os tratamentos físicos-químicos avançados.

Ensaio	pH inicial	pH final em cada réplica				Variação de pH			
	A/B/C/D	A	B	C	D	A	B	C	D
Tratamento Secundário	7,78	6,79	8,11	7,56	-	0,98	0,33	0,22	-
UV									
Plasma	6,02	6,41	3,79	3,10	3,07	0,39	2,23[8]	2,91[8]	2,95[8]
UF									

[8] Os resultados obtidos para estas réplicas não foram incluídos, uma vez que ultrapassam as 1,5 unidades.

Na tabela C.2, encontra-se apresentada a variação de pH nas culturas de controlo para os ensaios realizados para os tratamentos eletroquímicos avançados.

Tabela C. 2 - Variação de pH nas culturas de controlo para os tratamentos eletroquímicos avançados.

Ensaio	pH inicial	pH final em cada réplica				Variação de pH			
	A/B/C/D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	7,83	7,54	7,60	7,43	7,70	0,29	0,23	0,40	0,13
2									
3	7,30	8,54	9,04	8,20	9,59	1,24	1,74[9]	0,9	2,29[9]
4	7,26	8,44	9,97	8,24	8,90	1,18	2,71[9]	0,98	1,64[9]
5									
6	7,51	5,74	7,44	8,28	7,40	1,77[9]	0,07	0,77	0,11
7									
8	7,22	3,15	9,69	8,32	8,25	4,07[9]	2,47	1,11	1,04
9									
10	7,32	8,38	8,87	7,75	7,98	1,06	1,55[9]	0,43	0,66
11	7,50	9,38	9,19	9,88	8,9	1,88[9]	1,69[9]	2,38[9]	1,40
12	7,32	8,38	8,87	7,75	7,98	1,06	1,55[9]	0,43	0,66

[9] Os resultados obtidos para estas réplicas não foram incluídos, uma vez que ultrapassam as 1,5 unidades.