

MESTRADO
CONTROLO DE QUALIDADE

Determinação de contaminantes emergentes em águas residuais com aplicação de solventes extrativos “verdes” e espectrometria de massa

Joel Carlos Araújo Matos

M
2019

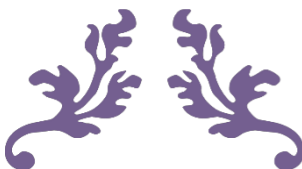
Determinação de contaminantes emergentes em águas residuais com aplicação de solventes extrativos “verdes” e espectrometria de massa

Joel Carlos Araújo Matos

U.PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO



Joel Carlos Araújo Matos

Determinação de contaminantes emergentes em águas residuais com aplicação de solventes extrativos “verdes” e espectrometria de massa

Dissertação de Mestrado no âmbito de Mestrado em Controlo de
Qualidade

Faculdade de
Farmácia da
Universidade do
Porto

Setembro 2019



Joel Carlos Araújo Matos

Determinação de contaminantes
emergentes em águas residuais
com aplicação de solventes
extrativos “verdes” e espectrometria
de massa

Dissertação do 2º Ciclo de estudos conducente ao Grau de Mestre
em Controlo de Qualidade

Especialidade em Água

Orientador: Professor Doutor José Fernandes

Co-orientadora: Doutora Sara Cunha

Faculdade de Farmácia
da Universidade do
Porto

Setembro 2019

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO DO INTERESSADO, QUE TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à empresa Águas do Norte pela oportunidade de realizar este trabalho, bem como à Engenheira Cristina que a tornou possível.

Em segundo lugar, agradecer ao Professor Doutor José Fernandes e à Doutora Sara Cunha, que me orientaram neste trabalho, pelo tempo disponibilizado, pela ajuda prestada, pelo apoio e incentivo ao longo de todo o processo.

Não queria deixar de agradecer à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por facultar as instalações para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, sem eles nunca seria possível chegar até aqui, por todo o esforço e amparo.

Aos meus amigos que contribuíram neste percurso académico.

Um muito obrigado a todos.

Resumo

As águas residuais são provenientes de diversas fontes, com realce para os sistemas de saneamento utilizados depois do uso de água fresca em casas, indústrias e hospitais. Estas águas contêm grandes quantidades de sólidos suspensos e substâncias dissolvidas, estando também presentes compostos com toxicidade conhecida, alguns dos quais por não serem alvo de qualquer legislação estipulada para águas, são denominados por contaminantes emergentes.

As águas residuais são geralmente encaminhadas para uma Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), o que tem como objetivo evitar as descargas de efluentes não tratados no meio ambiente e, dessa forma, manter elevados os padrões de saúde pública. As operações de tratamento realizadas nas ETAR variam de acordo com diferentes fatores, baseando-se numa sequência de etapas com diferentes funções, as mais importantes das quais correspondem aos tratamentos preliminar, primário, secundário e terciário.

O tratamento por lamas ativadas é o tratamento secundário em foco neste estudo, e baseia-se na manutenção de uma elevada concentração de uma cultura de microrganismos (bactérias, protozoários e metazoários) num reator arejado artificialmente, de forma a reduzir a carga orgânica das águas residuais. Os protozoários alimentam-se das bactérias presentes no licor misto, controlando assim o crescimento de biomassa no tratamento biológico, ajudando na clarificação do efluente nos processos de tratamento de águas residuais. A sua análise é fundamental para a avaliação do desempenho dos sistemas de tratamento da ETAR, pois a presença ou ausência de uma espécie, a dominância de espécies ou a composição de organismos está diretamente relacionada com as características físico-químicas e processuais do sistema de tratamento.

Os Produtos de Cuidado Pessoal (PCP), que incluem as fragrâncias sintéticas, também conhecidas por musks, abundantemente usadas nos mais diferentes produtos de uso doméstico, como perfumes, cosméticos, detergentes, amaciadores, etc., com função de dar um aroma agradável aos produtos, correspondem a um grupo de contaminantes emergentes com importância crescente. Devido ao aumento da sua produção e consumo são cada vez maiores os níveis de musks encontrados nas águas residuais. A sua elevada toxicidade tem suscitado uma preocupação crescente, sendo atualmente a classe de PCP mais estudada.

O estudo que aqui se apresenta foi realizado em cinco ETAR diferentes e teve como objetivo identificar os protozoários presentes nas lamas ativadas usadas no tratamento secundário das diferentes ETAR e avaliar a sua eficácia na remoção de musks.

Os protozoários foram identificados nas amostras de licor misto através de microscopia ótica, tendo sido possível concluir que o grupo predominante são os ciliados,

e dentro dos ciliados, o grupo dos sésseis é sempre o dominante, com percentagens de 40,5% até 59,5% do total de protozoários presentes nas diferentes ETAR, indicando uma eficiência do tratamento medíocre. Apesar disso, também foram identificados protozoários flagelados e nadadores e apenas não foram identificadas sarcodinas nas ETAR em estudo.

Os musks foram identificados e quantificados utilizando um processo extrativo de microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) seguido de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura, indicando o galaxolide (HHCB) e o tonalide (AHTN) como os compostos mais frequentemente encontradas nas ETAR. Estas duas fragrâncias foram também as encontrados em maiores concentrações, variando entre 6 364 ng/L até 11 114 ng/L para o galaxolide, e 5 928 ng/L até 11 367 ng/L para o tonalide. Isto deve-se ao facto de serem as fragrâncias mais utilizadas atualmente.

De uma forma geral, foi possível concluir que diferenças no método biológico utilizado tem influência sobre a comunidade de protozoários encontrada no reator, e todas as ETAR apresentaram uma boa eficácia na eliminação da carga orgânica das águas residuais. Comprovou-se que o tratamento biológico por lamas ativadas é capaz de diminuir as concentrações dos musks nas águas residuais numa percentagem que vai desde 28% para tratamento por *Sequencing Batch Reactors (SBR)* até 80% por tratamento convencional, e por fim, é possível concluir que a maior abundância de flagelados pode resultar numa melhor remoção dos musks, pois a sua maior abundância resulta numa maior percentagem de remoção dos musks.

Palavras-chave: Águas residuais; Lamas ativadas; Fragrâncias sintéticas (musks); GC-MS

Abstract

Wastewater are descendants of several sources, with emphasis on the sewer systems after fresh water usage on homes, industries and hospitals. These waters contain a great amount of suspended solids and dissolved substances, being also present compounds with known toxicity, some of them without any legislation attached. These are known as emerging contaminants.

Wastewater are normally guided to a Wastewater Treatment Plant (WWTP), which goal is to avoid sending non-treated effluents to the environment, and like this, keep public health standards high. The treatment operations made on the WWTP varies accordingly to different facts, based of a sequence of steps with different functions. These steps are divided as preliminary treatment, primary, secondary and tertiary treatments.

The active sludge treatment is the secondary step, and it's the one we are focusing on, on this study. This is based of the maintenance of an elevated concentration of a microorganisms culture (bacteria, protozoa e metazoa), in a reactor aired artificially, in order to reduce the organic charge of the wastewater. The protozoa feed on the bacteria that are present on the mixed licor, controlling the growth of biomass on the biological treatment. This will help on the clarity of the effluent on the water treatment process. Its analysis is crucial for the performance evaluation on the treatment systems of the WWTP, as the presence or absence of a certain species, dominance of species or even the composition of the organisms, is directly linked with the physical-chemical and procedure characteristics of the treatment system.

Personal care products (PCP) have included synthetic fragrances also known as musks. These are abundantly used in domestic use products, like perfume, cosmetics, detergents, conditioners, among other, with the purpose of giving a pleasant aroma to the products. These musks are one of the most emergent contaminators, and with growing attention. Due to the increase of its productions and consumption, the levels of musk found on water have been higher than ever. Its high toxicity have created an increased concern, being nowadays the most studied class of PCP.

The study here presented was directed on five different water treatment plants, and has the goal of identifying the different protozoa found on the activated sludges used on the secondary treatment, and evaluate the water treatment plants efficiency on removing the musks.

Protozoa were identified on the samples of mixed licor through microscopic optic, making it possible to conclude that the most prominent group is the ciliads, and within the ciliads, the sessile group is the dominant one, with percentages of 40,5% up to 59,5% of

the total of protozoa found on the different WWTP, which indicated a mediocre treatment efficiency. Also, there were flagellated and swimmer protozoa identified, and just sacordines weren't found on the WWTP in study.

Musks were identified and quantified using an extractive process – dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), followed by a gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The obtained results are according to the literature, identifying that galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN) are the most frequent compounds found on the WWTP. These two fragrances were also found in higher concentrations, varying between 6 364 ng/L up to 11 114 ng/L for galaxolide; and 5 928 ng/L up to 11 367 ng/L for tonalide. This is a result of being the most used fragrances at the moment.

In general, you can conclude that the differences of the biological method used has an influence on the protozoa community found on the reactor, and every WWTP presented a good efficiency on the disposal of the organic matter of the wastewater. It's proved that the biological treatment of activated sludges can diminish the musk concentration on wastewater on the percentage that goes from 28% for the Sequencing Batch Reactors (SBR) to 80% by conventional treatment. And at last, is possible to conclude that the abundance of flagellated can result on a better removal of musks.

Keywords: Wastewater; Activated sludge; Synthetic fragrances (musks); GC-MS

Índice

Agradecimentos	v
Resumo.....	vii
Abstract	ix
Capítulo I – Introdução.....	3
1.1 – Contaminação das águas residuais.....	3
1.2 – Tratamento das águas residuais.....	6
1.2.1 – Monitorização dos parâmetros analíticos das ETAR	11
1.3 – Sistema de Lamas Ativadas	14
1.3.1 – Microbiologia das ETAR.....	16
1.4 – Contaminantes emergentes nas águas residuais	23
1.5 – Ocorrência de musks, TCS e metil-TCS em ETAR.....	28
1.6 – Análise dos protozoários e metodologias analíticas para a determinação de musks, TCS e metil-TCS	36
1.6.1 – Amostragem e pré-tratamento	36
1.6.2 – Método extrativo	36
1.6.3 – Técnica Cromatográfica	38
1.7 – Caracterização das ETAR em estudo.....	44
1.8 – Objetivo do estudo	48
Capítulo II – Materiais e Métodos	51
2.1 – Padrões e Reagentes.....	51
2.2 – Amostragem e pré-tratamento.....	52
2.3 – Identificação dos protozoários e metazoários.....	52
2.4 – Determinação de musks.....	53
2.4.1 – DLLME com procedimento otimizado de derivatização <i>in situ</i>	53
2.4.2 – Condições do GC-MS	54
2.4.3 – Garantia e controlo de qualidade	55
2.5 Análise estatística	55

Capítulo III – Resultados e Discussão	59
3.1 – Caracterização da comunidade de protozoários e metazoários presentes nas ETAR	59
3.2 – Caracterização dos musks presentes nas ETAR	63
3.3 – Eficácia das ETAR na remoção de musks	65
Capítulo IV – Conclusão e Perspetivas futuras.....	71
Bibliografia	75

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Aplicação da reutilização de águas residuais.....	5
Tabela 2 - Níveis de tratamento de águas residuais domésticas (1,13)	7
Tabela 3 – Exemplo de sarcodinas presentes em lamas ativadas (81)	17
Tabela 4 – Exemplo de flagelados presentes em lamas ativadas (81)	18
Tabela 5 – Exemplo de ciliados nadadores presentes em lamas ativadas (62,81).....	19
Tabela 6 – Exemplo de ciliados móveis de fundo presentes em lamas ativadas (62,81)	20
Tabela 7 - Exemplo de ciliados sésseis presentes em lamas ativadas (62,81)	20
Tabela 8 – Exemplo de metazoários presentes nas lamas ativadas (62)	22
Tabela 9 - Relação entre os grupos dominantes, a eficiência do tratamento biológico e as causas de problemas (44,51)	23
Tabela 10 - Propriedades físicas e químicas dos musks em estudo (57,61)	26
Tabela 11 - Ocorrência de musks em ETAR. (DPMI – Cashmeran; ADBI – Celestolide; HHCB – Galaxolide; AHTN – Tonalide; MM – Musk moskene; MK – Musk cetona; MX – Musk xileno; BE – Brassilato de etileno; TCS – Triclosan; Metil-TCS – Metil-triclosan) ..	29
Tabela 12 - Técnicas de extração acopladas à análise GC de musks em amostras de águas residuais, recuperações, limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ)	39
Tabela 13 - Características teóricas das ETAR em estudo	47
Tabela 14 - Tempos de retenção e quantificação de iões (m/z) por análise em GC-MS de musks, TCS e metil-TCS	54
Tabela 15 - Abundância média dos grupos de protozoários e metazoários no licor misto das ETAR. n (nº de amostras).....	60
Tabela 16 - Concentração em ng/L dos musks presentes no licor misto das ETAR. n (nº total de amostras); σ (desvio padrão); Valor “(i)” indica o número de amostras onde foi possível detetar o composto.....	64
Tabela 17 - Percentagem de remoção dos musks das ETAR	66

Índice de Figuras

Figura 1 - Fontes de contaminação das águas residuais. Adaptado de State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals, 2012 (6).....	4
Figura 2 - Exemplo de um diagrama do processo simplificado de uma ETAR. Adaptado de (17).....	8
Figura 3 - Processo de tratamento de águas residuais por lamas ativadas (34).....	15
Figura 4 - Esquema representativo do processo de identificação da microfauna ao longo da lamela, seguindo a direção A-B . 2 – Lamela; 3 – Campo de visão ao microscópio ótico. Adaptado de “Avaliação do desempenho de uma ETAR de lamas ativadas através do estudo das comunidades microbiológicas do licor misto” (15).....	53
Figura 5 - Abundância das espécies de protozoários e metazoários encontrados no licor misto das ETAR.....	59
Figura 6 - Ciliado móvel de fundo (ampliação 100X).....	62
Figura 7 - Ciliado sésil (ampliação 100X).....	62
Figura 8 - Ciliado Carnívoro (ampliação 100X).	63
Figura 9 – Metazoário (ampliação 100X).	63
Figura 10 - Somatório das concentrações dos musks, incluindo TCS e metil-TCS, do licor misto e do efluente final (ng/L).....	67

Abreviaturas

ACN – Acetonitrilo

ADBI – Celestolide

AHTN - Tonalide

ASE – Extração acelerada de solvente

BE – Brassilato de Etileno

CBO – Carência bioquímica de oxigênio

CQO – Carência química de oxigênio

DLLME – Microextração dispersiva líquido-líquido

DPMI - Cashmeran

EA – Época alta

EB – Época baixa

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

GC – Cromatografia gasosa

Hab.eq – Habitante equivalente

HHCB - Galaxolide

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IPA - Propanol

LC – Cromatografia líquida

LLE – Extração líquido-líquido

LOD – Limite de detecção

Log K_{ow} – Coeficiente octanol/água

LOQ – Limite de quantificação

MeOH - Metanol

MEPS – Microextração por sorbente empacotado

MK – Musk cetona

MM – Musk moskene

MS – Espetrometria de massa

MX – Musk xileno

N-total – concentração de azoto

NMP – Número mais provável

P-total – Concentração de fósforo

PAHs – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

PCBs – Policlorados bifenilos

PCP – Produtos de cuidado pessoal

PDMS - Polidimetilsiloxano

PI – Padrão interno

SBR - Sequencing Batch Reactors

SBSE – Extração por barra de agitação

SDT – Sólidos dissolvidos totais

SIM – Monitoramento seletivo de iões

SPE – Extração em fase sólida

SPME – Microextração em fase sólida

SSF – Sólidos suspensos fixos

SST – Sólidos suspensos totais

SSV – Sólidos suspensos voláteis

ST – Sólidos totais

TCC – Tetracloreto de carbono

V₃₀ – Sólidos sedimentáveis

Capítulo I
Introdução

Capítulo I – Introdução

1.1 – Contaminação das águas residuais

São denominadas águas residuais as águas resultantes da utilização humana em casas, indústrias, instituições públicas e entidades semelhantes, e contêm uma grande quantidade de sólidos suspensos e substâncias dissolvidas (7,8). As águas residuais não consistem apenas nas águas utilizadas pela população, mas também nas águas infiltradas no sistema, cuja origem pode ser de escorrências pluviais, afluições freáticas ou de ligações ilegais à rede de drenagem (1,13). Consoante a origem das águas residuais, estas podem ser consideradas (9,10,11):

- **Águas residuais domésticas** – provenientes de serviços ou instalações residenciais, essencialmente resultantes do metabolismo humano e de atividades domésticas;
- **Águas residuais industriais** – provenientes de qualquer tipo de atividade industrial;
- **Águas residuais urbanas** – consiste na mistura de águas residuais domésticas com águas residuais industriais e/ou águas pluviais.

A matriz das águas residuais é bastante complexa, e contém uma grande quantidade de sólidos suspensos e substâncias dissolvidas. Atualmente, o foco das pesquisas sobre a poluição da água encontra-se nos chamados “contaminantes emergente” – compostos com toxicidade reconhecida, mas que não têm legislação estipulada para águas (3). Nas águas residuais são encontrados os maiores teores de contaminantes emergentes, devido a diferentes tipos de produtos terem como destino o esgoto doméstico, industrial e hospitalar. Nestas águas são encontrados produtos utilizados em grandes quantidades em todo o mundo, tais como ingredientes ativos de produtos farmacêuticos e produtos de cuidado pessoal (PCP) (4). Estes contaminantes emergentes contaminam as águas residuais de diferentes formas, por exemplo, quando é ingerido um medicamento, este é absorvido e metabolizado pelo organismo, no entanto uma fração não é metabolizada e é excretada pela urina ou pelas fezes, tendo como destino o esgoto. Outra forma de contaminação é através de descargas de águas residuais industriais (4,5). (Figura 1)

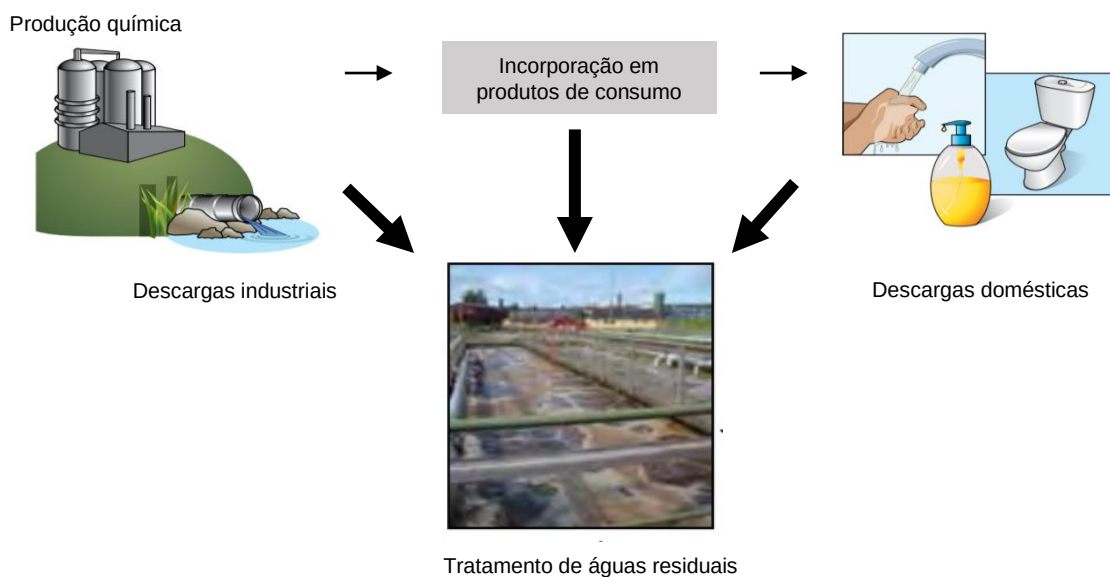


Figura 1- Fontes de contaminação das águas residuais. Adaptado de State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals, 2012 (6).

De forma a caracterizar as águas residuais podem ser efetuadas análises dos parâmetros físicos (teor em sólidos, cor, turvação, temperatura, densidade e condutividade), químicos inorgânicos (pH, odores, azoto, fósforo, enxofre, oxigénio dissolvido e constituintes metálicos) e pela análise de constituintes orgânicos (Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO), Carência Química de Oxigénio (CQO), agentes tensioativos, óleos e gorduras) (12).

Devido ao crescimento exponencial da população mundial observado nas últimas décadas, e com o aumento da concentração das populações em cidades, é necessário um aumento proporcional na produção de água para consumo humano. Uma solução viável para o problema da escassez de água é a reutilização de águas residuais (2). Estas águas, podem ser utilizadas em diferentes locais com diversas finalidades, tais como descrito na Tabela 1, se apresentarem valores inferiores a 100 NMP/100 mL de coliformes fecais. Estes valores só são possíveis de alcançar caso exista tratamento terciário, e por isso apenas uma pequena percentagem do efluente tratado é reutilizado.

Tabela 1 - Aplicação da reutilização de águas residuais.

Uso interno da estação de tratamento	Água de serviço
	Rega
Rega agrícola	Rega de culturas
	Viveiros
Rega paisagística	Parques
	Campos de golfe
	Faixa de separação nas autoestradas
	Recintos de escolas
	Espaços verdes residenciais
	Cemitérios
Reutilização industrial	Água de arrefecimento
	Água de processo
	Construção pesada
	Caldeiras de produção de vapor
Recarga de aquíferos	Reforço do volume de águas subterrâneas
	Controlo da intrusão salina
Usos recreativos e ambientais	Lagos e lagoas
	Conservação de zonas húmidas naturais
	Reforço do caudal de cursos de água
	Pesca
	Produção artificial de neve
Usos urbanos não potáveis	Combate contra incêndios
	Lavagem de ruas
	Lavagem de contentores de resíduos sólidos urbanos
	Descarga de autoclismos
	Lavagem de veículos
	Ar condicionado

1.2 – Tratamento das águas residuais

De forma a manter a saúde pública e evitar as descargas de efluentes não tratados no meio ambiente, as águas residuais são encaminhadas para uma Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) (14). O objetivo das ETAR é o tratamento das águas residuais, formando um efluente com qualidade suficiente para prevenir doenças ou situações incómodas indesejáveis (maus cheiros, insetos, etc), evitar a contaminação das águas que recebem o efluente, melhorar a qualidade da água de forma a preservar a função ecológica e possibilitar a utilização do efluente para fins recreativos, conservando a qualidade e a quantidade da água para uso futuro (13). As operações realizadas nas ETAR variam de acordo com as características dos efluentes a tratar, com o destino a dar aos efluentes tratados, com os requerimentos de qualidade da água e com os custos/eficácia dos processos de tratamento (15).

Os processos de tratamento consistem essencialmente em operações unitárias (aplicação de forças físicas) e processos unitários (processos de tratamento nos quais a remoção de contaminantes é feita através de reações químicas ou biológicas). Os métodos de tratamento combinam e aplicam as operações e os processos unitários, concedendo vários tipos de tratamento, conhecidos como tratamentos preliminares, primários, primários avançados, secundários (com ou sem remoção de nutrientes), tratamento terciário e avançado (Tabela 2). Dependendo da qualidade final do efluente pretendida, é definido o nível de tratamento a aplicar (13).

Tabela 2 - Níveis de tratamento de águas residuais domésticas (1,13)

Nível de tratamento	Descrição
Preliminar	Remoção de resíduos sólidos das águas, nomeadamente vegetação, areias ou partículas flutuantes e gorduras, de forma a evitar danificar os equipamentos, bem como os órgãos a jusante; A gradagem, desarenação, homogeneização e armazenamento e separação de óleos e gorduras são exemplos de métodos utilizados.
Primário e Primário Avançado	Remoção de uma parte dos sólidos suspensos e matéria orgânica, normalmente através de decantação; Os métodos utilizados podem ser químicos (neutralização - adição de reagentes químicos e coagulantes) ou físicos (flotação e decantação); No caso do tratamento Primário Avançado é uma remoção melhorada dos sólidos suspensos e matéria orgânica.
Secundário	Remoção de matéria orgânica biodegradável (em solução ou suspensão) e de sólidos suspensos por processos biológicos seguidos de processos físico-químicos; Nos processos biológicos podem ser utilizados tratamentos aeróbios (lamas ativadas, discos biológicos, lagoas aeróbias, etc) ou tratamentos anaeróbios (lagoas anaeróbicas ou digestão anaeróbia); Nos processos físico-químicos são utilizados um ou mais decantadores secundários.
Secundário com remoção de nutrientes	Remoção de matéria orgânica biodegradável, sólidos suspensos e nutrientes (azoto, fósforo ou ambos).
Terciário	Este tratamento tem o objetivo de remover substâncias suspensas e dissolvidas que não foram removidas nos tratamentos anteriores e, se necessário, inativar os microrganismos patogénicos
Avançado	Aquando da reutilização de água tratada através do tratamento por desinfecção para parâmetros mais exigentes ou por nanofiltração/microfiltração/osmose reversa, etc.

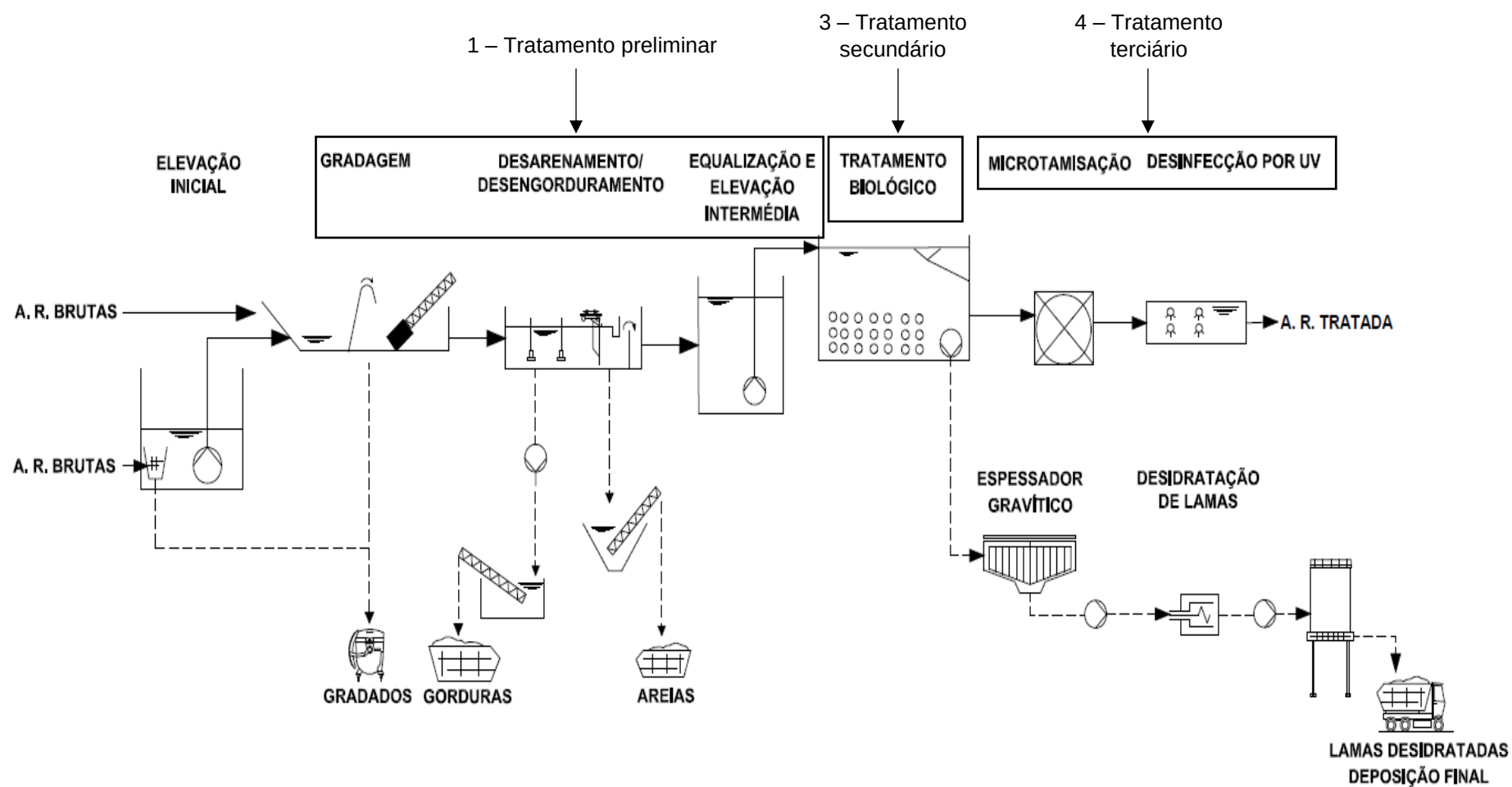


Figura 2 - Exemplo de um diagrama do processo simplificado de uma ETAR. Adaptado de (17).

1 – Tratamento Preliminar

Como apresentado na Figura 2, o tratamento preliminar é a primeira fase do tratamento das águas residuais e permite a remoção/diminuição de sólidos flutuantes, gorduras e sólidos sedimentáveis de maiores dimensões (sólidos grosseiros, panos, areias, etc) que podem danificar os equipamentos e os processos a jusante. São utilizados processos e equipamentos como a gradagem (remoção de sólidos de maiores dimensões), os desarenadores (removem as areias, gravilhas e toda a espécie de matérias sólidas de elevada densidade) e desengorduramento (remoção de gorduras e óleos). Outro objetivo deste tratamento é a equalização/homogeneização dos caudais (16,18,19).

2 – Tratamento Primário

Posteriormente ao tratamento preliminar, as águas residuais seguem para o tratamento primário. Este tratamento consiste geralmente numa decantação (decantação primária), que tem como objetivo a remoção de sólidos sedimentáveis (orgânicos e inorgânicos) e de escumas, reduzindo desta forma os sólidos suspensos. Assim, é produzido um efluente clarificado que é conduzido ao tratamento biológico enquanto os sólidos decantados e depositados no fundo do decantador são removidos sob a forma de lamas primárias e sólidos, e as escumas que se acumulam na superfície do decantador são removidas e enviadas para o concentrador de gorduras (1,18).

3 – Tratamento Secundário

O tratamento secundário procura a remoção de compostos orgânicos solúveis e coloidais e sólidos em suspensão, devido a estes não serem totalmente removidos no tratamento primário (20). Esta fase pode ser composta por processos biológicos (aeróbios e anaeróbios) e por processos físico-químicos (decantador secundário).

Podem ser combinadas várias operações e processos de forma a assegurar o tratamento secundário do efluente. Geralmente os processos biológicos realizam-se num reator biológico tendo por objetivo: oxidar as partículas e substâncias biodegradáveis em produtos finais; capturar e incorporar os sólidos suspensos e coloidais num floco biológico ou no biofilme; transformar ou remover nutrientes, nomeadamente o azoto e o fósforo; e, por vezes, remover compostos específicos tais como metais pesados e poluentes prioritários.

O processo biológico é possível através do recurso a uma variedade de microrganismos, sendo maioritariamente bactérias, que são utilizados para oxidar a

matéria orgânica dissolvida ou particulada, em produtos finais simples e em biomassa (novas células) (18,21). As vantagens do tratamento biológico são o baixo impacto ambiental, ser um processo económico de tratamento de contaminantes orgânicos, possibilitar o tratamento de grandes quantidades de efluente, possuir elevada eficiência energética e originar compostos inócuos. Apesar disso, apresenta desvantagens tais como o facto de ser muito sensível à presença de substâncias tóxicas e inibidoras da atividade biológica, da eficiência depender da temperatura, produzir lamas que necessitam de um correto encaminhamento e a possibilidade de ocorrência de maus odores. O processo biológico mais utilizado e de interesse para este estudo é o processo de lamas ativadas, que consiste basicamente numa mistura entre o efluente e microrganismos autoagregados, que é arejada e agitada (22). Este processo será abordado com mais detalhe posteriormente.

Por norma, devido à formação de sólidos aquando do tratamento biológico, é necessário que exista um decantador secundário, que tem uma função semelhante ao decantador primário – promover a separação entre os sólidos (lamas) e o efluente (18). (Figura 2)

4 – Tratamento Terciário

Este tratamento tem o objetivo de remover substâncias suspensas e dissolvidas que não foram removidas no tratamento secundário (nutrientes, CBO, sólidos suspensos totais (SST)) e, se necessário, inativar os microrganismos patogénicos. O tratamento terciário (Figura 2) não é efetuado em todas as ETAR, uma vez que depende das características exigidas para o efluente de saída e a sua aplicação. Caso a descarga seja feita em zonas sensíveis, existem imposições legais mais exigentes nos valores de descarga, como por exemplo a remoção de azoto e fósforo para valores entre 10 mg/L – 15 mg/L e 1 mg/L – 2 mg/L, respetivamente. Outro motivo para a implementação deste tratamento é o objetivo de reutilização do efluente tratado (18,22).

Existem diversos processos utilizados no tratamento terciário, consoante o objetivo que se pretende: por exemplo, utiliza-se a desinfecção para a remoção/inativação de patogénicos. O método mais utilizado é a radiação por ultravioleta (18).

Posteriormente, realiza-se a descarga do efluente tratado para o curso de água (22).

1.2.1 – Monitorização dos parâmetros analíticos das ETAR

Para avaliar o bom funcionamento de uma ETAR é necessária uma determinação analítica de alguns parâmetros, de forma a garantir que o efluente final está em condições de ser libertado, sem pôr em causa o meio recetor. Esta determinação permite avaliar o funcionamento global das instalações, possibilitando a determinação de eventuais alterações nos processos e proceder ao devido ajuste, para otimizar o sistema de tratamento (25). Os parâmetros analíticos avaliados são os seguintes:

- **Sólidos sedimentáveis (V_{30})**

A determinação do V_{30} baseia-se no volume, em mililitros, ocupado pelos sólidos em 1 litro de amostra do efluente. É determinado utilizando um cone de *Imhoff*, onde 1 litro da amostra é deixado a sedimentar durante um período de 30 minutos. No final verifica-se quanto é que os sólidos ocupam no cone. Quando maior a sedimentação, menor o valor de sólidos é medido no cone (13). Este parâmetro permite conhecer o estado do processo, pois é possível concluir acerca da sedimentabilidade e da qualidade das lamas biológicas formadas no reator biológico (25).

- **pH**

O pH é um parâmetro de qualidade importante das águas residuais, e varia de acordo com a origem, por exemplo, sendo mais básico para efluentes indústrias de origem têxtil, e mais neutro para efluentes de origem doméstica (26,27). O pH também vai variando ao longo do processo de tratamento - à entrada do reator biológico, este deve estar entre 6 e 9, de forma a garantir as condições adequadas para o crescimento e manutenção dos organismos interveniente no processo biológico (26); no interior do reator biológico, como ocorre a remoção da matéria orgânica e de azoto, faz com que o valor de pH baixe devido à libertação de metabolitos ácidos resultantes do crescimento dos organismo. Contudo, o valor de pH pode aumentar devido à atividade de organismos desnitrificantes, pois este processo repõe grande parte da alcalinidade removida durante o processo de nitrificação (28).

- **Temperatura**

A temperatura também é um parâmetro a avaliar. Por norma, as águas residuais têm uma temperatura ligeiramente superior à temperatura ambiente, e

isso pode afetar alguns processos tais como a decantação secundária, a remoção de óleos e gorduras e a velocidade de processos biológicos. O aumento da temperatura resulta na diminuição da concentração de oxigénio dissolvido, sendo prejudicial para o processo de tratamento biológico (26).

- **Concentração de oxigénio dissolvido**

Tal como o pH, a concentração de oxigénio dissolvido pode variar durante o processo de tratamento, e permite avaliar o estado do funcionamento do sistema de arejamento nas diferentes etapas. No reator biológico, este parâmetro é bastante importante pois é fundamental para a remoção de carga orgânica e para a remoção biológica do azoto por processos de nitrificação e desnitrificação (25). A nitrificação é a oxidação biológica da amónia com consequente transformação em nitrato. Este processo acontece em duas etapas – inicialmente a amónia é convertida a nitrito e de seguida em nitrato. Por fim, o nitrito e o nitrato são reduzidos pelos microrganismos, em ambiente anóxico, transformando-se em azoto molecular, que é libertado para a atmosfera (32).

- **Potencial Redox**

Este parâmetro indica a tendência de uma espécie química em ganhar eletrões e ser reduzida. Em processos como o de lamas ativadas, o potencial redox é normalmente superior a + 50 mV (26).

- **Condutividade elétrica**

Este parâmetro expressa a concentração de compostos ionizados capazes de conduzir a corrente elétrica. Um valor elevado na condutividade elétrica indica a presença de uma grande quantidade de iões (26).

- **Carência bioquímica de oxigénio (CBO)**

Este parâmetro é utilizado para determinar a poluição orgânica das águas residuais. A CBO baseia-se na medição da concentração de oxigénio dissolvido consumido pela comunidade de microrganismos durante a oxidação bioquímica da matéria orgânica. Através deste parâmetro é possível estimar a carga orgânica biodegradável existente numa amostra de águas residuais. Por norma, numa amostra de licor misto o CBO encontra-se entre 38 e 120 mg/L (21), e na saída é de 40 mg/L.

- **Carência química de oxigênio (CQO)**

A partir deste parâmetro é possível determinar a quantidade de oxigênio equivalente à porção de matéria orgânica total passível de ser oxidada quimicamente. Este parâmetro permite determinar a carga orgânica biodegradável ou não biodegradável de uma amostra. A CQO do licor misto varia normalmente entre 260 a 900 mg/L (21) e na saída é de 150 mg/L.

- **Sólidos**

Nas águas residuais são encontrados uma grande variedade de sólidos de diferentes dimensões, sendo esta matéria suspensa ou dissolvida. Pode ser realizada a determinação da quantidade de matéria sólida que uma amostra contém para avaliar a sua carga poluente. Este parâmetro designa-se sólidos totais (ST), é expresso em mg/L, e indica os resíduos sólidos resultantes após a evaporação total da água da amostra (26).

- **Sólidos totais (ST)**

Os ST incluem os sólidos dissolvidos totais (SDT) e os SST. Os SDT, expressos em mg/L, são referentes ao sólidos orgânicos e minerais dissolvidos que passam através de um filtro de vidro específico. Os SST, expressos em mg/L, são a parte dos ST que fica retido no filtro de vidro específico (26).

- **Sólidos suspensos totais (SST)**

Grande parte dos SST são sólidos de natureza orgânica, por isso são designados por sólidos suspensos voláteis (SSV). Os restantes são sólidos inorgânicos ou minerais, designados por sólidos suspensos fixos (SSF). Os valores de SST podem variar entre 70 e 120 mg/L (21).

- **Concentração de azoto (N-total) e fósforo (P-total)**

O azoto e o fósforo são nutrientes essenciais para o crescimento dos microrganismos.

O azoto pode aparecer nas águas residuais sob a forma de azoto amoniacal (NH_3), o ião amónia (NH_4^+), os iões nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) e como azoto orgânico. No afluente, o azoto apresenta-se normalmente sob a forma orgânica, sendo convertido nas outras formas ao longo do tempo (21,26). O controlo da N-total é importante pois permite evitar a proliferação de algas tóxicas nos ecossistemas, provocado pela descarga deste composto no ambiente. Os níveis normais de N-total nas águas residuais varia entre 4 e 16 mg/L.

O fósforo pode aparecer nas águas residuais sob a forma de ortofosfatos (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , H_3PO_4), polifosfatos e fosfatos orgânicos. Nas águas residuais são encontrados maioritariamente ortofosfatos, sendo utilizados posteriormente no metabolismo biológico (21,26).

1.3 – Sistema de Lamas Ativadas

Como referido anteriormente, o processo de lamas ativadas é o processo mais utilizado como tratamento biológico de águas residuais numa ETAR, tanto domésticas como indústrias. Este processo foi desenvolvido por Arden e Lockett em 1914, em Inglaterra, embora já tenha sofrido algumas alterações, tais como no tipo de fluxo do sistema, no tempo de arejamento e tipos de sistema de arejamento (sistema de ar difuso, arejamento mecânico, etc) (29).

O processo de lamas ativadas baseia-se na manutenção de uma elevada concentração de uma cultura mista de microrganismos num reator arejado artificialmente. Consiste na formação de flocos suspensos, originando uma lama ativa biológica que, devido às suas dimensões e peso específicos, é capaz de se manter em suspensão no efluente arejado e, posteriormente, sedimentar no decantador secundário. O principal objetivo deste processo é a redução da carga orgânica nas águas residuais. O conteúdo do reator denomina-se licor misto e é constituído por águas residuais, microrganismos e matéria orgânica (30,32). Segundo Tchobanoglous *et al.* (2003), um sistema de lamas ativadas é constituído por (22,31):

- Um ou mais reatores (tanques de arejamento);
- Componente biótica (lamas ativadas);
- Sistema de arejamento (processo aeróbio);
- Decantador secundário (para a separação da biomassa do efluente tratado);
- Sistema de recirculação de lamas (no qual os sólidos removidos da unidade de separação retornam para o tanque de arejamento).

Durante o processo de lamas ativadas, no tanque de arejamento ocorre a degradação de matéria orgânica por bactérias heterotróficas, em que matéria carbonada, azotada e fosfatada é dissolvida e convertida em biomassa, sendo assim removida das águas residuais (22). A metabolização da matéria orgânica tem como subprodutos água, dióxido de carbono e compostos azotados e sulfurosos (Figura 3) (33).

Neste sistema, as bactérias responsáveis pelo processo possuem a capacidade de formarem flocos – conjunto de bactérias, metabolicamente ativas e não ativas, e outros microrganismos agregados, juntamente com partículas orgânicas e inorgânicas, que

formam uma estrutura heterogênea complexa, embebido numa matriz polimérica (p.e – exopolissacarídeos) (35,36,37). Em consequência da formação de flocos e devido à gravidade, passado algum tempo, a biomassa formada no tanque vai sedimentar, possibilitando a separação do efluente tratado por uma separação líquido-sólido (35). No entanto, a floculação só ocorre quando não houver matéria orgânica disponível para os microrganismos ou estes atingirem a fase de crescimento estacionária, pois é quando acumulam os exopolissacarídeos celulares à superfície das células, favorecendo a sua agregação (37).

Apesar das bactérias terem um papel principal no processo de lamas ativadas, não são os únicos microrganismos presentes e envolvidos no processo. No licor misto encontra-se cerca de 95% de bactérias e 5% de protozoários, metazoários, algas, fungos e invertebrados. Dentro destes, destacam-se os protozoários (organismos unicelulares com 5 -200 μm de comprimento) e os metazoários (organismos multicelulares que podem superar 1 mm de comprimento) (38).

De forma a compreender melhor o sistema de lamas ativadas, para além de entender todo o processo de tratamento das águas residuais, é necessário um conhecimento maior sobre a comunidade microbiana existente.

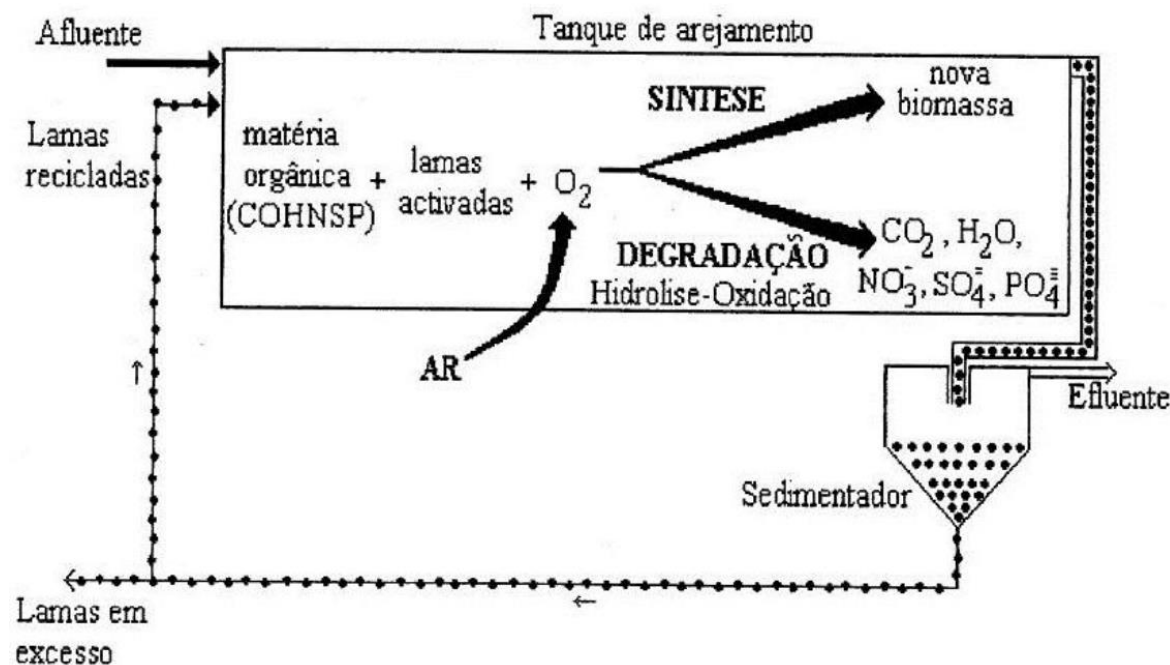


Figura 3 - Processo de tratamento de águas residuais por lamas ativadas (34).

1.3.1 – Microbiologia das ETAR

Apesar das bactérias serem as principais responsáveis pela biodegradação dos resíduos nas ETAR, para garantir o sucesso dos processos biológicos, é necessária uma completa interação ecológica de todos os organismos microscópios presentes no tanque de arejamento (39). Esta microfauna é composta por decompositores (bactérias e fungos), que retiram a energia da matéria orgânica presente em suspensão no afluente para o seu desenvolvimento, e pelos seus predadores. Dentro dos predadores temos os protozoários e os metazoários. O crescimento dos decompositores, em particular das bactérias, depende da qualidade e quantidade de matéria orgânica disponível, e o crescimento dos predadores depende da disponibilidade de alimento (12,34). Portanto, para além das bactérias, os protozoários e os pequenos metazoários são essenciais para o tratamento das águas residuais em sistemas de lamas ativadas, e a análise da estrutura de toda a comunidade é fundamental para o diagnóstico e avaliação do desempenho dos sistemas de tratamento biológico (40).

Os protozoários são organismos eucarióticos, unicelulares, sem diferenciação celular pertencentes ao reino Protista. Apesar disto, alguns apresentam estruturas relativamente complexas, tais como regiões diferenciadas no interior da célula para a realização de funções específicas. São, na sua maioria, livres e solitários, mas podem formar colónias. Estes organismos têm dimensões maiores que as bactérias, alimentando-se delas, controlando assim o crescimento da biomassa no tratamento biológico e ajudando na clarificação do efluente nos processos de tratamento de águas residuais (41,42,43). As condições ambientais podem afetar o desempenho da ETAR, por interferirem na comunidade de protozoários num reator biológico de um sistema de lamas ativadas. A análise destes microrganismos pode ser usada como instrumento de avaliação do desempenho das instalações, pois a presença ou ausência de uma espécie, a dominância de espécies ou a composição de organismos está diretamente relacionada com características físico-químicas e processuais do sistema de tratamento (34). Por isso, a análise microscópica de protozoários e metazoários é utilizada para fornecer dados importantes sobre a eficiência de remoção de matéria orgânica da ETAR, a qualidade do efluente, o arejamento, a idade das lamas e se existem processos de nitrificação ou de substâncias tóxicas (44).

Os protozoários presentes nas lamas ativadas são classificados relativamente à sua locomoção, uma vez que grande parte são móveis, usando para isso flagelos, cílios ou pseudópodes. Assim, podem ser divididos em três grupos principais:

- **Sarcodinas** – Movem-se por pseudópodes. As amibas estão incluídas neste grupo, alimentando-se por absorção de alimentos solúveis ou por fagocitose de bactérias.

Os três grupos morfológicos presentes nas lamas ativadas são: amibas com teca (com concha), amibas nuas (sem concha) ou *Heliozoa* (formas planctônicas) (Tabela 3). A dominância por amibas nuas indica baixa eficiência do sistema de tratamento quando correlacionadas com pequenos flagelados. Pelo contrário, as amibas com teca são encontradas em sistemas de baixas cargas orgânicas, com idade elevada das lamas e presença de nitrificação, sendo então associadas a uma boa eficiência do sistema de tratamento (35,37,45);

Tabela 3 – Exemplo de sarcodinas presentes em lamas ativadas (81)

Grupo	Espécie	Descrição	Referência
Sarcodinas	<i>Arcella sp.</i>	A sua presença indica uma instalação que trabalha em baixa carga ou arejamento prolongado, com elevada nitrificação e bom arejamento; Frequente em efluentes industriais agroalimentares.	Canler <i>et al.</i> , 1999
	<i>Euglypha sp.</i>	A sua presença indica uma instalação que trabalha em baixa carga ou arejamento prolongado, com ou sem nitrificação.	Canler <i>et al.</i> , 1999
	Pequenas amibas com teca	Encontradas durante anomalias no funcionamento da ETAR, efluentes industriais contendo produtos químicos (indústria química) ou compostos tóxicos;	Canler <i>et al.</i> , 1999

- **Flagelados** – Deslocam-se através de um ou mais flagelos e alimentam-se de matéria orgânica solúvel por difusão ou transporte ativo (Tabela 4). A maioria é predadora de bactérias. São encontrados, predominantemente, na fase de arranque dos sistemas de lamas ativadas, indicando uma idade da lama baixa. São protozoários resistentes a condições anóxicas e a substâncias tóxicas, por isso, quando predominantes, indicam condições deficientes de arejamento e carga orgânica elevadas, logo, uma baixa qualidade do efluente final (35,37);

Tabela 4 – Exemplo de flagelados presentes em lamas ativadas (81)

Grupo	Espécie	Descrição	Referência
Flagelados	<i>Pequenos flagelados</i>	Indicam altas cargas, condições de sub-arejamento, baixo rendimento de depuração e a presença de amônia; Presentes abundantemente em estações na fase de arranque ou com anomalias de funcionamento.	Canler <i>et al.</i> , 1999
	<i>Euglena sp.</i>	Espécie rara e independente da qualidade do tratamento; Pode estar relacionada com baixas concentrações de lamas.	Canler <i>et al.</i> , 1999
	<i>Peranema sp.</i>	Raramente dominante, mas bastante frequente nas lamas ativadas; São relacionadas com condições de idade das lamas baixa e baixa carga; Ao contrário da maioria dos flagelados, estes são indicadores de boa qualidade do efluente final.	Canler <i>et al.</i> , 1999

- **Ciliados** – Utilizam cílios para se deslocarem e alimentam-se de bactérias. Também ajudam no processo de floculação, por segregarem substâncias com propriedades floculantes, ajudando a melhorar a qualidade do efluente. São os protozoários mais abundantes nas lamas ativadas (cerca de 70% da população de protozoários), podendo corresponder a cerca de 9% dos SST. A sua dominância é indicadora de um arejamento correto no sistema de tratamento, e desempenham um papel fundamental no processo de lamas ativadas pois existe uma relação direta entre o seu número e a qualidade do efluente final (35,45,46,47).

De acordo com o seu comportamento, hábitos alimentares e localização física na biomassa, os protozoários ciliados podem ser divididos em quatro grupos funcionais:

- **Nadadores** – Ciliados que permanecem em suspensão nos tanques de arejamento e alimentam-se de bactérias livres na fração líquida, e por isso podem ser removidos facilmente do sistema com o efluente (Tabela 5). São predominantes na fase de arranque dos sistemas aeróbios e a sua predominância indica uma eficiência

medíocre do sistema de tratamento. À medida que a floculação aumenta, estes ciliados são substituídos por outros mais eficientes que ganham a competição pelo alimento, tais como os ciliados sésseis. (35,48,49,50);

Tabela 5 – Exemplo de ciliados nadadores presentes em lamas ativadas (62,81)

Grupo	Espécie	Descrição	Referência
Ciliados nadadores	<i>Colpidium sp.</i>	São relacionados com cargas relativamente elevadas; Indicam uma qualidade média a baixa do efluente final.	Canler <i>et al.</i> , 1999
	<i>Depranomonas sp.</i>	Ciliados pouco abundantes nos sistemas de lamas ativadas; São relacionados com a elevada idade das lamas e nitrificação deficiente.	Madoni, 2004
	<i>Paramecium</i>	Ciliados pouco frequentes nos sistemas de lamas ativadas; Estão normalmente presentes em afluentes não tratados ou na fase inicial do tratamento, ou em condições transitórias.	Madoni, 2004
	<i>Trachelophyllum</i>	São associados a cargas orgânicas elevadas e a fenómenos transitórios; Indicam uma qualidade medíocre do efluente final.	Madoni, 2004
	<i>Uronema</i>	Ciliados associados a afluentes não tratados e condições de sub-arejamento.	Madoni, 2004

- **Móveis de fundo** – Ciliados que permanecem à superfície dos flocos e se alimentam de bactérias levemente aderidas ao floco, ocupando assim um nicho ecológico diferente dos outros (Tabela 6). Não havendo competição, este é o grupo predominante nas lamas ativadas. Por norma, a sua abundância ocorre após a fase de arranque e faz diminuir a carga orgânica. A sua predominância indica uma eficiência do tratamento razoável a boa. (35,48,49,50);

Tabela 6 – Exemplo de ciliados móveis de fundo presentes em lamas ativadas (62,81)

Grupo	Espécie	Descrição	Referência
Ciliados móveis de fundo	<i>Aspidisca cicada</i>	São muito abundantes em lamas ativadas em todo o tipo de cargas.	Madoni, 2004
	<i>Aspidisca lynceus</i>	São associados a baixa carga ou arejamento prolongado, com um bom arejamento e a uma boa nitrificação.	Canler <i>et al.</i> , 1999
	<i>Euplotes sp.</i>	Indicadores de cargas baixa a média; Indicam uma boa qualidade do efluente final.	Canler <i>et al.</i> , 1999

- **Sésseis** – Ciliados que se alimentam de bactérias e que estão fixos aos flocos através de pedúnculos, precipitando com estes com o decorrer da sedimentação (Tabela 7). Competem com os ciliados nadadores, pois ambos se alimentam de bactérias dispersas na fração líquida. A sua dominância indica uma eficiência medíocre do sistema de tratamento (48,49);

Tabela 7 - Exemplo de ciliados sésseis presentes em lamas ativadas (62,81)

Grupo	Espécie	Descrição	Referência
Ciliados sésseis	<i>Carchesium sp.</i>	São indicadores de carga média, de um funcionamento estável do tratamento, com um bom processo de nitrificação e um bom arejamento; Indicam uma qualidade boa a muito boa do efluente final.	Canler <i>et al.</i> , 1999
	<i>Epistylis sp.</i>	São associados a baixas cargas orgânicas e a um funcionamento correto do tratamento; Estão associados a uma variação entre longos períodos de anoxia e a períodos de arejamento; Indicam uma boa qualidade do efluente.	Canler <i>et al.</i> , 1999

	<i>Opercularia sp.</i>	São associados a cargas elevadas, baixa idade das lamas ou tratamento de resíduos dificilmente biodegradáveis (efluentes industriais); Ciliado resistente a alguns sais tóxicos, a pH ácido e pode ser relacionado a um período de sub-arejamento; Indicam uma qualidade medíocre do efluente final.	Canler <i>et al.</i> , 1999
	<i>Vorticella aquadulcis</i>	São associados a cargas baixas e médias e bom arejamento; Indicam uma boa qualidade do efluente final.	Madoni, 2004
	<i>Vorticella convalaria</i>	Indicadores de cargas médias e elevadas e com arejamento permanente; Esta espécie é particularmente sensível à presença de substâncias tóxicas e falta de oxigenação;	Canler <i>et al.</i> , 1999
	<i>Vorticella microstoma</i>	São associados a cargas elevadas e condições de sub-arejamento; Indicam um tratamento deficiente, logo uma baixa qualidade do efluente final.	Canler <i>et al.</i> , 1999

- **Carnívoros** – Ciliados que se alimentam de outros ciliados. Não se encontram como espécie dominante (35).

Para além dos protozoários, os metazoários também são encontrados em sistemas de lamas ativadas (Tabela 8). São organismos pluricelulares e alimentam-se de protozoários e de bactérias (34). São característicos de um sistema por arejamento prolongado, com baixa carga e elevada idade das lamas. Tal como os protozoários, os metazoários têm a função de controlar o crescimento de coliformes e bactérias patogénicas por predação das mesmas e contribuem para os fenómenos de floculação e desfloculação (48).

Tabela 8 – Exemplo de metazoários presentes nas lamas ativadas (62)

Grupo	Espécie	Descrição	Referência
Metazoários	Rotíferos	São os que aparecem com maior frequência numa ETAR e indicia lamas com idade elevada, bom arejamento e qualidade elevada do efluente final.	Madoni, 1994
	Nematodes	Estão presentes em todas as cargas orgânicas e em períodos de sub-arejamento.	Madoni, 1994
	Anelídeos	Surgem com pouca frequência e indicam uma idade elevada das lamas, cargas orgânicas muito baixas e ocorrência de nitrificação; Indicam uma elevada qualidade do efluente final.	Madoni, 1994

Como referido anteriormente, existe uma relação entre o grupo de protozoários dominante e a eficiência do tratamento por lamas ativadas, como é apresentado na Tabela 9.

Tabela 9- Relação entre os grupos dominantes, a eficiência do tratamento biológico e as causas de problemas (44,51)

Grupo de protozoário dominante	Eficiência do sistema de tratamento	Causa possível
Pequenos flagelados	Baixa	Lamas pouco oxigenadas, carga muito elevada, idade de lamas baixa, entrada de substâncias passíveis de fermentação
Pequenas amibas nuas e flagelados	Baixa	Carga elevada ou dificilmente biodegradável
Pequenos ciliados nadadores	Medíocre	Tempo de contacto muito breve, lamas pouco oxigenadas, fenómenos transientes
Grandes ciliados nadadores	Medíocre	Carga elevada
Ciliados sésseis	Medíocre	Fenómenos transitórios (carga descontínua, extração recente de lamas, tempo de recirculação baixo)
Ciliados móveis de fundo	Razoável a Elevada	Cargas orgânicas médias a baixas
Ciliados sésseis e móveis de fundo	Elevada	-
Amibas com teca	Elevada	Baixa carga e/ou diluída, idade das lamas elevada e boa nitrificação

1.4 – Contaminantes emergentes nas águas residuais

Atualmente, o foco das pesquisas sobre a poluição da água encontra-se nos chamados “contaminantes emergentes” – compostos com toxicidade reconhecida, mas que não têm legislação estipulada para águas (52). Estes são encontrados em águas residuais e podem ser pesticidas, alquilfenóis, bifenilos policlorados (PCBs), fitoestrogénios

e estrogénios naturais e compostos aromáticos tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (53,54).

Os grupos mais abundantes encontrados em águas residuais são os produtos farmacêuticos, que englobam hormonas contracetivas, reguladores lipídicos, analgésicos, antibióticos, medicamentos anti-cancro, medicamentos antiepiléticos, medicamento para a regulação da pressão arterial e produtos veterinários (55,56), e os PCP.

Devido ao aumento da produção e do consumo de PCP, estes tornaram-se um grupo de grande interesse (5). PCP indica um grupo de compostos químicos que são incluídos em diferentes produtos do quotidiano, tais como pasta dos dentes, champôs, cosméticos e até em alimentos (56). Devido a sua ampla aplicabilidade, são dos compostos mais detetados em águas superficiais no mundo (57), e podem facilmente chegar às águas residuais através das descargas domésticas. As principais categorias de PCP são conservantes (p.e. parabenos), desinfetantes/antissépticos (p.e. triclosan), repelentes de insetos (p.e. N, N-dietil-meta-toluamida), filtros UV (p.e. 4-metilbenzilideno cânfora) e fragrâncias (p.e. musks) (58). Dentro destes compostos, a classe que tem suscitado maior interesse são as fragrâncias (musks), porque são bioacumuláveis nos organismos.

1.4.1 – Fragrâncias (musks)

As fragrâncias são utilizadas numa vasta quantidade de PCP e tem como função dar um aroma agradável a estes produtos. Devido a estudos toxicológicos, alguns destes compostos foram proibidos e substituídos por outros. Estes contaminantes são ubíquos no ambiente e são a classe de PCP mais estudada (58,59). Devido a possuírem estruturas químicas diferentes, as fragrâncias podem ser divididas em dois grupos – fragrâncias naturais (compostas por extratos florais e animais) e fragrâncias sintéticas ou musks (56).

As fragrâncias naturais foram sendo substituídas pelos musks com propriedades semelhantes, sendo estes os mais utilizados atualmente. Os musks podem ser encontrados numa grande variedade de produtos, tais como produtos químicos domésticos, sabonetes e detergentes, e em altas concentrações em perfumes, loções para o corpo e desodorizante (56,60). Os musks de interesse para este estudo estão divididos em 3 grupos químicos – nitro musks, musks policíclicos e musks macrocíclicos. Todos os grupos têm características em comum, tais como serem bioacumuláveis nos organismos, pois, apesar de serem solúveis em água, apresentam altos coeficientes octanos/água ($\log K_{ow}$) (57):

- **Nitro musks** – Devido a ser demonstrado a sua toxicidade, estes compostos deixaram de ser tão frequentemente utilizados. Deste grupo, os compostos de interesse são: musk moskene (MM), musk cetona (MK) e musk xileno (MX) (56,59);
- **Musks policíclicos** – Devido a um menor custo e maior estabilidade, os musks policíclicos substituíram os nitro musks. Dentro destes, os musks de interesse são: cashmeran (DPMI), celestolide (ADBI), galaxolide (HHCB) e tonalide (AHTN) (59);
- **Musks macrocíclicos** – Estes musks são os mais quimicamente idênticos aos que ocorrem naturalmente, mas, devido ao alto custo de produção, ainda não são muito utilizados. O musk de interesse para o estudo é o brassilato de etileno (BE) (59).

De forma a caracterizar estes musks, são utilizadas propriedades físicas e químicas, tais como solubilidade em água, pressão de vapor, ponto de ebulição e o Log K_{ow} . Essa comparação está descrita na Tabela 10.

Tabela 10 - Propriedades físicas e químicas dos musks em estudo (57,61)

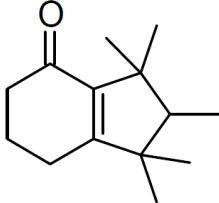
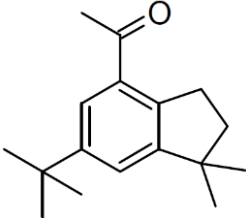
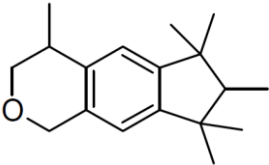
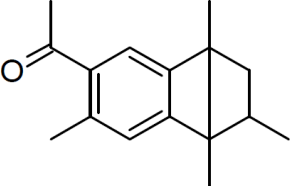
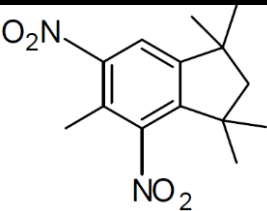
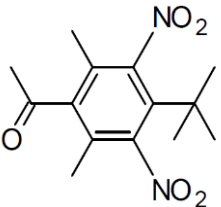
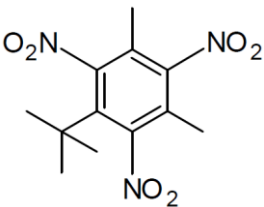
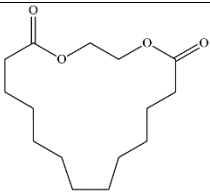
Família química	Acrônimo	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula e Estrutura molecular	Massa Molar (g/mol)	Log K _{ow}	Solubilidade em água a 25 °C (mg/L)	Pressão de vapor (mm Hg)
Musks policíclicos	Cashmeran (DPMI)	33704-61-9	C ₁₄ H ₂₂ O		206.32	4.9	0.17	3.9x10 ⁻²
	Celestolide (ADBI)	13171-00-1	C ₁₇ H ₂₄ O		244.38	5.93	0.22	1.5x10 ⁻⁴
	Galaxolide (HHCB)	1222-05-5	C ₁₈ H ₂₆ O		258.40	5.9	1.75	5.2x10 ⁻⁴
	Tonalide (AHTN)	1506-02-1	C ₁₈ H ₂₆ O		258.40	5.7	1.25	4.5x10 ⁻⁴

Tabela 10 (Continuação)

Família química	Acrônimo	Número CAS	Fórmula molecular	Fórmula e Estrutura molecular	Massa Molar (g/mol)	Log K _{ow}	Solubilidade em água a 25 °C (mg/L)	Pressão de vapor (mm Hg)
Nitro Musks	Musk moskene (MM)	116-66-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄		280.32	5.39	0.57	8.5x10 ⁻⁵
	Musk cetona (MK)	81-14-1	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅		294.30	4.31	0.46	5.84x10 ⁻⁷
	Musk xileno (MX)	81-15-2	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₆		297.26	4.9	0.15	2.25x10 ⁻⁷
Musks macrocíclicos	Brassilato de Etileno (BE)	105-95-3	C ₁₅ H ₂₆ O ₄		270.36	4.70	1.72	3.285x10 ⁻⁴

1.5 – Ocorrência de musks, TCS e metil-TCS em ETAR

Não é fácil analisar quais são as concentrações normais de musks nas águas residuais pois estes podem variar drasticamente consoante o tamanho da ETAR, a densidade populacional, a origem dos efluentes (efluente doméstico, industrial, hospitalar e/ou agrícola) e o tipo de metodologias aplicadas. Estes parâmetros também influenciam a eficácia na remoção dos musks das águas residuais (63,64,65). Uma característica dos musks é a sua difícil biodegradação e, por isso, os processos de tratamento biológico convencionais utilizados nas ETAR por vezes não são capazes de os remover (66,67).

O número de estudos em relação à remoção de musks em ETAR aumentou significativamente nas últimas décadas. Na Tabela 11 são apresentados alguns estudos realizados acerca da presença dos musks de interesse nas ETAR. A maioria dos estudos é realizado em zonas urbanas, onde existe maior população e atividade industrial, logo, maior produção de águas residuais e consequentemente, maior número de ETAR.

As ETAR apresentadas têm afluentes de diferentes tipos, desde afluente doméstico, afluente urbano (afluente doméstico + afluente industrial), em que o afluente industrial pode ter uma percentagem residual (69) ou ser de cerca de 70% (77) e também afluente hospitalar (69). Na grande parte dos casos, o método de tratamento secundário é o tratamento por lamas ativadas e é o método utilizado nas ETAR que foi alvo de estudo. Também são apresentadas ETAR com e sem tratamento terciário, de forma a avaliar se este tipo de tratamento tem influência na remoção dos musks (73). Dos estudos referidos, foram encontradas concentrações de todos os musks nas ETAR, exceto de EB, TCS e metil-TCS. Os musks são usados em diversos produtos tais como cosméticos, detergentes, perfumes, champôs, produtos de limpeza doméstica, entre outros, por isso chegam facilmente ao esgoto e, consequentemente, às ETAR (78). De acordo com Lv *et al.*, 2010 (109), os musks mais utilizados em produtos são os musks policíclicos HHCB e o AHTN, daí estes, por norma, terem concentrações maiores e aparecerem com maior frequência.

Os valores de referência para este estudo são os encontrados nas ETAR de Portugal, onde os valores máximos atingidos nos afluentes são de 4 040 ng/L para o DPPI (71), 5 801 ng/L para o HHCB, 250 ng/L para o MK (68) 1 442 ng/L para o ADBI (71), 1290 ng/L para o AHTN (72), 621 ng/L para o MX (69) e 250 ng/L de MK (68). Nos estudos em Portugal não foram encontrados dados para o MM. Exceto em Silva e Nogueira, 2017 (71), em todos os casos em Portugal onde existia a ocorrência de afluentes industriais, estavam presentes maior número e maiores concentrações de musks do que em ETAR apenas com afluentes domésticos.

Tabela 11 - Ocorrência de musks em ETAR. (**DPMI** – Cashmeran; **ADBI** – Celestolide; **HHCB** – Galaxolide; **AHTN** – Tonalide; **MM** – Musk moskene; **MK** – Musk cetona; **MX** – Musk xileno; **BE** – Brassilato de etileno; **TCS** – Triclosan; **Metil-TCS** – Metil-triclosan)

País	Informação da ETAR	Observações	Composto											Referências
				DPMI	ADBI	HHCB	AHTN	MM	MK	MX	BE	TCS	Metil-TCS	
Portugal	Tratamento secundário	Local – Porto; 2 amostras da mesma ETAR – Foram selecionados os valores máximos registados	Af (ng/L)	797.8	2.7	5801	537.4	-	250.0	-	-	-	-	(68)
			Ef (ng/L)	739.6	2.1	3799	281.5	-	242.1	-	-	-	-	
Portugal	Afluente doméstico e industrial; Tratamento secundário (filtro biológico)	Local – Coimbra; Foram selecionados os dados correspondentes à Primavera	Af (ng/L)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	(69)
			Ef (ng/L)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
Portugal	Afluente doméstico. Afluente industrial residual; Tratamento secundário (lamas ativadas com arejamento prolongado)	Local – Bragança; Foram selecionados os dados correspondentes à Primavera	Af (ng/L)	n.d	n.d	< 72	<4	n.d	n.d	621	n.d	n.d	n.d	(69)
			Ef (ng/L)	n.d	n.d	< 72	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	

Tabela 11 (Continuação)

País	Informação da ETAR	Observações		Composto										Referências
				DPMI	ADBI	HHCB	AHTN	MM	MK	MX	BE	TCS	Metil-TCS	
Portugal	Afluente doméstico e industrial; Tratamento secundário (lamas ativadas) + biofiltração	Local – Frielas; Foram selecionados os dados correspondentes à Primavera	Af (ng/L)	n.d	n.d	701	264	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	(69)
			Ef (ng/L)	n.d	n.d	< 72	< 4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
Portugal	Afluente doméstico e industrial; Tratamento secundário (lamas ativadas) + desinfecção	Local – Beirolas; Foram selecionados os dados correspondentes à Primavera	Af (ng/L)	n.d	n.d	1571	370	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	(69)
			Ef (ng/L)	n.d	n.d	390	264	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
Portugal	Afluente doméstico; Tratamento secundário (lamas ativadas com arejamento prolongado) + desinfecção com UV	Local – Vila Real Santo António; Foram selecionados os dados correspondentes à Primavera	Af (ng/L)	n.d	n.d	740	269	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	(69)
			Ef (ng/L)	n.d	n.d	273	< 4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	

Tabela 11 (Continuação)

País	Informação da ETAR	Observações		Composto										Referências
				DPMI	ADBI	HHCB	AHTN	MM	MK	MX	BE	TCS	Metil-TCS	
Portugal	Afluente doméstico, hospitalar e industrial; Tratamento secundário (lamas ativadas com arejamento de carga média) + desinfecção com UV	Local – Viana do Castelo; Foram selecionados os dados correspondentes à Primavera	Af (ng/L)	n.d	n.d	2701	503	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	(69)
			Ef (ng/L)	n.d	n.d	< 72	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
Portugal	Afluente doméstico	Local – Fernão Ferro (Seixal); Foram selecionados os valores mínimos e máximos registados	Af (ng/L)	66 – 4040	6 – 1442	50 – 2780	18 – 816	-	-	-	-	-	-	(71)
			Ef (ng/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Portugal	Afluente doméstico e industrial	Local - Cartaxo	Af (ng/L)	-	< 19	4670	1290	-	< 12	-	-	-	-	(72)
			Ef (ng/L)	-	< 19	1270	259	-	< 12	-	-	-	-	

Tabela 11 (Continuação)

País	Informação da ETAR	Observações		Composto										Referências
				DPMI	ADBI	HHCB	AHTN	MM	MK	MX	BE	TCS	Metil-TCS	
Espanha	Afluente doméstico e industrial; Tratamento secundário (lamas ativadas)	ETAR A – foram selecionados os valores mínimos e máximos registados	Af (ng/L)	690 – 3410	232 – 1133	2398 – 5516	852 – 2575	159 – 639	987 – 4110	208 – 632	-	-	-	(70)
			Ef (ng/L)	91 – 478	34 – 277	769 – 895	391 – 878	137 – 221	218 – 457	29 – 84	-	-	-	
Espanha	Afluente doméstico e industrial; Tratamento secundário (lamas ativadas)	ETAR B – foram selecionados os valores mínimos e máximos registados	Af (ng/L)	n.d – 32933	n.d – 44319	818 – 45091	990 – 49904	n.d – 1182	n.d – 1677	n.d – 321	-	-	-	(70)
			Ef (ng/L)	n.d – 9437	n.d – 9930	< 1.5 – 900	< 2 – 7555	n.d	n.d – 465	n.d	-	-	-	
França	Afluente doméstico e industrial	Foram selecionados os valores máximos registados	Af (ng/L)	267	24	2347	134	n.d	n.d	-	-	-	-	(74)
			Ef (ng/L)	112	n.d	1512	90	n.d	n.d	-	-	-	-	

Tabela 11 (Continuação)

País	Informação da ETAR	Observações		Composto										Referências
				DPMI	ADBI	HHCB	AHTN	MM	MK	MX	BE	TCS	Metil-TCS	
Canada	Afluente doméstico e industrial; Tratamento secundário (lamas ativadas)	Afluente - selecionados os valores mínimos e máximos registrados; Efluente – selecionados valores máximos registrados	Af (ng/L)	6.3 – 13.5	4.8 – 8.2	246.7 – 567.5	47.2 – 136.7	n.d	12.5 – 15.5	10.8 – 16.0	-	-	-	(73)
			Ef (ng/L)	4.7	4.0	234.0	62.8	n.d	8.4	6.4	-	-	-	
Canada	Afluente doméstico e industrial; Tratamento secundário (lamas ativadas) + desinfecção por UV	Foram selecionados os valores mínimos e máximos registrados; Afluente – selecionados valores máximos registrados	Af (ng/L)	6.3 – 13.5	4.8 – 8.2	246.7 – 567.5	47.2 – 136.7	n.d	12.5 – 15.5	10.8 – 16.0	-	-	-	(73)
			Ef (ng/L)	4.0	2.8	145.6	37.4	n.d	8.5	7.6	-	-	-	
USA	Afluente doméstico e industrial; Tratamento primário, secundário e terciário	Foram selecionados os valores mínimos e máximos registrados	Af (ng/L)	n.d – 427	n.d – 45	4772 – 13399	509 – 2337	-	n.d – 812	n.d	-	-	-	(65)
			Ef (ng/L)	77 – 421	n.d	2928 – 10525	328 – 1754	-	n.d – 177	n.d	-	-	-	

Tabela 11 (Continuação)

País	Informação da ETAR	Observações		Composto										Referências
				DPMI	ADBI	HHCB	AHTN	MM	MK	MX	BE	TCS	Metil-TCS	
China	Afluente doméstico; Tratamento secundário (lamas ativadas com arejamento prolongado)	Foram selecionados os valores mínimos e máximos registrados	Af (ng/L)	n.d	n.d	1467 – 3430	435 – 1043	-	418 – 1010	< 4	-	-	-	(75)
			Ef (ng/L)	n.d	n.d	233 - 336	74 – 94	-	43 – 101	< 4	-	-	-	
China	Afluente doméstico e industrial	Foram selecionados os valores médios registrados	Af (ng/L)	-	-	1290.4	378.2	-	72.1	80.4	-	-	-	(76)
			Ef (ng/L)	-	-	212.6	38.7	-	8.4	< 0.09	-	-	-	
China	Afluente doméstico e industrial (cosmético); Afluente industrial representa 70% do total; Tratamento secundário (lamas ativadas)	Foram selecionados os valores mínimos e máximos registrados	Af (ng/L)	190 – 340	n.d – <10	1010 – 3080	120 – 160	-	-	-	-	-	-	(77)
			Ef (ng/L)	60 – 100	< 10	950 - 2020	100 – 140	-	-	-	-	-	-	

(n.d) não detetado, (-) não mencionado, (Af) Afluente, (Ef) Efluente

Com valores mais elevados do que Portugal, encontra-se a Espanha que apresenta valores máximos de 32 933 ng/L para o DPMI, 44 319 ng/L para o ADBI, 45 091 ng/L para o HHCB, 49 904 ng/L para AHTN, 1 182 ng/L para o MM, 4 110 ng/L para o MK e 632 ng/L para o MX. Neste caso, foi possível encontrar MM em concentrações máximas de 1 182 ng/L (70). Os dados encontrados nas ETAR de Espanha estão de acordo com o estudo de Lv *et al.*, 2010 (109), pois as concentrações mais elevadas são do HHCB e do AHTN.

Em França (74) os valores máximos registados foram 267 ng/L para o DPMI, 24 ng/L para o ADBI, 2 347 ng/L para o HHCB e 134 ng/L para o MM. Não foram registados valores para o MK e MX. No caso da América do Norte, os valores máximos registados são 427 ng/L para o DPMI, 45 ng/L para o ADBI, 13 399 ng/L para o HHCB, 2 337 ng/L para o AHTN, 812 ng/L para o MK (65) e 16 para o MX (73) e na China, os valores máximos registados são de 430 ng/L e < 10 ng/L para o DPMI e ADBI respetivamente (76) e são registados valores máximos de 3 430 ng/L para o HHCB, 1 043 ng/L para o AHTN e 1 010 ng/L para o MK e 80.4 ng/L para o MX (75). Tal como Portugal, não foram encontrados registos de MM nos afluentes das ETAR.

Segundo Lv *et al.*, 2010 (109), os nitro musks, principalmente os MK e MX eram os mais utilizados, mas depois da descoberta do seu potencial carcinogénico, foram proibidos ou têm a utilização restrita na maioria dos países desenvolvidos, daí estes serem os musks que aparecem com menor frequência e em menores concentrações em todos os estudos. Apesar disso, foram encontrados MK e MX em todos os países, sendo as concentrações maiores em Espanha e na China. A China é dos maiores produtores de nitro musk do mundo (80).

No estudo de Yang e Metcalfe, 2006 (73), foram registados os valores do efluente com e sem desinfecção por UV. Embora existam algumas diferenças, o autor conclui que não afeta o resultado porque as diferenças não são significativas.

De uma forma geral, é possível concluir que efluentes industriais são responsáveis pelo aparecimento de maior número de musks e em maiores concentrações, e que as ETAR conseguem diminuir as concentrações de alguns musks nas águas residuais, numa percentagem que pode ir deste 10% até perto de 100%, mas não conseguem eliminá-los a todos totalmente.

1.6 – Análise dos protozoários e metodologias analíticas para a determinação de musks, TCS e metil-TCS

1.6.1 – Amostragem e pré-tratamento

A amostragem pode ser realizada durante todo o processo realizado na ETAR. Para a observação de protozoários e metazoários é necessário recolher amostras de lamas ativadas a cerca de meia profundidade do tanque de arejamento e devem ser recolhidas em pontos bastante homogêneos (83). Posteriormente, as amostras são recolhidas para frascos de vidro âmbar, de forma a evitar a ocorrência de reações catalisadas pela luz solar, que podem alterar a amostra (53).

Caso o período entre a amostragem e a análise seja longo, as amostras são refrigeradas a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ durante o transporte até ao laboratório e são armazenadas a -20°C até análise (68, 69). Caso haja a possibilidade de realizar a análise da amostra no imediato, não é necessário congelar.

Depois de descongelar a amostra até esta atingir a temperatura da sala, é necessário remover as partículas suspensas que podem dificultar a extração, de forma a garantir bons valores de recuperação e evitar perdas significativas dos analitos alvo (70). Esta remoção pode ser através de filtros de vidro (69) ou através de uma centrifugação (68). Pode ser adicionado, por exemplo, ácido clorídrico até atingir $\text{pH} = 2$ para evitar a protonação dos compostos mais básicos. Por fim, as amostras podem ser refrigeradas novamente ou então prosseguem para a análise.

1.6.2 – Método extrativo

Os musks são encontrados em concentrações muito baixas ($\mu\text{g/L}$ ou menos) nas amostras de água, por isso, os procedimentos de extração seletivos e técnicas de alta sensibilidade são obrigatórios para analisá-los com precisão (69). Além disso, as águas residuais têm uma matriz bastante complexa, com altas quantidades de matéria orgânica, e, por isso, é necessária uma técnica de extração para isolar os compostos alvo do resto da matriz para evitar interferências na medição, tais como supressões ou ampliações na espectrometria de massa (MS), concentrar os compostos alvo e alcançar os níveis baixos de concentração presentes (85). Por fim, o objetivo na escolha do método extrativo é escolher a técnica mais eficiente, mais rápida e ambientalmente sustentável, reduzindo a utilização de solventes orgânicos nocivos para o ambiente (69,86).

Já foram aplicadas várias técnicas de extração na análise musks, tais como: extração líquido-líquido (LLE) (87,88,89), extração em fase sólida (SPE) (65,70,75,76,77), microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME) (68,69), microextração em fase sólida (SPME) (71), extração por barra de agitação (SBSE) (72), microextração por sorvente empacotado (MEPS) (74) e também extração acelerada de solvente (ASE) (73).

LLE e SPE são as técnicas tradicionalmente utilizadas para a extração. São técnicas que exigem grandes quantidades de amostra e quantidades elevadas de solventes orgânicos (85). No entanto, foram desenvolvidas as técnicas de microextração que diminuíram o volume de amostra utilizado e reduziram ou eliminaram a utilização de solventes orgânicos durante a extração, tornando estes métodos mais ambientalmente sustentáveis (90,91).

Atualmente, técnicas como SPME e SBSE são amplamente utilizadas para determinar PCP em águas devido à sua alta sensibilidade e reprodutibilidade, ao seu fácil uso e por não utilizarem solventes orgânicos (92). O sorbente mais utilizado é o polidimetilsiloxano (PDMS), e a diferença entre a SPME e a SBSE é a quantidade utilizada deste sorbente (93). Apesar das vantagens, estas técnicas necessitam de cerca de uma hora ou mais para a extração (85).

Em relação às microextrações em fase líquida, a SDME é utilizada ocasionalmente para a determinação de PCP. No entanto, a técnica mais utilizada é a DLLME, a única técnica competitiva com as extrações em fase sólida (85), sendo esta a técnica utilizada neste estudo. A DLLME foi introduzida por Rezaee *et al.*, (94) como uma técnica eficaz, simples, rápido, com baixo consumo de solventes e reagentes (ordem dos microlitros) e com alto fator de enriquecimento (95,96). Foi comprovado que esta técnica é capaz extrair musks, TCS e metil-TCS em diferentes matrizes aquosas, incluindo águas residuais (69).

Um dos parâmetros importantes do DLLME é a escolha dos solventes de extração e dispersão. O solvente de extração deve extrair os compostos de interesse, ser imiscível, ter uma densidade maior que a fase aquosa, para que possa sedimentar após a centrifugação e ter um bom comportamento com a técnica analítica a ser utilizada. O solvente de dispersão tem de ser miscível tanto na fase aquosa como no solvente de extração e, quando misturado, deve formar uma solução turva. Uma das grandes vantagens desta técnica é a sua rapidez, uma vez que a área de superfície entre o solvente de extração e a fase aquosa é tão grande, que atinge o estado de equilíbrio quase instantaneamente (97). Já foram utilizados diferentes solventes de extração e dispersão, sendo comumente o tetracloreto de carbono (TCC) usado como extrator e o MeOH ou o 2-propanol (IPA) como solventes dispersivos (97,98,99). Esta técnica pode sofrer modificações de forma a tornar-se mais eficaz para determinados compostos, como, por

exemplo – incluir um procedimento de derivatização *in situ* por anidrido acético, de forma a melhorar a resposta cromatográfica a compostos mais polares (69) ou a utilização de ultrassons como sistema emulsificante de forma a melhorar a determinação de alguns ftalatos, nitro musks (MX, MK e MM) e musks policíclicos (100).

1.6.3 – Técnica Cromatográfica

Após os processos de extração e limpeza, é necessário selecionar uma técnica analítica apropriada, para identificar e quantificar os compostos alvo nas amostras (101). Tanto a GC como a cromatografia líquida (LC) acoplada a MS permitem a sensibilidade necessária para detetar níveis vestigiais dos potenciais contaminantes, são capazes de detetar uma variedade de compostos numa única amostra e são técnicas de referência na análise de contaminantes emergentes (102,103). Apesar disso, os métodos cromatográficos apresentam desvantagens, tais como, não ser possível a sua aplicação no campo, ser necessário pessoal altamente qualificado, terem altos custos e ser necessário o pré-tratamento da amostra (103).

As propriedades físicas e químicas dos analitos são determinantes na escolha da técnica cromatográfica. Quando se trata de identificar compostos mais polares e menos voláteis é utilizado a LC, enquanto que a GC é usada para quantificar compostos voláteis (102).

Os analitos deste estudo são os nitro musks, musks policíclicos e musks macrocíclicos. Todos estes compostos têm volatilidade e estabilidade suficientes para serem determinados por GC, normalmente acoplado a um único MS quadrupolo (85), sendo este o método utilizado neste estudo.

Diferentes técnicas de extração podem ser utilizadas em amostras de água residuais para a identificação em GC, tendo cada uma delas uma percentagem de recuperação, um limite de deteção (LOD) e um limite de quantificação (LOQ) específicos, como se pode observar na Tabela 12. Consoante os analitos a observar e o material disponível no laboratório, é selecionado o melhor conjunto de técnicas.

Tabela 12 - Técnicas de extração acopladas à análise GC de musks em amostras de águas residuais, recuperações, limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ)

País	Técnica de Extração	Técnica Analítica	Coluna (comprimento x id.; espessura do filme)	Compostos	Recuperação (%)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Referências
Portugal	USA – DLLME	GC – MS/MS	CP-Sil 8 CB 50 m x 0.25 mm; 0.12 µm	DPMI	Af: 86 – 100 Ef: 90 – 121	0.9	3.1	(68)
				ADBI	Af: 85 – 98 Ef: 83 – 103	0.1	0.2	
				HHCB	Af: 102 – 113 Ef: 88 – 111	0.6	1.9	
				AHNT	Af: 98 – 114 Ef: 84 – 106	0.5	1.6	
				MK	Af: 83 – 120 Ef: 101 – 123	3.2	10.5	
Portugal	DLLME com derivatização <i>in situ</i>	GC – MS	DB-5-MS 30 m x 0.25 mm; 0.25 µm	DPMI	89 – 106	0.6	2	(69)
				ADBI	86 – 95	0.5	2	
				HHCB	95 – 118	22	72	
				AHTN	117 – 121	1	4	
				MM	63 – 79	1	4	
				MK	68 – 78	3	8	
				MX	71 – 85	2	8	
				EB	56 – 77	9	30	
				TCS	66 – 77	8	28	
				Metil-TCS	86 – 97	9	31	

Tabela 12 (Continuação)

País	Técnica de Extração	Técnica Analítica	Coluna (comprimento x id.; espessura do filme)	Compostos	Recuperação (%)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Referências
Portugal	SPME	GC – MS	DB-5MS fused-silica 30 m x 0.32 mm; 0.25 µm	DPMI	83	1	1	(71)
				ADBI	85	2	2	
				HHCB	94	1	1	
				AHTN	82	1	1	
Portugal	SBSE – LD	LVI-GC-MS	TRB-5MS 30 m x 0.25 mm; 0.25 µm	ADBI	105.2	19	62	(72)
				HHCB	107.6	14	48	
				AHTN	105.1	17	58	
				MK	83.7	12	41	
Espanha	SPE	GC – MS	ZB-50 30 m x 0.25 mm; 0.25 µm	DPMI	> 90	Af: 5 Ef: 2.5	Af: 10 Ef: 7.5	(70)
				ADBI	> 90	Af: 1 Ef: 1	Af: 7.5 Ef: 5	
				HHCB	> 90	Af: 2 Ef: 1.5	Af: 5 Ef: 5	
				AHTN	> 90	Af: 2.5 Ef: 2	Af: 5 Ef: 5	
				MM	> 90	Af: 5 Ef: 1	Af: 7.5 Ef: 5	
				MK	> 90	Af: 2.5 Ef: 1	Af: 7.5 Ef: 5	
				MX	> 90	Af: 3 Ef: 2.5	Af: 7.5 Ef: 7.5	

Tabela 12 (Continuação)

País	Técnica de Extração	Técnica Analítica	Coluna (comprimento x id.; espessura do filme)	Compostos	Recuperação (%)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Referências
França	MEPS	LVI – GC – MS	HP-5MS 30 m x 0.25 mm; 0.25 µm	DPMI	Af: 108 Ef: 76	Af: 10 Ef: 7	-	(74)
				ADBI	Af: 135 Ef: 86	Af: 8 Ef: 14	-	
				HHCB	Af: 89 Ef: 133	Af: 23 Ef: 39	-	
				AHTN	Af: 76 Ef: 108	Af: 25 Ef: 31	-	
				MM	Af: 85 Ef: 75	-	-	
				MK	Af: 118 Ef: 87	Af: 9 Ef: 10	-	
Canadá	ASE	GC – MS	VF-5MS 30 m x 0.25 mm; 0.25 µm	DPMI	70	-	0.4 – 4.0	(73)
				ADBI	> 80	-	0.4 – 4.0	
				HHCB	> 80	-	0.4 – 4.0	
				AHTN	> 80	-	0.4 – 4.0	
				MM	> 80	-	0.4 – 4.0	
				MK	> 80	-	0.4 – 4.0	
				MX	> 80	-	0.4 – 4.0	

Tabela 12 (Continuação)

País	Técnica de Extração	Técnica Analítica	Coluna (comprimento x id.; espessura do filme)	Compostos	Recuperação (%)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Referências
USA	SPE	GM – MS	DB-5 - x 0.25 mm; 1 µm	DPMI	> 50	4	40	(65)
				ADBI	> 50	4	40	
				HHCB	> 50	4	40	
				AHTN	> 50	4	40	
				MM	> 50	4	40	
				MK	> 50	4	40	
				MX	> 50	4	40	
China	SPE	GC – MS	HP-5MS 30 m x 0.25 mm; 0.25 µm	DPMI	79.2	2	4	(75)
				ADBI	73.8	1	2	
				HHCB	77.8	2	4	
				AHTN	83.4	2	4	
				MK	68.7	2	4	
				MX	62.3	2	4	

Tabela 12 (Continuação)

País	Técnica de Extração	Técnica Analítica	Coluna (comprimento x id.; espessura do filme)	Compostos	Recuperação (%)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Referências
China	SPE	GC – MS	RTX-5 MS 30 m x 0.25 mm; 0.25 µm	HHCB	42.4 – 94.8	1.5	5.0	(76)
				AHTN	37.3 – 108.6	1.0	4.0	
				MK	50.6 – 107.8	2.0	8.0	
				MX	32.7 – 87.7	2.5	12.5	
China	SPE	GC – MS	HP-5 fused silica 30 m x 0.25 mm; 0.25 µm	DPMI	82.63	20	-	(77)
				ADBI	65.5	10	-	
				HHCB	71.08	20	-	
				AHTN	83.78	20	-	
Espanha	DLLME	GC – MS	HP-5MS 30 m x 0.25 mm; 0.25 µm	MM	Af: 109 Ef: 94	6	19	(97)
				MK	Af: 107 Ef: 116	7	24	
				MX	Af: 107 Ef: 96	19	63	

(-) não mencionado, (Af) Afluente, (Ef) Efluente

1.7 – Caracterização das ETAR em estudo

Como referido anteriormente, os métodos utilizados em cada ETAR podem variar, fazendo com que a estrutura da ETAR também varie. Neste estudo, foram recolhidas amostras de 5 ETAR diferentes, todas da zona norte do país, que serão denominadas ETAR 1, ETAR 2, ETAR 3, ETAR 4 e ETAR 5. A característica teórica dos afluentes brutos de cada ETAR está sumarizado na Tabela 13.

ETAR 1 (17)

A ETAR 1 situa-se no concelho de Esposende, e encontra-se em funcionamento desde abril de 1991. Segundo dados de 2014, a ETAR 1 é capaz de dar resposta, em média, a um total de 22 248 hab.eq. em época baixa (EB) e 44 892 hab.eq. em época alta (EA), juntando a população residente, a flutuante e fossas sépticas. Relativamente ao caudal médio (m^3/dia) em EB é de 3 594 e em EA é de 6 741.

Na ETAR 1 existem descargas industriais e de hospitais, no entanto com uma percentagem baixa tendo em conta a componente doméstica.

Nesta ETAR o tratamento biológico é realizado segundo um sistema de lamas ativadas em reatores biológicos do tipo *SBR* (*Sequencing Batch Reactors*). A diferença entre este método SBR e o método tradicional é que neste pode-se realizar o tratamento biológico e decantação secundária num único tanque com controlo automatizado. Num sistema convencional de lamas ativadas, estes processos seriam realizados usando tanques diferentes. O oxigénio necessário para a degradação biológica é fornecido ao reator por um sistema de arejamento de difusores de bolha fina, colocados na base do reator.

Relativamente ao tratamento terciário, a ETAR 1 é composta por um processo de filtração por microtamisação, para redução da concentração de sólidos em suspensão e por uma desinfecção final por meio de radiação ultravioleta. A desinfecção por UV da ETAR tem como duplo objetivo a desinfecção para descarga em meio hídrico (2 000 NMP/100 mL) e reutilização de águas residuais tratadas (100 NMP/100 mL).

Por fim, a descarga da ETAR 1 não se encontra integrada na bacia hidrográfica de uma zona considerada sensível, mas devido à proximidade de zonas balneares considerou-se ser uma mais valia a desinfecção das águas residuais tratadas, não existindo obrigatoriedade legal para tal.

ETAR 2 (113)

A ETAR 2 situa-se no concelho de Esposende, e o seu arranque foi em 1999. Segundo dados de 2004, a população abrangida é de 34 814 hab.eq. em EB e de 45 257 hab.eq. em EA e o caudal médio (m^3/dia) é de 6 480 e 8 580 em EB e EA, respetivamente, sendo a componente industrial de importância ínfima.

O tratamento biológico baseia-se em valas de oxidação, com arejamento através de arejadores de superfície, seguido de decantação secundária. O efluente secundário sofre um processo de microtamisação, e de seguida desinfeção por UV.

O meio hídrico onde ocorre a descarga do efluente tratado não é considerado uma zona sensível.

ETAR 3 (23)

A ETAR 3 localiza-se no conselho de Viana do Castelo. Segundo dados de 2000, a ETAR 3 recebe afluente doméstico, industrial e fossas sépticas, sendo capaz de dar resposta a 23 723 hab.eq. em EB e a 28 615 em EA, juntando os três tipos de afluentes. Em relação ao caudal médio (m^3/dia) em EB é de 2 824 e em EA é de 5 044.

Tal como a ETAR 2, o tratamento biológico é o tradicional – sistema de lamas ativadas em arejamento prolongado em canais de oxidação - com arejadores superficiais e um decantador secundário. (Tanques separados)

De seguida, o efluente secundário sofre o tratamento terciário. São utilizados microtamisadores ($20\ \mu\text{m}$), seguido de desinfeção por UV. Não há objetivo para a reutilização do efluente tratado exceto para água de serviço da ETAR.

O meio hídrico onde é descarregado o efluente final da ETAR 3 não é considerado uma zona sensível, mas devido a atingir locais perto de zonas balneares considerou-se ser uma mais valia a desinfeção das águas residuais tratadas, não existindo obrigatoriedade legal para tal.

ETAR 4 (24)

A ETAR 4 localiza-se no concelho de Vila Nova de Famalicão. No caso da ETAR 4, os dados referentes a 2007 indicam a presença de afluente doméstico, industrial e fossas sépticas, abrangendo na totalidade uma população de 30 150 hab.eq. Neste caso o caudal médio (m^3/dia) é de 5 808. O afluente industrial provém de indústrias têxteis e alimentares.

Relativamente ao tratamento secundário (biológico) na ETAR 4, este consiste novamente num sistema de lamas ativadas em arejamento prolongado em canais de oxidação, seguido de uma decantação secundária.

Posteriormente, o tratamento terciário baseia-se num processo microtamisação seguido de uma desinfecção por UV.

ETAR 5 (114)

A ETAR 5 localiza-se no concelho de Vila do Conde. Segundo dados de 2010, a população abrangente é de 62 979 em EB e de 89 909 em EA, com os seguintes caudais (m³/dia) – 10 521 em EB e 14 839 em EA. Esta ETAR é caracterizada por afluentes industriais de indústrias têxtil e de vestuário da região.

Tal como as ETAR anteriores, o tratamento secundário baseia-se no processo de lamas ativadas em vala de oxidação, mas com a diferença que o arejamento é conferido por um sistema de difusão por bolha fina. De seguida, o efluente passa por um processo de microtamisação e, por fim, desinfecção do efluente com radiação UV.

A descarga é realizada numa zona não sensível, mas devido à proximidade de zonas balneares considerou-se ser uma mais valia a desinfecção das águas residuais tratadas, não existindo obrigatoriedade legal para tal.

Tabela 13 - Características teóricas das ETAR em estudo

		ETAR 1		ETAR 2		ETAR 3		ETAR 4	ETAR 5	
		EB	EA	EB	EA	EB	EA		EB	EA
População (Total)		22 248	44 892	34 814	45 257	23 723	38 6115	30 150	62 979	89 909
Caudal total (m³/dia)		3 594	6 741	6 480	8 580	2 824	5 044	5 808	10 521	148 39
Condições do afluente	CQO (kg/d)	1 317	27 75	4 595	5 973	-	-	-	8 313	11 868
	CBO (kg/d)	599	1 262	2 089	2 715	1 423	2 317	1 809	3 559	5 175
	SST (kg/d)	698	1 472	3 154	4 100	2 135	3 475	2 227	3 992	5 877
	N-total (kg/d)	120	252	417	543	-	-	233	756	1 079
	P-total (kg/d)	11	23	-	-	-	-	46,9	114	162
Afluente industrial significativo		Não		Não		Sim		Sim (têxtil e alimentar)	Sim (têxtil e vestuário)	
Tratamento secundário		SBR (<i>Sequencing Batch Reactors</i>)		Sistema de lamas ativadas em arejamento prolongado em canais de oxidação		Sistema de lamas ativadas em arejamento prolongado em canais de oxidação		Sistema de lamas ativadas em arejamento prolongado em canais de oxidação	Sistema de lamas ativadas em arejamento prolongado em canais de oxidação	
Tratamento terciário		Microtamisação e desinfecção por UV		Microtamisação e desinfecção por UV		Filtros de malha fina de 20 µm e desinfecção por UV		Filtro de malha metálica de 80 µm e desinfecção por UV	Microtamisação (malha de 30 µm) e desinfecção por UV	

1.8 – Objetivo do estudo

Atualmente, os musks são utilizados em diversos produtos do cotidiano e, por isso, as suas concentrações nas ETAR têm vindo a aumentar. O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar se as ETAR em estudo são eficazes na remoção dos musks das águas residuais e se existe relação entre a comunidade de microrganismos presentes nas lamas ativadas e a eficácia na remoção dos musks.

Capítulo II

Materiais e Métodos

Capítulo II – Materiais e Métodos

2.1 – Padrões e Reagentes

Musks (fragrâncias sintéticas): 6,7-di-hidro-1,1,2,3,3-pentametil-4 (5*H*)-indanona (DPMI, cashmeran), 4-acetil-1,1-dimetil-6-*tert*-butilindano (ADBI, celestolide), 1,3,4,6,7,8-hexa-hidro-4,6,6,7,8,8-hexametilciclopenta-(*g*)-2-benzopirano (HHCB, galaxolide), 7-acetil-1,1,3,4,4,6-hexametil-1,2,3,4-tetra-hidronaftaleno (AHTN, tonalide), 4-aceto-3,5-dimetil-2,6-dinitro-*tert*-butilbenzeno (MK, musk cetona), 1,1,3,3,5-pentametil-4,6-dinitroindano (MM, musk moskene), 2,4,6-trinitro-1,3-dimetil-5-*tert*-butilbenzeno (MX, musk xileno) e 1,4-dioxacicloheptadecano-5,17-diona (BE, brassilato de etileno) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol antimicrobiano (TCS, triclosan) e o 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) anisolo (metil-TCS, metil-triclosan) foram adquiridos na Sigma-Aldrich. Os compostos tinham todos uma pureza igual ou superior a 98%.

Os padrões internos (PIs) de criseno D-₁₂ (98% átomo D, PI1) e metil-TCS D-₃ (99% de pureza, PI2) foram adquiridos na Sigma-Aldrich.

Os solventes dispersivos acetonitrilo (ACN, Honeywell Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha) ACS ≥ 99,9% de pureza), metanol (MeOH ≥ 99,9% de pureza), foram adquiridos na Sigma-Aldrich (grau HPLC). O agente de derivatização anidrido acético (Ac₂O) foi obtido a partir do reagente Sigma-Aldrich ISO (≥ 99% de pureza), e o solvente extrativo tetracloreto de carbono (CCl₄, 99,9% de pureza) da Panreac Química SA (Cascais, Portugal). A solução de carbonato de potássio a 23% foi preparada com água (K₂CO₃, 99,0% de pureza) da Panreac Química SA. Para preparar soluções e diluições, foi utilizada água ultrapura, purificada com um sistema 'Seral' (SeralPur Pro 90 CN). O gás hélio, com uma pureza de 99,999%, para análise por GC-MS, adquirido na Gasin (Maia, Portugal).

Foi preparada uma solução de cada composto (100 mg/L), dissolvendo o analito em MeOH. Uma solução padrão intermediária de mistura de todos os analitos, a 20 mg/L, foi preparada a partir das soluções stock obtidas por diluição em ACN. Soluções stock individuais (100 mg/L) de metil-TCS D-₃ e criseno D-₁₂ utilizadas como PIs foram preparadas em MeOH. Soluções padrões a 0,5 mg/L foram preparadas a partir das soluções de stock previamente obtidas por diluição em MeOH. Todas as soluções padrões foram armazenadas em frascos de âmbar a 4 °C entre as utilizações.

2.2 – Amostragem e pré-tratamento

A amostragem foi realizada através da recolha de 1 litro de amostra para um recipiente de plástico, que posteriormente ± 10 mL foi transferido para um frasco de vidro âmbar de forma a evitar a ocorrência de reações catalisadas pela luz solar, que podem alterar a amostra. As amostras foram recolhidas de cinco ETAR em Portugal, em três fases do processo de tratamento: afluente bruto (recolhido antes de qualquer processo de tratamento), licor misto (recolhidas a cerca de meia profundidade do tanque de arejamento e em zonas bastantes homogêneas) e efluente tratado (recolhidas após o tratamento secundário, pois era o último tratamento no processo). Todas as amostras foram recolhidas semanalmente entre o período de 24 de abril a 27 de junho do ano de 2019.

No total foram recolhidas 47 amostras da ETAR 1, 12 do afluente bruto e do efluente tratado (pois nas duas primeiras semanas recolhi duas amostras semanalmente destas etapas) e 23 amostras do licor misto, pois nas primeiras 3 semanas estavam em funcionamento 3 SBR, e nas restantes semanas ficaram 2 SBR em funcionamento, e recolhia de ambos.

Na ETAR 2 e ETAR 3 foram recolhidas na totalidade 28 amostras em cada uma: 7 amostras do afluente bruto e efluente tratado (pois em três semanas não foi possível a recolha de amostras) e 14 amostras de licor misto, pois existiam 2 linhas de tratamento biológico nestas ETAR.

Na ETAR 4 e ETAR 5 foram recolhidas na totalidade 27 amostras em cada uma: 9 amostras de cada etapa do tratamento (pois houve uma semana que não foi possível a recolha).

Desta forma, recolhi um total de 157 amostras das 5 ETAR.

As amostras foram refrigeradas a ± 4 °C até poderem ser transportadas para o laboratório para ser analisada a presença de musks. Uma vez em laboratório, foram congeladas a -20 °C até à análise. Após o descongelamento à temperatura ambiente, 4 mL das amostras foram filtradas com um filtro de microfibra de vidro (filtros de membrana de poliamida de 0,45 μ m de diâmetro e 0,2 μ m de tamanho do poro) e adicionado 0,5 mL de etanol para limpar o filtro, e armazenadas a 4 °C até análise.

2.3 – Identificação dos protozoários e metazoários

Nas amostras de licor misto, foram identificadas as microfaunas (protozoários e metazoários) das mesmas. As observações devem ser realizadas logo após a colheita no tanque de arejamento, de maneira a evitar a morte de algumas espécies.

Com uma pipeta de Pasteur, coloca-se cerca de 0,5 mL da amostra (caso não fosse possível visualizar os microrganismos, aconselha-se a diluir a amostra) e fez-se uma montagem com a lamela sem produzir bolhas. Procedeu-se à identificação das espécies existentes, utilizando um microscópio ótico (contraste de fases), da marca Leica BA 210, com a ampliação de 100X.

A contagem foi feita da forma que está exemplificada na Figura 4, em ziguezague, da esquerda para a direita, abrangendo toda a amostra. Apenas são contabilizadas como espécies presentes as que se observam, pelo menos dois indivíduos durante o rastreo.

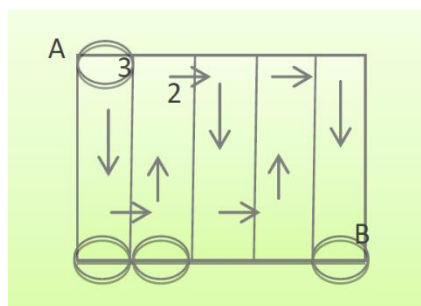


Figura 4 - Esquema representativo do processo de identificação da microfauna ao longo da lamela, seguindo a direção **A-B**. **2** – Lamela; **3** – Campo de visão ao microscópio ótico. Adaptado de “Avaliação do desempenho de uma ETAR de lamas ativadas através do estudo das comunidades microbiológicas do licor misto” (15).

2.4 – Determinação de musks

2.4.1 – DLLME com procedimento otimizado de derivatização *in situ*

Foi transferido 4,0 mL da amostra para um tubo de vidro cônico de 10 mL e adicionado 200 μ L de PI crisenio D-₁₂ (PI1) a 0,5 mg/L, com algumas gotas de K₂CO₃ a 23% (até pH $\geq$ 10). De seguida, uma mistura de 85 μ L de CCl₄, 800 μ L de ACN e 125 μ L de Ac₂O foi adicionada ao tubo. Depois de centrifugado a 2 300 rpm por 4 min, foram transferidos 65 μ L da fase sedimentada para um frasco de injeção onde foi adicionado 20 μ L de metil-TCS D-₃ (PI2) a 2 mg/L. Finalmente, 1 μ L da fase sedimentada contendo analitos foi injetada no sistema GC-MS. Todas amostras foram analisadas em duplicado.

2.4.2 – Condições do GC-MS

A análise cromatográfica foi realizada num sistema GC-MS 6890N Network GC (Agilent Technologies, Little Falls, DE, EUA) equipado com um amostrador automático Combi-PAL (CTC Analytics, Zwingen, Suíça) e uma injeção splitless controlada de forma eletrônica, diretamente acoplada a um único detetor quadruplo seletivo de massa inerte (5975, Agilent Technologies) com uma câmara de ionização. A separação do GC foi realizada com uma coluna capilar (DB-5-MS 30 m × 0,25 mm I.D. × 0,25 µm de espessura de filme; J&W Scientific, Folsom, CA, EUA). A injeção foi realizada a 250 °C no modo splitless e o tempo de purga foi 1 min. O hélio foi usado como gás de arrasto com um fluxo constante de 1 mL/min. O forno foi mantido a 90 °C durante 1 min, aumentando depois para 150 °C, num fluxo de 20 °C/min, para 225 °C a 5 °C/min e, finalmente, 300 °C a 20 °C/min, e mantido durante 2,25 min; o tempo de execução total foi de 25 min. A temperatura da linha de transferência foi 280°C. Os espectros de massa de impacto dos eletrões foram medidos com uma energia de aceleração de 70 eV. A temperatura da fonte de iões foi de 230°C e a temperatura do MS quadruplo foi de 150 °C. A recolha dos dados foi feita no modo de monitoramento seletivo de iões (SIM), detetando quatro iões por analito. Os parâmetros SIM e os tempos de retenção de cada um dos analitos são mostrados na Tabela 14. O Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Little Falls, DE, EUA) foi usado para colheita/processamento dos dados e controlo de GC-MS.

Tabela 14 - Tempos de retenção e quantificação de iões (m/z) por análise em GC-MS de musks, TCS e metil-TCS

Analito	tR	SIM iões (m/z)
DPMI	7.49	191 , 135, 163, 206
ADBI	10.57	229 , 128, 173, 244
HHCB	12.85	243 , 185, 213, 258
MX	12.91	282 , 283, 128, 297
AHTN	12.98	243 , 159, 187, 258
MM	13.37	263 , 128, 264, 278
MK	14.98	279 , 280, 247, 294
EB	15.82	227 , 211, 187, 98
Metil-TCS D- ₃ (PI2)	18.27	305 , 307, 252, 254
Metil - TCS	18.28	302 , 304, 252, 254
TCS	19.34	288 , 290, 252, 218
Criseno D- ₁₂ (PI1)	22.68	240 , 241, 120, 236

2.4.3 – Garantia e controlo de qualidade

O método foi validado em conformidade com a Comissão Europeia SANTE/11.813/2017 (82). A quantificação foi efetuada pelo método PI, usando o padrão criseno D-₁₂ (PI1, usado para quantificar os musks) e PI metil-TCS D-₃ (PI2, usado para quantificar TCS e metil-TCS).

A linearidade foi observada em amostras de água (água ultrapura) com seis níveis de concentração, de 0 a 50 µg/L, para os 8 musks, o TCS e o metil-TCS. Estas soluções foram tratadas de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.4.

Os parâmetros como a eficiência de extração (% de recuperação), precisão (repetibilidade), critério de aceitação, limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), foram baseados no artigo Sá, S. V. D., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C., 2019.

De modo a evitar problemas de contaminação, foram utilizadas luvas de plástico nitrílico durante todo o procedimento analítico, tendo sido contornado o uso de plástico. Todos os frascos e tubos de vidro cónico que foram utilizados na extração foram previamente colocados numa mufla a 500°C, durante 3 horas. Após este tempo, foram lavados com água destilada, acetona e, finalmente, com água para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Por fim, foram deixados secar numa estufa a 60°C.

2.5 Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos valores dos diversos parâmetros analíticos, de controlo operacional e resultantes da análise, foi utilizado a média e o desvio-padrão com base na população total (DESVPAD.P) no Excel 2017 e análise de normalidade.

Capítulo III

Resultados e Discussão

Capítulo III – Resultados e Discussão

3.1 – Caracterização da comunidade de protozoários e metazoários presentes nas ETAR

Como já referido, o tipo de afluente, as condições da ETAR, os métodos biológicos utilizados e as condições ambientais fazem variar a comunidade de protozoários e metazoários encontrados nos reatores biológicos das ETAR. Na Figura 5 comprova-se que existem diferenças na microfauna encontrada em cada ETAR.

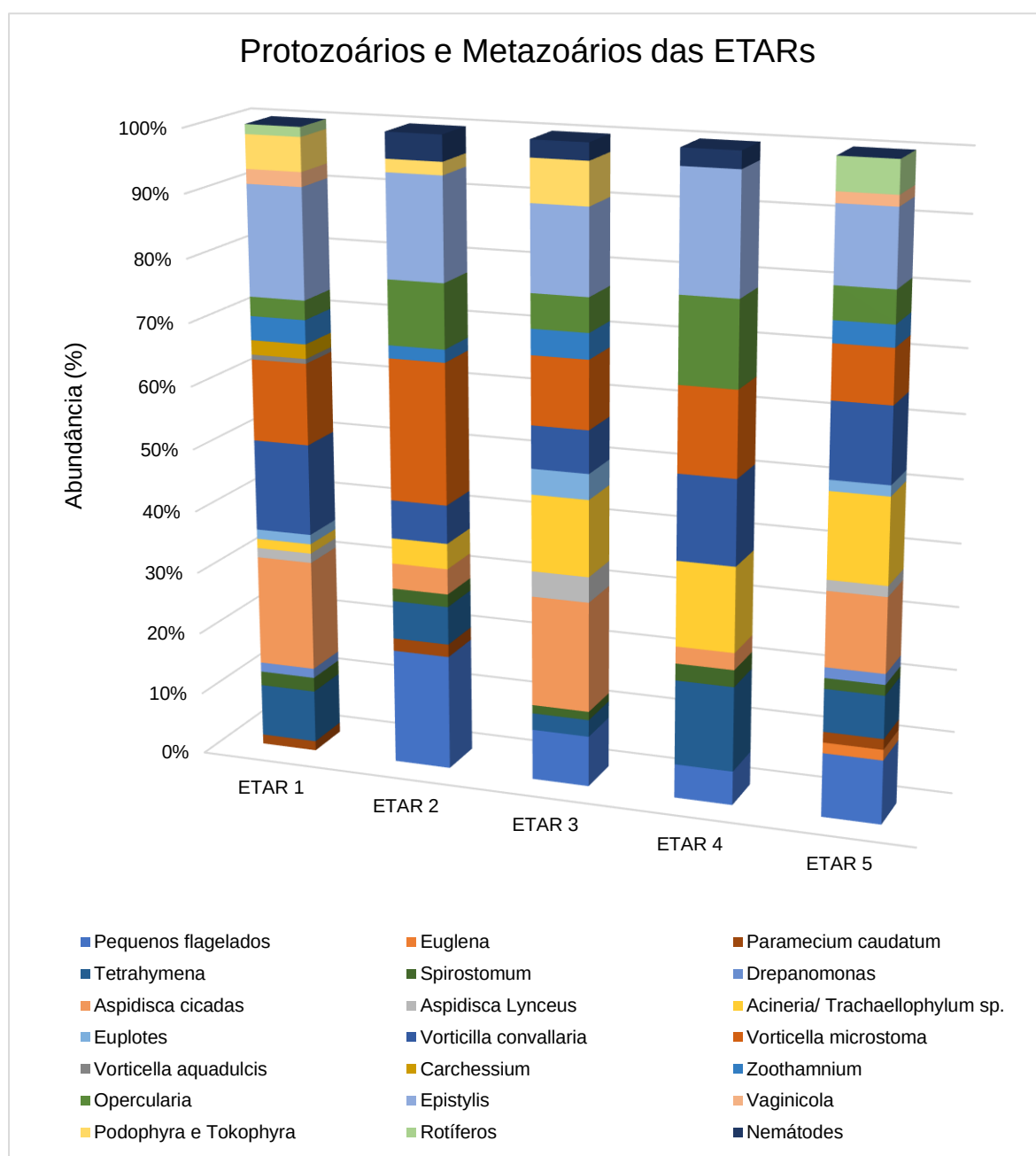


Figura 5 - Abundância das espécies de protozoários e metazoários encontrados no licor misto das ETAR.

A percentagem média da abundância dos grupos de microrganismos presentes nas ETAR está descrita na Tabela 15.

Tabela 15 - Abundância média dos grupos de protozoários e metazoários no licor misto das ETAR. n (nº de amostras)

	ETAR 1 n=23	ETAR 2 n=14	ETAR 3 n=14	ETAR 4 n=9	ETAR 5 n=9
Sarcodinas %	-	-	-	-	-
Flagelados %	-	18.4	8.1	5.4	11.9
Ciliados nadadores %	13.7	10.2	4.1	16.2	11.9
Ciliados sésseis %	57.3	57.1	40.5	59.5	42.4
Ciliados móveis de fundo %	22.1	8.2	37.8	16.2	28.8
Ciliados carnívoros %	5.3	2.0	6.8	-	-
Ciliados (Totais) %	98.5	77.6	89.2	91.9	83.1
Metazoários %	1.5	4.1	2.7	2.7	5.1

(-) não encontrado

De uma forma geral, tanto pela observação da Tabela 15, como da Figura 6, comprovou-se que o grupo predominante em todas as ETAR foram os ciliados, com uma abundância que vai desde 77.6% na ETAR 2 até representar 98.5% dos protozoários encontrados na ETAR 1. Dentro dos ciliados, os mais abundantes foram especificamente os ciliados sésseis e os móveis de fundo. Regra geral, a abundância destes dois grupos indica uma elevada eficiência do sistema de tratamento.

A ETAR 1 é a única onde não foram encontrados flagelados, mais concretamente pequenos flagelados. Estes protozoários apareceram predominantemente na fase de arranque dos sistemas de lamas ativadas ou em condições deficientes de arejamento (35,37). A ETAR 1 é a única em que o sistema de tratamento biológico é através de SBR com arejamento por difusores de bolha fina (17). Este tipo arejamento é mais eficaz que o arejamento prolongado das outras ETAR, por isso, a probabilidade do licor misto ter um arejamento deficiente é bastante baixa, fazendo com que não haja o aparecimento de pequenos flagelados. A ETAR 2 é onde existe maior percentagem de pequenos flagelados (18.4%).

Os ciliados nadadores também são predominantes na fase de arranque dos sistemas aeróbios e à medida que a floculação aumenta, estes ciliados vão sendo substituídos por outros (35,48,49,50). Por causa disso, a sua abundância foi baixa,

variando entre 4.1% na ETAR 3 até 16.2% na ETAR 4. No geral, dentro dos ciliados, apenas os carnívoros apresentam abundâncias mais baixas que os nadadores, exceto na ETAR 3. Apesar disso, os ciliados carnívoros não foram identificados na ETAR 4 e ETAR 5.

Os ciliados móveis de fundo são um grupo predominante nas lamas ativadas. A sua abundância ocorre após a fase de arranque e faz diminuir a carga orgânica, por isso têm um papel fundamental no tratamento biológico (35, 48,49,50). A sua abundância foi de 8.2% na ETAR 2 até 28.8% na ETAR 5, o que indica ser um dos grupos predominantes em todas as ETAR. Dentro deste grupo apenas as espécies *Aspidisca cicadas* e *Acineria* foram encontradas em todas as ETAR, por serem bastante abundantes em lamas ativadas. Dentro dos ciliados móveis a *Aspidisca cicada* foi a espécie predominante na ETAR 1, ETAR 2, e ETAR 3, e também apresentou uma abundância elevada na ETAR 5. No caso da ETAR 4, a espécie predominante foi a *Acineria*.

A ETAR 2 apresentou menor abundância de ciliados móveis e, acoplado ao facto de uma elevada densidade de pequenos flagelados, pode ser um indicativo de uma deficiência no tratamento biológico desta ETAR ou arranque processual.

Os ciliados foram o grupo mais abundante em todas as ETAR, com uma abundância que vai desde 40.5% na ETAR 3 até 59.5% na ETAR 2. Foi possível identificar que na ETAR 2, a espécie *Vorticella microstoma* foi mais abundante que nas outras ETAR (22.4%). Esta espécie é associada a condições de sub-arejamento e indica um tratamento deficiente, logo uma baixa qualidade do efluente final. Em todas as outras ETAR a espécie dominante foi a *Epistylis*, com uma abundância de 11.9% na ETAR 5 até 18.9% na ETAR 4, que indica um funcionamento correto da ETAR. Apenas na ETAR 1 foram encontradas espécies como *Carchesium* (2.3%) e *Vorticella aquadulcis* (0.8%) que são indicadores de bom arejamento.

Por fim, também se verificaram diferenças na abundância de metazoários presentes nas ETAR. A sua abundância foi de 1.5% na ETAR 1 até 5.1% na ETAR 5. Estes microrganismos são característicos de um arejamento prolongado, logo a probabilidade de aparecerem na ETAR 1 é mais baixa do que a probabilidade de aparecerem em qualquer uma das outras ETAR, como se verificou.

Assim, concluiu-se que, devido ao melhor sistema de arejamento da ETAR 1, existem diferenças entre esta ETAR e as restantes nos microrganismos sensíveis ao arejamento. Também foi possível identificar algum tipo de problema no funcionamento da ETAR 2 devido à abundância de microrganismos indicadores de falta de arejamento ou arranque processual. A ETAR 3 destacou-se pela sua baixa abundância de ciliados nadadores e maior abundância de ciliados móveis de fundo e de ciliados carnívoros, o que

propõe que seja uma ETAR com uma carga orgânica entre baixa e média. Pelo contrário, a ETAR 4 destacou-se pela sua maior abundância de ciliados nadadores, indicando cargas elevadas. A ETAR 5 apresentou a abundância de metazoários mais elevada, o que demonstra uma idade das lamas mais elevada.

Podemos ver nas Figura 6, 7, 8, 9 alguns exemplos dos protozoários encontrados nas lamas ativadas das ETAR em estudo.

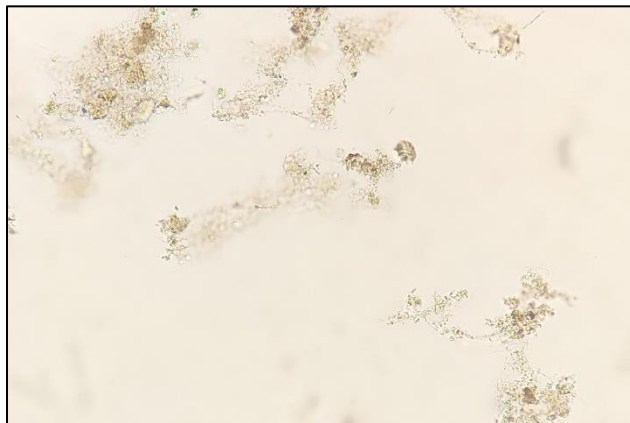


Figura 6 - Ciliado móvel de fundo (ampliação 100X).



Figura 7 - Ciliado sésil (ampliação 100X).

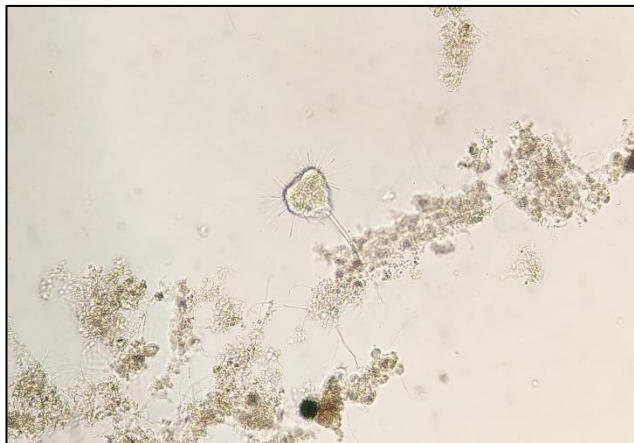


Figura 8 - Ciliado Carnívoro (ampliação 100X).



Figura 9 – Metazoário (ampliação 100X).

3.2 – Caracterização dos musks presentes nas ETAR

Dos 10 musks em estudo, incluindo TCS e metil-TCS, apenas o brassilato de etileno não foi registado em nenhuma ETAR, mas após a análise de normalidade só foram utilizados os valores de galaxolide, tonalide e musk xileno. Foram utilizados os dados relativos ao licor misto para a caracterização dos musks presentes nas ETAR, pois os dados do afluente bruto não eram conclusivos. No afluente bruto não era possível identificar um número significativo de musks, por isso foi utilizado o licor misto para facilitar a comparação com o efluente tratado e entre ETAR. Os dados são apresentados na Tabela 16.

Muitos estudos são focados em ETAR que recebem mistura de afluentes (afluente doméstico + afluente industrial), como o caso das ETAR em estudo, mas como na maioria dos casos as indústrias não operam com este tipo de compostos, as concentrações dos musks pode não variar pela presença do efluente industrial (104, 105). As duas classes

Tabela 16 - Concentração em ng/L dos musks presentes no licor misto das ETAR. **n** (nº total de amostras); **σ** (desvio padrão); Valor “()” indica o número de amostras onde foi possível detetar o composto

	ETAR 1 (n=23)		ETAR 2 (n=14)		ETAR 3 (n=14)		ETAR 4 (n=9)		ETAR 5 (n=9)	
	Média	σ	Média	σ	Média	σ	Média	σ	Média	σ
Celostolide	n.d	-	n.d	-	n.d	-	n.d	-	n.d	-
Galaxolide	8 450 (17)	4.54	4 102 (9)	2.45	5 046 (9)	2.90	6 900 (6)	4.12	4 482 (3)	1.81
M. Xilene	n.d	-	1 889 (1)	0	n.d	-	n.d	-	n.d	-
M. Moskene	n.d	-	n.d	-	n.d	-	n.d	-	n.d	-
M. Cetone	n.d	-	n.d	-	n.d	-	n.d	-	n.d	-
Metil-TCS	n.d	-	n.d	-	n.d	-	n.d	-	n.d	-
TCS	n.d	-	n.d	-	n.d	-	n.d	-	n.d	-
Tonalide	8 339 (15)	4.28	3 955 (9)	2.43	4 602 (9)	2.84	9 595 (5)	5.19	3 568 (3)	2.24

(n.d) não detetado

principais de musks encontradas nas ETAR foram os musks policíclicos e os nitro musks, sendo os musks policíclicos os maioritários (106), pois os nitro musks foram banidos do mercados e o seu uso é proibido ou restrito na Europa (107). Dentro dos musks policíclicos os mais predominantes foram o galaxolide, tonalidade e o cashmeran. (106)

Tal como era esperado, nas ETAR em estudo, os musks em maiores concentrações e encontrados com maior frequência foram o galaxolide e o tonalide. As concentrações destes musks não apresentavam grande variação entre as ETAR, sendo o valor mínimo e máximo para o galaxolide de 4 102 ng/L na ETAR 2 e 8 450 ng/L na ETAR 1, respetivamente, e o tonalide apresentou valores entre 3 568 ng/L na ETAR 5 e 9 595 ng/L na ETAR 4. Concentrações idênticas de galaxolide já tinham sido detetadas em Portugal (68, 72), em Espanha (70) e nos EUA (65). Apesar disso, foram encontradas concentrações mais baixas em estudos em Portugal (69, 71), em França (74), no Canada (73) e na China (75, 76, 77) e concentrações mais altas em Espanha (74) e nos EUA (65). Relativamente ao tonalide, apenas foram encontradas concentrações idênticas em Espanha (70). Apesar disso, foram encontradas concentrações mais baixas em estudos em Portugal (68, 69, 71, 72), em Espanha (70), em França (74), no Canada (73), nos EUA (65) e na China (75, 76, 77), e concentrações mais altas apenas em Espanha (70).

Na ETAR 2 foi verificada a presença de musk xileno numa concentração de 1 889 ng/L em 1 amostra no total de 14, numa concentração mais elevada do que os estudos referidos anteriormente.

Assim é possível concluir que neste estudo os valores obtidos para o galaxolide encontram-se dentro dos valores normais registados em estudos anteriores, enquanto que o tonalide e o musk xileno estão em concentrações mais elevadas.

3.3 – Eficácia das ETAR na remoção de musks

Os musks têm características físico-químicas idênticas e por isso os seus mecanismos de ação e os locais de remoção nas ETAR são semelhantes. De forma geral, os mecanismos de remoção biológica, como o processo de lamas ativadas, é um possível mecanismo para a remoção destes compostos nas ETAR. Como estes compostos apresentam coeficientes de partição relativamente altos ($\text{Log } K_{ow} > 5.0$) e baixa solubilidade em água, é esperado que se acumulam nas lamas, e sejam removidos através delas (106,108). As percentagens relativas da remoção dos diferentes musks está sumarizada na Tabela 17.

A ETAR 1, que utiliza o método *SBR* para o processo de tratamento biológico apresentou uma percentagem de remoção do galaxolide de 8.3% e do tonalide de 65.9%. Por norma, a percentagem mínima de remoção destes dois musks é de cerca de 30% (65,74,109,110), logo nesta ETAR a percentagem de remoção do galaxolide está muito abaixo do normal. Este valor não foi registado em nenhuma literatura referida anteriormente, e é muito baixo quando comparado com as restantes ETAR em estudo. Isto pode dever-se ao facto de o método de tratamento biológico ser diferente das restantes ETAR. Relativamente à percentagem de remoção do tonalide (68.9%), é idêntica à verificada na ETAR 4 (67.27%) e já tinha sido verificada num estudo em Espanha (70).

De seguida, a ETAR 2 e ETAR 5 são as que apresentam percentagens de remoção do galaxolide mais baixas, 34% e 24.9% respetivamente. Percentagens idênticas já tinham sido verificadas em estudos na Alemanha (110), na Bélgica (111), em Portugal (68), em França (74) e nos EUA (65). Por fim, as percentagens de remoção do galaxolide nas ETAR 3 e ETAR 4 são de 60.1% e 58.07% respetivamente, e foram verificadas percentagens idênticas em estudos na China (109). Por norma, as percentagens de remoção deste musks são superiores às verificadas nestes estudos, sendo de 60% até 80% em estudos em Portugal (69,72) e Espanha (70), e superiores a 80% até perto 100% em estudos em Portugal (69,71), Espanha (70) e na China (75).

Relativamente ao tonalide, as percentagens de remoção variam entre 0% na ETAR 5 até 67.27% na ETAR 4. A percentagem de remoção na ETAR 5 não foi verificada em

nenhum dos estudos referidos anteriormente. Percentagens entre 27% (ETAR 2) até 34% (ETAR 3) foram verificadas em estudos em Portugal (69) e França (74), mas mesmo a percentagem de remoção da ETAR 4 (67.27%) é baixa quando comparada com estudos anteriores em Portugal (69), em Espanha (70,71,72) e na China (75,76) com percentagens superiores a 70%.

O musk xileno foi registado na ETAR 2 e a sua percentagem de remoção foi de apenas 8.6%, o que contraria estudos anteriores, onde a percentagem de remoção observada foi próxima dos 100% (65,70,76,109).

Tabela 17 - Percentagem de remoção dos musks das ETAR

	ETAR 1	ETAR 2	ETAR 3	ETAR 4	ETAR 5
Celostolide	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Galaxolide	8.3 %	34.0 %	60.1 %	58.07 %	24.9 %
M. Xilene	n.d	8.6 %	n.d	n.d	n.d
M. Moskene	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
M. Cetone	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Metil-TCS	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
TCS	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Tonalide	65.9 %	27.0 %	34.0 %	67.27 %	0 %
Somatório	36.9 %	26.4 %	47.6 %	27.52 %	12.4 %

(n.d) não definido

De uma forma geral, é possível observar que as ETAR em estudo são eficazes na remoção dos musks presentes. As percentagens da remoção total dos musks estão indicadas na Tabela 17 e estão representadas as concentrações do somatório dos musks, incluindo o TCS e o metil-TCS, na Figura 10.

A ETAR 5 foi responsável pela eliminação de apenas 12.4% da totalidade dos musks presentes nas águas residuais, sendo esta percentagem é a mais baixa dentro das ETAR em estudo. Apesar disso, a ETAR 1 (36.9%), ETAR 2 (26.4%) e ETAR 4 (27.52%) também apresentam percentagens de remoção mais baixas que estudos anteriormente referidos. Apenas na ETAR 3, com uma percentagem de remoção de 47.6%, é possível encontrar um estudo no Canada (73) com percentagens idênticas. Normalmente, as percentagens de remoção dos musks varia entre 60% até perto de 100% em estudos na Alemanha (110), China (77), EUA (63), Bélgica (111) e Reino Unido (112).

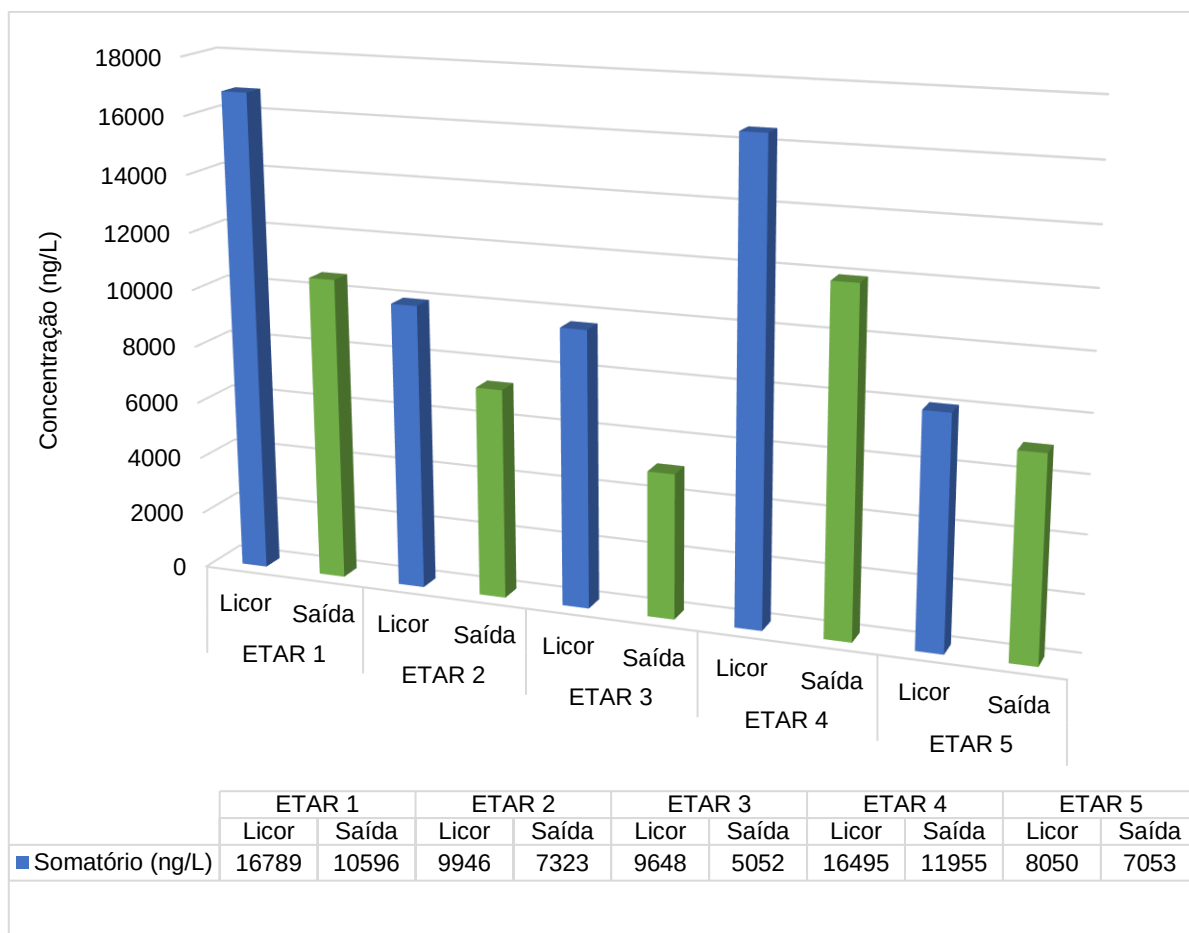


Figura 10 - Somatório das concentrações dos musks, incluindo TCS e metil-TCS, do licor misto e do efluente final (ng/L).

Capítulo IV
Conclusão e Perspetivas Futuras

Capítulo IV – Conclusão e Perspetivas futuras

Este trabalho baseou-se na recolha de amostras para a identificação dos protozoários no licor misto de cinco ETAR diferentes através de microscopia ótica, e posterior análise dos musks através do processo extrativo DLLME seguido do método cromatográfico GC-MS.

Foi possível concluir que diferenças no método biológico utilizado (arejamento com difusores de bolha fina na ETAR 1 ou arejamento prolongado nas restantes ETAR) têm influência sobre a comunidade de protozoários encontrado no reator biológico. Em todas as ETAR o grupo predominante foi o dos ciliados, que apresentaram abundâncias de 77.6% até 98.5%, mais concretamente os ciliados sésseis. A abundância destes protozoários permite concluir que existe uma boa eficácia na eliminação da carga orgânica das águas residuais em todas as ETAR.

A ETAR 1, devido à diferença no método biológico, responsável por um melhor arejamento do licor misto, apresentou diferenças na microfauna, nomeadamente nos microrganismos sensíveis ao arejamento. A ETAR 2 é caracterizada pela presença de pequenos flagelados e a menor abundância de ciliados móveis, sendo possível concluir que está na fase do arranque processual. A ETAR 3 apresenta uma microfauna indicadora de carga orgânica baixa a média, devido a elevada abundância de ciliados móveis de fundo e ciliados carnívoros e pelo contrário, a ETAR 4 apresentou microfauna indicadora de elevadas cargas orgânicas (elevada abundância de ciliados nadadores). Na ETAR 5, foi possível concluir que tem uma idade das lamas mais elevada que as restantes ETAR pela maior abundância de metazoários.

Em relação à caracterização dos musks presentes nas ETAR, foi possível concluir que o galaxolide e o tonalide são os mais frequentes e que aparecem em maiores concentrações. Apesar dos nitro musks terem sido banidos e do seu uso ser restrito na Europa, ainda foi possível verificar a sua presença na ETAR 2, confirmando o seu uso atualmente.

No que respeita à avaliação da eficácia das ETAR na remoção de contaminantes emergentes, foi possível concluir que o tratamento biológico por lamas ativadas é capaz de diminuir significativamente as concentrações dos musks. De uma forma geral, a eficácia de remoção dos musks foi de 36.9% na ETAR 1, de 26.4% na ETAR 2, de 47.6% na ETAR 3, de 27.52% na ETAR 4 e de 12.4% na ETAR 5. Assim, verificou-se que é possível diminuir a concentração dos musks das águas residuais, mas não é possível eliminá-los totalmente. Os musks mais persistentes, tais como o galaxolide e o tonalide, não são passíveis de ser eliminados totalmente das águas residuais.

De forma a melhorar a eficácia das ETAR na remoção de contaminantes emergentes, é necessário maior investimento na identificação destes nas águas residuais, de forma a desenvolver mecanismos mais eficazes na sua remoção. O acoplamento de métodos nas ETAR é uma solução para o aumento da eficácia na remoção de contaminantes emergentes, como por exemplo acoplar o tratamento biológico a processos de filtração por membrana ou processos de oxidação. Grande parte da eficiência de remoção obtida nas ETAR é devido à adsorção dos musks nas lamas ativadas ou por outros processos de oxidação/redução. Um maior conhecimento da microfauna dos processos biológicos também pode ser uma alternativa para o aumento da eficácia na remoção de contaminantes emergentes, pois os microrganismos podem ter influência na sua remoção e podem utilizar determinados compostos tóxicos no seu metabolismo, eliminando-os das águas residuais.

Capítulo V
Bibliografía

Bibliografia

1. Metcalf and Eddy, Inc, Asano T, Burton FL, Leverenz H, Tsuchihashi R, Tchobanoglous G. Water reuse. McGraw-Hill Professional Publishing; 2007.
2. Jorge JP. Contribuição para o Estudo da Remoção de 17β -Estradiol em água residual tratada através da adição de Ácido Peracético [dissertação]. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; 2018.
3. Simões PMDSV. Contribuição para o estudo da presença e remoção de compostos emergentes de filtros de UV em ETAR [dissertação]. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; 2010.
4. Berger K, Petersen B, Buening-Pfaue H. Persistence of drugs occurring in liquid manure in the food chain. Arch fuer Leb (Germany, FR); 1986.
5. Giokas DL, Salvador A, Chisvert A. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. Trends in Analytical Chemistry 26(5); 2007.
6. Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, Kidd K, Zoeller TR, World Health Organization. State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012. World Health Organization. 2013
7. Mara D. Domestic wastewater treatment in developing countries. Routledge; 2013.
8. Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama GA, Brdjanovic D. Biological wastewater treatment. IWA publishing; 2008.
9. Saeed T, Sun G. Bioresource Technology The removal of nitrogen and organics in vertical flow wetland reactors: Predictive models. Bioresour Technology, 102(2):1205–1213; 2011.
10. Sincero AP, Sincero GA. Physical-chemical treatment of water and wastewater. CRC press. 2002.
11. Alexandra S. Avaliação da eficiência da desinfecção de efluentes urbanos com recurso a cloro [dissertação]. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; 2015.
12. Efacec Ambiente, S.A. “Gestão e operação de sistemas de tratamento de águas residuais”, Manual de formação, 2010.
13. Metcalf INC. Wastewater engineering: treatment and reuse. McGraw-Hill; 2003.
14. Andersson S. Characterization of Bacterial Biofilms for Wastewater Treatment [dissertação]. Stockholm: Royal Institute of Technology, School of Biotechnology; 2009.
15. Filipa A, Barroso S. Avaliação do desempenho de uma ETAR de lamas ativadas através do estudo das comunidades microbológicas do licor misto [dissertação]. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2012.
16. Gomes RL, Lester JN. Endocrine disrupters in receiving waters. Endocrine Disrupters Wastewater Sludge Treat, 177–218. 2003.
17. Documento Interno de Águas do Norte, SA (2013), Elaboração dos Estudos e Projectos das ETAR e ETL de Esposende.

18. Antunes MG. Contributo para a Avaliação do Balanço Associado à Degradação de Compostos Disruptores Endócrinos em Águas Residuais Domésticas [dissertação]. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa; 2008.
19. Ministério do Ambiente, Decreto-Lei nº 152/97 de 19 de junho, 1997. Diário da República n.º 139/1997, Série I-A de 1997-06-19.
20. Lin SD, Lee CC. Water and wastewater calculations manual. 6 vol. Mcgraw-hill New York; 2007.
21. Metcalf and Eddy. Wastewater Engineering, Treatment and Reuse. 4th ed. New York: McGraw-Hill. 2003.
- 22 Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. Metcalf & Eddy Inc. McGraw-Hill, New York; 2003
23. Documento Interno de Águas do Minho e Lima, SA (2008), Caracterização da ETAR de Viana do Castelo - ZI;
24. Documento Interno de Águas do AVE, SA (2007).Empreitada de Execução das ETAR de Mosteiro- FD1 Santo Emilião- FD2 Água Longa, FD7 e Penices.
25. Assunção, PCC. Controlo Analítico da ETAR de Serzedo e Avaliação do Desempenho da Instalação [dissertação]. Braga: Escola de Engenharia da Universidade do Minho; 2013.
26. Cerdeira LABM. Acompanhamento do Arranque/Exploração de uma ETAR. 2008.
27. Silva SC. Tratamento químico e biológico de efluentes da indústria têxtil como forma de redução do impacto ambiental aos recursos hídricos. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2011.
28. Sousa JFPDO. Caracterização da decantabilidade das lamas activadas da etar de sobreiras, Porto, via determinação fisiológica global através da monitorização de sour. 2011.
29. Bitton G. Wastewater Microbiology. 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons. 2011
30. Jenkins D, Richard MG, Daigger GT. Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems. Crc Press. 2003.
31. Vesilind P. Wastewater treatment plant design. 2 vol. IWA publishing; 2003.
32. Marinho MM. Avaliação da comunidade microbiológica das ETAR exploradas pela AGERE-EM [dissertação]. Braga: Escola de Engenharia da Universidade do Minho; 2013.
33. Cervantes FJ, Pavlostathis SG, van Haandel A, editors. Advanced biological treatment processes for industrial wastewaters. IWA publishing. 2006.
34. Nicolau A. Avaliação do desempenho das ETAR's através da observação das comunidades de protozoários, metazoários e filamentosas. Manual de curso, Biotempo– Consultoria em Biotecnologia, Lda. 2009.
35. Vaz AIP. Caracterização microbiológica e físico-química da ETAR da Ribeira de Frades e de uma instalação piloto como forma de avaliar o seu funcionamento [dissertação]. Coimbra: Instituto Superior de Engenharia de Coimbra; 2016.

36. Stoddard A, Harcum JB, Simpson JT, Pagenkopf JR, Bastian RK. Municipal wastewater treatment: evaluating improvements in national water quality. John Wiley & Sons. 2003.
37. Seviour R, Nielsen PH, editors. Microbial ecology of activated sludge. IWA publishing. 2010.
38. Canler J-P, Perret J-M, Duchène P. Aide au diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des: boues activées. Editions Quae; 2011.
39. Brault JM, Whalen P, Stuart P. Early warning signs of bulking in an activated sludge system through interpretation of ATP data in a systems analysis context. Environmental technology, 2011; 32(14), 1649-1660.
40. Ginoris YP, Amaral AL, Ferreira EC, Coelho MAZ, Nicolau A. Aplicação de técnicas de análise de imagem e de estatística multivariável no reconhecimento de protozoários e metazoários típicos de sistemas por lodos ativados. 2007
41. Von Sperling M, de Lemos Chernicharo CA. Biological wastewater treatment in warm climate regions, 1 vol. IWA publishing. 2005.
42. Madoni P. Protozoa in wastewater treatment processes: A minireview. Italian Journal of Zoology. 2011; 78(1), 3-11.
43. Gomes MJDMP. Avaliação do efeito da microfauna do tanque de arejamento no efluente final [dissertação]. Porto: Instituto Superior de Engenharia do Porto; 2013.
44. Vieira JC. Análise microbiológica de lamas ativadas como forma de avaliar o funcionamento de uma ETAR. Coimbra: Instituto Superior de Engenharia de Coimbra; 2017.
45. Bitton G. Wastewater Microbiology. 4th ed. New Jersey, John Wiley & Sons; 2011.
46. Signorile G, Molinari A, Lugoli F, Sciancalepore L, Montemurro P, De Donno A. Study of the correlation between microfauna and the macrostructure of activated sludge and the efficiency of biological wastewater treatment plants. Journal of preventive medicine and hygiene 2010; 51: 15-19
47. Mara, DD. Domestic wastewater treatment in developing countries. London: Earthscan; 2004
48. Madoni P. A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. Water Research, 1994; 28(1), 67-75.
49. Mara D, Horan NJ, editors. Handbook of water and wastewater microbiology. Elsevier. 2003.
50. Martins MJ, Nicolau A, Mota M, Lima N. A importância da microfauna como ferramenta de trabalho em estações de tratamento de águas residuais. 2002.
51. Madoni, P. La microfauna nell'analisi di qualità biologica dei fanghi attivi. Itália: Università degli Studi di Parma, Parma; 1994.
52. Gómez, MJ, Gómez-Ramos MM, Agüera A, Mezcua M, Herrera S, Fernández-Alb AR. A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis

of target and non-target organic contaminants in waters. *Journal of Chromatography A* 2009; 1216(18), 4071-4082.

53. Mauricio R, Diniz M, Petrovic M, Amaral L, Peres I, Barcelo D, Santana F. A characterization of selected endocrine disruptor compounds in a Portuguese wastewater treatment plant. *Environmental monitoring and assessment* 2006; 118(1-3), 75-87.

54. Bu Q, Wang B, Huang J, Deng S, Yu G. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: a review. *Journal of hazardous materials* 2013; 262, 189-211.

55. Ayscough NJ, Fawell J, Franklin G. Review of human pharmaceuticals in the environment. Environment Agency. 2000

56. Kanda R, Griffin P, James HA, & Fothergill, J. Pharmaceutical and personal care products in sewage treatment works. *Journal of Environmental Monitoring* 2003; 5(5), 823-830.

57. Moreira MM. Assessment of musk and UV filter compounds in wild mussels collected in Portugal coast. 2016

58. Daughton CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. *Environmental health perspectives* 1999; 107, 907-938.

59. Brausch JM, Rand GM. Chemosphere A review of personal care products in the aquatic environment Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*. 2011; 82(11): 1518–32.

60. Silva ESM. Detecção de fragâncias sintéticas (musk) em produtos de higiene e de cuidado pessoal por GC-MS. 2013.

61. Musks. Disponíveis em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [acedido em 05/09/2019]

62. Dell A, Biotico I, Nel FSBI, Di P, Madoni P. Applicazione dell' indice biotico del fango (SBI) nel processo di depurazione a fanghi attivi. 2004; 1–68.

63. Horii Y, Reiner JL, Loganathan BG, Senthil K, Sajwan K, Kannan K. Occurrence and fate of polycyclic musks in wastewater treatment plants in Kentucky and Georgia, USA. 2007; 68(11).

64. Lee IS, Lee SH, Oh JE. Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment. *Water research* 2010; 44(1), 214-222.

65. Chase DA, Karnjanapiboonwong A, Fang Y, Cobb GP, Morse AN, Anderson TA. Science of the Total Environment Occurrence of synthetic musk fragrances in effluent and non-effluent impacted environments. 2012; 416: 253–60.

66. Gatermann R, Hühnerfuss H, Rimkus G, Attar A, Kettrup A. Occurrence of musk xylene and musk ketone metabolites in the aquatic environment. *Chemosphere*. 1998; 36(11): 2535-2547.

67. Osemwengie LI, Steinberg S. On-site solid-phase extraction and laboratory analysis of ultra-trace synthetic musks in municipal sewage effluent using gas chromatography – mass spectrometry in the full-scan mode. 2001; 932 (1-2): 107–118.

68. Ramos S, Homem V, Santos L. Simultaneous determination of synthetic musks and UV-filters in water matrices by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography tandem mass-spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2019; 1590: 47-57.
69. Sá SVM, Fernandes JO, Cunha SC. In situ acetylation dispersive liquid – liquid microextraction followed by gas chromatography – mass spectrometry for the simultaneous determination of musks , triclosan and methyl-triclosan in wastewaters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2019; 99 (1): 1–15.
70. Vallecillos L, Borrull F, Pocurull E. On-line coupling of solid-phase extraction to gas chromatography – mass spectrometry to determine musk fragrances in wastewater. *Journal Chromatography*. 2014; 1364: 1–11.
71. Salgado R, Marques R, Noronha JP, Mexia JT, Carvalho G, Oehmen A, et al. Assessing the diurnal variability of pharmaceutical and personal care products in a full-scale activated sludge plant. *Environmental Pollution*. 2011; 159(10): 2359–2367.
72. Silva ARM, Nogueira JMF. Stir-bar-sorptive extraction and liquid desorption combined with large-volume injection gas chromatography – mass spectrometry for ultra-trace analysis of musk compounds in environmental water matrices. 2010; 396 (5): 1853–1862.
73. Yang J, Metcalfe CD. Fate of synthetic musks in a domestic wastewater treatment plant and in an agricultural field amended with biosolids. 2006; 363 (1-3): 149–65.
74. Cavaleiro J, Prieto A, Monperrus M, Etxebarria N, Zuloaga O. *Analytica Chimica Acta* Determination of polycyclic and nitro musks in environmental water samples by means of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection-gas chromatography – mass spectrometry analysis. *Analytica Chimica Acta*. 2013; 773: 68–75.
75. Zhang X, Yao Y, Zeng X, Qian G, Guo Y, Wu M, et al. Synthetic musks in the aquatic environment and personal care products in Shanghai, China. *Chemosphere*. 2008; 72 (10): 1553–1558.
76. Yan L, Tao Y, Jiangyong H, Wenhua W. Simultaneous Determination of Trace Polycyclic and nitro Musks in Water Samples using Optimized Solid-Phase Extraction by gas Chromatography and Mass Spectrometry. 2009; 25(9): 1125-1130.
77. Zeng X, Sheng G, Gui H, Chen D, Shao W, Fu J. Preliminary study on the occurrence and distribution of polycyclic musks in a wastewater treatment plant in Guandong, China. 2007; 69 (8): 1305–11.
78. Sommer C. The role of musk and musk compounds in the fragrance industry. In: *Series Anthropogenic Compounds*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2004. p. 1–16.
79. Salvito D. Synthetic musk compounds and effects on human health. *Environmental health perspectives* 2005, 113(12), A802-A803.
80. Schmeiser HH, Gminski R, Mersch-sundermann V. Evaluation of health risks caused by musk ketone. 2001; 203 (4): 293–299.
81. Canler J, Perret J, Duchéne P, Cotteux E. Aide au diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des boues activées. Editions Quae; 1999.

82. European Commission, SANTE/11813/ Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Disponível em https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf [acedido em 08/09/2019]
83. Nicolau A. Índice Biótico de Lamas: Identificação de Protozoários e Metazoários. Biotempo; 2007.
84. Snyder SA, Adham S, Redding AM, Cannon FS, Decarolis J, Oppenheimer J, et al. Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. 2007; 202 (1-3): 156–81
85. Chisvert A, Salvador A. Analytical Methodologies for the Determination of Personal Care Products in Water Samples. 2014. p. 191-229.
86. Pereira AIG. Monitorização de desreguladores endócrinos em águas [dissertação]. Porto: Instituto Superior de Engenharia do Porto; 2010
87. Peck AM, Hornbuckle KC. Synthetic Musk Fragrances in Lake Michigan. 2004; 38 (2): 367–72.
88. Kolpin DW, Skopec M, Meyer MT, Furlong ET, Zaugg SD. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. Science of the Total Environment. 2004; 328 (1-3): 119–30.
89. Stackelberg PE, Furlong ET, Meyer MT, Zaugg SD, Henderson AK, Reissman DB. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water- treatment plant. 2004; 329 (1-3): 99–113.
90. Zygmunt B, Namies J, Tobiszewski M, Mechlin A. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. 2009; 28(8): 943–51.
91. Pena-Pereira F, Lavilla I, Bendicho C. Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry. Trends Anal Chem. 2010; 29(7): 617–28.
92. David F, Sandra P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. 2007; 1152 (1-2): 54–69.
93. Serôdio P, Nogueira JMF. Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography – mass spectrometry detection. 2004; 517 (1-2): 21–32.
94. Rezaee M, Assadi Y, Hosseini MRM, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid – liquid microextraction. 2006; 1116 (1-2): 1–9.
95. García-Córcoles MT, Rodríguez-Gómez R, de Alarcón-Gómez B, Çipa M, Martín-Pozo L, Kauffmann JM, Zafra-Gómez A. Chromatographic Methods for the Determination of Emerging Contaminants in Natural Water and Wastewater Samples: A Review. Critical reviews in analytical chemistry. 2019; 49 (2): 160-186
96. Herrera-Herrera AV, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MÁ. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. 2010; 29(7): 728-751.

97. Chisvert A, Salvador A, Carretero A. Dispersive liquid – liquid microextraction followed by gas chromatography – mass spectrometry for the determination of nitro musks in surface water and wastewater samples Musk ambrette Musk ketone. *Talanta* 2011; 85 (4): 1990–5.
98. Panagiotou AN, Sakkas VA, Albanis TA. *Analytica Chimica Acta* Application of chemometric assisted dispersive liquid – liquid microextraction to the determination of personal care products in natural waters. 2009; 649 (2): 135–40.
99. Yang C, Ding W. Determination of synthetic polycyclic musks in aqueous samples by ultrasound-assisted dispersive liquid – liquid microextraction and gas chromatography – mass spectrometry. 2012; 402 (4): 1723–30.
100. Regueiro J, Llompарт M, Garcia-jares C, Garcia-monteagudo JC, Cella R. Ultrasound-assisted emulsification – microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. 2008; 1190 (1-2): 27–38.
101. Ramos S, Homem V, Alves A, Santos L. *Science of the Total Environment Advances* in analytical methods and occurrence of organic UV- filters in the environment — A review. *Sci Total Environ*. 2015; 526: 278–311.
102. Jiménez-díaz I, Zafra-gómez A, Ballesteros O, Navalón A. Analytical methods for the determination of personal care products in human samples. An overview. *Talanta*. 2014; 129: 448–58.
103. Scognamiglio V, Antonacci A, Patrolecco L, Lambrevia MD, Litescu SC, Ghuge SA, et al. Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. *Trends Anal Chem*. 2016; 80: 555-567
104. Herren D, Berset JD. Nitro musks , nitro musk amino metabolites and polycyclic musks in sewage sludges Quantitative determination by HRGC-ion-trap-MS / MS and mass spectral characterization of the amino metabolites. 2000; 40 (5): 565–74.
105. Zeng X, Sheng G, Xiong Y, Fu J. Determination of polycyclic musks in sewage sludge from Guangdong, China using GC – EI-MS. 2005; 60 (6): 817–23.
106. Silva A, Ratola N, Santos L, Alves A, Homem V. Long lasting perfume e A review of synthetic musks in WWTPs. 2015; 149: 168-192.
107. European Parliament, 2009. Regulation (EC) N° 1223/2009 of the European parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. *Off. J. Eur. Union* 59e209. L 342.
108. Jones-Lepp TL, Stevens R. Pharmaceuticals and personal care products in biosolids / sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation. 2007; 1173–83.
109. Lv Y, Yuan T, Hu J, Wang W. *Science of the Total Environment* Seasonal occurrence and behavior of synthetic musks (SMs) during wastewater treatment process in Shanghai, China. *Sci Total Environ*. 2010; 408(19): 4170–6.
110. Bester K. Retention characteristics and balance assessment for two polycyclic musk fragrances (HHCB and AHTN) in a typical German sewage treatment plant. 2004; 57: 863–70.

111. Simonich SL, Begley WM, Debaere G, Eckhoff WS. Trace Analysis of Fragrance Materials in Wastewater and Treated Wastewater. 2000; 34(6): 959–65.
112. Federle TOMW, Eckhoff WS, Rottiers A, Webb S, Sabaliunas D, Wolf WDE et al. Removal of Fragrance Materials during US and European Wastewater Treatment. 2002. p. 2839–47.
113. Documento Interno de Águas do Minho e Lima, SA (2004). Processo de tratamento e equipamentos electromecânicos e hidromecânicos.
114. Efacec Ambiente, S.A. “Memória descritiva e justificativa do processo de tratamento e equipamento”, Projeto de execução 2010.