

Dedico este trabalho à minha família, principalmente às minhas filhas de 6 e 4 anos, que no decorrer deste trabalho por vezes se viram privadas de brincar com as suas bonecas preferidas, tendo mesmo visto o seu quarto desprovido de brinquedos!

Agradecimentos

Antes de mais, agradeço á minha família, principalmente ao meu esposo por todo o seu apoio e paciência para aturar os meus devaneios, entre os quais evitar o uso de tudo o que era de plástico.

Às minhas filhas por não entenderem porque é que a mamã chegava tarde e não podia brincar com elas.

Um especial agradecimento aos meus sogros, principalmente à minha sogra que, entre outras coisas, sempre se disponibilizou em cuidar das minhas filhas durante o tempo necessário aos ensaios.

Aos meus pais, que sem eles eu não estaria aqui e que sempre me apoiaram nos meus estudos durante todos estes anos, para eles eu entrei na escola com 6 anos e nunca mais de lá saí! Um especial agradecimento ao meu pai que, apesar do problema grave de saúde pelo qual passou durante o desenvolvimento deste trabalho, me transmitiu que devemos ter sempre muita força de vontade e coragem. Fez-me ver a realidade da vida e que não devemos dar grande valor a factores externos, que a vida é apenas uma ponte muito curta, pelo que devemos desfrutar ao máximo e sem pressas enquanto a atravessamos.

Aos meus orientadores, Prof. Ana Barreiros e Prof. Ricardo Salgado, que sempre me incentivaram e motivaram, mesmo nas vezes em que pensei desistir.

Ao Prof. Ricardo Salgado, pela sua disponibilidade, incrível paciência e boa disposição para me aturar e por tudo mais...sem palavras!

Á Prof. Ana Mata por todo o apoio, disponibilidade e carinho com que acompanhou o desenvolvimento deste trabalho.

Às colegas Fernanda Rosa que se disponibilizou em me ouvir e aconselhar nos momentos críticos e Lurdes Brito que se disponibilizou em me ajudar, mesmo fora de horas.

Às Eng. Ana Quintão e Eng. Alexandra Viana (Águas do Sado), pelo seu apoio e disponibilidade para fornecer as amostras de lama da ETAR de Setúbal.

Á Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL), em particular ao Doutor João Paulo Noronha, pela disponibilidade do equipamento de HPLC-DAD do laboratório de Química Orgânica e Física Radicalar.

Quero ainda agradecer ao Instituto Politécnico de Setúbal (IPS) e Escola Superior de Tecnologia de Setúbal (ESTSetúbal) pelo apoio financeiro do projecto, 3-CP-IPS-07-2009, do qual este trabalho fez parte, tendo sido inclusive, o seu resumo enviado ao encontro 14.º ENaSB/14.º SILUBESA aceite para apresentação sob a forma de poster, tendo sido referenciado com o número 056. Junta-se em anexo uma cópia do poster, Anexo A.1.

Obrigada

Resumo

Existem compostos retardadores de chama (RC) que se adicionam aos produtos de uso comum para lhes conferir resistência ao fogo. Estes compostos são de difícil degradação, pelo que podem ser facilmente absorvidos pela pele, inalados ou ingeridos, pelas diversas formas de vida. Alguns estudos indicam que estes compostos contribuem para o aparecimento de várias doenças tais como problemas hormonais, defice neurológico, alergias e algumas formas de cancro. A Organização Mundial de Saúde (OMS), alertada por esses estudos, tem desenvolvido acções no sentido de reduzir ou mesmo proibir a sua aplicação. O presente estudo teve como objectivo estudar a biodegradabilidade de compostos RC, por uma cultura mista de microrganismos existentes numa estação de tratamento de águas residuais (ETAR). Os compostos RC estudados foram Éteres Difenílicos Polibromados (PBDEs), pertencentes ao grupo dos halogenados bromados e Ésteres Organofosforados (OPEs), por serem considerados os mais tóxicos. A utilização da cromatografia líquida de alta precisão com detector ultra violeta (HPLC-UV) foi optimizada como metodologia analítica para detecção de todos os compostos em estudo. Dois dos compostos em estudo (HBCD e TPhP) não foram detectados com esta metodologia pelo que houve a necessidade de se utilizar a metodologia HPLC-DAD. Verificou-se biodegradação dos compostos DBNPG, TBBPA e BPA através da diminuição da sua concentração ao longo do tempo, no entanto não se verificou o mesmo para os compostos HBCD e TPhP.

Palavras chave: Retardadores de chama, Biodegradabilidade, Dibromoneopentilglicol, Tetrabromobisfenol A, Hexabromociclododecano, Trifenilfosfato, HPLC

Summary

There are flame retardant (FR) compounds added to product commonly used to give them fire resistance. These compounds are difficult to biodegrade, so it can be easily absorbed through skin, inhaled or ingested by various life forms. Several studies have determined that the characteristics and composition of these compounds can lead to the emergence of several diseases as hormonal problems, neurological deficit, allergies and even cancer. World Health Organization (WHO), prompted by those studies, has developed policies to reduce or even prohibit its application. The objective of this study was to determine the biodegradability of flame retardant compounds (FR) by a mixed culture of microorganisms from a waste water treatment plant (WWTP). The flame retardant compounds choosed were polibrominated diphenyl ethers (PBDEs), belonging to the group of brominated halogenated and organophosphorus esters (OPEs) for being considered the most toxic. The use of high performance liquid chromatography with a ultraviolet detector (HPLC-UV) has been optimized as an analytical method for detection of all compounds under study. This method not show sensitivity to detect two of the compounds (TPhP, HBCD) and was necessary to use HPLC method but with a photodiode array detector (DAD). Biodegradation of DBNPG, TBBPA and BPA compounds was demonstrated through the decline of its concentration versus time, however the same was not observed for HBCD and TPhP compounds.

Keywords: Flame retardants, Biodegradability, Dibromoneopentilglycol, Tetrabromobisphenol A, Hexabromocyclododecane, Triphenilphosphate, HPLC

Índice

Capítulo 1 - Introdução	11
1.1 Retardadores de chama	11
1.1.1 Classes de compostos RC	13
1.1.2 Consumo de compostos RC.....	15
1.2 Metodologia de acção dos RC	16
1.3 Toxicidade dos compostos RC	18
1.4 Limitações à utilização de compostos RC	21
1.5 RC nas ETAR e tecnologias de tratamento actuais	23
1.6 Estudos e Técnicas para remoção de RC	24
1.7 Caracterização dos RC alvos do estudo	26
1.8 Métodos de análise dos RC	27
1.9 Motivação	28
Capítulo 2 - Materiais e métodos	30
2.1 Reagentes, compostos RC e consumíveis	30
2.1.1 Reagente RC padrão	30
2.1.2 Fase móvel e preparação de soluções.....	30
2.1.3 Preparação de soluções padrão	30
2.2 Metodologia de quantificação analítica	31
2.2.1 Determinação do comprimento de onda por espectrofotometria.....	31
2.2.2 Análise e quantificação dos RC por HPLC-UV.....	32
2.2.3 Análise e quantificação da amónia por fotometria. Método Palintest.....	32
2.2.4 Análise e monitorização do crescimento da biomassa	33
2.2.5 Linearidade e validação do método: limites mínimos de quantificação e detecção.....	33
2.3 Ensaio de biodegradação em descontínuo com lamas activadas	34
2.3.1 Preparação do inóculo e da água residual sintética	34
2.3.2 Preparação da biomassa.....	35
2.3.3 Preparação dos reactores.....	35
2.3.4 Manutenção dos reactores.....	35
2.3.5 Monitorização dos reactores.....	35
2.4 Parâmetros cinéticos dos reactores.....	37
2.5 Mecanismos previsíveis de biodegradação dos RC	39
Capítulo 3 - Resultados e discussão	41
3.1 Validação da metodologia de análise aos RC	41
3.2 Aclimatização da biomassa	42
3.3 Biodegradabilidade	43
3.4 Cinética de biodegradação	50
3.5 Previsíveis caminhos de biodegradação dos RC.....	51
Capítulo 4 - Conclusão	56
Capítulo 5 - Trabalho futuro	57
Bibliografia	58
Anexo	64

Lista de figuras

Figura 1.1 - Estrutura química de diferentes RC	12
Figura 1.2 - Consumo de RC em 2007	15
Figura 1.3 - Maiores consumidores de RC em 2007.....	15
Figura 1.4 - Triângulo do fogo	16
Figura 1.5 - Tetraedro do fogo	16
Figura 1.6 - Diluição do gás	17
Figura 1.7 - Interação química	17
Figura 1.8 - Representação esquemática do comportamento ambiental dos BFR	19
Figura 1.9 - Estruturas do TBBPA, PCBs, DDT e hormonas T4 e T3.....	20
Figura 1.10 - Esquema do tratamento da ETAR de Setúbal	24
Figura 2.1 - Varrimento de espectros no espectrofotómetro	31
Figura 2.2 - Reactores com os compostos RC.....	36
Figura 3.1 - Crescimento da biomassa nos reactores alimentados com os RC.....	43
Figura 3.2 - Concentração de DBNPG durante 3 semanas.....	44
Figura 3.3 - Concentração de TBBPA durante 3 semanas.....	44
Figura 3.4 - Concentração de BPA durante 3 semanas.....	45
Figura 3.5 - Concentração de HBCD durante 3 semanas.....	45
Figura 3.6 - Concentração de TPhP durante 3 semanas	46
Figura 3.7 - (a) Concentração do TBBPA e de amónia no reactor durante 1 ciclo de 5 dias e (b) OD e pH no mesmo reactor durante mesmo ciclo.....	47
Figura 3.8 - (a) Concentração do BPA e de amónia no reactor durante 1 ciclo de 5 dias e (b) OD e pH no mesmo reactor durante mesmo ciclo.....	48
Figura 3.9 - (a) Concentração do DBNPG e de amónia no reactor durante ciclo de 5 dias e (b) OD e pH no mesmo reactor durante mesmo ciclo.....	49
Figura 3.10 - Caminho de biodegradação previsto para o composto TBBPA.....	52

Figura 3.11 - Caminho de biodegradação previsto para o composto BPA.....	52
Figura 3.12 - Caminho de biodegradação previsto para o composto DBNPG.....	53

Lista de tabelas

Tabela 1.1 - Histórico da aplicação de compostos com efeito RC	11
Tabela 1.2 - Classes de retardadores de chama e respectiva utilidade	14
Tabela 1.3 - Ocorrência de RC no meio ambiente	18
Tabela 1.4 - Diligências apresentadas por alguns países não pertencentes á EU.....	22
Tabela 1.5 - Caracterização dos compostos RC alvos do estudo.....	27
Tabela 1.6 - Estudos realizados com HPLC.....	28
Tabela 1.7 - Estudos realizados com GC.....	28
Tabela 2.1 - Comprimento de onda, linearidade coeficientes de correlação para NH_4^+	33
Tabela 2.2 - Composição dos meios de crescimento.....	34
Tabela 3.1 - Comprimento de onda, linearidade coeficientes de correlação, LDD e LOQ para os compostos RC	41
Tabela 3.2 - Comprimento de onda, linearidade coeficientes de correlação para biomassa.....	42
Tabela 3.3 - Parâmetros cinéticos.....	50
Tabela 3.4 - Propriedades dos metabolitos gerados na biodegradação dos RC em estudo.....	54
Tabela 3.5 - Classes de toxicidade: Escala de Hodge e Sterner	55

Lista de anexos

Anexo A.I - Poster apresentado no encontro 14.º ENaSB/14.º SILUBESA	65
---	----

Lista de abreviaturas

aC - antes de Cristo

BDE-209 - Éter Decabromodifenil

BFRs - Brominated Flame Retardants – Retardadores de Chama Bromados

BPA - Bisfenol A

CAS - Chemical Abstracts Service Registry - Número CAS

CE - Comissão Europeia

DAD - Diode Array Detector - Detector de Fotódiodos

DBNPG - Dibromoneopentilglicol

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

EI+ - Positive Ion Impacte - Impacto electrónico positivo

ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais

GC - Cromatografia Gasosa

GC-MS - Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa

HBCD - Hexabromociclododecano

HET - Ácido Clorêndrico

HP5 - 5% Fenil Metilsilicone

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Resolução

ICP-MS - Espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo

LC 18 - Coluna LiChrosorb® 18

LC-APCI-MS/MS - Cromatografia líquida com ionização química a pressão atmosférica acoplada a espectrometria de massa em tandem

LDD - Limite de Detecção

LDQ - Limite de Quantificação

LogK_{ow} -Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água

OD - Oxigénio Dissolvido

OPEs - Organophosphate Esters – Ésteres Organofosfatados

PCB - Bifenilos Policlorados

PBBs - Bifenilos Polibromados

PBDEs - Polybrominated Diphenyl Ethers – Éteres difenil polibromados

PDMS - Polidimetilsiloxano

POPs - Poluentes Orgânicos Persistentes

Pv - Pressão de vapor

PW - Massa molar

REACH - Registration Evaluation and Authorization of Chemicals - Registo, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas

RC - Retardadores de Chama

RoHS - Restriction of Certain Hazardous Substances, Restrição de Certas Substâncias Perigosas

SST - Sólidos Suspensos Totais

SSV - Sólidos Suspensos Voláteis

TCEP - Tris(2-cloroetil)fosfato

TBBPA - Tetrabromobisfenol A

TBNPA - Álcool Tribromoneopentílico

TBP - Tribromofenol

TPhP - Trifenilfosfato

u - Unidades de massa atômica

UV - Ultravioleta

WEEE - Waste from Electrical and Electronic Equipment - Resíduos de Equipamentos Elétricos e Electrónicos

WHO - World Health Organization – Organização Mundial de Saúde (OMS)

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Retardadores de chama

Os retardadores de chama (RC) são compostos adicionados aos mais variados produtos de uso comum tais como têxteis, madeiras, tintas, plásticos, etc, conferindo-lhes resistência ao fogo. Desta forma são utilizados em aparelhos eléctricos e electrónicos, mobílias, cortinas, sofás, tapetes, roupas, colchões, brinquedos e em muitos outros.

A Portaria n.º 1532/2008 de 29 de Dezembro é um regulamento técnico de segurança contra incêndios em edifícios e promove mesmo a sua utilização, nomeadamente em termos de segurança contra incêndios para edifícios de utilidade pública, tais como hotéis, teatros, recintos balneares, jardins-de-infância, escolas, etc.

A utilização de RC remonta a 450 a.C., quando os egípcios usaram Alum (sulfato de alumínio e potássio) para reduzir a inflamabilidade da madeira [1]. Na tabela 1.1 apresenta-se um resumo da história da utilização de compostos RC.

Tabela 1.1 – Histórico da aplicação de compostos com efeito RC

Descoberta	Composto, utilidade	Ano
Egípcios	Alum (sulfato de alumínio e potássio) na madeira	450 aC
Romanos	Mistura de vinagre e alum, na madeira	200 aC
Nicolas Sabbatini	Gypsum (sulfato de cálcio di-hidratado) e argila, nas cortinas dos teatros	1638
Obadiah Wyld	Alum, sulfato ferro e bórax em papel e têxteis. Primeira patente (nº 551) em RC	1735
Gay-Lussac (gases perfeitos)	Fosfato de amónio, cloreto de amónio e borax em linho e cânhamo	1821
William Perkin (Químico inglês, 1838, ficou famoso pela descoberta acidental da anilina)	Hexahidróxido de estanho e sódio e sulfato de amónio em algodão	1912

Fonte: EHC 192 [2]

Actualmente existem mais de 175 compostos químicos classificados como RC existindo vários grupos: inorgânicos, organofosforados, azotados e os halogenados (bromados e clorados). Na Figura 1.1 observam-se as estruturas químicas de diferentes RC.

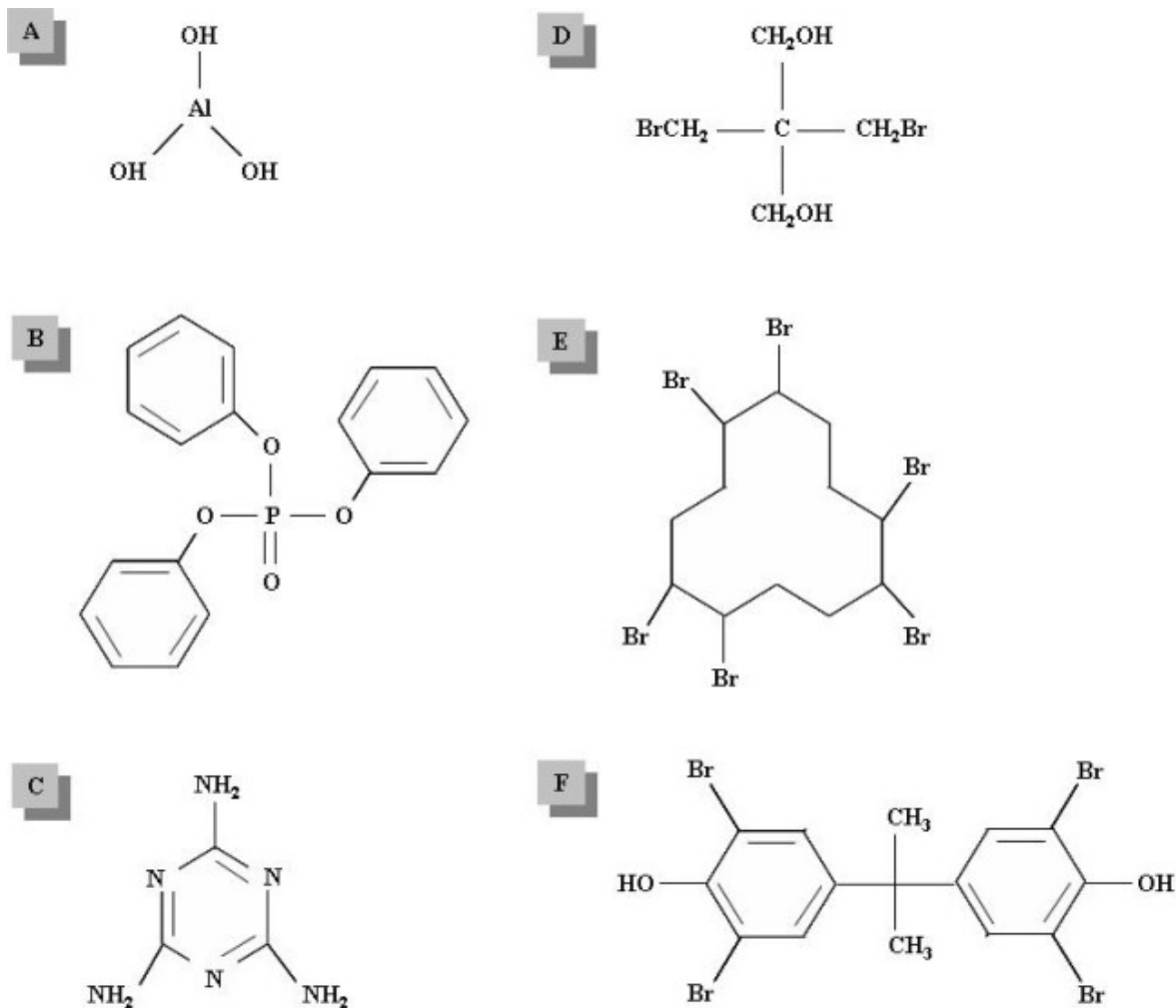


Figura 1.1 - Estrutura química de diferentes RC: (A) Inorgânicos: hidróxido de alumínio; (B) Organofosforados: trifenílfosfato; (C) compostos azotados: melamina; (D-F) orgânicos halogenados: (D) alifáticos: DBNPG, (E) Ciclo alifáticos: HBCD e (F) aromáticos: TBBPA. [3]

1.1.1 Classes de compostos RC

Os compostos halogenados clorados ou bromados, possuem fórmulas adaptáveis a quase todos os polímeros, além de possuírem baixo custo e um bom desempenho contra a propagação de chamas [4]. Podem ainda ser enriquecidos com trióxido de antimônio, o qual não sendo um RC funciona como catalisador, facilitando a activação das moléculas dos RC, ou seja, ao reagir com estes produzem compostos voláteis de antimônio que removem a energia H^+ e os radicais $OH\cdot$ que alimentam a chama [4].

Os compostos RC bromados são mais utilizados do que os clorados devido à sua eficiência e devido aos produtos da sua decomposição a altas temperaturas serem menos voláteis do que os produtos da decomposição dos compostos clorados, dado que o bromo (massa atômica de 79,904 u) é um elemento mais pesado que o cloro (massa atômica de 35,452 u) [2].

Os RC organofosforados são na sua maioria ésteres fosforados que também podem conter bromo ou cloro. São bastante utilizados em polímeros e fibras de celulose têxteis. Os RC azotados inibem a formação de gases inflamáveis e são usados em polímeros contendo azoto, tais como o poliuretano e a poliamida. Os compostos azotados mais utilizados são a melamina e seus derivados [2].

Os compostos RC inorgânicos (hidróxidos de metal tais como: hidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio, polifosfato de amônio, sais de boro, antimônio inorgânico, estanho, zinco, compostos de molibdénio e fósforo vermelho elementar) são adicionados como enchimento do polímero [3].

Dentro de cada grupo de RC existem compostos que são utilizados como activos e outros que são utilizados como reactivos, ou seja, eles próprios são o retardador de chama e podem ser usados, nas mais variadas matérias-primas de fabrico de produtos de uso diário [2]. Os RC reactivos ligam-se quimicamente ao polímero e são exemplos o ácido clorêndico (HET), TBBPA, DBNPG ou alguns compostos organofosforados. Os RC activos misturam-se com o polímero, sendo exemplo o HBCD, trihidróxido de alumínio, hidróxido de magnésio e ésteres de fosfato [2].

Na tabela Tabela 1.2, encontram-se os grupos existentes destes compostos, alguns exemplos de compostos pertencentes a cada grupo, bem como a sua utilização.

Tabela 1.2 – Classes de retardadores de chama e respectiva utilidade

Retardadores de Chama		Abrev.	Nome	Utilização como retardador de chama
Halogenados	Clorados	HCCPD	Hexaclorociclopentadieno	Intermediário na produção de RC
		TCBPA	Tetraclorobisfenol A	Epoxy
		HET	Ácido clorêndico	Resinas de poliéster e tintas
		TCPA	Tetracloroftalato anidrido	Resinas de poliéster e tintas, polietileno, poliestireno, PVC
		DP	Parafinas cloradas Declarano Plus	Polipropileno, borracha, têxteis Fios eléctricos, cabos
	Bromados	DBNPG	Dibromoneopentilglicol	Poliuretano rígido, termoplásticos, poliestireno, ABS
		DBDPE	Decabromodifeniletano	Polipropileno, poliéster/algodão
		HBCD	Hexabromociclododecano	Poliestireno, látex, têxteis, adesivos, vestuário
		TBBPA	Tetrabromobisfenil A	Resinas epoxys, poliésteres, policarbonatos, ABS, resinas fenólicas
		Deca-BDE	Éter decabromodifenil (BDE-209)	Poliestireno, poliésteres, poliamidas, têxteis
Organofosforados	TEP	Trietilfosfato	PVC, resinas poliéster, polyurethane	
	TCEP	Tris(2-cloroetil)fosfato	PVC vinil, borrachas, plásticos, tintas, vernizes,	
	TEHP	Tris(2-etilhexilfosfato)	PVC, solventes, borrachas, tintas, poliuretano	
	TCP	Tricresil fosfato	Solventes, aditivos para lubrificantes e sistemas hidráulicos,	
	TBEP	Tris(2-butoxietil)fosfato	Plásticos e borrachas sintéticas	
	TPhP	Trifenilfosfato	PVC, resinas fenólicas	
	IPPP	Isopropiltrifenilfosfato	Plastizante, fluidos hidráulicos, lubrificantes, termoplásticos	
Azotados		Melamina	Polipropileno e polietileno	
		Fosfato de melamina	Teraftalatos(PET/PBT)	
		Cianurato de melamina	Epoxy e poliuretano	
		Melamina formaldeído	poliamidas, teraftalatos (PET/PBT)	
		Outros sais de melamina e guanidina	Epoxy e poliuretano Resinas thermoset Resinas thermoset	
Inorgânicos	ATH	Tri-hidróxido de alumínio	Compostos de borracha, PVC	
	MDH	Hidróxido de magnésio	Termoplásticos, termosets, borrachas	
		Compostos de Boro	Celulose, têxteis	
		Outros compostos de Zinco e Estanho	Poliamidas, borracha	

Adaptado de EHC 192 [2]

1.1.2 Consumo de compostos RC

Através de dados recolhidos em 2007, verificou-se que o consumo de RC nos Estados Unidos, Europa e Ásia rondou os 1,8 milhões de toneladas, num total de 4,2 biliões de dólares, sendo esperado que este mercado ascenda 3,7% ao ano durante o período 2007-2012. Através da Figuras 1.2 e Figura 1.3 observa-se que, efectivamente, são os RC bromados que apresentam o maior consumo, seguidos dos RC organosfosforados. Observa-se ainda que o continente asiático foi o maior utilizador destes compostos, com um consumo de 918 milhões de dólares. Na Europa é onde se verifica o menor consumo de RC bromados.

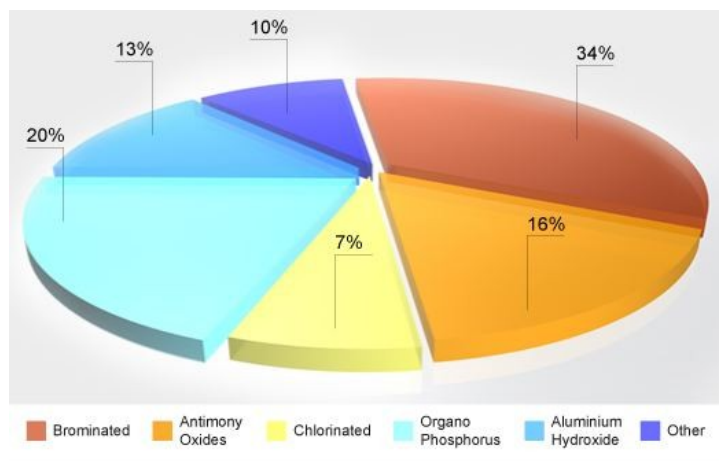


Figura 1.2 – Consumo de RC em 2007 [4]

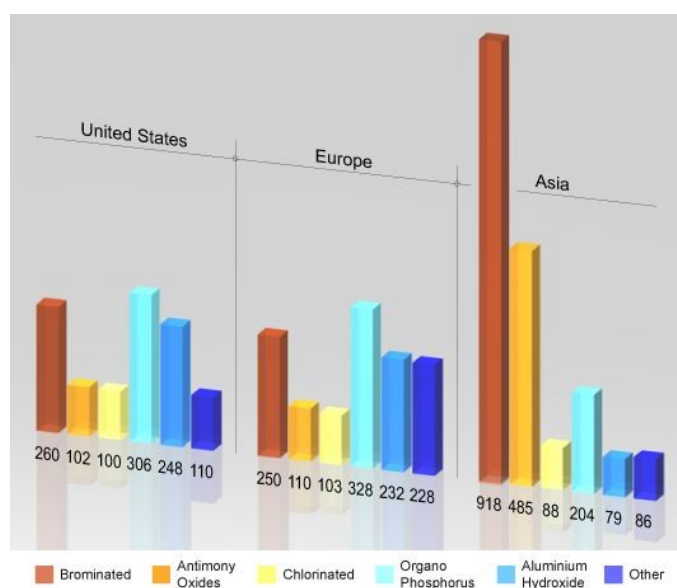


Figura 1.3 – Maiores consumidores de RC em 2007 [4]

1.2 Metodologia de acção dos RC

Quando um composto orgânico (papel, madeira, plástico, gás de hidrocarbonetos, gasolina, etc.) susceptível a oxidação, entra em contacto com uma substância comburente (oxigénio do ar) ao atingir a energia de activação, também conhecida como temperatura de ignição, entra em combustão. A energia para inflamar o combustível pode ser fornecida através de uma faísca ou de uma chama. Iniciada a reacção de oxidação, também denominada combustão ou queima, o calor desprendido pela reacção mantém o processo em actividade [4].

Desta forma, para que haja fogo tem de existir os três vértices do chamado triângulo do fogo, o qual é exemplificado na Figura 1.4: material comburente (o que permite a combustão, gases inflamáveis), o combustível (que é o que arde) e a ignição (que é a energia de activação que provoca a reacção). E para que o fogo continue, para além destes três vértices tem de existir um 4º elemento, reacção em cadeia, passando a designar-se tetraedro do fogo, Figura 1.5, bastando que um deles acabe para que o fogo se extinga.

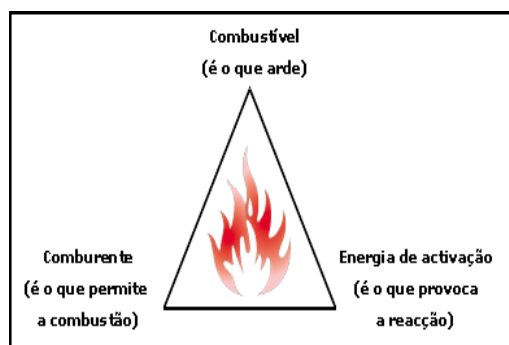


Figura 1.4 – Triângulo do fogo [4]

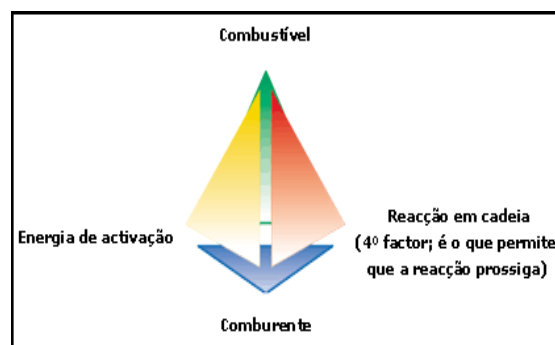


Figura 1.5 - Tetraedro do fogo[4]

É neste sentido que os retardadores de chama actuam, ou seja, na eliminação de um dos vértices, podendo fazê-lo de diferentes formas:

1ª - Diluição do gás: envolve o uso de aditivos que produzem um certo número de gases não combustíveis que diluem o oxigénio fornecido à chama (comburente), ou diluem a concentração do combustível, baixando desta forma a energia de activação. Agem desta forma compostos inorgânicos e alguns compostos azotados, Figura 1.6.[4]

2ª - Têmpera térmica: resulta da decomposição endotérmica do composto, diminuindo a temperatura superficial e a taxa de combustão. Agem desta forma compostos inorgânicos (hidróxidos de metais e sais metálicos) e alguns compostos azotados. [4]

3ª - Camada protectora: formam um líquido ou barreira de protecção, o que limita a quantidade de combustível disponível para arder, ou agem como uma camada isoladora para reduzir o calor transferido da chama para o combustível. Agem desta forma compostos organofosforados e sistemas intumescentes baseados na melamina e outros compostos azotados. [4]

4ª - Diluição física: baseia-se na aplicação de camadas inertes (fibras de vidro, microesferas) e minerais (talco) que agem como resistência térmica para aumentar a resistência do combustível ao calor ou mesmo reduzir a sua disponibilidade [4].

5ª - Interação química: alguns compostos halogenados e fosforados dissociam-se em espécies radicais que competem com os passos do processo de combustão, Figura 1.7. [4]

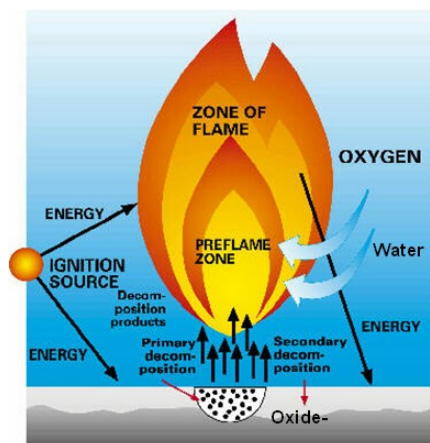


Figura 1.6 – Diluição do gás [4]

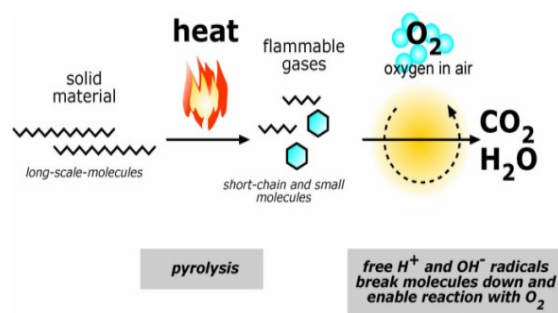


Figura 1.7 – Interação química [4]

1.3 Toxicidade dos compostos RC

A detecção de substâncias, como Penta-, Octa- e DecaBDE, além de PBBs e do HBCD, tem ocorrido em locais remotos, tais como as camadas polares, onde a sua detecção não era esperada, demonstrando uma grande mobilidade destes compostos. Inclusivamente, foram encontrados PBBEs na região Ártica que demonstra a elevada mobilidade, persistência e bioacumulação destas substâncias químicas.

Desta forma, os PBDEs apresentam características que os classificam como POPs (Poluentes Orgânicos Persistentes) de acordo com a Convenção de Estocolmo em 2004 [43]. Vários estudos evidenciaram a presença de RC no meio ambiente, (ver tabela 1.3) onde podem ocorrer processos bióticos e abióticos que os transformam.

Tabela 1.3 – Ocorrência de RC no meio ambiente

Compostos	Amostras	Local	Ano	Ref ^a
HBCD PBDEs	Ar Pó doméstico, escritórios e automóveis Sangue e ovos de gaivotas Leite materno Dieta á base de peixe	Estados Unidos Canadá, Reino Unido Estados Unidos Noruega Corunha (Espanha) Noruega	2005 2008 2008 2007, 2008 2009 2008	[44] [45,46] [47] [48] [49] [50]
PBDEs	Sedimentos vários rios Sedimentos Sedimentos	Portugal (Drammenfjord) Noruega Holanda Lake Woserin (Alemanha)	2005 2007 2007 2007	[51] [52] [52] [53]
PCBs e PBDEs	Sedimentos Tecidos adiposos, cérebros e fígados de focas e ursos polares Sedimentos, ar (gases e partículas)	New York (Rio Niagara) Dinamarca Suiça (Lago Maggiore)	2006 2009 200, 2010	[54] [55] [56, 57]
PCBs, PBEs e DDT	Cérebros de mamíferos marinhos	Atlântico Norte	2009	[58]

Os processos abióticos são processos físico-químicos incluindo a fotodegradação, deposição seca e húmida, decomposição a temperatura elevada, reacções químicas com

outros compostos ou radicais que estando presentes no meio ambiente alteram as características dos compostos devido a factores como temperatura e pH [3]. Os processos bióticos são aqueles que advêm dos compostos para o meio ambiente e incluem bioacumulação, penetração na cadeia alimentar, biotransformação e biodegradação. Estes processos são relevantes no sentido de prever o destino dos compostos RC, uma vez que podem alterar as suas propriedades, incluindo a mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade [3]. Poderá ocorrer que um composto RC poderá ser alterado tornando-se mais ou menos tóxico que o composto inicial [3].

Foi demonstrado em alguns estudos [6,41,42,43,48,55] que quando estes compostos são degradados pela luz geram-se produtos resultantes da perda de átomos de bromo, conferindo-lhes maior solubilidade entrando facilmente na cadeia alimentar, acumulando-se principalmente nos tecidos adiposos e no fígado dos organismos que os ingerem. Na Figura 1.8 é apresentado um esquema do comportamento que os RC bromados podem apresentar no meio ambiente.

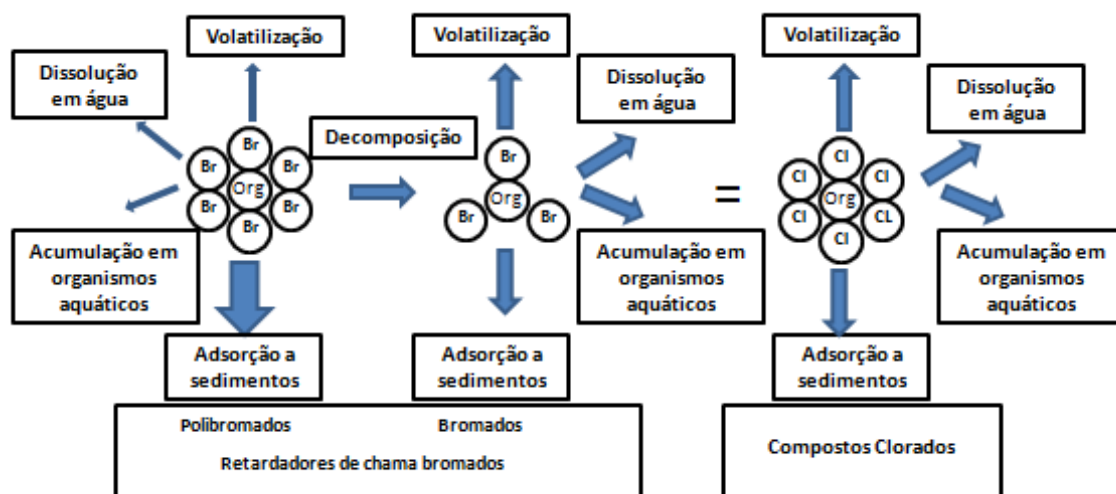


Figura 1.8 - Representação esquemática do comportamento ambiental dos BFR [5]

Segundo o esquema da Figura 1.8, verifica-se que os RC polibromados apresentam uma volatilização, dissolução na água e acumulação nos organismos aquáticos relativamente baixa pelo facto de apresentarem uma forte adsorção a sedimentos. Desta forma, é natural que a sua concentração seja mais elevada em sedimentos junto das suas fontes de emissão, do que nos organismos aquáticos e no Homem. Ainda segundo o esquema,

observa-se que a decomposição dos RC polibromados em outros compostos com menos bromo, aumenta a sua volatilização, dissolução em água bem como a sua acumulação em organismos aquáticos, já que a tendência para serem adsorvidos por sedimentos torna-se menor, ficando assim disponíveis, mesmo em locais afastados da sua fonte de emissão. Este comportamento torna-os semelhantes a compostos clorados considerados também POPs, como é o caso dos bifenilos policlorados (PCBs).[5]

Como se pode observar na Figura 1.9, as estruturas dos compostos RC, por exemplo do TBBPA, tem semelhança com alguns compostos usados até aos anos 70 como é o caso dos já referidos bifenilos policlorados (PCBs) e do para-diclorodifeniltricloroetano (DDT) cuja comercialização foi proibida, por alguns países, nessa altura. Na figura é ainda evidente alguma semelhança com as hormonas tiroideanas, T4 e T3 e com o aminoácido tiroxina.

Por esta razão, os PBDEs são considerados possíveis disruptores endócrinos, levando ao aparecimento de problemas de tiróide, infertilidade, comportamentos “trocados” entre sexos, cancro (algumas formas de cancro são de origem hormonal, por exemplo o cancro da mama e do sistema reprodutor) [3,6].

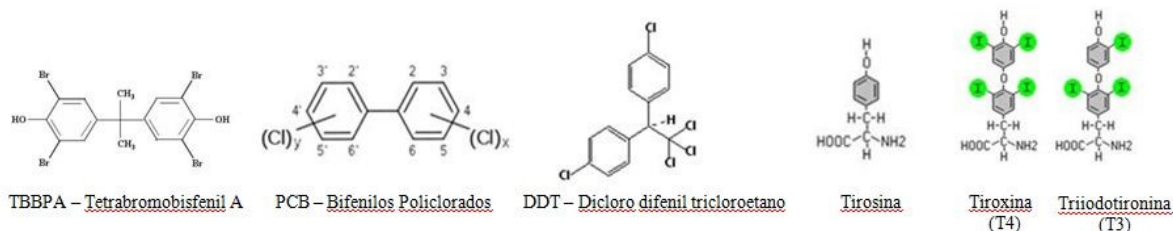


Figura 1.9 – Estruturas do TBBPA, PCBs, DDT e hormonas T4 e T3 [3,6]

Várias pesquisas [6,41,42,43] detectaram concentrações de compostos RC bromados e fosforados no Homem e alertaram que a exposição crónica a baixas concentrações pode causar danos no fígado, disfunções reprodutivas, debilitação do sistema imunitário, desordens endócrinas e neurológicas e desenvolvimento infantil e intelectual retardado [6].

1.4 Limitações à utilização de compostos RC

Uma vez verificada a toxicidade e ecotoxicidade destes compostos, a Comissão Europeia (CE) tomou algumas diligências no sentido de reduzir ou mesmo proibir a utilização de compostos RC, publicando as seguintes directivas e regulamentos:

- Directiva 2002/96/CE (WEEE) – Waste from Electrical and Electronic Equipment - estabelece regras para a gestão adequada de resíduos eléctricos e electrónicos;
- Directiva 2002/95/CE (RoHS) – Restriction of Hazardous Substances) - limita o uso de determinadas substâncias perigosas nos equipamentos eléctricos e electrónicos (PBDEs entre outros) proibindo o uso do pentabromo e do éter octabromodifenil e restringindo e controlando o uso de outros PBDEs;
- Regulamento CE nº 1907/2006 (REACH) – Registration Evaluation and Authorization of Chemicals - estabelece um quadro regulamentar único para o registo, a avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas, criando a Agência Europeia de Substâncias Químicas (European Chemicals Agency - ECHA). Esta entidade é responsável pela gestão dos aspectos técnicos, científicos e administrativos do regulamento, a nível comunitário.

Também a OMS determinou a não utilização de PBDEs sempre que existam substitutos não tóxicos disponíveis.

Além dos países pertencentes à União Europeia (EU), outros países preocuparam-se em tomar diligências de forma a reduzir ou mesmo eliminar o uso de certos RC, na tabela 1.4 encontram-se alguns exemplos:

Tabela 1.4 – Diligências apresentadas por alguns países não pertencentes à UE

Noruega	Proíbe a utilização de PBBs em produtos têxteis para uso em contacto com a pele de acordo com as Directivas ECC 76/769, 83/264 e 89/677.
Suíça	Proíbe a produção, fornecimento, importação e utilização de PBBs e de produtos que os contenham. Proíbe o fornecimento e importação de condensadores e transformadores contendo PBBs.
Canadá	Proíbe a produção, utilização, processamento, venda e importação de PBBs.
USA	Proíbe, através da <i>Toxic Substances Control Act of 1976</i> (TSCA), a produção ou importação de produtos químicos que não pertencem ao Inventário TSCA. Os produtores devem notificar a EPA (U.S. Environmental Protection Agency) 90 dias antes para que seja avaliada a produção ou importação de novos produtos químicos.
Brasil	As empresas que quiserem exportar para os países da UE, deverão comprovar perante a <i>Associação Brasileira da Indústria Eléctrica e Electrónica</i> (ABINEE) que os seus produtos respeitam as restrições impostas. Também a <i>Comissão Nacional de Segurança Química</i> (CONASQ) elaborou planos de acção para uma gestão segura e sustentável de produtos químicos.
Japão	<i>Home Appliance Recycling Law</i> - atribui aos produtores a responsabilidade de desmontar e reciclar produtos como máquinas de lavar, televisões, ar-condicionado e automóveis. Aplica o conceito dos 3C (Clean/Cycle/Control) equivalente aos 3R. Com base nesta Lei a produção de PBDEs tem sido voluntariamente substituída pela produção de outros compostos.

Fonte: EHC 192 [2] e [7]

1.5 RC nas ETAR e tecnologias de tratamento actuais

As águas residuais resultam num conjunto de águas residuais urbanas, provenientes dos aglomerados populacionais, águas residuais industriais, provenientes das indústrias e águas pluviais. A manipulação diária de objectos contendo RC (tecidos, embalagens, utensílios de cozinha, brinquedos, etc.) bem como a utilização de equipamentos (TVs, rádios etc.) pode colocar os RC na atmosfera, uma vez que estes volatilizam-se podendo pairar e aglomerar-se às partículas de pó, sendo depois depositados no solo e na água. Também a lavagem dos objectos contendo RC, nomeadamente os de uso diário, poderá libertá-lo contaminando assim as águas residuais urbanas com RC. O próprio processo de fabrico destes compostos também produz efluentes, nomeadamente águas residuais contaminadas por RC.

Nas ETAR (estações de tratamento de águas residuais), o tratamento da água residual que lhe aflui envolve processos físico-químicos e biológicos de forma a remover óleos/gorduras e sólidos, diminuir a matéria orgânica biodegradável e eliminar microrganismos de forma a poder lançar no meio hídrico um efluente tratado com um impacto pouco significativo.

A Figura 1.10 apresenta um esquema do tratamento da ETAR de Setúbal, local onde foram recolhidas as lamas para os ensaios deste estudo. Os RC ao chegar às ETAR poderão ser removidos no tratamento secundário biológico, através da biomassa existente, em condições aeróbias ou anaeróbias, no terciário ou ficar adsorvido nas lamas.

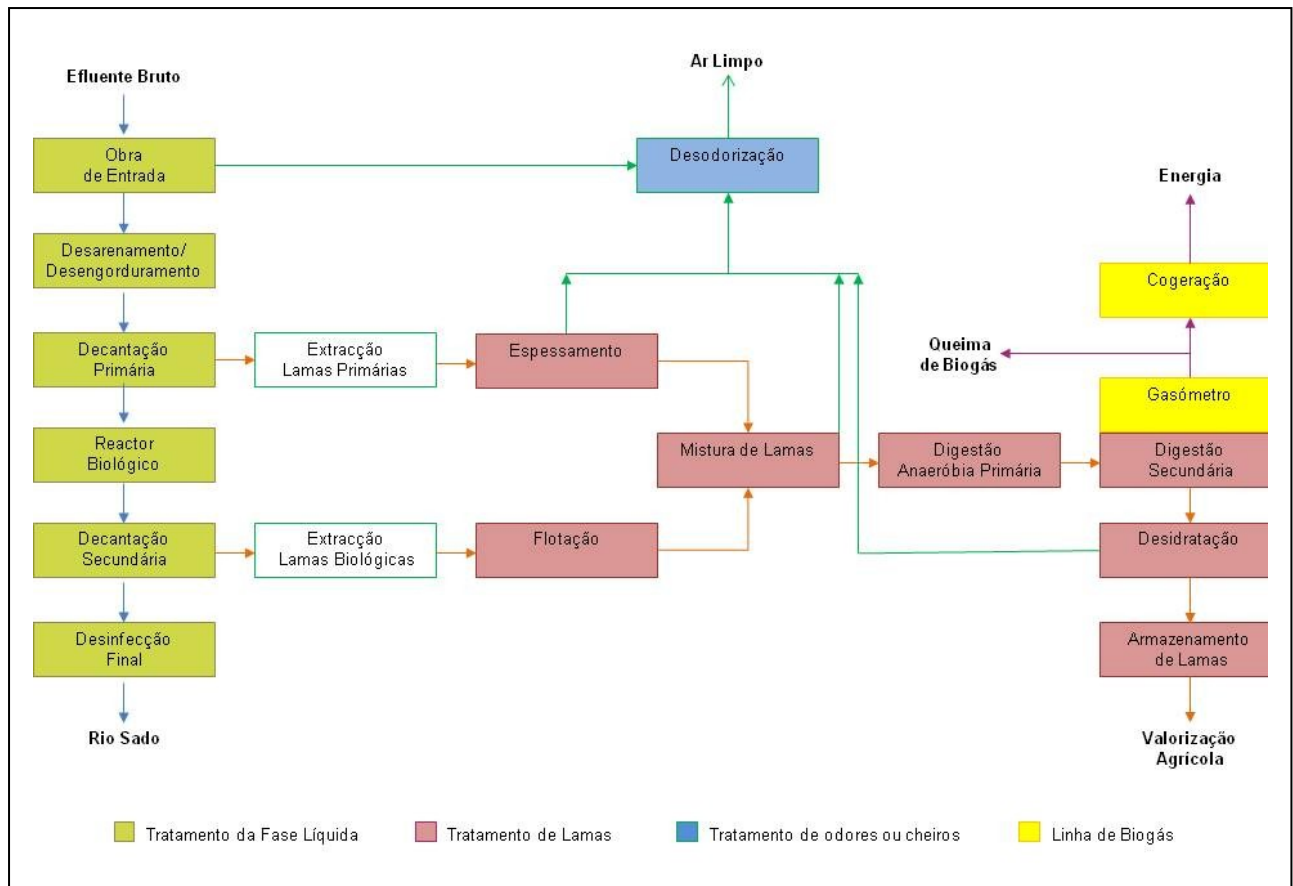


Figura 1.10 - Esquema do tratamento da ETAR de Setúbal [8]

1.6 Estudos e técnicas para remoção de RC

A biodegradação, degradação promovida por microrganismos, pode contribuir para a redução ou eliminação dos compostos orgânicos no ambiente [9]. Desta forma, têm sido realizados alguns estudos no sentido de verificar a biodegradação destes compostos, pelo que têm sido relatados processos de biodegradação aeróbia e anaeróbia de compostos orgânicos halogenados [9,10-11].

Os microrganismos podem usar os compostos orgânicos halogenados de várias formas, nomeadamente, como fonte de carbono e substrato oxidável, como receptor de electrões no processo de halorespiração, na transformação co-metabólica e no metabolismo fermentativo, no qual um intermediário halogenado serve como receptor de electrões [12]. Normalmente, a remoção dos halogéneos reduz a resistência dos compostos para a biodegradação e o risco de formação de metabolitos tóxicos durante as etapas metabólicas [12]. No entanto, isso nem sempre acontece, especialmente se não ocorrer a completa mineralização dos compostos e permanecerem os substituintes bromados.

Segev et al. (2007) estudaram a biodegradação de dois RC bromados, (o dibromoneopentilglicol (DBNPG) e o álcool tribromoneopentílico (TBNPA)), promovida por um consórcio bacteriano, constituído por bactérias das espécies *Rhizobium* (com 97% similaridade) e *Paracoccus* (com 97% similaridade). Neste estudo foram utilizadas 12 amostras de solo contaminado provenientes do parque industrial de Ramat-Hovav localizado no deserto Negev em Israel. Utilizaram uma câmara de anaerobiose (COY – Laboratory Product INC., modelo nº AAT) para promover as condições aeróbias e anaeróbias e a temperatura foi mantida a 30°C. Verificaram biodegradação acompanhada por uma libertação de bromo através de uma reacção bacteriana [13].

Brenner et al. (2006) estudaram a biodegradação de uma mistura de compostos orgânicos contendo bromo, incluindo o TBBPA e o TBP (2,4,6-tribromofenol) através de um sistema de reactores (5 reactores, agitados mecanicamente e com pH mantido a 8,5). Adicionaram à biomassa concentrada, proveniente de um sistema de tratamento de águas residuais domésticas e industriais, sedimentos contaminados provenientes do parque industrial de Ramat-Hovav. Apesar de terem aplicado várias condições redox e testado diferentes fontes de carbono não observaram biodegradação do TBBPA. Verificaram que o TBP, foi facilmente biodegradado por culturas aeróbias num processo de lamas activadas [14].

Ronen et al. (2000) estudaram a biodegradação do TBBPA e do TBP em condições aeróbias e anaeróbias. A inoculação anaeróbia de sedimentos provenientes do parque industrial Ramat-Hovav em Negev, perante meio de cultura peptona-triptona-glucose-extracto de levedura, foi realizada num reactor anaeróbio (Forma Scientific, Marietta-Ohio) contendo 94% de N₂ e 6% de H₂ a uma temperatura de 30°C. Observaram um decréscimo em 80% da concentração do TBBPA com a identificação, através de GC-MS, do BPA como metabolito. Quanto ao TBP, verificaram a desalogenação do mesmo dando origem a fenol sendo este ultimo metabolizado nas condições anaeróbias. O BPA persistiu em condições anaeróbias, no entanto observaram a sua mineralização em condições aeróbias através da estirpe *WHI* da bactéria gram-negativa do género *Sphingomonas*, num reactor aeróbio, inoculado ao abrigo da luz, com agitação de 200 rpm e a uma temperatura de 30°C [15].

Davis et al. (2005) demonstraram a biodegradação do composto HBCD em solo aeróbio e anaeróbio e em sedimentos aquáticos, onde o HBCD perdeu átomos de bromo através de um mecanismo de desalogenação conhecido por dihaloeliminação onde, em cada etapa,

ocorre a perda de dois átomos de bromo e forma-se uma ligação dupla entre os dois carbonos vizinhos [16,17].

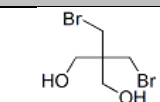
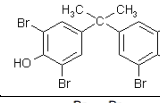
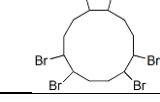
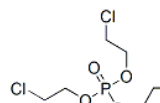
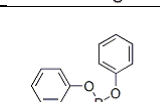
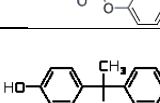
Outras publicações [18,19,20-21] demonstraram a perda de átomos de bromo de diferentes PBDEs em meio anaeróbio, incluindo do éter decabromodifenil (BDE-209), através de bactérias isoladas, misturas de culturas e fungos em meios minerais, assim como de sedimentos ou lamas de ETAR. No caso da perda de átomos de bromo do BDE-209 verificaram que o metabolito formado apresentou ser mais tóxico e bioacumulativo que o BDE-209 [21].

1.7 Caracterização dos RC alvos do estudo

No presente estudo optou-se pelos RC bromados: dibromoneopentilglicol (DBNPG), tetrabromobisfenol A (TBBPA) e hexabromociclododecano (HBCD) e pelos organofosforados: tris(2-cloroetil)fosfato (TCEP) e trifenilfosfato (TPhP). Não sendo um composto utilizado como retardador de chama, o bisfenol A (BPA) também foi objecto deste estudo, no sentido de se verificar a sua presença ou não como metabolito da degradação do TBBPA.

Na escolha dos compostos levou-se em consideração características como a sua estrutura, que sendo complexa nos indica o quanto o composto poderá ser, á partida, de difícil degradação, o $\log K_{ow}$, que nos indica a potencialidade para ser adsorvido, a solubilidade, indicativo de como o composto pode estar disponível no meio hídrico e também para a preparação das soluções para o estudo, a temperatura de ebulição e a pressão de vapor que indicam a potencialidade do composto para se volatilizar. Na Tabela 1.5, estão resumidas estas características.

Tabela 1.5 – Caracterização dos compostos RC alvos do estudo

Composto	Número CAS	Estrutura	Peso Molecular (g/mol)	logK _{ow}	Solubilidade água (25°C)	T. ebulição (°C)	Pressão Vapor
Dibromoneopentilglicol (DBNPG)	3296-90-0		261,97	2,29 (a)	19,40 mg.L ⁻¹ (a)	270 (a)	2,0x10 ⁻³ Pa a 25°C (a)
TetrabromobisfenilA (TBBPA)	79-94-7		543,87	8,024 (b)	1,26 mg.L ⁻¹ (b)	316 (b)	1,19 x 10 ⁻⁵ Pa a 20 °C (b)
Hexabromociclododecano (HBCD)	3194-55-6		631,69	5,625 (c)	3,40 µg.L ⁻¹ (c)	230 (e)	6,2x10 ⁻⁵ Pa a 21° C (c)
Tris(2-cloroetil)fosfato (TCEP)	115-96-8		285,48	1,51 (d)	951 mg.L ⁻¹ (d)	119 (d)	133 x10 ³ Pa a 20 °C (d)
Trifenilfosfato (TPhP)	115-86-6		326,28	5,12 (e)	0,04 µg.L ⁻¹ (e)	260 (e)	13 Pa a 155°C (e)
Bisfenol A (BPA)	80-05-7		228,29	3,4 (f)	300 mg.L ⁻¹ (f)	361 (f)	5,3 x 10 ⁻⁶ Pa a 25°C (f)

(a) The Ameribrom, Inc., Robust Summaries & Test Plan: 2,2-bis(bromomethyl)-1,3-propanediol; Revised Summaries; (b) The American Chemistry Council Brominated Flame Retardant Industry Panel (BFRIP), Robust Summaries & Test Plan: Phenol, 4,4'-Isopropylidenebis[2,6-dibromo-; Revised Summaries; (c) U.S. Environmental Protection Agency Supporting Documents for Risk-Based Prioritization, Supporting Documents for Initial Risk-Based Prioritization of High Production Volume Chemicals3/18/2008; (d) Rhodia Inc., Robust Summaries & Test Plan: Tris (2-chloroethyl) Phosphite; Robust Summaries; (e) Akzo Nobel Functional Chemicals LLC., Robust Summaries & Test Plan: Butylated Triphenyl Phosphate; Robust Summaries; (f) General Electric Company, Robust Summaries & Test Plan; 2-Propanone, Reaction Product w/Phenol

1.8 Métodos de análise dos RC

Estudos realizados a estes compostos, utilizaram métodos analíticos envolvendo, na sua maioria, cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS). No entanto, verificou-se a existência de alguns estudos que também utilizaram cromatografia líquida de alta resolução com detector de fotiodos (HPLC-DAD). Na tabela 1.6 estão resumidos os estudos realizados com HPLC e na tabela 1.7 os estudos realizados com cromatografia gasosa (GC). São indicadas também as condições de funcionamento para estes dois tipos de equipamento e respectivos métodos analíticos.

Tabela 1.6 – Estudos realizados com HPLC

Composto	Análises com HPLC				
	Detector	Coluna	Fase móvel	Gradiente Isocrático	Ref.
Dibromoneopentilglicol (DBNPG)	DAD	LC 18	Metanol 1:1		[13]
TBBPA e BPA	DAD	LC 18	Fase A e Fase B	60%A:40%B**	[15]

DAD - diode array detector

Fase A - Metanol 1% ácido acético

LC - LiChrosorb®

Fase B - Tampão acetato de amónio 18 mM com 1% ácido acético

** Aumentando linearmente até 100 % em 13 min.

Tabela 1.7 – Estudos realizados com GC

Composto	Análises com GC				
	Equipamento	Coluna	Cond. Rampa	Gás arraste	Ref.
Hexabromociclododecano (HBCD)	EI-MS	PDMS	110:1-320:5*	hidrogénio, 4 ml/min	[22]
Tris(2-Cloroetil)fosfato (TCEP)	ICP-MS	HP 5	70:1-270:5 **	hélio 99,999%, 1,5 ml/min	[23]
Trifenilfosfato (TPP)	ICP-MS	HP 5	70:1-270:5 **	hélio 99,999%, 1,5 ml/min	[23]

* 12 °C/min

PDMS - Polydimethylsiloxane

** 15°C/min

HP 5 - 5% fenil metilsilicone

EI-MS - Impacto electrónico em modo positivo-espectrometria de massa

ICP-MS - Espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo

1.9 Motivação

Como já foi referido anteriormente os RC são compostos utilizados principalmente para proteger os materiais contra a ignição, sendo utilizados no fabrico de numerosos utensílios. Entre os vários grupos de RC, os bromados e os organosfosforados são os mais utilizados devido ao seu baixo custo e á sua alta eficiência. Recentemente, vários estudos [44, 45,46,51,52,53,54] têm demonstrado a presença de RC bromados no ar, no solo, na água, em águas residuais e em sedimentos, mesmo em locais longe do local de fabrico, evidenciando o facto de que estes compostos não são de fácil degradação e tem elevada mobilidade.

Outros estudos [48,49,50,55,58] demonstraram a presença destes compostos em plantas, organismos aquáticos, aves e até mesmo em humanos, inclusive em leite materno, concluindo-se que, para além da exposição externa a que o Homem está sujeito (através da manipulação dos objectos e inalação de ar contaminado), também a alimentação é fonte de contaminação, uma vez que estes compostos entram na cadeia alimentar.

Uma eventual solução para este problema passa pela remoção destes compostos através de processos biológicos. Existem alguns estudos [9,10,13,14,15,16,17,18,19] que evidenciam a sua remoção total ou parcial. No entanto, existe ainda pouca pesquisa no sentido de verificar os processos bióticos e abióticos que possam alterar as características destes compostos, tornando-os mais persistentes e tóxicos, pelo que existe a necessidade de se investigar as transformações bioquímicas, os microrganismos envolvidos e os metabolitos gerados.

Foi com base na pouca investigação existente sobre a biodegradabilidade destes compostos, o seu carácter toxicológico e bioacumulativo e, principalmente, a disponibilidade com que estes compostos nos são apresentados diariamente, inclusivamente às nossas crianças, desde tenra idade, através, por exemplo, dos seus brinquedos preferidos, que a motivação para a elaboração deste projecto-tese surgiu, pois, segundo uma frase de Mahatma Ghandi *"Não sabemos que resultados virão das nossas acções. Mas se não fizermos nada, então nunca existirão resultados."*

Capítulo 2 - Materiais e métodos

2.1 Reagentes, compostos RC e consumíveis

2.1.1 – Reagentes RC padrão

Os compostos dibromoneopentilglicol a 98% (DBNPG), hexabromociclododecano a 95% (HBCD), 3,3',5,5'- tetrabromobisfenol A a 97% (TBBPA) e bisfenol A a 99% (BPA), foram provenientes da Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Alemanha) e os compostos tris(2-cloroetil)fosfato a 97% (TCEP) e trifenilfosfato a 98% (TPhP) foram provenientes da Acros Organics (Acros Organics, Geel, Bélgica).

2.1.2 – Fase móvel e preparação de soluções

Para a preparação da fase móvel e dos padrões das soluções de alimentação foram utilizados Metanol para HPLC e Acetonitrilo para HPLC (ambos da Panreac, Barcelona, Espanha). A água utilizada foi proveniente do sistema de desmineralização de água ultra pura, Diwe Water Max W2, Type II Water Station Technologies.

2.1.3 – Preparação de soluções padrão

Prepararam-se soluções de cada composto tendo em consideração a sua solubilidade, desta forma, devido à sua baixa solubilidade em água, foram dissolvidos em Metanol os seguintes compostos: TCEP (2003 mg.L⁻¹), DBNPG (1000 mg.L⁻¹), TPhP (1128 mg.L⁻¹), BPA (280 mg.L⁻¹) e TBBPA (75 mg.L⁻¹). O composto HBCD foi dissolvido em acetonitrilo (16 mg.L⁻¹). Estas soluções foram preparadas quinzenalmente, guardadas ao abrigo da luz a +4°C, até à sua utilização de forma a evitar a sua degradação.

2.2 Metodologia de quantificação analítica

2.2.1 Determinação do comprimento de onda por espectrofotometria

De forma a se proceder á análise e quantificação dos compostos RC por HPLC-UV foi necessário determinar o comprimento de onda para o qual a absorvência apresentou o valor máximo. Estes comprimentos de onda foram determinados através do espectrofotómetro de duplo feixe (ThermoScientific Evolution 160 UV-Vis). Para tal, traçou-se a linha de base colocando o solvente, em que os compostos foram dissolvidos, em duas células de quartzo com um percurso óptico de 1 cm, fazendo-se depois a leitura da célula com a amostra. O comprimento de onda foi determinado para as soluções de cada composto nas concentrações descritas no ponto anterior, tendo-se obtido os varrimentos dos espectros na gama de comprimento onda de 190 a 400 nm, Figura 2.1.

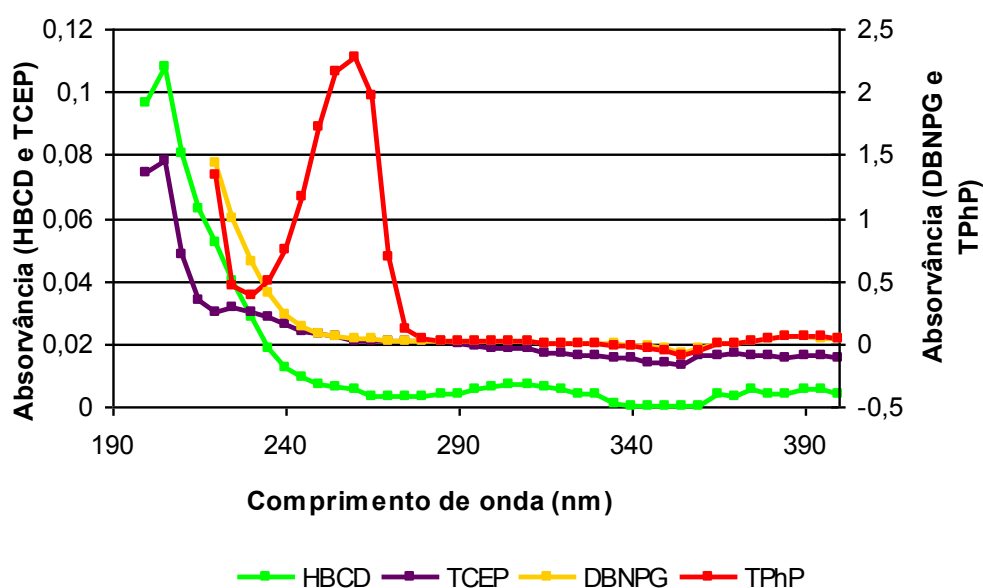


Figura 2.1 - Varrimento de espectros no espectrofotómetro

Pelos varrimentos nos comprimentos de onda demonstrados na Figura 2.1 determinou-se que o que melhor se adequava para análise simultânea era de 210 nm para os compostos TCEP, DBNPG, HBCD e TPhP. Para os compostos BPA e TBBPA foi utilizado o comprimento de onda de 275 nm de acordo com a literatura [15].

2.2.2 Análise e quantificação dos RC por HPLC-UV

Para a detecção e análise dos compostos utilizou-se o aparelho de HPLC Varian Prostar 210 com uma coluna de cromatografia LiChroCart 250-4 HPLC-Cartridge Purospher Star RP-18 endcapped (5 μ m) (Merck, Portugal), com pré-colunas LiChroCart 4-4, Purospher Star RP 18-e (5 μ m) (Merck, Portugal). A fase móvel utilizada foi metanol:água, (70:30), acidificada a pH = 3 com ácido fórmico, filtrada em vácuo após preparação através de um filtro de membrana de nylon 0,45 μ m (Whatman, Portugal) e desgaseificada por ultrasons durante 30 minutos antes da sua utilização. A coluna funcionou em regime isocrático, com um caudal de 0,6 mL.min⁻¹ durante 20 min. O volume injectado dos padrões e amostras foi de 20 μ L. O detector UV Prostar 325 UV-Vis foi utilizado nos comprimentos de onda de 210 nm (para TCEP, DBNPG, HBCD e TPhP) e 275 nm (para BPA e TBBPA) de acordo com previamente estudado no espectrofotómetro.

No entanto, aquando da análise dos compostos HBCD e TPhP obteve-se dificuldade na detecção por HPLC-UV, pelo que se utilizou outro equipamento de HPLC (Waters) com detector DAD (photodiode array detector, Waters 996) com coluna (LiChroCART 250-4 Purospher Star RP18 column, Merck) e amostrador automático (Waters 717 plus) acoplado a bomba e controlador (Waters 600) com desgaseificador (X-Act-4 channels, Jour Research). As condições de funcionamento foram as mesmas utilizadas em HPLC-UV.

2.2.3 Análise e quantificação da amónia por fotometria. Método Palintest

A determinação da concentração de azoto foi realizada através do fotómetro (Palintest Photometer 5000^R). Os valores de concentração de azoto (sob a forma de NH₄⁺) foram obtidos pelo procedimento sugerido pelo método Palintest (Ammonia PHT.4.). Foi determinada a recta de calibração do método para padrões nas gamas de concentração de 20 a 2000 ppm cujas leituras foram realizadas no fotómetro a 640 nm de comprimento de onda (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Comprimento de onda, linearidade coeficientes de correlação para NH_4^+

Composto	Comprimento de onda (nm)	Linearidade (C em mg N.L^{-1})	Coef. Correlação
NH_4^+	640	$A = 10 \times 10^{-1}C + 8,4 \times 10^{-2}$	$R^2 = 0,9998$

2.2.4 Análise e monitorização do crescimento da biomassa

Para se estabelecer a relação entre o valor da biomassa em sólidos suspensos voláteis (SSV) e a absorvência, de forma a monitorizar os reactores em termos de crescimento da biomassa, fizeram-se cinco diluições (1:10, 1:25; 1:50, 1:100 e 1:200) de uma solução de concentração 800 mg.L^{-1} SSV e determinou-se a concentração de sólidos [24]. Mediu-se a absorvência de cada uma das diluições no comprimento de onda de 610 nm usando o espectrofotómetro e determinou-se a recta de calibração da absorvência versus concentração de SSV.

2.2.5 Linearidade e validação do método: limites mínimos de quantificação e detecção

As rectas de calibração para a avaliação da linearidade em HPLC, na gama de comprimentos de onda seleccionada do HPLC, foram determinadas através da preparação de soluções padrão:

- nas gamas de concentração de 5 a 90 mg.L^{-1} (5, 10, 25, 50 e 90 mg.L^{-1}) para os compostos TCEP, DBNPG, TPhP, BPA;
- nas gamas de concentração de 0,25 a $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (0,25, 0,50, 1,25, 2,50 e $4,50 \text{ mg.L}^{-1}$) para o composto HBCD
- nas gamas de concentração de 1,25 a $22,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (1,25, 2,50, 5,00, 12,50 e $22,50 \text{ mg.L}^{-1}$) para o composto TBBPA

A validação do método foi feita com base na determinação dos limites de detecção (LDD) e quantificação (LDQ) para os compostos RC alvo. LDD e LDQ foram determinados com base na análise de 5 brancos com metanol, injectados no HPLC nas mesmas condições dos compostos RC alvo e determinadas as alturas de pico no tempo de retenção do respectivo composto. Com base nisto, foi determinado o desvio padrão e o

valor de LDD e LDQ, os quais foram calculados através de 3 e 10 vezes o desvio padrão, respectivamente em relação ao declive da recta de calibração do composto RC alvo obtida em HPLC.

2.3 Ensaio de biodegradação em descontinuo com lamas activadas

2.3.1 Preparação do inoculo e da água residual sintética

Para preparação dos reactores foram usados meios de crescimento com as concentrações apresentados na Tabela 2.2. Todos estes meios foram separadamente autoclavados durante 15 min a 121 °C e armazenados a +4°C até à sua utilização.

Tabela 2.2 - Composição dos meios de crescimento

Reagente	Concentração
Meio mineral, pH = 7,15	
NaHPO ₄	1,35 mM
KH ₂ PO ₄	1,35 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 mM
Solução de micronutrientes	
HCl 25%	10 mM
ZnCl ₂	0,5 mM
MnCl ₂ .6H ₂ O	1 mM
H ₃ BO ₃	1 mM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,8 mM
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,1 mM
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,1 mM
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,15 mM
Solução de macronutrientes	
NaCl	1,26 M
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,35 M
FeCl ₂ .4H ₂ O	0,87 mM
Solução de cloreto de cálcio	
CaCl ₂	0,2 M

Fonte: Barreiros et al., 2003 [25]

2.3.2 Preparação da biomassa

Como inoculo foi utilizada biomassa (cultura mista) colhida na ETAR de Setúbal, tendo sido previamente lavada com o meio mineral da seguinte forma: um volume de 150 ml de amostra foi centrifugado durante 10 minutos a 10000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. Seguidamente adicionou-se um volume de 150 ml de meio mineral, voltando a centrifugar-se a solução através do método descrito anteriormente. Repetiu-se a acção até obtenção de um sobrenadante límpido. Desta forma rejeitou-se toda a água residual que acompanhava a biomassa. Retirou-se 10 ml da biomassa e colocou-se num erlenmeyer com 250 ml de meio mineral e fez-se a determinação da concentração de sólidos, calculada de acordo com o procedimento para a determinação da concentração de sólidos [24], tendo-se obtido o valor de 800 mg.L⁻¹ SSV. O inoculo dos reactores foi preparado da mesma forma, retirando-se 10 ml de biomassa para cada um deles e medindo-se a sua absorvência (absorvência inicial).

2.3.3 Preparação dos reactores

Os reactores consistiram em erlenmeyers de vidro de 500 ml, rolhados com tampa de algodão cardado envolta em gaze e tapados com folha de alumínio para evitar a entrada da luz. Foram preparados com 250 ml de meio mineral, suplementado com 0,25 ml de solução de micronutrientes, 1,5 ml de solução de macronutrientes, 0,25 ml de solução de CaCl₂ (Tabela 2.1) e 10 ml de biomassa preparada da forma descrita no ponto 2.3.2. Como fonte de carbono (solução de alimentação) foi adicionado apenas os compostos RC em estudo, provenientes das soluções stock (descritas em 2.1.3), nas seguintes concentrações: 100 ppm para TCEP, DBNPG, TPhP e BPA; 25 ppm para TBBPA e 5 ppm para HBCD.

2.3.4 Manutenção dos reactores

Os reactores foram mantidos à temperatura ambiente, em constante agitação através de placas de agitação e barras magnéticas e em condições aeróbias, tendo sido arejados através de bombas de ar com pedra difusora., Figura 2.2.



Figura 2.2 - Reactores com os compostos RC

Após 7 dias, a biomassa de cada reactor foi centrifugada a 10 000 rpm durante 10 min, desprezado o sobrenadante e recolocada no respectivo reactor ao qual se adicionou o meio mineral, macronutrientes, micronutrientes, fonte de cálcio e composto RC, repondo-se as concentrações iniciais.

2.3.5 Monitorização dos reactores

Os reactores estiveram em funcionamento durante 16 semanas e foram monitorizados diariamente nos parâmetros pH (*Crison Micro pH 2001*), oxigénio dissolvido e temperatura (*WTW oxi 330i* com célula *WTW Cell-Ox 325*). Semanalmente, aquando a mudança do meio, foi determinada a concentração de biomassa nos diferentes reactores.

Para a análise e monitorização dos compostos foi, diariamente, colhida uma amostra de cada reactor e centrifugada a 10 000 rpm durante 8 minutos de onde se retirou 1 ml do sobrenadante, voltando o restante ao respectivo reactor. A amostra foi conservada em “vial” de vidro âmbar a -22°C para a posterior análise em HPLC-UV.

De forma a observar a concentração de azoto em cada reactor, fez-se colheita de amostra diariamente durante um ciclo de 5 dias.

2.4 Parâmetros cinéticos dos reactores

A cinética de remoção destes compostos pode ser realizada por biodegradação e/ou por adsorção. O termo de adsorção foi minimizado neste trabalho apenas se tendo considerado maioritariamente a componente biológica.

Em 1898 Lagergren apresentou uma equação de primeira ordem, para descrever a sorção (ocorrência simultânea de absorção e adsorção) num sistema líquido/sólido, baseado na capacidade do sólido e, desde então tem sido largamente utilizada em diversos estudos [26]. A equação de Lagergren, também conhecida por cinética de pseudo-primeira ordem pode ser representada pela seguinte equação:

$$\frac{dCt}{dt} = -K_{bio}.X_{ss}.Cl \quad (Eq. 2.4.1)$$

em que Ct é a concentração total de composto (mg.L^{-1}), t é o tempo (dias), K_{bio} é a constante de velocidade de reacção ($\text{L.g SS}^{-1}\text{d}^{-1}$), X_{ss} é a concentração de sólidos suspensos (g SS.L^{-1}) e Cl é a concentração de composto em solução (mg.L^{-1}) [26,27,31].

Considerando que a remoção pode ocorrer por transformação biológica e/ou adsorção, devemos tomar em consideração o coeficiente de sorção, kd (L.g SS^{-1}), que dá a razão entre a quantidade de composto adsorvido e a quantidade dissolvida na fase líquida, por unidade de sólidos suspensos [26,31]:

$$kd = \frac{C_{ads}}{X_{ss}.Cl} \quad (Eq. 2.4.2)$$

$$Ct = C_{ads} + Cl = kd.X_{ss}.Cl + Cl = Cl(kd.X_{ss} + 1) \quad (Eq. 2.4.3)$$

onde C_{ads} é a concentração de composto adsorvido expressa por unidade de volume do reactor (mg.L^{-1}). Substituindo as Eq. (2.4.2) e (2.4.3) na Eq. (2.4.1), o decréscimo da concentração do composto em solução, C_{liq} , pode ser expresso por:

$$\frac{dC_{liq}}{dt} = \frac{-K_{bio}.X_{ss}.Cl}{1+kd.X_{ss}} \quad (Eq. 2.4.4)$$

A forma logarítmica desta equação diferencial pode ser apresentada como:

$$\ln \left(\frac{Ct}{C0} \right) = - \left(\frac{K_{bio}.X_{ss}}{1+K_d.X_{ss}} \right) t \quad (Eq 2.4.5)$$

onde Ct representa a concentração de substrato ao longo do tempo e $C0$ a concentração inicial de substrato. Traçando um gráfico do semi-logaritmo da concentração $\ln (Ct/C0)$ em função do tempo de incubação, obtém-se uma representação linear, provando-se desta forma que a reacção de degradação corresponde a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Através do declive das regressões lineares obtidas para cada conjunto de pontos, é possível determinar o valor da velocidade de remoção biológica (K_{bio}) e do tempo de meia vida $T_{1/2}$ (d) para cada um dos compostos alvo [26].

$$T_{1/2} = \ln 2 / K' \quad (Eq 2.4.6)$$

Onde K' representa a constante de velocidade da reacção sem ser afectada do coeficiente de sorção uma vez que só se teve em consideração a concentração na fase líquida.

Tal como na literatura [26,27,28,29,30,31], para a avaliação da adsorção apenas foi tido em conta a facilidade ou dificuldade dos compostos poderem vir a ser adsorvidos à biomassa através da análise dos K_{ow} . Desta forma, pode considerar-se que para:

- a) $\log K_{ow} < 2,5$ resulta num baixo potencial adsorção;
- b) $2,5 > \log K_{ow} > 4,5$ apresenta potenciais médios de adsorção;
- c) $\log K_{ow} > 4,5$ leva a elevado potencial de adsorção.

A sorção depende não só da hidrofobia dos RC mas também das interacções electrostáticas e do seu pK_a . Segundo Soeiro, R., (2009), existe uma relação linear entre o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) e o pH quando este é alterado de forma a manter a neutralidade dos compostos em causa [26].

2.5 Mecanismos previsíveis de biodegradação dos RC

As vias metabólicas de transformação dos RC por microrganismos em meio aeróbio foram realizadas por um software que permite efectuar a previsão dos mecanismos de transformação química da molécula original, o PPS (Pathway Prediction System) [32]. Esta previsão é mais precisa para os compostos que:

- são semelhantes aos compostos cujos caminhos de biodegradabilidade existem em literatura científica;
- estão em ambientes expostos ao ar, no solo húmido ou na água, a temperaturas e pH moderados e sem concorrência de produtos químicos ou toxinas;
- são a única fonte de energia, carbono, azoto ou outro elemento essencial para o crescimento dos microrganismos.

A previsão termina quando se alcançam pequenos compostos de fácil degradação. Se inicialmente se introduzir um composto com estas características, a sua biodegradação não é previsível e o utilizador receberá uma ligação para a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) para pesquisar o composto.

Não é apresentada previsão de degradação para moléculas muito pequenas com poucos ou nenhuns átomos de carbono e alguns co-factores e derivados de enzimas comuns. Tal facto limita a lista de previsões para os compostos mais importantes. Desta forma, existe uma lista de moléculas cujo caminho de degradação não é previsível, disponível no sistema.

O PPS foi desenvolvido para compostos orgânicos que possam ser representados por uma só estrutura química conhecida com precisão. Se o composto tiver uma composição variável (tal como oligómeros, gorduras naturais ou mistura de produtos cuja composição depende das condições ambientais) a sua estrutura representativa pode ser introduzida no sistema, mas neste caso existe a possibilidade do resultado não reflectir a verdadeira natureza dos produtos da biodegradação.

Algumas reacções ambientais conhecidas não são previsíveis com este sistema, porque não são reacções de biodegradação e também porque algumas reacções são de difícil previsão:

- reacções de desintoxicação, incluindo mas não limitado a, conjugação com xilose, glucuronato e sulfato;
- reacções de dimerização, incluindo mas não limitado a dissulfuretos formados a partir de grupos sulfureto, ou compostos azo formados a partir de grupos de amidas primárias;
- metilação de grupos hidroxilo;
- acetilação de aminas primárias;
- formação de anéis intermoleculares
- hidroxilação de átomos de carbono alifáticos em posições onde culturas puras de microrganismos, que metabolizam compostos semelhantes, não hidroxilam [32].

Capítulo 3 - Resultados e discussão

3.1 Validação da metodologia de análise aos RC

O desenvolvimento da metodologia analítica para monitorização dos compostos RC alvo, com determinação do melhor comprimento de onda pelo varrimento no espectrofotómetro e uso posterior do seu valor no HPLC resultou numa boa linearidade e limites de detecção e quantificação para os RC alvo deste estudo, Tabela 3.1

Tabela 3.1 – Comprimento de onda, linearidade coeficientes de correlação, LDD e LOQ para os compostos RC

Composto RC	Comp. de onda (nm)	Linearidade (C em mg RC.L ⁻¹)	Coef. Correlação	LDD (mg.L ⁻¹)	LDQ (mg.L ⁻¹)
DBNPG	210	$A = 2,9 \times 10^4 C + 7,4 \times 10^4$	$R^2 = 0,9967$	0,565	1,883
TBBPA	275	$A = 2,5 \times 10^3 C + 8,4 \times 10^3$	$R^2 = 0,9821$	1,795	5,985
BPA	275	$A = 2,4 \times 10^5 C + 9,8 \times 10^5$	$R^2 = 0,9966$	0,185	0,617
HBCD	210	$A = 5,1 \times 10^3 C - 8,6 \times 10^3$	$R^2 = 0,9564$	0,015	0,052
TPhP	260	$A = 2,2 \times 10^2 C + 6,8 \times 10^2$	$R^2 = 0,9659$	0,056	0,188

Para alguns destes compostos, apesar de poderem ser analisados por outras técnicas analíticas com boas linearidades, a metodologia desenvolvida mostrou-se bastante robusta, versátil e prática para a monitorização dos RC nos reactores biológicos objecto deste estudo. Assim, praticamente todos os compostos apresentaram uma boa linearidade para os comprimentos de onda seleccionados. No caso do TCEP usou-se o comprimento de onda de 210 nm em HPLC, no entanto a sua detecção não foi bem sucedida, uma vez que este composto é mais adequado para ser analisado por GC-MS [13,15, 22] ou por técnica de derivatização para HPLC devendo a metodologia analítica ser optimizada em trabalho futuro. O TBBPA também foi analisado por LC-APCI-MS-MS e apresentou uma boa linearidade e detectabilidade tal como a determinação por GC-MS [15].

3.2 Aclimatização da biomassa

A biomassa foi aclimatizada a uma temperatura média nos reactores descontínuos, nas 16 semanas de funcionamento, de 32 °C (temperatura ambiente no Verão e com aquecimento natural do funcionamento da placa de agitação) e o pH foi mantido a 7,02 em todos os reactores. Segundo a recta de calibração da absorvência versus concentração de SSV, Tabela 3.2, calculou-se a concentração da biomassa no final de cada semana, permitindo avaliar a sua evolução, Figura 3.2.

Tabela 3.2 – Comprimento de onda, linearidade coeficientes de correlação para biomassa

Composto	Comprimento de onda (nm)	Linearidade (C biomassa em mg SSV.L ⁻¹)	Coef. Correlação
Biomassa	610	$A = 9,0 \times 10^{-4}C + 9,7 \times 10^{-4}$	$R^2 = 0,9982$

Na Figura 3.1 verifica-se uma oscilação na concentração da biomassa nas primeiras semanas. A partir da quarta semana verifica-se um aumento da concentração da biomassa, excepto no reactor com DBNPG, cujo aumento significativo só se começa a verificar a partir da sétima semana. A partir da terceira semana o reactor com TPhP teve um aumento considerável de biomassa, mantendo-se em crescimento até ao final dos ensaios.

No reactor com HBCD verifica-se um decréscimo de biomassa na semana 12 que teve origem num derrame ocorrido aquando a mudança do meio. No entanto verifica-se que o crescimento foi restabelecido nas semanas seguintes.

No geral, verifica-se que foi a partir da oitava semana que o crescimento da biomassa, em todos os reactores, teve tendência a manter-se estável.

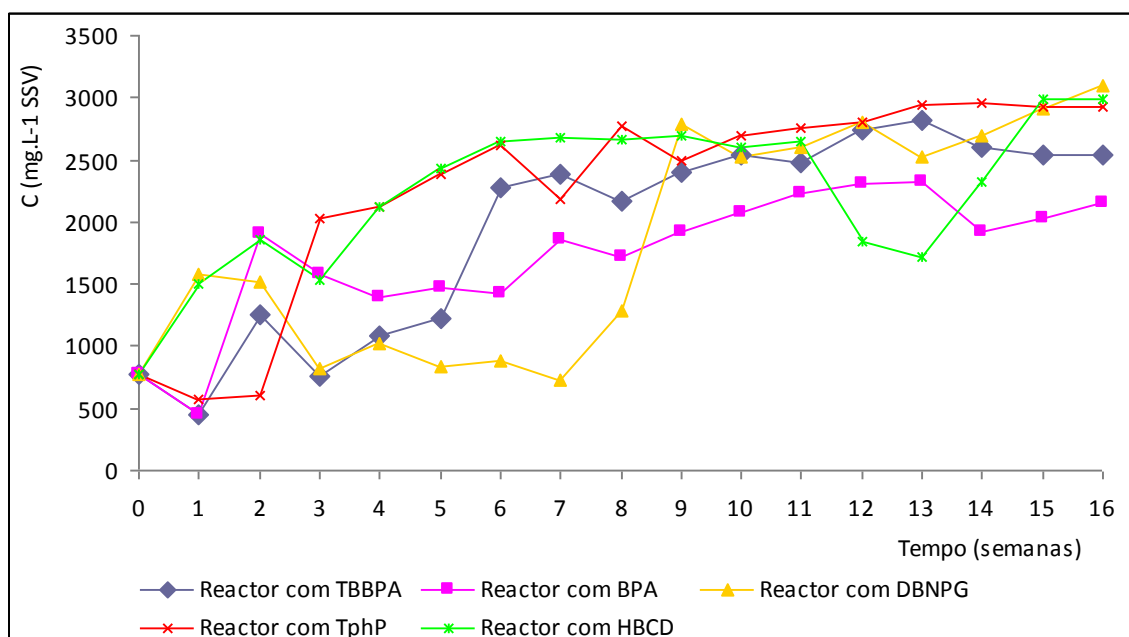


Figura 3.1 – Crescimento da biomassa nos reactores alimentados com os RC

3.3 Biodegradabilidade

A biodegradabilidade dos RC foi determinada pela análise de ciclos consecutivos de 6 dias de monitorização dos reactores em termos da concentração do RC, Amónia, pH e oxigénio dissolvido (OD).

Os reactores funcionaram em regime aeróbio, mas notaram-se variações significativas nas concentrações de OD ao longo do tempo. As Figuras seguintes representam a variação da concentração dos RC, durante 3 ciclos, ou seja das últimas 3 semanas (6 dias) com resultados diários de funcionamento, dos reactores com valores de concentração diários e sob diferentes concentrações de OD.

A concentração de OD nos reactores não foi constante, havendo alternância entre condições aeróbias e anóxicas. A concentração de OD influencia a cinética de remoção destes compostos, verificando-se que as condições aeróbias favorecem a sua degradação.

Na Figura 3.2 verifica-se que a concentração do composto DBNPG vai baixando até ao 3º dia a partir do qual se torna praticamente indetectável.

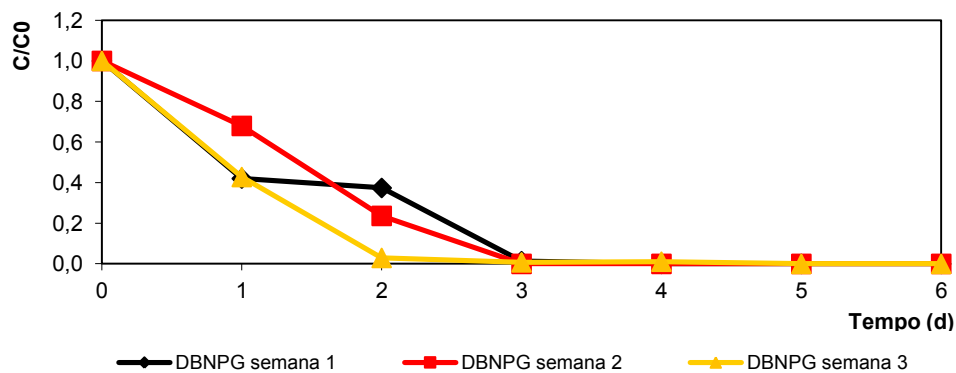


Figura 3.2 – Concentração de DBNPG durante 3 semanas

O comportamento do TBBPA, Figura 3.3, é semelhante ao do composto DBNPG apresentando também concentrações indetectáveis ao 3º dia.

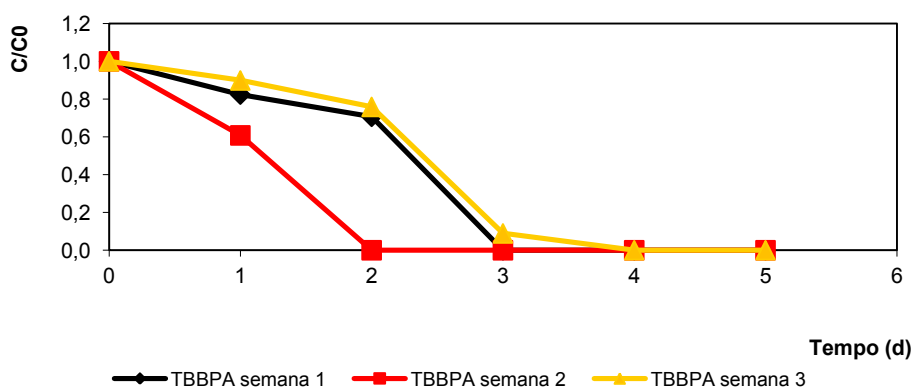


Figura 3.3 – Concentração de TBBPA durante 3 semanas

O BPA, Figura 3.4, apresenta um comportamento semelhante aos anteriores no entanto, através do declive das rectas, verifica-se que a velocidade de remoção foi mais lenta. Após 5º dia, as concentrações tornaram-se praticamente indetectáveis.

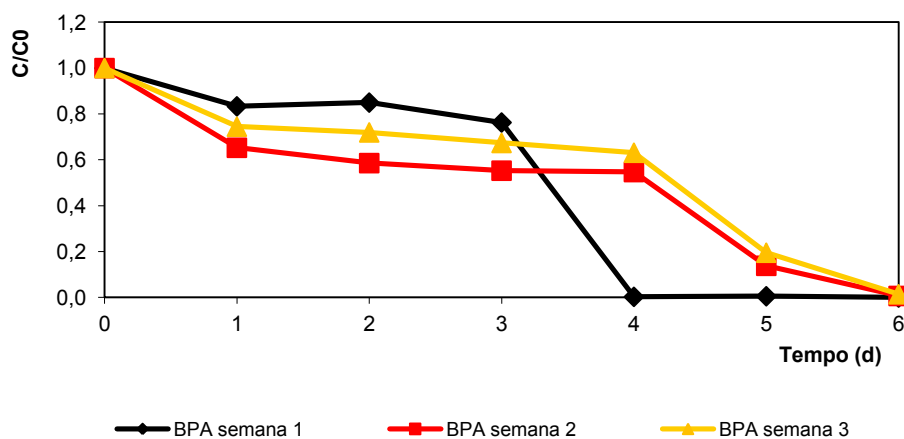


Figura 3.4 – Concentração de BPA durante 3 semanas

Desta forma, verificou-se que o DBNPG, TBBPA e o BPA são removidos na totalidade por via biológica. Ronen et al. sugerem que o TBBPA possa ser completamente mineralizado se existir alternância das condições anaeróbias e aeróbias parecendo haver uma deshalogenação em meio redutor levando ao aparecimento do BPA. O BPA seria então removido em meio aeróbio tal como sugerem resultados deste trabalho [14,15,33].

Quanto aos compostos HBCD e TPhP, Figura 3.5 e Figura 3.6, apresentaram um comportamento semelhante entre si, em que a concentração praticamente se mantém, havendo mesmo dias em que parece aumentar.

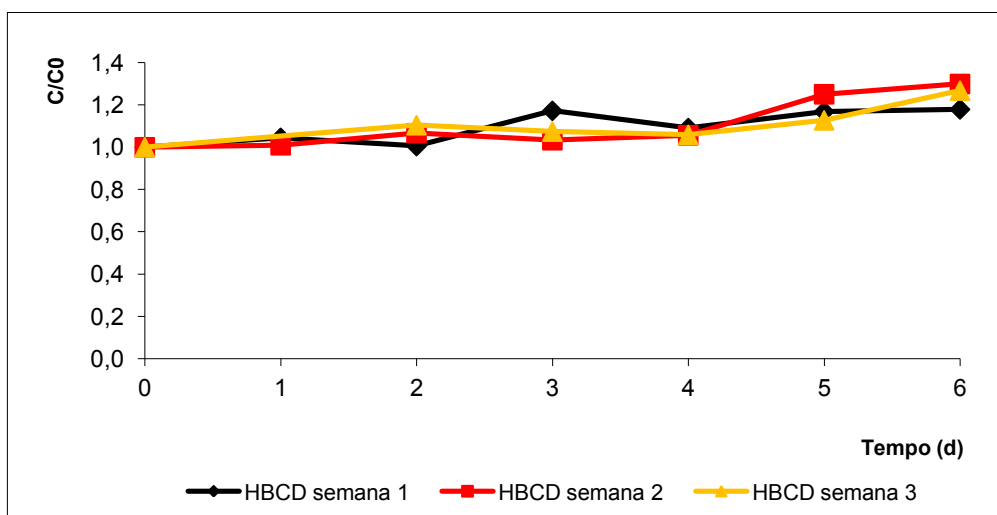


Figura 3.5 – Concentração de HBCD durante 3 semanas

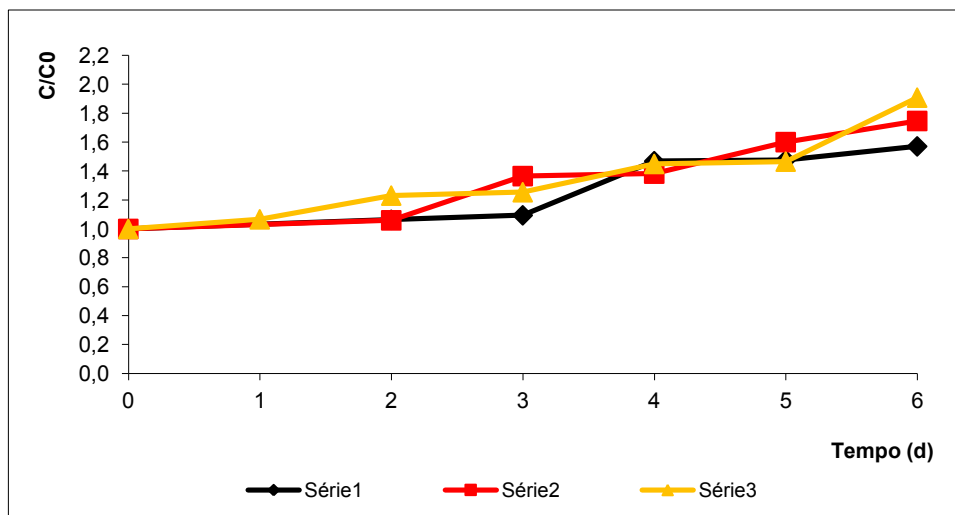


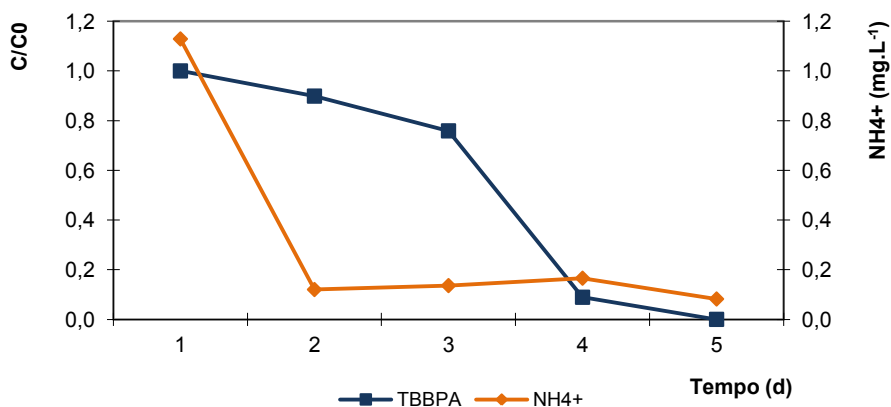
Figura 3.6 – Concentração de TPhP durante 3 semanas

De forma a comparar os valores obtidos para o OD e pH, concentração de RC e concentração de azoto e verificar a biodegradabilidade dos compostos, foram estudados aqueles cuja concentração atingiu valores próximos de zero, nas semanas em análise, nomeadamente o TBBPA, o BPA e o DBNPG. Desta forma apresentam-se as figuras para TBBPA, Figura 3.7 a) e b); para BPA, Figura 3.8 a) e b) e para DBNPG, Figura 3.9 a) e b).

No reactor com TBBPA, Figura 3.7 a) e b), verifica-se que a concentração de azoto desceu para valores próximos de zero, assim com a concentração do composto TBBPA que, apesar de uma descida gradual, apresentou uma remoção de 100% ao quinto dia.

Os valores de pH e oxigénio dissolvido também decaíram, tendo-se verificado uma subida acentuada no valor de oxigénio até ao terceiro dia e um valor de pH praticamente constante. Parece indicar que a degradação do composto é acompanhada por uma descida de pH e oxigénio dissolvido, devido a actividade da biomassa durante a degradação.

a)



b)

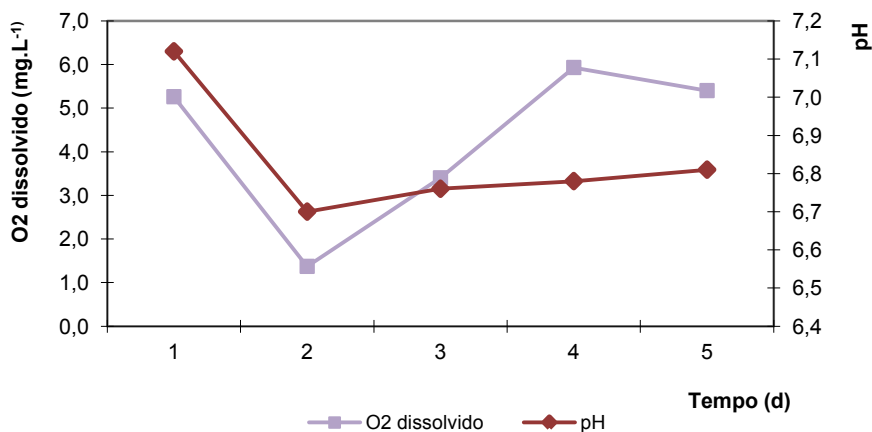
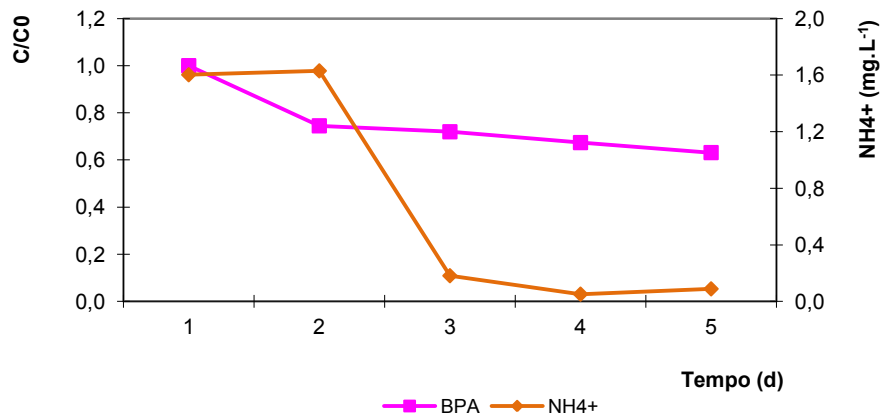


Figura 3.7 – (a) Concentração do TBBPA e de amónia no reactor durante 1 ciclo de 5 dias e (b) OD e pH no mesmo reactor durante mesmo ciclo

No reactor em que a biomassa estava em contacto com BPA, Figura 3.8, verificou-se uma remoção de 80% do BPA e uma remoção completa de azoto. Os resultados podem indicar uma inibição na remoção de BPA devido aos valores baixos de azoto. Verificou-se neste caso um aumento de pH e valores mais elevados de OD.

a)



b)

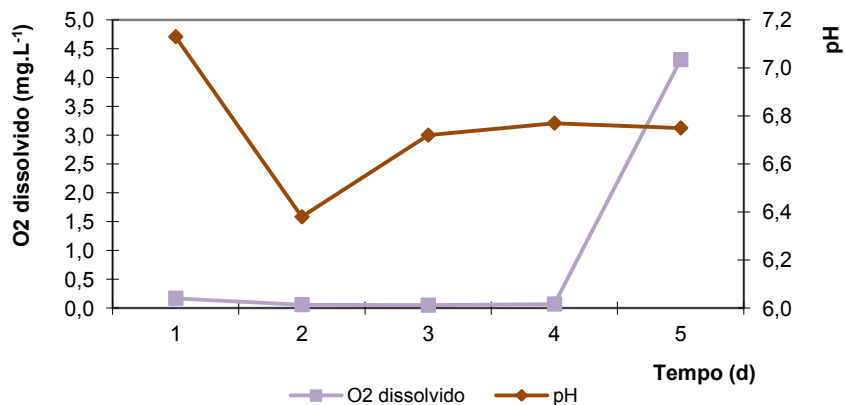
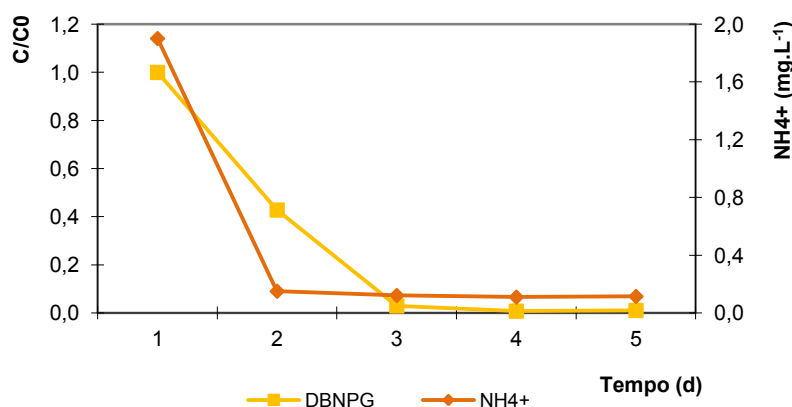


Figura 3.8 – (a) Concentração do BPA e de amónia no reactor durante 1 ciclo de 5 dias e (b) OD e pH no mesmo reactor durante mesmo ciclo

No reactor com DBNPG, Figura 3.9, pode observar-se que, igualmente como nos outros reactores, a concentração de azoto desce para valores próximos de zero ao primeiro dia e a concentração do composto ao segundo dia. Esta última mantém-se indetectável até ao final do ciclo. Neste reactor as concentrações de OD e pH desceram ligeiramente, mantendo-se em valores próximos de 7 mg.L⁻¹ e 6,7 respectivamente.

a)



b)

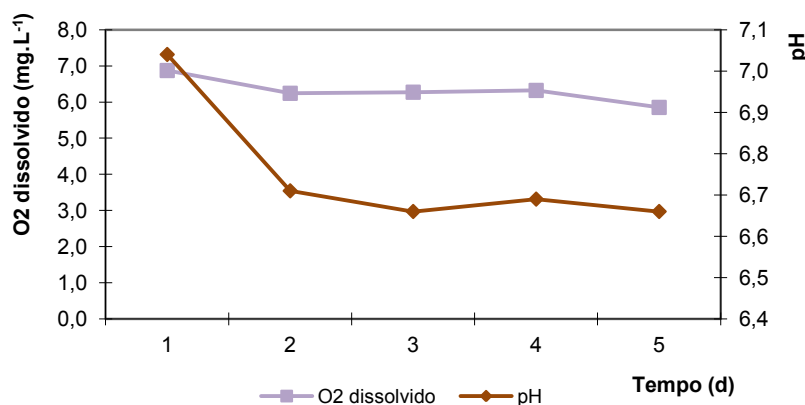


Figura 3.9 - (a) Concentração do DBNPG e de amónia no reactor durante ciclo de 5 dias e (b) OD e pH no mesmo reactor durante mesmo ciclo

O azoto está naturalmente presente nas águas residuais na forma de azoto orgânico (proteínas) e amónia. À medida que o tempo vai passando o azoto orgânico é gradualmente convertido em amónia e se ocorrerem condições aeróbias, esta é convertida em nitritos e nitratos. Desta forma a determinação da concentração de azoto nos reactores indicam-nos a presença de actividade bacteriana. Nestes ensaios, o azoto foi introduzido nos reactores através do meio mineral. Pode-se verificar que a sua concentração desceu no primeiro dia em quase todos os reactores e se manteve em valores baixos, próximos de zero. Este facto indica-nos a presença de bactérias nitrificantes.

A determinação da concentração de azoto foi efectuada segundo procedimento descrito em 2.2.3, de onde se obteve os resultados constantes na Tabela 2.1 e cuja determinação da concentração nas amostras foi obtida com recurso à recta de calibração.

3.4 Cinética de biodegradação

Após a aclimatização da biomassa e a estabilidade da sua concentração nos reactores, foram seleccionados os compostos em que se observou biodegradabilidade, nomeadamente o TBBPA, BPA e DBNPG para determinar os parâmetros cinéticos. Assim, pelo comportamento apresentado nos resultados experimentais, a cinética segue um modelo de Modelo Lagergren (Pseudo-primeira ordem, Eq 2.4.5), Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Parâmetros cinéticos

Composto	Declive	X _{ss} (mg.L ⁻¹)	K _d (L.Kg ⁻¹)	K _{bio} (L.g ⁻¹ d ⁻¹)	T _½ vida (d)
TBBPA	-0,85	2533	6,18 [34]	0,34	2,03
BPA	-0,32	2219	6,48 [35]	0,14	4,89
DBNPG	- 1,24	3098	-- *	0,001K _d +0,401	ln2/K _{bio}

* não foram encontradas referências

O valor de 6,18 L.Kg⁻¹ de K_d do composto TBBPA foi obtido num estudo para determinar o efeito deste composto na larva de uma espécie de mosquito. Foi realizado em amostras de água provenientes de reactores com sedimentos com diferentes concentrações de carbono orgânico. Determinou-se o valor de K_d para um valor baixo de carbono orgânico, um valor médio e um valor alto, sendo o valor apresentado na tabela resultado da média destes [34].

O valor de 6,48 L.Kg⁻¹ de K_d do composto BPA foi determinado num estudo com sedimentos marinhos com diferentes concentrações de carbono orgânico. O valor apresentado na tabela resulta na média dos valores obtidos no estudo [35]. Desta forma, utilizando o valores de K_d, determinou-se uma K_{bio} para o composto TBBPA de 0,34 L.g⁻¹d⁻¹ com um tempo de meia vida de 2,0 d e para o composto BPA 0,14 L.g⁻¹d⁻¹ com um tempo de meia vida de 4,9 d.

Comparando com a literatura [34, 35] a degradação aeróbia e anaeróbia do TBBPA em solos apresentou um tempo de meia via entre 28 - 67d. TBBPA também apresentou fotodegradação quando em solução (em água) variando o tempo de meia vida entre 16 minutos a 6 d. Quanto ao BPA, alguns estudos [59,60,61,62] determinaram um tempo de meia vida entre 1-4 dias, em condições aeróbias.

Quanto ao composto DBNPG, não foram encontradas referências na bibliografia consultada para o coeficiente de sorção (K_d), pelo que a K_{bio} e o tempo de meia vida serão determinados em função de K_d. No entanto, tendo em consideração a bibliografia

consultada [26,27,28,31], considera-se K_d mínimo pois como o processo de sorção é um processo mais rápido que a biodegradação, a remoção que se observa deve-se então a processo de biodegradação porque a capacidade para a sorção satura rapidamente.

O mecanismo de remoção dos RC pode ser por via biológica, por volatilização ou por adsorção. Os valores elevados de K_{ow} justificam que grande parte dos RC estudados apresentam elevada capacidade de adsorção, por exemplo o composto TBBPA, apresenta $\log K_{ow}$ de 8,0 (Tabela 1.5). No entanto, apesar dos valores de K_{ow} serem elevados, nada garante que a biomassa tenha capacidade para adsorver os compostos já que o processo de adsorção traduz-se sempre num equilíbrio entre adsorção e desorção.

Se a biomassa não teve capacidade para remover biologicamente por processo que tenha conduzido à completa mineralização do RC ou que o tenha transformado noutro composto ou a adsorção se ocorreu, foi reversível, não se pode concluir qualquer efeito da remoção por esta via.

Quanto ao composto DBNPG, a pressão de vapor a 25°C é de $2,0 \times 10^{-3}$ Pa logo susceptível de se volatilizar á temperatura média a que os reactores se mantiveram (32°C). Desta forma, um mecanismo possível para redução da concentração deste composto poderá ter sido a volatilização e em menor efeito a adsorção, no entanto esta via necessitaria de estudo complementar, já que não foi objecto do presente estudo.

3.5 Previsíveis caminhos de biodegradação dos RC

Com base na simulação do software PPS, foi possível prever as diferentes transformações químicas ocorridas biologicamente em meio aeróbio e confirmar que na realidade se formam compostos de maior biodegradabilidade para o composto BPA e para os compostos TBBPA e DBNPG. Nas figuras seguintes estão apresentadas as previsões dos caminhos de biodegradação dos compostos fornecidas pelo software, tendo sido escolhido apenas o caminho mais favorável.

Desta forma, para o composto TBBPA, de estrutura mais complexa, são previstos vários caminhos de biodegradação mas apresentando reduzida probabilidade de ocorrerem, no entanto, seguindo o caminho mais favorável, a biodegradação (Figura 3.10) leva ao aparecimento de ácidos carboxílicos de cadeia complexa como é o caso do ácido (2E)-3,5-dibromo-2-[2-[2,4-dibromo-3-hidroxifenil]propano-2-il]-4-oxohex-2-enodioico.

Desta forma, surgem ainda outros caminhos para a biodegradação destes metabolitos, até a

mineralização do composto, apresentando a formação de outros metabolitos, incluindo o BPA.

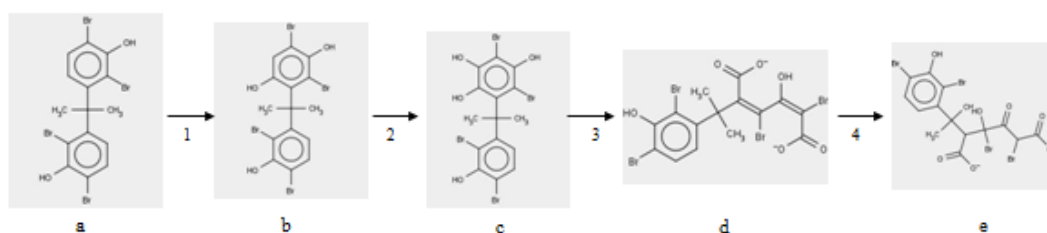


Figura 3.10 - Caminho de biodegradação previsto para o composto TBBPA

Legenda: a – TBBPA; b, c, d – metabolitos intermediários; e - ácido (2E)-3,5-dibromo-2-[2-[2,4-dibromo-3-hidroxifenil]propano-2-il]-4-oxohex-2-enodioico

Para o BPA prevê-se que a biodegradação, em condições aeróbias, provavelmente ocorra através de 5 reacções (Figura 3.11) dando origem a 3 ácidos carboxílicos (ácido propanodioico ou malónico, ácido butanodioico ou succínico e ácido 2-oxopropanoico ou pirúvico). Sendo que a completa mineralização destes ainda passará pelo aparecimento dos ácidos oxálico, fôrmico, láctico, acético ou álcool etílico e dióxido de carbono, consoante os microrganismos envolvidos.

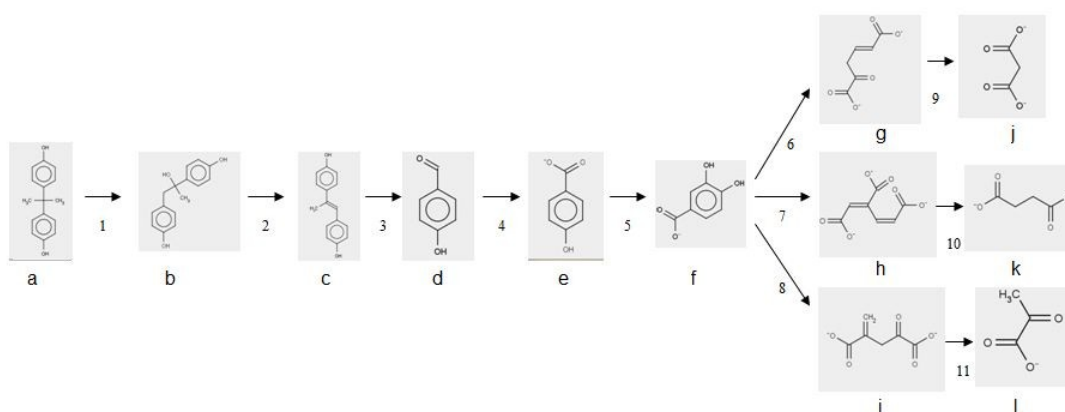


Figura 3.11 - Caminho de biodegradação previsto para o composto BPA

Legenda: a – BPA, b, c, d, e, f, g, h, i – metabolitos intermediários; j– ácido malónico; k– ácido succínico ; l – ácido pirúvico

Para o composto DBNPG, também são previstos vários caminhos de biodegradação, sendo que apenas um é apresentado como o mais favorável para condições aeróbias (Figura 3.12). Mais uma vez, á semelhança do composto TBBPA, as reacções

envolvidas levam ao aparecimento de vários metabolitos até ao aparecimento do ácido carboxílico propanodioico.

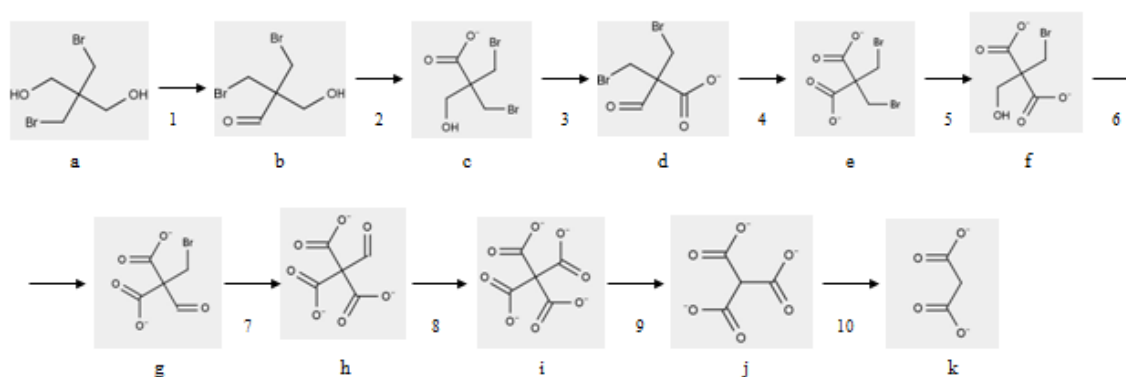


Figura 3.12 - Caminho de biodegradação previsto para o composto DBNPG

Legenda: a – DBNPG, b, c, d, e, f, g, h, i, j – metabolitos intermediários; k – ácido malónico;

Desta forma, pelas previsões dos caminhos de biodegradação dos compostos fornecidos pelo software, verifica-se que, para ocorrer a mineralização dos compostos RC, vários outros compostos são produzidos. Por exemplo, na biodegradação do TBBPA prevê-se a formação de BPA e efectivamente, nos ensaios realizados pelo método HPLC-UV, verificou-se a formação de um metabolito à medida que a concentração de TBBPA ia diminuindo durante o ciclo. Ao comparar o tempo de retenção do BPA com o do metabolito, verificou-se que são semelhantes, levando a crer que seja o mesmo composto. Assim, a formação deste metabolito aquando da degradação do TBBPA vem aumentar a sua concentração no meio ambiente podendo permanecer no sistema durante certo período de tempo, elevando o grau de toxicidade. Para os outros compostos (BPA e DBNPG) não foram detectados, pela técnica HPLC-UV, formação de metabolitos.

Na tabela 3.4 estão apresentadas as propriedades dos metabolitos, incluindo a dose letal para provocar a morte a 50% de cobaias em estudo (DL_{50}).

Tabela 3.4 – Propriedades dos metabolitos gerados na biodegradação dos RC em estudo

Propriedades	Ácido Pirúvico	Ácido Malónico	Ácido Succínico	Ácido Propanoico
Fórmula molecular	C ₃ H ₄ O ₃	C ₃ H ₄ O ₄	C ₄ H ₆ O ₄	C ₃ H ₆ O ₂
Peso molecular (g.mol ⁻¹)	88,06	104,06	118,09	74,09
Densidade (g.cm ³)	1,25	1,62	1,56	0,99
Ponto de fusão (°C)	11,80	132 - 135	185-190	-22
Ponto de ebulição (°C)	165	157	235	141
Solubilidade a 20°C (g.L ⁻¹)	1000	735	58	100
Pressão de vapor a 25°C (mm Hg)	0,97	0,02	0,02	4,23
LogKow	- 1,24	-0,91	-0,59	0,19
DL ₅₀ Rato (mg.kg ⁻¹)	3533	1310	2260	2600
Via dérmica (VD); Oral (O)	(VD)	(O)	(O)	(O)
Classificação	C - Corrosivo	Xn - Perigoso	Xi - Irritante	C - Corrosivo
Ref ^a	[36]	[37]	[38]	[39]

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económicos (OCDE) define a DL₅₀ como "a dose única, calculada estatisticamente, de uma substância capaz de provocar a morte em 50% de animais de experiência". Não sendo uma constante, corresponde a um termo estatístico que descreve uma resposta letal a um composto de uma determinada população e sob condições experimentais bem precisas.

A determinação da letalidade providencia uma medida de comparação entre substâncias tóxicas cujo mecanismo de acção possa ser marcadamente diferente. Contudo, este parâmetro não pode ser encarado exclusivamente como o elemento absoluto que caracteriza a toxicidade aguda, pois a letalidade constitui apenas um dos muitos índices de avaliação de toxicidade aguda que se podem determinar em qualquer situação de risco de exposição [40].

Da tabela 3.5 verifica-se que os metabolitos formados, segundo os seus valores de DL₅₀, apresentam um grau de toxicidade 4 (ligeiramente tóxicos), sendo necessário aproximadamente um volume de 600 ml para causar a morte ao Homem.

Tabela 3.5 - Classes de toxicidade: Escala de Hodge e Sterner

		Via de administração			
		Oral DL ₅₀	Inalação CL ₅₀	Dérmica DL ₅₀	
Grau de toxicidade	Termo usado	(única dose em ratos) mg/kg	(exposição de ratos durante 4 h) ppm	(única aplicação na pele de coelhos) mg/Kg	Provável dose letal para Homem
1	Extremamente tóxico	≤ 1	≤ 10	≤ 5	1 gota (1 grão)
2	Muito tóxico	1 - 50	10 - 100	5 - 43	4 ml
3	Moderadamente tóxico	50 - 500	100 - 1000	44 - 340	30 ml
4	Ligeiramente tóxico	500 - 5000	1000 - 10000	350 - 2810	600 ml
5	Praticamente não-tóxico	5000 - 15000	10000 - 100000	2820 - 22590	1000 ml
6	Praticamente inofensivo	≥ 15000	100000	≥ 22600	1000 ml

Fonte: [40]

Capítulo 4 – Conclusão

Neste estudo foi possível verificar as condições favoráveis à monitorização dos compostos RC por HPLC-UV e obter boas relações lineares com esta técnica analítica. Verificou-se ainda que para alguns dos compostos, nomeadamente o TCEP não foi possível a sua detecção por esta técnica, confirmando-se o que se apresenta na literatura que refere que este composto é mais adequado para ser analisado por GC-MS [10,23]. Quanto aos compostos TPhP e HBCD só foi possível a sua detecção com outro tipo de detector que não o de UV, mais precisamente o detector DAD, tendo-se verificado que a concentração destes compostos se manteve ao longo do ciclo em análise.

Verificou-se ainda que aquando da renovação dos meios de crescimento a concentração de azoto desceu consideravelmente evidenciando a actividade da biomassa e que alguns compostos apresentaram maior e menor variação da sua concentração em presença de diferentes teores de oxigénio dissolvido.

Foi evidente também a formação de um metabolito no reactor com o composto TBBPA e, comparando o tempo de retenção do composto BPA com o deste metabolito formado, indica realmente ser o BPA. Também, *Ronen et al.* (2000), verificaram a formação de BPA como metabolito da biodegradação do TBBPA [15].

Para os compostos que apresentaram biodegradabilidade, foram determinados os parâmetros cinéticos, baseados num modelo de pseudo-primeira (modelo de Lagergren). Desta forma, comparando os resultados obtidos no presente estudo com os da literatura consultada observa-se que os mesmos são convergentes.

De forma a prever o mecanismo de degradação dos compostos, foi realizada com apoio de software, a previsão dos possíveis caminhos de degradação e identificados os metabolitos daí provenientes.

Verificou-se ainda que, dos compostos que apresentaram biodegradabilidade, os possíveis metabolitos finais são ácidos carboxílicos cujo grau de toxicidade é ligeiro, no entanto não se previu as quantidades formadas desses metabolitos.

Capítulo 5 - Trabalho futuro

De forma a continuar o estudo da biodegradabilidade dos compostos RC, propõe-se a realização de outros ensaios, nomeadamente:

- verificação da adsorção dos compostos á biomassa, utilizando-se uma técnica de extracção dos compostos da biomassa, por exemplo, ultrasons;
- verificação da volatilidade dos compostos onde se deverá utilizar as mesmas condições mas na ausência de biomassa;
- caracterização da biodeversidade da biomassa de cada um dos reactores através de técnicas microbiológicas de forma a identificar as bactérias envolvidas;
- verificação do mecanismo de degradação previsto pelo software;
- identificação e quantificação de todos os metabolitos formados aquando da biodegradação dos compostos.

Bibliografia

- [1] Hindersinn, RR., *Historical aspects of polymer fire retardance*. In: Nelson GL, ed. Fire and polymers hazard identification and prevention. Am Chem Soc Symp, 415, New York, 1990.
- [2] <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc192.htm> (acesso em 02/01/2011)
- [3] Segev, O.; Kushmaro, A.; Brenner, A., *Environmental Impact of Flame Retardants (Persistence and Biodegradability)*, Int. J. Environ. Res. Public Health, 6, 478-491, 2009
- [4] <http://www.cefic-efra.com> (acesso em 22.02.2010)
- [5] Watanabe, I.; Sakai, S. I., *Environmental release and behavior of brominated flame retardants*, Environ. Int., 29, 665–682, 2003
- [6] Halden, R. U., *Plastics and Health Risks, Annual Review of Public Health*, 31, 19.1–19.16, 2010
- [7] http://www.uncrd.or.jp/env/spc/docs/1st_3r_forum_presentation/Session22f2_Sakai.pdf
Inaugural Meeting of the Regional 3R Forum in Asia, Tokyo, 091111 (acesso em 3/2011)
- [8] <http://www.aguasdosoado.pt> (acesso em 27.02.2011)
- [9] Haggblom M.M.; Bossert, I.D.: *Dehalogenation – Microbial processes and environmental applications*; Kluwer Academic Publishers: Norwell, MA, USA, 2003.
- [10] Chaudhry, G.R.; Chapalamadugu, S., *Biodegradation of Halogenated Organic Compounds*. Microbiol. Rev, 55, 59-79, 1991
- [11] Smidt, H.; De Vos, W.M. *Anaerobic microbial dehalogenation*. Annu. Rev. Microbiol, 58, 43-73, 2004
- [12] Janssen, B.D.; Oppentocht, J.E.; Poelarends, G.J., *Microbial dehalogenation*. Curr. Opin. Biotechnol, 12, 254-258, 2001
- [13] Segev, O.; Abeliovich, A.; Kushmaro, A., *Biodegradation of dibromoneopentyl glycol by bacterial consortium*, Chemosphere, 68, 958-964, 2007
- [14] Brenner, A.; Mukmenev, I.; Abeliovich, A.; Kushmaro, A., *Biodegradability of tetrabromobisphenol A and tribromophenol by activated sludge*, Ecotoxicology, 15, 399–402, 2006

- [15] Ronen, Z.; Abeliovich, A., *Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of Tetrabromobisphenol A*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2372-2377, 2000
- [16] Davis, J.W.; Gonsior, S.; Marty, G.; Ariano, J. *The transformation of hexabromocyclododecane in aerobic and anaerobic soils and aquatic sediments*. *Water Res.* 39, 1075-1084, 2005
- [17] Davis, J.W.; Gonsior, S.; Markham, D.A.; Friederich, U.; Hunziker, R.W.; Ariano, J., *Biodegradation and product identification of [14C]hexabromocyclododecane in wastewater sludge and freshwater aquatic sediments*. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 5395-5401, 2006
- [18] Rayne, S.; Ikonomou, M.G.; MacMurray, D.W., *Anaerobic microbial and photochemical degradation of 4,4'-dibromodiphenyl ether*. *Water Res.*, 37, 551-560, 2003
- [19] Gerecke, A.C.; Giger, W.; Hartmann, P.C.; Heeb, N.V.; Kohler, H.P.E.; Schmid, P.; Zennegg, M.; Kohler, M., *Anaerobic degradation of brominated flame retardants in sewage sludge*. *Chemosphere*, 64, 311-317, 2006
- [20] Tokarz, J.A. III.; Ahn, M.Y.; Leng, J.; Filley, T.R.; Nies, L., *Reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers in anaerobic sediment and a biomimetic system*. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 1157-1164, 2008
- [21] Zhou, J.; Jiang, W.; Ding, J.; Zhang, X.; Gao, S., *Effect of Tween 80 and β -cyclodextrin on degradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) by White Rot Fungi*. *Chemosphere*, 70, 172-177, 2007
- [22] Gerecke, A.C.; Hartmann, P.C.; Heeb, N.V.; Kohler, H.E.; Giger, W.; Schmid, P.; Zennegg, M.; Kohler, M., *Anaerobic degradation of decabromodiphenyl ether*, *Environ. Sci. Technol.*, 39, 1078-1083, 2005
- [23] Lopez, M.G.; Rodríguez, I.; Cela, R.; Kroening, K.K.; Caruso, J.A., *Determination of organophosphate flame retardants and plasticizers in sediment samples using microwave-assisted extraction and gas chromatography with inductive couple plasma mass spectrometry*, *Talanta*, 79, 824-829, 2009
- [24] A.P.H.A., A.W.W.A., W.E.F., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edition*, APHA (Eds), Washington D.C., USA, 1998

- [25] Barreiros, L. Nogales; B., Ferreira; A.C.S., Pieper, D.H., Reis, M.A.M., Nunes, O.C., *A novel pathway for mineralization of thiocarbamate herbicide molinate by a defined bacterial mixed culture*, *Environmental Microbiology* 5 (10), 944-953, 2003
- [26] Soeiro, R., Dissertação de tese mestrado em Biotecnologia com *Estudo do Tratamento Biológico seguido de Fotólise para Remoção de Xenobióticos de Águas Residuais*, DQ, FCT/UNL, 8-12, 2009
- [27] Joss, A.; E. Keller, *Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment*, *Water Res* 39(14), 3139-52, 2005
- [28] Metcalfe, C. D.; Miao, X. S., *Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada*, *Environ Toxicol Chem* 22(12), 2881-9, 2003
- [29] Kreuzinger, N., *Review On The Assessment Of The Removal Efficiency Of Wastewater Treatment Plants For Selected Xenobiotics in Dangerous Pollutants (Xenobiotics) in Urban Water Cycle*, Springer Netherlands. 4: 227-244, 2008
- [30] Caliman, F. A.; Gavrilescu, M., *Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment - A Review*, *Clean - Soil, Air, Water* 37(4-5), 277-303, 2009
- [31] Jones-Lepp, T. L.; Stevens, R., *Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation*, *Anal Bioanal Chem* 387(4): 1173-83, 2007
- [32] Gao J; Ellis LB; Wackett LP, *The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: improving public access*, Laboratory Medicine and Pathology, University of Minnesota, Minneapolis, USA, Jan 2010. (Acesso em 3/2011)
- [33] Arbeli, Z; Ronen, Z; Díaz-Báez, M. C., *Reductive dehalogenation of tetrabromobisphenol-A by sediment from a contaminated ephemeral streambed and an enrichment culture*, *Chemosphere*, 64, 1472–1478, 2006
- [34] Albemarle Corporation, IUCLID data set 201-16155, Florida, USA, 2005
- [35] Xiangrong, X; Wang, Y.; Xiaoyan, L., *Sorption behavior of bisphenol A on marine sediments*, *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 43 (3), 239 – 246, 2008

- [36] <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1034261.html> (acesso em 4/2011)
- [37] <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1030881.html> (acesso em 4/2011)
- [38] <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1040431.html>, (acesso em 4/2011)
- [39] <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1001661.html>, (acesso em 4/2011)
- [40] Canadian Centre for Occupational Health and Safety, <http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>, (acesso em 2/2011)
- [41] Steinmetz, R.; Mitchner, N.A.; Grant, A.; Allen, D.L.; Bigsby R.M.; Ben-Jonathan N., *The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract*. *Endocrinology*, 139, 2741-2747, 1998
- [42] Welshons, W.V.; Nagel, S.C.; Vom Saal, F.S. *Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure*. *Endocrinology*, 147, S56-S69, 2006
- [43] Agencia Portuguesa do Ambiente, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, *Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo (PNIPOP)*, Janeiro 2010
- [44] Hoh E.; Hites RA., *Brominated flame retardants in the atmosphere of the east-central United States*, *Environ Sci Technol* 39(20):7794-7802, 2005
- [45] Harrad, S.; Ibarra, C.; Abdallah, M.A.; Boon, R.; Neels, H.; Covaci, A., *Concentrations of brominated flame retardants in dust from United Kingdom cars, homes, and offices: Causes of variability and implications for human exposure*. *Environ. Int.*, 34, 1170–1175, 2008
- [46] Abdallah, M.A.E; Harrad, S.; Ibarra, C.; Diamond, M.; Melmymuk, L.; Robson, M.; Covaci, A., *Hexabromocyclododecanes in indoor dust from Canada, the United Kingdom, and the United States*. *Environ. Sci. Technol.* 42:459-464, 2008
- [47] Stapleton, H. M.; Allen, J. A.; Kelly, S. M.; Konstantinov, A.; Klosterhaus, S.; Watkins, D.; Mcclean, M. D.; Webster, T. F., *Alternate and new brominated flame retardants detected in U. S. house dust*, *Environ. Sci. Technol.*, 42, 6910–6916, 2008
- [48] Verreault, J.; Gebbink, W. A.; Gauthier, L. T.; Gabrielsen, G. W.; Letcher, R. J., *Brominated flame retardants in glaucous gulls from the Norwegian Arctic: more than just an issue of polybrominated diphenyl ether*, *Environ. Sci. Technol.*, 41, 4925–4931, 2007

- [49] Eljarrat, E.; Guerra, P.; Martinez, E.; Farre, M.; Alvarez, J. G. Lopez-Teijon, M.; Barcelo, D., *Hexabromocyclododecane in human breast milk: levels and enantiomeric patterns*, Environ. Sci. Technol., 43, 1940–1946, 2009
- [50] Knutsen, H.K.; Kvalem, H.E.; Thomsen, C.; Froshaug, M.; Haugen, M.; Becher, G., *Dietary exposure to brominated flame retardants correlates with male blood levels in a selected group of Norwegians with a wide range of seafood consumption*, MoI Nutr Food Res 52(2),217-227, 2008
- [51] Lacorte, Silvia; Guillamon, Miriam; Martinez, Elena; Viana, Paula, *Occurrence and Specific Congener Profile of 40 Polybrominated Diphenyl Ethers in River and Coastal Sediments from Portugal*, Environmental Science and Technology, 37(5), 892-898, 2003
- [52] Klamer, H.J.C.; Leonards, P.E.G.; Lamoree, M.H.; Villerius, L.A.; Akerman, J.E.; Bakker, J.F., *A chemical and toxicological profile of Dutch North Sea surface sediments*, Chemosphere, 58, 1579-1587, 2005
- [53] Zegers, B.N.; Lewis, W.E.; Booij, K.; Smittenberg, R.H.; Boer, W.; De Boer, J.; Boon, J.P., *Levels of polybrominated diphenyl ether flame retardants in sediment cores from Western Europe*. Environmental Science & Technology, 37, 3803-3807, 2003
- [54] Fatin S.; Christina, W. T.; Diana, S. A., *Determination of potential sources of PCBs and PBDEs in sediments of the Niagara River*, Environmental Pollution, 139 (3), 489-497, 2006
- [55] Letcher, R.J.; Gebbink, W.A.; Sonne, C.; Dietz, R.; McKinney, M.A.; Born, E.W., *Bioaccumulation and biotransformation of brominated and chlorinated contaminants and their Metabolites in ringed seals (Pusa hispida) and polar bears (Ursus maritimus) from East Greenland*. Environ. Internat. 35, 1118-1124, 2009
- [56] Vives, I.; Canuti E.; Castro-Jiménez, J.; Christoph, E.H.; Eisenreich, S.J.; Hanke, G.; Huber, T.; Mariani, G.; Mueller, A.; Skejo, H.; Umlauf G.; Wollgast, J., *Occurrence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Lake Maggiore (Italy and Switzerland)*, Journal of environmental monitoring, 9(6), 589-98, 2007
- [57] Letcher, R.J.; Bustnes, J.O.; Dietz, R.; Jenssen, B.M.; Jørgensen, C.; Sonne, E.H.; Verreault, J; Vijayan, M; Gabrielsen, G.W.; *Exposure and Effects assessment of*

persistent organic pollutants in Arctic wildlife and fish, Sci. Total Environ. 408(15), 2995-3043, 2010

[58] Eric Montie, http://insciences.org/article.php?article_id=5151, (acesso em 5/2010)

[59] Environmental Fate of Bisphenol A, <http://www.bisphenol-a.org/esafety/enfate.html>, (acesso em 5/2010)

[60] Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202920>, (acesso em 5/2010)

[61] Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653505002031>, (acesso em 5/2010)

[62] A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566294>, (acesso em 2010)

Anexos

Anexo A.1

O Anexo A.1 é apresentado na página seguinte.