

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Análises Químicas Ambientais

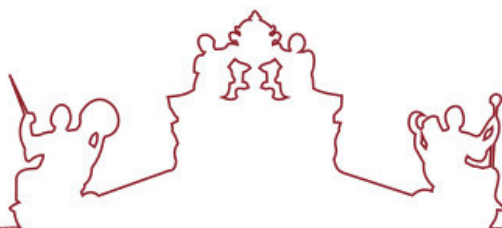
Dissertação

**Papel da matriz composta por materiais argilosos e carvão
ativado na remoção de fármacos em LCM**

João Carlos Baptista Carrajola

Orientador(es) | Ana Vitória Dordio
Isabel Pestana Cansado

Évora 2021



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Análises Químicas Ambientais

Dissertação

**Papel da matriz composta por materiais argilosos e carvão
ativado na remoção de fármacos em LCM**

João Carlos Baptista Carrajola

Orientador(es) | Ana Vitória Dordio
Isabel Pestana Cansado

Évora 2021



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Ana Paula Pinto (Universidade de Évora)

Vogais | Alfredo Jorge Palace Carvalho (Universidade de Évora) (Arguente)
Ana Vitória Dordio (Universidade de Évora) (Orientador)

Agradecimentos

Várias foram as pessoas que contribuíram, de diversas formas, para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Dordio por ter aceitado orientar a minha dissertação de mestrado, demonstrando sempre grande dedicação, disponibilidade, encorajamento e transmitindo conhecimentos científicos essenciais.

À Professora Doutora Isabel Cansado pela colaboração, empenho e incentivo.

Aos meus pais e irmã pelo apoio e incentivo ao longo deste percurso.

Aos colegas de mestrado pela cooperação e amizade demonstrada.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia” (Robert Collier)

Resumo

Com este trabalho pretendeu-se avaliar a eficiência de remoção do diclofenac e furosemida, de uma solução aquosa contendo quatro fármacos, usando microcosmos de leitos construídos de macrófitas (LCM) com uma matriz de suporte de LECA+vermiculite, e plantado com *Typha* spp.. Foi avaliada a capacidade de remoção dos fármacos pela matriz, verificando-se que esta contribuiu com uma percentagem de remoção dos fármacos entre 53-54%, ao fim de 120h. Globalmente, o microcosmos atingiu elevadas eficiências de remoção de ambos os fármacos (70-78%). A presença de plantas contribuiu para uma remoção adicional dos dois fármacos entre 32-37%.

Como otimização do microcosmos adicionou-se à matriz carvão ativado em pó, conseguindo-se um aumento significativo da eficiência de remoção dos fármacos (92-99,5%).

Este estudo, apesar do seu carácter preliminar, aponta para que LCMs construídos e operados analogamente aos deste trabalho serão potencialmente uma opção para o tratamento de águas contaminadas com estes dois fármacos.

Palavras-chave: Leito Construído de Macrófitas, Diclofenac, Furosemida, *Typha* spp., LECA, Vermiculite, Carvão Ativado

Role of the matrix composed of clay materials and activated carbon in the removal of pharmaceuticals by CWS

Abstract

The aim of the present work was to assess the efficiency of a Constructed Wetlands Systems (CWS) microcosms in removing diclofenac and furosemide from an aqueous solution containing four pharmaceuticals. The CWS was constructed with LECA+vermiculite as support matrix and planted with *Typha* spp.. The contribution of the support matrix for the pharmaceuticals removal was evaluated in 53-54% after 120h. Overall, the microcosms attained high removal efficiencies for both pharmaceuticals (70-78%). The presence of plants contributed with additional removal of the two pharmaceuticals in between 32-37%.

As an optimization of the microcosms, powdered activated carbon was added to the support matrix, which provided for a significant increase in the pharmaceuticals removal efficiencies (92-99.5%).

This study, in spite of its still preliminary nature, suggests that CWS constructed and operated according to the guidelines reported in this work may potentially be an option for treating wastewater contaminated with these two pharmaceuticals.

Keywords: Constructed Wetlands Systems, Diclofenac, Furosemide, *Typha* spp., Light Expanded Clay Aggregates (LECA), Vermiculite, Activated Carbons.

Abreviaturas

APIFARMA – Associação Portuguesa da Indústria Farmacêutica

CHNM – Corresponde à quantidade unitária de cada medicamento

CA – Carvão Ativado

c.d.o. – Comprimento de onda

DPR – Desvio Padrão Relativo

EUA – Estados Unidos da América

ETAR – Estação Tratamento Águas Residuais

FUR – Furosemida

HPLC – High-Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

LCM – Leito Construído de Macrófitas

LECA – Light Expanded Clay Aggregates

LDI – Limite de Detecção Instrumental

LQI – Limite de Quantificação Instrumental

NQA – Normas de Qualidade Ambiental

NQA,MA – Normas de Qualidade Ambiental, Média Anual

NQA,CMA – Normas de Qualidade Ambiental, Concentração Máxima Admissível

ONU – Organização das Nações Unidas

pK_a – Constante de ionização

SPE – Solid-Phase Extraction (extração em fase sólida)

SPME – Solid Phase Micro Extration (microextração em fase sólida)

TCR – Taxa de Crescimento Relativo

UE – União Europeia

UV/Vis- Ultravioleta visível

Índice Geral

1. Introdução	2
1.1. Problemática	2
1.2. Objetivos	5
1.3. Revisão bibliográfica	6
1.3.1. Consumo e/ou utilização de medicamentos	6
1.3.2. Entrada de fármacos no meio ambiente	11
1.3.3. Características físico-químicas dos fármacos em estudo	14
1.3.4. Processos de remoção dos fármacos nas ETARs	17
1.3.5. Leitões construídos de macrófitas como possível tecnologia de tratamento de águas contaminadas com fármacos	20
1.3.5.1. Principais processos de remoção dos fármacos em LCM com escoamento sub-superficial	22
1.3.5.2. Papel dos componentes dos LCM na remoção dos fármacos	24
1.3.5.2.1. Papel da matriz de suporte na remoção dos fármacos	25
1.3.5.2.2. Papel da vegetação e da população microbiana na remoção dos fármacos	26
1.3.5.3. Carvão Ativado	28
1.3.6. Métodos analíticos de quantificação de fármacos	31
2. Metodologia experimental	34
2.1. Reagentes e material	34
2.2. Metodologia analítica	37
2.2.1. Otimização das condições de quantificação dos fármacos por HPLC-UV-Vis	38
2.2.1.1. Condições de quantificação dos fármacos no HPLC-UV-Vis	38
2.2.1.2. Validação do método analítico	40
2.3. Seleção do CA a utilizar	41

2.4. Avaliação da capacidade de remoção dos fármacos em microcosmos de LCMs plantados com <i>Typha</i> spp.	41
2.4.1. Descrição dos microcosmos de LCMs	41
2.4.2. Caracterização físico-química da matriz de suporte	43
2.4.3. Condições de operação dos LCMs e recolha de amostras	43
3. Resultados e discussão	46
3.1. Otimização e validação da metodologia analítica	46
3.1.1. Validação do método analítico	48
3.1.2. Otimização do volume de solução a filtrar nos filtros de nylon	48
3.2. Seleção do carvão ativado	50
3.3. Avaliação da capacidade de remoção da furosemida e do diclofenac em microcosmos de LCMs plantados com <i>Typha</i> spp	53
3.3.1. Caracterização físico-química da matriz de suporte	54
3.3.2. Condições relevantes para a realização dos ensaios	56
3.3.3. Remoção do diclofenac e da furosemida pelos microcosmos de LCMs . 59	
3.3.4. Estudo cinético	69
3.4. Resposta fisiológica das plantas ao stress abiótico	78
4. Conclusões e perspectivas futuras	82
5. Referências bibliográficas	87
6. Anexo I	102

Índice de Figuras

Figura 1.1 Possíveis vias de entrada de fármacos no meio ambiente (adaptado de Boxall <i>et al.</i> , 2012).....	13
Figura 1.2 Esquema de um sistema convencional de tratamento de águas residuais (adaptado Tchobanoglous <i>et al.</i> , 2003; Dordio e Carvalho, 2015)	19
Figura 1.3 Sistema de macrófitas aquáticas flutuantes (adaptado de Dordio <i>et al.</i> , 2008)	21
Figura 1.4 Sistema de macrófitas aquáticas submersas (adaptado de Dordio <i>et al.</i> , 2008)	21
Figura 1.5 Sistema de macrófitas aquáticas emergentes (adaptado de Dordio <i>et al.</i> , 2008)	21
Figura 1.6 Diferentes subdivisões dos LCMs (adaptado de Dordio <i>et al.</i> , 2008) ..	22
Figura 1.7 Principais processos de depuração/redução de fármacos em LCM...	23
Figura 1.8 Interação dos componentes de um LCM (adaptado de Dordio e Carvalho, 2013a)	24
Figura 1.9 Distribuição da <i>Typha domingensis</i> em Portugal (Carapeto <i>et al.</i> , 2020)	27
Figura 1.10 Adsorção por carvão ativado (Parcialmente adaptado de NaturalTec, 2010)	29
Figura 2.1 Imagens ilustrativas da LECA	35
Figura 2.2 Imagens ilustrativas da vermiculite esfoliada.....	35
Figura 2.3 CA em forma de pó fino.....	37
Figura 2.4 CA em forma de granulado.....	37
Figura 2.5 Fotografia dos microcosmos no início dos ensaios	43
Figura 3.1 Cromatograma obtido por HPLC-UV-Vis para uma solução padrão com Trimetoprim (2,5 mg L ⁻¹), Sulfametoxazol (2,5 mg L ⁻¹), Furosemida (2,5 mg L ⁻¹) e Diclofenac (2,5 mg L ⁻¹).....	46

Figura 3.2 Reta de calibração utilizada para a quantificação da furosemida em solução aquosa.....	47
Figura 3.3 Reta de calibração utilizada para a quantificação do diclofenac em solução aquosa.....	47
Figura 3.4 Percentagem de recuperação dos fármacos filtrados utilizando membranas de nylon 0,45 µm para uma concentração de 2 mg L ⁻¹ (média ± DP; n=9). As diferentes letras significam que os valores apresentam diferenças significativas (P<0,05)	49
Figura 3.5 Remoção da furosemida pelas diferentes matrizes.....	51
Figura 3.6 Remoção do diclofenac pelas diferentes matrizes	52
Figura 3.7 Valores médios do pH do meio nos leitos ao longo do período de estudo.....	58
Figura 3.8 Percentagem de remoção do diclofenac nos Ensaios I, II, V, IV e VI para os tempos de contacto de 0,5, 7,5 e 120 h. Valores médios ± desvio padrão	60
Figura 3.9 Percentagem de remoção da furosemida nos Ensaios I, II, V, IV e VI para os tempos de contacto de 0,5; 7,5 e 120 h. Valores médios ± desvio padrão	61
Figura 3.10 Comparação da remoção dos dois fármacos nos diferentes leitos ..	67
Figura 3.11 Cinética de remoção do diclofenac	71
Figura 3.12 Cinética de remoção da furosemida	72
Figura 3.13 Ajustes dos dados cinéticos experimentais do diclofenac aos diferentes modelos.....	76
Figura 3.14 Ajustes dos dados cinéticos experimentais da furosemida aos diferentes modelos.....	77
Figura 3.15 Taxa de crescimento relativo médio da folha maior, da menor e do tamanho médio das plantas.....	79
Figura I.1 Espectro de absorção das soluções de diclofenac, furosemida, trimetoprim e sulfametoxazol com identificação do valor de comprimento de onda onde se realizou a quantificação dos fármacos.....	102

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Evolução do volume de medicamentos consumidos em Portugal (APIFARMA, 2018)	6
Tabela 1.2 Substâncias ativas com maior utilização em meio hospitalar, 2018 (INFARMED, 2018)	7
Tabela 1.3 Substâncias ativas com maior utilização em meio ambulatorio, em Portugal, em 2018 (INFARMED, 2018b)	8
Tabela 1.4 Concentração de alguns fármacos em amostras ambientais	11
Tabela 1.5 Características físico-químicas dos quatro fármacos	15
Tabela 1.6 Detecção de diclofenac e furosemida em 4 zonas da bacia do Guadiana. Frequência de Detecção (FD %), média (Méd ng L ⁻¹), máximo (Máx ng L ⁻¹) (Palma <i>et al.</i> , 2020).	17
Tabela 1.7 Detecção de fármacos em águas residuais e eficiência de remoção em ETARs (adaptado de Luo <i>et al.</i> , 2014; Deblonde <i>et al.</i> , 2011)	18
Tabela 2.1 Principais características das substâncias químicas utilizadas	34
Tabela 2.2 Características da vermiculite e da LECA utilizadas (Dordio <i>et al.</i> , 2017)	36
Tabela 2.3 Principais características texturais e químicas dos CA utilizados	36
Tabela 3.1 Parâmetros físico-químico dos materiais selecionados como matriz de suporte dos LCMs (n=6) e da sua mistura. Valores médios ± desvio padrão	54
Tabela 3.2 Volume de líquido adicionado diariamente aos leitos e valores médios da taxa de evaporação/transpiração de cada leito.	56
Tabela 3.3 Parâmetros cinéticos da remoção da furosemida nos ensaios	74
Tabela 3.4 Parâmetros cinéticos da remoção do diclofenac nos ensaios.....	75

I Introdução

1. Introdução

1.1. Problemática

A água é um bem essencial na sociedade atual, tanto para utilização doméstica como na indústria ou na agricultura. Estando presente em todos os sectores e em função do crescimento populacional, do desenvolvimento económico ou das mudanças dos padrões de consumo, a utilização da água tem vindo a aumentar a nível mundial (ONU, 2018).

Estima-se que em 2018 a utilização de água a nível mundial tenha sido de 4600 Km³, prevendo-se um aumento de 20% a 30% até 2050 para valores entre 5500 e 6000 Km³/ano (ONU, 2018). Considerando estes dados torna-se evidente que a água é um bem cada vez mais valioso, e que caso não se tomem medidas para uma boa gestão do mesmo, pode muito em breve tornar-se num bem escasso.

Com este intuito continuam, em Portugal, a ser debatidos projetos e medidas entre o governo e várias entidades públicas e privadas responsáveis pelo tratamento e gestão da água, com vista ao cumprimento das metas a que o governo se propôs no que respeita à gestão eficiente da água. A meta será chegar a 2030 com pelo menos 20% de utilização de águas residuais tratadas, por exemplo, na rega de jardins, lavagem de ruas ou para uso nos autoclismos das casas de banho (Portaldagua, 2019).

Para além do objetivo de promover uma boa gestão e reaproveitamento da água, existe também a preocupação para que as estações de Tratamento das Águas Residuais (ETARs) vão evoluindo e adaptando os seus processos de tratamento de forma a conseguirem dar uma resposta satisfatória face aos denominados poluentes emergentes. Estes são definidos como poluentes não incluídos atualmente nos programas de monitorização em curso na União Europeia, mas que poderão vir a sê-lo, no futuro, dependendo dos resultados da investigação relativamente à sua ecotoxicidade, efeitos na saúde humana e níveis de concentração presentes nos compartimentos ambientais (IAREN, 2009).

Existe uma grande diversidade de poluentes emergentes, como sejam: toxinas provenientes de algas; detergentes; aditivos de gasolina; nanoparticulas; pesticidas e os compostos farmacêuticos. Na realidade, estes últimos são os principais responsáveis pela ocorrência de problemas de desregulação endócrina em seres vivos aquáticos, provocando por exemplo a alteração no comportamento do sistema reprodutivo e a mudança de sexo (Gogoi *et al.*, 2018; Felis *et al.*, 2020). Outras consequências provocadas pela presença de fármacos no ambiente são a toxicidade

aquática e a seleção de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos (IAREN, 2009; Tran *et al.*, 2018; Felis *et al.*, 2020).

A preocupação com a presença de fármacos nos meios aquáticos resulta do conhecimento dos efeitos negativos que estes provocam e na constatação de que os mesmos estão a ser utilizados em grandes quantidades tanto na medicina humana como veterinária, bem como em diversas atividades agropecuárias e aquícolas (Sousa, 2015; Couto *et al.*, 2019; Felis *et al.*, 2020). Desta forma, tem-se procurado estudar a ocorrência dos poluentes emergentes no meio ambiente e para tal tem contribuído o desenvolvimento das técnicas analíticas, as quais têm aumentado significativamente a sua sensibilidade e seletividade para este tipo de poluentes em matrizes ambientais (Mompelat *et al.*, 2009).

Têm sido identificadas várias vias de entrada dos fármacos no meio ambiente, como sejam, as atividades agro-pecuárias, industriais, aquicultura ou do seu depósito diretamente no lixo, contudo acabam por ser as ETARs as principais vias de entrada dos fármacos no ambiente, isto porque, existe um grande consumo de medicamentos como por exemplo os antibióticos, diuréticos ou anti-inflamatórios, que não são totalmente absorvidos pelo organismo, acabando assim por em parte serem direcionados para as águas residuais (Fent *et al.*, 2006; Dordio *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2018; Felis *et al.*, 2020). Desta forma, as ETARs são um dos principais locais onde faz sentido o estudo sobre a identificação e quantificação de fármacos, dos seus metabolitos e compostos de transformação, dado que, é o local para onde as águas residuais são encaminhadas e onde é realizado o tratamento das mesmas antes da sua descarga no meio ambiente.

Atualmente é reconhecido que as águas residuais estão de uma forma geral significativamente contaminadas com uma grande variedade de poluentes emergentes, entre os quais os fármacos. Embora as concentrações detetadas destes compostos sejam normalmente muito baixas (ng/L- μ g/L), as ETARs convencionais não foram projetadas e optimizadas para a remoção deste tipo de poluentes, além de que, muitos deles são difíceis de biodegradar, levando assim de uma forma geral a uma remoção ineficiente dos mesmos nas ETARs (Gao *et al.*, 2012; Trojanowicz, 2012; Verlicchi *et al.*, 2012; Couto *et al.*, 2019; Tran *et al.*, 2019; Felis *et al.*, 2020).

Com a emergência desta nova classe de poluentes relativamente aos quais as ETARs convencionais não conseguem dar resposta, é necessário encontrar processos alternativos ou complementares de tratamento que permitam a sua eficiente remoção, mantendo um baixo custo e uma fácil operacionalidade em larga escala, podendo-se

salientar, entre várias tecnologias que têm sido estudadas e propostas como opção, os Leitões Construídos de Macrofitas (LCM).

Os LCMs simulam a capacidade depurativa das zonas húmidas não sendo necessário recorrer a agentes químicos, apresentando um bom enquadramento paisagístico e baixos custos de operação, tendo vindo a mostrar-se uma alternativa que é razoavelmente eficiente na remoção de vários fármacos, mais sustentável e económica do que outras alternativas avançadas de tratamento, tais como a oxidação catalítica ou os processos de membranas (Dordio *et al.*, 2010; Ávila *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Tiwari *et al.*, 2017; Vystavna *et al.*, 2017).

Os LCMs realizam a depuração das águas residuais através da ação combinada entre as plantas, os microorganismos e os componentes da matriz de suporte sólida, envolvendo assim uma grande variedade de processos físicos, químicos e biológicos. A eficiência dos LCMs pode ser significativamente melhorada através de uma boa escolha dos componentes (plantas, microorganismos e matriz de suporte) usados na sua construção (Dordio *et al.*, 2009; Dordio e Carvalho, 2013_a; Dordio e Carvalho, 2018).

Desta forma, uma criteriosa seleção dos materiais a serem utilizados como matriz de suporte poderá permitir alcançar uma maior capacidade de retenção dos contaminantes por fenómenos de adsorção ou troca iónica. De resto, estudos já realizados com alguns materiais argilosos, como os agregados de argila expandida (Light Expanded Clay Aggregates, LECA) e a vermiculite bem como vários tipos de carvões ativados permitiram demonstrar que estes materiais apresentam uma boa capacidade de remoção de alguns pesticidas e fármacos de águas e efluentes, principalmente com base em processos de adsorção (Dordio *et al.*, 2009; Cansado *et al.*, 2010; Dordio *et al.*, 2010; Dordio e Carvalho, 2013_a; Dordio e Carvalho, 2018; Cansado *et al.*, 2019; Thiebault, 2020).

A vegetação desempenha também um importante papel, de uma forma direta ou indireta, na remoção, retenção e/ou transformação ou degradação dos poluentes. Indiretamente, as plantas contribuem para a biodegradação dos poluentes através do efeito de estimulação que têm no desenvolvimento das populações microbianas, por via da libertação de oxigénio e exsudados na rizosfera e do aumento da área disponível para o desenvolvimento de biofilme sobre a superfície das suas raízes. Por outro lado, as plantas podem ter uma contribuição mais direta através da adsorção dos poluentes nas suas raízes, absorção, acumulação e/ou metabolização (Mavioso, 2010; Dordio e Carvalho, 2013_a; Dordio *et al.*, 2018). Assim, para o melhoramento da

eficiência de todo o sistema de um LCMs é essencial uma boa seleção da espécie vegetal. Estudos já efetuados demonstraram que a *Typha* spp., que é uma das espécies mais utilizadas em LCMs, apresenta uma elevada capacidade de remoção de vários compostos orgânicos xenobióticos, nomeadamente alguns fármacos, de águas contaminadas (Susarla *et al.*, 2002; Dordio *et al.*, 2010; Dordio *et al.*, 2011, Carvalho *et al.*, 2014, Dordio *et al.*, 2018, Li *et al.*, 2014, Machado, 2020).

1.2. Objetivos

A realização deste trabalho teve como objetivo geral a avaliação da eficiência de microcosmos de LCMs na remoção do diclofenac e da furosemida em água dopada com quatro fármacos (diclofenac, furosemida, sulfometoxazol, trimetoprim), utilizando como matriz de suporte uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 3 (1:1, v:v) e tendo como vegetação a macrófita *Typha* spp..

Com esta finalidade, realizaram-se estudos experimentais de modo a atingir os seguintes objetivos mais específicos:

- Avaliar o papel da matriz de suporte (LECA 2/4 + vermiculite esfoliada 3) na remoção do diclofenac e da furosemida nos LCMs;
- Avaliar a contribuição do carvão ativado na remoção do diclofenac e da furosemida na matriz de suporte;
- Avaliar o papel da componente biota (plantas e população microbiana) na remoção do diclofenac e da furosemida nos LCMs;
- Avaliar a cinética de remoção do diclofenac e da furosemida para estabelecimento do tempo de retenção nos LCMs;
- Avaliar a capacidade de resposta da *Typha* spp. à toxicidade causada pela exposição aos fármacos;
- Avaliar a suscetibilidade do diclofenac e da furosemida para sofrer fotodegradação, hidrólise ou adsorção às paredes de recipientes do mesmo tipo dos usados nos ensaios, de modo a poder excluir o efeito de processos de remoção não devidos às plantas, microrganismos ou matriz;
- Otimizar e validar um método analítico para a quantificação do diclofenac e da furosemida em água dopada com os quatro fármacos.

1.3. Revisão bibliográfica

1.3.1. Consumo e/ou utilização de medicamentos

Segundo o Decreto-Lei nº76/2006, de 30 de Agosto podemos definir medicamento como *“toda a substância ou associação de substâncias apresentadas como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas”* (Decreto-Lei nº76/2006, de 30 de Agosto).

Considerando que o acesso aos cuidados de saúde tem aumentado ao longo dos anos e que a esperança média de vida da população também tem aumentado, seria previsível que a conjugação destes dois fatores levasse a um aumento do consumo de medicamentos. E de facto, esta previsão é confirmada com dados como os do INFARMED que indicam que foram consumidas mais 4 milhões de embalagens de medicamentos em Portugal, em 2018 relativamente ao ano anterior (INFARMED, 2019).

Pelos dados presentes na tabela 1.1 é possível verificar que existe um elevado consumo de medicamentos em Portugal, registando-se por exemplo em 2017 a venda de 248,2 milhões de embalagens no mercado ambulatorio, com e sem receita médica, e no mesmo ano foram ainda administradas 246,9 milhões de unidades em meio hospitalar (APIFARMA, 2018).

Tabela 1.1 Evolução do volume de medicamentos consumidos em Portugal (APIFARMA, 2018).

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Mercado ambulatorio (Milhões de embalagens)	251,5	243,4	249,5	245,6	245,0	247,4	249,2	248,2
Mercado hospitalar (milhões de unidades CHNM)	239,2	233,2	231,7	232,1	233,6	239,4	246,0	246,9

Unidades de CHNM - corresponde à quantidade unitária de cada medicamento (nº de comprimidos, seringas, frascos, etc.)

Para além do número de medicamentos vendidos importa também saber quais as substâncias ativas mais consumidas. Na tabela 1.2 são apresentados esses dados referentes ao ano de 2018, no que diz respeito ao meio hospitalar. De entre as substâncias ativas presentes nos vários fármacos, é de destacar o paracetamol com 11 271 277 unidades CHNM ou a furosemida com 4 680 906 unidades CHNM.

Tabela 1.2 Substâncias ativas com maior utilização em meio hospitalar, 2018 (INFARMED, 2018).

Substâncias Ativas	Jan-Dez 2018 (CHNM)
Cloreto de Sódio	21 634 828
Paracetamol	11 271 277
Oxigénio	10 591 545
Tacrolímus	6 618 964
Micofenolato de Mofetil	5 880 649
Furosemida	4 680 906
Tamoxifeno	3 907 392
Água para preparação de injectáveis	3 761 067
Enoxaparina Sódica	3 708 676
Etinilestradiol + Gestodeno	3 692 152
Restante substâncias ativas	174 845 714
Total	250 593 171

No que diz respeito aos dados para o meio ambulatorio, os valores fornecidos pelo INFARMED indicam que no ano de 2018, a substância ativa mais vendida, foi a atorvastatina com 4 433 896 embalagens, seguida do paracetamol com 3 552 914 embalagens. Na tabela 1.3 são apresentados os dados para as 10 substâncias ativas com maior utilização em meio ambulatorio, em 2018, em Portugal.

Tabela 1.3 Substâncias ativas com maior utilização em meio ambulatorio, em Portugal, em 2018 (INFARMED, 2018b).

Substância ativa	Nº embalagens
Atorvastatina	4 433 896
Paracetamol	3 552 914
Metformina	3 471 890
Sinvastatina	3 015 685
Amoxicilina + Ácido clavulânico	2 687 191
Bisoprolol	2 416 873
Ácido acetilsalicílico	2 416 088
Alprazolam	2 299 051
Pantoprazol	2 232 717
Omeprazol	2 136 853
Restantes substâncias	132 651 500
Total	161 314 658

Outro dado importante a considerar relaciona-se com o consumo de medicamentos adquiridos sem receita médica e que são vendidos fora das farmácias, os quais estão incluídos na designação de auto-medicação, sendo um hábito frequentemente adotado por uma grande parte da população. Neste aspeto, os dados do INFARMED indicam que em 2018, o grupo farmacoterapêutico com maior volume de vendas sem receita médica foi o dos analgésicos e antipiréticos com 2 185 384 embalagens vendidas. No que diz respeito à substância ativa mais vendida em termos de volume foi o paracetamol com 1 263 728 embalagens e em termos de valor económico foi o diclofenac com 4 971 482€ (INFARMED, 2018^c)

Tendo como objetivo melhorar o nível de vida das populações, através da prevenção, diagnóstico e cura de doenças e sintomas, são consumidas toneladas de medicamentos, anualmente, em todo o mundo. Só na União Europeia (UE) são utilizadas cerca de 3000 substâncias diferentes, entre as quais se destacam os analgésicos, contraceptivos, anti-inflamatórios, antibióticos, reguladores lipídicos entre outros (Comissão Europeia, 2019). É de referir que, também a medicina veterinária utiliza uma grande quantidade de fármacos entre os quais podemos salientar os

antibióticos e os anti-inflamatórios (Fent *et al.*, 2006; Couto *et al.*, 2019; Mackulak *et al.*, 2019).

Embora desde a descoberta e início da utilização dos fármacos existam resíduos dos mesmos no meio ambiente, a expansão da indústria farmacêutica, o aumento do consumo de medicamentos e a identificação dos impactes negativos provocados no ambiente tem levado ao aumento da preocupação com esta temática. Já na década de 70, nos EUA foi dado o alerta para o problema dos produtos farmacêuticos no meio ambiente (Melo *et al.*, 2009). Contudo, só em meados da década de 90, o desenvolvimento das técnicas analíticas possibilitou a deteção e quantificação destes compostos em matrizes ambientais, o que levou a um alargamento dos conhecimentos sobre esta temática. Hoje em dia, a cromatografia líquida de alta eficiência, juntamente com a espectrometria de massa e a extração de fase sólida (que permite uma pré-concentração dos analitos) são técnicas que possibilitam a deteção destes compostos na ordem dos $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou mesmo ng.L^{-1} (Santos *et al.*, 2010).

Com vista à avaliação e monitorização da qualidade da água, foi criada legislação nomeadamente o Decreto-lei nº218/2015 de 7 de outubro onde é referido que “*A poluição química das águas superficiais pode causar toxicidade aguda e crónica nos organismos aquáticos, acumulação no ecossistema e perda de habitats e de biodiversidade para além de constituir uma ameaça para a saúde humana. As normas de qualidade ambiental (NQA) definidas no âmbito da política da água têm como objetivo o controlo da poluição, estabelecendo níveis máximos de concentração de determinadas substâncias na água, nos sedimentos e no biota, para proteção do ambiente e da saúde humana*”. Os níveis máximos de concentrações definidos nas NQA são expressos em valores médios anuais (NQA – MA) e em concentração máxima admissível (NQA – CMA), respetivamente associados à toxicidade crónica e aguda (Decreto-lei nº218/2015 de 7 de outubro).

No mesmo decreto-lei é ainda mencionado que se “*estabelece um quadro de ação no domínio da política da água e define uma estratégia de combate à poluição da água que envolve a identificação de substâncias prioritárias que constituem um risco significativo para o meio aquático, ou por intermédio deste.*” (Decreto-lei nº218/2015 de 7 de outubro).

Desta forma também em Portugal, a problemática dos poluentes emergentes tem sido abordada através de alguns estudos e monitorizações da presença dos mesmos nos meios aquáticos, contudo os dados conhecidos ainda são escassos. Salienta-se um artigo de revisão de 2015 sobre 38 trabalhos realizados entre 1997 e 2014, onde foi

detetada a presença de ibuprofeno em sedimentos do rio Uíma, um dos afluentes do rio Douro (Ribeiro *et al.*, 2015). Num outro artigo de revisão de 2016 é feita referência à presença de ibuprofeno nos rios Minho, Lima, Leça, Ave, Douro e na Ria de Aveiro, sendo detetado também paracetamol no rio Leça. Além disso é ainda referido que foram detetados 65 fármacos em cinco ETARs (Ribeiro *et al.*, 2016). Já num artigo publicado em 2018 sobre um estudo realizado nas águas superficiais dos rios Ave e Sousa é referido que foram detetados cinco fármacos, sendo eles o diclofenac, o filtro ultravioleta EHMC, a eritromicina, a claritromicina e o azitromicina (Sousa *et al.*, 2018). Um outro artigo publicado em 2020, referente ao estudo da presença de fármacos na bacia do Guadiana realizado durante os anos de 2017 e 2018, indica que foram detetados 27 fármacos diferentes, sendo o diclofenac, o ibuprofeno, a carbamazepina e a hidroclorotiazida, os que apresentam maior preocupação por terem sido detetados em concentrações que podem representar um risco moderado a alto para o ecossistema aquático (Palma *et al.*, 2020). Este estudo concluiu ainda que a presença destes fármacos na bacia do Guadiana deve-se à descarga contínua destes compostos pelas ETARs e à sua remoção incompleta por estas instalações, bem como à utilização veterinária, devido à criação intensiva de gado (Palma *et al.*, 2020).

Por todo o mundo têm sido feitos estudos de monitorização de fármacos no ambiente, tendo sido detetada uma grande variedade dos mesmos em águas superficiais, águas subterrâneas, águas residuais tratadas, água potável e até em plantas utilizadas na alimentação (Deblonde *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2014). Na tabela 1.4 apresentam-se os valores das concentrações de alguns dos fármacos mais frequentemente detetados em amostras ambientais.

Tabela 1.4 Concentração de alguns fármacos em amostras ambientais.

Composto	Água superficial	Água subterrânea	Água potável	Efluentes ETARES
Diclofenac	419 ng L ^{-1 a}	518 ng L ^{-1 a}	8,0 ng L ^{-1 b}	812 ng L ^{-1 c}
Sulfametoxazol	360 ng L ^{-1 g}		0,23 ng L ^{-1 c}	
Triclosan			0,11 ng L ^{-1 c}	660-2040 ng L ^{-1 h}
Amoxicilina	2,7 ng L ^{-1 d}			
Ciprofloxacina	21.3 ng L ^{-1 e}			
Genfibrozil	9-17 ng L ^{-1 h}	10 ng L ^{-1 h}		10-680 ng L ^{-1 h}
Trimatropim	0,56-3580 ng L ^{-1 h}	11 ng L ^{-1 h}	470-2330 ng L ^{-1 h}	10-1230 ng L ^{-1 h}
Carbamazepina	0,5-36,920 ng L ^{-1 h}		680-31,450 ng L ^{-1 h}	10-830 ng L ^{-1 h}
Eritromicina		568 ng L ^{-1 f}		10-720 ng L ^{-1 h}
Vancomicina		153,38 ng L ^{-1 f}		
Furosemida	22 ng L ^{-1 i}			

a) Branchet *et al.*, 2019; b) Tröger *et al.*, 2018; c) Česen *et al.*, 2019; d) Azanu *et al.*, 2018; e) Castrignanò *et al.*, 2018; f) Szekeres *et al.*, 2018; g) Hanna *et al.*, 2018; h) Pena-Guzman *et al.*, 2019; i) Huerta-Fontela *et al.*, 2011.

Verifica-se que os fármacos mais frequentemente detetados em amostras ambientais pertencem às classes dos anti-inflamatórios, antibióticos, beta-bloqueadores, estimulantes e dos diuréticos. Embora estes compostos se encontrem no ambiente em concentrações relativamente baixas ($\mu\text{g L}^{-1}$ – ng L^{-1}), não deixam de causar preocupação, especialmente devido à sua persistência no meio ambiente e à sua atividade biológica. A acrescentar, deve-se considerar a possibilidade de uma grande diversidade de compostos com modos de atuação afins poderem ter efeitos aditivos, ou até sinérgicos que assim superem os efeitos esperados para concentrações mais baixas.

1.3.2. Entrada de fármacos no meio ambiente

Os medicamentos para uso humano ou veterinário, são desenvolvidos para terem alguma estabilidade química, que evite a sua fácil degradação, permitindo a manutenção das suas propriedades químicas o tempo suficiente para exercerem o efeito terapêutico pretendido antes de serem inativados (Santos *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2020).

Se por um lado, esta estabilidade é essencial para que o fármaco consiga exercer o mecanismo de ação, por outro lado, a mesma é responsável pela respetiva acumulação no meio ambiente. A utilização destes produtos farmacêuticos conduz à libertação dos seus princípios ativos, excipientes, metabolitos e produtos de transformação para o ambiente, principalmente para o meio aquático (Santos *et al.*, 2010).

Assim, é possível identificar as várias vias através das quais os produtos farmacêuticos podem chegar ao meio aquático:

- **Consumo/aplicação e excreção:** os fármacos podem ser administrados por via oral, tópica ou parentérica e dependendo da forma de administração são absorvidos, distribuídos, metabolizados e excretados. A metabolização tem como objetivo principal tornar os compostos mais polares e dessa forma hidrofílicos, para que possam ser mais facilmente excretados por via urinária (Tambosi *et al.*, 2010). Contudo a transformação dos fármacos em metabolitos nem sempre é completa, ou seja, uma parte do fármaco vai ser excretada inalterada em conjunto com os seus derivados, que acabam sendo recolhidos nos sistemas de saneamento e encaminhados para as ETARs, cujo desempenho é ineficiente no que se refere à remoção destes compostos das águas residuais, acabando esta via por ser uma das principais fontes de contaminação dos ambientes aquáticos.

- **Eliminação incorreta de medicamentos:** os medicamentos que se encontram fora de prazo de validade, ou que já não serão usados, são frequentemente, descartados de forma incorreta diretamente no esgoto ou no lixo. Caso sejam descartados no esgoto, os fármacos provocam os mesmos problemas que ocorrem aquando da sua excreção, mas de forma mais agravada devido ao aumento da concentração dos mesmos (Proença, 2011). Quando colocados no lixo, os mesmos são direcionados para o aterro sanitário, onde algumas moléculas acabam por se degradar. O aterro acaba por funcionar sobretudo como um depósito de fármacos e dependendo da precipitação e humidade forma-se um lixiviado onde estes compostos estão presentes (Zhou *et al.*, 2009; Proença, 2011; Mackulak *et al.*, 2019).

- **Resíduos de fármacos na agropecuária e aquicultura:** na criação intensiva de gado e peixe são administrados produtos farmacêuticos como vacinas, anti-inflamatórios, antibióticos ou hormonas, que por sua vez são excretados através da urina e das fezes. Desta forma, pode ocorrer uma contaminação no local, ou quando utilizado o estrume como fertilizante pode contaminar os solos onde é aplicado, o que por sua vez através das escorrências poderá contaminar a água circundante ou por

infiltração irá contaminar os lençóis freáticos (Zhou *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Mackulak *et al.*, 2019).

- **Efluentes da indústria farmacêutica e hospitalar:** a indústria farmacêutica é um potencial foco de contaminação, devido à produção de resíduos durante o processo de fabrico. Os hospitais também são considerados uma potencial fonte de entrada de fármacos na rede de saneamento, por serem locais onde são manipuladas e administradas grandes quantidades de medicamentos (Kummerer, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Mackulak *et al.*, 2019).

A figura 1.1 esquematiza as principais vias de entrada dos fármacos no ambiente bem como o seu percurso desde a sua utilização até à chegada aos meios recetores. É possível identificar três percursos principais que direcionam os fármacos até ao meio ambiente. No caso da aquicultura, em que não se efetua o tratamento de águas residuais, os fármacos acabam por sair do local de administração diretamente para as águas recetoras. Após o uso veterinário, e em caso de eliminação incorreta (ausência de tratamento de resíduos, aplicação de estrume no solo para fertilização, etc.), os fármacos podem acabar no solo sendo posteriormente lixiviados para os meios recetores. Refira-se ainda que, os medicamentos de uso humano em conjunto com os efluentes gerados durante os processos de fabrico, que são encaminhados diretamente para as ETARs, se não forem removidos de forma eficiente, são encaminhados para o meio ambiente.

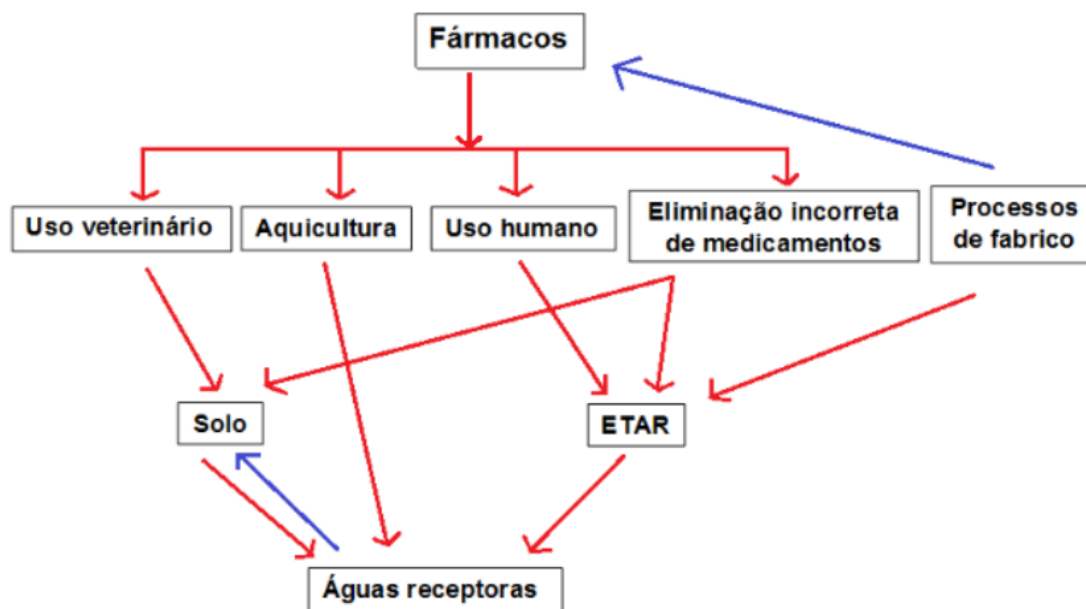


Figura 1.1 Possíveis vias de entrada de fármacos no meio ambiente (adaptado de Boxall *et al.*, 2012).

Independentemente da forma como os fármacos chegam ao meio ambiente, provocam sempre um impacto negativo, sendo mais ou menos gravoso em função das respetivas propriedades. Entre as várias características podemos destacar a persistência, que se relaciona com o tempo de meia-vida, ou seja, o período necessário para que a concentração de um composto fique reduzida a metade (Cid, 2011); o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), que é uma medida do carácter hidrofóbico do composto (Cid, 2011); a estrutura molecular, onde fatores como o tamanho molecular, espécies presentes em meio aquoso, capacidade de estabelecer pontes de hidrogénio, influenciam o seu comportamento no meio ambiente e a eficácia das diferentes formas de remoção (Dragun, 1998); a constante de ionização (pKa), que determina quais as espécies iónicas (ou forma neutra) que estão presentes no ambiente. As espécies iónicas são mais solúveis em água do que a sua correspondente forma neutra. Se o fármaco for muito ionizável, não ocorrerá facilmente a partição para um compartimento ambiental hidrofóbico, nem terá tendência a volatilizar-se (Cunningham, 2008). Finalmente, a polaridade do adsorvido, que irá afetar o seu comportamento no meio aquático, dado que um composto apolar terá maior tendência a ser adsorvido por uma matriz sólida sobretudo se esta contiver elevados teores de matéria orgânica. Por outro lado, os compostos polares são mais solúveis em água, e conseqüentemente serão menos adsorvidos nas superfícies que contém matéria orgânica (Cunningham, 2008).

1.3.3. Características físico-químicas dos fármacos em estudo

Existe uma grande variedade de compostos farmacêuticos que durante as últimas décadas têm sido detetados um pouco por todo o mundo em águas superficiais, água subterrâneas, águas residuais tratadas, lamas de ETARs e até mesmo em águas destinadas ao consumo humano, como demonstra a tabela 1.4.

Dada a grande variedade de fármacos que têm sido detetados em amostras ambientais, houve a necessidade de estabelecer critérios de seleção sobre os fármacos a estudar, de forma a garantir que apesar do estudo apenas incidir sobre um número reduzido desses fármacos (dois) possa ser representativo e indicador do comportamento de um grupo mais abrangente de moléculas.

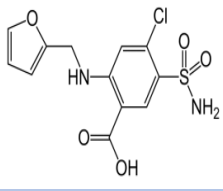
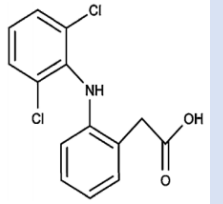
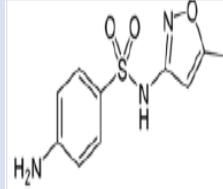
Assim, os critérios tidos em atenção na seleção dos fármacos a estudar foram os seguintes:

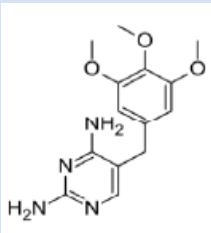
- i) consumo anual em Portugal e noutros países;
- ii) frequência de deteção em amostras ambientais;
- iii) comportamento nas ETARs convencionais;

- iv) biodegradabilidade;
- v) classes farmacoterapêuticas e propriedades físico-químicas (características ácido-base, log Kow, solubilidade em água);
- vi) escassez de estudos sobre estes compostos.

Os fármacos selecionados de acordo com estes critérios para a realização dos ensaios foram o diclofenac, a furosemida, o sulfametoxazol e o trimetoprim. As principais características físico-químicas destes compostos estão apresentadas na tabela 1.5. No entanto, no âmbito deste trabalho, apenas foi analisado o comportamento de dois destes fármacos, nomeadamente o diclofenac e a furosemida.

Tabela 1.5 Características físico-químicas dos quatro fármacos.

Nome comum	Nome sistemático	Estrutura	Massa Molar (g/mol)	pKa	Solubilidade (mg/L)	Log K _{ow}
Furosemida	Ácido 4-cloro-2-(2-furilmetilamino)-5-sulfamoil-benzóico		330,75 ^a	4,25 ^a	73,1 ^b	2,03 ^b
Diclofenac	2-[[2-(2,6-diclorofenil)amino]fenil]etanóico		296,147 ^c	4,15 ^c	2,37 ^d	4,5 ^d
Sulfametoxazol	4 - amino - N-(5-metilsoxazol - 3-il) benzenosulfonamida		253,28 ^e	5.6-5.7 ^e	610 ^f	0,89 ^e

Trimetoprim	5-(3,4,5-trimetoxibenzil) pirimidina-2,4-diamina		290,32 ^g	6,60 ^g	500 ^g	0,91 ^g
-------------	--	---	---------------------	-------------------	------------------	-------------------

a) British Pharmacopoeia, 2010; b) Bolton *et al.*, 2008; c) Altman *et al.*, 2015; d) Fortunato, 2014; e) Pal *et al.*, 2010; f) Ziyilan e Ince, 2011; g) Pérez *et al.*, 2005

A furosemida e o diclofenac são ácidos fracos com baixa solubilidade em água. No entanto, a furosemida apresenta um valor de $\log K_{ow}$ favorável à sua absorção pelas raízes das plantas e à sua translocação para a parte aérea pois é um composto moderadamente hidrofóbico (geralmente assim considerado se $\log K_{ow}$ for entre 0.5 e 3.5) e por isso suficientemente lipofílico para conseguir atravessar a camada fosfolipídica das membranas celulares e suficientemente solúvel em água para poder ser transportado no interior das plantas (Pilon-Smits, 2005). O diclofenac é um composto mais hidrofóbico ($\log K_{ow} > 3.5$), considerando-se, em geral, que estes compostos poderão ser fortemente adsorvidos às paredes celulares e à camada lipofílica da raiz, levando a uma conseqüente redução da sua entrada e translocação no interior da planta. No entanto, alguns estudos indicam que o valor de $\log K_{ow}$ pode não ser o único fator determinante para propiciar a sua absorção pelas plantas pois são referidos exemplos de compostos que são capazes de atravessar as membranas das plantas, apesar de terem valores de $\log K_{ow}$ fora dos limites indicados, ou sejam inferiores a 0.5, ou superiores a 3.5 (Renner, 2002). O potencial para um composto ser removido por uma dada planta, pode depender de outros fatores, tais como, da sua concentração inicial, do tamanho da molécula, da anatomia e do sistema radicular da planta, entre outros (Chaudhry *et al.*, 2005).

O diclofenac apresenta um elevado consumo a nível mundial, e também no nosso país, como foi referido no ponto 1.3.1. O mesmo é utilizado para reduzir a inflamação e aliviar a dor, funcionando como um analgésico em situações de artrite ou lesões agudas, sendo posteriormente eliminado sob a forma de glucuronídeos e sulfatos conjugados dos metabolitos. Destes, cerca de 65% da dose administrada é excretada pela urina, e menos de 1% é excretado sob a forma inalterada (Ferreira e Ferreira, 2006).

A furosemida pertence à classe dos diuréticos tendo como função intensificar a excreção da urina e sódio pelo organismo, sendo principalmente utilizada em

situações de insuficiência cardíaca e renal, síndrome nefrótica, edema, cirrose e hipertensão (Isidoi *et al.*, 2006). A furosemida tem sido detetada em amostras ambientais, sobretudo em águas residuais com concentrações na ordem dos $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo ainda referido que a percentagem de remoção nas ETARs ronda os 60% (Luo *et al.*, 2014).

De facto, ambos os fármacos seleccionados para o presente estudo são consumidos em todo mundo bem como em Portugal, sendo frequentemente detetados em águas naturais (superficiais e subterrâneas), em efluentes de ETARs e mesmo em águas para consumo humano, o que indica que a sua remoção nas ETARs convencionais é deficiente. Prova disso é um artigo publicado recentemente que faz referência à deteção de diclofenac e de furosemida, entre janeiro de 2017 e novembro de 2018, em quatro zonas da bacia do Guadiana. A tabela 1.6 engloba os valores encontrados nessas zonas, sendo as zonas do Zebro e dos Álamos as mais contaminadas (Palma *et al.*, 2020).

Tabela 1.6 Deteção de diclofenac e furosemida em 4 zonas da bacia do Guadiana. Frequência de Deteção (FD %), média (Méd ng L^{-1}), máximo (Máx ng L^{-1}) (Palma *et al.*, 2020).

	Amieira			Zebro			Álamos			Lucefécit		
	FD	Méd	Máx	FD	Méd	Máx	FD	Méd	Máx	FD	Méd	Máx
Dic	82	23.73	72.45	100	808.33	4208	100	1152.57	4806	89	18.09	80.25
Fur	18	5.49	9.90	92	886.79	6894	100	288.87	1073.4	33	16.46	43.91

1.3.4. Processos de remoção dos fármacos nas ETARs

As ETARs convencionais, como já foi referido anteriormente, são consideradas uma das principais fontes de introdução de fármacos no ambiente. Na tabela 1.7 apresentam-se as concentrações típicas de alguns dos fármacos mais frequentemente detetados em estudo nas águas residuais e nos efluentes tratados bem como as suas percentagens de remoção em algumas ETARs.

Tabela 1.7 Detecção de fármacos em águas residuais e eficiência de remoção em ETARs (adaptado de Luo *et al.*, 2014; Deblonde *et al.*, 2011).

Classes de fármacos	Substância	Influyente (µg/L)	Efluente (µg/L)	Remoção (%)
Anti-inflamatório/Analgésico	Ibuprofeno	0,004-603	ND-55	72-100
	Diclofenac	0,001-94,2	0,001-0,69	0-81,4
	Ácido Mefenâmico	0,017-1,27	0,005-0,39	0-70,2
	Naproxeno	0,002-52,9	0,002-5,09	43,3-98,6
Antibiótico	Tetraciclina	48	2,375	95,1
	Eritromicina	0,14-10,0	0,02-2,84	0-82,5
	Sulfametoxazol	0,003-0,98	0,003-1,15	4-88,9
	Trimetoprim	0,06-6,80	0,01-3,05	0-81,6
Beta-bloqueadores	Metopropol	0,002-1,52	0,003-0,25	3-56,4
	Atenolol	0,1-33,1	0,13-7,60	0-85,1
Reguladores Lipídeos	Ácido clofíbrico	0-0,74	ND-0,33	0-93,6
	Gemfibrozil	0,10-17,1	0,0025-5,24	0-92,3
Anti-epilépticos	Carbamazepina	0,04-3,78	0,005-4,60	0-62,3
Estimulantes	Cafeína	0,22-209	ND-43,50	49,9-99,6
Diuréticos	Furosemida	0,413	0,166	59,8

Como se pode verificar na tabela 1.7, a eficiência de remoção nas ETARs convencionais de muitos fármacos, incluindo o diclofenac e a furosemida, é frequentemente baixa e variável, dependendo de fatores como a composição das águas residuais, as condições climáticas, o tipo de tratamento utilizado e as condições de operação do processo de tratamento (pH, condições redox, tempo de retenção hidráulico, idade das lamas).

De fato as ETARs convencionais são projetadas e otimizadas de forma a removerem os denominados poluentes convencionais que se encontram presentes com concentrações relativamente elevadas, nomeadamente a matéria orgânica dissolvida

que é facilmente biodegradável, os sólidos em suspensão, os agentes patogénicos e os nutrientes. Não se mostrando no geral eficientes no tratamento de poluentes emergentes presentes em concentrações muito baixas e em muitos casos dificilmente biodegradáveis, como é o caso dos fármacos.

No tratamento de águas residuais em ETARs são utilizados diferentes processos físicos, químicos e biológicos, correspondentes às diversas etapas de tratamento do efluente (Gonçalves, 2017). As principais etapas de tratamento são o pré-tratamento, o tratamento primário, o tratamento secundário e em alguns casos um tratamento terciário como ilustrado na figura 1.2.

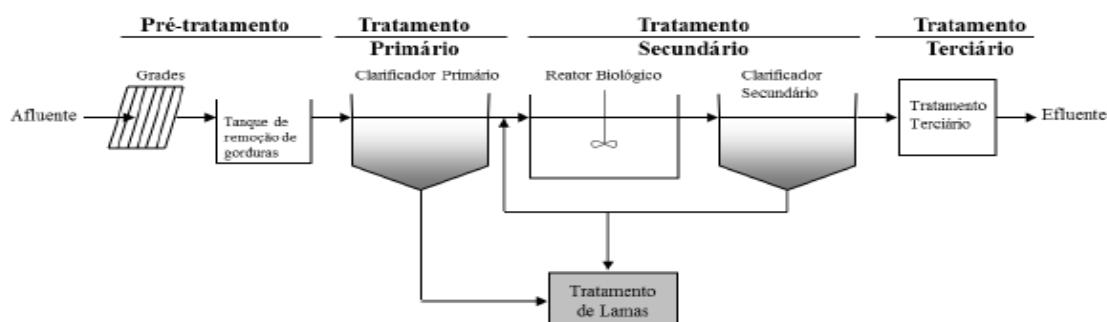


Figura 1.2 Esquema de um sistema convencional de tratamento de águas residuais (adaptado Tchobanoglous *et al.*, 2003; Dordio e Carvalho, 2015).

Durante o pré-tratamento, o objetivo principal é a remoção dos sólidos de grandes dimensões. No tratamento primário são removidos os sólidos em suspensão, as gorduras e alguma matéria orgânica dissolvida. Nestas duas etapas ocorre pouca eliminação de micropoluentes orgânicos e, também não são esperadas remoções significativas de fármacos. Nestas etapas existe uma baixa atividade microbiológica e desta forma qualquer remoção de fármacos deve-se à sua adsorção às partículas dos sólidos suspensos que são removidas nos sedimentadores (Luo *et al.*, 2014, Dordio e Carvalho, 2015).

O tratamento secundário tem como objetivo principal a remoção de matéria orgânica facilmente biodegradável, sendo normalmente um processo essencialmente biológico. Contudo, este tipo de tratamento apresenta uma capacidade limitada na remoção de muitos fármacos presentes nas águas residuais, nomeadamente os mais difíceis de biodegradar (Luo *et al.*, 2014; Dordio e Carvalho, 2015).

As etapas referidas anteriormente não são suficientemente eficientes na remoção de fármacos das águas residuais, sendo necessário recorrer a tratamentos complementares, designadamente os tratamentos avançados ou terciários, como

sejam a oxidação química (ozonização, oxidação catalítica), os processos de membrana e a adsorção em carvão ativado (Gomes *et al.*, 2017, Quesada *et al.*, 2019, Khanzada *et al.*, 2020). Embora vários destes processos sejam muito eficientes na remoção de diversos fármacos não são em geral utilizados em larga escala por serem relativamente caros e difíceis de implementar nas ETARs (Gomes *et al.*, 2017; Zaied *et al.*, 2020). Por outro lado, alguns destes processos originam poluição secundária como por exemplo produtos de transformação tão ou mais tóxicos do que os próprios fármacos (Luo *et al.*, 2014, Tiwari *et al.*, 2017, Tran *et al.*, 2018, Felis *et al.*, 2020).

Torna-se assim necessário estudar processos complementares ou alternativos que permitam uma elevada eficiência na remoção de fármacos e que sejam economicamente viáveis e que não originem produtos tóxicos. Alguns estudos têm sido feitos nos últimos anos, tendo-se demonstrado que os leitos construídos de macrófitas (LCMs) apresentam uma elevada capacidade de remoção de vários compostos orgânicos, incluindo alguns fármacos (Dordio *et al.*, 2010; Soares, 2012; Dordio e Carvalho, 2013a; Ávila *et al.*, 2014; Verlicchi e Zambello, 2014; Vystavna *et al.*, 2017, Dordio e Carvalho, 2018; Li *et al.*, 2020; Llyas e Hullebusch, 2020).

1.3.5. Leitos construídos de macrófitas como possível tecnologia de tratamento de águas contaminadas com fármacos

Há bastante tempo que é reconhecida a capacidade das zonas húmidas naturais para depurar águas poluídas às quais estejam expostas. Com a construção de leitos de macrófitas procura-se reproduzir e otimizar, em ambiente controlado, os principais mecanismos de depuração de poluentes que ocorrem nas zonas húmidas naturais, podendo assim tirar benefícios das vantagens que estes ecossistemas apresentam, como sejam, uma boa integração paisagística e o reduzido consumo de energia e reagentes químicos (Cooper *et al.*, 1996; Oliveira, 2009; Dordio e Carvalho, 2018).

Estes sistemas têm sido usados, principalmente, como processos alternativos ou complementares, aos sistemas de tratamento de efluentes domésticos, de pequenos aglomerados populacionais, tendo-se revelado muito eficientes na remoção de poluentes convencionais. Recentemente, estes sistemas foram testados com sucesso no tratamento de diferentes efluentes industriais e agrícolas. Em consequência deste alargamento dos domínios de aplicação dos LCMs, surgiram estudos e aplicações destes para a remoção de uma variedade de poluentes de águas, em particular daqueles que são mais recalcitrantes, onde se incluem vários fármacos (Dordio *et al.*, 2009b; Oliveira, 2009; Dordio *et al.*, 2010; Dordio e Carvalho, 2013a; Ávila *et al.*, 2014;

Verlicchi e Zambello, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016, Dordio e Carvalho, 2018; Li *et al.*, 2020; Llyas e Hullebusch, 2020).

Estes sistemas apresentam baixo custo de construção, manutenção e de mão-de-obra, podendo ser usados como tratamento secundário ou terciário de efluentes. Como principal desvantagem é referida a necessidade de uma grande área para a sua instalação, em comparação com os sistemas tradicionais. Os sistemas necessitam também de um período de adaptação entre a vegetação e as populações microbianas e apresentam alguma sazonalidade, na eficiência do tratamento, que é dependente das épocas vegetativas e não vegetativas, e das condições meteorológicas (Cooper *et al.*, 1996; Kadlec e Wallace, 2009; Oliveira, 2009; Dordio e Carvalho, 2018).

Os LCMs podem ser classificados de acordo com o tipo de vegetação implementada em: flutuantes, submersas ou emergentes, como apresentado nas figuras seguintes.



Figura 1.3 Sistema de macrófitas aquáticas flutuantes (adaptado de Dordio *et al.*, 2008).

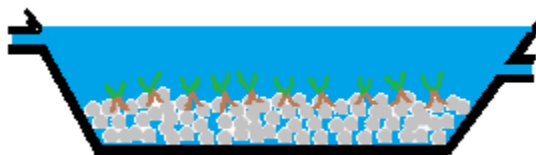


Figura 1.4 Sistema de macrófitas aquáticas submersas (adaptado de Dordio *et al.*, 2008).

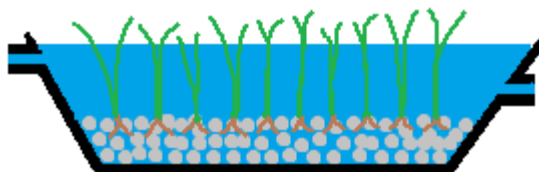


Figura 1.5 Sistema de macrófitas aquáticas emergentes (adaptado de Dordio *et al.*, 2008).

Os LCMs com plantas emergentes podem ainda ser classificados de acordo com o regime de escoamento em dois grandes grupos (Kadlec e Wallace, 2009):

- ✓ Escoamento superficial: o efluente percorre um leito preenchido com água e plantas aquáticas;
- ✓ Escoamento sub-superficial: o efluente percorre um leito preenchido com um meio poroso, normalmente gravilha, que se encontra plantado com plantas macrófitas. Os leitos de fluxo sub-superficial podem ainda ser diferenciados de acordo com a direção do escoamento em fluxo horizontal, fluxo vertical, ou híbridos, se estiver presente uma combinação de ambos (Vymazal, 2003).

Na figura 1.6 encontram-se as diferentes subdivisões dos LCMs:

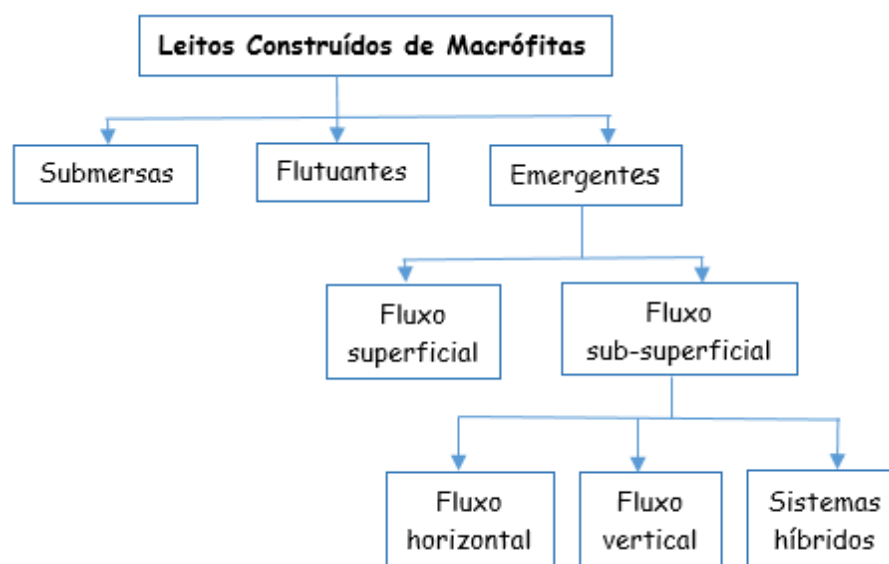


Figura 1.6 Diferentes subdivisões dos LCMs (adaptado de Dordio *et al.*, 2008).

1.3.5.1. Principais processos de remoção dos fármacos em LCM com escoamento sub-superficial

A remoção de compostos orgânicos xenobióticos em LCMs envolve vários processos inter-dependentes. Os processos de remoção de poluentes nos LCMs podem ainda ser distinguidos em bióticos, quando são levados a cabo por organismos vivos, tais como plantas e microrganismos, ou abióticos, quando decorrem de processos físicos ou químicos. Muitos destes processos são essencialmente os mesmos que ocorrem em zonas húmidas naturais e que são responsáveis pelo destino dos fármacos presentes no ambiente. Os LCMs diferem dos sistemas naturais, visto que os

primeiros podem ser otimizados de forma a remover um conjunto específico de poluentes.

Os processos abióticos e bióticos que têm um papel relevante na remoção de poluentes orgânicos xenobióticos, estão apresentados na figura 1.7:

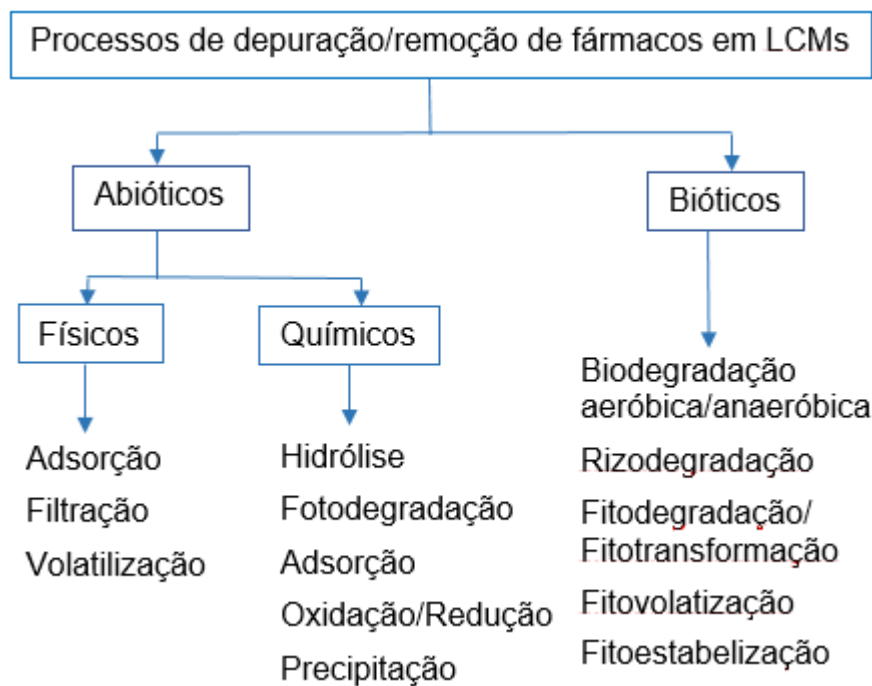


Figura 1.7 Principais processos de depuração/redução de fármacos em LCM.

De uma maneira geral, pode-se referir que, nos LCMs os fármacos podem ser removidos do efluente por retenção na matriz de suporte do LCMs, na biomassa, por biodegradação, rizodegradação, absorção pelas plantas e possível metabolização ou transformação química, ou ainda através de perdas para a atmosfera (Dordio e Carvalho, 2013a; Dordio e Carvalho, 2018).

A extensão com que cada processo contribuirá para a remoção global dos fármacos, de uma água residual, dependerá dos mesmos fatores que influenciam os processos que ocorrem no ambiente. Entre estes fatores salientam-se a estrutura molecular, polaridade, constante de ionização, solubilidade em água, hidrofobicidade, afinidade para sorção, volatilidade e persistência do fármaco e as condições ambientais, tais como a temperatura, a precipitação e a luz solar. Alguns fatores adicionais são específicos dos LCMs, nomeadamente as características da água residual (pH, presença de matéria orgânica, condições redox), o desenho do LCM (material da matriz de suporte, biota, layout do sistema, tipo de escoamento, velocidade de

escoamento) e os parâmetros de operação (tempo de retenção hidráulica e níveis de oxigénio dissolvido) (Dordio e Carvalho, 2013a; Dordio e Carvalho, 2018).

O conhecimento da forma como estes processos de remoção de fármacos se influenciam mutuamente é extremamente útil na identificação das vantagens, das limitações e das potenciais aplicações dos LCMs. Além disso, o desenho do sistema, que inclui a seleção dos seus componentes (espécies de plantas, materiais usados como matriz de suporte, e também a possibilidade de inoculação do meio com diferentes estirpes de microrganismos) será melhor orientada e sucedida se forem conhecidos os vários papéis e inter-dependências de cada componente do LCM.

1.3.5.2. Papel dos componentes dos LCM na remoção dos fármacos

Os componentes fundamentais dos LCM são a vegetação (macrófitas), a matriz de suporte e os microrganismos. A ação concertada destes 3 componentes, com base nos processos de remoção descritos anteriormente, é responsável pela remoção dos poluentes no sistema (Dordio e Carvalho, 2013a, Dordio e Carvalho, 2018). Na figura 1.8 estão esquematizadas as inter-relações existentes entre a matriz de suporte, a vegetação e os microrganismos.

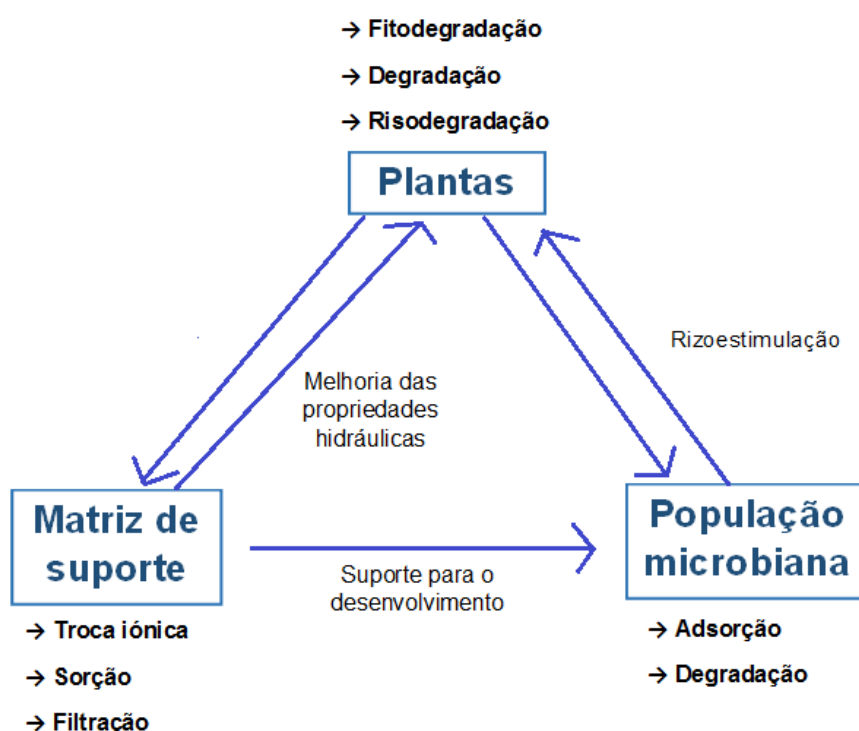


Figura 1.8 Interação dos componentes de um LCM (adaptado de Dordio e Carvalho, 2013a).

Em muitos dos estudos em que é avaliada a eficiência dos LCMs na remoção dos fármacos, os mesmos são tratados como uma “caixa negra”, sendo apenas avaliada a eficiência global do sistema. São ainda relativamente poucos os estudos sobre a contribuição de cada uma das componentes para os processos globais de remoção dos fármacos. A eficiência dos LCMs na remoção de poluentes pode ser significativamente melhorada através de uma seleção dos componentes de forma a maximizar o papel desempenhado por cada um deles (Dordio e Carvalho, 2013a, Dordio e Carvalho, 2018). Torna-se imperativo proceder a uma caracterização detalhada dos papéis de cada componente do LCM, na eficiência global de remoção dos fármacos, em função da substância envolvida, de forma a alcançar uma otimização do desenho do sistema.

1.3.5.2.1. Papel da matriz de suporte na remoção dos fármacos

A matriz de suporte utilizada nos LCMs influencia a forma como os processos físicos, químicos e biológicos ocorrem durante a depuração do efluente no sistema. A mesma contribui de forma direta, através dos processos de adsorção, e de forma indireta, para a depuração dos poluentes, através do provisionamento de um substrato sólido para o crescimento das plantas e para o desenvolvimento da população microbiana (Sundaravadivel e Vigneswaran, 2001, Dordio e Carvalho, 2013a).

De forma a maximizar a influência positiva da matriz de suporte no desempenho dos LCMs, a escolha dos materiais para a sua construção deve ser criteriosa. Os componentes da matriz irão influenciar a respetiva capacidade de troca iónica, a área superficial específica disponível, a condutividade hidráulica, o poder tampão do pH, a capacidade de adsorção, a permeabilidade ou a capacidade de drenagem e, na generalidade, a eficiência do sistema (Dordio e Carvalho, 2013a, Dordio e Carvalho, 2018).

Estudos anteriores demonstraram que, alguns materiais, como os agregados de argila expandida (Light Expanded Clay Aggregates – LECA) e a vermiculite, têm a capacidade de adsorver alguns fármacos dissolvidos em águas contaminadas. Estes materiais têm sido muito utilizados, pois apresentam uma elevada porosidade e condutividade hidráulica bem como um baixo custo de aquisição (Dordio *et al.*, 2009, Dordio *et al.*, 2009b; Dordio *et al.*, 2010; Dordio *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2017, Thiebault, T., 2020).

Devido às características destes dois materiais argilosos, a sua mistura possibilita um bom desenvolvimento das plantas e um contacto efetivo com os poluentes, apresentando-se como uma boa opção, para a constituição da matriz de suporte, em

LCMs, a utilizar no decorrer deste trabalho. A possibilidade de alterar a composição da matriz de suporte, através da incorporação de pequenas quantidades de carvão ativado, que é um material adsorvente com elevadas capacidades de adsorção, face a vários poluentes orgânicos (Cansado *et al.*, 2018; Cansado *et al.*, 2019), será também alvo de estudo.

1.3.5.2.2. Papel da vegetação e da população microbiana na remoção dos fármacos

Os LCMs são considerados sistemas essencialmente biológicos, e os componentes bióticos (vegetação e população microbiana) têm um papel fundamental nos processos de remoção de muitos poluentes. Os microorganismos têm uma função fulcral na transformação e mineralização de nutrientes e poluentes orgânicos, sobretudo na remoção de xenobióticos orgânicos (Dordio e Carvalho, 2013a; Dordio e Carvalho, 2018). A biodegradação pode ocorrer em condições aeróbias e anaeróbias, além disso, a degradação xenobiótica, realizada pelos microorganismos, é também influenciada pelo meio de suporte onde as populações microbianas crescem, pela temperatura, pH, presença de substâncias tóxicas e nutrientes disponíveis. A eficiência, que é avaliada pela taxa de degradação xenobiótica e pelo crescimento microbiano, é altamente variável, sendo influenciada pelo tipo de compostos orgânicos bem como pela respetiva estrutura química xenobiótica. Os compostos com estrutura simples, alta solubilidade em água e baixa adsorção, apresentam maior semelhança com as substâncias existentes no meio ambiente, e que são usadas como fonte de energia pelos microorganismos, deverão ser mais facilmente degradados (Dordio e Carvalho, 2013a).

Quanto às plantas utilizadas nos LCMs são denominadas de macrófitas, tendo a especificidade de estarem adaptadas à vida em meio aquático, possuindo sistemas internos de ventilação para oxigenar os seus tecidos submersos. As plantas são uma parte essencial dos LCMs, pois contribuem de forma direta para a remoção/degradação de diversos tipos de poluentes através de processos como a absorção, adsorção, metabolização, acumulação, volatilização e exsudação de enzimas, que ajudam na degradação de poluentes na rizosfera (Dietz e Schnoor, 2001; Dordio e Carvalho, 2018). De forma indireta as macrófitas contribuem para a estimulação e desenvolvimento da população microbiana na rizosfera, contribuem ainda para um bom enquadramento paisagístico (Kadlec e Wallace, 2009; Dordio e Carvalho, 2018).

Foram identificadas várias espécies de macrófitas que podem ser utilizadas nos LCMs, como por exemplo o *Phragmites australis* (caniço), o *Scirpus spp.* (bunho) ou a *Typha spp.*. A *Typha spp.* é uma das plantas mais utilizadas em LCMs usados para o tratamento de efluentes contaminados com xenobióticos orgânicos, incluindo os fármacos, estando a sua eficiência já comprovada (Dordio e Carvalho, 2018). De salientar que, a *Typha spp.* apresenta um crescimento rápido e é pouco vulnerável a variações no seu habitat.

A *Typha* é uma planta herbácea aquática ou palustre, com uma altura média que varia entre 1,5 e 3 metros, um diâmetro entre 0,9 e 2 cm, no centro, e de 0,3 a 0,6 cm perto das folhas. Cada rebento pode conter entre 12 a 16 folhas e os rizomas são robustos com cerca de 0,6 a 3,2 cm de diâmetro, indo até aos 70 cm de comprimento. Esta espécie tem tendência a desenvolver-se em solos com grandes quantidades de matéria orgânica, podendo igualmente crescer em solos minerais e de textura fina, ácidos ou alcalinos, (cujo pH pode variar entre 4 e 10) e que tenham matéria orgânica nas camadas superficiais. Estas plantas podem ser semeadas ou transplantadas na forma de rebentos, sendo o verão a altura ideal para se realizarem estas operações. As mesmas têm uma propagação muito rápida, podendo mesmo tornar-se espécies invasoras (Mavioso, 2010).

Em Portugal, e em particular no Alentejo, a *Typha domingensis* é a espécie que predomina, como indicado na figura 1.9, sendo uma das razões para a sua seleção para a realização deste estudo.

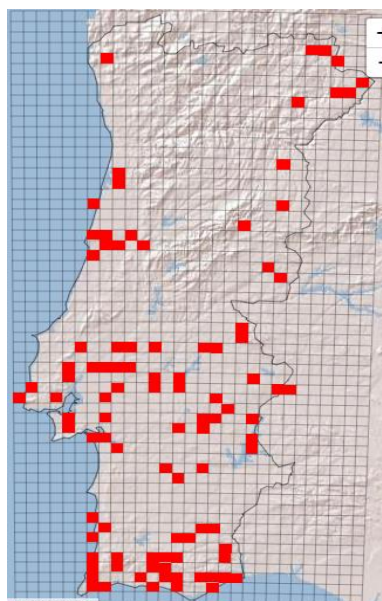


Figura 1.9 Distribuição da *Typha domingensis* em Portugal (Carapeto *et al.*, 2020).

1.3.5.3. Carvão Ativado

De forma a aumentar a eficiência do tratamento nos LCMs, ou para aplicação em situações de emergência em que se pretenda uma remoção rápida de poluentes presentes nos efluentes líquidos, o carvão ativado (CA) pode ser utilizado de forma eficiente, sendo normalmente utilizado nos processos descontínuos, na forma de pó (tamanho de partícula < 0.177 mm) ou em contínuo e também para adsorção de gases, na forma granular (tamanho de partícula $> 0,177$ mm) (Lopes, 2016).

Os carvões ativados são materiais altamente porosos que apresentam uma forma essencialmente amorfa e não grafítica, tendo sofrido durante a sua produção um processo de ativação, permitindo deste modo aumentar a respetiva porosidade interna. Os mesmos apresentam um volume poroso e área superficial, que podem ser superiores a $1.0 \text{ cm}^3/\text{g}$ e a $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ respetivamente, sendo que esta última pode atingir os $3200 \text{ m}^2/\text{g}$ (Cansado *et al.*, 2018). O CA é um material composto maioritariamente por átomos de carbono, ao qual crescem inúmeros heteroátomos, tais como: os halógenos, o oxigénio, o nitrogénio, o hidrogénio e o enxofre, que contribuem para a formação dos diferentes grupos funcionais presentes na sua superfície (Cansado *et al.*, 2018).

Os carvões ativados podem apresentar-se sobre diferentes formas e tamanhos, tais como pó, granulados, fibras, tecidos entre outros. Os mesmos podem ser utilizados em diversas fileiras industriais, com diferentes funções, tais como peneiros moleculares, adsorventes, catalisadores ou suporte de catalisadores, entre outras, sendo aplicados, por exemplo, na purificação de gases, de produtos químicos, farmacêuticos e industriais, e no tratamento de águas residuais ou para consumo humano. As diferentes aplicações, e em particular a capacidade de adsorção de vários poluentes, depende da existência de poros no seu interior, que são classificados consoante o seu tamanho médio em microporos (dimensão $< 2\text{nm}$), mesoporos ($2 \text{ nm} < \text{dimensão} < 50 \text{ nm}$) e macroporos (dimensão $> 50 \text{ nm}$) (Cansado, 2003; Lopes, 2016).

A remoção de poluentes dos efluentes líquidos por CA baseia-se em processos de adsorção, podendo a mesma ocorrer na forma química (quimissorção) ou física (fississorção). No primeiro caso, ocorre uma interação mais forte devido à afinidade química entre o adsorvente e o adsorvato, onde se estabelecem ligações químicas entre os dois. No caso da adsorção física ocorre uma interação relativamente fraca entre o adsorvente e o adsorvato, envolvendo forças de ação intermoleculares fracas, principalmente do tipo de Van der Waals (Cansado *et al.*, 2010; Castellan, 2011).

Os fenómenos de adsorção em carvão ativado são de natureza predominantemente

física. Quando o CA é colocado em contato com o soluto, que se encontra numa solução, há um decréscimo da concentração do soluto na fase líquida, como consequência do aumento da sua concentração na superfície do carvão ativado, até que o equilíbrio seja atingido, ou seja, até que a superfície do CA fique saturada.

Apesar da superfície disponível e do processo de adsorção estarem intimamente interligados, outros fatores são também determinantes, tais como: a química superficial, o volume poroso e o tamanho e a distribuição de tamanho de poros. São estes fatores que permitem controlar o acesso das moléculas de adsorvido à superfície interna do carvão ativado (Cansado *et al.*, 2010; Castellan, 2011).

Para além das características do adsorvente, também as características do adsorvido e do meio onde o mesmo se encontra, como o tamanho do adsorvido e a polaridade, a solubilidade em água, o pKa e o pH da solução, a viscosidade, a temperatura e ainda o tempo de contato entre os adsorvente e adsorvido podem afetar a eficiência da adsorção de modo significativo (Cansado *et al.*, 2010; Castellan, 2011).

Na figura 1.10 está ilustrado, de uma forma geral, como decorre a adsorção de um poluente na superfície e no interior dos poros dos CA.

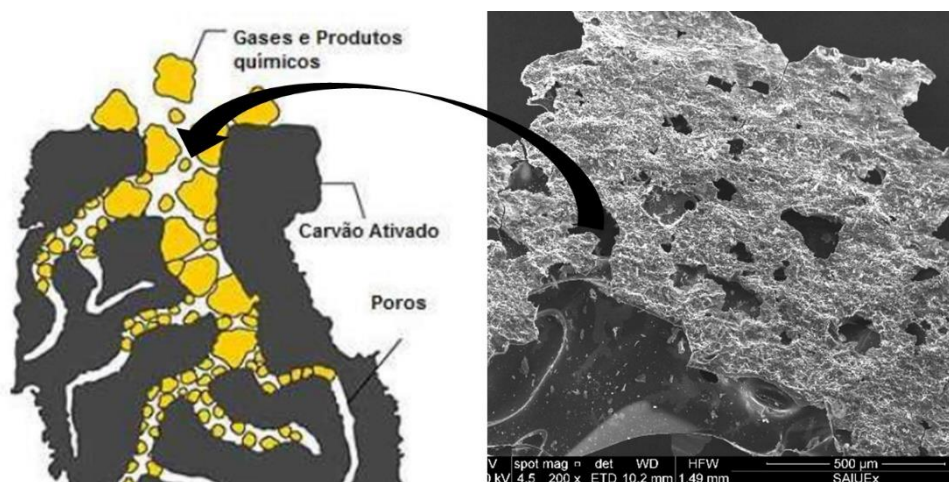


Figura 1.10 Adsorção por carvão ativado (Parcialmente adaptado de NaturalTec, 2010)

Teoricamente, qualquer matéria-prima carbonácea pode ser utilizada como precursor para a produção de um CA. A sua produção pode ser conseguida com base em dois processos diferentes, ou sejam a ativação física e a ativação química. (Lopes, 2014). A ativação física é realizada em duas etapas consecutivas, uma primeira etapa designada por carbonização e a ativação propriamente dita, que ocorre normalmente a temperaturas elevadas, como descrito seguidamente:

- **A carbonização** é uma etapa durante a qual o precursor é submetido a elevadas temperaturas e durante esta etapa, a água e os compostos orgânicos mais voláteis são removidos, restando no final um material composto essencialmente por átomos de carbono e que possui uma estrutura com alguns poros, mas que estão ainda pouco abertos. Esta etapa ocorre antes da ativação física e é realizada sobre um fluxo de gás inerte, para minimizar os fenómenos de oxidação, sendo normalmente utilizado para esse fim o nitrogénio (Lopes, 2014) pois a presença de oxigénio conduz a uma oxidação completa da matéria-prima, ficando no final apenas cinzas.

- **A ativação física** permite a formação de novos poros ou a abertura de alguns poros que foram formados durante o processo de carbonização, levando ao aparecimento de uma estrutura mais aberta onde os poros já estão bem desenvolvidos. A ativação tem lugar após a carbonização, onde o gás inerte, ou seja, o nitrogénio é substituído por outros gases, designados de agentes ativantes, tais como o ar, o vapor de água ou gás carbónico, os quais atravessam o material, que se encontra normalmente a temperaturas elevadas (entre os 800 a 1000°C) (Lopes, 2014). Durante esta etapa ocorrem reações entre os agentes ativantes e o material carbonáceo levando à formação de gases, como o monóxido de carbono e ao desenvolvimento de uma estrutura porosa aberta (Cansado, 2003).

- **A ativação química** é conseguida com recurso a agentes químicos ativantes. Os agentes químicos mais utilizados são o ácido fosfórico, o cloreto de zinco, os hidróxidos de sódio ou de potássio e o carbonato de potássio, entre outros (Cansado, 2019). Neste caso, o material carbonáceo, que é utilizado como matéria-prima ou precursor, é colocado em contato com o agente químico ativante antes de ser introduzido no forno e submetido a um processo de aquecimento, durante o qual alguns parâmetros são controlados. A ativação química é feita a temperaturas normalmente inferiores às utilizadas durante a ativação física. A libertação de gases que são produzidos durante o processo de ativação química ajudam ao desenvolvimento da porosidade.

- Após a ativação química, o material restante é retirado do forno e o agente ativante que não reagiu durante o processo é removido do contato com o CA, com recurso a várias lavagens sucessivas, com água destilada (Cansado, 2019). No final de qualquer um dos processos de produção, os carvões ativados podem ser

submetidos a uma etapa de peneiramento e moagem, o que proporciona a classificação granulométrica (Lopes, 2014).

Embora o carvão ativado seja um dos adsorventes mais utilizados na adsorção de moléculas presentes em fase líquida ou gasosa, o mesmo ainda apresenta um custo de produção relativamente elevado, pelo que deve ser sempre feita uma ponderação e avaliação entre o custo/benefício da sua utilização.

Na realidade, os CA são frequentemente referidos como tendo excelentes propriedades de adsorção, que advém da sua enorme área superficial interna e ao seu volume de poros bem desenvolvido. Entre as várias aplicações destaca-se a remoção de impurezas dissolvidas em solução e a capacidade de armazenar seletivamente gases, líquidos ou impurezas no interior dos seus poros, apresentando portanto um excelente poder de clarificação, desodorização e purificação de líquidos ou gases (Belo, 2017; González-García, 2018), sendo por estas razões um bom material para adicionar e otimizar o desempenho de uma matriz de suporte de LCM, composta originalmente por LECA e vermiculite.

1.3.6. Métodos analíticos de quantificação de fármacos

Como já foi referido em pontos anteriores, reconhece-se a existência de vários fármacos no meio ambiente, sendo que esse conhecimento só foi possível graças aos métodos analíticos que permitem a sua extração, identificação e quantificação em diversas matrizes biológicas e ambientais (Huerta *et al.*, 2012).

Devido à instrumentalização, à precisão e à sensibilidade dos métodos analíticos, é possível detetar, quantificar e identificar quantidades vestigiais (na gama dos $\mu\text{g/L}$ e ng/L) de resíduos de produtos farmacêuticos presentes em diversas matrizes (Fent *et al.*, 2006).

Existem assim várias técnicas que podem ser utilizadas, como por exemplo a espectrometria de absorção atómica, espectrofotometria de absorção molecular (UV/Vis), a electroforese capilar, espectrofluorimetria e alguns métodos voltamétricos. Refira-se também a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à espectrometria de massa (LC-MS ou LC-MS/MS) (mais aplicada na análise de compostos polares, não voláteis e termicamente instáveis) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS ou GC-MS/MS) (mais indicada para identificação de compostos voláteis e termicamente estáveis) são atualmente as técnicas mais utilizadas para a quantificação de fármacos em amostras ambientais (Baker e Kasprzyk-Hordern, 2011).

Para a realização deste trabalho o método escolhido para a quantificação de fármacos foi o HPLC/UV-Vis. Esta técnica apresenta como vantagens: a sua elevada sensibilidade, conseguindo mesmo com reduzidas quantidades de amostra separar as substâncias químicas aí presentes; versatilidade, pode ser utilizada para a identificação/quantificação de compostos orgânicos ou inorgânicos e os analitos podem ser iónicos ou covalentes; rapidez de análise, é uma técnica que possibilita a separação dos compostos em poucos minutos; alta resolução, possibilita a deteção de mais de duzentas substâncias diferentes, contudo é necessário proceder a uma etapa de otimização de alguns parâmetros para que se consiga obter melhores resoluções para as substâncias pretendidas; automatização, permite a programação do equipamento para realizar a injeção de amostras de forma automática, bem como a impressão dos cromatogramas obtidos com os tempos de retenção e áreas de cada composto analisado, oferece também uma boa precisão e exatidão nos resultados (Costa, 2019).

Como desvantagens, este método apresenta: o custo relativamente elevado, tanto o equipamento como os consumíveis têm um preço elevado; conhecimentos técnicos especializados, para a utilização do equipamento de HPLC/UV-Vis é necessário que o operador tenha conhecimentos teóricos e acompanhe a realização prévia de alguns trabalhos, antes de se tornar autónomo, isto porque, o equipamento requer a otimização de alguns parâmetros específicos consoante as amostras a analisar e é uma técnica pouco amiga do ambiente (as fases móveis incluem, geralmente, solventes orgânicos) (Costa, 2019).

Para a realização da análise das amostras em HPLC/UV-Vis é necessário proceder à preparação das mesmas, sendo possível utilizar várias técnicas que têm como finalidade aumentar a sua concentração, tornar o método mais robusto e reproduzível, através da eliminação de potenciais interferências. Pode ainda ser necessário converter o analito através do ajuste de pH do meio numa forma mais adequada à sua quantificação (Rodrigues, 2013). Quando necessária, a limpeza das amostras pode ainda ser feita com recurso à extração em fase sólida (SPE) (Comerton *et al.*, 2009).

II Metodologia Experimental

2. Metodologia experimental

2.1. Reagentes e material

Para a realização dos vários ensaios experimentais, ao longo deste trabalho, foram utilizadas soluções aquosas preparadas a partir de quatro compostos farmacêuticos puros, ou seja, o diclofenac com pureza $\geq 99,0\%$, a furosemida com pureza $\geq 97,0\%$, o trimetoprim com pureza $\geq 98,0\%$ e o sulfametoxazol com pureza $\leq 100,0\%$, todos da Sigma Aldrich. Na tabela 2.1 apresentam-se as principais características e os fornecedores dos vários reagentes utilizados.

Tabela 2.1 Principais características das substâncias químicas utilizadas.

Substância química	Formula química	Riscos e segurança	Massa molar (g mol ⁻¹)	Grau de pureza (%)	Fabricante
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	Tóxico; inflamável	41,05		Merck
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	Corrosivo	98,00	85,0	JMGS
Água para HPLC	H ₂ O		18,02		Fischer chemical
Diclofenac	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	Nocivo	296,147	≥ 99	Sigma Aldrich
Furosemida	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	Nocivo	330,75	≥ 97	Sigma Aldrich
Metanol	CH ₃ OH	Tóxico Inflamável	32,04	99,8	VWR
Sulfametoxazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	Nocivo irritante	253,28	≤ 100	Sigma Aldrich
Trimetoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	Nocivo irritante	290,14	≥ 98	Sigma Aldrich

Numa primeira fase, para a composição da matriz de suporte a utilizar nos microcosmos de LCMs foram selecionados dois materiais argilosos, a vermiculite esfoliada (Aguiar & Mello Lda, Portugal) com granulometria 3 e os agregados de argila expandida (LECA) com granulometria 2/4 (MaxitGroup, Portugal).

Visualmente, os dois materiais argilosos apresentam aspetos diferentes e nas figuras 2.1 e 2.2 estão ilustradas a LECA e a vermiculite esfoliada utilizadas nos microcosmos do LCMs.



Figura 2.1 Imagens ilustrativas da LECA.

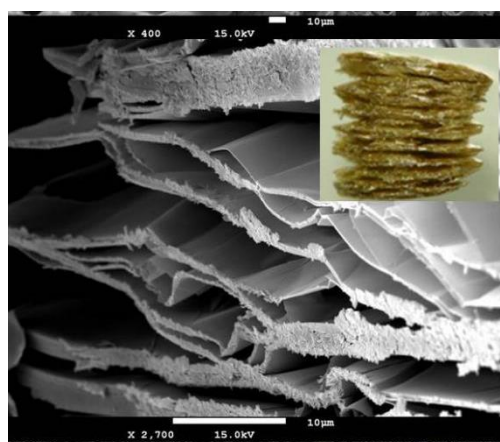


Figura 2.2 Imagens ilustrativas da vermiculite esfoliada.

De forma a remover as partículas finas e os sólidos em suspensão que os materiais apresentavam, devido ao desgaste mecânico, antes da respetiva utilização, os mesmos foram lavados sucessivamente com água ultra-pura (Fisher Chemical), sendo posteriormente secos numa estufa a uma temperatura de 105°C, durante 24 horas. Esta etapa também contribui para a redução da população microbiana presente no material.

A LECA e a vermiculite foram posteriormente misturadas uniformemente, na razão de 1:1 (v:v). A mistura destes dois materiais foi utilizada como matriz de suporte dos microcosmos de LCMs. Na tabela 2.2 são apresentados alguns dos parâmetros de caracterização física e química da vermiculite 3 e da LECA 2/4, que foram determinados em laboratório por outros elementos do grupo de investigação onde este trabalho se insere.

Tabela 2.2 Características da vermiculite e da LECA utilizadas (Dordio *et al.*, 2017).

Material	Vermiculite	LECA
Granulometria (mm)	3 (0.8-5)	2/4 (2-6.3)
Porosidade (%)	66 ± 1	49 ± 1
Densidade aparente (Kg m ⁻³)	88 ± 2	394 ± 10
pH (H ₂ O)	7,44 ± 0,06	9,04 ± 0,08

Com o intuito de aumentar a capacidade de remoção dos fármacos pela matriz de suporte, utilizada nos microcosmos, foram realizados estudos de adsorção conjunta, numa matriz composta pela LECA e pela vermiculite, mas à qual foram adicionadas pequenas quantidades de dois carvões ativados. Um dos carvões ativados encontrava-se sobre a forma de um pó fino, designado por Panreac (Panreac, Panreac Applichem) e o outro sobre a forma de um granulado mesh 12-40 (0,6-0,7 mm), designado por GAC-1240 X (Norit, Cabot Corporation). Algumas das principais características texturais e químicas destes dois CA foram determinadas em laboratório, por outros elementos do grupo de investigação onde este trabalho se insere, e são apresentadas na tabela 2.3.

Tabela 2.3 Principais características texturais e químicas dos CA utilizados.

Carvão ativado	A _{BET} /m ² g ⁻¹	V _{0.95} /cm ³ g ⁻¹	V ₀ /cm ³ g ⁻¹	L ₀ /nm	pH _{PCZ}
GAC-1240X	975	0,5	0,23	1,04	9,73
PANREAC-AC	941	0,41	0,23	0,97	8,12

Nas figuras 2.3 e 2.4 estão apresentadas duas imagens referentes aos CA utilizados no decorrer deste trabalho, à esquerda podemos ver uma imagem do CA sobre a forma de um pó fino (Panreac) e à direita um CA sobre a forma de granulado (Norit).

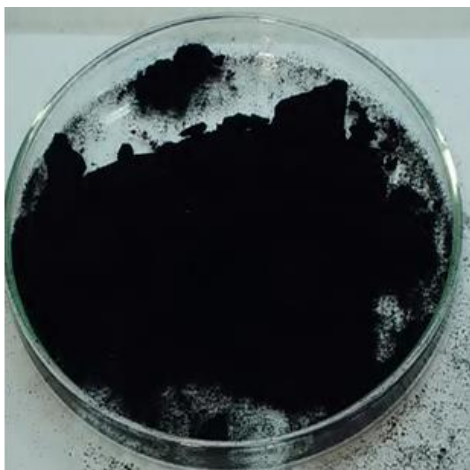


Figura 2.3 CA em forma de pó fino



Figura 2.4 CA em forma de granulado

2.2. Metodologia analítica

A técnica analítica utilizada para a quantificação do diclofenac e da furosemida em solução aquosa foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por UV-Vis, utilizando um equipamento Agilent 1100 system (Agilent technologies, Alemanha) equipado com detetor UV, com um injetor manual Rheodyne 7725i, sendo controlado através do software HP Chemstation.

Optou-se por esta técnica analítica porque as soluções utilizadas no decorrer deste trabalho, continham uma mistura de quatro fármacos (trimetoprim, furosemida, sulfametoxazol e diclofenac) pelo que era necessário recorrer a uma técnica que permitisse uma completa separação e quantificação seletiva de cada fármaco. Esta técnica é muito seletiva, sensível e oferece uma boa precisão e exatidão nos resultados, contudo acaba por ser um método relativamente moroso, dispendioso (devido à pureza elevada dos reagentes utilizados) e pouco amigo do ambiente (as fases móveis incluem, geralmente, solventes orgânicos). Entretanto, antes de se poder aplicar esta técnica analítica para a quantificação destes fármacos foi necessário proceder à otimização e validação do método.

2.2.1. Otimização das condições de quantificação dos fármacos por HPLC-UV-Vis

Para a obtenção dos melhores resultados na quantificação dos compostos em estudo foram identificados os valores de comprimento de onda (c.d.o.) onde as absorvâncias referentes à furosemida e ao diclofenac apresentam um valor máximo. Foi preparada uma solução de stock de 10 mg L^{-1} por pesagem de 0,1 g de cada um dos fármacos, tendo sido dissolvidos com 1% de metanol, sendo transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL, sendo este aferido com água desionizada. Para que as soluções não sofressem fotodegradação, em particular a furosemida, as mesmas foram armazenadas no escuro.

Numa primeira fase, o espectrofotómetro de absorção molecular foi utilizado para a obtenção do traçado dos diferentes espectros e permitiu verificar que a furosemida apresenta dois c.d.o. de absorvância máxima, um por volta de 229 nm e outro a 278 nm e o diclofenac apresenta um c.d.o. de absorvância máxima por volta de 275 nm. O respetivo espectro está apresentado em anexo. Estes valores foram também confirmados na literatura, chegando-se a valores de 229 e 276 nm para a furosemida (Patel e Solanki, 2012) e no caso do diclofenac a valores entre 275 e 276 (Lopes, 2016).

Como o trabalho foi realizado em conjunto com outros colegas de mestrado, que estudaram outros compostos, o varrimento de absorvância que foi efetuado na zona do ultravioleta entre os c.d.o. de 190 a 300 nm (Anexo I) permitiu a identificação dos c.d.o. de absorvância máxima para cada um dos quatro fármacos. Os vários espectros foram obtidos a partir de uma solução com uma concentração de 10 mg L^{-1} . No entanto, a concentração que se delineou testar nos ensaios de remoção dos fármacos, nos diferentes LCMs foi de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$.

2.2.1.1. Condições de quantificação dos fármacos no HPLC-UV-Vis

Para o doseamento dos quatro fármacos presentes na solução aquosa, entre os quais a furosemida e o diclofenac, foi utilizado um equipamento de HPLC-UV-Vis com uma coluna analítica de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, Alemanha) com dimensões de 250 mm x 4,6 mm e com um tamanho das partículas de $5,0 \mu\text{m}$. A fase móvel era um sistema binário de solventes, composto por: A – acetonitrilo, B – água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fosfórico (H_3PO_4), cuja composição foi otimizada no decorrer do trabalho.

A eluição ocorreu isocriticamente e de forma a obter uma separação efetiva dos quatro fármacos e reduzir o respetivo tempo de retenção, foram testadas diversas

composições entre acetonitrilo e água acidificada. Destes testes concluiu-se que a composição da fase móvel que permitia obter a separação dos quatro fármacos no menor período de tempo foi a constituída por 55% de acetonitrilo e 45% de água acidificada.

O perfil cromatográfico foi obtido com deteção UV-Vis ao c.d.o. de 270 nm, que embora não corresponda ao máximo de absorvância dos compostos estudados, permitiu a quantificação simultânea dos quatro fármacos presentes em solução (Anexo I).

As análises foram realizadas à temperatura ambiente, sendo o volume de amostra injetada de 20 μL e o caudal da fase móvel de 1 mL min^{-1} . Tendo-se procedido previamente a uma filtração de todas as amostras, com recurso a um filtro de 0.45 μm de membrana de nylon (Filtres Fioroni, França) e realizaram-se três replicas das injeções de cada amostra.

Em estudos anteriores, realizados por alguns colegas, tinha sido verificado que alguns fármacos (como é o caso da furosemida) ficam parcialmente retidos no filtro de membrana de nylon (Machado *et al.*, 2020). De forma a maximizar a percentagem de recuperação de todos os fármacos, antes de se proceder à filtração das várias amostras foi necessário otimizar o volume de solução a filtrar.

Para otimizar o volume de solução a filtrar, procedeu-se à filtração, com recurso a seringas de plástico de 10 mL (Ecoject, Portugal), de soluções com concentração de 2 mg L^{-1} dos compostos em estudo, com recurso a filtros de membrana de nylon 0.45 μm ($\text{Ø} = 25 \text{ mm}$) (Filtres Fioroni, França). Foram testados os volumes de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 mL. Em todos os ensaios, o último mililitro da filtração foi recolhido para ser submetido a uma posterior quantificação dos fármacos. Os ensaios de filtração das diferentes soluções foram feitos em triplicado. Para cada concentração testaram-se vários volumes até se obterem percentagens de recuperação da furosemida e do diclofenac de aproximadamente 100%.

A quantificação dos fármacos foi efetuada com recurso ao método do padrão externo. Prepararam-se uma série de soluções padrão com 9 concentrações entre 0,25 e 4,5 mg L^{-1} para cada um dos fármacos, por diluição da solução padrão, de stock de 10 mg L^{-1} , e desta forma construíram-se as retas de calibração. Foram realizadas 2 réplicas para cada solução padrão, as quais foram injetadas 3 vezes no equipamento de HPLC, após otimização das condições de trabalho. Os tempos de retenção (tr) foram de 3,4 min para a furosemida e de 10,2 min para o diclofenac.

2.2.1.2. Validação do método analítico

O método analítico foi avaliado através da determinação da exatidão, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), linearidade da reta de calibração e dos limites de detecção e quantificação, de acordo com o procedimento descrito no guia “ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 1994”.

Para a avaliação da exatidão e da repetibilidade do aparelho foram utilizadas 3 soluções com concentrações diferentes, numa gama de valores próximas das concentrações dos compostos utilizados nos ensaios. Ou seja, foram utilizadas uma solução de baixa concentração ($\sim 0,5 \text{ mg L}^{-1}$), outra de concentração média ($\sim 2 \text{ mg L}^{-1}$) e uma de concentração alta ($\sim 3 \text{ mg L}^{-1}$). Foram efetuadas 3 injeções sucessivas da mesma solução padrão, pelo mesmo utilizador e a composição da fase móvel, assim como as condições de eluição foram mantidas inalteradas. A exatidão, expressa em percentagem, foi calculada através da razão entre a média das concentrações determinadas experimentalmente e a concentração teórica, que era previamente conhecida (ICH, 1994). A repetibilidade foi avaliada com base na dispersão dos dados, ou seja, o desvio padrão relativo (% DPR) das áreas dos picos correspondentes a cada analito (ICH, 1994).

A reprodutibilidade do aparelho foi avaliada, através da realização de 3 injeções da mesma solução, em 5 dias diferentes, sendo utilizada uma solução com concentração de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cada um dos fármacos. A reprodutibilidade neste caso também foi avaliada como a dispersão ou desvio padrão relativo (% DPR) das áreas dos picos atribuídos a cada analito (ICH, 1994).

As retas de calibração foram obtidas através da representação gráfica das áreas obtidas nas 9 soluções padrão (com concentrações que variaram entre $0,25$ e $4,5 \text{ mg L}^{-1}$), em função das respetivas concentrações. O método dos mínimos quadrados (regressão linear) foi utilizado para a análise da correlação linear na gama de concentrações usadas, possibilitando assim a obtenção do declive e do coeficiente de determinação R^2 .

Os limites de detecção (LDI – Limite de Detecção Instrumental) e de quantificação (LQI – Limite de Quantificação Instrumental) do aparelho foram obtidos a partir da determinação da concentração do analito correspondente ao sinal do branco mais 3,3 e 10 vezes o desvio padrão, respetivamente (ICH, 1994).

2.3. Seleção do CA a utilizar

Os CAs são materiais adsorventes que apresentam uma cinética relativamente rápida no que se refere à remoção de muitos poluentes orgânicos da fase líquida. Quando se pretende aumentar a rapidez de remoção dos fármacos presentes na fase líquida, os mesmos podem ser utilizados, tendo estes uma função relevante em casos de derrames, incapacidade de remoção através de processos de tratamentos convencionais, ou numa emergência. Desta forma, a introdução de uma pequena porção de CA na matriz dos LCMs pode representar uma mais-valia para o desempenho imediato do sistema.

A seleção dos CAs, a utilizar nos diferentes ensaios, foi efetuada em simultâneo com outros colegas que estavam integrados no mesmo grupo de trabalho, através da realização de ensaios de remoção de fármacos da fase líquida, com recurso a alguns CAs com propriedades diferentes. Tendo-se chegado previamente à conclusão de que, os CAs que seriam mais interessantes testar, na remoção da furosemida e do diclofenac seriam o CA da Norit 1240 X e o da Panreac, cujas propriedades texturais e químicas estão incluídas na tabela 2.3. Assim, no decorrer deste trabalho, estes dois CAs foram testados como um possível agente aditivo da matriz dos LCM e a influência dos mesmos foi avaliada. No entanto, no decorrer dos ensaios de remoção dos fármacos, usando leitos com matrizes diferenciadas, apenas o CA da Panreac foi utilizado.

2.4. Avaliação da capacidade de remoção dos fármacos em microcosmos de LCMs plantados com *Typha* spp.

2.4.1. Descrição dos microcosmos de LCMs

Os ensaios foram realizados em microcosmos de LCMs, que foram instalados em recipientes de PVC com as dimensões de 0,25 m de largura, 0,30 m de comprimento e 0,30 m de profundidade, tendo como matriz de suporte uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite 3 (1:1, v: v) e plantados com *Typha* spp.

Os leitos foram plantados em novembro de 2016 com pequenos rebentos de *Typha* spp., ficando com uma densidade de 40 plantas/m². Os ensaios de remoção dos fármacos foram realizados no início de maio de 2019 e nesta data as plantas tinham uma altura média de 85 cm e a densidade média nos leitos era agora de 55 plantas/m².

Na totalidade foram realizados 6 ensaios, organizados da seguinte forma:

- **No Ensaio I** - num leito plantado foram colocados 2,5 L de água dopada, com $\sim 2,5$ mg L⁻¹ de cada um dos fármacos em análise (sulfametoxazol, furosemida, diclofenac e trimetoprim), com o objetivo de avaliar a capacidade dos LCMs para remover os compostos e avaliar a ocorrência de possíveis efeitos fitotóxicos resultantes da exposição das plantas aos fármacos.
- **No Ensaio II** - num leito plantado, para além da matriz constituída pela mistura de LECA e vermiculite adicionou-se ainda 0,625 g do carvão ativado em pó e colocaram-se 2,5 L de água dopada com $\sim 2,5$ mg L⁻¹ de cada um dos 4 fármacos. Este ensaio iria permitir avaliar a capacidade dos LCMs para remover os fármacos e observar alguns possíveis efeitos fitotóxicos.
- **No Ensaio III** - num leito plantado colocou-se apenas 2,5 L de água (não existindo a presença de fármacos), este ensaio serviria de controlo na avaliação de possíveis efeitos fitotóxicos dos fármacos nas plantas.
- **No Ensaio IV** - utilizaram-se dois leitos não plantados com uma matriz constituída por LECA + vermiculite (1:1, v:v) e colocou-se água dopada com $\sim 2,5$ mg L⁻¹ de cada um dos 4 fármacos, para avaliar a capacidade da matriz de suporte em remover os fármacos em estudo.
- **No Ensaio V** - foram utilizados dois leitos não plantados e com uma matriz constituída por LECA + vermiculite (1:1, v:v) + carvão ativado (0.625 g). Nestes leitos colocou-se água dopada com $\sim 2,5$ mg L⁻¹ de cada um dos 4 fármacos para avaliar a capacidade de remoção destes compostos por parte da matriz de suporte modificada, que agora também continha CA na sua composição.
- **No Ensaio VI** - que consistia apenas num recipiente sem plantas nem matriz, onde foi colocada água dopada com $\sim 2,5$ mg L⁻¹ de cada um dos 4 fármacos tendo como objetivo avaliar a remoção destes compostos por fotodegradação, hidrólise ou adsorção às paredes dos recipientes. Desta forma, pretendia-se excluir o efeito de outros processos de remoção que não fossem devidos às plantas, microrganismos ou matriz.

Em todos os leitos foi sendo adicionada água sempre que necessário de modo a manter o seu nível ligeiramente abaixo da superfície da matriz, garantindo assim que ocorria uma taxa de inundação de aproximadamente 100%. Na figura 2.5 apresenta-se uma fotografia dos microcosmos de LCMs utilizados na altura do início da realização dos ensaios.



Figura 2.5 Fotografia dos microcosmos no início dos ensaios.

2.4.2. Caracterização físico-química da matriz de suporte

Numa matriz, a capacidade de adsorção de compostos orgânicos, as propriedades hidráulicas do sistema e o desenvolvimento da componente biota (plantas e população microbiana) está diretamente relacionada com as propriedades físico-químicas dos materiais utilizados na mesma.

Com vista à caracterização físico-química da mistura LECA 2/4 + vermiculite 3 (1:1, v:v) foi determinada a porosidade do meio, ou seja a % de volume de vazio, a densidade aparente e o pH em água.

A porosidade do meio foi estabelecida a partir da quantidade de água necessária para saturar um volume conhecido de cada material (n=5) (Brix *et al*, 2001; Bubba *et al*, 2003). A densidade aparente foi calculada a partir da razão entre o peso seco e o volume aparente do material (n=5) (Brix *et al*, 2001; Bubba *et al*, 2003). O pH foi avaliado através da colocação de 10 g de mistura (LECA + vermiculite) em contacto com 75 mL de água, onde após 30 minutos de agitação foram realizadas as medições potenciométricas, num total de 5 leituras (McLean, 1982).

2.4.3. Condições de operação dos LCMs e recolha de amostras

A solução inicial contendo uma concentração de aproximadamente 2,5 mg L⁻¹ de cada um dos quatro fármacos, apresentou um valor de pH_{solução} de 6,02. Todas as

experiências foram realizadas em modo descontínuo, tendo-se mantido o volume inicial de solução e sem alimentação com qualquer outro tipo de solução durante a realização da experiência. Quanto ao nível de líquido, manteve-se apenas ligeiramente abaixo da superfície da matriz de forma a corresponder a uma taxa de inundação de aproximadamente 100%.

A experiência teve uma duração de 120 horas, efetuando-se recolhas de alíquotas no primeiro dia, logo no início da experiência ($t=0$), ao fim de 30 minutos, e depois ao fim de 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 6; 7,5 e 24 h. Posteriormente as recolhas foram efetuadas a cada 24 horas, até perfazer as 120 horas.

Procurou-se que as recolhas fossem homogêneas e representativas da solução que se encontrava em cada leito, fazendo colheitas até aproximadamente metade da profundidade de todos os recipientes e em pontos aleatórios das superfícies dos mesmos. Após a recolha, as amostras foram filtradas de acordo com o procedimento apresentado no ponto 2.2.1.1 e guardadas no frio e na ausência de luz até serem analisadas. A quantificação da furosemida e do diclofenac foi realizada por HPLC-UV-Vis de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.2.1.1.

Diariamente foi controlada a transpiração e/ou evaporação nos recipientes bem como o nível de líquido. Sempre que necessário foi adicionada água destilada antes da recolha das amostras como forma de minimizar o erro na determinação da concentração dos fármacos devido à diminuição do volume de líquido por evaporação e/ou transpiração, e este volume foi contabilizado.

Recolheu-se ainda durante o período de realização dos ensaios, alíquotas de todos os recipientes para a determinação dos valores de pH.

O tamanho das folhas das plantas foi avaliado no decorrer da experiência, através da medição do tamanho da maior e da menor folha, de cada uma das plantas dos leitos, no início e no final da experiência. Esta avaliação permitiu determinar as taxas de crescimento relativo das plantas durante o período da realização dos ensaios, registando-se também a ocorrência de novas folhas e rebentos.

III RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização e validação da metodologia analítica

Para a quantificação da furosemida e do diclofenac em solução aquosa recorreu-se à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por UV-Vis, utilizando as condições experimentais que foram otimizadas, segundo o procedimento descrito na secção 2.2, da metodologia experimental.

O perfil cromatográfico, que permitiu identificar os quatro fármacos presentes na solução, foi obtido a um comprimento de onda de 270 nm. Este valor não corresponde ao c.d.o do máximo de absorvância dos compostos estudados, (como é possível confirmar no espectro de ultravioleta visível colocado no Anexo I). Como a solução aquosa utilizada continha quatro fármacos (o estudo foi realizado em conjunto com outros colegas que estudaram o comportamento de outros fármacos), a escolha deste comprimento de onda permitiu proceder à quantificação simultânea dos quatro compostos. A 270 nm, os compostos não apresentam um máximo de absorvância, mas todos apresentam uma elevada absorvância, o que permite a sua quantificação (Anexo I).

Para a identificação, dos quatro compostos presentes em solução fez-se a comparação com os tempos de retenção obtidos nos cromatogramas das soluções padrão de cada composto isolado. Com base na figura 3.1, identificou-se um tempo de retenção para a furosemida e para o diclofenac de 3,4 min e 10,2 min, respetivamente.

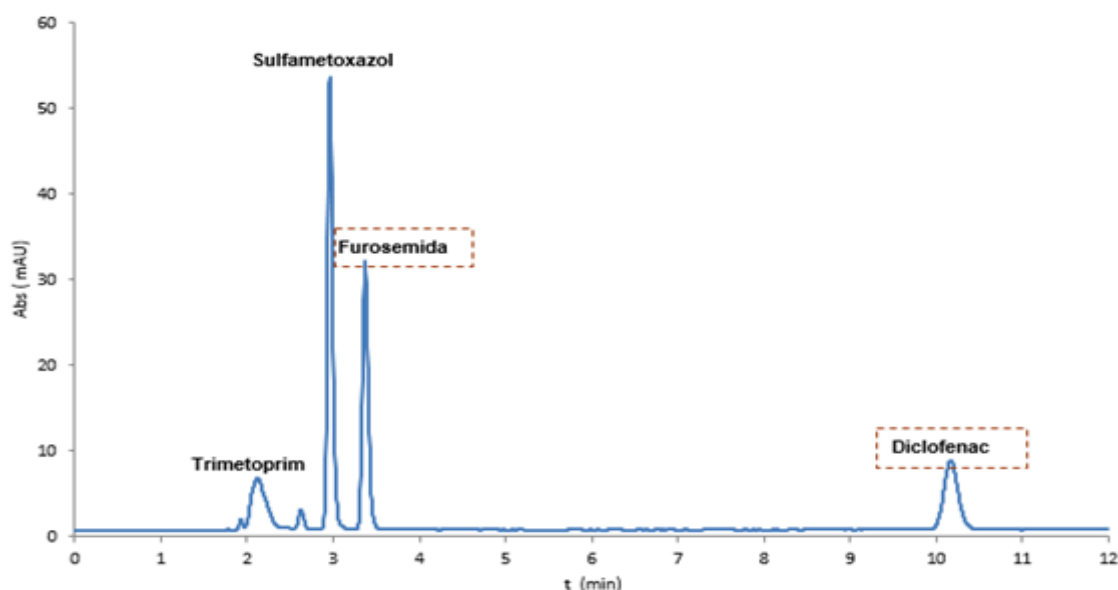


Figura 3.1 Cromatograma obtido por HPLC-UV-Vis para uma solução padrão com Trimetoprim ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$), Sulfametoxazol ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$), Furosemida ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) e Diclofenac ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$).

De forma a quantificar a furosemida e o diclofenac presentes na solução aquosa (água dopada com quatro fármacos) pelo método do padrão externo, construíram-se retas de calibração utilizando 9 soluções padrão, cujas concentrações variaram entre 0,25 e 4,5 mg L⁻¹ (seção 2.2.1.1 da metodologia experimental).

As retas de calibração obtidas para a furosemida e para o diclofenac estão apresentadas nas figuras 3.2 e 3.3, respetivamente.

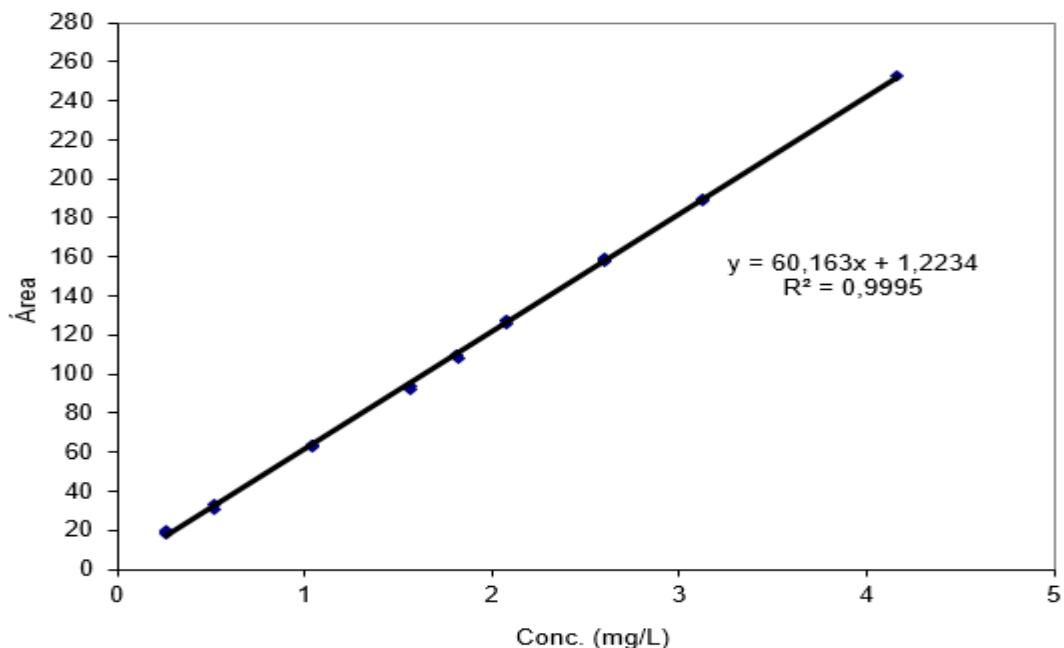


Figura 3.2 Reta de calibração utilizada para a quantificação da furosemida em solução aquosa

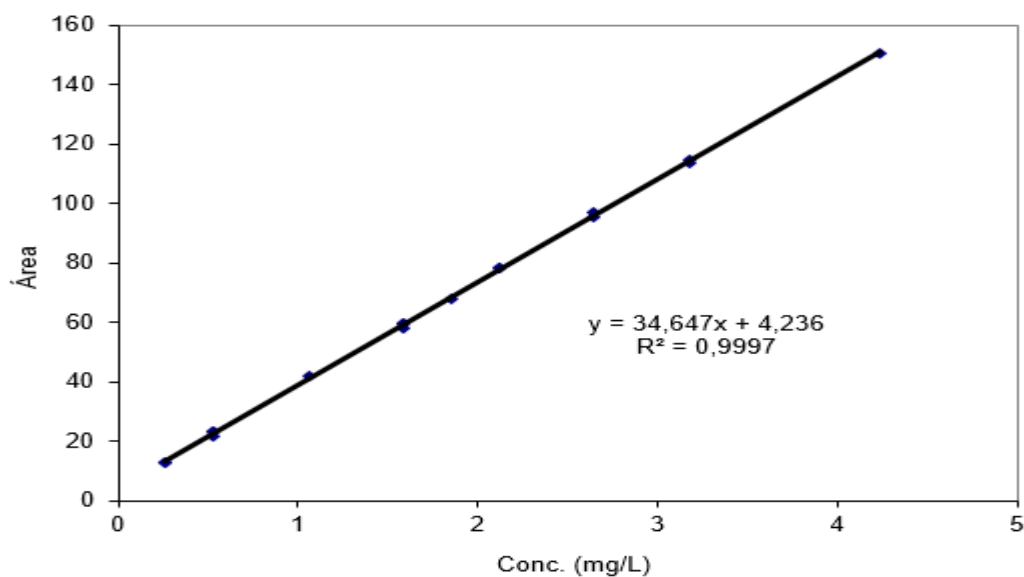


Figura 3.3 Reta de calibração utilizada para a quantificação do diclofenac em solução aquosa.

Para ambos os compostos foram obtidas retas de calibração com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,999, o que permite assegurar que os valores de concentração determinados, por regressão linear, utilizando estas retas de calibração são fiáveis dentro da gama de valores que foram construídas.

3.1.1. Validação do método analítico

A metodologia analítica desenvolvida e otimizada para a quantificação da furosemida e do diclofenac por HPLC-UV-Vis apresentou uma elevada reprodutibilidade (DPR < 0.8%) e exatidão (98-103%) para ambos os fármacos no intervalo de concentrações testadas (0.5; 2; 3 mg L⁻¹). A repetibilidade, também foi elevada (DPR < 2,9%) para ambos os compostos. No entanto, e como seria de esperar, a repetibilidade foi menor para as concentrações mais baixas (para uma concentração de 0.5 mg L⁻¹, DPR = 2.8 % para a furosemida e DPR = 1.9 % para o diclofenac) e mais elevada para as concentrações mais altas (para uma concentração de 3 mg L⁻¹, DPR = 0.27% para a furosemida e DPR = 0.14% para o diclofenac). Na realidade, as incertezas nas medições têm maior peso relativo quanto menor for o valor medido, originando, por consequência, uma maior dispersão dos valores obtidos nestas condições.

Os limites de deteção instrumental (LDI) para a técnica de HPLC-UV- Vis foram de 0,04 mg L⁻¹ para a furosemida e de 0,03 mg L⁻¹ para o diclofenac e os limites de quantificação instrumental (LQI), foram de 0,12 mg L⁻¹ para a furosemida e de 0,09 mg L⁻¹ para o diclofenac. Estes valores correspondem à concentração do analito cujo sinal é igual ao branco adicionado de, respetivamente, 3.3 e 10 vezes o desvio padrão (Miller e Miller, 2000).

3.1.2. Otimização do volume de solução a filtrar nos filtros de nylon

Tem sido reportado em alguns estudos que as membranas filtrantes de nylon podem reter alguns compostos orgânicos, incluindo fármacos (Carlson e Thompson, 2000; Sumitra, 2016). Também em estudos efetuados por elementos do grupo de investigação, já tinha sido verificado que, alguns dos fármacos que foram estudados no decurso deste trabalho, nomeadamente a furosemida, poderiam ficar retidos nos filtros de nylon (Machado *et al.*, 2020), demonstrando que a utilização deste tipo de filtros deve ser feita com algum cuidado, tendo em vista a minimização das perdas de analito durante a filtração das amostras, que é um procedimento obrigatório, aquando do uso da técnica de HPLC.

De facto, as membranas filtrantes de nylon contêm grupos funcionais amina e ácido carboxílico bem como ligações amida, que podem interatuar com analitos ácidos e

básicos através de interações eletrostáticas ou por pontes de hidrogénio, levando à retenção de algumas moléculas nesses centros interatuantes dos polímeros do filtro. No entanto, a retenção dos fármacos na membrana de nylon está dependente da sua concentração em solução e das características do composto, tais como polaridade, grau de ionização e capacidade para formação de pontes de hidrogénio.

Este problema pode ser minimizado através de um pré-tratamento do filtro que permita a ocupação/saturação destes locais dos polímeros, de modo a que os mesmos já não estejam disponíveis para reter o analito quando for feita a filtração da amostra. A saturação do filtro pode ser conseguida pela filtração de um pequeno volume de uma solução bastante concentrada, ou pela passagem de solução idêntica à amostra a utilizar, mas de um volume bastante superior, suficiente para atingir a saturação do filtro. Em qualquer um dos casos, é necessário efetuar testes prévios que permitam determinar os volumes necessários a usar para que a saturação do filtro seja efetiva.

Assim, de forma a minimizar as perdas de analito no filtro optou-se pela segunda abordagem, procurando assim otimizar o volume de amostra a filtrar para saturar o filtro. Para tal foram testados oito volumes diferentes de solução de furosemida com uma concentração de 2 mg L^{-1} e de uma solução de diclofenac com uma concentração semelhante. Os resultados obtidos para as percentagens de recuperação dos dois fármacos estão presentes na figura 3.4.

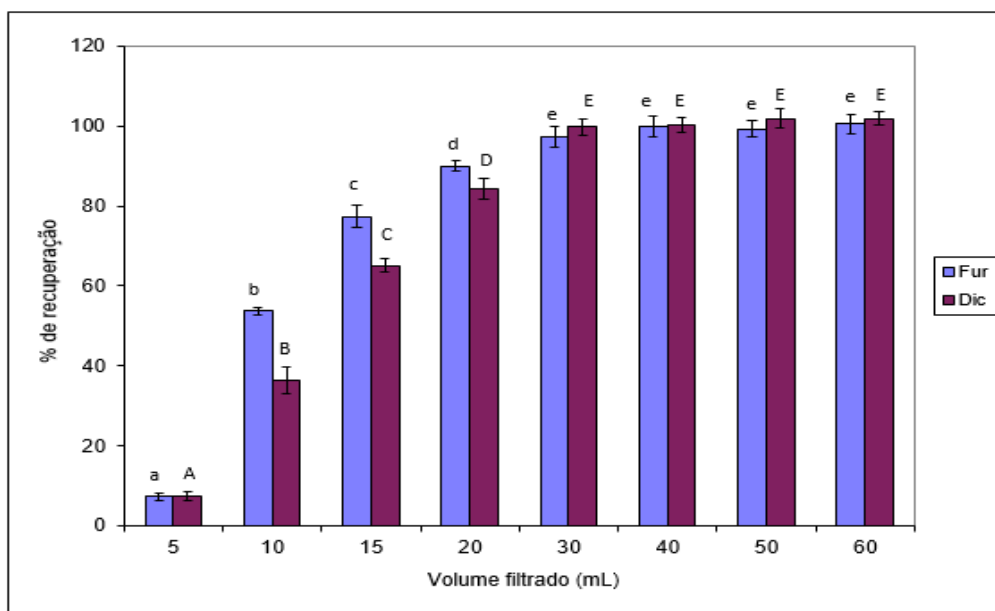


Figura 3.4 Percentagem de recuperação dos fármacos filtrados utilizando membranas de nylon $0,45 \mu\text{m}$ para uma concentração de 2 mg L^{-1} (média \pm DP; $n=9$). As diferentes letras significam que os valores apresentam diferenças significativas ($P<0,05$).

Com base nos resultados obtidos, constatou-se que tanto a furosemida como o diclofenac apresentam uma considerável retenção na membrana de nylon do filtro para volumes de solução filtrados inferiores a 20 mL. Para volumes de solução filtrados superiores a 30 mL, a percentagem de recuperação dos analitos aproxima-se de 100%, não se observaram diferenças significativas na percentagem de recuperação destes fármacos para volumes de filtrado superiores a 30 mL, o que provavelmente se deve já à saturação da membrana filtrante. Assim, tendo em conta os resultados obtidos nestes ensaios, e de forma a garantir uma elevada percentagem de recuperação dos dois compostos, optou-se por realizar, previamente, uma filtração de 30 mL de uma solução padrão contendo 2 mg L^{-1} de cada um dos compostos, por forma a garantir a saturação da membrana de nylon do filtro. Só depois deste passo é que se procedeu a filtrações de 10 mL das soluções a analisar, e o último mililitro foi recolhido para ser utilizado na quantificação dos fármacos por HPLC-UV-Vis. Tendo em conta o número de réplicas realizadas, cada filtro foi utilizado no máximo 3 vezes perfazendo um volume total de filtrado de 60 mL.

3.2. Seleção do carvão ativado

Antes de se proceder à modificação da matriz que constituía os LCM, através da adição de pequenas quantidades de CA, foi necessário identificar à priori qual ou quais os CA a utilizar. Para tal, fizeram-se ensaios de remoção dos fármacos em diferentes matrizes, preparadas em pequena escala, constituídas apenas por LECA e vermiculite ou contendo ainda uma pequena porção de CA. Nestes ensaios foram utilizados, um CA apresentado sobre a forma de um pó fino da Panreac e outro CA apresentado sobre a forma de um granulado da Norit.

Em ensaios de remoção individual de cada um dos fármacos em estudo, foi possível verificar que a matriz constituída apenas pela LECA e pela vermiculite apresentou uma percentagem de remoção dos dois fármacos ao fim de 8 horas na ordem dos 37%. Ao fim das 120 horas de contato, a percentagem de remoção da furosemida aumentou cerca de 1%, enquanto que a percentagem de remoção do diclofenac aumentou cerca de 4%. Estes ensaios põem em evidência a cinética na remoção dos fármacos em estudo.

Foi preparada uma matriz com LECA e vermiculite, à qual foi adicionada uma pequena porção de CA da Norit, e neste ensaio, a percentagem de remoção face aos dois fármacos foi semelhante à obtida na ausência de CA. Foi então preparada uma matriz, contendo uma maior quantidade de CA, ainda sobre a forma de grânulos, e a

percentagem de remoção quer da furosemida como do diclofenac aumentou mais do que 10% em relação aos ensaios anteriores. No entanto, nestes últimos ensaios, a percentagem de remoção da furosemida e do diclofenac, ao fim de 120 horas de contacto, era apenas de 51,4 e 51,2%, respetivamente.

Foi realizado um quarto ensaio no qual foi adicionado um CA, da Panreac, que se encontrava sobre a forma de um pó fino. A adição do CA da Panreac, sobre a forma de pó, apresentou uma cinética de adsorção muito rápida, apresentando capacidades máximas de remoção face aos dois fármacos em estudo muito superiores às determinadas nas matrizes preparadas anteriormente, onde o CA adicionado se encontrava sobre a forma de grânulos. Nas condições de trabalho utilizadas, na presença do CA em pó, ao fim de 8 horas de contacto, a percentagem de remoção era já de 82,3% e 83,9% para a furosemida e diclofenac respetivamente. Ao fim das 120 horas de contacto, a percentagem de remoção era de 92,3 e 95,6% para a furosemida e diclofenac, como apresentado nas figuras 3.5 e 3.6.

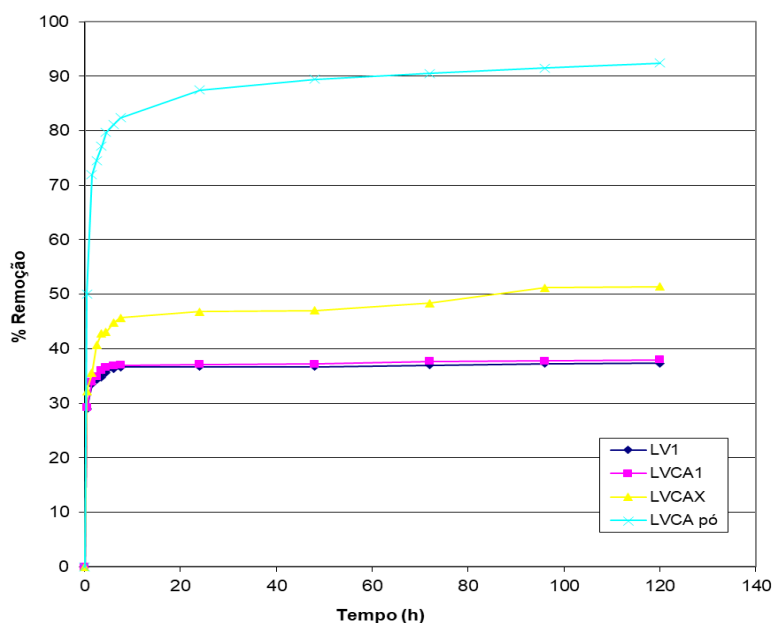


Figura 3.5 Remoção da furosemida pelas diferentes matrizes. (LV1 – Matriz composta apenas pela LECA+vermiculite; LVCA1 – Matriz composta pela LECA+vermiculite+CA granulado (Norit 1240 X); LVCA X – Matriz composta pela LECA+vermiculite+CA granulado (Norit 1240 X - maior quantidade de massa); LVCA pó – Matriz composta pela LECA+vermiculite + CA pó (Panreac)).

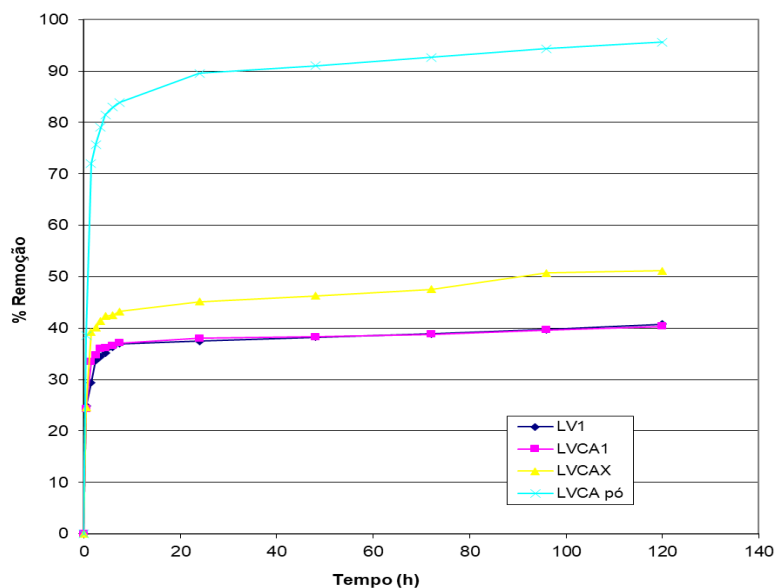


Figura 3.6 Remoção do diclofenac pelas diferentes matrizes. (LV1 – Matriz composta apenas pela LECA+vermiculite; LVCA1 – Matriz composta pela LECA+vermiculite+CA granulado (Norit 1240 X); LVCAX – Matriz composta pela LECA+vermiculite+CA granulado (Norit 1240 X - maior quantidade de massa); LVCA pó – Matriz composta pela LECA+vermiculite + CA pó (Panreac)).

É de salientar que, as capacidades máximas de remoção da furosemida e do diclofenac determinadas na matriz que continha o CA da Panreac como aditivo eram muito superiores às obtidas nos ensaios efetuados com as três matrizes referidas anteriormente. Em termos mássicos, o segundo ensaio preparado com o CA da Norit, sobre a forma de grânulos, continha um maior rácio de massa de CA, por volume de matriz, do que o ensaio preparado com o CA sob a forma de pó, da Panreac, o que põe em evidência a importância da acessibilidade dos fármacos aos sítios ativos presentes na superfície dos CA, no desempenho dos mesmos.

Com base nestes resultados preliminares, e por comparação com os dados obtidos por outros colegas de mestrado, optou-se por utilizar o CA sobre a forma de pó como um aditivo na composição da matriz dos LCM, sendo que, em alguns ensaios, os leitos já se encontravam plantados com *Typha*.

3.3. Avaliação da capacidade de remoção da furosemida e do diclofenac em microcosmos de LCMs plantados com *Typha* spp.

Vários estudos já comprovaram a elevada eficiência dos LCMs plantados com *Typha* spp. na remoção de poluentes orgânicos, incluindo diversos fármacos (Matamoros *et al.*, 2005; Dordio *et al.*, 2010; Dordio e Carvalho, 2013b; Li *et al.*, 2016). Com base nestes resultados, optou-se por estudar a eficiência desse tipo de sistema na remoção conjunta da furosemida e do diclofenac de uma água dopada com 4 fármacos (furosemida, diclofenac, trimetoprim, sulfametoxazol), com uma concentração inicial de 2,5 mg L⁻¹ de cada fármaco.

Para a realização dos ensaios foi selecionada como matriz de suporte uma mistura de dois compostos argilosos, a LECA 2/4 e a vermiculite esfoliada 3 (1:1, v:v). Esta escolha deveu-se ao facto de ambos os materiais já terem demonstrado, em estudos anteriores, uma elevada eficiência na remoção de poluentes orgânicos xenobióticos presentes na água, incluindo vários fármacos (Dordio *et al.*, 2010; Dordio *et al.*, 2007; Dordio *et al.*, 2009; Dordio *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2020). A LECA e a Vermiculite apresentam características distintas, ou sejam, a Vermiculite apresenta uma maior capacidade de adsorção do fármaco por massa de adsorvente. Por sua vez, a LECA remove uma maior quantidade de fármaco por volume de material utilizado (Dordio *et al.*, 2017). Esta diferença de características deve-se ao facto de a vermiculite apresentar uma densidade bastante inferior à da LECA e, conseqüentemente, o mesmo volume de material corresponde a uma menor massa de adsorvente usado. Assim, a capacidade de remoção é maior para a vermiculite quando expressa em termos de massa de adsorvente, mas é maior para a LECA quando expressa em termos volúmicos. Estudos anteriores, do grupo, mostraram que a vermiculite apresenta uma cinética de adsorção mais rápida de fármacos, em comparação com a LECA, o que poderá estar relacionado com a sua estrutura laminar (dado que é um filossilicato) disponibilizando assim uma maior área superficial facilmente acessível aos fármacos (Dordio *et al.*, 2009).

Tendo em conta as características referidas, considerou-se que a utilização em conjunto destes dois materiais poderia melhorar a eficiência do sistema beneficiando das vantagens de cada um dos materiais. A seleção destes dois materiais teve em conta também outras características como a sua elevada capacidade de retenção de diversos compostos orgânicos, a sua capacidade tampão, bem como uma adequada condutividade hidráulica, sendo também de realçar a sua disponibilidade e o seu baixo custo.

3.3.1. Caracterização físico-química da matriz de suporte

Alguns dos parâmetros que caracterizam física e quimicamente os materiais argilosos (LECA e vermiculite) bem como a sua mistura (vermiculite 3 + LECA 2/4, 1:1 (v:v)), utilizados na composição da matriz, estão apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Parâmetros físico-químico dos materiais selecionados como matriz de suporte dos LCMs (n=6) e da sua mistura. Valores médios \pm desvio padrão.

Material	Mistura vermiculite/LECA (1:1 v/v)	Vermiculite ^(a)	LECA ^(a)
Porosidade (%)	54 \pm 2	66 \pm 1	49 \pm 1
Densidade aparente (kg/m ³)	291 \pm 14	88 \pm 2	394 \pm 10
pH (H ₂ O)	8,67 \pm 0,05	7,44 \pm 0,06	9,04 \pm 0,08
pH _{PZC}	n.d.	7,69 \pm 0,12	9,67 \pm 0,14

n.d.: não determinado; [a] Dordio *et al.*, 2017

Com o intuito de tornar estes materiais argilosos menos densos, a vermiculite esfoliada e a LECA são submetidas a processamentos industriais, durante os quais, as mesmas são aquecidas a elevadas temperaturas, causando a expansão térmica dos materiais, passando os mesmos a exibir valores de porosidade relativamente elevados, em especial a vermiculite. A vermiculite apresenta uma porosidade de 66% e a LECA de 49%. Contudo, após mistura, dos dois materiais, na proporção de 1:1, a porosidade da mistura apresenta um valor intermédio de 54%. Durante a mistura dos dois materiais, o empacotamento do material é alterado, ocorrendo um rearranjo das partículas, em que as mais pequenas vão ocupar parte do espaço livre entre as partículas de maiores dimensões.

A porosidade dos meios proporciona a existência de espaços vazios onde efetivamente ocorrem muitos dos processos de remoção dos poluentes. A porosidade promove o arejamento dos LCMs e favorece a criação de melhores condições aeróbias na rizosfera. Adicionalmente, em sistemas de tratamento em contínuo, esta propriedade é fundamental para que existam boas condições de condutividade hidráulica. Os efeitos indesejáveis de uma baixa condutividade hidráulica são a colmatação dos sistemas e a consequente formação de canais preferenciais ou a circulação das águas à superfície, o que reduz o contacto dos poluentes com a matriz de suporte, diminuindo assim a eficiência da sua remoção.

A vermiculite e a LECA são materiais argilosos que, por apresentarem elevada porosidade, conseguem absorver facilmente, grandes quantidades de água nas suas estruturas internas, permitindo deste modo maiores áreas de contacto com as soluções e com os poluentes a remover (Dordio e Carvalho, 2013; Dordio *et al.*, 2017).

Os valores de porosidade relativamente elevados apresentados por estes dois materiais confere-lhes densidades aparentes relativamente reduzidas, como é possível confirmar pelos dados apresentados na tabela 3.1. Apresentando a mistura dos dois materiais um valor de densidade aparente intermédio de 291 kg m^{-3} .

Outro fator que influencia significativamente a capacidade de adsorção dos compostos nos materiais argilosos é o pH do meio, com especial importância no caso dos poluentes polares. O valor de pH do meio relativamente ao ponto de carga zero (pcz) dos materiais determina a extensão das cargas na respetiva superfície. Os materiais argilosos possuem diversos grupos anfiproticos na sua superfície, nomeadamente grupos silanol e aluminol, cujo estado de ionização depende do pH do meio. Por outro lado, muitos fármacos têm características ácido-base, apresentando-se ionizados em certas condições de pH. Assim, há condições para que ocorram interações eletrostáticas dependentes do pH que dominam os fenómenos de adsorção em poluentes polares ionizáveis, como é o caso da furosemida e do diclofenac.

O desenvolvimento da vegetação e da população microbiana nos LCMs também é influenciado pelo pH, estando este relacionado com a composição do material da matriz de suporte e da solução em contato, com a presença de plantas e o tipo de exsudados que elas libertam na rizosfera e ainda com os processos de biodegradação que ocorrem.

Pelos dados apresentados na tabela 3.1, verifica-se que o valor de pH para a vermiculite é próximo da neutralidade ($\sim 7,4$), enquanto que a LECA apresenta um carácter alcalino ($\sim 9,04$). Em estudos que incluíram a caracterização química e mineralógica da LECA (Dordio, 2009), comprovou-se a existência, de alguns óxidos e carbonatos, os quais podem contribuir para este carácter alcalino do material (Dordio, 2009).

A mistura dos dois materiais, nas proporções utilizadas, apresentou um valor de pH ligeiramente alcalino, com valor de aproximadamente 8,67, intermédio entre o valor da vermiculite e da LECA.

3.3.2. Condições relevantes para a realização dos ensaios

Os ensaios foram realizados no início de maio, apresentando-se as plantas dos microcosmos de LCMs numa fase de crescimento já avançada, com uma altura média de 85 cm, apresentando a folha menor um tamanho médio de cerca de 48 cm e a folha maior 122 cm. A densidade média das plantas nos leitos na altura da realização da experiência era de 55 plantas/m².

As taxas de evaporação/evapotranspiração, nos diversos leitos, foram estimadas diariamente recorrendo-se à medição dos volumes de água destilada necessários para a reposição dos níveis iniciais de líquidos nos leitos. Esses mesmos valores estão apresentados na tabela 3.2. De notar que na tabela não são apresentados dados relativos ao Ensaio VI dado que o recipiente desse ensaio permaneceu tapado durante o período de realização das experiências por isso não ocorreu qualquer perda de água por evaporação.

Tabela 3.2 Volume de líquido adicionado diariamente aos leitos e valores médios da taxa de evaporação/transpiração de cada leito.

Tempo (h)	24	48	72	96	120	Taxa média de evaporação + transpiração (mL/dia)	Área (m ²)	Taxa média de evaporação + transpiração (mL/(dia.m ²))	Nº plantas no leito	Taxa média de evaporação + transpiração (mL/(planta.dias.área))
Ensaio	Volume de líquido adicionado (mL)									
I	272	296	284	250	280	276,4	0,075	3685	5	737
II	283	280	342	160	206	254,2	0,075	3469	4	867
III	250	260	310	284	330	286,8	0,075	3480	3	1160
IV	35	30	25	30	40	32	0,01885	1698	-	-
V	30	32	27	32	37	31,6	0,01885	1676	-	-

I: Matriz (LECA + Vermiculite)+plantas + solução; II: Matriz (LECA + Vermiculite)+ CA+plantas + solução; III: Matriz (LECA + Vermiculite) + plantas+ H₂O; IV: Matriz LECA + Vermiculite (valores médios); V: Matriz LECA+ Vermiculite+ CA (valores médios).

Com base nos resultados da tabela 3.2 é possível verificar que o leito IV, que é constituído pela matriz de apenas vermiculite e LECA, e o leito V, em que a essa matriz foi também adicionado carvão ativado (0,625 g), apresentam taxas de evaporação muito próximas, nomeadamente de 1698 mL/(dia m²) e de 1676 mL/(dia m²) respetivamente. Esta semelhança seria espetável visto que os leitos têm composição semelhante e como não são plantados, o volume de líquido perdido deve-se apenas à evaporação, que é função da temperatura e da humidade relativa do ar.

Nos leitos plantados, as taxas médias de evapotranspiração foram de 3685 mL/(dia m²) para o leito I, 3469 mL/(dia m²) para o leito II e de 3480 mL/(dia m²) para o leito III. A diferença significativa observada em relação aos leitos não plantados é atribuída à perda de água devido à transpiração das plantas.

Deste modo, é possível estimar os valores de água perdidos através da transpiração das plantas, sendo estes de 1988, 1793 e 1782 mL/(dia.m²) para os leitos I, II e III respetivamente, o que constitui uma importante contribuição para a perda de água nos leitos. A taxa de transpiração das plantas por sua vez é influenciada por fatores como a densidade de plantas nos leitos e o seu estado vegetativo (que pode ser inferido do tamanho médio das plantas e da taxa relativa de crescimento).

Estes valores são da mesma ordem de grandeza de outros obtidos em sistemas semelhantes (Dordio *et al.*, 2010).

A taxa de transpiração das plantas é uma variável fundamental que determina a taxa de absorção de água e de todas as substâncias nela dissolvidas que passam para o interior das plantas por processos passivos, como é o caso de compostos orgânicos xenobióticos (e.g. fármacos), para os quais não há mecanismos de transporte específicos. Assim, espera-se uma intervenção das plantas mais importante naquelas espécies (e também nos períodos do ano) em que a taxa de transpiração seja maior (Pilon-Smits, 2005).

Como já foi referido, o pH do meio é um dos fatores que influencia significativamente a capacidade dos materiais argilosos para adsorver compostos (em especial os poluentes polares ionizáveis como a furosemida e o diclofenac), bem como o desenvolvimento da vegetação e da população microbiana nos LCMs.

Daí que se tenham registado os valores de pH da solução em contacto com a matriz de suporte ao longo do período de realização dos estudos. Os resultados obtidos são apresentados na figura 3.7.

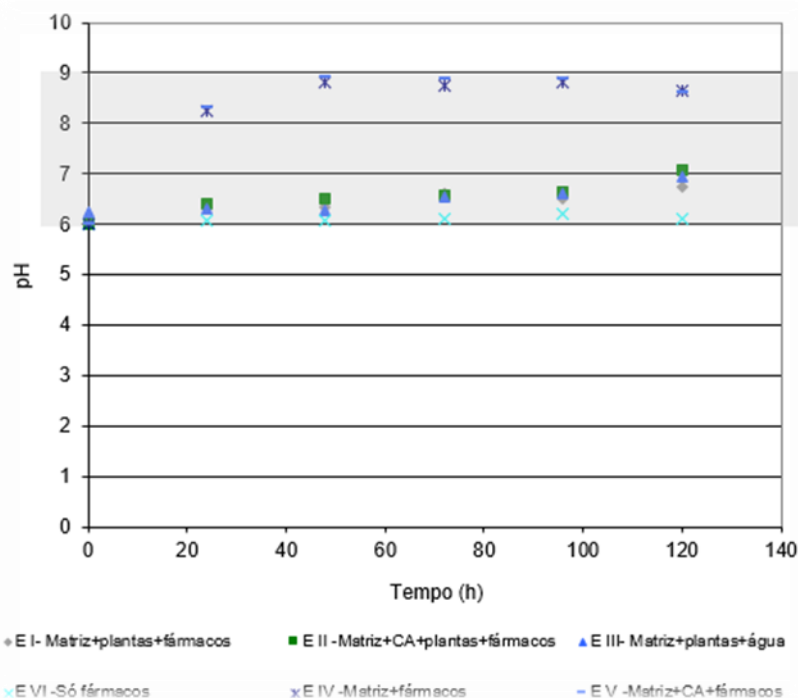


Figura 3.7 Valores médios do pH do meio nos leitos ao longo do período de estudo.

Pela observação da figura 3.7 constata-se que os valores de pH da solução em contato com as diferentes matrizes, variou entre 6 e 9, ao longo do período de realização do estudo.

No que diz respeito aos valores de pH registados na solução contendo apenas fármacos (Ensaio VI, sem plantas nem matriz), as variações ao longo do tempo foram muito residuais, variando apenas entre 6,02 e 6,19, ou seja, em condições ligeiramente ácidas devido à exposição da solução ao ar, e sobretudo em consequência das características ácidas dos fármacos.

Por outro lado, nos Ensaios IV e V, onde não se colocaram plantas mas apenas a solução em contacto com a matriz, foi onde se verificou um maior aumento de pH durante o estudo, partindo de um valor inicial de 6,02 até a um valor que se manteve estável a partir das 48h, apresentando apenas ligeiras flutuações, entre 8,6 e 8,9. Os valores alcalinos registados são os característicos da matriz em água (tabela 3.1), observando-se assim o efeito tamponante de alguns dos constituintes da matriz. A estes valores de pH, praticamente todas as moléculas de furosemida ($pK_a \approx 4,25$) e de diclofenac ($pK_a \approx 4,15$) se encontram desprotonadas (pH do meio $> pK_a$), i.e. na forma aniónica. Por outro lado, as superfícies dos materiais argilosos da matriz de suporte, em particular da LECA ($pcz \approx 9,67$) mas também da vermiculite ($pcz \approx 7,69$) apresentam cargas positivas (pH do meio $< pcz$). Estas condições favorecem a

adsorção, em especial no caso da LECA, principalmente devido às interações eletrostáticas entre os grupos carboxilato (COO^-) da furosemida e do diclofenac e a superfície, carregada positivamente, dos materiais argilosos da matriz de suporte.

Da observação da figura 3.7 verifica-se, que nos leitos onde existem plantas (Ensaio I e II) o pH sofreu poucas alterações, situando-se em níveis intermédios (entre 6-7). O maior aumento de pH ocorre no leito II com uma subida de 6,02, no início do estudo, para um valor de pH de 7,08, passados 5 dias. Este valores de pH observados nos leitos plantados parecem indicar que as plantas têm um efeito moderador na alcalinidade da matriz, o que poderá resultar da libertação de exsudados pelas plantas, os quais normalmente contêm ácidos orgânicos de baixo peso molecular como o ácido oxálico, málico, fórmico, acético, etc. que contribuem para a diminuição do pH do meio (Wu *et al.*, 2012). Os valores de pH do meio, correspondentes a um meio neutro ou ligeiramente alcalino, são propícios ao desenvolvimento das plantas e da população microbiana. Tal como no caso dos leitos não plantados, estas condições de pH, pelas razões já apontadas anteriormente, também favorecem a adsorção dos compostos, furosemida e diclofenac, dado o seu carácter ácido ($\text{pK}_a \sim 4$, ainda bastante abaixo do pH do meio), aos materiais argilosos de pcz alcalino, sobretudo a LECA.

3.3.3. Remoção do diclofenac e da furosemida pelos microcosmos de LCMs

Como descrito no ponto 2.4.1, no total foram realizados seis ensaios distintos com o intuito de avaliar a capacidade de remoção do diclofenac e da furosemida pelos vários componentes dos LCM estudados, bem como para caracterizar as cinéticas em cada caso.

No Ensaio I pretendeu-se estudar a contribuição das plantas, para a remoção dos dois fármacos da solução presente num microcosmos de LCM, construído com uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite 3 (1:1, v:v) como matriz de suporte e plantado com *Typha* spp.. No Ensaio IV, usando um leito idêntico, mas sem plantas, pretendeu-se estudar a contribuição da matriz de suporte (LECA + vermiculite) na remoção dos fármacos. Em sistemas análogos, Ensaio II e V respetivamente, adicionou-se carvão ativado à matriz de suporte para avaliar potenciais ganhos de eficiência na remoção dos fármacos através do aumento das capacidades adsorptivas da matriz de suporte. Utilizou-se também um microcosmos de LCM que não esteve exposto à solução de fármacos (Ensaio III) e que serviu de controlo para avaliar o efeito fitotóxico dos fármacos nos sistemas plantados (Ensaio I e II). Finalmente, um recipiente idêntico aos usados nos restantes ensaios, mas contendo apenas a solução de fármacos foi

utilizado para determinar a contribuição na remoção de diclofenac e furosemida de outros processos, nomeadamente fotodegradação, hidrólise, precipitação ou adsorção às paredes dos recipientes (Ensaio VI).

Em todos os ensaios, que tiveram uma duração de 120h, utilizou-se uma solução aquosa contendo 2,5 mg L⁻¹ de cada um, dos quatro fármacos, ou sejam, o diclofenac, furosemida, trimetoprim e sulfametoxazol.

A percentagem de remoção do diclofenac e da furosemida, nos vários tempos de amostragem foi calculada com base na equação 1:

$$\% \text{ remoção} = \frac{c_i - c_t}{c_i} \times 100 \quad (1)$$

onde c_i é a concentração inicial para (t=0) e c_t é a concentração ao fim de um determinado tempo de contacto (t).

Nas figuras 3.8 e 3.9 apresentam-se as percentagens de remoção do diclofenac e da furosemida, obtidas nos diferentes ensaios apenas para os tempos de contacto mais determinantes em termos cinéticos, nomeadamente 0,5; 7,5 e 120 h, correspondendo estes tempos, como veremos posteriormente, a diferentes etapas/regimes do processo e, no fim, a um estado já próximo do equilíbrio.

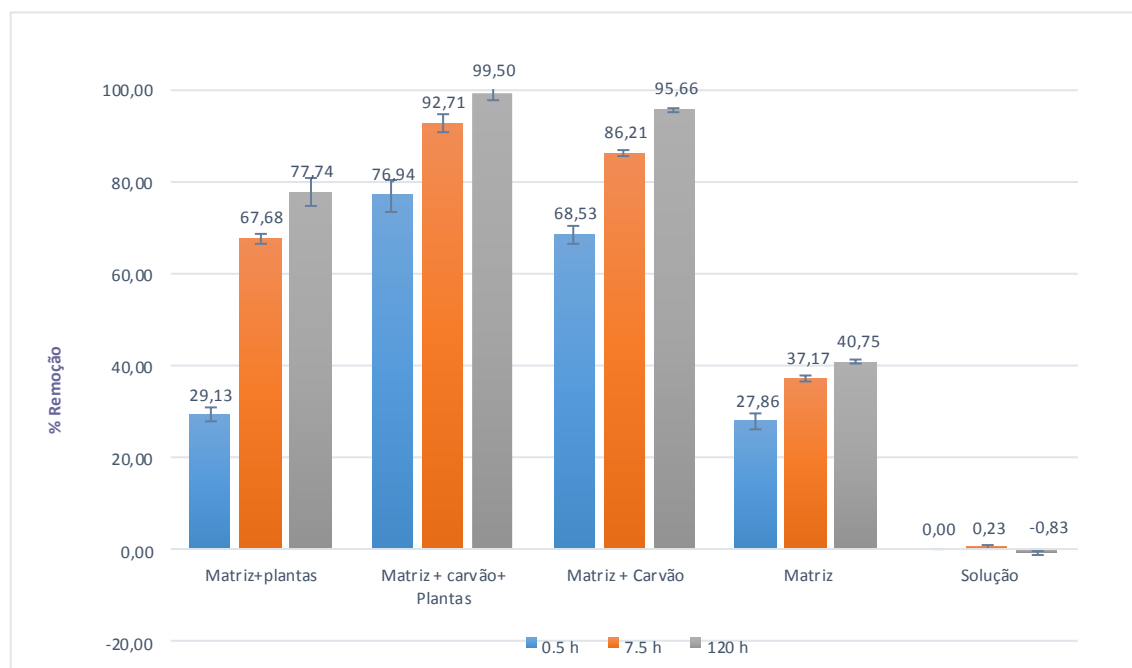


Figura 3.8 Percentagem de remoção do diclofenac nos Ensaios I, II, V, IV e VI para os tempos de contacto de 0,5; 7,5 e 120 h. Valores médios \pm desvio padrão.

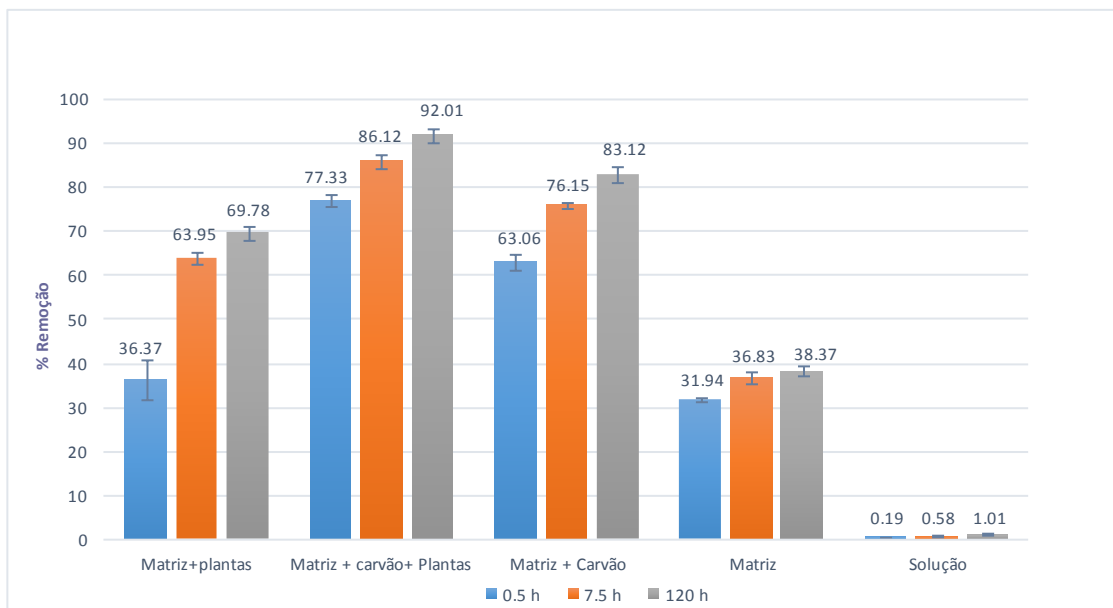


Figura 3.9 Percentagem de remoção da furosemida nos Ensaios I, II, V, IV e VI para os tempos de contacto de 0,5; 7,5 e 120 h. Valores médios \pm desvio padrão.

Pode-se observar nas figuras 3.8 e 3.9 que no Ensaio VI, onde estava apenas a solução dopada com os quatro fármacos (sem matriz ou plantas), a concentração dos dois fármacos não sofreu alterações significativas ao longo do período da realização da experiência. É então possível concluir que não terão ocorrido em extensão significativa processos de fotodegradação, hidrólise, precipitação ou adsorção às paredes dos recipientes dos fármacos em estudo. É de notar, que existem estudos em que se observou que a furosemida é sensível a processos de fotodegradação. De facto, estudos de fotodegradação realizados por Machado *et al.*, (2020) mostraram que a exposição direta da furosemida à luz solar conduzia à sua fotodegradação, no entanto, as experiências realizadas neste trabalho foram efetuadas sem exposição direta à luz solar, tal como acontece nos leitos sub-superficiais, o que explica não terem sido observadas alterações significativas na concentração da furosemida, ao longo das 120 h. Também parece não ter ocorrido biodegradação dos compostos, na realidade, a solução utilizada foi preparada com água desionizada e durante a realização da experiência, o recipiente permaneceu fechado, o que eventualmente terá minimizado o desenvolvimento de população microbiana.

Os leitos apenas com matriz de suporte (LECA + vermiculite) (Ensaio IV) e o leito com matriz (LECA+ vermiculite) e plantado com *Typha* spp. (Ensaio I) após um tempo de contacto de 0,5 h, apresentaram valores muito idênticos de percentagem de remoção do diclofenac, ou sejam, 28% e 29% respetivamente. À semelhança do que aconteceu

com o diclofenac, também para a furosemida após um tempo de contacto de 0,5h no Ensaio I, a percentagem de remoção era de ~36%, sendo um valor próximo ao obtido no Ensaio IV (~ 32%). Estas observações sugerem que a remoção inicial, mais rápida, é devida essencialmente a processos a ocorrerem na matriz, provavelmente devido à adsorção.

No entanto, é de notar que, relativamente à quantidade total de fármacos removida até ao final da experiência, a parte que é removida apenas durante esta primeira meia hora de contacto é muito diferente para os dois tipos de leitos. De facto, no caso do diclofenac, ~ 68,4 % da quantidade total removida durante todo o período de realização da experiência, pelos leitos não plantados, é removida logo durante esta meia hora inicial, enquanto que no caso dos leitos plantados, durante este período ocorre apenas a remoção de ~ 37,5 % da quantidade total removida ao longo de toda a experiência. Por outro lado, durante o mesmo período, a remoção da furosemida é de cerca de ~ 83,2 % e ~ 52,1 % da quantidade total removida, do fármaco, nos leitos não plantados e plantados, respetivamente.

Estas diferenças entre os dois tipos de leitos podem ser explicadas pelo facto de os dois Ensaio apresentarem cinéticas de remoção dos fármacos distintas, como será referido na seção 3.3.4. De facto, no caso do leito plantado ocorrem outros processos de remoção, que estão ausentes nos leitos não plantados, os quais têm uma cinética mais lenta, mas que contribuirão para que a longo prazo se atinjam eficiências de remoção mais elevadas.

Para os tempos de contacto de 7,5 h e 120 h os valores de percentagem de remoção dos dois fármacos nos Ensaio I e IV deixam de ser similares.

Os leitos constituídos apenas com matriz (Ensaio IV) apresentaram valores de remoção do diclofenac de 37% e de 40%, para os tempos de contacto de 7,5 h e 120 h respetivamente, enquanto o leito constituído pela matriz + plantas (Ensaio I) apresenta valores de remoção do diclofenac de 68% e de 78% para os mesmos tempos de contacto (figura 3.8).

No caso da furosemida, no Ensaio IV, as percentagens de remoção para os tempos de contacto de 7,5 h e 120 h foram de 37% e 38 % respetivamente, enquanto no Ensaio I foram de 64% e 70% respetivamente. Estes valores confirmam o que foi dito anteriormente, ou seja, que embora os processos associados com a matriz tenham um efeito mais rápido na remoção dos fármacos, os processos mais lentos que ocorrem nos leitos plantados associados à componente biota permitem atingir maiores percentagens de remoção ao fim de um período mais longo.

Verifica-se, assim que no final da experiência (120 h) a presença de plantas no leito contribuiu para uma remoção adicional de diclofenac de ~37% e de furosemida de ~32%. Esta maior eficiência de remoção obtida no leito plantado poderá resultar da ocorrência de vários processos que estão relacionados, direta ou indiretamente, com a presença das plantas no sistema, nomeadamente a adsorção dos fármacos às raízes e rizomas das plantas; a absorção dos fármacos pelas raízes e sua eventual translocação para as partes aéreas da planta com uma possível metabolização ou sequestração em compartimentos celulares adequados; um aumento da biodegradação na matriz, em particular na rizosfera, a qual é potenciada pelo efeito estimulante de alguns exsudados libertados pelas raízes das plantas no desenvolvimento dos microorganismos; e ainda à transformação/degradação dos compostos catalisada por enzimas presentes nesses exsudados. De facto, a transformação de compostos contendo grupos funcionais amina ($-NH_2$) e hidroxilo ($-OH$) pode ser catalisada por enzimas extracelulares presentes na rizosfera (Dietz e Schnoor, 2001). Tanto a furosemida como o diclofenac são compostos com estas características, cuja degradação pode potencialmente ser facilitada pela ação deste tipo de enzimas.

A presença de plantas macrófitas nos leitos pode também promover a ocorrência de processos aeróbios de degradação na rizosfera, mais eficientes do que os processos anaeróbios de degradação dos compostos, graças à libertação de oxigénio pelas raízes das plantas e conseqüente maior arejamento da rizosfera (Zwiener *et al.*, 2002; Matamoros *et al.*, 2008). Por outro lado, as plantas no leito tornam ainda mais favorável o processo de adsorção dos fármacos aos dois materiais argilosos devido à criação de condições propícias à intensificação das interações electrostáticas pois, como já foi referido no ponto 3.3.2, nos leitos plantados, o pH do meio é neutro (~ 6-7) e para estes valores de pH, o diclofenac e a furosemida estão preferencialmente na forma aniónica, enquanto a LECA e vermiculite terão os seus grupos silanol e aluminol carregados positivamente. Em contrapartida, nos leitos não plantados apenas a LECA está carregada positivamente neste intervalo de valores de pH do meio (8-9).

Todos estes fatores permitem explicar por que razão a remoção dos fármacos no leito plantado passa a ser superior ao verificado nos leitos apenas com matriz ao longo do período de realização da experiência. Refira-se ainda que, em estudos realizados em microcosmos construídos com uma matriz constituída apenas por LECA, mas com o mesmo tipo de plantas e com condições de operação idênticas às do presente estudo, foram observados comportamentos semelhantes (Dordio *et al.*, 2009b, Dordio *et al.*, 2010, Dordio, 2013b).

Em estudos realizados em hidroponia com a *Typha* também já foi demonstrado a capacidade desta planta para remover diversos fármacos da água, incluindo a furosemida e o diclofenac (Dordio *et al.*, 2011 Bartha *et al.*, 2014; Cui e Schroder, 2016; Machado *et al.*, 2020)

Tendo em vista um aumento global do desempenho dos LCM na remoção dos fármacos, principalmente em situações de derrames, e com base nos resultados apresentados anteriormente referentes à escolha do CA a utilizar, uma pequena quantidade de carvão ativado da Panreac, sobre a forma de um pó fino, foi adicionada à matriz.

Uma primeira observação das figuras 3.8 e 3.9, salienta-se que nos Ensaio II e V, que continham CA como aditivo na matriz, as percentagens de remoção dos dois fármacos sofreram um aumento significativo em comparação com os valores obtidos nos ensaios correspondentes (I e IV), mas sem adição de CA.

Como foi verificado nos Ensaio I e IV, também nos Ensaio II e V, numa fase inicial, após 0,5 h de contato, predominam os fenómenos de adsorção à matriz. A comparação entre os Ensaio IV e V põe em evidência a contribuição da adsorção na superfície do CA, para o aumento da percentagem de remoção dos dois fármacos. Após 0,5 h de contato, no Ensaio IV (sem CA), as percentagens de remoção eram de 27,86% e 31,94% para o diclofenac e furosemida respetivamente, enquanto que no Ensaio V, que contém CA na composição da matriz, as percentagens de remoção dos dois fármacos mais do que duplicaram em relação aos valores obtidos no Ensaio IV, sendo de 68,53% e 63,06% para o diclofenac e furosemida, respetivamente.

Estas diferenças entre os dois leitos podem ser explicadas pelo facto de os dois Ensaio apresentarem cinéticas de remoção dos fármacos distintas, como será referido em 3.3.4. No caso do leito que contém CA na composição da sua matriz, os fenómenos de adsorção continuam durante um período mais prolongado, podendo ocorrer um rearranjo das moléculas dos fármacos que se encontram na superfície dos CA promovendo um aumento da quantidade adsorvida, ao longo do tempo.

Para os tempos de contacto de 7,5 h e 120 h os valores de percentagem de remoção dos dois fármacos nos dois tipos de Ensaio (II e V) são agora bastante diferentes. Os leitos do Ensaio IV apresentaram valores de remoção do diclofenac de 37% e de 40%, para os tempos de contacto de 7,5 h e 120 h respetivamente, enquanto o leito constituído pela matriz modificada pela adição de CA (Ensaio V) apresenta valores de remoção do diclofenac de 86,21% e de 95,66% para os mesmos tempos de contacto (figura 3.8).

No caso da furosemida, no Ensaio IV, as percentagens de remoção para os tempos de contacto de 7,5 h e 120 h foram de 36,83% e 38,37 % respetivamente, enquanto no Ensaio V foram de 76,15% e 83,12% respetivamente (figura 3.9). Estes valores põem em evidência a contribuição dos fenómenos de adsorção rápidos que ocorrem inicialmente na superfície dos CA, mas também da presença de fenómenos de adsorção mais lentos que ocorrem devido a fenómenos de rearranjo na superfície dos CA e que favorecem o aumento da remoção, dos fármacos em estudo, ao fim de um período mais longo.

Nos leitos plantados com *Typha* foi também adicionada uma pequena quantidade de CA para avaliar a influência do mesmo no desempenho dos LCM na remoção dos fármacos. Quando comparamos o desempenho de remoção do diclofenac e da furosemida nos leitos, Ensaios I (matriz+plantas) e II (matriz+plantas+CA) é possível verificar um aumento da percentagem de remoção de todos os fármacos no Ensaio II.

A comparação entre os Ensaios I e II coloca novamente em evidência a contribuição da adsorção na superfície do CA para o aumento da percentagem de remoção dos dois fármacos. Após 0,5h de contato, no Ensaio I (leito plantado com *Typha*, sem CA na matriz), as percentagens de remoção eram de 29,13% e 36,37% para o diclofenac e furosemida, enquanto que no Ensaio II, que contém CA na composição da matriz, as percentagens de remoção dos dois fármacos mais do que duplicaram em relação aos valores obtidos no Ensaio I, sendo de 76,94% e 77,33% para o diclofenac e furosemida respetivamente.

Com a continuação do tempo de contato, os leitos do Ensaio I apresentaram valores de remoção do diclofenac de 67,68% e de 77,74%, para os tempos de contacto de 7,5 h e 120 h respetivamente, enquanto o leito constituído pela matriz modificada pela adição de CA (Ensaio II) apresenta valores de remoção de diclofenac de 92,71% e de 99,5%, para os mesmos tempos de contacto (figura 3.8).

No caso da furosemida, no Ensaio I, as percentagens de remoção para os tempos de contacto de 7,5 h e 120 h foram de 63,95% e 69,78 %, enquanto no Ensaio II foram de 86,12% e 92,01% respetivamente (figura 3.9). Estes valores põem em evidência a contribuição dos fenómenos de adsorção rápidos que ocorrem inicialmente na superfície dos CA, mas também da presença de fenómenos de adsorção mais lentos que ocorrem devido a fenómenos de rearranjo na superfície dos CA e que favorecem o aumento da remoção, dos fármacos em estudo, ao fim de um período mais longo.

Finalmente, uma comparação entre as eficiências de remoção dos dois fármacos nos leitos cuja matriz tinha na sua composição um aditivo de CA, mas que se

diferenciavam pela presença de plantas permite realçar o papel das plantas para a remoção continua ao longo de todo o tempo que decorreram os ensaios.

A comparação dos resultados obtidos nos Ensaios II e V coloca novamente em evidência a contribuição das plantas para o aumento da percentagem de remoção dos dois fármacos. Após 0,5h de contato, no Ensaio V (leito com CA na matriz, mas não plantado), as percentagens de remoção eram de 68,53,% e 63,06% para o diclofenac e furosemida respetivamente, enquanto que no Ensaio II (leito com CA na matriz, mas plantado com *Typha*), as percentagens de remoção dos dois fármacos eram superiores em 8,4% e 14,3% para o diclofenac e furosemida, respetivamente.

Com a continuação do tempo de contato, os leitos do Ensaio V apresentaram valores de remoção do diclofenac de 86,12% e 95,66% para os tempos de contacto de 7,5 h e 120 h respetivamente, enquanto o leito constituído pela matriz modificada pela adição de CA (Ensaio II) apresenta valores de remoção do diclofenac de 92,71% e de 99,5% para os mesmos tempos de contacto (figura 3.8).

No caso da furosemida, no Ensaio V, as percentagens de remoção para os tempos de contacto de 7,5 h e 120 h foram de 76,15% e 83,12 % respetivamente, enquanto no Ensaio II foram de 86,12% e 92,01% respetivamente (figura 3.9).

O incremento nas percentagens de remoção dos fármacos em estudo verificado entre estes dois leitos (Ensaio V e II) é assim atribuído à contribuição das plantas para o processo de remoção.

As eficiências de remoção dos dois fármacos estudados, diclofenac e furosemida, obtidas nos vários ensaios, são apresentadas na figura 3.10, para fins de comparação das eficiências de remoção dos diferentes leitos LCM na remoção dos dois compostos.

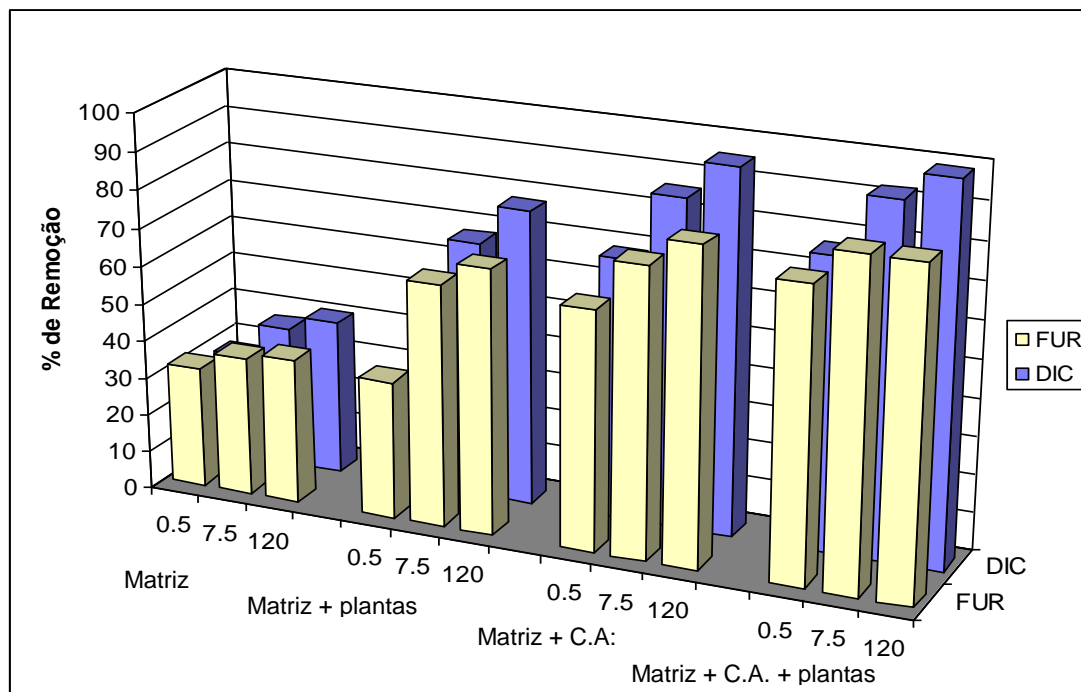


Figura 3.10 Comparação da remoção dos dois fármacos nos diferentes leitos.

Comparando as eficiências de remoção do diclofenac e da furosemida nos diferentes tipos de Ensaio (figura 3.10) verificou-se que os resultados obtidos para os dois fármacos nos leitos só com matriz (Ensaio IV), em que o principal processo responsável pela remoção dos fármacos é a adsorção aos materiais argilosos, são muito semelhantes. Tal poderá estar relacionado com o facto de estes dois fármacos apresentarem alguma semelhança nas suas estruturas, bem como em algumas das propriedades físico-químicas com maior influência nos processos de adsorção, em especial o valor de pKa (tabela 1.5). Na realidade, como já foi referido anteriormente, ao pH do meio (entre 8 e 9) os dois fármacos estão predominantemente desprotonados (aniónicos), pelo que deverão estabelecer o mesmo tipo de interações (essencialmente eletrostáticas) com a matriz de suporte.

Por sua vez, as percentagens de remoção do diclofenac, obtidas nos restantes leitos, quer nos que continham CA na composição da sua matriz, quer plantados com *Typha* ou não plantados, foram sempre superiores às obtidas com a furosemida (figura 3.10). Esta diferença pode estar relacionada com a diferença do pKa do diclofenac, que sendo superior ao pKa da furosemida contribui favoravelmente para a adsorção do mesmo, nos diferentes constituintes da matriz que apresentam características essencialmente básicas. Na realidade, o CA foi adicionado em quantidades relativamente baixas em comparação com as quantidades de LECA e vermiculite

utilizadas, mas o CA utilizado também exibe propriedades essencialmente básicas ($\text{pH}_{\text{pzc}} = 8.12$), o que também contribui para o bom desempenho dos leitos.

No Ensaio I (leito plantado) a remoção do diclofenac é superior à remoção da furosemida. Na realidade, dada a diferença entre os valores da hidrofobicidade dos dois compostos, seria previsível uma remoção pelas plantas diferenciada. Como já foi referido anteriormente, compostos orgânicos xenobióticos como a furosemida e o diclofenac, não possuem transportadores específicos nas membranas celulares, movendo-se para o interior da planta e dentro dos tecidos vegetais por simples difusão (transporte passivo) (Pilon-Smits, 2005). No entanto, a absorção e translocação destes compostos pelas plantas está dependente das suas propriedades físico-químicas, em particular, a sua hidrofobicidade, a qual é normalmente avaliada em termos do valor de $\log K_{ow}$ (Dietz e Schnoor, 2001; Pilon-Smits, 2005). Tal como já foi referido anteriormente, os valores de $\log K_{ow}$ considerados ideais (não excessivamente hidrofílicos nem excessivamente hidrofóbicos para conseguirem atravessar membranas celulares e se manterem solúveis em água) situam-se na gama de $0,5 < \log K_{ow} < 3,5$. Assim, a furosemida, com um $\log K_{ow}$ de 2,03 (tabela 1.5) é um composto moderadamente hidrofóbico e que se prevê que possa ser parcialmente adsorvido às raízes, mas também possivelmente absorvido pelas plantas e translocado para as suas partes aéreas. De facto, em estudos realizados em hidroponia por Machado em 2020, foi detetada a presença de furosemida em folhas de *Typha* o que demonstra que esta planta consegue efetivamente absorver e translocar para a parte aérea este composto. Outros fármacos moderadamente hidrofóbicos, como é o caso da carbamazepina ($\log K_{ow} \approx 2,45$), também já foram detetados nas partes aéreas de plantas (Dordio *et al.*, 2011).

Por outro lado, o diclofenac, sendo um composto mais hidrofóbico ($\log K_{ow} = 4.51$), embora possa sofrer absorção radicular e consequente translocação/metabolização no interior dos tecidos vegetais, seria de esperar que estivesse maioritariamente sujeito a adsorção/imobilização nas paredes celulares e camada lipofílica das raízes das plantas. Assim, a maior remoção deste composto nos leitos plantados contraria a visão comumente aceite. Existem, no entanto, alguns estudos que sugerem que o valor de $\log K_{ow}$ do composto pode não ser o único fator a determinar a sua tendência para ser absorvido pelas plantas e há alguns casos de compostos capazes de atravessar membranas de plantas, apesar de possuírem um elevado $\log K_{ow}$ (Kummerer, 2004). O potencial para um composto ser removido por uma dada planta pode estar dependente de outros fatores, tais como a sua concentração inicial, o tamanho da molécula, a anatomia e o sistema radicular da planta, a fase de desenvolvimento vegetativo da

planta, etc. (Chaudhry *et al.*, 2005). Assim, o caso do diclofenac poderá incluir-se nestas exceções. Por outro lado, uma menor tendência do diclofenac para ser absorvido pelas plantas pode também ser contrariada por uma maior tendência do composto em ser adsorvido nas suas raízes ou nos biofilmes que se desenvolvem sobre a superfície da matriz, os quais têm maior afinidade para compostos mais hidrofóbicos.

O desempenho inferior face à remoção da furosemida pode ser atribuída à dificuldade que a molécula tem em aceder ao interior dos poros presente nos vários componentes da matriz, com especial destaque para os poros de pequenas dimensões que se encontram presentes no CA que foi usado como aditivo na matriz dos LCM. O CA da Panreac apresenta um volume poroso relativamente elevado, com tamanho médio de poros na ordem dos 0,97 nm de diâmetro e o diclofenac e furosemida apresentam dimensões na ordem de 0,97 x 0,96 nm (Sotelo *et al.*, 2014) e 1,05 x 1,36 x 0,49 nm (Le *et al.*, 2019), respetivamente. Com base nas dimensões dos dois fármacos, é possível concluir que a furosemida terá alguma dificuldade em aceder ao volume poroso disponível, principalmente aos poros mais estreitos.

3.3.4. Estudo cinético

A eficiência de tratamento em LCMs é função, entre outros fatores, do tempo de retenção hidráulico. Para maximizar esta eficiência, o tempo de residência da água contaminada dentro do leito deve ser o suficiente para garantir a remoção física, química e biológica dos poluentes. Por sua vez, o valor ótimo para o tempo de residência é dependente de outros fatores como a configuração do leito, a taxa de inundação, a área superficial disponível, a espécie e a densidade de plantas selecionadas, o tipo de matriz de suporte, a população microbiana e as condições climáticas.

É normalmente a atividade da componente biota que condiciona a definição do tempo de retenção do efluente no LCM, pois geralmente os processos biológicos de degradação dos poluentes apresentam cinéticas mais lentas do que os processos físicos e químicos de tratamento. Um período entre os 4 e 15 dias é normalmente considerado o tempo necessário para que a remoção dos poluentes em LCMs seja eficiente (Metcalf e Eddy, 1991), sendo o período de 6-7 dias considerado ótimo para o tratamento dos efluentes domésticos em LCMs (Cooper *et al.*, 1996).

Contudo, este período depende das características e da concentração dos poluentes e de todos os outros fatores acima mencionados. Tempos de residência mais longos no leito permitem um contacto mais prolongado dos poluentes com os componentes dos

LCMs, resultando assim em maiores eficiências de remoção. No entanto, tempos de residência demasiado longos também podem permitir a estagnação do efluente e a criação de condições anaeróbias, para além de exigirem uma área mais extensa para a implementação dos leitos. Por outro lado, tempos de retenção reduzidos podem não ser suficientes para que ocorram muitos dos processos responsáveis pela remoção dos poluentes. Assim, torna-se fundamental avaliar a influência do tempo de retenção na eficiência de remoção dos poluentes nos leitos, de modo a obter a maior eficiência de tratamento no menor período de retenção possível.

Em estudos realizados com o objectivo de avaliar a influência do tempo de retenção na remoção de fármacos em LCMs, os tempos mais testados variaram entre 1 a 10 dias, incidindo com frequência no intervalo de 2 a 6 dias (Verlicchi e Zambello, 2014; Llyas e Hullebusch, 2019; Zhang *et al*, 2014; Gorito *et al*, 2017, Ilyas e Hullebusch, 2020). Nestes estudos conclui-se que o tempo de retenção é, sem dúvida, um parâmetro com uma influência fundamental na eficiência de remoção de fármacos nos LCMs.

Assim, efetuou-se o estudo cinético de remoção do diclofenac e da furosemida nos diferentes ensaios, realizados até uma duração máxima das experiências de 120 h. Os ensaios foram realizados em descontínuo de modo a mais facilmente caracterizar o perfil cinético dos processos de adsorção. Ainda que os sistemas reais sejam muitas vezes operados em contínuo, este é um passo de estudo essencial para definir certos parâmetros de operação, em particular o tempo de retenção hidráulica, que mais facilmente se obtém em estudos em descontínuo. Naturalmente que, numa fase posterior, estes parâmetros deduzidos a partir destes estudos terão que ser afinados em ensaios realizados em condições mais próximas das situações reais, nomeadamente em operação em contínuo, se for o caso do sistema a implementar.

Nas figuras 3.11 e 3.12 estão apresentados os perfis cinéticos determinados nos diferentes ensaios/leitos para o diclofenac e para a furosemida respetivamente.

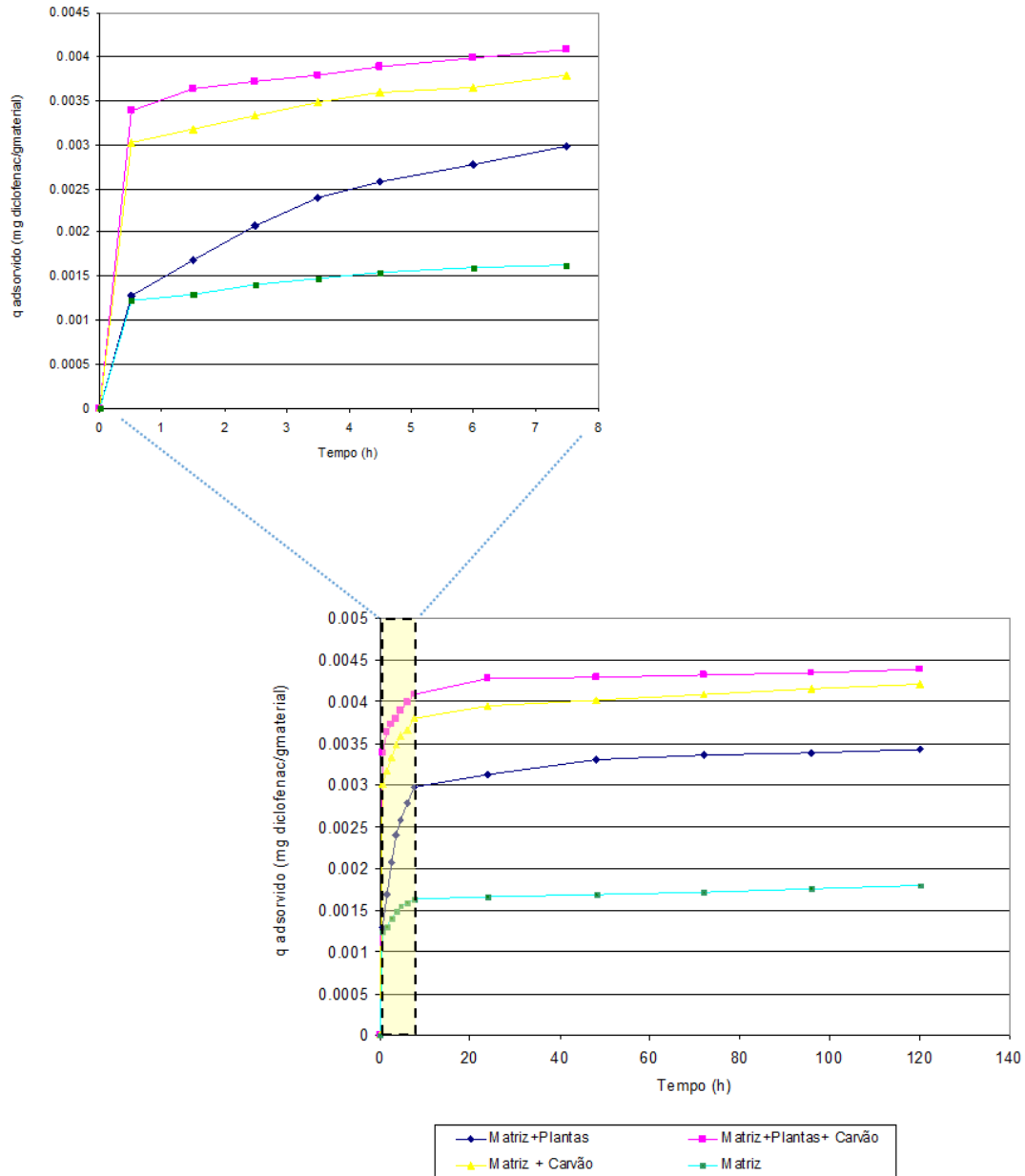


Figura 3.11 Cinética de remoção do diclofenac nos ensaios.

Durante o período de realização das experiências a remoção do diclofenac aumentou continuamente em todos os ensaios até atingir o equilíbrio. O equilíbrio foi atingido entre as 24h e 48h de contacto em todos os sistemas com exceção do leito constituído pela matriz + plantas (Ensaio I) onde o equilíbrio só foi atingido às ~ 96h.

No que diz respeito à cinética de remoção do diclofenac nos diferentes ensaios realizados verifica-se que é na fase inicial até às 7,5 horas, que o processo de

remoção é mais rápida, continuando depois a remoção em todos os ensaios, contudo com uma evolução mais lenta.

Sendo de notar que, em todos os ensaios, é na primeira meia hora que o processo de remoção é mais rápido, continuando até às 7,5 horas a registar-se um comportamento de remoção idêntico, embora com eficiências/quantidades removidas diferentes, para todos os ensaios à exceção do ensaio constituído pela matriz+plantas (linha azul) onde a taxa de remoção é muito superior em comparação com os restantes leitos.

Na figura 3.12 apresentam-se os perfis cinéticos de remoção da furosemida, determinados nos diferentes ensaios, até uma duração máxima de 120 h.

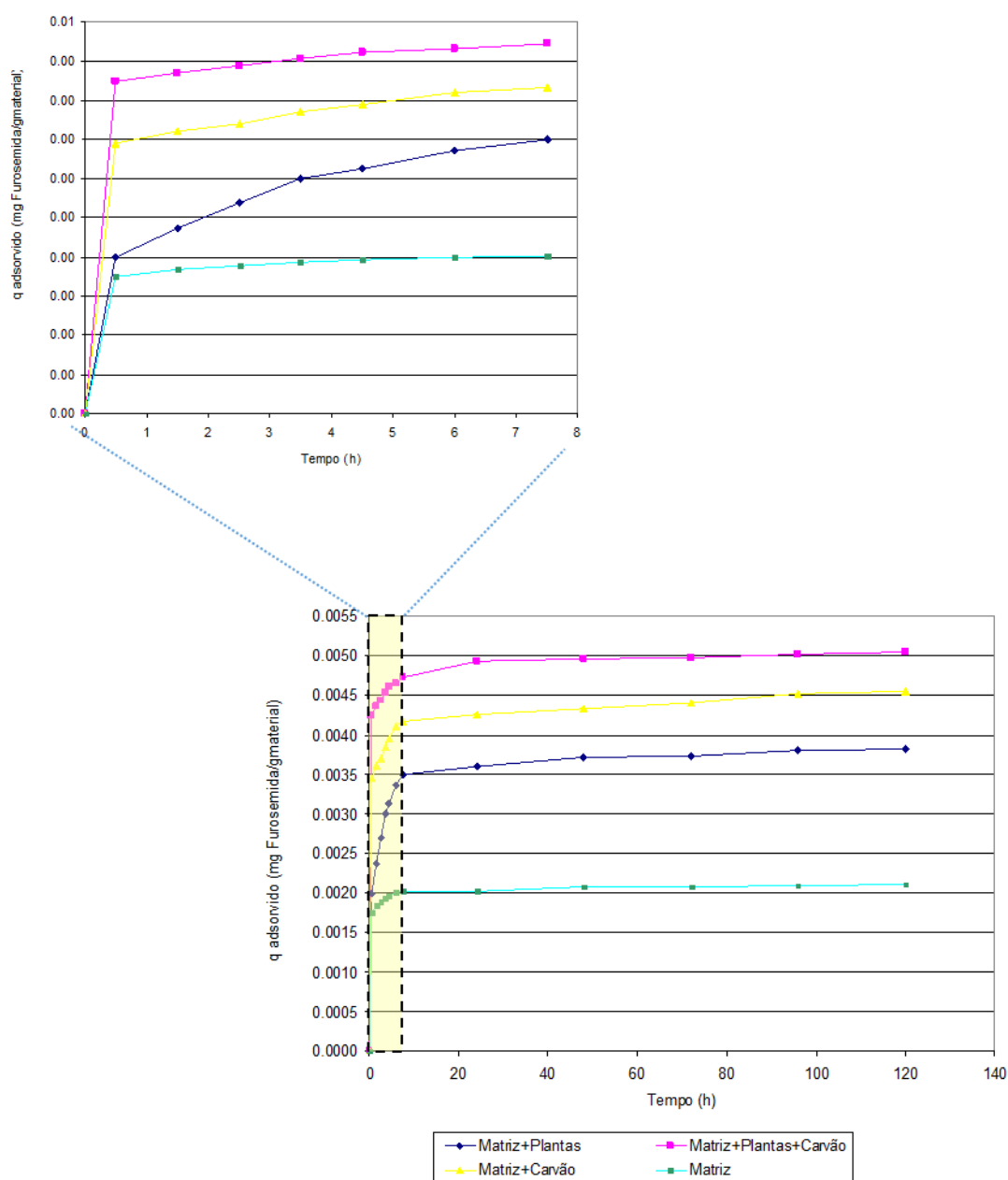


Figura 3.12 Cinética de remoção da furosemida nos ensaios.

Também com a furosemida se verificou que o equilíbrio é atingido entre as 24 e as 48 horas, em todos os sistemas, exceto para o leito com matriz+plantas (Ensaio I) onde o equilíbrio só ocorre aproximadamente às 96 horas. Observa-se que, como aconteceu com o diclofenac, são nas primeiras 7,5 horas onde ocorre um processo de remoção do fármaco mais rápido e que depois deste pico inicial o crescimento da taxa de remoção continua a ocorrer mas de forma mais moderada em todos os ensaios.

Para complementar a informação sobre a remoção dos dois fármacos ao longo do estudo, são apresentados os ajustes dos dados cinéticos experimentais aos modelos de cinética de pseudo-primeira ordem (no período inicial, até às 7,5h) e de pseudo-segunda ordem (ajustes em três diferentes períodos: no período inicial, até às 7,5h; no período desde as 24h até ao final, 120h; e em todo o período de duração do ensaio). De facto, estes dois modelos cinéticos são os que têm mostrado ajustar-se melhor aos processos de adsorção de vários fármacos incluindo a furosemida (Machado, *et al.*, 2017).

A forma linearizada do modelo cinético de pseudo-primeira ordem é dada pela equação 2:

$$\ln(q_e - q_t) = -k_1 t + \ln(q_e) \quad (2)$$

onde q_e representa a quantidade de adsorbato adsorvida no equilíbrio (mg g^{-1}), q_t representa a quantidade de adsorbato adsorvida no tempo t (mg g^{-1}), k_1 é a constante de velocidade de pseudo-primeira ordem (h^{-1}) e t é o tempo de contacto (h).

A forma linearizada do modelo cinético de pseudo-segunda ordem é dada pela equação 3:

$$\frac{t}{q_e} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (3)$$

onde os símbolos da equação anterior mantêm o mesmo significado e k_2 é a constante de velocidade de pseudo-segunda ordem ($\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Nas tabelas 3.3 e 3.4 são apresentados os parâmetros cinéticos para as remoções da furosemida e do diclofenac, obtidos a partir dos ajustes dos dados cinéticos a curvas de pseudo-primeira ordem ou pseudo-segunda ordem, as quais são apresentadas nas figuras 3.13 e 3.14.

Tabela 3.3 Parâmetros cinéticos da remoção da furosemida nos ensaios.

	Pseudo-primeira ordem				Pseudo-segunda ordem			Pseudo-segunda ordem			Pseudo-segunda ordem		
	0,5 – 7,5 h				0,5 – 7,5 h			24 – 120 h			0 – 120 h		
	q_{exp}	k_1	q_{calc}	R^2	k_2	q_{calc}	R^2	k_2	q_{calc}	R^2	k_2	q_{calc}	R^2
Matriz	0.002102	0.2053	0.000365	0.9905	5.948725	0.002028	0.9993	671.7772	0.002122	1	51.66146	0.002102	1
Matriz + Plantas	0.003822	0.2511	0.002082	0.9987	71.08298	0.003604	0.9876	1358.776	0.003889	0.9998	210.0806	0.003828	0.9998
Matriz + Carvão	0.004554	0.1565	0.001209	0.994	7.867311	0.004195	0.9977	1998.815	0.004651	0.9996	113.5829	0.004532	0.9996
M + P + C	0.005041	0.1311	0.00083	0.9883	1.753327	0.004729	0.9995	206.4878	0.005072	0.9999	28.40641	0.005035	0.9999

q_{exp} : o valor experimental da quantidade de adsorbato adsorvida no equilíbrio ($\text{mg}_{\text{composto}} \text{g}^{-1}_{\text{material}}$); k_1 : constante de velocidade de pseudo-primeira ordem (h^{-1}); q_{calc} : o valor calculado, a partir da equação modelo, para a quantidade de adsorbato adsorvida no equilíbrio; k_2 : constante de velocidade de pseudo-segunda ordem ($\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$); R^2 : coeficiente de determinação.

Tabela 3.4 Parâmetros cinéticos da remoção do diclofenac nos ensaios.

	Pseudo-primeira ordem				Pseudo-segunda ordem			Pseudo-segunda ordem			Pseudo-segunda ordem		
	0,5 – 7,5 h				0,5 – 7,5 h			24 – 120 h			0 – 120 h		
	q_{exp}	k_1	q_{calc}	R^2	k_2	q_{calc}	R^2	k_2	q_{calc}	R^2	k_2	q_{calc}	R^2
Matriz	0.001794	0.1912	0.000629	0.9905	42.91485	0.001658	0.996	7448.045	0.001829	0.999	387.0812	0.001772	0.9993
Matriz+Plantas	0.003422	0.2232	0.002365	0.9965	208.1052	0.003129	0.9725	2508.381	0.003501	1	556.2473	0.00344	0.9998
Matriz+Carvão	0.004211	0.148	0.001273	0.9904	10.94216	0.003802	0.9973	1984.106	0.00429	0.9997	149.4232	0.00419	0.9997
M+P+C	0.00438	0.1621	0.001016	0.9905	5.427659	0.004086	0.9984	290.0745	0.004407	0.9999	48.64759	0.004374	0.9999

q_{exp} : o valor experimental da quantidade de adsorbato adsorvida no equilíbrio ($\text{mg}_{\text{composto}} \text{g}^{-1}_{\text{material}}$); k_1 : constante de velocidade de pseudo-primeira ordem (h^{-1}); q_{calc} : o valor calculado, a partir da equação modelo, para a quantidade de adsorbato adsorvida no equilíbrio; k_2 : constante de velocidade de pseudo-segunda ordem ($\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$); R^2 : coeficiente de determinação.

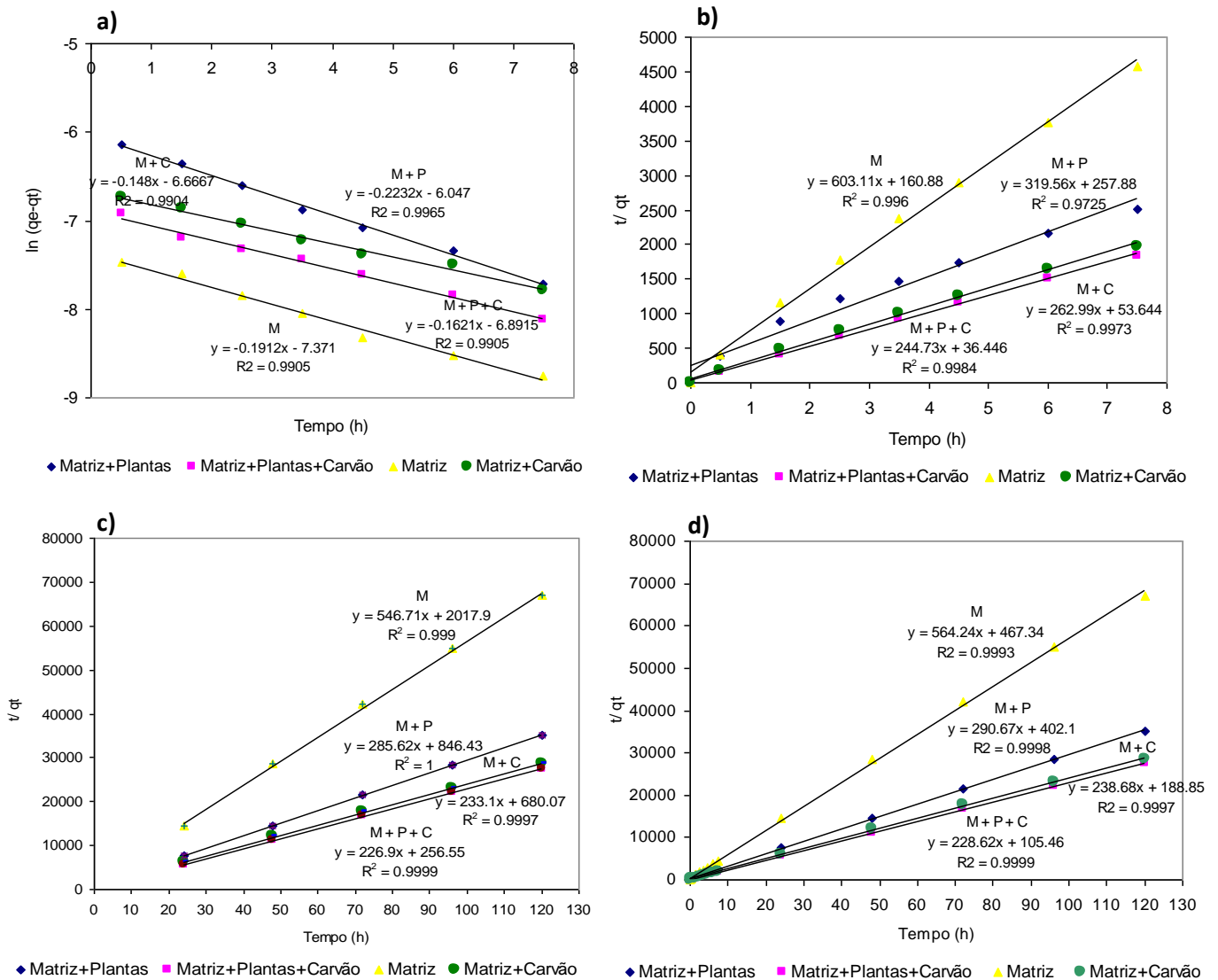


Figura 3.13 Ajustes dos dados cinéticos experimentais do diclofenac aos diferentes modelos. a) cinética de pseudo-primeira ordem (no período inicial, até às 7,5h); b) cinética de pseudo-segunda ordem (no período inicial, até às 7,5h); c) cinética de pseudo-segunda ordem (no período desde as 24h até ao final, às 120h); e d) cinética de pseudo-segunda ordem (em todo o período de duração do ensaio).

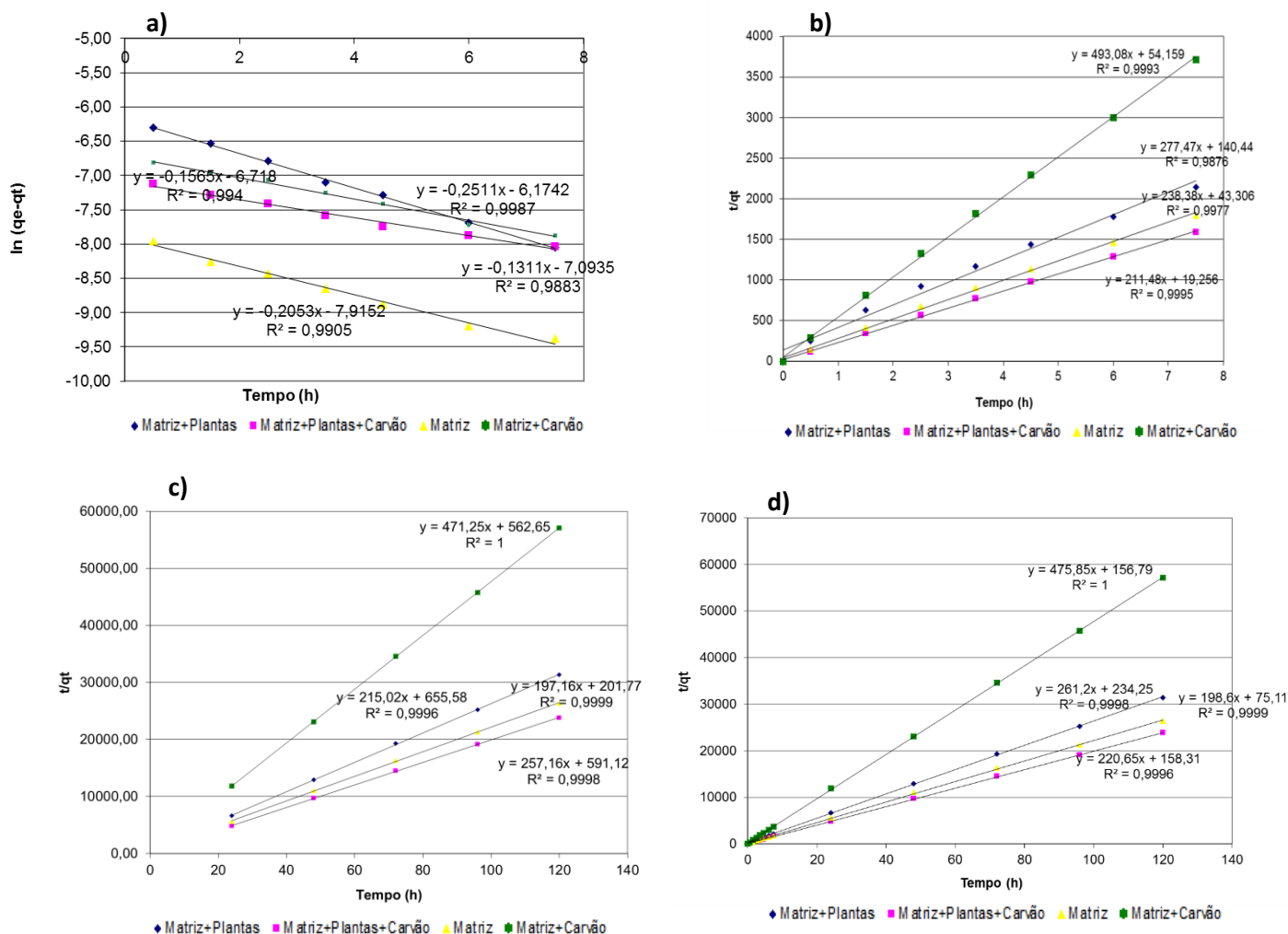


Figura 3.14 Ajustes dos dados cinéticos experimentais da furosemida aos diferentes modelos. a) cinética de pseudo-primeira ordem (no período inicial, até às 7,5h); b) cinética de pseudo-segunda ordem (no período inicial, até às 7,5h); c) cinética de pseudo-segunda ordem (no período desde as 24h até ao final, às 120h); e d) cinética de pseudo-segunda ordem (em todo o período de duração do ensaio).

Dos ajustes de várias fases dos processos de remoção dos fármacos aos modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem, que se podem observar nas figuras. 3.13 e 3.14, e cujos parâmetros são apresentados nas tabelas 3.3 e 3.4, pode se deduzir que na fase inicial (0,5h-7,5h) os processos de remoção de ambos os fármacos seguem uma cinética que se caracteriza melhor pelo modelo de pseudo-segunda ordem (R^2 mais próximos de 1) excepto no sistema de Matriz+Plantas (Ensaio I) onde o ajuste ao modelo de pseudo-primeira ordem se revela melhor. Por outro lado, tanto no período de 24h-120h como para a duração total da experiência, o

modelo de pseudo-segunda ordem ajusta-se sempre melhor aos dados experimentais para todos os ensaios e para todos os fármacos. Os ajustes ao modelo de pseudo-primeira ordem são bastante fracos quando se considera todo o período de duração da experiência ($R^2 < 0,7$, dados não mostrados) e, embora estes sejam melhores no período de 24h-120h (R^2 entre 0,89 e 0,995, dados não mostrados), são, ainda assim, piores do que os ajustes ao modelo de pseudo-segunda ordem.

É também notório da análise dos parâmetros cinéticos apresentados nas tabelas 3.3 e 3.4 que, tal como se tinha já referido no ponto 3.4, se verifica que os processos de remoção de ambos os fármacos decorrem em duas etapas distintas, sendo os parâmetros cinéticos (em especial o k_2) obtidos para os modelos de pseudo-segunda ordem no período de 0,5h – 7,5h bastante diferentes (e maiores) dos obtidos para uma cinética do mesmo tipo mas no período de 24h – 120h, revelando portanto alguma alteração no mecanismo de remoção. Além do mais, a cinética no primeiro período é bastante mais rápida do que no período seguinte, pelo que a vantagem em prolongar o processo de tratamento com tempos de retenção hidráulica superiores a 24h reduz-se significativamente e os ganhos em remoção adicional dos fármacos poderão não justificar os custos de dimensionamento para tempos de retenção mais prolongados.

3.4. Resposta fisiológica das plantas ao stress abiótico

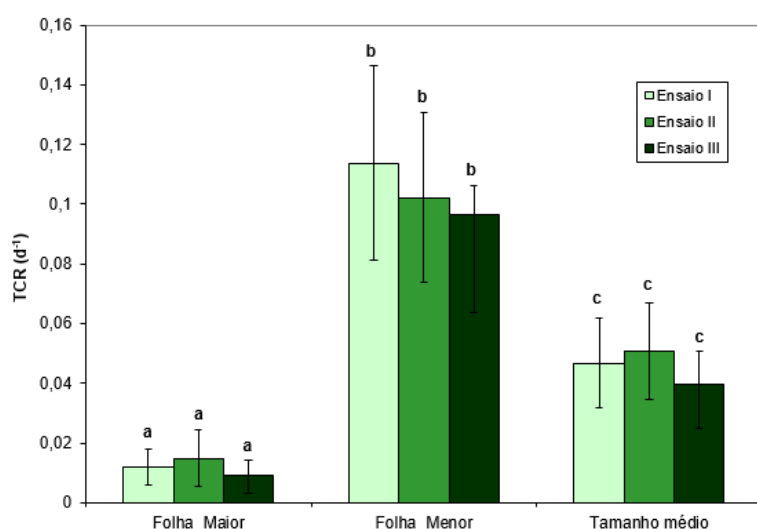
No estudo realizado, a exposição das plantas de *Typha* spp. aos fármacos e a possível absorção de alguns desses compostos poderia ser um fator de stress abiótico para as plantas, que se poderia manifestar através de uma possível alteração de alguns parâmetros fisiológicos (e.g. crescimento, formação de rebentos, fotossíntese) e bioquímicos (e.g. atividade de enzimas antioxidantes). Assim, de modo a se proceder a uma primeira avaliação dos possíveis efeitos causados por este fator de stress, determinou-se a taxa de crescimento relativo (TCR) da folha maior e da menor, em todas as plantas usada nos ensaios. Os valores obtidos, nas plantas expostas à solução de fármacos (Ensaio I e II), foram comparados aos obtidos nas plantas do controlo (Ensaio III).

O efeito de fitotoxicidade dos fármacos nas plantas foi ainda avaliado através da contagem do número de novas folhas de cada planta, da observação de novos rebentos e da inspeção visual do aspeto das plantas (aparecimento de cloroses, necroses, etc.) durante todo o período de realização da experiência.

As taxas de crescimento relativo (TCR) das folhas maior e menor das plantas nos diferentes ensaios, foram calculadas recorrendo à equação proposta por Hunt (Gracia-Lor *et al.*, 2012):

$$TCR = \frac{\ln p_2 - \ln p_1}{t}$$

onde p_1 e p_2 são respetivamente o tamanho inicial (cm) e final (cm) das folhas, e o t é o período de duração do ensaio em horas. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 3.15.



Ensaio I (matriz + planta + fármacos), II (matriz + CA + planta + fármaco) e III (matriz + plantas + H₂O)

Figura 3.15 Taxa de crescimento relativo médio da folha maior, da menor e do tamanho médio das plantas para um tempo de estudo de 120 horas. Diferentes letras significam valores significativamente diferentes para P<0.05.

Comparando as taxas de crescimento relativo médias das folhas maior e menor, bem como do tamanho médio das plantas dos Ensaio I, II e III, não se verificam diferenças significativas no crescimento de nenhuma das folhas. Embora no caso das folhas menores o valor médio da TCR, para as plantas expostas aos fármacos (Ensaio I e II), fosse ligeiramente superior ao observado para o ensaio controlo (Ensaio III). Como já foi referido anteriormente, essas diferenças não são estatisticamente significativas e resultam de uma elevada dispersão dos valores (variância) para as várias plantas. Tal dispersão de resultados, que limita o alcance da sua interpretação, poderá ser devido à amostra (número de pés de plantas) ser relativamente pequeno e o estado de crescimento das plantas não ser suficientemente homogéneo. Desta forma, e pelos

dados observados na figura 3.15, não se pode garantir que os fármacos tenham tido um efeito notório, nem de inibição nem de estímulo no crescimento das plantas.

O mesmo comportamento foi verificado num estudo de Dordio *et al.*, (2011), onde foi verificado que a capacidade da *Typha* spp. em remover um fármaco, no caso a carbamazepina, sem se verificar efeitos significativos de toxicidade na planta.

Da inspeção visual feita às plantas expostas aos fármacos, ao longo do período de realização da experiência não se verificaram quaisquer sinais de toxicidade, tais como o aparecimento de cloroses (amarelecimento das folhas), folhas murchas ou secas na parte superior. Há ainda a referir que nos cinco dias de duração da experiência verificou-se o aparecimento de novas folhas e rebentos em todos os Ensaios.

IV Conclusões e perspectivas futuras

4. Conclusões e perspectivas futuras

Este trabalho constitui uma abordagem inicial à potencial utilização dos leitos construídos de macrófitas (LCMs) que se pretende otimizar para a remoção dos fármacos selecionados de águas contaminadas.

Numa primeira fase, neste estudo avaliou-se a eficiência de um microcosmos de leitos construídos de macrófitas, utilizando uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 3 (1:1, v:v) como matriz de suporte e plantado com *Typha* spp., para a remoção de diclofenac e furosemida de uma solução aquosa, tendo-se obtido elevadas eficiências de remoção dos dois fármacos (78% e 70%, respetivamente), ao fim de 120 horas de contacto, para uma concentração inicial de 2,5 mg L⁻¹ de cada um dos fármacos presentes em solução. A cinética da remoção dos fármacos no microcosmos foi caracterizada por uma fase inicial rápida até às 7,5 horas, prosseguindo depois a remoção, mas a uma taxa mais lenta. O equilíbrio foi atingido, em geral, entre as 24 e as 48 horas de contacto entre as soluções de fármacos e os sistemas de LCM, com algumas exceções em que equilíbrio só foi atingido após 96 horas de contacto. Estes resultados demonstram o potencial destes sistemas para tratar águas contaminadas com este tipo de poluentes, neste caso particular onde se encontravam quatro fármacos presentes em solução, num tempo de contacto relativamente curto.

Nos LCMs, a remoção de poluentes é alcançada através de uma interação complexa entre os seus componentes. Deste modo, a eficiência de remoção de poluentes pelos LCMs pode ser significativamente melhorada através da seleção cuidadosa desses componentes (a matriz de suporte, as plantas e a população microbiana) de forma a maximizar o papel desempenhado por cada um deles na remoção dos poluentes. Assim, neste trabalho deu-se particular atenção ao estudo do papel da matriz de suporte na remoção dos fármacos e à otimização da sua composição. Pretendeu-se também avaliar o papel das plantas na remoção dos compostos de modo a tentar encontrar formas de otimizar também a ação deste componente.

Verificou-se que a matriz de suporte utilizada nos leitos (LECA + vermiculite), foi responsável pela remoção de cerca de metade (53%-54%) da quantidade inicial dos fármacos presente na solução. Verifica-se assim que a mistura de materiais testada demonstra possuir uma boa capacidade de adsorção dos fármacos estudados, contribuindo com uma grande parte da sua remoção. Por outro lado, devido às suas características físico-químicas, estes materiais apresentam também um poder tampão que mantém o pH do meio próximo de 7, criando assim condições mais propícias ao desenvolvimento dos microrganismos e plantas. Adicionalmente, estes materiais apresentam também propriedades de porosidade e condutividade hidráulica

adequadas para o bom funcionamento dos leitos, constituindo, por todas estas razões, uma boa opção para a matriz de suporte de LCMs destinados à remoção dos fármacos estudados.

Apesar dos bons resultados obtidos para a mistura, inicialmente, utilizada como matriz de suporte procurou-se estudar o aumento da capacidade da matriz na retenção dos dois fármacos adicionando, à mesma, uma pequena quantidade de carvão ativado em pó. De facto, com a adição de carvão ativado conseguiu-se obter um aumento significativo das percentagens de remoção do diclofenac e da furosemida tanto no leito plantado (remoções finais de 99,5% e 92%, respetivamente) como nos leitos não plantados (remoções finais de 96% e 83%, respetivamente), tendo também tornado mais rápida a cinética da remoção dos dois fármacos. Estes resultados demonstram as potencialidades deste material para a adsorção destes poluentes. No entanto, a granulometria do carvão ativado testado pode constituir um problema para a sua utilização nos LCMs, especialmente em sistemas em modo contínuo, dada a facilidade com que este adsorvente, que foi utilizado sobre a forma de um pó fino, quando em suspensão, se perde na corrente de saída. Antes de considerar a sua aplicação em LCMs, será, portanto, necessário estudar alguma forma de aprisionar o carvão em pó no leito, por exemplo através de uma estratificação dos materiais que dificulte a formação da suspensão de carvão ativado. Por outro lado, o custo deste material poderá também ser uma condicionante na sua aplicação a uma escala maior. Uma possível aplicação de interesse e mais economicamente viável poderá ser a sua utilização pontual em situações de pico de carga poluente.

Em estudos futuros com o objetivo de otimizar o papel da matriz no aumento da eficiência de remoção de fármacos em LCMs, alguns tópicos de interesse a serem abordados poderão ser a avaliação de matrizes de suporte usando os mesmos materiais estudados neste trabalho (LECA, vermiculite e carvão ativado) mas testando diversas disposições (tais como a sua estratificação em camadas horizontais) e diferentes proporções dos materiais. Poderá também testar-se granulometrias diferentes destes materiais. No entanto, a procura de outros materiais, especialmente os de baixo custo e fácil acessibilidade, deve continuar estendendo a escolha, por exemplo, a sub-produtos da indústria ou desperdícios da atividade agrícola. Também deverá no futuro ser um objetivo ampliar a gama de fármacos testados, tendo em conta as classes terapêuticas e os princípios ativos de maior consumo e devem também ser testadas outras concentrações dos fármacos eventualmente mais próximas das concentrações ambientais.

Apesar de a matriz de suporte ser responsável pela remoção de cerca de metade da quantidade de fármacos presente em solução, a presença de plantas nos LCMs contribuiu para uma remoção adicional de diclofenac de ~37% e de furosemida de ~32% ao fim de 120 h de contacto. Deve-se notar que a realização das experiências decorreu num período de primavera, o que corresponde a uma fase de crescimento das plantas com máxima atividade vegetativa.

Esta elevada eficiência de remoção obtida no leito plantado poderá resultar da ocorrência de vários processos que estão relacionados, direta ou indiretamente, com a presença das plantas no sistema. Em concreto, a adsorção dos fármacos às raízes e rizomas das plantas; a absorção dos fármacos pelas raízes; um aumento da biodegradação na matriz, em particular na rizosfera; e ainda à transformação/degradação dos compostos catalisada por enzimas presentes nesses exsudados são alguns dos principais processos responsáveis pela remoção de fármacos que podem ser atribuídos à componente biótica.

Em trabalhos futuros seria interessante estudar de forma mais aprofundada o papel das plantas *Typha* spp. na remoção destes e de outros fármacos, nomeadamente a sua capacidade de absorver, translocar para as partes aéreas e possivelmente metabolizar os compostos.

No que diz respeito à potencial fitotoxicidade para as plantas de *Typha* spp. provocada pelos fármacos estudados, a partir da inspeção visual das plantas e determinação das suas taxas relativas de crescimento não foram aparentes efeitos significativos de toxicidade atribuíveis à sua exposição aos fármacos. No entanto, esta avaliação é bastante preliminar e seria interessante em trabalhos futuros estudar este tópico com mais profundidade, nomeadamente através da determinação de parâmetros fisiológicos tais como alterações de pigmentos fotossintéticos e a avaliação de parâmetros bioquímicos tais como a resposta do sistema enzimático responsável pela proteção aos efeitos de stress oxidativo.

Dadas as qualidades exibidas pela *Typha* spp., a espécie pode ser considerada como uma boa candidata para ser utilizada em LCMs para tratamento de águas contaminadas com os fármacos estudados. No entanto, apesar dos resultados positivos obtidos nestes ensaios, deve ser considerada a hipótese de, em estudos futuros, serem testadas outras espécies (por ex., *Phragmites australis*). A possibilidade de serem utilizadas várias espécies de plantas também deve ser equacionada como uma opção adicional de otimização destes sistemas. Também pode ser otimizada a densidade de plantas a utilizar.

Em futuros trabalhos de avaliação da eficiência dos LCMs deverão ser testadas condições mais realistas, em particular visando aspectos de primordial importância tais como a influência da complexidade das matrizes de águas residuais reais nas eficiências de remoção destes e outros fármacos, o impacto resultante de períodos de operação mais longos envolvendo vários ciclos de carga de influente nos sistemas, sensibilidade da performance dos sistemas às condições ambientais e climáticas (em especial, influências sazonais nas eficiências de remoção e nas cinéticas dos processos), diferenças entre modo de operação em contínuo relativamente ao modo de operação em descontínuo (testado em laboratório), bem como possíveis perdas de eficiência no aumento de escala desde o microcosmos até a uma escala real/industrial. No processo de aumento de escala, deverão ser necessárias otimizações adicionais, incluindo o estabelecimento dos tempos de retenção ótimos para um modo de operação em contínuo ou intermitente, bem como a avaliação das taxas de inundação ótimas.

Apesar da necessidade de esclarecer os pontos acima mencionados bem como outros que importa ainda aprofundar antes da real implementação destes sistemas, os resultados obtidos neste trabalho permitem, no entanto, encarar com otimismo esta alternativa de tratamento para a remoção de fármacos de efluentes e sugerem a continuação do investimento no estudo deste tipo de sistemas.

V Referências bibliográficas

5. Referências bibliográficas

Adsorção por carvão ativado (NaturalTec, 2010). Disponível em <http://www.naturaltec.com.br/filtro-carvao-ativado-remocao-sabor-odores/>, acessado em 26 de Abril de 2020.

Altman, R., Bosch, B., Brune, K., Patrignani, P., Young, C., 2015. Advances in NSAID development: evolution of Diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs*, 75, pp. 859-877.

APIFARMA, 2018. Volume de medicamentos consumidos em Portugal. Disponível em https://www.apifarma.pt/publicacoes/ifnumeros/Documents/IF_em_Numeros_2017.pdf. Acessado em 1 de Novembro 2019.

Ávila, C., Matamoros, V., Reyes-Contreras, C., Piña, B., Casado, M., Mita, L., Rivetti, C., Barata, C., García, J., Bayona, J.M., 2014. Attenuation of emerging organic contaminants in a hybrid constructed wetland system under different hydraulic loading rates and their associated toxicological effects in wastewater. *Science of The Total Environment*, 470-471, 1272-1280.

Azanu, D., Styryshave, B., Darki, G., Weisser, J., Abaidoo, R., 2018. Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Science of the Total Environment* 622-623, 293-305.

Baker, D., Kasprzyk-Hordern, B., 2011. Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 8036-8059

Bartha, B., Huber, C., Schroder, P., 2014. Uptake and metabolism of diclofenac in *Typha latifolia* – How plants cope with human pharmaceutical pollution. *Plant Science*, Volume 227, 12-20.

Bolton, E., Wang, Y., Thiessen, P., Bryant, S., 2008. Chapter 12 – PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities, in: R.A. 43 Wheeler, D.C. Spellmeyer (Eds.), *Annu. Rep. Comput. Chem.*, Elsevier, Oxford, UK, pp. 217–241.

Boxall, A., Rudd, M., Brooks, B., Caldwell, D., Choi, K., Hickmann, S., Innes, E., Ostapyk, K., Staveley, J., Verslycke, T., Ankley, G., Beazley, K., Belanger, S.,

Berninger, J., Carriquiriborde, P., Coors, A., DeLeo, P., Dyer, S., Ericson, J., Gagné, F., Giesy, J., Guin, T., Hallstrom, L., Karlsson, M., Larsson, D., Lazorchak, J., Mastrocco, F., McLaughlin, A., McMaster, M., Meyerhoff, R., Moore, R., Parrott, J., Snape, J., Murray-Smith, R., Servos, M., Sibley, P., Straub, J., Szabo, N., Topp, E., Tetreault, G., Trudeau, V., Kraak, G., 2012. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions?. *Environmental Health Perspectives*, 120(9), 1221-9.

Branchet, P., Castro, N., Fenet, H., Gomez, E., Courant, F., Sebag, D., Gardon, J., Jourdan, C., Ngatcha, B.N., Kengne, I., Cadot, E., Gonzalez, C., 2019. Anthropogenic impacts on Sub-Saharan urban water resources through their pharmaceutical contamination (Yaoundé, Center Region, Cameroon). *Science of The Total Environment*, 660, 886–898.

British Pharmacopoeia 2010. London: Stationary office, 2009. V.1.

Brix, H., Arias, C., Bubba, 2001. Media selection for sustainable phosphorus removal in subsurface flow constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 44, 47–54.

Bubba, M., Arias, C., Brix, H., 2003. Phosphorus adsorption maximum of sands for use as media in subsurface flow constructed reed beds as measured by the Langmuir isotherm. *Water Research*, 37, 3390–3400.

Cansado, I., 2003. Caracterização estrutural de materiais de carbono com recurso a vários adsorventes (2003). Tese de doutoramento, Universidade de Évora.

Cansado, I., Belo, C. E Mourão, P., 2018. Valorisation of Tectona Grandis tree sawdust through the production of high activated carbon for environment applications. *Bioresource Technology*, 249, 328–333.

Cansado, I., Galacho, C., Nunes, Á., Carrott, M., e Carrott, P., 2010. Adsorption properties of activated carbons prepared from recycled pet in the removal of organic pollutants from aqueous solutions. *Adsorption Science and Technology*, 28 (8–9), 807–821.

Cansado, I., Ramiro, C., Mourão, P., 2019. Pesticides abatement using activated carbon produced from a mixture of synthetic polymers by chemical activation with KOH and K₂CO₃. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 12, 100261-100268.

Carapeto, A., Pereira, E. P., Schwarzer, U., Clamote, F., Gomes, C., Caraça, R., Aguiar, C., Correia M. J., *et. al.* (2020). *Typha domingensis* Pers. – mapa de

distribuição. Flora-On: Flora de Portugal interactiva, Sociedade Portuguesa de Botânica. <http://www.flora-on.pt/#wTypha+domingensis>. Consulta realizada em 26/04/2020.

Carlson, M., Thompson, R., 2000. Analyte loss due to membrane filter adsorption as determined by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 38, 77-83.

Carvalho, P., Basto M., Almeida C., Brix, H. A review of plant–pharmaceutical interactions: from uptake and effects in crop plants to phytoremediation in constructed wetlands. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 11729–11763.

Castellan, G., 2011. *Fundamentos de Físico-química*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda.

Castrignanò, E., Kannan, A., Feil, E., Kasprzyk-Hordern, B., 2018. Enantioselective fractionation of fluoroquinolones in the aqueous environment using chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 206, 376–386.

Česen, M., Ahel, M., Terzić, S., Heath, D.J., Heath, E., 2019. The occurrence of contaminants of emerging concern in Slovenian and Croatian wastewaters and receiving Sava river. *Science of The Total Environment* 650, 2446-2453.

Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., Joner, E., 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental Science Pollution Research*, 12, 34-48.

Cid, J. 2011. *Contribuição para o estudo de sistemas de tratamento de água para abastecimento associados à remoção de compostos farmacêuticos. Tese de mestrado*. Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Lisboa.

Comerton, A., Andrews, R., & Bagley, D. 2009. Practical overview of analytical methods for endocrine-disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in water and wastewater. *Philosophical Transactions of The Royal Society Royal Society*, 367(1904), 3923–39.

Comissão europeia 2019. COMUNICAÇÃO DA COMISSÃO AO PARLAMENTO EUROPEU, AO CONSELHO E AO COMITÉ ECONÓMICO E SOCIAL EUROPEU, Abordagem Estratégica da União Europeia relativa aos Produtos Farmacêuticos no Ambiente. Bruxelas, 11.3.2019

Cooper P., Job G., Green M., Shutes R., 1996. Reed beds and constructed wetlands for wastewater treatment. Medmenham, Marlow, UK: WRc Publications

Costa, I., 2019. Vantagens e limitações da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Disponível em <https://www.linkedin.com/pulse/vantagens-e-limita%C3%A7%C3%B5es-da-t%C3%A9cnica-de-cromatografia-ferreira-costa>.

Acedido em 1 de Maio de 2020.

Couto, F., Lange, C., Amaral, S., 2019. Occurrence, fate and removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) in water and wastewater treatment plants – A review. *Journal of Water Process Engineering*, 32, 100927.

Cui, H., Schroder, P., 2016. Uptake, translocation and possible biodegradation of the antidiabetic agent metformin by hydroponically grown *Typha latifolia*. *Journal of Hazardous Materials*, 308, 355-361.

Cunningham, V., 2008. Special characteristics of pharmaceuticals related to environmental fate, in: Kümmerer, K. (ed.), *pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks*. Springer - Verlag, Berlin, Germany, 23-34.

Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 442-448.

Decreto-lei nº218/2015 de 7 de outubro

Decreto-Lei nº76/2006, de 30 de Agosto

Dietz, A., Schnoor, J., 2001. Advances in phytoremediation, *Environmental Health Perspectives*, 109,163–168.

Dordio, A., Belo, M., Teixeira, D., Carvalho, A. 2011. Evaluation of carbamazepine uptake and metabolization by *Typha* spp. a plant with potencial use in phytotreatment. *Bioresource Technology*, 102 (17), 7827-34.

Dordio, A., Carvalho, A., 2018. Removal Processes of Pharmaceuticals in Constructed Wetlands. In *Constructed Wetlands for Industrial Wastewater Treatment*. In S. Alexandros (Ed.) (p.584).

Dordio, A., Carvalho, A., 2015. Removal of pharmaceuticals in conventional wastewater treatment plants. In: Barrett, L. M. (Ed.) *Wastewater Treatment: Processes, Management Strategies and Environmental/Health Impacts*, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, pp. 1-44.

Dordio, A., Carvalho, A., 2013a. Organic xenobiotics removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of the support matrix. *Journal of Hazardous Materials*, 252-253, 272-292.

Dordio, A., Carvalho, A., 2013b. Constructed wetlands with light expanded clay aggregates for agricultural wastewater treatment, *Science of The Total Environment*., 463, 454–461.

Dordio, A.; Carvalho, A. J. P; Hijosa-Valsero, M.; Becares, E.. 2018. The Role of Macrophytes in the Removal of Organic Micropollutants by Constructed Wetlands. In *Artificial or Constructed Wetlands: A Suitable Technology for Sustainable Water Management*, ed. María del Carmen Durán-Domínguez-de-Bazúa, Amado Enrique Navarro-Frómata, Josep M. Bayona, Boca Raton, Florida: CRC Press.

Dordio, A., Carvalho, A., Pinto, A., 2008. Wetlands: Water living filters?. Russo, Raymundo E., *Wetlands: Ecology, Conservation and Restoration*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, 15-72.

Dordio, A., Carvalho, A., Teixeira, D., Dias, C., Pinto, A., 2010. Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using typha spp. and LECA. *Bioresource Technology*, 101, 886-892.

Dordio, A., Estévão Candeias, A., Pinto, A., Teixeira da Costa, C., Palace Carvalho, A., 2009. Preliminary media screening for application in the removal of clofibric acid, carbamazepine and ibuprofen by ssf-constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 35, 2, 290-302.

Dordio, A., Miranda, S., Ramalho, J., Carvalho, A., 2017. Mechanisms of removal of three widespread pharmaceuticals by two materials. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 575-583.

Dordio, A., Pinto, J., Dias, C., Pinto, A., Carvalho, A., Teixeira, D., 2009b. Atenolol removal in microcosmo constructed wetlands. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89, 8-12, 835 - 848.

Dordio, A., Teimão, J., Ramalho, I., Carvalho, A., Candeias, A., 2007. Selection of a support matrix for the removal of some phenoxyacetic compounds in constructed wetlands systems. *Science of The Total Environment*, 380, 237- 246.

Dragun, J., 1998. Adsorption and mobility of organic chemicals in: Draugun, j. (ed.) *soil chemistry of hazardous materials*. . Amherst Scientific Publishers, Massachusetts, USA.

Felis, E., Kalka, J., Sochacki, A., Kowalska, K., Bajkacz, S., Harnisz, M., Korzeniewska, E., 2020. Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment – occurrence and environmental implications, *European Journal of Pharmacology*, 866, 172813.

Fent, K., Weston, A., & Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76 (2), 122–59.

Ferreira, A., Ferreira, H., 2006. Diclofenac - Toxicologia e Análises Toxicológicas. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Disponível em <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0506/diclofenac/diclofenac.htm>. Visualizado em 31 de Julho de 2019.

Fortunato, A., 2014. Ocorrência de diclofenac, Ibuprofeno e paracetamol em águas residuais em Portugal. *Tese de mestrado*. Universidade de Coimbra.

Gao, P., Ding, Y., Li, H., Xagorarakis, I., 2012. Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: Mass balance and removal processes. *Chemosphere*, 88, 17-24.

Gogoi, A. Mazumder, P., Tyagi, V., Chaminda, G., Na, A., Kumar, M., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, 6, 169-180.

Gonçalves, J. 2017. Análise das tecnologias correntes para o tratamento e secagem de lamas de ETAR. *Tese de mestrado*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.

Gomes, J., Costa, R., Quinta-Ferreira, R., Martins, R., 2017. Application of ozonation for pharmaceuticals and personal care products removal from water. *Science of The Total Environment*, 586, 265–283.

González-García, P., 2018. Activated carbon from lignocellulosics precursors: A review of the synthesis methods, characterization techniques and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 1393–1414.

Gorito, A., Ribeiro, A., Almeida, C., Silva, A., 2017. A review on the application of constructed wetlands for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern listed in recently launched EU legislation. *Environmental Pollution*. 227, 428-443.

Gracia-Lor, E., Sancho, J., Serrano, R., Hernández, F., 2012. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*. 87, 453–462.

Hanna, N., Sun, P., Sun, Q., Li, X., Yang, X., Ji, X., Zoub, H., Ottosond, J., Nilssone, L., Berglunde, B., Dyara, O., Tamhankar, A., Stålsby Lundborg, C., 2018. Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: its potential for resistance development and ecological and human risk. *Environment International*, 114, 131–142.

Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404 (9), 2611–24.

Huerta-Fontela, M., Galceran, M., Ventura, F., 2011. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment, *Water Research*, 45 1432–1442.

IAREN, 2009. Disponível em <http://www.iaren.pt/Revista%20UPortoAlumni.pdf>. Visualizado em 16 de Agosto de 2019.

ICH, 1994 - ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)

Infarmed 2018. Monitorização do consumo de medicamentos no meio hospitalar dezembro de 2018. Disponível em <https://www.infarmed.pt/documents/15786/2682984/dezembro/9a288819-3b0e-4381-a068-5dee8c1df380?version=1.0>, acessado em 4 de Novembro de 2019

Infarmed^b 2018. Monitorização do consumo de medicamentos meio ambulatório, dezembro de 2018. Disponível em <https://www.infarmed.pt/documents/15786/2684155/dezembro/660e32e8-e1d0-431b-9cac-cb487dae738a?version=1.0>, acessado em 4 de Novembro de 2019

Infarmed^c, 2018. Medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), monitorização das vendas fora das farmácias, Dezembro de 2019. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/2771828/janeiro-dezembro/fa6d6c39-490b-48ed-8dca-d3f3b94fa16e?version=1.0>

Infarmed, 2019. Disponível em https://www.infarmed.pt/web/infarmed/comunicados-de-imprensa1/-/journal_content/56/15786/2961331, acessado em 1 de Novembro de 2019

Isidori, M., Nardelli, A., Parrella, A., Pascarella, L., Previtera, L., 2006. A multispecies study to assess the toxic and genotoxic effect of pharmaceuticals: Furosemide and its photoproduct. *Chemosphere*, 63, 785–793.

Kadlec, R., Wallace, S., 2009. *Treatment Wetlands*. U.S.A. : CRC Press, 2009.

Khanzada, N.K., Farid, M.U., Kharraz, J.A., Choi, J., Tang, C.Y., Nghiem, L.D., Jang, A., An, A.K., 2020. Removal of organic micropollutants using advanced membrane-based water and wastewater treatment: A review. *Journal of Membrane Science* 598, 117672.

Kümmerer, K. 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90 (8), 2354–66.

Le, T., Elyafi, A., Mohammed, A., Al-Khattawi, A., 2019. Silica: Impact of drug overloading on release and thermal profiles. *Pharmaceutics* 11 (6), 269

Li, J., Carter, J., Boxall, A. 2020. Evaluation and development of models for estimating the sorption behaviour of pharmaceuticals in soils. *Journal of Hazardous Materials*, 392, 122469.

Li, X., Wu, S., Yang, C., Zeng, G., 2020. Microalgal and Duckweed Based Constructed Wetlands for Swine Wastewater Treatment: A Review. *Bioresource Technology*, 123858.

Li, Y., Zhang, J., Zhu, G., Liu, Y., Wu, B., Ng, W. J., Appan, A., Tan, S. K., 2016. Phytoextraction, phytotransformation and rhizodegradation of ibuprofen associated with *Typha angustifolia* in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Water Research*, 102, 294-304.

Li, Y., Zhu, G., Ng, W., Tan, S., 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of The Total Environment*, 468-469, 908-932.

Llyas, H., Hullebusch, E., 2019. Role of Design and Operational Factors in the Removal of Pharmaceuticals by Constructed Wetlands. *Journal Water*, 11, 2356.

Llyas, H., Hullebusch, E., 2020. Performance comparison of different types of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and their transformation products: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 14342–14364.

Lopes, A., 2014. Adsorção de compostos de enxofre e nitrogénio do diesel comercial por carvão ativado impregnado com paládio. *Tese de doutoramento*, Universidade Federal de Paraná, Curitiba.

Lopes, M. 2016. Remoção em fase líquida do fármaco diclofenac por adsorção em coluna de leito fixo com carvão vegetal ativado. *Tese de mestrado*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Lisboa.

Luo, Y., Guo, W., Hao, H., Duc, L., Ibney, F., Zhang, J., Liang, S., Wang, X., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 473-474 619-641.

Machado, A., 2020. Removal of pharmaceutical active compounds by constructed wetland systems – A sustainable phytoremediation technique?. *Tese de doutoramento*, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Machado, A., Dordio, A., Fragoso, R., Leitão, A., Duarte, E., 2017. Furosemide removal in constructed wetlands: Comparative efficiency of LECA and Cork granulates as support matrix. *Journal of Environmental Management*, 203, 422–428.

Machado, A., Fragoso, R., Dordio, A., Duarte, E., 2020. Furosemide in water matrix: HPLC-UV method development and degradation studies. *Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 15 1.

Mackulak, T., Cernansky, S., Fehér, M., Birosová, L., Gál, M., 2019. Pharmaceuticals, drugs, and resistant microorganisms – environmental impact on population health. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 9, 40-48.

Matamoros, V., Garcia, J., Bayona, J., 2005., Behavior of selected pharmaceuticals in subsurface flow constructed wetlands: a pilot-scale study. *Science of The Total Environment*, 39, 14, 5449–5454.

Matamoros, V., Garcia, J., Bayona, J., 2008. Organic micropollutant removal in a full-scale surface flow constructed wetland fed with secondary effluent. *Water Research*, 42, 653–660.

Mavioso, J., 2010. Tratamento de águas residuais através de leitos de macrófitas, A influência da vegetação. *Tese de mestrado*. Instituto Superior Técnico, Lisboa.

McLean, E., 1982. Soil pH and lime requirement., in: A.L. Page, R.H. Miller, D.R. Keeney (Eds.), *Methods Soil Anal. Part 2 Chem. Microbiol. Prop.*, Madison.

Melo, S., Trovó, A., Bautitz, I., Nogueira, R., 2009. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, Vol. 32, No. 1, 188-197.

Metcalf and Eddy, 1991. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse* (third ed.), McGraw Hill, New York, p. 1334

Miler, J., Miller, J., 2000., *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Prentice Hall, Harlow, UK.

Miranda, S., 2014. Remoção de Fármacos de Águas Contaminadas. Avaliação de vários Substratos. *Tese de mestrado*. Universidade de Évora.

Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products 605 and by-products, from resource to drinking water. *Environment International*, 35, 803–814.

Nunes, B., Carvalho, F., e Guilhermino L. 2004. Acute and chronic effects of clofibrate and clofibric acid on the enzymes acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase and catalase of the mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Chemosphere*, 57, 1581–1589.

Oliveira, J. 2009. Diagnóstico e optimização do tratamento de águas residuais em leitos de macrófitas. *Tese de mestrado*. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

ONU, 2018. Relatório mundial das nações unidas sobre o desenvolvimento dos recursos hídricos 2018.

Pal, A., Gin, K.Y.-H., Lin, A.Y.-C., Reinhard, M., 2010. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of The Total Environment*, 408, 6062-6069.

Palma, P., Fialho, S., Lima, A., Novais, M., Costa, M., Montemurro, N., Pérez, S., Alda, M., 2020. Pharmaceuticals in a Mediterranean Basin: The influence of temporal and hydrological patterns in environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, 709, 136205.

Patel, H., Solanki, S., 2012. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of furosemide and spironolactone in combined tablet dosage form. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (4), 383-386.

Pena-Guzman, C., Ulloa-Sanchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopes-Barrera, E., Alvarez, J., Rodriguez-Pinzon, M., 2019. Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *Journal of Environmental Management* 237, 408-423.

Péres, S., Eichhorn, P., Aga, D., 2005. Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole and trimethoprim at different stages of sewage treatment, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1361-1367.

Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 15–39.

Portaldaagua, 2019. Disponível em <https://www.portaldaagua.pt/noticias/item/62-estratégia-nacional-para-a-utilização-de-águas-residuais-tratadas.html>. visualizado em 16 de Agosto de 2019.

Proença, P., 2011. Resíduos de medicamentos: estudo de caso sobre comportamentos, atitudes e conhecimentos. *Tese de mestrado*. Universidade Aberta.

Quesada, H.B., Baptista, A.T.A., Cusioli, L.s.F., Seibert, D., Oliveira Bezerra, C., Bergamasco, R., 2019. Surface water pollution by pharmaceuticals and an alternative of removal by low-cost adsorbents: A review. *Chemosphere* 222, 766-780.

Renner, R., 2002. The KOW Controversy. *Environmental Science and Technology*, 36, 410A-413A.

Ribeiro, C., Ribeiro, A., Tiritan, M., 2015. Occurrence of persistent organic pollutants in sediments and biota from Portugal versus European incidence: A critical overview. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 51 (3):1 -11.

Ribeiro, C., Ribeiro, A., Tiritan, M., 2016. Priority Substances and Emerging Organic Pollutants in Portuguese Aquatic Environment: A Review. Springer International Publishing.

Rodrigues, A., 2013. Resíduos farmacêuticos no ambiente. *Tese de mestrado*. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

Santos, L., Araújo, A., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175, 45–95.

Soares, M., 2012. Avaliação do desempenho de leitos de macrófitas face à aplicação de cargas orgânicas crescentes. *Tese de mestrado*. Instituto Superior Técnico, Lisboa.

Sotelo, J., Ovejero, G., Rodriguez, A., Álvarez, S., Galán, J., Garcia, J., 2014. Competitive adsorption studies of caffeine and diclofenac aqueous solutions by activated carbon. *Chemical Engineering Journal*, 40, 443-453.

Sousa, I., 2015. Métodos de eliminação de fármacos e seus metabolitos ao nível das Estações de Tratamento de Águas Residuais. *Tese de mestrado*. Universidade Fernando Pessoa.

Sousa, J., Ribeiro, A., Barbosa, M., Ribeiro, C., Tiritan, M., Pereira, M., Silva, A., 2018. Monitoring of the 17 EUWatch List contaminants of emerging concern in the Ave and the Sousa Rivers. *Science of The Total Environment*, 649, 1083–1095.

Sumitra, A. P., Dhawal, C., Dileep, U., Nagasuri, R., 2016. Filters and Filtration: A Review of Mechanisms That Impact Cost, Product Quality and Patient Safety. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research; Cuddalore* Vol. 8, Edic. 5, 271-278.

Sundaravadivel, M., Vigneswaran, S., 2001. Constructed wetlands for wastewater treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31, 351-409.

Susarla, S., Medina, V. F., McCutcheon, S. C. 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*, 18, 647–658.

Szekeres, E., Chiriac, C., Baricz, A., Szőke-Nagy, T., Lung, I., Soran, M., Rudi, K., Dragos, N., Coman, C., 2018. Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas. *Environmental Pollution*, 236, 734–744.

Taheran, M., Brar, S.K., Verma, M., Surampalli, R.Y., Zhang, T.C., Valero, J.R., 2016. Membrane processes for removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) from water and wastewaters. *Science of The Total Environment* 547, 60-77.

Tambosi, J., de Sena, R., Favier, M., Gebhardt, W., José, H., Schröder, H., Moreira, R., 2010. Removal of pharmaceutical compounds in membrane bioreactors (MBR) applying submerged membranes. *Desalination*, 261, 148-156.

Tchobanoglous, G., Burton, F., Stensel, H., Eddy, M., 2003. *Wastewater Engineering: Treatment and reuse*. McGraw-Hill, Professional

Thiebault, T., 2020. Raw and modified clays and clay minerals for the removal of pharmaceutical products from aqueous solutions: State of the art and future perspectives. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50, 1451-1514.

Tiwari, B., Sellamuthu, B., Ouarda, Y., Drogui, P., Tyagi, R., Buelna, G., 2017. Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. *Bioresource Technology*, 224, 1-12.

Tran, H., Reinhard, M., Gin, K., 2018. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions – a review. *Water Research*, 133, 182-207.

Tröger, R., Klöckner, P., Ahrens, L., Wiberg, K., 2018. Micropollutants in drinking water from source to tap - Method development and application of a multiresidue screening method. *Science of The Total Environment* 627, 1404–1432.

Trojanowicz, M., 2012. Flow-injection analysis as a tool for determination of pharmaceutical residues in aqueous environment. *Talanta*, 96, 3-10.

Verlicchi, P., Aukidy, A., Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment - a review. *Science of The Total Environment*, 429, 123-155.

Verlicchi, P., Zambello, E., 2014. How efficient are constructed wetlands in removing pharmaceuticals from untreated and treated urban wastewaters? A review. *Science of The Total Environment*, 470–471, 1, 1281-1306.

Vystavna, Y., Frkova, Z., Marchand, L., Vergeles, Y., Stolberg, F., 2017. Removal efficiency of pharmaceuticals in a full scale constructed wetland in East Ukraine. *Ecological Engineering*. 108, 50-58.

Vymazal, J. 2003. *Types of constructed wetlands. Proceedings of the 1st International Seminar on the use of aquatic macrophytes for wastewater treatment in constructed wetlands*. Lisboa, N.D

Zaied, B., Rashid, M., Nasrullah, M., Zularisam, A., Pant, D., Singh, I., 2020. A comprehensive review on contaminants removal from pharmaceutical wastewater by electrocoagulation process. *Science of The Total Environment*, 726, 138095.

Zhang, D., Gersberg, R., Ng, W., Tan, S., 2014. Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environmental Pollution*, 184, 620-639.

Zhou, L., Zhang, L., Banks, E., Grover, D., Jiang, Q. 2009. Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 655–661.

Ziylan, A., Ince, N.H., 2011. The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by conventional and non-conventional processes. *Journal of Hazardous Materials*, 187, 24-36.

Zwiener, C., Seeger, S., Glauner, T., Frimmel, F. H., 2002. Metabolites from the biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372, 569–575.

Anexo I

6. Anexo I

Como referido no ponto 2.2.1 da metodologia experimental, procedeu-se a uma varriemento do espectro eletromagnéticos na zona de UV, entre os c.d.o. de 190 e 300 nm, de uma solução padrão contendo os quatro fármacos utilizados nos ensaios (diclofenac, furosemida, trimetoprim e sulfametoxazol) com uma concentração de 10 mg L⁻¹, de forma a determinar o valor de comprimento de onda no qual as adsorvâncias apresentavam um valor máximo (figura I.1).

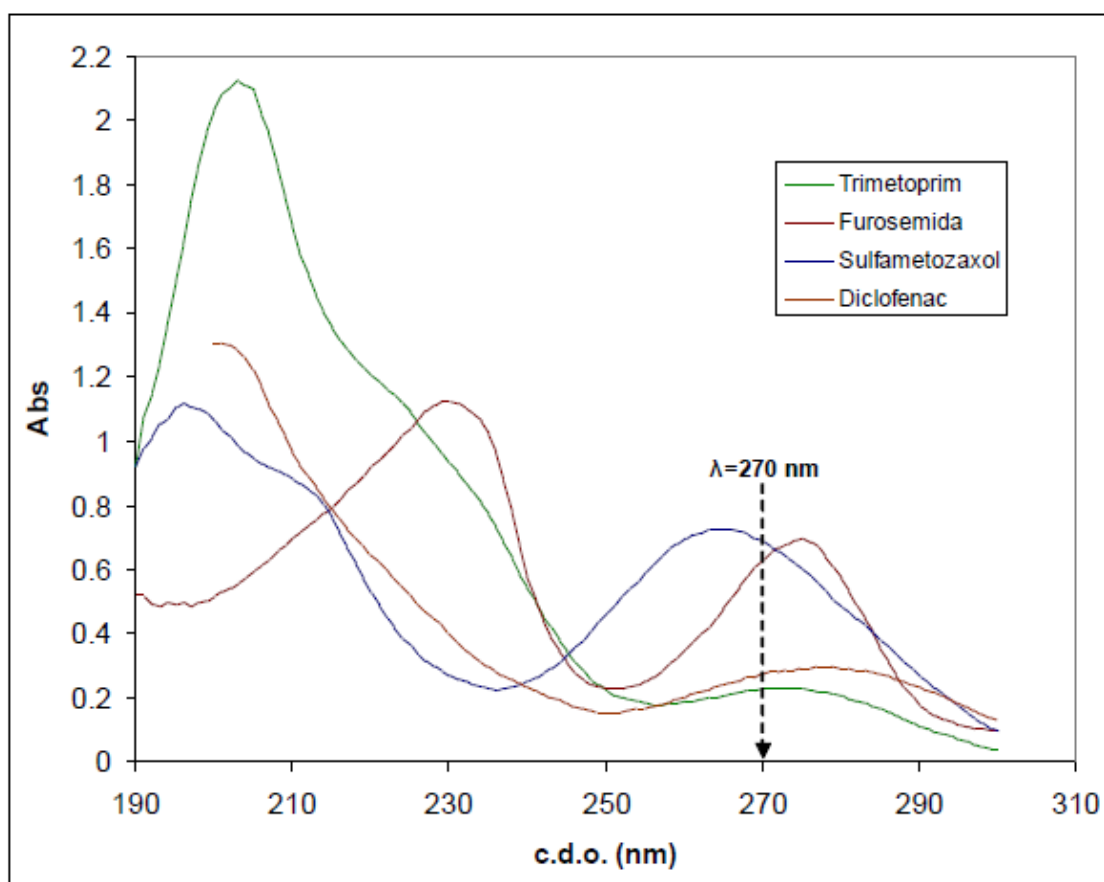


Figura I.1 Espectro de absorção das soluções de diclofenac, furosemida, trimetoprim e sulfametoxazol com identificação do valor de comprimento de onda onde se realizou a quantificação dos fármacos

O comprimento de onda escolhido para traçar o perfil cromatográfico foi de 270 nm porque, apesar de não corresponder ao máximo de absorvância dos compostos estudados na gama UV/Vis, foi a solução de compromisso que permitiu a quantificação simultânea de todos os compostos.