



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

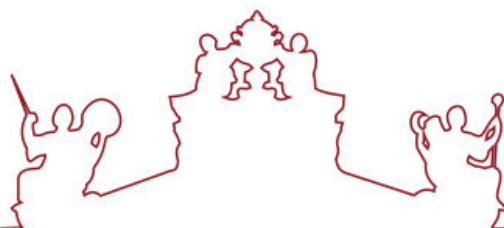
Dissertação

**Ensaaios preliminares para a otimização da remoção de
Carbamazepina e Ibuprofeno em Leitos Construídos de
Macrófitas**

Cátia Sofia Chanino Carvalho

Orientador(es) | Ana Vitória Dordio
Alfredo Jorge Palace Carvalho
Ana Paula Pinto

Évora 2025



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

**Ensaio preliminares para a otimização da remoção de
Carbamazepina e Ibuprofeno em Leitos Construídos de
Macrófitas**

Cátia Sofia Chanino Carvalho

Orientador(es) | Ana Vitória Dordio
Alfredo Jorge Palace Carvalho
Ana Paula Pinto

Évora 2025



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

Presidente | António Manuel Teixeira Martins do Canto (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Rodrigues Costa (Universidade de Évora) (Arguente)
Ana Vitória Dordio (Universidade de Évora) (Orientador)

Resumo

A contaminação de águas por fármacos é uma preocupação ambiental que tem motivado a procura de tecnologias, como os leitos construídos de macrófitas (LCMs), com maior eficiência na remoção destes poluentes a custos acessíveis. Apesar dos resultados promissores, existe margem para otimização destes sistemas. Neste trabalho estudaram-se alguns componentes de LCMs (materiais para matriz de suporte e microrganismos) contribuindo para a otimização de microcosmos de LCMs para a remoção de fármacos como carbamazepina e ibuprofeno de águas contaminadas.

Granulados de cortiça expandida estudados neste trabalho demonstraram capacidade de adsorção dos fármacos estudados. Contudo, a sua adição à matriz vermiculite+LECA anteriormente testada, não mostrou um aumento significativo da sua performance.

Estudou-se também o crescimento do *Bacillus subtilis* num meio contendo fármacos e sua capacidade para os remover. Verificou-se que o crescimento está fortemente associado à capacidade de remover fármacos, sendo a adição de glucose o principal fator de estímulo do crescimento.

Palavras-chave: carbamazepina, ibuprofeno, LCM, granulado de cortiça, *Bacillus subtilis*

Preliminary assays for the optimization of Constructed Wetlands Systems for Carbamazepine and Ibuprofen removal

Abstract

Water contamination with pharmaceuticals is an environmental concern that has driven the search for technologies, such as constructed wetland systems (CWS), with higher efficiency in removing these pollutants at accessible costs. Despite promising results, there is still room for optimization of these systems. This study investigated certain components of CWS (support matrix materials and microorganisms) contributing to the optimization of CWS microcosms for removal of pharmaceuticals such as carbamazepine and ibuprofen from contaminated waters.

Expanded cork granules studied in this work showed some capacity for adsorption of the studied pharmaceuticals. However, their addition to the previously tested vermiculite+LECA matrix did not show a significant increase in performance.

The growth of *Bacillus subtilis* in a medium containing pharmaceuticals and its ability to remove them was also studied. It was found that the capacity to remove pharmaceuticals is strongly associated with bacterial growth, with glucose being the main factor for stimulating growth.

Keywords: carbamazepine, ibuprofen, CWS, cork granules, *Bacillus subtilis*

Índice geral

Resumo	I
Abstract	II
Índice geral	III
Índice de figuras	V
Índice de tabelas	VII
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos	VIII
1. Introdução	1
1.1. Problemática.....	2
1.2. Objetivos.....	3
1.3. Revisão bibliográfica	4
1.3.1. Poluentes emergentes – uma problemática ambiental atual	4
1.3.2. Ocorrência e impacto dos fármacos no meio ambiente	4
1.3.2.1. Problemática dos fármacos nas águas de Portugal – Impacto no ambiente	11
1.3.2.2. Características físico-químicas da carbamazepina e do ibuprofeno	13
1.3.3. Processos de tratamento em ETARs: Desafios e eficiência na remoção de fármacos 15	
1.3.4. Leitos Construídos de Macrófitas: uma solução alternativa e eficiente.....	18
1.3.4.1. A contribuição dos diferentes componentes dos LCMs para a eliminação de fármacos	20
1.3.4.1.1. Papel da matriz de suporte	22
1.3.4.1.2. Papel das plantas.....	23
1.3.4.1.3. Papel da população microbiana	25
2. Metodologia Experimental	27
2.1. Reagentes e Material	28
2.2. Metodologia Analítica	30
2.2.1. Otimização das condições de quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis	30
2.2.1.1. Condições de quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis.....	31
2.2.1.2. Seleção do tipo de filtro e otimização do volume de amostra a filtrar	32
2.2.1.3. Validação do método analítico	33
2.2.2. Otimização da composição da matriz a utilizar no microcosmos de LCM	35
2.2.2.1. Preparação dos materiais	36
2.2.2.2. Seleção da classe granulométrica de granulado de cortiça expandida a utilizar na composição da matriz.....	36
2.2.2.3. Estudo da estratificação dos materiais a utilizar na composição da matriz de suporte.....	38
2.2.2.4. Caracterização físico-química dos materiais da matriz de suporte.....	40
2.2.3. Estudo da capacidade da bactéria na remoção/degradação dos fármacos.....	41

2.2.3.1.	Meio de cultura e condições de crescimento	41
2.2.3.2.	Preparação do inóculo	42
2.2.3.3.	Estudo do crescimento, em descontínuo, da bactéria em suspensão em meio líquido.....	43
2.2.3.4.	Estudo da capacidade de remoção/degradação da carbamazepina e do ibuprofeno pela bactéria em meio líquido	44
2.2.4.	Análise estatística dos resultados	46
3.	Resultados e discussão	47
3.1.	Otimização e validação da metodologia analítica	48
3.1.1.	Condições de quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis	48
3.1.2.	Validação do método analítico	49
3.1.3.	Seleção dos filtros e otimização do volume de solução a filtrar	52
3.2.	Estudo da capacidade de remoção da carbamazepina e do ibuprofeno pela cortiça ...	58
3.2.1.	Caracterização físico-química dos granulados de cortiça expandida	58
3.2.2.	Remoção da carbamazepina e do ibuprofeno pelos granulados de cortiça expandida... ..	60
3.3.	Otimização da composição da matriz a utilizar nos microcosmos de LCMs	64
3.4.	Caracterização da curva de crescimento da bactéria	69
3.5.	Determinação dos parâmetros cinéticos do crescimento da bactéria <i>Bacillus</i>	74
3.6.	Estudo da capacidade de degradação da carbamazepina e do ibuprofeno pela bactéria <i>Bacillus</i>	77
3.6.1.	Avaliação do efeito da exposição aos fármacos no crescimento da cultura de <i>Bacillus</i>	77
3.6.2.	Avaliação da capacidade de degradação/remoção da carbamazepina e do ibuprofeno pela bactéria <i>Bacillus</i>	89
4.	Conclusões e perspectivas futuras	98
	Referências bibliográficas	102
	Anexos	115
A.	Determinação do comprimento de onda de quantificação	116

Índice de figuras

Figura 1.1 - Vias de entrada e destino de fármacos no meio ambiente.....	5
Figura 1.2 - Esquema dos processos de tratamento presentes numa ETAR (desenhado com auxílio do software Wondershare EdrawMax)	17
Figura 1.3 - LCMs e fatores que podem afetar o desempenho do mesmo	19
Figura 1.4 - Relações entre os três componentes de um LCMs	20
Figura 1.5 - Processos/mecanismos de fitorremediação	22
Figura 1.6 - Mapa de distribuição da <i>Typha latifolia</i> em Portugal (Jardim Botânico UTAD <i>Typha Latifolia</i> , 2023)	25
Figura 2.1 - a) Aspeto da vermiculite esfoliada; b) Aspeto da LECA; c) Aspeto do granulado de cortiça	29
Figura 2.2 - a) Cortiça com granulometria 0,5/3; b) Cortiça com granulometria 3/5.....	36
Figura 2.3 - Esquema geral da montagem dos ensaios da cortiça 3/5 (esquerda) e da cortiça 0,5/3 (direita) para a solução com os compostos em estudo	37
Figura 2.4 - Esquema geral da montagem dos ensaios de estratificação para a solução com os compostos em estudo.....	39
Figura 2.5 - Esquema da preparação dos inóculos a utilizar nos ensaios	43
Figura 2.6 - Esquema geral utilizado na montagem de cada um dos ensaios (MC = meio de cultura)....	44
Figura 3.1 - Cromatograma obtido por HPLC-UV-Vis para uma solução padrão com os quatro fármacos	48
Figura 3.2 - Reta de calibração utilizada para a quantificação da carbamazepina em solução aquosa..	49
Figura 3.3 - Reta de calibração utilizada para a quantificação da ibuprofeno em solução aquosa	50
Figura 3.4 - Percentagem de recuperação (%R) da carbamazepina nas concentrações de 2,5 mg/L e 10 mg/L, após filtração utilizando membranas de nylon e PTFE.....	53
Figura 3.5 - Percentagem de recuperação (%R) do ibuprofeno nas concentrações de 2,5 mg/L e 10 mg/L, após filtração utilizando membranas de nylon e PTFE	54
Figura 3.6 - Percentagem de recuperação (%R) da carbamazepina nas concentrações de 2,5 mg/L e 10 mg/L, após filtração utilizando membranas de PTFE.....	56
Figura 3.7 - Percentagem de recuperação (%R) do ibuprofeno nas concentrações de 2,5 mg/L e 10 mg/L, após filtração utilizando membranas de PTFE	56
Figura 3.8 - Cinética de remoção pela cortiça 0,5/3 e pela cortiça 3/5 da carbamazepina e do ibuprofeno para uma concentração de 2,5 mg/L.....	61
Figura 3.9 - Cinética de remoção pela cortiça 0,5/3 e pela cortiça 3/5 da carbamazepina e do ibuprofeno para uma concentração de 5 mg/L.....	61
Figura 3.10 - Concentração inicial de fármaco vs a concentração removida pela cortiça de granulometria 3/5 às 216h.	64
Figura 3.11 - Percentagem de remoção da carbamazepina e do ibuprofeno às 168h. As letras diferentes significam que os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem a comparações entre % R de CBZ para diferentes estratificações. Letras maiúsculas correspondem a comparações entre % R de IBU para diferentes estratificações.....	65
Figura 3.12 - Cinética de remoção da carbamazepina e do ibuprofeno pelas diferentes estratificações da matriz de suporte	67
Figura 3.13 - Curvas de crescimento celular do <i>Bacillus</i> em meio líquido na presença de glucose	70
Figura 3.14 - Curvas de crescimento celular do <i>Bacillus</i> em meio líquido na ausência de glucose.....	71
Figura 3.15 - Aspeto visual do <i>Bacillus</i> em meio líquido na ausência e na presença de glucose.....	73
Figura 3.16 - Curvas de crescimento da <i>Bacillus</i> para as várias condições do ensaio com uma concentração de carbamazepina de 2 mg/L	78
Figura 3.17 - Curvas de crescimento do <i>Bacillus</i> para as várias condições do ensaio com uma concentração de ibuprofeno de 2 mg/L.....	80
Figura 3.18 - Curvas de crescimento do <i>Bacillus</i> para as várias condições do ensaio com uma concentração de Ibuprofeno de 20 mg/L.....	82
Figura 3.19 - Curvas de crescimento do <i>Bacillus</i> para as várias condições do ensaio com a mistura de 4 fármacos (carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno) com uma concentração de 2 mg/L de cada um dos fármacos.....	85

Figura 3.20 - Curvas de crescimento do <i>Bacillus</i> para as várias condições do ensaio com a mistura de 4 fármacos (carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno) com uma concentração de 5 mg/L de cada um dos fármacos.....	86
Figura 3.21 - Percentagens de remoção da carbamazepina para todas as condições testadas para a concentração de 2 mg/L	91
Figura 3.22 - Curvas de crescimento do <i>Bacillus</i> para todas as condições testadas para a concentração de 2 mg/L de carbamazepina	91
Figura 3.23 - Percentagens de remoção da carbamazepina para as diferentes condições com duas concentrações testadas (2 e 5 mg/L).....	93
Figura 3.24 - Percentagens de remoção do ibuprofeno para todas as condições testadas para a concentração de 2 mg/L	94
Figura 3.25 - Curvas de crescimento do <i>Bacillus</i> para todas as condições testadas para a concentração de 2 mg/L de ibuprofeno	95
Figura 3.26 - Percentagens de remoção do Ibuprofeno para as diferentes condições com duas concentrações testadas (2, 20 e 5 mg/L)	97
Figura 0.1 - Espectro de absorção molecular na zona do UV dos quatro fármacos	116

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Compostos farmacêuticos detetados em amostras ambientais e as suas respectivas concentrações	7
Tabela 1.2 - Compostos farmacêuticos detetados em amostras ambientais de Portugal e as suas respectivas concentrações	11
Tabela 1.3 - Principais propriedades físico-químicas da carbamazepina e do ibuprofeno (Adaptado de PubChem).....	15
Tabela 1.4 - Características dos materiais utilizados na matriz de suporte (vermiculite e LECA)(Dordio et al., 2017)	23
Tabela 2.1 - Principais características dos compostos farmacêuticos e outros reagentes e solventes utilizados	28
Tabela 2.2 – Características físico-químicas dos materiais argilosos utilizados como matriz de suporte, bem como a sua mistura.....	29
Tabela 2.3 - Composição do meio de cultura utilizado durante o estudo (adaptado de Marchlewicz et al., 2016)	42
Tabela 3.1 - Retas de calibração, LDI e LQI relativamente à carbamazepina e ibuprofeno.....	50
Tabela 3.2 - Parâmetros de exatidão, repetibilidade e reprodutibilidade	51
Tabela 3.3 - Algumas propriedades físicas ou químicas de caracterização dos granulados de cortiça (n=6). Valores médios $\pm$ desvio padrão.....	58
Tabela 3.4 – Comparação da % remoção da carbamazepina em 5 situações diferentes (mistura LECA + Vermiculite; cortiça 3/5; 3 estratificações).....	68
Tabela 3.5 - Comparação da % Remoção de ibuprofeno em 5 situações diferentes (mistura LECA + Vermiculite; cortiça 3/5; 3 estratificações).....	68
Tabela 3.6 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de <i>Bacillus</i> na presença de glucose	75
Tabela 3.7 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de <i>Bacillus</i> na ausência de glucose	75
Tabela 3.8 – Parâmetros cinéticos obtidos no estudo realizado e na literatura	76
Tabela 3.9 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de <i>Bacillus</i> para as diferentes condições do ensaio com carbamazepina (2 mg/L)	79
Tabela 3.10 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de <i>Bacillus</i> para as diferentes condições do ensaio com Ibuprofeno (2 mg/L).....	83
Tabela 3.11 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de <i>Bacillus</i> para as diferentes condições do ensaio com Ibuprofeno (20 mg/L).....	84
Tabela 3.12 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de <i>Bacillus</i> para as diferentes condições do ensaio com a mistura dos 4 fármacos com uma concentração inicial de 2 mg/L.....	87
Tabela 3.13 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de <i>Bacillus</i> para as diferentes condições do ensaio com a mistura dos 4 fármacos com uma concentração inicial de 5 mg/L.....	88

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

$\mu_{\max}$ – velocidade específica de crescimento máxima

c.d.o. – Comprimento de onda

CBZ – Carbamazepina

DCF– Diclofenaco

DO_{600nm} – Densidade ótica a 600 nm

DPR – Desvio Padrão Relativo

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

g – Tempo de geração

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*)

IBU - Ibuprofeno

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

LCM – Leitos Construídos de Macrófitas

LDI – Limite de Detecção Instrumental

LECA – Agregados de Argila Expandida (do inglês *Light Expanded Clay Aggregates*)

LQI – Limite de Quantificação Instrumental

MC – Meio de cultura

N – Número de gerações

NAP – Naproxeno

PEs – Poluentes Emergentes

pK_a – Constante de ionização

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

1. Introdução

1.1. Problemática

Este estudo aborda um dos principais problemas ambientais da atualidade: a presença de compostos farmacêuticos e dos seus metabolitos no meio ambiente. Apesar dos fármacos serem um recurso importante e benéfico para a saúde humana, a sua libertação no meio ambiente, mesmo que em concentrações baixas (ng/L – µg/L), causa impactos negativos nos meios recetores hídricos e, consequentemente, na qualidade da água potável, podendo originar, a longo prazo, efeitos nocivos nos ecossistemas aquáticos e criando um risco para a saúde humana e animal.

As estações de tratamento de águas residuais (ETARs), que são empregues para a remoção de poluentes convencionais das águas residuais, não são, no entanto, totalmente eficientes na remoção de micropoluentes como os fármacos, uma vez que não foram projetadas com esse objetivo. Assim, tem-se procurado cada vez mais estudar processos alternativos ou complementares de tratamento de águas residuais que permitam melhorar a remoção deste tipo de poluentes, dando-se preferência aos sistemas de baixo custo e que não originem compostos com toxicidade igual ou superior.

Os leitos construídos de macrófitas (LCMs) são um dos sistemas de tratamento que mais se têm mostrado eficientes na remoção de vários fármacos. O tratamento das águas contaminadas é obtido através de vários processos físicos, químicos e biológicos resultantes da ação de plantas, juntamente com microrganismos e componentes da matriz de suporte. A eficiência deste tipo de sistemas pode ser melhorada selecionando cuidadosamente os componentes principais do sistema (plantas, matriz de suporte e população microbiana) de modo a otimizar o papel desempenhado por cada um e, assim, maximizar a remoção alcançada globalmente. De modo a conseguir uma seleção mais criteriosa e bem informada, é muito importante conhecer os processos envolvidos na remoção dos fármacos nos LCMs bem como caracterizar diversas opções para os componentes e a forma como influenciam as remoções dos poluentes.

1.2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi contribuir para a otimização da eficiência de microcosmos de Leitos Construídos de Macrófitas (LCMs) na remoção de dois fármacos, carbamazepina e ibuprofeno, de uma solução aquosa dopada com uma mistura de vários fármacos. Os microcosmos a melhorar são inicialmente compostos por uma matriz de suporte constituída por uma mistura de agregados de argila expandida LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 3 e plantado com a macrófita *Typha* spp. Para tal, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

- Otimização e validação do método analítico para a quantificação dos fármacos estudados em solução aquosa por cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) com detecção por UV-Vis;
- Estudo de um material sustentável, nomeadamente granulados de cortiça expandida, com o objetivo de incorporar na matriz de suporte do microcosmos, constituída por uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite 3 de modo a melhorar a sua capacidade em remover os fármacos estudados. Caracterização cinética dos principais processos envolvidos na remoção da carbamazepina e do ibuprofeno;
- Otimização da composição e estratificação da nova matriz de suporte e avaliação da capacidade de adsorção desta relativamente aos fármacos em estudo;
- Otimização das condições de crescimento da bactéria do género *Bacillus* em meio de cultura líquido;
- Caracterização da curva de crescimento em descontínuo da bactéria e determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento;
- Avaliação do potencial da bactéria (*Bacillus subtilis*) para remover a carbamazepina e o ibuprofeno em meio líquido;
- Avaliação dos possíveis efeitos na curva de crescimento da bactéria e nos parâmetros cinéticos provocados pela sua exposição aos fármacos;
- Avaliação da suscetibilidade da carbamazepina e do ibuprofeno sofrerem outros processos abióticos que possam contribuir para a sua remoção, como a fotodegradação.

1.3. Revisão bibliográfica

1.3.1. Poluentes emergentes – uma problemática ambiental atual

A água é um dos recursos mais importantes para todos os seres vivos na Terra e o crescimento contínuo da população mundial levou a um aumento da necessidade da sua utilização para vários fins, sejam eles, domésticos, agrícolas ou industriais. Esta utilização intensiva da água resulta numa produção notável de águas residuais que, na maioria das vezes, acabam por ser libertadas diretamente no ambiente. Assim, a manutenção deste recurso é uma exigência para um futuro onde o bem-estar dos seres vivos e dos ecossistemas deve ser garantido (Gorito et al., 2017; Rathi et al., 2021).

As substâncias químicas provenientes da atividade humana, como o uso de pesticidas na agricultura, compostos industriais e produtos farmacêuticos, têm contribuído globalmente para a contaminação dos sistemas aquáticos. Muitas dessas substâncias são classificadas como poluentes emergentes (PEs), definidos como contaminantes de origem diversa, que podem incluir produtos farmacêuticos, hormonas, pesticidas, produtos de higiene pessoal, detergentes e desinfetantes, entre outros, e que não são completamente removidos pelos sistemas tradicionais de tratamento de águas. Embora anteriormente não monitorados ou regulados de forma rigorosa, esses poluentes têm sido cada vez mais associados a impactos negativos no meio ambiente, especialmente em ecossistemas aquáticos, solos e na saúde humana (Ansari et al., 2020; Kumar et al., 2020; Quesada et al., 2019; Tang et al., 2019; Vasilachi et al., 2021).

1.3.2. Ocorrência e impacto dos fármacos no meio ambiente

Atualmente, o desenvolvimento e a melhoria da tecnologia permitiram a produção de uma maior diversidade e quantidade de compostos farmacêuticos. Com o aumento da produção destas substâncias bem como o seu consumo, a introdução das mesmas no meio ambiente tem vindo a aumentar de forma exponencial nos últimos anos tornando-se, assim, uma preocupação científica e pública (Adeleye et al., 2022; Ansari et al., 2020; Bilal et al., 2020; Fernandes et al., 2020). Devido à importância deste problema, vários estudos têm sido realizados de modo a compreender a origem e o destino destes poluentes emergentes.

Estes poluentes são encontrados no meio aquático em baixas concentrações ($\mu\text{g/L}$ e ng/L), nomeadamente na água do mar, subterrânea, superficial e água potável (Paíga et al., 2019; Palma et al., 2020; Quesada et al., 2019; Sousa et al., 2019). Todavia, apesar das suas baixas concentrações no ambiente, os fármacos e respetivos metabolitos, devido aos efeitos cumulativos e à exposição contínua, podem causar efeitos adversos, principalmente nos organismos aquáticos. Exemplos disso são as alterações fisiológicas, reversíveis e não reversíveis, efeitos de desregulação endócrina e estimulação da resistência a antibióticos observados (Gogoi et al., 2018; Majewsky et al., 2014; Sabri et al., 2020; Xu et al., 2019).

A combinação de diversos compostos farmacêuticos e os seus metabolitos é introduzida no meio ambiente por meio de várias fontes (Figura 1.1). Entre essas fontes estão as águas residuais provenientes de hospitais e clínicas, os lixiviados de aterros sanitários, os efluentes industriais, além das águas residuais geradas pela aquicultura e pelas atividades agropecuárias (Fernandes et al., 2021; Gorito et al., 2017; Katsikaros & Chrysikopoulos, 2021; Palma et al., 2020; Son et al., 2022).

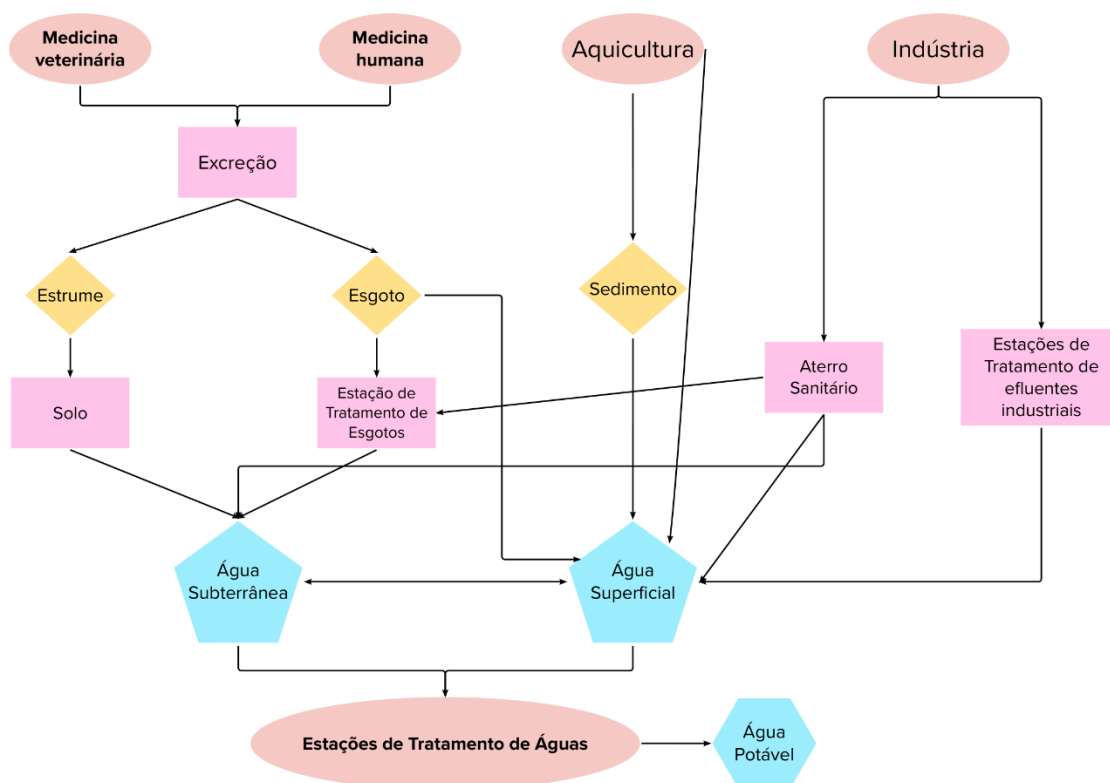


Figura 1.1 - Vias de entrada e destino de fármacos no meio ambiente

Apesar de todas estas vias, as Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) são as principais fontes de contaminação. Embora muitas substâncias sejam eliminadas eficientemente nestas unidades de tratamento, a remoção de compostos farmacêuticos é insuficiente e muitas vezes é nula. Este problema deve-se ao facto do tratamento convencional adotado não ser totalmente eficiente na remoção destes micropoluentes, induzindo estas substâncias e os seus metabolitos, advindos das ETARs, a estarem presentes nas águas residuais tratadas (Adeleye et al., 2022; Felis et al., 2020; Gorito et al., 2017; Ilyas & van Hullebusch, 2020; Kosek et al., 2020; Son et al., 2022). Para além dos problemas das descargas dos efluentes das ETARs, uma grande parte dos compostos farmacêuticos podem acabar por contaminar as lamas das ETARs que, consequentemente, ao serem aplicadas nos solos, acabam por contaminar as culturas e as águas subterrâneas e superficiais (Adeleye et al., 2022; Nannou et al., 2019; Sousa et al., 2019).

O destino destes compostos no meio ambiente é dependente de vários fatores, entre os quais, as propriedades do composto (i.e., estrutura química, coeficiente de partição água-octanol, constante de acidez, entre outras) e pelas condições do meio envolvente. Assim, dependendo das propriedades dos compostos, estes podem ficar sujeitos a processos de sorção, volatilização, dispersão, hidrólise, oxidação, fotodegradação e biodegradação. É conhecido que todos os compartimentos ambientais estão interligados e, por isso, os micropoluentes são capazes de se propagar pelo meio ambiente (solo, ar e águas superficiais e subterrâneas), bem como acumular-se em plantas e microrganismos (Gorito et al., 2017; Quesada et al., 2019).

A contaminação do meio aquático através de produtos farmacêuticos é dependente de vários fatores, tais como, os processos de tratamento a operar nas ETARs, a quantidade de efluente, a estação do ano, a temperatura da água, a intensidade da radiação solar, o tipo de leito e sedimento do rio. Em diferentes águas, sejam elas superficiais, marinhas ou subterrâneas, as concentrações de fármacos variam, sendo menores nos rios que nos efluentes das ETARs e isso deve-se à diluição das águas superficiais onde ocorre biodegradação e fotodegradação dos compostos (Couto et al., 2019; Fernandes et al., 2021; Mackul'ak et al., 2019).

Na Tabela 1.1 estão apresentados alguns compostos farmacêuticos detetados em amostras ambientais de águas superficiais, subterrâneas, potável e efluentes e afluentes de ETARs.

Tabela 1.1 - Compostos farmacêuticos detetados em amostras ambientais e as suas respetivas concentrações

Compostos farmacêuticos	Águas superficiais (ng/L)	Águas subterrâneas (ng/L)	Água potável (ng/L)	Afluentes de ETARs (ng/L)	Efluentes de ETARs (ng/L)	Referências
Analgésicos/anti-inflamatórios						
Paracetamol	3 - 25200	-	28000 - 200000	80 - 66000	17,1 - 29200	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	-	-	-	2300 - 14900	-	(Mendoza et al., 2015)
	-	-	-	330 - 165000	-	(Camacho-Muñoz et al., 2014)
	-	-	-	500 - 1200	12 - 58	(Verlicchi et al., 2012)
	-	-	-	ND - 65402,8	ND - 1060,3	(Kosma et al., 2014)
	-	-	-	171,875 - 512,813	692 - 2195	(Petrie et al., 2017)
	354 - 508	-	-	2330 - 14900	ND	(Rivera-Jaimes et al., 2018)
	-	-	-	739,9 - 8983,9	2,9 - 58,4	(Zhang et al., 2018)
Ibuprofeno	2 - 37000	4,27 - 510	90 - 625000	0,23 - 2140	0,02 - 2100	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	-	-	-	1150 - 56300	21 - 21700	(Afonso-Olivares et al., 2017)
	-	-	-	920 - 1200	10 - 120	(Verlicchi et al., 2012)
	-	-	-	ND - 8890,1	ND - 301,2	(Kosma et al., 2014)
	-	-	-	4016 - 20215	1746 - 3718	(Petrie et al., 2017)
	-	-	-	76 - 14231	863 - 4617	(Kay et al., 2017)
	184 - 248	-	-	370 - 2835	ND	(Rivera-Jaimes et al., 2018)
Naproxeno	0,1 - 900	3,19 - 2000	90 - 3000	2,85 - 12800	0,2 - 4800	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	-	-	-	144 - 5140	50 - 872	(Afonso-Olivares et al., 2017)
	-	-	-	780 - 910	100 - 210	(Verlicchi et al., 2012)
	-	-	-	ND - 5899,9	ND - 483,5	(Kosma et al., 2014)
	-	-	-	6985 - 20398	3291 - 6412	(Petrie et al., 2017)
	-	-	-	60 - 170	ND	(Nguyen et al., 2018)
Diclofenaco	3,6	-	-	-	-	(Golovko et al., 2020)
	20 - 9600	1 - 130	1700 - 150000	236 - 400	5 - 1780	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	258 - 352	-	-	569 - 2470	466 - 2180	(Rivera-Jaimes et al., 2018)
	-	-	-	45 - 1605	ND - 2240	(Afonso-Olivares et al., 2017)

ND – Não Detetado

(Continuação da tabela 1.1)

Compostos farmacêuticos	Águas superficiais (ng/L)	Águas subterrâneas (ng/L)	Água potável (ng/L)	Afluentes de ETARs (ng/L)	Efluentes de ETARs (ng/L)	Referências
Diclofenaco	-	-	-	239,9 - 1881	239,4 – 521,2	(Petrie et al., 2017)
	-	-	-	360 - 480	220 - 330	(Verlicchi et al., 2012)
	-	-	-	ND - 5164	ND – 382,5	(Kosma et al., 2014)
	-	-	-	175 - 1805	401 - 2830	(Kay et al., 2017)
Antibióticos						
Ciprofloxacina	0,41 - 740	-	-	315 - 2290	13,2 - 810	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	14,9 – 21,3 ND - 115	ND – 323,7	0,82 - 6453	-	-	(Felis et al., 2020)
	25	-	-	220	630	(Verlicchi et al., 2014)
	-	-	-	1100 - 3700	290 - 1100	(Verlicchi et al., 2012)
Azitromicina	-	-	-	41,6 - 6320	65,8 - 3990	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	240	ND	-	-	-	(Felis et al., 2020)
	7	-	-	120	130	(Verlicchi et al., 2014)
	-	-	-	10 – 330	70 – 180	(Verlicchi et al., 2012)
	-	-	-	52 – 283,5	84,5 – 147,5	(Petrie et al., 2017)
Sulfametoxazol	0,14 - 106	-	-	279 - 2050	1,5 - 12500	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	0,3 – 360 612 - 4330	ND - 470	0,3 – 18,6	-	-	(Felis et al., 2020)
	-	-	-	19 - 1150	ND - 1520	(Afonso-Olivares et al., 2017)
	-	-	-	280 - 740	170 - 240	(Verlicchi et al., 2012)
	-	-	-	ND – 2170,4	ND – 72,9	(Kosma et al., 2014)
	-	-	-	64,5 - 1154	23 – 188,8	(Petrie et al., 2017)
	108 - 502	-	-	775 - 2010	440 - 1215	(Rivera-Jaimes et al., 2018)
	-	-	-	214 - 982	25 - 366	(Zhang et al., 2018)

ND – Não Detetado

(Continuação da tabela 1.1)

Compostos farmacêuticos	Águas superficiais (ng/L)	Águas subterrâneas (ng/L)	Água potável (ng/L)	Afluentes de ETARs (ng/L)	Efluentes de ETARs (ng/L)	Referências
Trimetoprim	0,56 - 3580	11	470 - 2330	75 - 1470	0,9 - 11300	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	7 - 19 23 - 1808	ND - 730,19	ND	-	-	(Felis et al., 2020)
	2	-	-	59	40	(Verlicchi et al., 2014)
	-	-	-	60 - 452	ND - 31	(Afonso-Olivares et al., 2017)
	-	-	-	3 - 72	36 - 51	(Verlicchi et al., 2012)
	-	-	-	931,5 - 2124	554 - 1104	(Petrie et al., 2017)
	34 - 74	-	-	125 - 790	135 - 395	(Rivera-Jaimes et al., 2018)
	-	-	-	11,2 - 423,2	4,3 - 427,8	(Zhang et al., 2018)
	2	-	-	59	40	(Verlicchi et al., 2014)
Psicotrópicos						
Venlafaxina		-		30 - 56	14 - 35	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	-	-	-	119,2 - 642,9	170,5 - 251,4	(Petrie et al., 2017)
	-	-	-	100	511 - 736	(Roberts et al., 2016)
Citalopram	1,1	-	-	-	-	(Golovko et al., 2020)
	-	-	-	239 - 509,5	189 - 270,5	(Petrie et al., 2017)
	20	-	-	-	-	(Golovko et al., 2020)
Carbamazepina	0,5 - 36920	-	680 - 31450	37,4 - 167	29,5 - 196	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	7	-	-	570	370	(Verlicchi et al., 2014)
	-	-	-	281 - 3030	11 - 1770	(Afonso-Olivares et al., 2017)
	-	-	-	300 - 1170	280 - 440	(Verlicchi et al., 2012)
	-	-	-	168,6 - 367	134,7 - 175,8	(Petrie et al., 2017)
	8 - 36	-	-	85 - 380	165 - 476	(Rivera-Jaimes et al., 2018)
	-	-	-	62,7 - 2499	43,4 - 672,5	(Zhang et al., 2018)
	-	-	-	589 - 685	685 - 702	(Roberts et al., 2016)
	0,05	-	-	-	-	(Golovko et al., 2020)
Diazepam	-	-	7000 - 50000	1,65 - 3,13	0,642 - 4,75	(Peña-Guzmán et al., 2019)

ND – Não Detetado

(Continuação da tabela 1.1)

Compostos farmacêuticos	Águas superficiais (ng/L)	Águas subterrâneas (ng/L)	Água potável (ng/L)	Afluentes de ETARs (ng/L)	Efluentes de ETARs (ng/L)	Referências
Reguladores lipídicos						
Gemfibrozil	9 – 17000	10	-	10,5 - 605	2,31 – 20,4	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	-	-	-	126 - 45200	8 - 20100	(Afonso-Olivares et al., 2017)
	-	-	-	ND – 733,2	ND – 230,9	(Kosma et al., 2014)
	14 - 24	-	-	20 - 225	20 - 380	(Rivera-Jaimes et al., 2018)
	-	-	-	4,7 – 220,3	0,3 – 6,9	(Zhang et al., 2018)
Bloqueadores β						
Atenolol	1,4	--	-	-	-	(Golovko et al., 2020)
	15,8 - 5149	-	42000 - 300000	38,2 - 277	3,69 - 140	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	4 - 10	-	-	-	-	(Rivera-Jaimes et al., 2018)
Metoprolol	9,5	-	-	-	-	(Golovko et al., 2020)
	-	20 - 60	-	25,9 - 228	7,76 - 175	(Peña-Guzmán et al., 2019)
Propanolol	0,46	-	-	-	-	(Golovko et al., 2020)
	3,1 – 43,9	-	7000 - 50000	3,86 – 15,3	39,6 – 45,5	(Peña-Guzmán et al., 2019)
	-	-	-	14 - 45	13 - 26	(Verlicchi et al., 2012)
	-	-	-	83,1 – 269,7	60,9 – 102,7	(Petrie et al., 2017)
	-	-	-	ND - 29	1 - 1464	(Kay et al., 2017)
	-	-	-	3,4 – 60,9	1,9 – 17,2	(Zhang et al., 2018)
	-	-	-	18,1 - 151	36,8 – 75,8	(Roberts et al., 2016)
Diuréticos						
Furosemida	2,6	-	-	-	-	(Golovko et al., 2020)
	-	-	-	173 - 514	24,96 - 165	(Peña-Guzmán et al., 2019)

ND – Não Detetado

1.3.2.1. Problemática dos fármacos nas águas de Portugal – Impacto no ambiente

De forma a avaliar a problemática dos fármacos em águas portuguesas, foram realizados diversos estudos em Portugal de maneira a monitorizar os fármacos em amostras ambientais (Coelho et al., 2019; Fernandes et al., 2020; Paíga et al., 2019; Palma et al., 2020). Em específico, na região do Alentejo, onde se localiza o maior lago artificial de Portugal (Amieira), foi realizado um estudo em que detetaram uma diversidade de fármacos em amostras ambientais (Palma et al., 2020). Estudos em diversos rios de Portugal também estão publicados (Fernandes et al., 2020; Paíga et al., 2016; Pereira et al., 2017).

Na Tabela 1.2 estão apresentados os valores de concentrações de alguns desses fármacos bem como a sua frequência de deteção.

Tabela 1.2. - Compostos farmacêuticos detetados em amostras ambientais de Portugal e as suas respetivas concentrações

Compostos farmacêuticos	Águas superficiais (ng/L)	Águas subterrâneas (ng/L)	Afluentes de ETARs (ng/L)	Efluentes de ETARs (ng/L)	Referências
Analgésicos/anti-inflamatórios					
Paracetamol	-	-	683	ND	(Paíga et al., 2019)
	173,91 – 699,60	-	-	-	(Palma et al., 2020)
	ND – 527	-	-	-	(Paíga et al., 2016)
	38,18	-	-	-	(Pereira et al., 2017)
Ibuprofeno	-	-	421	217	(Paíga et al., 2019)
	53,7	-	-	-	(Paíga et al., 2016)
	72,14 – 255,80	-	-	-	(Palma et al., 2020)
Naproxeno	-	-	28,6	ND	(Paíga et al., 2019)
	50,61 – 90,05	-	-	-	(Palma et al., 2020)
	ND – 260	-	-	-	(Paíga et al., 2016)
Diclofenaco	-	-	449	1934	(Paíga et al., 2019)
	23,72 – 72,45	-	-	-	(Palma et al., 2020)
	ND – 38	-	-	-	(Paíga et al., 2016)
	33,56	-	-	-	(Pereira et al., 2017)
	ND – 346	-	-	-	(Sousa et al., 2020)
Antibióticos					
Ciprofloxacina	-	-	448	159	(Paíga et al., 2019)
	339	-	-	-	(Fernandes et al., 2020)
	88,7	-	-	-	(Paíga et al., 2016)

ND – Não Detetado

(Continuação da tabela 1.2.)

Compostos farmacêuticos	Águas superficiais (ng/L)	Águas subterrâneas (ng/L)	Afluentes de ETARs (ng/L)	Efluentes de ETARs (ng/L)	Referências
Azitromicina	-	-	402	283	(Paíga et al., 2019)
	ND – 86	-	-	-	(Sousa et al., 2020)
	33,91	-	-	-	(Pereira et al., 2017)
	2,819 221	-	-	-	(Fernandes et al., 2020)
Sulfametoxazol	-	-	600	ND	(Paíga et al., 2019)
	12,93 – 19,29	-	-	-	(Palma et al., 2020)
	43	-	-	-	(Paíga et al., 2016)
Trimetoprim	-	-	ND	24,2	(Paíga et al., 2019)
	5,33 – 9	-	-	-	(Palma et al., 2020)
	ND – 20,4	-	-	-	(Sousa et al., 2020)
	110	-	-	-	(Fernandes et al., 2020)
Psicotrópicos					
Venlafaxina	-	-	275	484	(Paíga et al., 2019)
	ND – 159	-	-	-	(Paíga et al., 2016)
	ND – 16,7	-	-	-	(Sousa et al., 2020)
	641 235	-	-	-	(Fernandes et al., 2020)
Citalopram	-	-	149	148	(Paíga et al., 2019)
	ND – 28,9	-	-	-	(Paíga et al., 2016)
	39,21	-	-	-	(Pereira et al., 2017)
	67,9	-	-	-	(Fernandes et al., 2020)
Carbamazepina	ND – 28,9	-	-	-	(Paíga et al., 2016)
	39,21	-	-	-	(Pereira et al., 2017)
	67,9	-	-	-	(Fernandes et al., 2020)
	10,90	-	-	-	(Pereira et al., 2017)
	ND – 257	-	-	-	(Sousa et al., 2020)
	354 206	-	-	-	(Fernandes et al., 2020)
Diazepam	1,13	-	-	-	(Palma et al., 2020)
Reguladores lipídicos					
Gemfibrozil	-	-	57	13,2	(Paíga et al., 2019)
	4,59	-	-	-	(Palma et al., 2020)
	7,78	-	-	-	(Pereira et al., 2017)
Bloqueadores β					
Atenolol	16,55	-	-	-	(Palma et al., 2020)
Metoprolol	12,13 – 22,46	-	-	-	(Palma et al., 2020)
	ND – 161	-	-	-	(Sousa et al., 2020)
Propanolol	-	-	320	ND	(Paíga et al., 2019)
	ND – 285	-	-	-	(Sousa et al., 2020)
Diuréticos					
Furosemida	5,49 – 9,90	-	-	-	(Palma et al., 2020)

ND – Não Detetado

Como ilustrado na Tabela 1.2, foram detetados diversos fármacos de diferentes classes em amostras de água em Portugal. De acordo com os estudos de Paíga et al., 2016, 2019, que pretendiam avaliar a presença de 33 e 83 fármacos, respetivamente, em ETARs de Leiria, bem como em amostras do rio Lis, a deteção média de produtos farmacêuticos foi de 75%, onde a maioria dos compostos pertenciam às classes dos analgésicos/anti-inflamatórios (ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno), antibióticos (ciprofloxacina e sulfametoxazol) e psicotrópicos (carbamazepina e venlafaxina).

Também no estudo de Palma et al. (2020), em que foi estudado a presença de 27 fármacos nas ribeiras da bacia do Guadiana, todos eles foram detetados pelo menos uma vez, sendo a carbamazepina, o ibuprofeno, o diclofenaco e a hidroclorotiazida os fármacos detetados em maior quantidade.

Através destes estudos é possível perceber que a existência de compostos farmacêuticos na água é um problema não só mundial, mas também nacional e regional.

1.3.2.2. Características físico-químicas da carbamazepina e do ibuprofeno

Como demonstrado na secção 1.3.2.1 a presença de fármacos nas águas de Portugal é, atualmente, muito evidente. Existem, em específico, alguns fármacos detetados em grandes concentrações. Assim, para a seleção dos fármacos a estudar foram utilizados critérios específicos:

- Frequência de deteção em amostras ambientais;
- Comportamento nas ETARs convencionais;
- Consumo anual em Portugal e noutros países;
- Biodegradabilidade;
- Classes farmacoterapêuticas e propriedades físico-químicas.

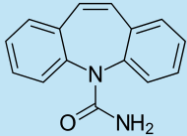
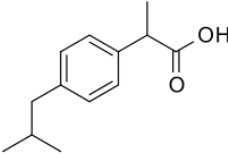
Tendo em vista estes critérios foram seleccionados dois fármacos para o presente estudo, a carbamazepina e o ibuprofeno. Ambos os fármacos são consumidos em Portugal e foram detetados em várias amostras ambientais (Tabela 1.2).

A carbamazepina é um composto tricíclico com propriedades anticonvulsivantes e analgésicas. É muito utilizada, no tratamento da epilepsia e na prevenção da doença maníaco-depressiva (Almeida et al., 2021; Infarmed, 2009; Nkoom et al., 2020; Schapira et al., 2020). Este composto é um pó cristalino branco que, com as suas propriedades físico-químicas e resistência à decomposição, pode acumular-se no ambiente. Para além disso, é absorvido, transportado e metabolizado pelas plantas, particularmente nas folhas (Almeida et al., 2021; Dordio, Belo, et al., 2011; Dordio et al., 2018). Em termos de toxicidade nos seres humanos, a carbamazepina pode provocar efeitos dermatológicos, hematológicos e neurológicos adversos (Schapira et al., 2020). Relativamente aos organismos aquáticos, apresenta uma baixa toxicidade aguda. No entanto, por ser um poluente pseudo-persistente (i.e. um poluente que, devido à sua contínua introdução no ambiente e baixa biodegradabilidade, mantém um nível de concentração estável e duradouro), pode causar uma exposição prolongada que a longo prazo pode provocar efeitos crónicos significativos (Dordio, Silva, et al., 2017; Oropesa et al., 2016; Zhou et al., 2019). Além disso, tal como outros fármacos, pode ter efeitos cumulativos (ou até sinérgicos) com outras substâncias com modos de ação compatíveis, o que pode agravar significativamente a sua ecotoxicidade (Informed, 2009; Schapira et al., 2020).

O ibuprofeno é um composto farmacêutico anti-inflamatório não esteroide muito utilizado no tratamento de doenças reumáticas, febre, dores e inflamações. Este é um dos fármacos mais consumidos mundialmente e, devido à ineficiência das ETARs no tratamento das águas residuais e às propriedades físico-químicas que apresenta, a sua presença no ambiente, à semelhança da carbamazepina, pode apresentar-se é muito elevada (Aguilar-Romero et al., 2021; al Falahi et al., 2021; Dordio, Ferro, et al., 2011; Muñiz-González, 2021; Zhang et al., 2016). A presença do ibuprofeno, tal como outros micropoluentes, afeta negativamente os seres vivos, principalmente os organismos aquáticos. Este, em particular, exibe uma toxicidade aguda para os mesmos, podendo ameaçar o seu desenvolvimento e até as suas vidas (Aguilar-Romero et al., 2021; al Falahi et al., 2021; Muñiz-González, 2021; Xiong et al., 2021).

Na Tabela 1.3 estão apresentadas as propriedades físico-químicas de cada um dos fármacos estudados.

Tabela 1.3 - Principais propriedades físico-químicas da carbamazepina e do ibuprofeno (Adaptado de PubChem)

Nome	Nome IUPAC	Estrutura e forma molecular	Massa Molecular (g/mol)	pK _a	Solubilidade (mg/L)	Log K _{ow}
Carbamazepina	Benzo[b][1] benzazepina-11-carboxamida		236,27	13,9	18	2,45
Ibuprofeno	ácido 2-[4-(2-metilpropil) fenil]propanóico		206,28	4,45	21	3,97

Para todos os fármacos, as suas concentrações no ambiente dependem do nível de consumo e hábitos de utilização, dos países e das regiões e a carbamazepina e o ibuprofeno não são exceção. Como apresentado na Tabela 1.1 é possível observar concentrações significativas de ambos os fármacos em águas subterrâneas, superficiais, potáveis e afluentes e efluentes de ETARs.

Em específico, em Portugal, também foram detetadas concentrações destes fármacos em águas superficiais (4 localizações diferentes na bacia do Guadiana) com uma frequência média de 79,5% para o ibuprofeno e 89% para a carbamazepina (Palma et al., 2020). Valores elevados de concentração podem ser atribuídos ao facto de que, devido à sua natureza química estável, estes fármacos exibem resistência aos processos de tratamento nas ETARs.

1.3.3. Processos de tratamento em ETARs: Desafios e eficiência na remoção de fármacos

As Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) são sistemas projetados com o objetivo de remover poluentes convencionais (ex. compostos orgânicos biodegradáveis), encontrados em grandes quantidades no afluente. A diminuição desta carga de poluentes permite a descarga do efluente num meio hídrico ou até que este seja reutilizado para outros fins. Inicialmente, estes sistemas contribuía para a manutenção

da saúde do meio ambiente, no entanto, como referido anteriormente, as ETARs são uma das principais fontes de contaminação do meio aquático, libertando diversos micropoluentes para o meio ambiente nomeadamente fármacos e respetivos metabolitos (Asami et al., 2021; Kosek et al., 2020; Najafzadeh & Zeinolabedini, 2019; Son et al., 2022).

Por não serem projetadas com o intuito de remover micropoluentes e devido às características e baixas concentrações ($\mu\text{g/L}$ e ng/L) dos mesmos, em particular os compostos farmacêuticos, os processos de tratamento convencionais destas estações não são eficientes na sua remoção, acabando por transferir para as águas superficiais quantidades consideráveis dos mesmos (Felis et al., 2020; Kosek et al., 2020; Mackul'ak et al., 2019; Paíga et al., 2019). Além disso, a eficiência das ETARs na remoção de fármacos pode variar em função de vários fatores, entre os quais, as condições climáticas, a composição das águas residuais, o tipo de processo utilizado e as próprias condições de operação do processo como por exemplo, pH, condições redox, tempo de retenção hidráulico e idade das lamas (Dordio & Carvalho, 2015; Kosek et al., 2020).

Geralmente, o tratamento das águas residuais numa ETAR envolve uma série de processos tanto físicos como químicos e biológicos (Figura 1.2). Estes processos correspondem aos tratamentos: preliminar, primário, secundário e, em alguns casos, avançados ou de afinação (tratamento terciário) (Dordio & Carvalho, 2015; Najafzadeh & Zeinolabedini, 2019). O tratamento preliminar consiste na remoção de sólidos de grande dimensão através de processos físicos como a gradagem. No tratamento primário, através de processos físicos (agregação e sedimentação), ocorre a remoção de partículas sólidas em suspensão que possam danificar o sistema (Chonova et al., 2016). Nessas duas etapas, há uma reduzida eliminação de micropoluentes orgânicos, devido à baixa atividade microbiológica, de modo que a remoção de fármacos ocorre principalmente pela sua adsorção às partículas de sólidos suspensos que são removidas nos sedimentadores (Dordio & Carvalho, 2015).

O tratamento secundário consiste num processo biológico, em que o mais comum é o sistema de lamas ativadas, e nele ocorre a remoção da matéria orgânica de fácil biodegradação e alguns compostos inorgânicos. Este processo origina um efluente de qualidade adequada com custos de operação e manutenção relativamente baixos (Dordio & Carvalho, 2015; Verlicchi et al., 2013). Adicionalmente, esta etapa de tratamento pode também incluir processos físico-químicos, como a sedimentação secundária. Quando o

tratamento primário é seguido deste processo biológico pode ocorrer remoção de certos resíduos farmacêuticos que sejam mais biodegradáveis (Dordio & Carvalho, 2015; Santos et al., 2016).

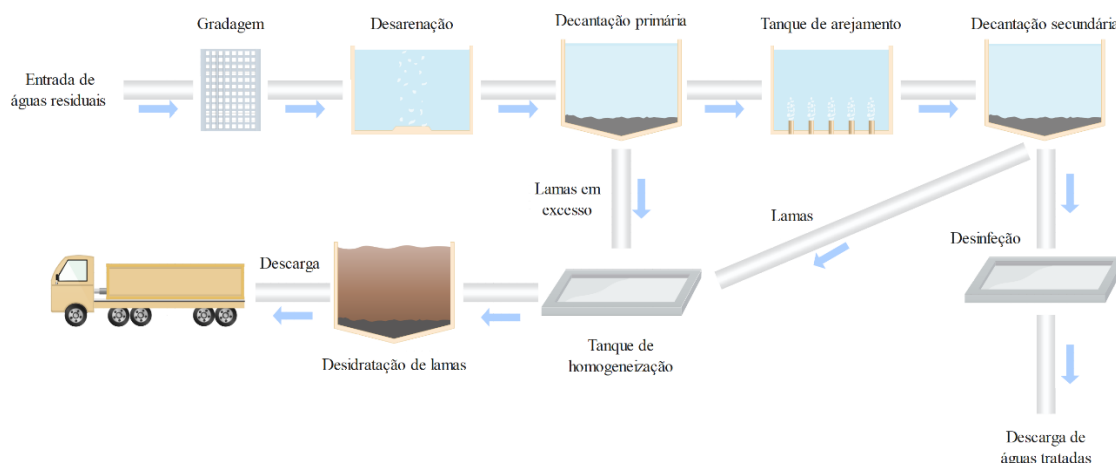


Figura 1.2 - Esquema dos processos de tratamento presentes numa ETAR (desenhado com auxílio do software Wondershare EdrawMax)

Por último, o tratamento terciário, o qual pode não estar presente em todas as ETARs, consiste em processos físico-químicos de desinfecção das águas com o auxílio de cloro, ozono e/ou luz ultravioleta, ocorrendo assim, a consequente eliminação de organismos patogénicos (bactérias e vírus), que possam ainda estar presentes na água residual. Através destes processos pode ocorrer também a oxidação de alguns poluentes que permaneçam por remover ou cuja remoção tenha sido incompleta nas fases anteriores. Segundo um estudo, nesta fase, alguns fármacos apresentam uma taxa de remoção superior a 90% como é o caso do ibuprofeno, naproxeno e paracetamol (Rivera-Jaimes et al., 2018).

Após os vários tratamentos requeridos por cada estação, a água tratada é então descarregada nos rios ou mares, ou ainda reutilizada na limpeza de cidades, na rega de espaços verdes e na agricultura (Enfrin et al., 2019).

Vários estudos realizados nos últimos anos confirmam a baixa eficiência das ETARs na remoção de fármacos e, por isso, é necessário o aparecimento de processos complementares ou alternativos. Atualmente, já existem processos avançados de tratamento e que têm demonstrado eficácia na remoção destas substâncias. Entre eles estão a ozonização, o uso de biorreatores de membrana, adsorção com carvão ativado,

processos de ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa (Enfrin et al., 2019; Mestre et al., 2019; Ziajahromi et al., 2017). Apesar de possuírem elevada eficácia na remoção destes compostos, alguns destes processos não são utilizados em larga escala devido ao seu elevado custo e por originarem poluição secundária que, muitas vezes é tão ou mais tóxica que os fármacos (Felis et al., 2020; Khanzada et al., 2020; Quesada et al., 2019; Tran et al., 2018).

1.3.4. Leitos Construídos de Macrófitas: uma solução alternativa e eficiente

A necessidade da diminuição de custos operacionais e do aumento da eficiência da remoção de micropoluentes nas ETARs convencionais, conduziu a que novos processos alternativos ou complementares sejam testados. Os leitos construídos de macrófitas (LCMs) são um sistema complementar/alternativo desenvolvido nos últimos anos. Vários estudos realizados têm apresentado os LCMs como um processo de elevada capacidade de remoção de vários compostos farmacêuticos (Dordio et al., 2018; Ilyas & van Hullebusch, 2020; Li et al., 2020; Zhang et al., 2016).

Os LCMs, também conhecidos por zonas húmidas artificiais, são sistemas biológicos projetados com o propósito de reproduzir e otimizar, em ambiente controlado, os principais mecanismos de depuração de poluentes. O tratamento nesses sistemas abrange diversos processos, sejam eles físicos, químicos ou biológicos. Os processos biológicos são executados por um dos componentes do sistema: as plantas, bem como as populações microbianas benéficas que se desenvolvem nas raízes dessas plantas aquáticas (Galwa-Widera, 2019; Macário et al., 2018; Wang et al., 2021).

Estes sistemas são constituídos por três componentes: i) vegetação macrófita que, através de sorção, volatilização e metabolização, removem e degradam os poluentes, ii) populações microbianas não prejudiciais que dependem de várias condições, como a altura do leito e as condições atmosféricas e, por último, iii) uma matriz de suporte que ajuda no enraizamento das plantas e no desenvolvimento das populações microbianas tal como na filtração, trocas iónicas (Dordio et al., 2018; Dordio & Carvalho, 2013; Gorito et al., 2017) (Dordio et al., 2018; Dordio & Carvalho, 2013; Gorito et al., 2017).

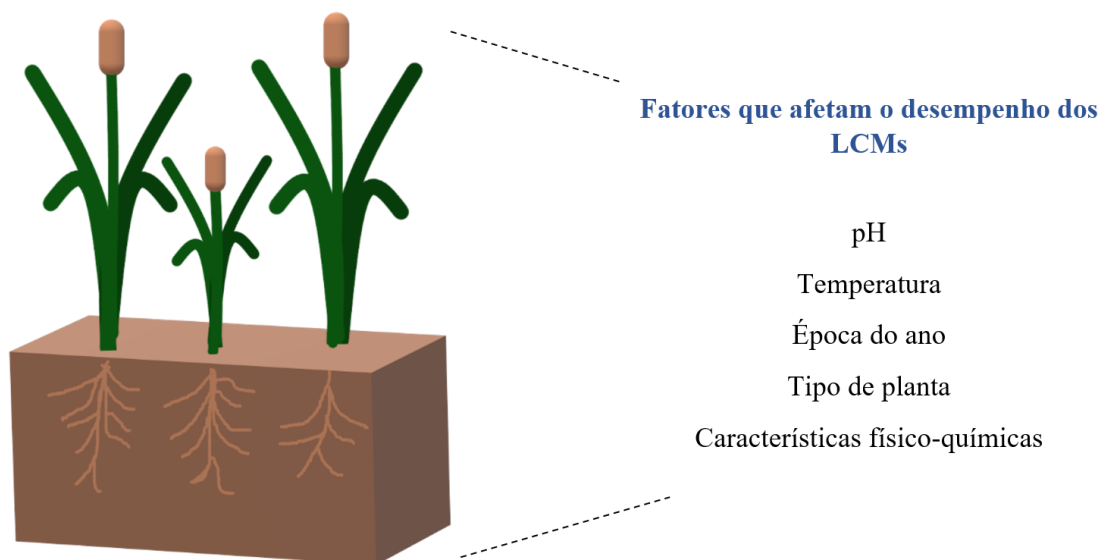


Figura 1.3 - LCMs e fatores que podem afetar o desempenho do mesmo

Os LCMs podem ser classificados de acordo com alguns critérios, entre os quais, o tipo de escoamento do efluente e o tipo de vegetação utilizada. A vegetação a utilizar pode ser flutuante, submersa ou emergente. No último caso, o tipo de escoamento pode ainda ser fluxo superficial ou subsuperficial. Outro critério envolvido é a direção do escoamento que pode ser horizontal, vertical ou, no caso de existirem os dois no mesmo sistema, híbrido (Dordio et al., 2018; Sharma & Malaviya, 2022; Varma et al., 2021).

O êxito e a grande relevância destes sistemas reside no facto de ser uma opção de tratamento de águas residuais ecológica que permite conservar e proteger o meio ambiente. Como vantagens, os LCMs possuem um baixo custo de operação, baixo consumo de energia, estabilidade, recorrem a processos naturais e não carecem de produtos químicos. Apresentam, também, uma grande diversidade de possibilidades de reutilização da biomassa que é produzida, particularmente como fertilizante, ração animal, produção de energia e extração de substâncias das raízes para utilizar como estimulante de crescimento de plantas (Li et al., 2020; Macário et al., 2018). Contudo, esta opção de reutilização da sua biomassa tem de ser bem avaliada considerando a sua possível contaminação com alguns dos poluentes a que o sistema é exposto e os possíveis riscos que daí advenham.

Todavia, como qualquer outro sistema, os LCMs também apresentam algumas desvantagens, como a necessidade de uma grande área de implantação, elevado tempo de

maturação dos sistemas e uma influência por parte das épocas vegetativas e não vegetativas que afetam a eficiência do tratamento (Wang et al., 2021).

1.3.4.1. A contribuição dos diferentes componentes dos LCMs para a eliminação de fármacos

A remoção de fármacos através dos componentes dos LCMs é realizada através de processos abióticos e bióticos, que no global apresentam um aumento do efeito da remoção destes micropoluentes (Figura 1.4).

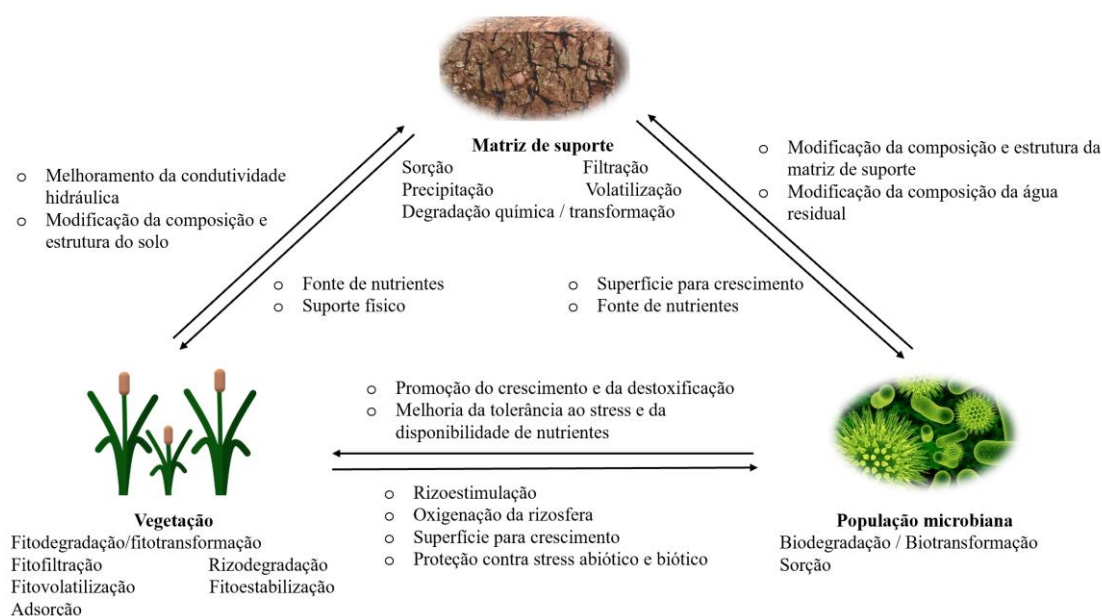


Figura 1.4 - Relações entre os três componentes de um LCMs

Os processos bióticos são realizados pela vegetação e a população microbiana, enquanto os processos abióticos são todos os processos f(Dordio & Carvalho, 2018; Kamilya et al., 2022; Oliveira et al., 2019; Varma et al., 2021)(Dordio & Carvalho, 2018; Kamilya et al., 2022; Oliveira et al., 2019; Varma et al., 2021) (Figura 1.5).

Um dos processos físico-químicos relevante nos LCMs é a sorção. Este processo pode ocorrer de duas formas: adsorção e absorção. No contexto desses sistemas, ambas as formas de sorção ocorrem simultaneamente, tanto na superfície das raízes das plantas quanto na matriz de suporte, levando à retenção ou imobilização dos fármacos a curto e

longo prazo (Dordio & Carvalho, 2018). Por ocorrer na matriz de suporte, os materiais que a constituem e as suas características influenciam, inevitavelmente, este processo. Para além disso, as características das águas residuais (conteúdo de matéria orgânica, pH, composição eletrolítica) e as propriedades físico-químicas dos micropoluentes (pK_a , solubilidade, $\log K_{ow}$) também influenciam o processo de sorção (Dordio & Carvalho, 2018; Kamilya et al., 2022; Oliveira et al., 2019; Varma et al., 2021).

Em conjunto com a sorção existem outros processos abióticos que contribuem para a remoção de micropoluentes. Entre eles estão a hidrólise (decomposição química de compostos orgânicos através da ação da água), a volatilização, a precipitação, a fotodegradação (decomposição dos poluentes através da luz solar) e as reações redox (ação de agentes oxidantes ou redutores na modificação do estado de oxidação do poluente). Quando esses processos ocorrem simultaneamente, eles podem ser mais eficazes na remoção de micropoluentes. No entanto, eles geralmente não removem totalmente os fármacos, devido às características dos poluentes e às condições dos leitos de tratamento (Dordio & Carvalho, 2018; Kamilya et al., 2022; Oliveira et al., 2019; Varma et al., 2021).

Os processos bióticos, como referido anteriormente, são processos biológicos que ocorrem com o auxílio de dois componentes dos LCMs, a vegetação e a população microbiana, desempenhando um papel muito importante na remoção de micropoluentes nestes sistemas (Dordio & Carvalho, 2018). Essencialmente, existem cinco processos bióticos que ocorrem nos LCMs, dos quais fazem parte a biodegradação aeróbica e anaeróbica, a rizodegradação, a fitodegradação/fitotransformação, a fitovolatilização e a fitoestabilização. A rizodegradação é um processo realizado pelas raízes das plantas e pode ter a ajuda de microrganismos, promovendo o aumento da eficiência da biodegradação. A fitodegradação/fitotransformação baseia-se na absorção e decomposição dos compostos no interior dos tecidos vegetais. A fitodegradação é uma abordagem inovadora e ecológica para a gestão de poluentes, aproveitando a capacidade das plantas para transformar substâncias nocivas em compostos menos prejudiciais, através da ação de enzimas produzidas pelas plantas, que quebram e modificam os poluentes.

A fitovolatilização é um processo realizado através da planta, essencialmente na parte aérea e consiste na absorção e transpiração/libertação dos poluentes orgânicos voláteis. Por último, a fitoestabilização compreende um conjunto de processos,

contribuindo para a redução da mobilidade dos poluentes, de modo a atingir a longo prazo, a sua imobilização na rizosfera (Dordio & Carvalho, 2018; Kamilya et al., 2022; Oliveira et al., 2019; Varma et al., 2021).

Estes processos podem ocorrer em simultâneo o que acaba por aumentar a eficácia na remoção dos poluentes, no entanto, as propriedades dos compostos e das suas interações com os dois componentes envolvidos nestes processos, as plantas e a população microbiana, influenciam a eficiência dos mesmos (Dordio & Carvalho, 2018).

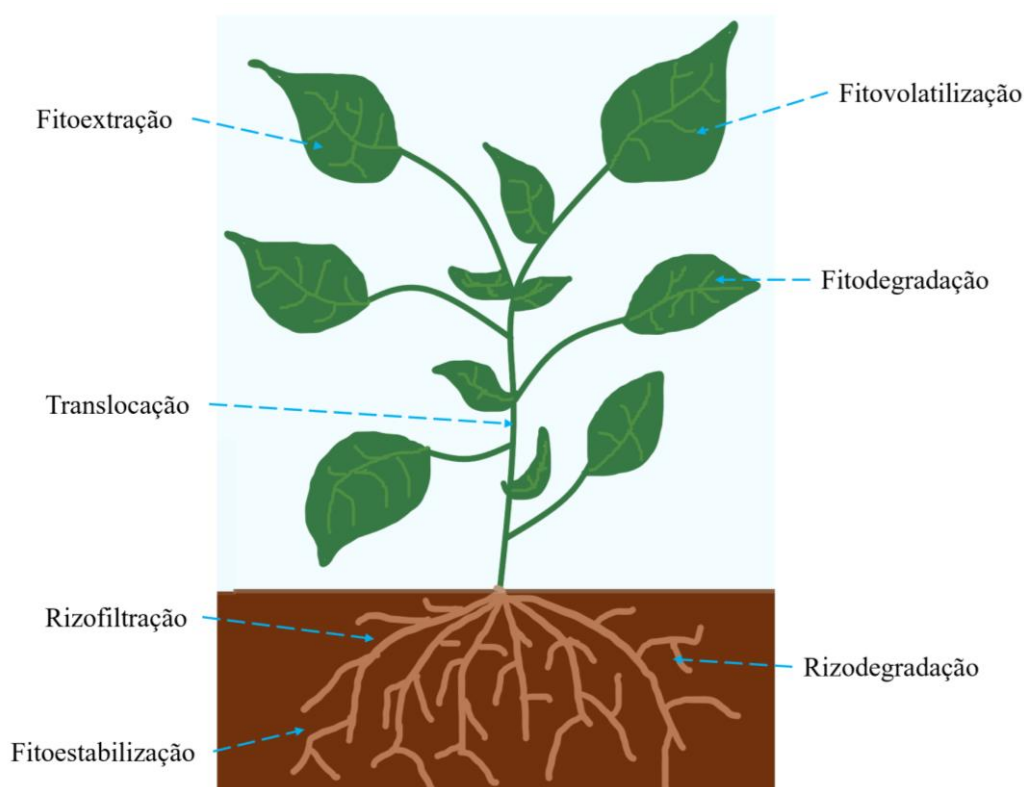


Figura 1.5 - Processos/mecanismos de fitorremediação

1.3.4.1.1. Papel da matriz de suporte

Como um dos componentes dos LCMs, ao interferir no modo como todos os processos envolvidos ocorrem durante o tratamento das águas residuais, a matriz de suporte possui um papel fundamental no sistema. Devido às suas características (capacidade de troca iónica, superfície específica, condutividade hidráulica, poder tampão, textura, estrutura, capacidade de sorção, entre outras), a matriz de suporte é, também, capaz de regular a permeabilidade, a capacidade de drenagem e reter alguns dos

poluentes presentes nas águas assegurando um ambiente benéfico para o crescimento das populações microbianas e das plantas. No entanto, devido às suas inúmeras características, é necessário uma seleção cuidadosa dos materiais a utilizar a fim de aumentar o desempenho do sistema (Dordio et al., 2018; Dordio & Carvalho, 2013; Wang et al., 2021).

Estudos realizados anteriormente permitiram verificar que certos materiais, como os agregados de argila expandida (LECA) e a vermiculite, possuem uma grande capacidade de retenção de alguns fármacos, e as suas características possibilitam um bom desempenho do sistema (Dordio, Miranda, et al., 2017a; Machado et al., 2017; Mlih et al., 2020).

Na Tabela 1.4 estão apresentadas algumas características de dois materiais utilizados como matriz de suporte nos microcosmos de LCMs.

Tabela 1.4 - Características dos materiais utilizados na matriz de suporte (vermiculite e LECA)(Dordio, Miranda, et al., 2017a)

Material	Granulometria (mm)	Porosidade (%)	Densidade aparente (Kg/m³)	pH (H₂O)
Vermiculite	3 (0,8 – 5)	66 ± 1	88 ± 2	7,44 ± 0,06
LECA	2/4 (2 – 6,3)	49 ± 1	394 ± 10	9,04 ± 0,08

1.3.4.1.2. Papel das plantas

As macrófitas são plantas que habitam zonas alagadas e, por estarem habituadas e adaptadas a ambientes saturados de água, são a vegetação utilizada nos LCMs. Estas plantas ajudam na criação de um ambiente favorável ao crescimento das populações microbianas e desempenham um dos papéis mais importantes deste sistema, contribuindo de forma direta, através de processos como a absorção, adsorção, translocação, metabolização, acumulação, volatilização e exsudação de compostos orgânicos (ex. enzimas), e indireta para a remoção e degradação dos vários poluentes existentes nos efluentes (Dordio et al., 2018; Dordio & Carvalho, 2018). Além disso, possuem variadas funções tais como, estabilização do substrato, controlo do fluxo de água, diminuição da

velocidade da água, troca de gases entre a atmosfera e os sedimentos e, oxigenação do substrato.

Existem várias espécies de plantas utilizadas nestes sistemas e estas podem ser emergentes, flutuantes ou submersas. Por serem espécies diferentes apresentam, consequentemente, capacidades de tratamento das águas residuais diferentes e, por essa razão, tal como acontece na matriz de suporte, é necessária uma seleção cuidadosa e adequada da espécie a ser utilizada na remoção dos diferentes poluentes. Para esta escolha é necessário ter em atenção a sua tolerância às condições regionais e à toxicidade dos poluentes, a sua capacidade de remoção de poluentes, a sua resiliência a condições de alagamento bem como o seu bom estabelecimento, crescimento e propagação (Dordio et al., 2018; Li et al., 2021; Wang et al., 2021).

Vários estudos têm demonstrado que as macrófitas parecem apresentar resistência à toxicidade de poluentes orgânicos sendo capazes de reduzir as concentrações de vários fármacos. Como são xenobióticos, as plantas não possuem transportadores específicos para fármacos ou qualquer outro micropoluentes e, por isso, estes entram e movem-se no (Dordio & Carvalho, 2018) esses de difusão (Dordio & Carvalho, 2018). Após a absorção e translocação, os fármacos são sujeitos a transformações metabólicas no interior das plantas e dessa forma, levam à sua degradação completa ou parcial. Quando a degradação é parcial podem ser transformados em compostos menos tóxicos que são capazes de se ligar aos tecidos vegetais. Até ao momento foram identificadas três fases de transformação metabólica: a fase I, funcionalização; a fase II, conjugação; e a fase III, compartimentação. É pressuposto que os produtos finais da última fase (fase III) já não sejam tóxicos, contudo são necessários mais estudos (Dordio & Carvalho, 2018).

Atualmente, existem várias espécies de macrófitas a serem utilizadas em estudos, mas as que se destacam pela sua resiliência, rápido crescimento e extensa distribuição global são a *Typha* spp. e a *Phragmites australis*. A *Typha* spp. em específico é uma das plantas mais procuradas para estes sistemas e tem demonstrado elevada capacidade de remoção de vários fármacos de águas contaminadas incluindo os fármacos em estudo, a carbamazepina e o ibuprofeno (di Luca et al., 2019; Mufarrege et al., 2021; Tang et al., 2019; Wang et al., 2021).

Na Figura 1.6 está apresentado o mapa de distribuição da planta utilizada neste estudo (*Typha* spp.) em Portugal e como se pode observar ela está presente em quase todo o país.

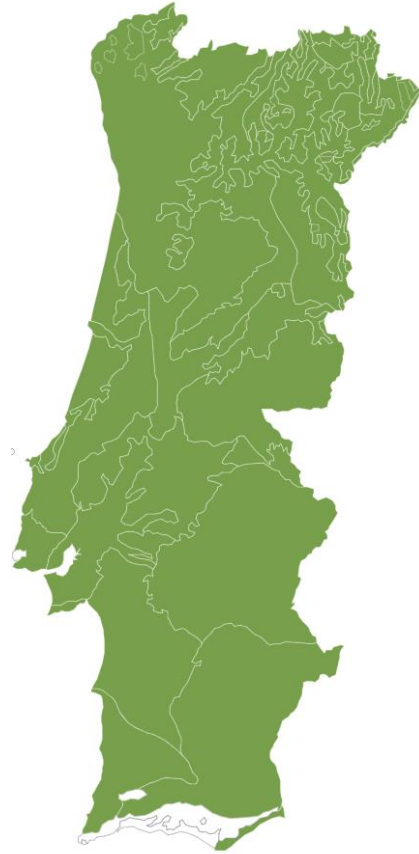


Figura 1.6 - Mapa de distribuição da *Typha latifolia* em Portugal (Jardim Botânico UTAD | *Typha Latifolia*, 2023)

1.3.4.1.3. Papel da população microbiana

Como um dos componentes dos LCMs, a população microbiana desempenha um papel importante nestes sistemas. Através das suas capacidades metabólicas, os microrganismos são fundamentais na biodegradação de compostos farmacêuticos. Através de processos como a oxidação, a biotransformação e a rizodegradação os microrganismos auxiliam as plantas na degradação e remoção de poluentes.

Atualmente existem diversos estudos que demonstram a capacidade de remoção/degradação de diferentes microrganismos. Exemplos disso são os resultados apresentados

por Marchlewicz et al. (2016a, 2017), que demonstraram a capacidade do *Bacillus thuringiensis* B1 para degradar naproxeno e ibuprofeno. Bactérias como *Alcaligenes faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Proteus mirabilis* foram capazes de degradar o diclofenaco e o ácido mefenâmico (Murshid & Dhakshinamoorthy, 2019). Em estudos realizados por Grandclément et al. (2020) foram utilizadas duas bactérias: *Bacillus subtilis* e *Brevibacillus laterosporus* para a remoção de diclofenaco, obtendo-se remoções de 100% ao fim de 17 horas. Al-Gheethi & Ismail (2014) e Chen et al. (2020) demonstraram a capacidade da bactéria *Bacillus subtilis* biodegradar o diclofenaco bem como 4 antibióticos (amoxicilina, ampicilina, cefalexina e cefuroxima).

Tal como acontece com as plantas, a seleção dos microrganismos a utilizar nos LCMs também necessita de ser adequada. Neste estudo, a espécie escolhida foi *Bacillus subtilis*. Esta bactéria, geralmente encontrada no solo ou na água, é aeróbia e resistente a diversas condições ambientais (como temperatura, radiação e alguns pesticidas) (Amuguni & Tzipori, 2012; Liu et al., 2020; Stamenković-Stojanović et al., 2020). Com propriedades probióticas e capacidade de produzir metabolitos importantes, como enzimas, antibióticos, polissacarídeos e proteínas, esta bactéria é apropriada para controlo de agentes patogénicos e muito utilizada para fins agrícolas, medicinais e industriais (Shafi et al., 2017; Shahcheraghi et al., 2015; Stamenković et al., 2018; Stojanović et al., 2019).

2. Metodologia

Experimental

2.1. Reagentes e Material

De modo a realizar os diversos ensaios experimentais foi necessário preparar soluções aquosas de quatro compostos farmacêuticos (carbamazepina (CBZ), naproxeno (NAP), diclofenaco (DCF) e ibuprofeno (IBU)). Na seguinte tabela (Tabela 2.1) são apresentadas as principais características dos fármacos e outras substâncias químicas utilizadas nos estudos realizados.

Tabela 2.1 - Principais características dos compostos farmacêuticos e outros reagentes e solventes utilizados

Substância química	Fórmula química	Riscos e segurança	Massa molar (g/mol)	Grau de pureza (%)	Fornecedor
Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	Perigo para a saúde	236,27	98,8	Acofarma
Diclofenaco	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂	Toxicidade aguda	318,13	99,4	Sigma
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	Tóxico	206,28	≥98	Biosynth
Naproxeno	C ₁₄ H ₁₃ NaO ₃	Perigo para a saúde	252,24	98 - 102	Sigma-aldrich
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	Tóxico; inflamável	41,05	>99,9	Merck
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	Corrosivo	98,00	85,0	JMGS
Água (HPLC)	H ₂ O	-	18,02	-	Fisher chemical
Cloreto de amónio	NH ₄ Cl	Perigo para a saúde	53,49	≥99,5	ACS reagent
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	Perigo para a saúde	136,09	>99,0	Sigma Aldrich
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	-	180,16	>99,0	Himedia
Hidrogenofosfato de sódio di-hidratado	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Perigo para a saúde	177,99	-	Sigma Aldrich
Metanol	CH ₃ OH	Tóxico; inflamável	32,04	99,8	Fisher chemical
Sulfato de magnésio hexa-hidratado	MgSO ₄ ·6H ₂ O	-	228,46	>99	Riedel-de Haën

Para a otimização da montagem de microcosmos de LCMs, destinados à remoção de fármacos de águas contaminadas, estudaram-se, como possíveis materiais a utilizar na composição da matriz de suporte, a mistura de dois materiais argilosos processados industrialmente, nomeadamente a vermiculite esfoliada (Aguiar & Mello, Lda, Portugal) com granulometria 3 e os agregados de argila expandida (LECA) (MaxitGroup, Portugal) com granulometria 2/4, numa mistura de 1:1 (v/v). A seleção destes materiais e da sua

mistura nestas proporções deveu-se ao facto de que, quer em estudos realizados anteriormente no âmbito do estágio de licenciatura, quer em estudos realizados por outros elementos do grupo de investigação, terem sido obtidos bons resultados na remoção de vários fármacos com estes materiais (Carrajola, 2020;. Dordio et al., 2017; Silva, 2023).

Com o objetivo de aumentar a capacidade da matriz de suporte para remover os fármacos, promover o desenvolvimento da vegetação e da população microbiana, melhorar as condições do meio (arejamento, nutrientes, etc.) e o funcionamento do sistema, foi ainda testado granulado de cortiça expandida com duas granulometrias distintas: 0,5-3 mm e 3-5 mm (Amorim Cork Isolation).

Na Tabela 2.2 estão apresentados alguns parâmetros de caracterização física e química da vermiculite esfoliada, da LECA e da mistura dos dois materiais argilosos nas proporções 1:1 (v:v).

Tabela 2.2 – Características físico-químicas dos materiais argilosos utilizados como matriz de suporte, bem como a sua mistura

Material	Vermiculite ^a	LECA ^a	Mistura vermiculite:LECA (1:1, v:v) ^b
Granulometria	3 (0,8 – 5,0)	2/4 (2,0 – 6,3)	0,5 – 3,0
Porosidade (%)	66 ± 1	49 ± 1	54 ± 2
Densidade aparente (Km/m3)	88 ± 2	294 ± 10	291 ± 14
pH (H₂O)	7,44 ± 0,06	9,04 ± 0,08	8,67 ± 0,05

a) (Dordio, Miranda, et al., 2017a); b) (Silva, 2023)

Uma imagem ilustrativa do aspeto de cada um dos materiais estudados está apresentada na figura abaixo (Figura 2.1).

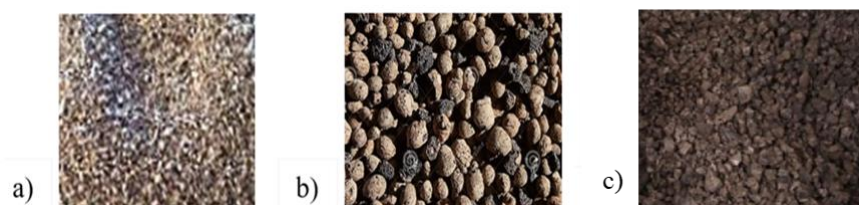


Figura 2.1 - a) Aspeto da vermiculite esfoliada; b) Aspeto da LECA; c) Aspeto do granulado de cortiça

2.2. Metodologia Analítica

Para a quantificação da carbamazepina e do ibuprofeno aplicou-se a técnica analítica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, *HPLC*) com detecção por UV-Vis. O aparelho utilizado foi um VWR HITACHI equipado com uma bomba L-2130 (Elite Lachrom), um *autosampler* L-2200 (Elite Lachrom) e um detetor UV L-2400 (Elite Lachrom).

Esta técnica foi selecionada para a quantificação dos dois fármacos em estudo uma vez que estes estavam presentes em soluções aquosas constituídas por quatro fármacos (carbamazepina, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno) sendo, portanto, necessária uma técnica que permitisse uma separação completa e uma quantificação seletiva de cada fármaco. Apesar de ser uma técnica seletiva, sensível, precisa e exata, tem como inconveniente o facto de ser um método demorado, dispendioso e não ecológico uma vez que utiliza solventes orgânicos para a eluição dos compostos, alguns dos quais são considerados perigosos e com efeitos tóxicos.

Antes da aplicação deste método analítico foi necessário proceder à sua otimização e validação.

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

Na quantificação dos compostos a analisar por HPLC foi utilizado um detetor UV-Vis, sendo o que integrava o equipamento disponível, especificamente do tipo de detetor de comprimento de onda (c.d.o.) único variável. Os detetores UV-Vis são dos mais utilizados em HPLC, pois são relativamente baratos e geralmente são pouco afetados por pequenas alterações de fluxo e temperatura. Os detetores UV-Vis apresentam diversas configurações, sendo o detetor de comprimento de onda único variável uma das mais comuns, por também ser das opções mais económicas. No entanto, este tipo de detetor apenas permite as determinações a um único c.d.o. durante a análise cromatográfica, embora o valor desse c.d.o. possa ser escolhido arbitrariamente e diferir de uma análise para outra.

Com o objetivo de obter os melhores resultados na quantificação dos compostos em estudo, e não sendo possível utilizar simultaneamente os vários máximos de absorvência de cada um dos fármacos presentes em solução, devido às limitações do tipo de detetor, foi necessário selecionar um c.d.o. que se apresentasse como um valor de compromisso que maximizasse as absorvências de todos os fármacos presentes em solução e, assim, permitisse a sua quantificação simultânea. A adicionar aos fármacos estudados neste estudo (carbamazepina e ibuprofeno), o trabalho experimental foi realizado em conjunto com outra colega de mestrado, que estudou outros dois fármacos, o naproxeno e o diclofenaco. Assim, o c.d.o. escolhido teria de permitir a deteção e quantificação de todos estes quatro compostos em simultâneo.

De acordo com a bibliografia consultada, a carbamazepina apresenta máximos de absorvência aos c.d.o. de 210 e 285 nm (Hemmateenejad et al., 2007; Rezaei et al., 2005) e o ibuprofeno apresenta um máximo de absorvência ao c.d.o de 222 nm (Tewari et al., 2017). De qualquer modo, foi feita a confirmação dos valores de c.d.o. correspondentes aos máximos de absorvência de cada um dos quatro fármacos presentes em solução através dos espectros de absorção obtidos num espectrofotómetro de absorção molecular. Assim, efetuaram-se varrimentos na zona do ultravioleta, num intervalo de c.d.o. entre 200 e 350 nm, para cada uma das quatro soluções dos fármacos em estudo (Anexo A). Os espectros foram obtidos utilizando soluções padrão de cada um dos fármacos com concentrações de 10 mg/L. O valor de c.d.o. selecionado para posteriormente ser utilizado para a quantificação de cada um dos compostos nas análises por HPLC/UV-Vis foi de 220 nm, pois a este c.d.o. todos os quatro fármacos apresentam absorvidades molares significativas.

2.2.1.1. Condições de quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis

Para a quantificação dos quatro fármacos presentes na solução a utilizar nos estudos, em especial a carbamazepina e o ibuprofeno, foi utilizado o equipamento de HPLC/UV-Vis acima mencionado, com uma coluna analítica de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, Alemanha) com as dimensões de 250 mm x 4,6 mm e um tamanho de partículas de 5,0 µm. A eluição foi feita isocraticamente, sendo a fase móvel constituída por dois solventes, acetonitrilo e água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fosfórico (H₃PO₄). De forma a obter uma separação eficaz dos quatro fármacos

e reduzir ao máximo o tempo de retenção dos quatro fármacos, testaram-se diferentes proporções destes dois componentes. A composição da fase móvel que apresentou melhores resultados foi de 60% de acetonitrilo e 40% de água acidificada.

Todas as análises foram efetuadas à temperatura ambiente. O volume de amostra injetado foi de 20 µL e o caudal da fase móvel de 1 mL/min, tendo sido realizadas pelo menos três réplicas das injeções para cada amostra. Todas as amostras foram previamente filtradas utilizando o tipo de filtro e as condições de filtração previamente otimizadas, conforme descrito na secção 2.2.1.2 que se segue.

Para a quantificação dos fármacos recorreu-se ao método do padrão externo. Para isso, a partir de uma solução padrão *stock* contendo 10 mg/L de cada um dos quatro fármacos, foram preparadas uma série de soluções padrão com as seguintes concentrações: 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2,5; 5,0 mg/L. Todas as soluções padrão foram injetadas pelo menos três vezes no HPLC/UV-Vis, utilizando as condições de trabalho previamente otimizadas e posteriormente, construiu-se a reta de calibração.

A solução padrão de *stock* de 10 mg/L foi preparada dissolvendo-se os fármacos com o auxílio de uma adição de 5 mL de metanol de modo a facilitar a solubilização dos fármacos com menor solubilidade em água. Para reduzir a fotodegradação de alguns destes compostos mais fotossensíveis (em particular o diclofenaco e o naproxeno), todas as soluções foram guardadas no escuro.

2.2.1.2. Seleção do tipo de filtro e otimização do volume de amostra a filtrar

Numa análise por HPLC, a filtração das amostras utilizando membranas filtrantes é um passo obrigatório para evitar o entupimento dos capilares ou a colmatação da coluna cromatográfica. Tipicamente, esta filtração é realizada utilizando membranas filtrantes com uma baixa porosidade, as quais devem permitir remover quaisquer pequenas partículas presentes na amostra, mas não devem reter o analito ou libertar substâncias interferentes na amostra. No entanto, em estudos publicados na literatura e em pesquisas conduzidas por membros da equipa de investigação, observou-se que certos tipos de membranas filtrantes, de determinados materiais e marcas comerciais, demonstram uma retenção significativa de alguns fármacos, dependendo do volume de amostra filtrado e

da concentração dos analitos (Carlson & Thompson, 2000; Carrajola, 2020; Machado et al., 2019; Pillai et al., 2016; Silva, 2023).

Com o objetivo de selecionar o tipo de filtro adequado e otimizar a preparação do filtro, especialmente em relação ao volume a ser filtrado, de modo a minimizar a perda dos analitos, foram testados dois tipos de membranas filtrantes: filtros de membrana de nylon com porosidade de 0,45 μm ($\varnothing = 25\text{mm}$) da marca Labfil e filtros de membrana hidrofílica de PTFE com porosidade de 0,45 μm ($\varnothing = 25\text{mm}$), também da marca Labfil.

Para proceder ao estudo a realizar com o intuito de atingir a maior percentagem de recuperação do analito filtrado antes da sua quantificação por HPLC, filtraram-se, com o auxílio de seringas de plástico de 10 mL de marca Ecoject, várias amostras de soluções aquosas contendo os quatro fármacos (carbamazepina, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno) a duas concentrações diferentes: 2,5 e 10 mg/L. Foi recolhido sempre o último mililitro da solução filtrada para quantificação. Para cada uma das concentrações testaram-se vários volumes de filtração (5, 10, 15, 20 e 25 mL) até ter sido obtida uma percentagem de recuperação dos compostos constante e o mais próxima possível de 100%. Para cada volume testado foram realizadas pelo menos três réplicas.

A percentagem de recuperação dos compostos após a filtração foi calculada pela razão entre a concentração dos compostos da solução filtrada e a concentração dos compostos da solução não filtrada.

2.2.1.3. Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada seguindo os procedimentos descritos no guia “ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)” (ICH, 1994), avaliando-se a exatidão, a repetibilidade e a reprodutibilidade, a linearidade da reta de calibração, a gama de concentrações de trabalho, os limites de deteção e de quantificação, além da eficiência de recuperação dos compostos após a filtração.

A) Linearidade

A avaliação da linearidade permitiu verificar se existia uma relação linear entre os valores das áreas e as concentrações das amostras analisadas, demonstrando assim a

capacidade de se obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração da substância em análise na gama de concentrações de trabalho do procedimento analítico.

As retas de calibração, obtidas conforme descrito no ponto 2.2.1.1, foram analisadas através do método dos mínimos quadrados (regressão linear), tendo sido estudada a correlação linear na gama das concentrações utilizadas, obtendo-se, assim, o declive, a ordenada na origem e o coeficiente de determinação (R^2), que deve ser próximo de 1.

Normalmente a gama de concentrações testadas deve variar de 60 % a 140 % da concentração do composto, sendo recomendada a utilização de, no mínimo, cinco padrões para o estudo da linearidade (ICH, 1994).

B) Gama de concentrações de trabalho

A gama de concentrações de trabalho numa quantificação normalmente deve situar-se entre 80 % e 120 % da concentração do composto. Esse intervalo corresponde às concentrações mínimas e máximas do analito que podem ser quantificadas com linearidade, exatidão e precisão (ICH, 1994).

C) Limites de deteção e quantificação

Os limites de deteção (LDI – Limite de Deteção Instrumental) e de quantificação (LQI – Limite de Quantificação Instrumental) foram calculados através da determinação da concentração do analito correspondente ao sinal do branco mais 3,3 e 10 vezes o desvio padrão, respetivamente (ICH, 1994).

D) Precisão e Exatidão

A avaliação da precisão do método analítico permite determinar o grau de concordância entre uma série de resultados obtidos por aplicação do mesmo método e sob as mesmas condições. A precisão deve ser avaliada a três níveis: repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade (ICH, 1994).

A exatidão de uma metodologia é a proximidade dos resultados obtidos em determinado ensaio em relação ao valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 1994).

Na avaliação da exatidão e da repetibilidade do equipamento, foram efetuadas três réplicas sucessivas de cada solução pelo mesmo utilizador e com a mesma composição da fase móvel de forma que as condições de eluição se mantivessem inalteradas, tendo

sido utilizadas três soluções padrão de concentrações diferentes, 0,5 mg/L (concentração baixa); 2,5 mg/L (concentração média) e 5,0 mg/L (concentração alta) (ICH, 1994). A exatidão foi calculada através da razão entre a média das concentrações determinadas experimentalmente e a concentração teórica previamente conhecida e é expressa em percentagem (ICH, 1994). Para avaliar a repetibilidade, foi analisada a dispersão dos dados, expressa como o desvio padrão relativo em percentagem das áreas dos picos (ICH, 1994).

A reprodutibilidade do aparelho foi também avaliada com base na dispersão, ou desvio padrão relativo (% DPR), dos valores das áreas do pico atribuído ao analito resultantes de 3 injeções sucessivas da mesma solução em dias diferentes (ICH, 1994).

E) Percentagem de recuperação dos compostos após filtração

A percentagem de recuperação dos compostos após a filtração foi determinada a partir da razão entre o valor da concentração dos compostos da solução filtrada e do valor da concentração dos compostos da solução não filtrada.

2.2.2. Otimização da composição da matriz a utilizar no microcosmos de LCM

Em estudos anteriormente realizados por membros da equipa de investigação, e também no decurso do trabalho de estágio, avaliou-se a capacidade de uma matriz de suporte constituída por uma mistura de agregados de argila expandida (LECA) 2/4 e vermiculite esfoliada 3, na proporção 1:1 (v:v), para remover/reter vários fármacos, tendo-se obtido resultados em geral promissores (Carrajola, 2020; Dordio, Miranda, et al., 2017a; Silva, 2023).

Com o objetivo de aumentar a eficiência na remoção dos fármacos pela matriz de suporte anterior, testou-se a capacidade de remoção de um novo material (granulados de cortiça expandida) com o objetivo de o adicionar à mistura de LECA e vermiculite. Neste âmbito, foram estudadas duas granulometrias de cortiça diferentes, 0,5/3 e 3/5 (Figura 2.2).

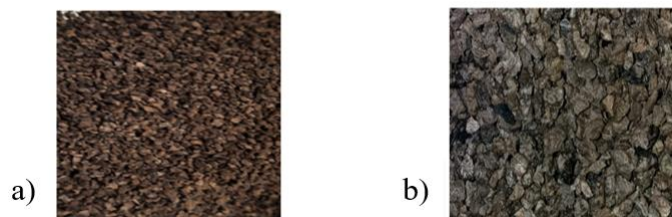


Figura 2.2 – a) Cortiça com granulometria 0,5/3; b) Cortiça com granulometria 3/5

2.2.2.1. Preparação dos materiais

Antes da utilização dos materiais, os mesmos sofreram lavagens sucessivas com água ultra-pura (*Fisher Chemical*), sendo posteriormente secos numa estufa a uma temperatura de 105°C, durante 24 horas. Este processo foi realizado com o objetivo de remover as partículas finas e os sólidos em suspensão que os materiais apresentavam devido ao desgaste mecânico. Para além disso, esta etapa também contribui para a redução da população microbiana presente no material.

A vermiculite e a LECA foram posteriormente misturadas uniformemente, na razão 1:1 (v:v).

2.2.2.2. Seleção da classe granulométrica de granulado de cortiça expandida a utilizar na composição da matriz

Foram realizados ensaios com duas granulometrias distintas de granulados de cortiça expandida, nomeadamente 0,5/3 e 3/5, com o objetivo de avaliar a influência do tamanho dos grânulos na remoção dos fármacos.

Nestes ensaios colocaram-se em contacto amostras de grânulos de cortiça de cada granulometria com soluções aquosas dos fármacos com quatro concentrações distintas (1 mg/L, 2,5 mg/L, 5,0 mg/L e 10 mg/L). Os ensaios foram realizados em descontínuo, à escala laboratorial, em triplicado e à temperatura ambiente. Para cada granulometria, a razão entre o volume de solução e a massa do material foi estabelecida de modo a que correspondesse a uma taxa de inundação de 100%, pois esta seria a situação verificada num contexto de aplicação prática, numa estação de tratamento, situação essa que permite

um melhor contacto entre as soluções e os meios filtrantes e seria de esperar consequentemente uma melhor remoção dos compostos.

A escolha das massas dos grânulos de cortiça a utilizar nos ensaios foi tomada de modo que as amostras com as duas granulometrias distintas ocupassem sensivelmente o mesmo volume (~200 mL).

Para além do efeito do tamanho dos grânulos de cortiça também foi estudada a influência de certas condições experimentais, nomeadamente o tempo de contacto e a concentração inicial dos fármacos (que variou entre 1 mg/L e 10 mg/L).

É de salientar ainda que todos os ensaios foram realizados no escuro e sem agitação, de modo a evitar a fotodegradação destes compostos e de modo a conseguir uma boa simulação do comportamento hidráulico de um leito construído de macrófitas de fluxo sub-superficial, onde são normalmente usadas baixas velocidades de escoamento do efluente.

As montagens de cada ensaio, para cada concentração testada para as duas granulometrias, seguiram o seguinte procedimento (Figura 2.3):

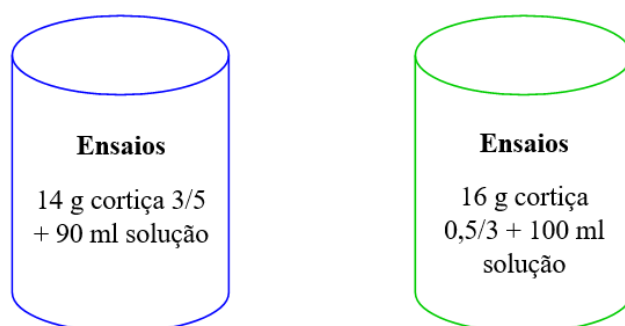


Figura 2.3 - Esquema geral da montagem dos ensaios da cortiça 3/5 (esquerda) e da cortiça 0,5/3 (direita) para a solução com os compostos em estudo

Assim, no total foram realizados 6 ensaios com as seguintes condições:

- ✓ **Ensaio 1** – destinado a avaliar a remoção dos fármacos pela granulometria 3/5 às concentrações de fármacos de 1 mg/L; dos 6 copos utilizados, 3 deles continham a solução aquosa dos fármacos e os restantes 3 (contendo apenas água) foram utilizados como controlos;

- ✓ **Ensaio 2** - destinado a avaliar a remoção dos fármacos pela granulometria 3/5 às concentrações de fármacos de 2,5 mg/L; dos 6 copos utilizados, 3 deles continham a solução aquosa dos fármacos e os restantes 3 (contendo apenas água) foram utilizados como controlos;
- ✓ **Ensaio 3** - destinado a avaliar a remoção dos fármacos pela granulometria 3/5 às concentrações de fármacos de 5 mg/L; dos 6 copos utilizados, 3 deles continham a solução aquosa dos fármacos e os restantes 3 (contendo apenas água) foram utilizados como controlos;
- ✓ **Ensaio 4** – destinado a avaliar a remoção dos fármacos pela granulometria 3/5 às concentrações de fármacos de 10 mg/L; dos 6 copos utilizados, 3 deles continham a solução aquosa dos fármacos e os restantes 3 (contendo apenas água) foram utilizados como controlos;
- ✓ **Ensaio 5** - destinado a avaliar a remoção dos fármacos pela granulometria 0,5/3 às concentrações de fármacos de 2,5 mg/L; dos 6 copos utilizados, 3 deles continham a solução aquosa dos fármacos e os restantes 3 (contendo apenas água) foram utilizados como controlos;
- ✓ **Ensaio 6** - destinado a avaliar a remoção dos fármacos pela granulometria 0,5/3 às concentrações de fármacos de 5 mg/L; dos 6 copos utilizados, 3 deles continham a solução aquosa dos fármacos e os restantes 3 (contendo apenas água) foram utilizados como controlos.

Todos os ensaios tiveram uma duração total de 216 h, tendo sido recolhidas amostras de 24 em 24 h. A realização deste estudo permitiu a seleção da granulometria de cortiça mais indicada para adicionar à matriz de suporte composta por uma mistura de LECA e vermiculite esfoliada.

2.2.2.3. Estudo da estratificação dos materiais a utilizar na composição da matriz de suporte

Foram realizados ensaios com três estratificações distintas de uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 3 (1:1, v:v) e dos granulados de cortiça expandida 3/5 mm (Figura 2.4), com o objetivo de selecionar a composição da matriz de suporte a utilizar na montagem dos microcosmos de LCMs a utilizar nos ensaios.

Nestes ensaios colocou-se o material com as diferentes estratificações em contacto com uma solução aquosa dos fármacos com uma concentração de 2,5 mg/L. Para as três estratificações testadas, o volume de solução utilizado foi igual e correspondeu aproximadamente à taxa de inundação de 100%, pelas razões apresentadas na secção 2.2.2.2. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições experimentais descritas acima (secção 2.2.2.2).

As montagens de cada ensaio, para cada estratificação testada, seguiram o seguinte procedimento (Figura 2.4):

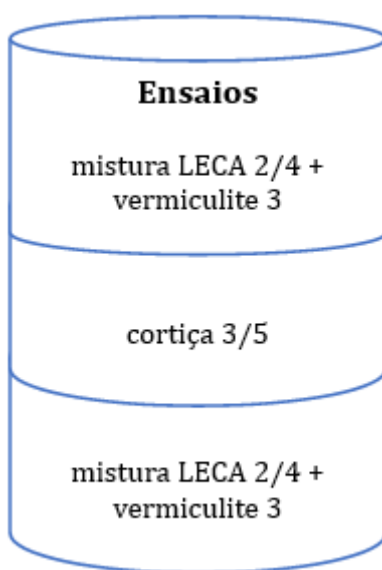


Figura 2.4 - Esquema geral da montagem dos ensaios de estratificação para a solução com os compostos em estudo

Assim, no total, foram realizados 3 ensaios com as seguintes condições:

- ✓ **Ensaio 1** – destinado a avaliar a remoção dos fármacos de uma solução aquosa contendo 2,5 mg/L de cada fármaco, por meio de uma estratificação 1:1:1 dos componentes da matriz de suporte, bem como determinar algumas propriedades físico-químicas (densidade aparente, porosidade, pH) da matriz: dos 6 copos utilizados, 3 deles continham a solução aquosa dos fármacos e os restantes 3 (contendo apenas água) foram utilizados como controlos;
- ✓ **Ensaio 2** – destinado a avaliar a remoção dos fármacos de uma solução aquosa contendo 2,5 mg/L de cada fármaco, por meio de uma estratificação

5:3:4 dos componentes da matriz de suporte, bem como determinar algumas propriedades físico-químicas (densidade aparente, porosidade, pH) da matriz: dos 6 copos utilizados, 3 deles continham a solução aquosa dos fármacos e os restantes 3 (contendo apenas água) foram utilizados como controlos;

- ✓ **Ensaio 3** – destinado a avaliar a remoção dos fármacos de uma solução aquosa contendo 2,5 mg/L de cada fármaco, por meio de uma estratificação 5:2:5 dos componentes da matriz de suporte, bem como determinar algumas propriedades físico-químicas (densidade aparente, porosidade, pH) da matriz: dos 6 copos utilizados, 3 deles continham a solução aquosa dos fármacos e os restantes 3 (contendo apenas água) foram utilizados como controlos.

Todos os ensaios tiveram uma duração total de 168 horas, com amostras recolhidas para análise a cada 24 horas. Este estudo possibilitou a seleção da estratificação mais adequada para a matriz de suporte, levando em consideração a sua capacidade de remoção e as suas propriedades físico-químicas.

2.2.2.4. Caracterização físico-química dos materiais da matriz de suporte

As características da matriz de suporte condicionam o seu papel na remoção dos poluentes nos sistemas de LCMs. Em particular a capacidade de sorção de poluentes, as propriedades hidráulicas do sistema e o desenvolvimento das plantas e da população microbiana estão diretamente relacionadas com as propriedades físico-químicas dos materiais que constituem a matriz de suporte. Assim, para a caracterização físico-química dos granulados de cortiça expandida com granulometria 0,5/3 e 3/5, bem como da estratificação a utilizar como matriz no sistema, foram determinadas a densidade aparente, a porosidade do meio (% de volume de vazio) e o pH em água.

Em relação à densidade aparente foi determinada tendo em conta a razão entre a massa do material (peso seco) e o volume aparente do material (n=6) (Brix et al., 2001; Del Bubba et al., 2003). A porosidade do meio (volume de vazios) foi determinada com base na quantidade de água necessária para saturar um volume conhecido de cada um dos materiais (n=6) (Brix et al., 2001; Del Bubba et al., 2003). Para as determinações do pH,

colocaram-se 10 g do material em contacto com 75 mL de água destilada e após 30 minutos em agitação efetuaram-se as medições potenciométricas (n=6) (Black et al., 2016).

2.2.3. Estudo da capacidade da bactéria na remoção/degradação dos fármacos

Na realização deste estudo foi utilizada uma bactéria, a *Bacillus subtilis* QST 713, isolada a partir de uma suspensão comercial. Além dos esporos desta estirpe de *Bacillus*, esta suspensão contém também diversas substâncias produzidas por esta bactéria durante o processo de fermentação, sendo utilizada como um fungicida biológico para aplicação agrícola. A bactéria referida é identificada mais recentemente neste produto comercial como *Bacillus amyloliquefaciens* QST 713.

As bactérias utilizadas como pré-inóculo encontravam-se numa suspensão concentrada (SC) com 14,1 g/L de *Bacillus subtilis* QST 713 (mínimo 1×10^9 UFC/g).

2.2.3.1. Meio de cultura e condições de crescimento

Os meios de cultura fornecem aos microrganismos os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e multiplicação. Diferentes microrganismos possuem necessidades nutricionais específicas e, como tal, os meios de cultura deverão ser selecionados de modo a satisfazer essas necessidades.

Para o crescimento da cultura de *Bacillus* em meio líquido procurou-se selecionar e formular um meio de cultura onde estivessem presentes os nutrientes (macronutrientes e micronutrientes) que naturalmente podem ser disponibilizados pelos materiais argilosos, vermiculite esfoliada e argila expandida (LECA), que irão constituir a matriz de suporte do microcosmos de LCMs, onde irão posteriormente ser inoculados os microrganismos.

A composição do meio de cultura utilizado para o crescimento, em meio líquido, do *Bacillus* encontra-se apresentada na Tabela 2.3. A fonte de carbono (glucose), sempre que necessário, foi adicionada ao meio de cultura antes da inoculação.

Tabela 2.3 - Composição do meio de cultura utilizado durante o estudo (adaptado de Marchlewicz et al., 2016)

Reagente	Concentração (g/L)
NH₄Cl	5
MgSO₄.6H₂O	0,185
Na₂HPO₄.2H₂O	1,879
KH₂PO₄	0,5
Glucose	1

O pH do meio de cultura foi ajustado inicialmente ao valor de 7,1 (Marchlewicz et al., 2016) e o crescimento da cultura de *Bacillus* foi realizado numa incubadora orbital (marca OHAUS, modelo ISLD04HDG) à temperatura constante de 30°C. Com o propósito de otimizar as condições de crescimento da cultura de *Bacillus* foram testadas 3 velocidades de agitação: 150 rpm, 160 rpm e 200 rpm.

2.2.3.2. Preparação do inóculo

Antecedendo a preparação dos inóculos foram preparados pré-inóculos, tendo-se, para esse fim, adicionado em Erlenmeyers de 250 mL um determinado volume de suspensão concentrada, a qual continha as células de *Bacillus*, e 200 mL de meio de cultura com glucose (Figura 2.5). O volume de suspensão concentrada foi selecionado de modo a ser obtido para a Densidade Ótica da cultura, medida ao comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}), um valor próximo de 0,8. A cultura foi submetida a agitação numa incubadora orbital a 200 rpm durante 24 horas e a uma temperatura constante de 30°C de modo a garantir uma densidade celular elevada. Após as 24 horas de incubação, novos inóculos foram preparados. Em Erlenmeyers de 250 mL foi adicionado um volume de pré-inóculo, contendo as novas células de *Bacillus*, e 200 mL de meio de cultura com glucose (Figura 2.5). O volume de pré-inóculo adicionado foi selecionado de modo a se obter um valor próximo de 0,03 para a DO_{600nm}. Novamente a cultura foi submetida a agitação na incubadora orbital a 200 rpm durante 24 horas e a uma temperatura constante de 30°C. Os inóculos assim obtidos foram posteriormente utilizados para os estudos de crescimento microbiano e para a avaliação da capacidade de remoção dos fármacos pela bactéria.

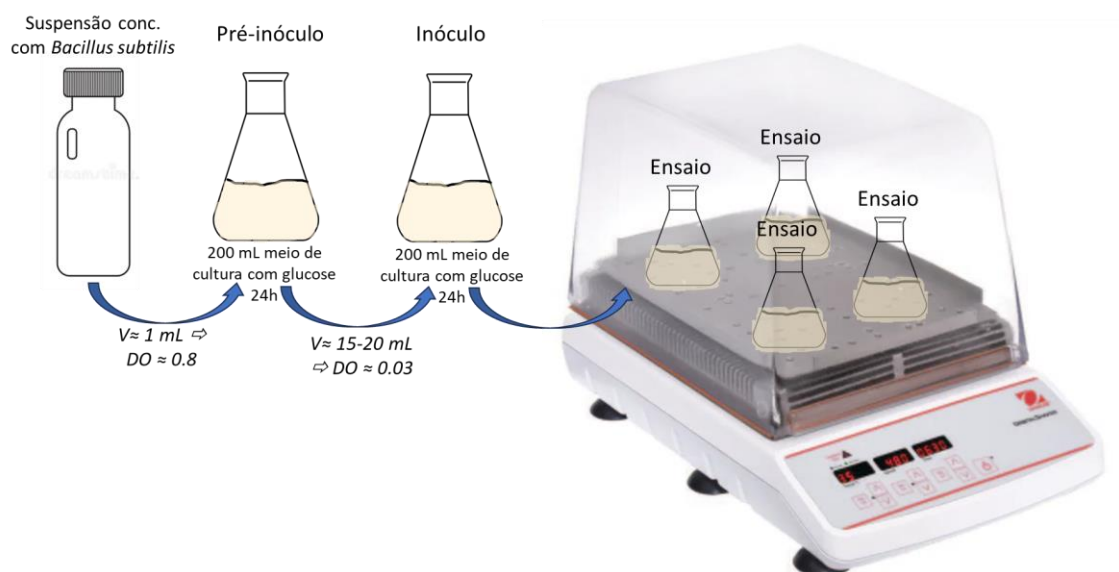


Figura 2.5 - Esquema da preparação dos inóculos a utilizar nos ensaios

2.2.3.3. Estudo do crescimento, em descontínuo, da bactéria em suspensão em meio líquido

O estudo da curva de crescimento da bactéria *Bacillus* foi feito com recurso ao método de turbidimetria. Este estudo foi realizado em descontínuo (*batch*) e em meio líquido, com agitação orbital de 200 rpm e a uma temperatura constante de 30°C. A curva de crescimento da bactéria foi obtida com base na medição da DO_{600nm} das amostras recolhidas ao longo do tempo.

Para a construção da curva de crescimento foi necessário, num Erlenmeyer contendo 200 mL do meio de cultura e glucose, inocular-se um volume adequado da cultura do inóculo, de modo que a DO_{600nm} da cultura bacteriana no início da experiência fosse próximo de 0,03. De seguida, o crescimento celular foi acompanhado durante cerca de 12 horas, com a recolha de amostras de cultura de 2 em 2 horas e a determinação dos valores da DO_{600nm} . Foram ainda realizadas recolhas de amostras às 24h, 28h, 33h e 48h e determinados os valores da DO_{600nm} .

O estudo da curva de crescimento do *Bacillus* também foi realizado na ausência de glucose no meio de cultura, tendo-se seguido o mesmo procedimento experimental descrito acima.

2.2.3.4. Estudo da capacidade de remoção/degradação da carbamazepina e do ibuprofeno pela bactéria em meio líquido

Com o propósito de estudar a capacidade que a bactéria *Bacillus* possui para remover ou degradar os fármacos, realizaram-se dois ensaios em meio líquido nos quais o meio de cultura foi dopado apenas com os fármacos em estudo (carbamazepina ou ibuprofeno) com uma concentração de 2 mg/L e 20 mg/L. Foi também realizado um ensaio em que o meio de cultura foi dopado com uma mistura de quatro fármacos (carbamazepina, diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno) com uma concentração inicial de 2 mg/L e 5 mg/L para cada um dos fármacos.

Na Figura 2.6 está apresentado o esquema geral utilizado para a montagem de cada um dos três ensaios.

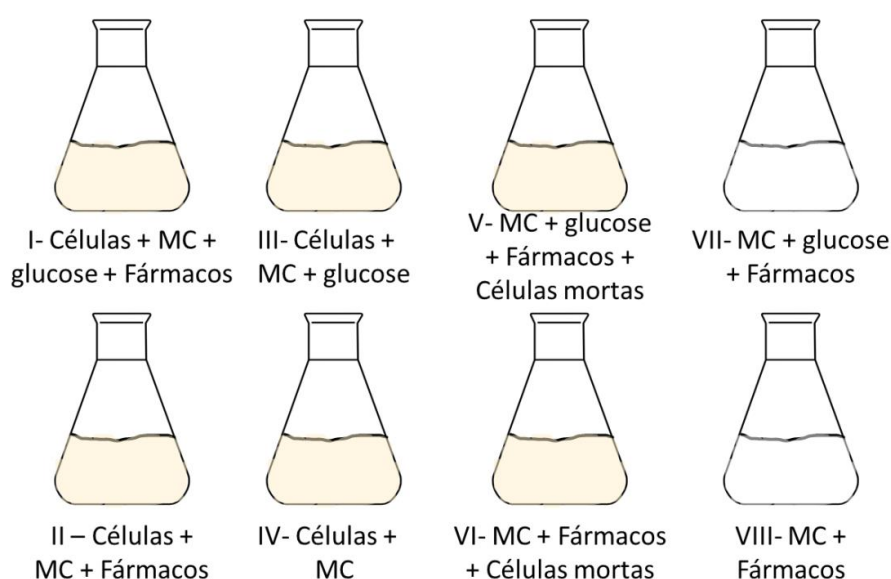


Figura 2.6 - Esquema geral utilizado na montagem de cada um dos ensaios (MC = meio de cultura)

Assim, no total, foram realizados 3 ensaios, cada um com 8 Erlenmeyers com as seguintes condições:

- ✓ **Erlenmeyer I** – com o objetivo de avaliar a capacidade de a bactéria degradar o(s) fármaco(s) presente(s) no meio de cultura bem como de avaliar também os possíveis efeitos da exposição ao(s) fármaco(s) sobre o desenvolvimento da cultura da bactéria, dopou-se com o(s) fármaco(s) o

- meio de cultura contendo glucose, o qual foi inoculado com um volume de cultura de *Bacillus* correspondente a uma DO_{600nm} inicial próxima de 0,03;
- ✓ **Erlenmeyer II** – com o objetivo de avaliar a capacidade de a bactéria degradar o(s) fármaco(s) presente(s) no meio de cultura bem como de avaliar a influência da presença da glucose na remoção do(s) fármaco(s), dopou-se com o(s) fármaco(s) o meio de cultura sem glucose, o qual foi inoculado com um volume de cultura de *Bacillus* correspondente a uma DO_{600nm} inicial próxima de 0,03;
 - ✓ **Erlenmeyer III** – com o objetivo de, por comparação com o Erlenmeyer I, avaliar o efeito que o(s) fármaco(s) pode(m) ter no desenvolvimento da cultura de bactérias, inoculou-se o meio de cultura com glucose com um volume de cultura de *Bacillus* correspondente a uma DO_{600nm} inicial próxima de 0,03;
 - ✓ **Erlenmeyer IV** – com o objetivo de, por comparação com o Erlenmeyer II, avaliar o efeito que o(s) fármaco(s) pode(m) ter no desenvolvimento da cultura de bactérias, inoculou-se o meio de cultura sem glucose com um volume de cultura de *Bacillus* correspondente a uma DO_{600nm} inicial próxima de 0,03;
 - ✓ **Erlenmeyer V** – com o objetivo de avaliar a possível adsorção do(s) composto(s) à biomassa de *Bacillus*, dopou-se com o(s) fármaco(s) o meio de cultura contendo glucose, o qual foi inoculado com um volume de células inativas de *Bacillus* correspondente a uma DO_{600nm} inicial próxima de 0,2;
 - ✓ **Erlenmeyer VI** – com o objetivo de avaliar a possível adsorção do(s) composto(s) à biomassa de *Bacillus*, dopou-se com o(s) fármaco(s) o meio de cultura sem glucose, o qual foi inoculado com um volume de células inativas de *Bacillus* correspondente a uma DO_{600nm} inicial próxima de 0,2;
 - ✓ **Erlenmeyer VII** – com o objetivo de avaliar a possível fotodegradação do(s) fármaco(s) dopou-se com este(s) composto(s) o meio de cultura contendo glucose, não tendo este sido inoculado com a cultura de *Bacillus*;
 - ✓ **Erlenmeyer VIII** – com o objetivo de avaliar a possível fotodegradação do(s) fármaco(s) dopou-se com este(s) composto(s) o meio de cultura sem glucose, não tendo este sido inoculado com a cultura de *Bacillus*.

Todos os ensaios foram realizados em descontínuo, em meio líquido, com agitação orbital de 200 rpm e a uma temperatura constante de 30°C. As amostras foram recolhidas de 2 em 2 horas durante 13h e ainda foram recolhidas amostras às 24h. Os valores da DO_{600nm} foram medidos para todas as amostras recolhidas e, no caso das amostras contendo fármacos, também se determinaram as concentrações do(s) fármaco(s) em solução por HPLC/UV-Vis.

2.2.4. Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram expressos como sendo a média $\pm$ desvio padrão. O tratamento estatístico dos mesmos foi feito com recurso ao programa Microsoft EXCEL. Recorreu-se também à análise de variância (ANOVA fator único) na comparação de alguns resultados. Neste trabalho a análise de ANOVA foi sempre realizada para um grau de confiança de 95%.

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização e validação da metodologia analítica

3.1.1. Condições de quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis

Como já foi referido anteriormente para a separação dos quatro fármacos (ibuprofeno, carbamazepina, diclofenaco e naproxeno) presentes na solução aquosa e a quantificação do ibuprofeno e da carbamazepina recorreu-se à técnica analítica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando um aparelho equipado com detetor UV-Vis de c.d.o. único variável, nas condições experimentais otimizadas descritas na secção 2.2.1.1.

Os perfis cromatográficos de cada um dos fármacos e da solução com os quatro fármacos foram determinados a 220 nm com deteção em UV-Vis (Anexo A). A identificação dos quatro fármacos presentes na solução foi feita por comparação dos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas das soluções padrão de cada um dos compostos isolados. Na Figura 3.1 está apresentado o cromatograma obtido para uma solução padrão contendo os quatro fármacos com uma concentração de 2 mg/L de cada um dos fármacos.

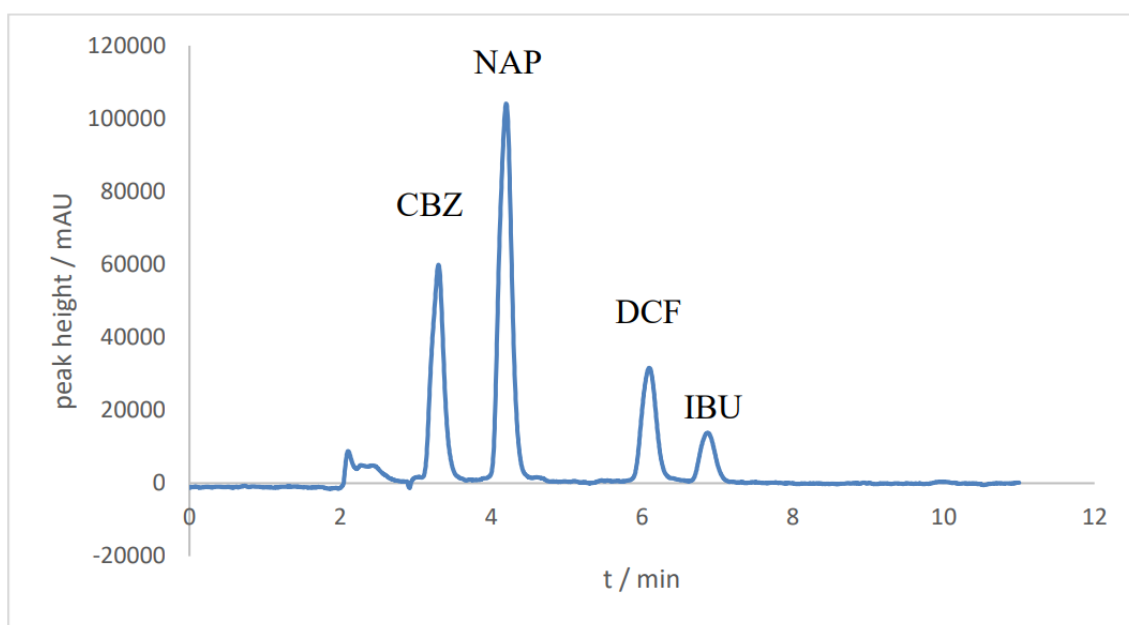


Figura 3.1 - Cromatograma obtido por HPLC-UV-Vis para uma solução padrão com os quatro fármacos

Tendo sido identificados previamente os tempos de retenção nos cromatogramas de cada composto isoladamente, foi possível identificar os tempos de retenção para a

carbamazepina, para o naproxeno, para o diclofenaco e para o ibuprofeno de 3,3 min, 4,2 min, 6,1 min e 6,9 min, respetivamente.

3.1.2. Validação do método analítico

A validação do método analítico realizou-se de acordo com o que está descrito no guia “ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)” (ICH, 1994). Foram assim avaliados a linearidade da curva de calibração e os parâmetros de exatidão, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), os limites de detecção e quantificação instrumentais.

De modo a quantificar a carbamazepina e o ibuprofeno presentes na solução aquosa, pelo método do padrão externo, construíram-se duas curvas de calibração (Figura 3.2 e Figura 3.3) utilizando 6 soluções padrão com concentrações entre 0,25 e 5 mg/L, conforme descrito na secção 2.2.1.1 da metodologia experimental. Procurou-se também determinar o limite de detecção, o limite de quantificação e o coeficiente de determinação (R^2), do método analítico para os fármacos em estudo.

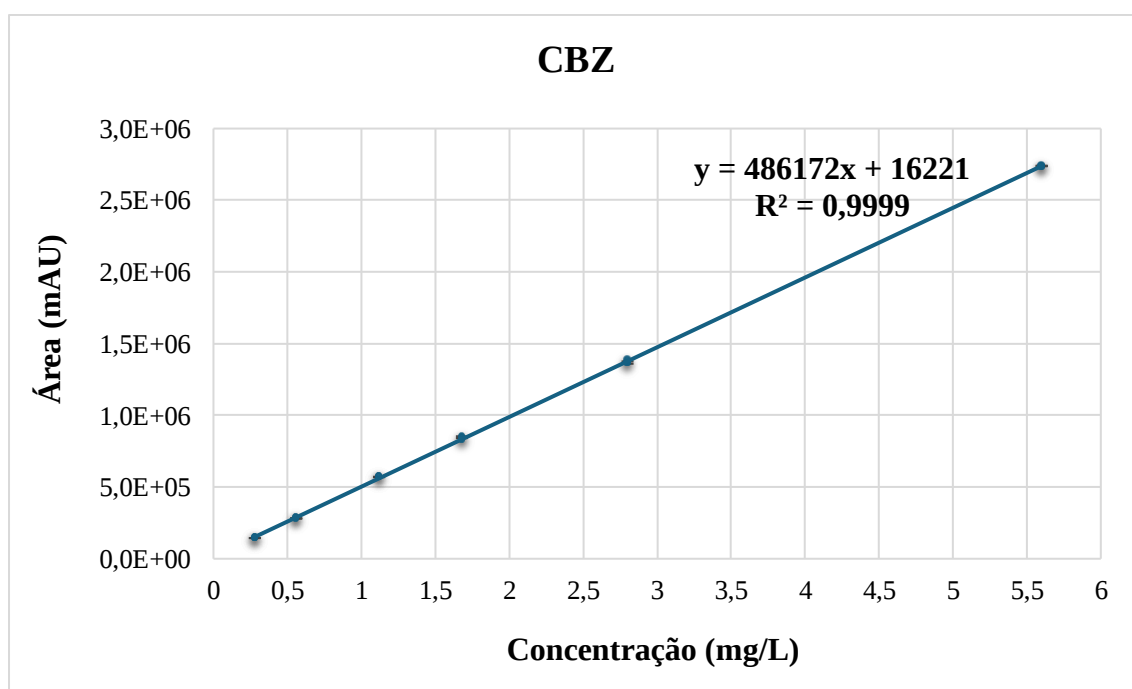


Figura 3.2 - Reta de calibração utilizada para a quantificação da carbamazepina em solução aquosa

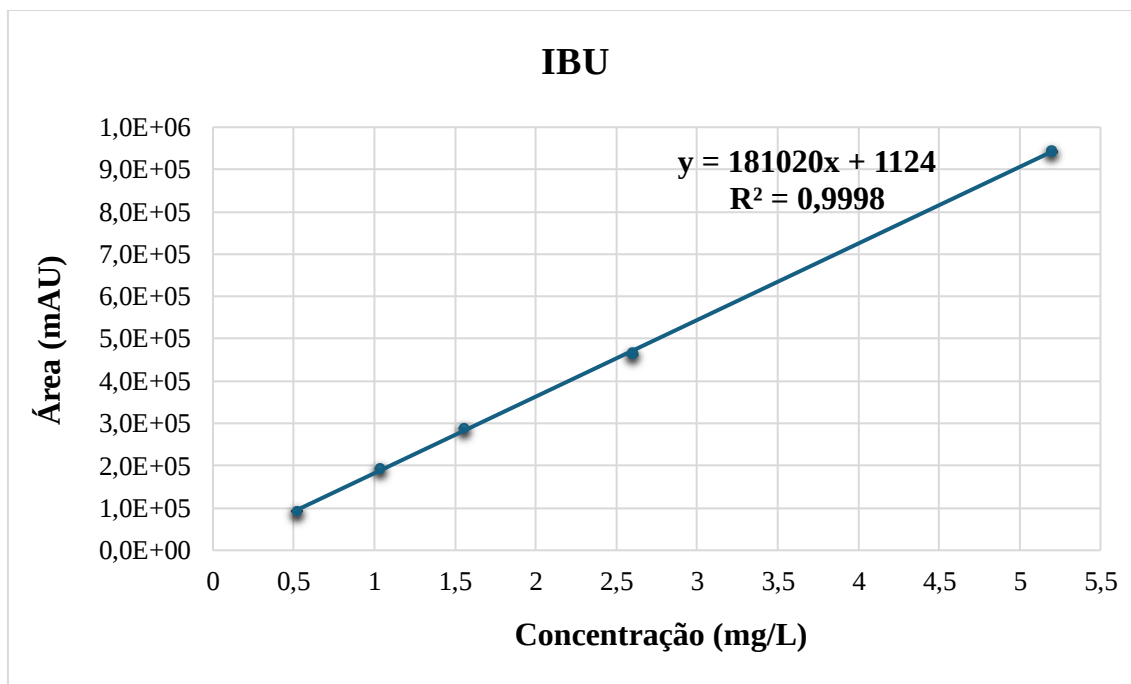


Figura 3.3 - Reta de calibração utilizada para a quantificação da ibuprofeno em solução aquosa

Na Tabela 3.1 são apresentados os parâmetros calculados, relativos ao modelo de regressão linear aplicado, respetivamente para cada um dos fármacos.

Tabela 3.1 - Retas de calibração, LDI e LQI relativamente à carbamazepina e ibuprofeno

Fármacos	carbamazepina	ibuprofeno
Equação da reta	$y = 486172x + 16221$	$y = 181020x + 1124$
R²	0,9999	0,9998
LDI (mg/L)	0,022	0,039
LQI (mg/L)	0,067	0,117

Analisando as duas equações das retas anteriormente apresentadas verifica-se que em ambos os casos o coeficiente de determinação (R^2) é superior a 0,9998. O coeficiente de determinação (R^2) mostra o quão próximos os valores medidos se encontram da reta de regressão que foi ajustada, podendo variar entre 0 e 1. Tal permite assegurar que os valores de concentração determinados por regressão linear, utilizando estas retas, são fiáveis dentro da gama de concentração de valores em que foram construídas (0,25 e 5 mg/L). Verifica-se também que o fármaco que é possível detetar e quantificar a

concentrações mais baixas é a carbamazepina, mas de uma forma geral os dois fármacos estudados têm limites de quantificação adequados aos valores de concentração medidos neste trabalho.

Foram ainda avaliadas a exatidão, a repetibilidade e a reprodutibilidade para ambos os fármacos, conforme descrito na secção 2.2.1.3 da metodologia experimental. Na Tabela 3.2 estão apresentados todos os resultados utilizados para a avaliação destes 3 parâmetros.

Tabela 3.2 - Parâmetros de exatidão, repetibilidade e reprodutibilidade

Parâmetro	Repetibilidade e Exatidão					
Fármacos	carbamazepina			ibuprofeno		
[teórica] (mg/L)	0,56	2,80	5,60	0,52	2,60	5,20
DPR (%)	1,41	0,42	0,30	2,66	0,75	0,34
[real] (mg/L)	0,54	2,81	5,55	0,49	2,59	5,16
% Nominal	97,14	100,24	99,15	95,00	99,52	99,20
	Reprodutibilidade e Exatidão					
[teórica] (mg/L)	0,56	2,80	5,60	0,52	2,60	5,20
DPR (%)	1,00	0,61	0,58	2,10	0,81	0,56
[real] (mg/L)	0,55	2,80	5,57	0,50	2,57	5,19
% Nominal	97,88	100,08	99,45	95,35	98,97	99,72

Para as concentrações testadas (0,5; 2,5 e 5 mg/L), o método analítico desenvolvido e otimizado para a quantificação da carbamazepina e do ibuprofeno por HPLC-UV-Vis apresentou uma elevada reprodutibilidade ($DPR_{CBZ} < 1,00 \%$; $DPR_{IBU} < 2,1 \%$) e repetibilidade ($DPR_{CBZ} < 1,41 \%$; $DPR_{IBU} < 2,66 \%$). No entanto, como seria de esperar, observa-se que estes indicadores são, em geral, maiores (DPR menores) para concentrações mais elevadas, diminuindo gradualmente (aumento de DPR) à medida que as concentrações medidas vão sendo menores. Tal deve-se ao facto de as incertezas nas medições terem maior peso relativo quanto menor for o valor medido (em denominador), originando uma maior dispersão relativa dos valores obtidos nestas condições.

3.1.3. Seleção dos filtros e otimização do volume de solução a filtrar

Como já foi referido, para a utilização da técnica analítica de HPLC-UV/Vis, um passo indispensável é a filtração prévia das amostras por membranas de baixa porosidade para evitar o entupimento dos capilares e a colmatação da coluna. No entanto, tem vindo a ser observado, em alguns estudos que se encontram na literatura (Carlson & Thompson, 2000; Machado et al., 2019; Pillai et al., 2016), bem como em alguns estudos realizados por outros membros da equipa de investigação (Carrajola, 2020; Silva, 2023), que na operação de filtração de alguns compostos orgânicos, incluindo alguns fármacos, estes são parcialmente retidos em certos tipos de membranas utilizadas nos filtros, em especial as constituídas por nylon. De facto, este material polimérico contém grupos funcionais de ácido carboxílico e de amina, bem como ligações amida, os quais podem interagir com analitos ácidos ou básicos por via eletrostática ou através do estabelecimento de pontes de hidrogénio, podendo favorecer a retenção de moléculas de analito por estes polímeros da membrana filtrante (Machado et al., 2019). O PTFE é um fluoropolímero sintético altamente apolar com uma estrutura alifática na qual o fluor substitui todos os átomos de hidrogénio na cadeia de carbonos, o que serve para evitar momentos dipolares apreciáveis (Michlig et al., 2024). Esta superfície apolar torna o PTFE menos suscetível de interagir (e reter) com compostos polares (Michlig et al., 2024).

No entanto, a retenção de fármacos por membranas filtrantes está dependente de vários fatores como o tipo de polímero constituinte da membrana, da concentração do composto em solução e das suas características, tais como polaridade, grau de ionização e capacidade para estabelecer de diferentes interações (ex. pontes de hidrogénio).

A utilização deste tipo de filtros requer deste modo que se proceda com algumas precauções nas operações de filtração, nomeadamente efetuando um estudo prévio de avaliação da retenção dos analitos pelos filtros e da maneira de mitigar este problema, de modo a minimizar as perdas de analito durante o passo preparativo das amostras.

Para selecionar o tipo de filtro a utilizar, bem como o volume de solução a filtrar que minimize as perdas de analito na filtração, foram testados dois tipos de filtros diferentes, um de membrana de nylon da marca Labfil e um de membrana hidrofílica de Politetrafluoroetileno (PTFE) da marca Labfil e vários volumes de soluções de carbamazepina e ibuprofeno. Para cada fármaco testaram-se duas concentrações distintas

(2,5 e 10 mg/L), uma vez que a retenção dos fármacos na membrana de nylon depende da sua concentração em solução, de acordo com o descrito na secção 2.2.1.2 da metodologia experimental.

Na Figura 3.4 são apresentados os resultados obtidos para as percentagens de recuperação da carbamazepina para as soluções com concentrações de 2,5 mg/L e 10 mg/L, nos dois tipos de filtros testados, de nylon e de PTFE (ambos da marca Labfil), sendo comparadas, para cada concentração, as percentagens de recuperação dos dois tipos de filtro a cada volume de solução filtrada.

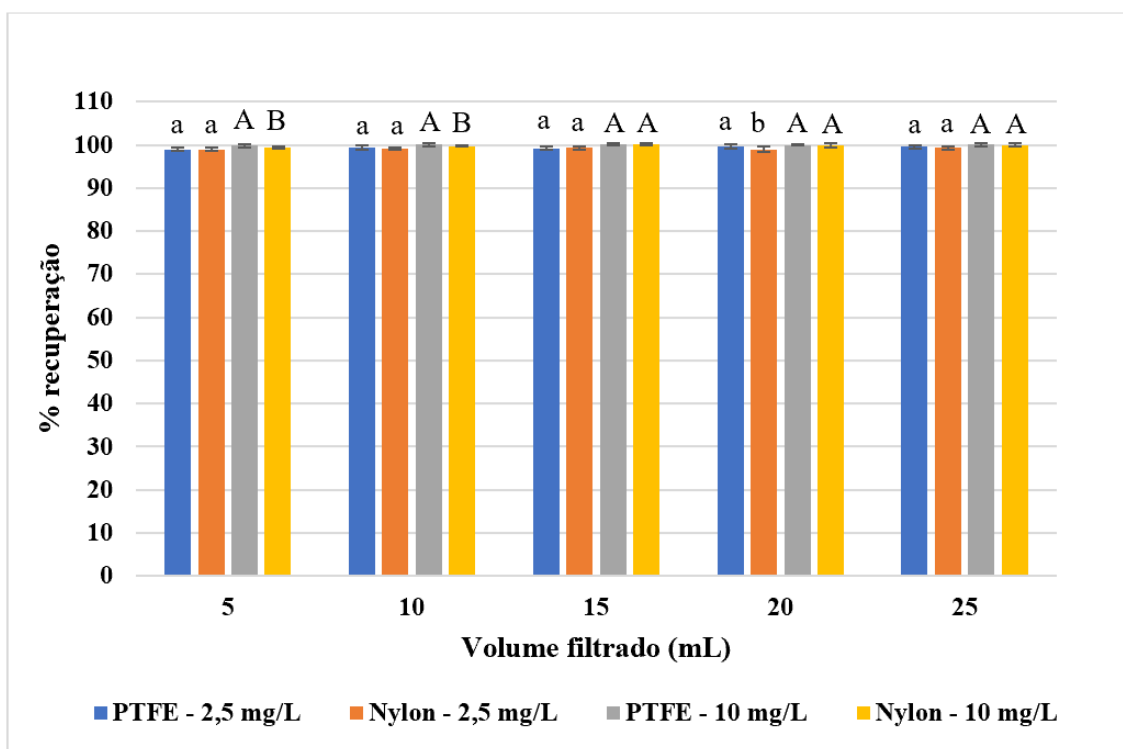


Figura 3.4 - Percentagem de recuperação (%R) da carbamazepina nas concentrações de 2,5 mg/L e 10 mg/L, após filtração utilizando membranas de nylon e PTFE. As letras diferentes significam que os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem a comparações entre %R de diferentes membranas para o mesmo volume e para a concentração de 2,5 mg/L. Letras maiúsculas correspondem a comparações entre %R de diferentes membranas para o mesmo volume e para a concentração de 10 mg/L

Para as duas membranas filtrantes testadas (nylon e PTFE) obtiveram-se percentagens de recuperação da carbamazepina elevadas (próximas de 100%) para todos os volumes testados e para as duas concentrações estudadas (2,5 mg/L e 10 mg/L). Embora se verifiquem diferenças que são estatisticamente significativas para as duas membranas à concentração mais elevada (10 mg/L) para os volumes de filtrado menores,

estas diferenças são bastante pequenas. Assim, para a carbamazepina, ambos os filtros apresentam resultados quase idênticos em que as recuperações do analito são quase totais.

Na Figura 3.5 são apresentados os resultados obtidos para as percentagens de recuperação do ibuprofeno para as soluções com concentrações de 2,5 mg/L e 10 mg/L, nos dois tipos de filtros testados, de nylon e de PTFE (ambos da marca Labfil), e comparam-se as percentagens de recuperação dos dois tipos de filtro para os mesmos volumes de solução filtrada.

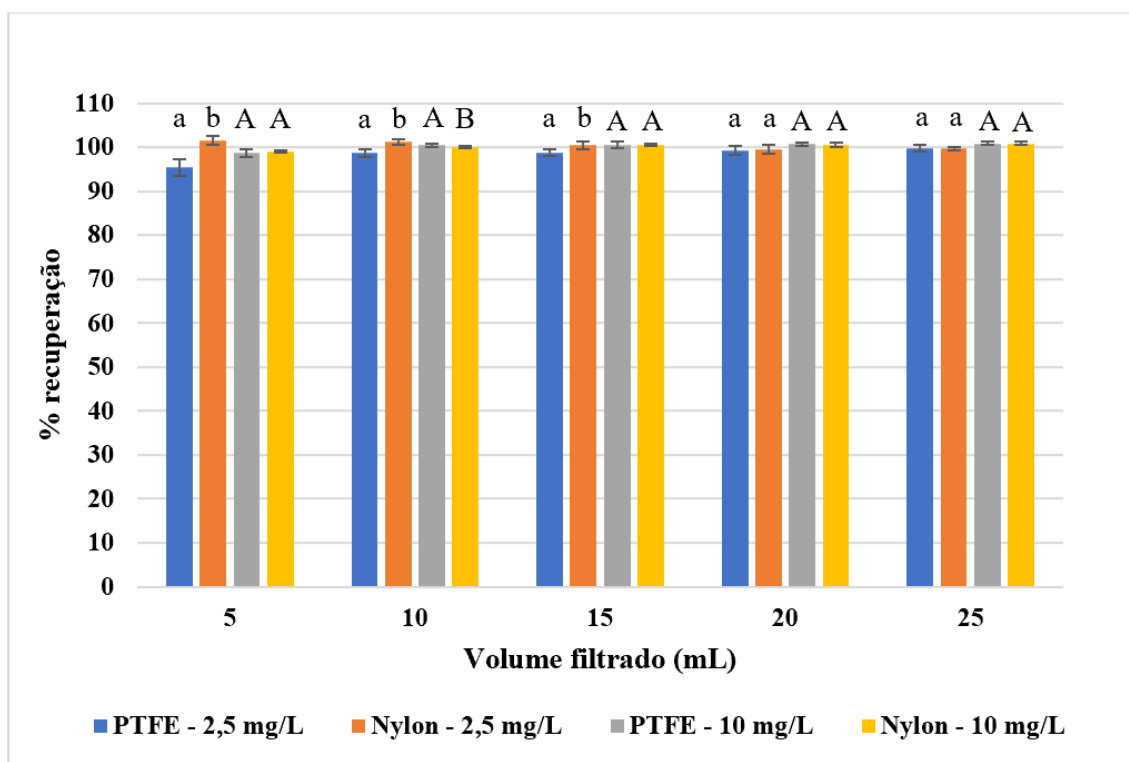


Figura 3.5 - Percentagem de recuperação (%R) do ibuprofeno nas concentrações de 2,5 mg/L e 10 mg/L, após filtração utilizando membranas de nylon e PTFE. As letras diferentes significam que os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem a comparações entre %R de diferentes membranas para o mesmo volume e para a concentração de 2,5 mg/L. Letras maiúsculas correspondem a comparações entre %R de diferentes membranas para o mesmo volume e para a concentração de 10 mg/L

Para a concentração de 10 mg/L, obtiveram-se percentagens de recuperação do Ibuprofeno elevadas (próximas de 100%) para todos os volumes testados e para as duas membranas filtrantes testadas (nylon e PTFE). Contudo, o mesmo não se observa para a concentração de 2,5 mg/L, em que para os três primeiros volumes testados (5, 20 e 15 mL) observaram-se diferenças significativas entre as recuperações obtidas pelas duas

membranas filtrantes testadas. Ao contrário do que acontece na membrana de PTFE, em que a percentagem de recuperação nos primeiros volumes testados é inferior a 100%, na membrana de nylon os valores são sempre próximos de 100%.

Embora em alguns artigos tenha sido relatada a retenção de ibuprofeno em membranas de nylon, esta discrepância é atribuída por alguns autores às diferenças na matriz da amostra nomeadamente à presença de outros fármacos em solução (Michlig et al., 2024).

No presente estudo, tal como já foi referido anteriormente, a solução utilizada nos ensaios contém, para além da carbamazepina e ibuprofeno, outros dois fármacos (diclofenaco e naproxeno) estudados no âmbito da dissertação de mestrado de outra colega. De facto, verificou-se para estes dois fármacos, mas em particular para o diclofenaco, que ocorreu uma retenção significativa deste(s) analito(s) na membrana de nylon (dados não apresentados). É uma possibilidade que o diclofenaco (uma molécula que possui um grupo amina básico que pode interatuar por pontes de hidrogénio com os grupos carboxílicos do nylon) interatue preferencialmente com o nylon, diminuindo assim o efeito de retenção da membrana sobre os outros fármacos, cujas interações são mais fracas.

Assim, tendo em atenção os resultados obtidos, o filtro escolhido para dar continuidade ao trabalho foi o filtro de PTFE da marca Labfil. Apesar do filtro de PTFE apresentar um custo mais elevado e percentagens de recuperação da carbamazepina semelhantes às obtidas para o filtro de nylon, existem diferenças significativas na percentagem de recuperação do ibuprofeno e dos outros dois fármacos presentes na solução em estudo (diclofenaco e naproxeno), daí a necessidade de se seleccionar os filtros de PTFE para a metodologia analítica e de se prosseguir com a otimização da operação de filtração realizando-se estudos para determinar o volume mínimo de filtrado para se obter uma percentagem de recuperação próxima de 100%.

Nas Figura 3.6 e Figura 3.7 estão apresentados os resultados referentes a esse estudo.

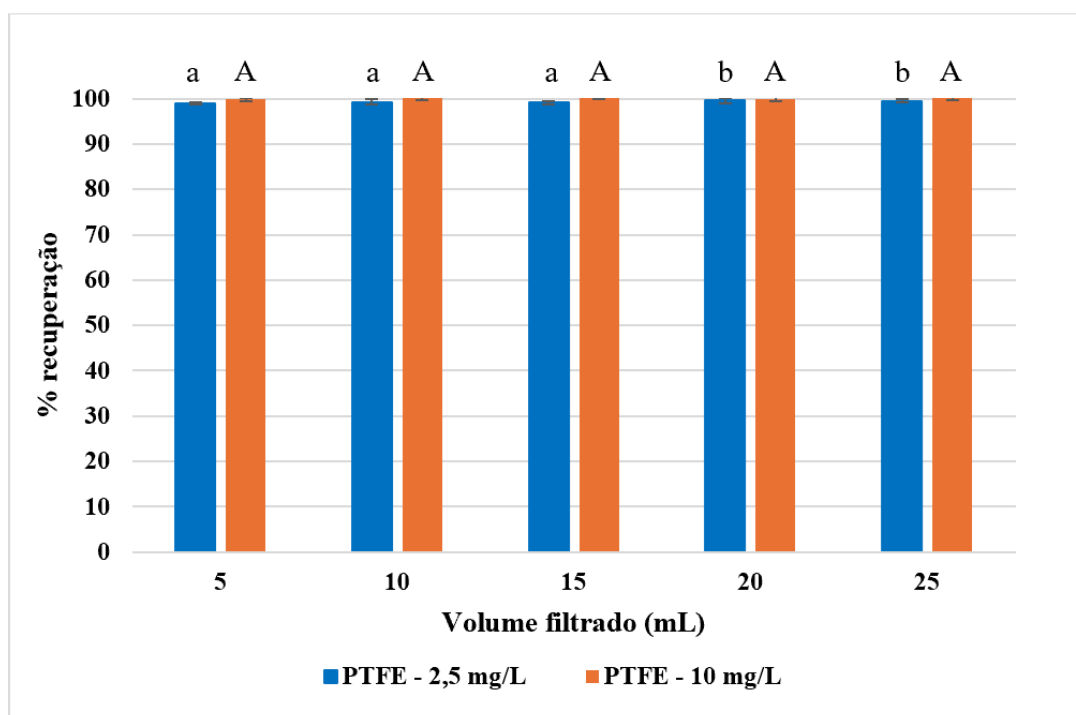


Figura 3.6 - Percentagem de recuperação (%R) da carbamazepina nas concentrações de 2,5 mg/L e 10 mg/L, após filtração utilizando membranas de PTFE. As letras diferentes significam que os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem a comparações entre %R de diferentes volumes filtrados para a concentração de 2,5 mg/L. Letras maiúsculas correspondem a comparações entre %R de diferentes volumes filtrados para a concentração de 10 mg/L

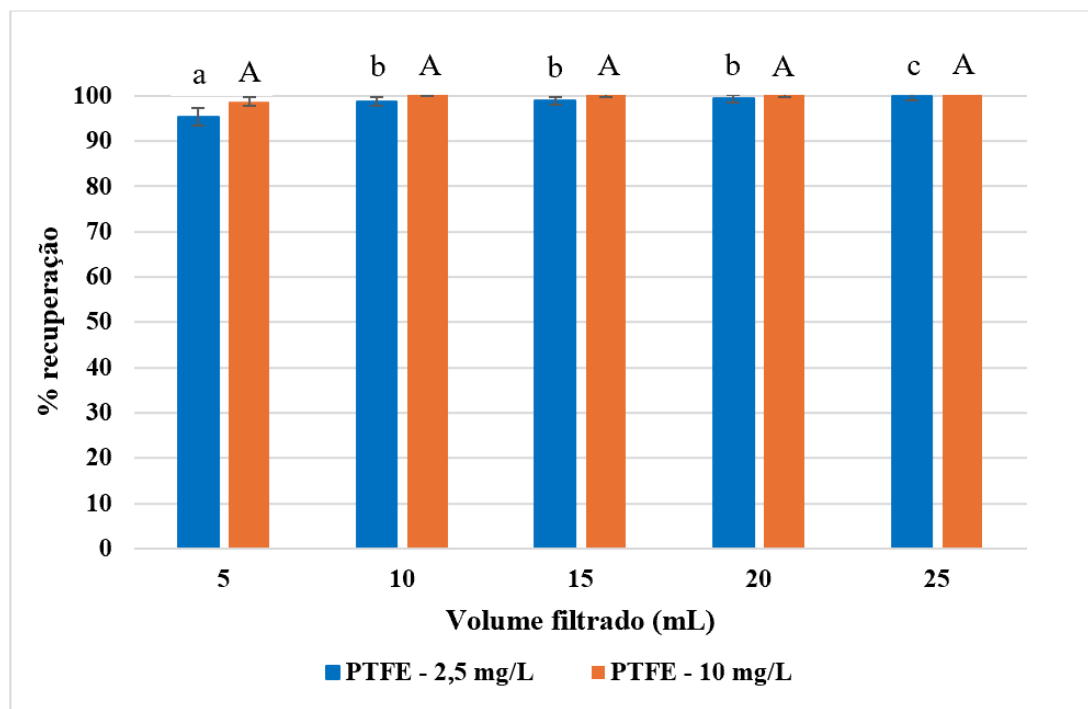


Figura 3.7 - Percentagem de recuperação (%R) do ibuprofeno nas concentrações de 2,5 mg/L e 10 mg/L, após filtração utilizando membranas de PTFE. As letras diferentes significam que os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem a comparações entre %R de diferentes volumes filtrados para a concentração de 2,5 mg/L. Letras maiúsculas correspondem a comparações entre %R de diferentes volumes filtrados para a concentração de 10 mg/L

Pela observação das Figura 3.6 e Figura 3.7 verifica-se que quanto maior for o volume filtrado e maior a concentração dos compostos em solução, maior é a percentagem de recuperação dos fármacos.

Assim, observa-se que para a concentração mais elevada (10 mg/L) a recuperação do analito é sempre muito elevada para ambos os fármacos, próxima de 100 %, e não existem diferenças significativas para os vários volumes de filtrado.

Por outro lado, da comparação entre as percentagens de recuperação obtidas para os diferentes volumes de filtrado no caso da concentração mais baixa de fármaco (2,5 mg/L), verifica-se que com um volume de filtrado de 5mL ainda resultam percentagens de recuperação que são mais baixas do que as obtidas para os restantes volumes testados, sendo essa diferença estatisticamente significativa (conforme verificado por testes de análise de variâncias, ANOVA). No entanto, esta diferença é mais acentuada no caso do ibuprofeno. No caso da carbamazepina, mesmo com diferenças estatisticamente significativas para os volumes maiores (> 15 mL), as percentagens de recuperação para o volume de filtrado mais baixo testado (5 mL) são suficientemente elevadas e próximas de 100 %, o que não justifica a necessidade de utilizar volumes filtrados maiores.

No entanto, no caso do ibuprofeno, como se disse, a recuperação de analito com apenas 5 mL de filtrado é significativamente mais baixa e já existe neste caso vantagem em usar volumes de filtrado maiores. A partir de volumes de filtrado de 10 mL, já não se obtêm percentagens de recuperação que sejam significativamente diferentes das obtidas com volumes de filtrado superiores, exceto no caso do volume de 25 mL, em que existe uma diferença que, embora pequena, é estatisticamente significativa. De qualquer modo, o volume de filtrado de 10 mL parece ser um bom compromisso para obter uma recuperação do analito suficientemente elevada sem necessidade de despende demasiada quantidade de amostra.

Este comportamento que foi observado era expectável, pois à medida que aumenta a quantidade de moléculas em contacto com a membrana polimérica (maiores volumes filtrados ou maiores concentrações da solução a filtrar) os locais de adsorção vão ficando ocupados pelas moléculas adsorvidas, até eventualmente ser atingido um ponto de saturação, a partir do qual a membrana deixa de ter capacidade de reter os compostos.

Atendendo aos resultados obtidos e tendo em atenção que as soluções a utilizar nos ensaios contêm outros dois fármacos para além dos estudados (diclofenaco e naproxeno), para garantir uma elevada percentagem de recuperação de todos os fármacos, para a utilização de cada filtro fez-se um pré-tratamento deste, filtrando um volume mínimo de 10 mL de solução com concentração de 2,5 mg/L de cada um dos fármacos.

Assim, para todos os ensaios os filtros utilizados foram os de PTFE da Labfil pré-tratados conforme descrito acima.

3.2. Estudo da capacidade de remoção da carbamazepina e do ibuprofeno pela cortiça

3.2.1. Caracterização físico-química dos granulados de cortiça expandida

O granulado de cortiça é produzido aquecendo a uma temperatura elevada a cortiça amolecida e cortada em pequenos grânulos. Este aquecimento provoca a expansão da cortiça (aumentando a sua porosidade) e seu escurecimento. A suberina, que é libertada durante o processo, é um adesivo natural que une os grãos em expansão.

Depois de a cortiça sofrer expansão, os grânulos são classificados com base no seu tamanho, qualidade e cor.

Na Tabela 3.3 apresentam-se algumas propriedades físicas e químicas deste material (granulados de cortiça expandida 0,5/3 e 3/5) cuja incorporação na composição da matriz de suporte se pretende estudar. Estas propriedades fornecem informações relevantes sobre a estrutura e comportamento destes materiais que poderão ajudar a avaliar qual a melhor forma de proceder à sua incorporação na composição da matriz de suporte.

Tabela 3.3 - Algumas propriedades físicas ou químicas de caracterização dos granulados de cortiça (n=6). Valores médios $\pm$ desvio padrão

Parâmetros	Cortiça 0,5/3	Cortiça 3/5
Granulometria (mm) (*)	1 a 3	3 a 5
Porosidade (%)	38,1 $\pm$ 2,5	45,1 $\pm$ 1,0
Densidade aparente (kg/m³)	82,6 $\pm$ 2,7	67,3 $\pm$ 2,2
pH	7,31 $\pm$ 0,12	6,70 $\pm$ 0,06

(*) especificações fornecidas pelo fornecedor do material

A porosidade dos materiais é sem dúvida uma propriedade importante, pois uma maior porosidade permite um maior contacto entre a matriz e a água a tratar, o que favorece a ocorrência de muitos dos processos responsáveis pela remoção de poluentes em que a matriz tem um papel importante, direto ou indireto. Uma maior porosidade, permite também uma boa circulação do ar e consequentemente o arejamento da matriz dos LCMs, favorecendo assim a criação de condições aeróbias adequadas na rizosfera para a degradação dos poluentes. Além disso, em sistemas de tratamento que operam em contínuo, a porosidade desempenha um papel fundamental na manutenção de uma boa condutividade hidráulica. A baixa condutividade hidráulica pode gerar efeitos indesejáveis, como a colmatção dos sistemas e a consequente formação de canais preferenciais ou a circulação de água superficial, fatores que limitam o contato dos poluentes com a matriz de suporte e, consequentemente, reduzem a eficiência dos processos de remoção.

Na caracterização dos materiais efetuada neste trabalho determinou-se para o granulado de cortiça expandida 0,5/3 uma porosidade de 38 % e para o granulado de cortiça expandida 3/5 uma porosidade de 45 %. Dado que ambos os materiais têm a mesma composição química, diferindo apenas nas propriedades físicas relacionadas com as diferentes granulometrias, esta propriedade (porosidade) relaciona-se de um modo evidente com a propriedade da densidade, sendo que uma maior porosidade corresponde a um maior volume de vazios e, consequentemente, a uma menor quantidade de material e uma menor densidade. De facto, o granulado de cortiça expandida 0,5/3, com menor porosidade, apresenta uma densidade aparente de 83 kg/m^3 , enquanto o granulado de cortiça expandida 3/5, com maior porosidade, possui uma densidade aparente de apenas 67 kg/m^3 . Em comparação com os materiais argilosos, aos quais se pretende adicionar estes granulados de cortiça expandida, verifica-se que estes são simultaneamente menos densos mas também menos porosos do que os materiais argilosos. Entre os dois tipos de granulometria, o granulado 0,5/3 é o que mais se aproxima dos materiais argilosos em relação à densidade e o granulado 3/5 aproxima-se mais em relação à porosidade.

Uma outra propriedade importante que pode afetar a capacidade de adsorção de compostos aos materiais é o pH do meio, sendo particularmente relevante no caso de poluentes polares. O desenvolvimento da vegetação e da microbiota nos LCMs também é influenciado pelo pH. Esta propriedade está diretamente relacionada com a composição dos materiais da matriz de suporte, a solução em contacto, a presença de plantas e o tipo

de exsudatos libertados na rizosfera, além dos processos de biodegradação que ocorrem no sistema.

Os valores de pH medidos em água em contacto com cada um dos tipos de granulado de cortiça expandida apresentaram valores próximos do meio neutro, o que são condições de ácido-base apropriadas para o desenvolvimento da maior parte da vegetação e da população microbiana. Além do mais, os valores médios obtidos para cada tipo de granulado, tal como esperado, foram bastante próximos um do outro, embora a pequena diferença entre eles seja superior à dispersão das medições em cada caso. Em comparação com os granulados de cortiça, os materiais argilosos estudados anteriormente apresentam valores médios de pH relativamente mais elevados, dada a ligeira alcalinidade desses materiais. Todos estes materiais apresentam características ácido-base que vão do comportamento neutro ao ligeiramente básico, sendo que nenhum destes materiais apresenta características ácidas.

3.2.2. Remoção da carbamazepina e do ibuprofeno pelos granulados de cortiça expandida

Como foi apresentado na secção 2.2.2.2, começou-se por fazer um estudo cinético da remoção dos fármacos carbamazepina e ibuprofeno por granulados de cortiça expandida com duas granulometrias distintas 0,5/3 mm e 3/5 mm, com o propósito de avaliar a influência do tamanho dos grânulos na remoção dos fármacos e certas condições experimentais tais como o tempo de contacto e a concentração inicial dos fármacos. No total foram realizados 6 ensaios, com uma duração de 216 h, que foram conduzidos em modo descontínuo, permitindo uma caracterização mais detalhada do perfil cinético dos processos de adsorção. Embora muitos sistemas reais operem em regime contínuo, o estudo em modo descontínuo é uma etapa essencial para a determinação de parâmetros operacionais, tais como, por exemplo, o tempo de retenção hidráulica, que é mais facilmente obtido com este tipo de abordagem.

Na Figura 3.8 estão apresentadas as cinéticas de remoção do ibuprofeno e da carbamazepina pelas duas granulometrias dos granulados de cortiça expandida para uma concentração de 2,5 mg/L de cada um dos fármacos.

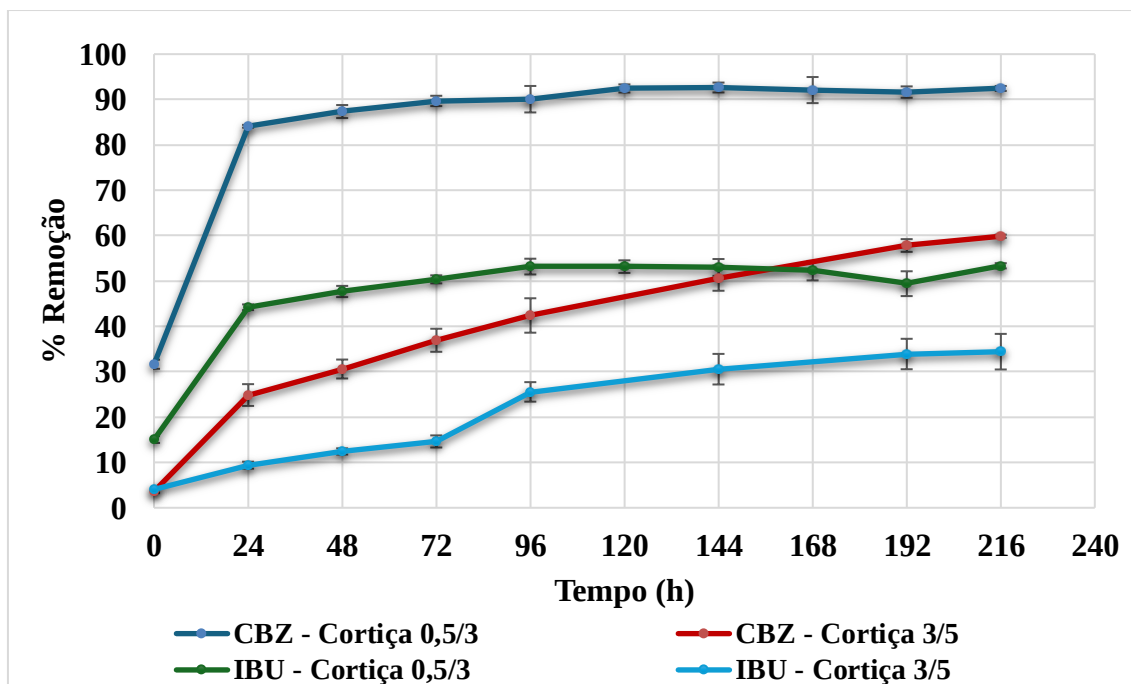


Figura 3.8 - Cinética de remoção pela cortiça 0,5/3 e pela cortiça 3/5 da carbamazepina e do ibuprofeno para uma concentração de 2,5 mg/L

Na Figura 3.9 estão apresentadas as cinéticas de remoção do ibuprofeno e da carbamazepina pelas duas granulometrias dos granulados de cortiça expandida para uma concentração de 5 mg/L de cada um dos fármacos.

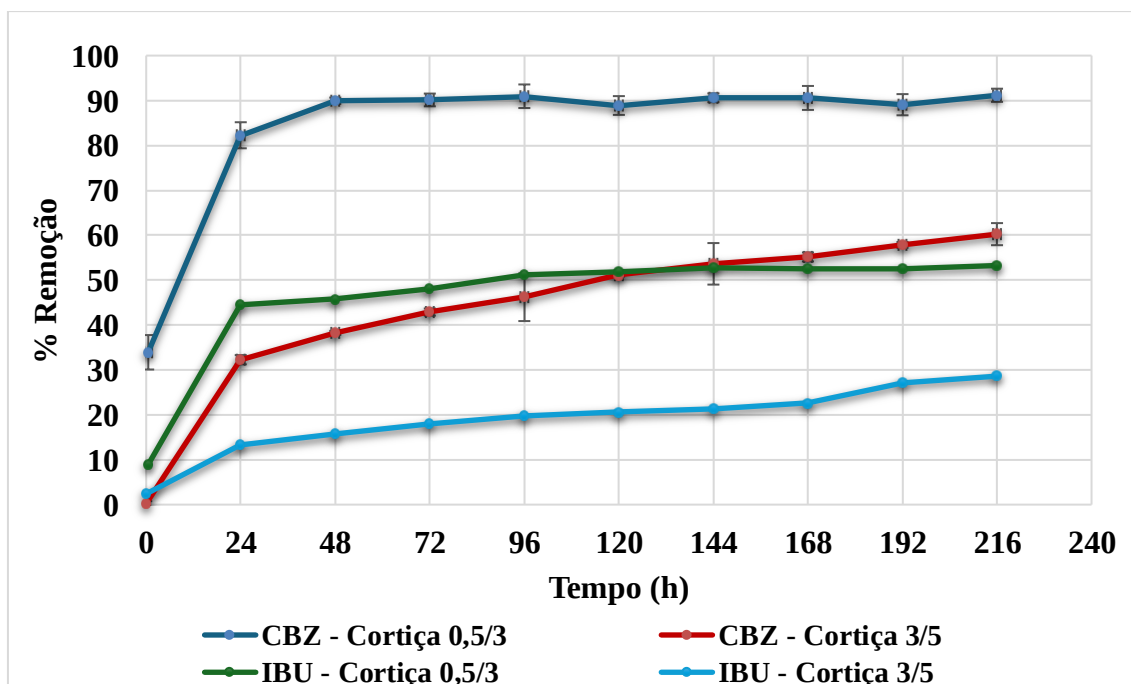


Figura 3.9 - Cinética de remoção pela cortiça 0,5/3 e pela cortiça 3/5 da carbamazepina e do ibuprofeno para uma concentração de 5 mg/L

Durante o período de realização dos ensaios, observou-se um aumento na remoção do ibuprofeno e da carbamazepina para as duas granulometrias de cortiça até o equilíbrio ser atingido, o que ocorreu, na maior parte dos ensaios, entre as 48 e as 96 horas de contato. Constatou-se também que o processo de remoção ocorre para a maior parte dos ensaios em duas etapas. Na primeira etapa, até às 24 horas, o processo de remoção é mais rápido, sendo a maior quantidade dos fármacos removida durante as primeiras horas. Numa etapa posterior continua a remoção em todos os ensaios, contudo com uma cinética mais lenta até se atingir o equilíbrio. No entanto, em certos casos, a remoção ainda decorria quando os ensaios foram terminados, não tendo nestes casos, portanto, sido atingido o equilíbrio durante a realização do ensaio. Durante esta segunda etapa observou-se um comportamento semelhante para a maior parte dos ensaios, embora com variações nas eficiências e nas quantidades removidas.

A remoção adicional mais lenta na segunda fase será devida, principalmente, ao facto de a fase seguinte, que deverá consistir essencialmente da ocorrência de adsorção já na superfície interna dos poros microscópicos, implicar um processo de difusão (que é mais lento) para o interior desses poros. Adicionalmente, nalguns ensaios pode ocorrer também alguma biodegradação dos fármacos por microrganismos, os quais são também processos lentos. Este comportamento observa-se também noutros estudos análogos Carrajola, 2020; Dordio et al., 2017; Machado et al., 2017; Silva, 2023.

De acordo com os gráficos apresentados, é também possível verificar que a percentagem de remoção tanto para a carbamazepina como para o ibuprofeno é maior quando utilizada a cortiça de granulometria 0,5/3. Para uma concentração de 2,5 mg/L (Figura 3.8) a percentagem de remoção máxima da carbamazepina para a granulometria 0,5/3 é de 92,6 % enquanto para a granulometria de 3/5 é de 59,9 %. Esta diferença de valores também é verificada no ibuprofeno, apresentado uma percentagem de remoção máxima de 53,3 % e 34,4 % para as granulometrias 0,5/3 e 3/5, respetivamente.

À semelhança do que acontece para a concentração de 2,5 mg/L, o mesmo é observado para a concentração de 5 mg/L em que as percentagens de remoção são maiores para a granulometria 0,5/3. A carbamazepina apresenta uma percentagem de remoção de 91,2 % para a granulometria 0,5/3 e 60,2 % para a granulometria 3/5. No caso do Ibuprofeno as percentagens de remoção foram de 53,3 % e 28,6 % para as granulometrias 0,5/3 e 3/5, respetivamente. O facto de serem obtidas maiores remoções com os materiais de granulometrias menores era de esperar, dado que para menores granulometrias a área

de contacto entre a solução e o material de cortiça expandida é maior, permitindo que processos como a adsorção, que dependem da área acessível dos materiais, ocorram em maior extensão.

Contudo, não é possível afirmar que os valores apresentados são as percentagens de remoção de fármacos finais, visto que, no caso da cortiça com granulometria 3/5, para ambas as concentrações e em particular nos ensaios com carbamazepina, ao fim de 216 h não parece haver uma estabilização. Esta ocorrência leva-nos a crer que se os ensaios tivessem uma maior duração, no caso da cortiça com granulometria 3/5 as percentagens de remoção dos fármacos seriam maiores.

Posto isto, apesar da granulometria 0,5/3 apresentar os valores de remoção mais elevados ao fim de 216 h, a granulometria escolhida para a continuação da investigação foi a cortiça com granulometria 3/5, pois as dimensões dos grânulos permitem uma melhor incorporação deste material na matriz de suporte que se pretendia melhorar, constituída por vermiculite 3 e LECA 2/4.

Para uma melhor caracterização da capacidade de remoção do material selecionado, nomeadamente o granulado de granulometria 3/5, foram realizados ensaios adicionais com este material, realizados nas mesmas condições dos ensaios anteriores conforme descrito na secção 2.2.2.2, em que se testou uma maior variedade de concentrações dos dois fármacos, dentro da gama de 1,0 a 10 mg/L. Destes ensaios procurou-se extrair uma relação entre as concentrações removidas e as concentrações iniciais dos fármacos estudados.

Assim, na Figura 3.10 é apresentada a relação entre as várias concentrações iniciais de carbamazepina e de ibuprofeno e as respetivas concentrações removidas pela cortiça de granulometria 3/5 após 216 h de contacto.

Ao analisar a Figura 3.10 é possível verificar que existe uma relação aproximadamente linear entre a concentração do fármaco removida e a sua concentração inicial, tanto para a carbamazepina como para o ibuprofeno. Assim, dentro da gama de concentrações testadas, verifica-se que a quantidade de fármaco removida é proporcional à quantidade presente inicialmente. Verifica-se também que a carbamazepina é mais removida (~ 60 % das concentrações iniciais) do que o ibuprofeno (~ 30 % em média) pelos granulados de cortiça 3/5.

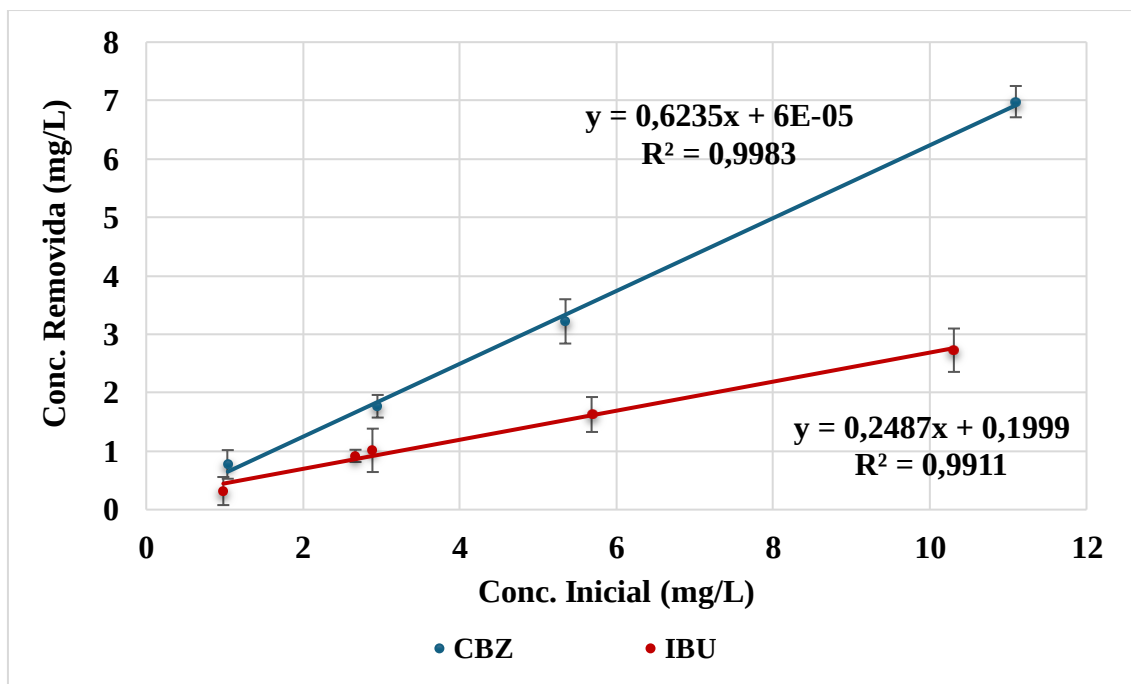


Figura 3.10 - Concentração inicial de fármaco vs a concentração removida pela cortiça de granulometria 3/5 às 216h.

Assim conclui-se que, apesar da remoção não ser total, a incorporação deste material na matriz de suporte pode trazer vantagens para a sua eficiência da matriz, tendo particular relevância para a remoção da carbamazepina, que é normalmente um dos fármacos de mais difícil remoção dada a sua baixa biodegradabilidade. Adicionalmente, sendo um material de origem biológica, poderá apresentar vantagens também como meio de suporte para o desenvolvimento das plantas e microrganismos.

3.3. Otimização da composição da matriz a utilizar nos microcosmos de LCMs

No total foram realizados 3 ensaios, como descrito na secção 2.2.2.3, com o objetivo de selecionar a melhor composição da matriz de suporte a utilizar numa futura montagem de microcosmos de LCMs para a remoção de fármacos. Cada um dos ensaios continha uma estratificação diferente dos três materiais, correspondendo a diferentes proporções entre a quantidade de mistura de LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 3 (1:1;v:v), já utilizada em estudos anteriores, e a camada de granulados de cortiça expandida 3/5 mm. Em todos os ensaios foi avaliada a capacidade de remoção da carbamazepina e do ibuprofeno.

Todos os ensaios foram conduzidos em modo descontínuo, com duração total de 168h e foi utilizada uma solução contendo 2,5 mg/L de cada um dos quatro fármacos, nomeadamente, a carbamazepina, o ibuprofeno, o naproxeno e o diclofenaco.

Na Figura 3.11 estão apresentadas as percentagens de remoção da carbamazepina e do ibuprofeno obtidas nos três ensaios para o tempo de contacto de 168h.

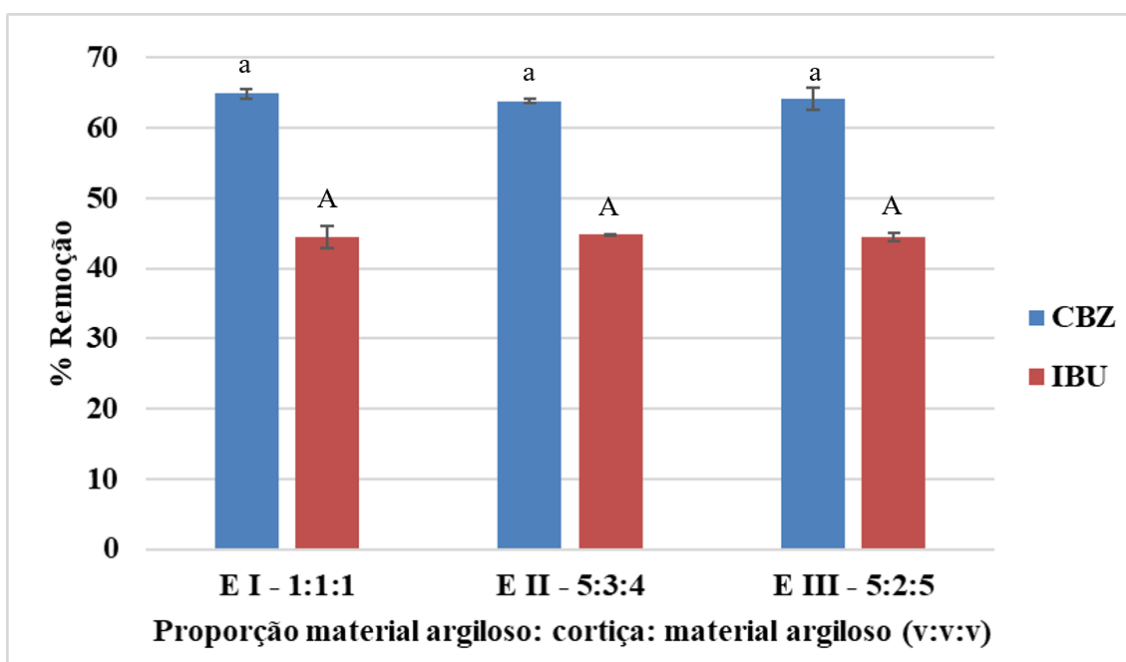


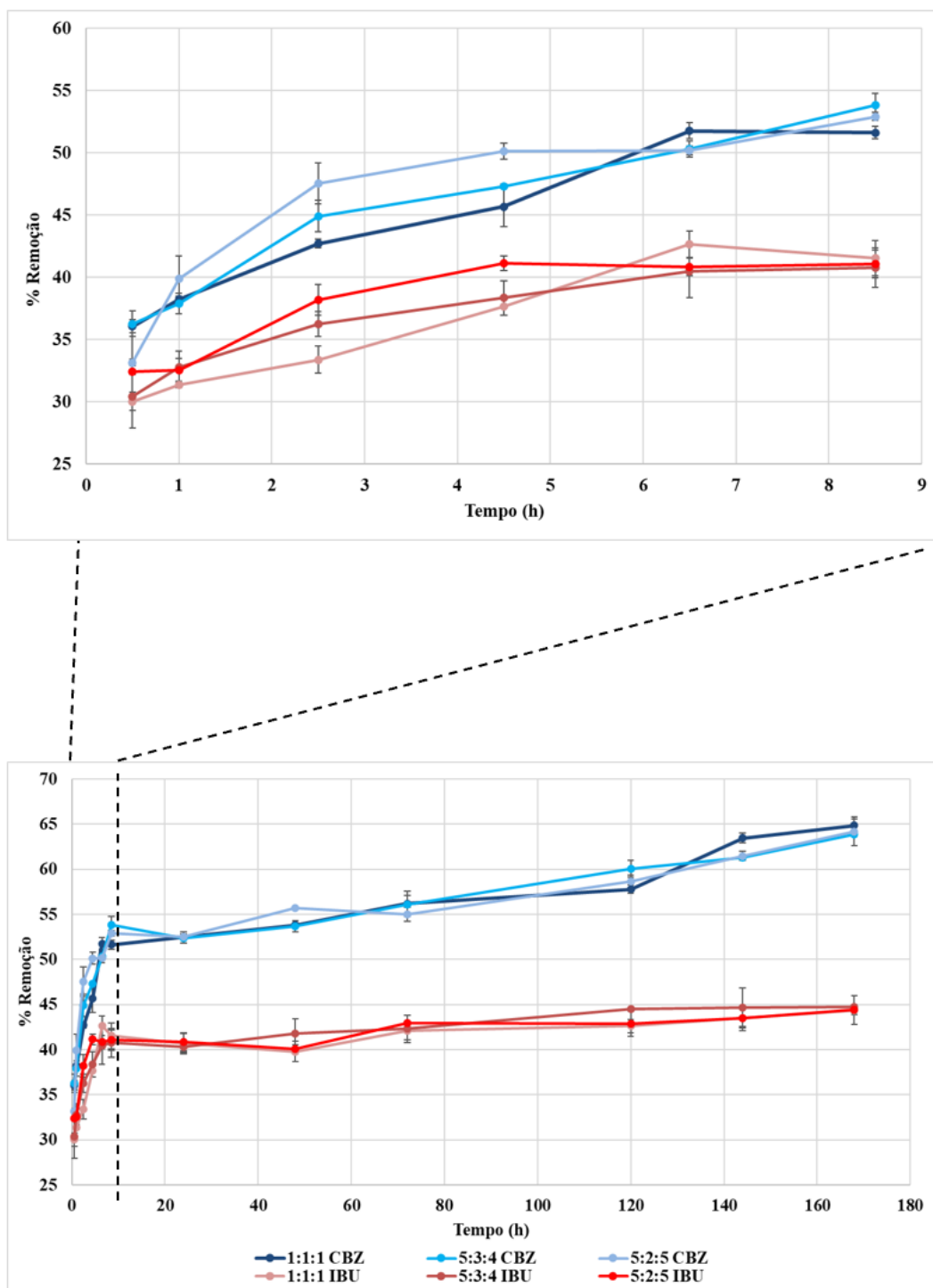
Figura 3.11 - Percentagem de remoção da carbamazepina e do ibuprofeno às 168h. As letras diferentes significam que os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem a comparações entre % R de CBZ para diferentes estratificações. Letras maiúsculas correspondem a comparações entre % R de IBU para diferentes estratificações.

Da análise da Figura 3.11 pode-se verificar que não existem diferenças significativas na remoção da carbamazepina e do ibuprofeno para os diferentes tipos de estratificação estudados. Este facto é inesperado pois, tal como se pode verificar nas Tabela 3.4 e Tabela 3.5, as capacidades de remoção dos fármacos pelos vários materiais é diferente e, portanto, seriam de esperar diferentes remoções pelos vários ensaios dado que as proporções dos materiais também diferem. No entanto, essas diferenças não se puderam observar, o que, eventualmente, poderá ter sido devido a uma incorreta estratégia de amostragem, que não tenha sido capaz de capturar a heterogeneidade da composição da matriz, apesar dos esforços em tentar fazer uma colheita composta representativa do líquido em contacto com as diversas frações da matriz estratificada.

No caso da carbamazepina a percentagem de remoção no Ensaio I foi de 64,9% e para os Ensaio II e III foi de 63,9% e 64,2%, respetivamente. Para o ibuprofeno as percentagens de remoção ao fim das 168h para os Ensaio I, II e III foram, respetivamente, 44,4%, 44,8% e 44,4%. Apesar das percentagens de remoção para cada fármaco serem semelhantes entre as estratificações testadas é possível observar que a carbamazepina é o fármaco com uma maior percentagem de remoção.

Na Figura 3.12 é apresentado o perfil cinético da remoção de ambos os fármacos, a carbamazepina e o ibuprofeno, para as diferentes estratificações.

Da análise da figura verifica-se que, em todos os ensaios, a remoção dos dois fármacos ocorre em duas etapas, uma mais rápida que ocorre durante as primeiras 8,5 h, seguida de uma segunda etapa em que a remoção dos fármacos continua a ocorrer, mas de forma mais lenta até ser atingido o equilíbrio. No Ensaio I o equilíbrio foi atingido ao fim de 120 h (42,6 %) para o ibuprofeno enquanto para a carbamazepina, ao fim das 168 h o equilíbrio parece ainda não ter sido atingido (64,9 %), o que indica que se o ensaio não tivesse sido interrompido às 168 h a percentagem de remoção da carbamazepina provavelmente continuaria a aumentar. Nos ensaios II e III este comportamento cinético da carbamazepina e do ibuprofeno também ocorre. A carbamazepina não atinge o equilíbrio para nenhuma das estratificações estudadas ao fim das 168 h (E II – 63,8 %; E III – 64,2 %) enquanto o ibuprofeno atingiu o equilíbrio ao fim de cerca de 120 h de contacto para o ensaio II (44,5 %) e ao fim de 144 h para o ensaio III (43,5 %). Tal como já foi referido na secção 2.2.2.3, estas duas etapas com diferentes cinéticas deverão corresponder a diferentes formas de adsorção do fármaco à matriz: inicialmente ocorrerá uma adsorção à superfície externa, imediatamente acessível, que ocorre rapidamente; posteriormente, num processo mais lento determinado pela velocidade de difusão, poderá ocorrer principalmente a transferência dos fármacos para o interior das porosidades internas dos materiais e a adsorção a essas superfícies menos acessíveis.



granulometria 3/5 e nas três estratificações estudadas. Nas Tabela 3.4 e Tabela 3.5 estão apresentados esses valores.

Tabela 3.4 – Comparação da % remoção da carbamazepina em 5 situações diferentes (mistura LECA + Vermiculite; cortiça 3/5; 3 estratificações)

[CBZ] (mg/L)	Tempo (h)	% Remoção de fármaco				
		LECA + Vermiculite ^a	Cortiça 3/5	E I – 1:1:1	E II – 5:3:4	E III – 5:2:5
2,5 mg/L	0,5	55,73	3,62	36,06	36,27	33,16
	1	-	-	38,23	37,90	39,89
	2,5	63,60	-	42,72	44,93	47,54
	4,5	67,72	-	45,69	47,31	50,14
	6,5	70,12	-	51,77	50,31	50,19
	8,5	73,34	-	51,62	53,82	52,91
	24	76,24	24,85	52,44	52,34	52,49
	48	79,33	30,59	53,83	53,68	55,69
	72	80,82	36,93	56,17	56,07	55,03
	120	81,38	-	57,80	60,03	58,63
	144	80,30	50,63	63,47	61,33	61,46
	168	81,45	-	64,87	63,86	64,20

a) (Silva, 2023)

Tabela 3.5 - Comparação da % Remoção de ibuprofeno em 5 situações diferentes (mistura LECA + Vermiculite; cortiça 3/5; 3 estratificações)

[IBU] (mg/L)	Tempo (h)	% Remoção de fármaco				
		LECA + Vermiculite ^a	Cortiça 3/5	E I – 1:1:1	E II – 5:3:4	E III – 5:2:5
2,5 mg/L	0,5	42,31	4,05	30,05	30,40	32,41
	1	-	-	31,39	32,79	32,52
	2,5	52,18	-	33,40	36,28	38,21
	4,5	54,92	-	37,67	38,37	41,14
	6,5	58,71	-	42,64	40,50	40,85
	8,5	64,34	-	41,54	40,76	41,06
	24	69,85	9,40	40,70	40,30	40,84
	48	75,36	12,43	39,78	41,79	40,04
	72	78,36	14,62	42,11	42,30	42,92
	120	81,36	-	42,61	44,48	42,87
	144	82,73	30,55	43,48	44,64	43,53
	168	83,89	-	44,39	44,78	44,44

a) (Silva, 2023)

Como é possível observar, existem diferenças consideráveis entre os valores de percentagem de remoção da carbamazepina na mistura LECA + Vermiculite e nos granulados de cortiça 3/5. Apesar de não haver registos dos valores de percentagem de

remoção nos granulados de cortiça 3/5 em alguns dos tempo, naqueles em que existe registro é possível observar que entre as 24 e 72 h e às 144 h os valores de remoção da mistura LECA + Vermiculite são superiores aos da cortiça 3/5. À semelhança do que acontece com a carbamazepina, o mesmo se observa na remoção do ibuprofeno (Tabela 3.5), sendo os valores de remoção deste fármaco na mistura LECA + Vermiculite muito superiores aos valores da sua remoção pelo granulado de cortiça 3/5.

Ao comparar os valores de remoção da mistura LECA+ Vermiculite dos dois fármacos (carbamazepina e ibuprofeno) com as 3 estratificações estudadas verifica-se uma diminuição de percentagem de remoção dos fármacos quando se adiciona a cortiça à matriz independentemente da proporção.

Conforme foi referido anteriormente, os valores de percentagem de remoção entre as três estratificações são semelhantes entre si. Estas semelhanças de valores de remoção entre os ensaios não permite escolher a composição da matriz de suporte com base na sua capacidade de remoção. Assim, sendo os resultados desta parte do estudo inconclusivos, e colocando-se a hipótese de tal se dever a deficiências no procedimento de amostragem utilizado, sente-se a necessidade de no futuro repetir a realização destes ensaios, tentando melhorar os aspetos de execução do trabalho, em especial a amostragem, para obter suficientes dados de qualidade que permitam tomar as decisões de modo mais esclarecido.

Além disso, dado a adição do granulado de cortiça ter resultado numa diminuição das quantidades de fármacos removidos, pode-se pensar que a adição da cortiça na matriz não influencia positivamente a remoção dos fármacos. No entanto, a sua capacidade de remoção e a sua composição não são os únicos aspetos que se deve ter em conta ao escolher a composição da matriz de suporte. Perante todos os papéis que a matriz de suporte desempenha, além de um papel mais ativo de retenção dos poluentes por adsorção, esta também deve promover o desenvolvimento da vegetação e da população microbiana, melhorar as condições do meio (arejamento, nutrientes, etc.) e o funcionamento do sistema.

3.4. Caracterização da curva de crescimento da bactéria

Como referido na secção 2.2.3, foi realizada a caracterização da curva de crescimento do microrganismo utilizado, o *Bacillus subtilis* QST 713, isolado a partir de

uma suspensão comercial. Como parâmetro de medida foi utilizada a densidade ótica a 600 nm ($D.O._{600nm}$) ao longo do tempo (0 – 48 horas). Na Figura 3.13 estão apresentadas três réplicas da curva de crescimento da bactéria, em descontínuo, em meio líquido e na presença de glucose.

Para todas as réplicas da curva de crescimento da bactéria, o período de adaptação da cultura ocorreu durante as primeiras 2 horas, o que corresponde à fase de latência (fase *lag*). Este período de adaptação corresponde à fase inicial de crescimento em que as células estão ainda a adaptar-se às novas condições ambientais impostas (temperatura, pH, meio de cultura, disponibilidade de O_2 , etc.) preparando-se para um crescimento exponencial. Nesta fase ocorre também a ativação da síntese de novas proteínas, enzimas e outras moléculas para que as células se adaptem às fontes de nutrientes disponíveis e à composição do meio de cultura. Existem vários fatores que podem influenciar a duração da fase de latência, entre as quais a composição do meio de cultura, a quantidade de nutrientes disponíveis e a condição inicial das células, como o seu estado de repouso ou crescimento prévio.

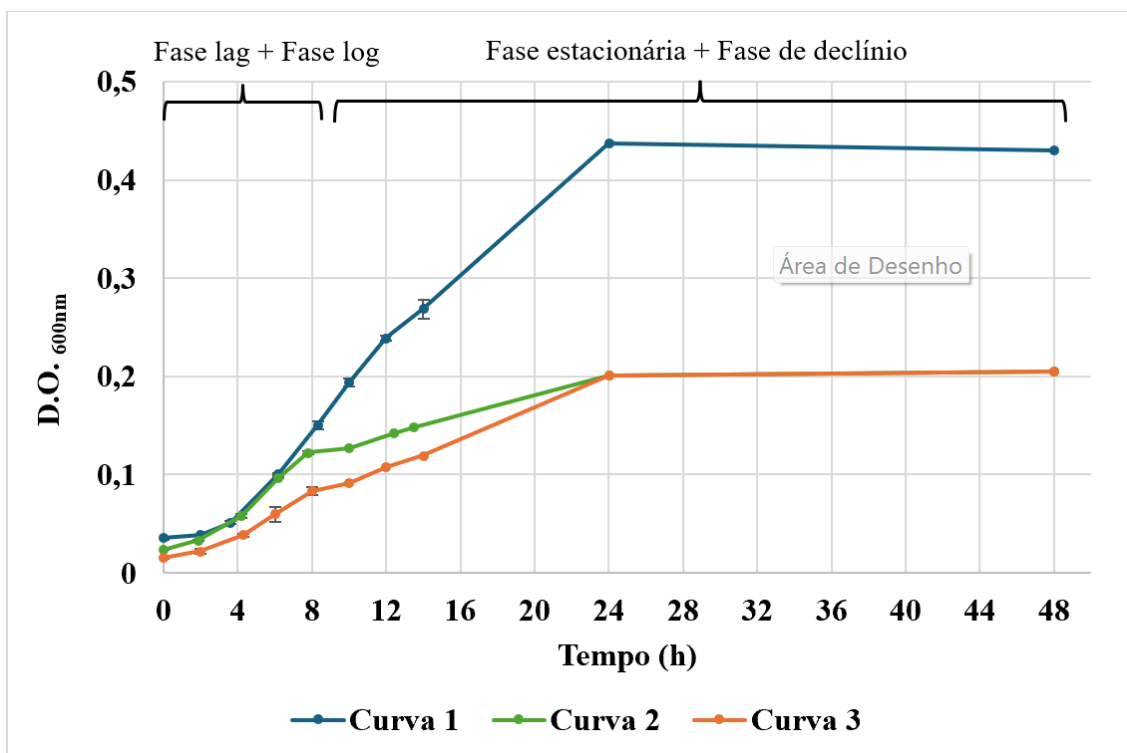


Figura 3.13 - Curvas de crescimento celular do *Bacillus* em meio líquido na presença de glucose

Após o período de adaptação das células, a bactéria entra na fase exponencial de crescimento (fase log), em que ocorre um aumento exponencial do número de células. Para todas as curvas de crescimentos representadas na Figura 3.13, esta fase exponencial teve uma duração de cerca de 6 h, com início a partir das 2 h e o fim, aproximadamente, às 8 h. Durante este período, as bactérias dividem-se a uma velocidade específica de crescimento que é máxima e constante. Esta velocidade de divisão é dependente das condições ótimas de cada organismo, como temperatura, pH, fatores nutricionais e composição do meio.

De seguida, o crescimento entra na fase estacionária, em que aumento do número de células deixa de ser exponencial. Nesta fase, o crescimento exponencial termina e o número de células resultantes da divisão é aproximadamente igual ao número de células que morre. Esta fase teve uma duração de cerca de 16 h (8 h – 24 h).

Na Figura 3.14 estão apresentadas três réplicas da curva de crescimento da bactéria, em descontínuo, em meio líquido e na ausência de glucose. À semelhança da Figura 3.13, como parâmetro de medida também foi utilizada a D.O. ao longo do tempo (0 – 48 horas).

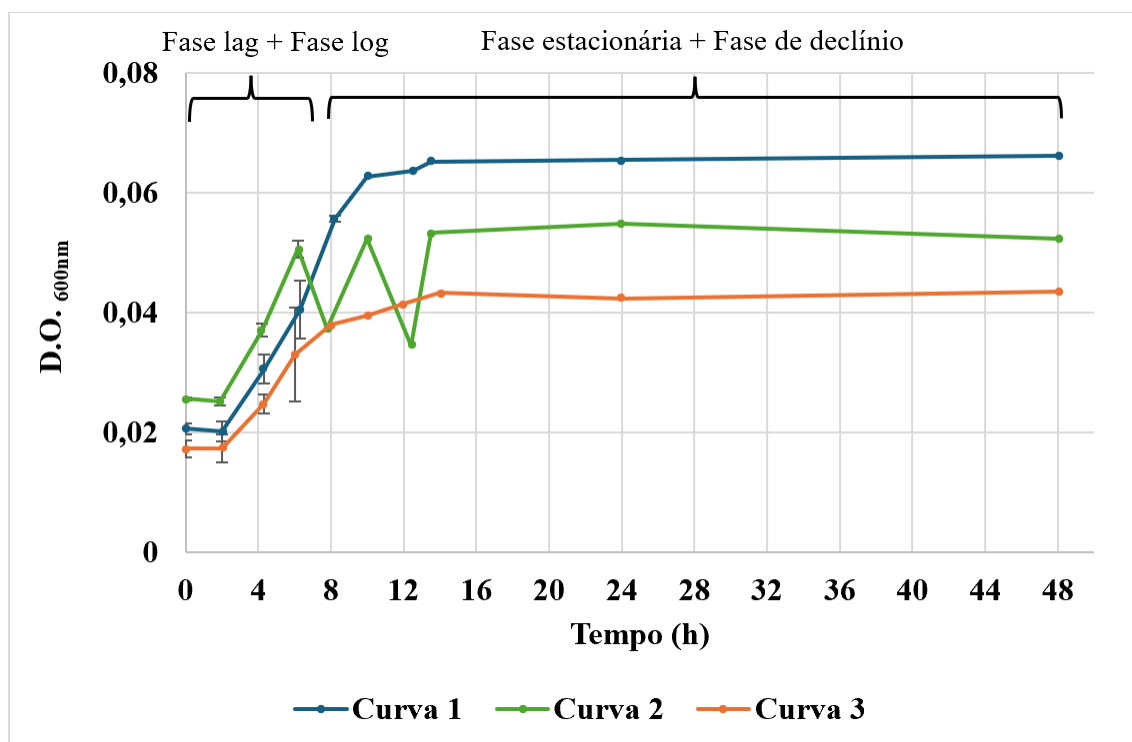


Figura 3.14 - Curvas de crescimento celular do *Bacillus* em meio líquido na ausência de glucose

À semelhança do que acontece com o crescimento da bactéria na presença de glucose, em que a bactéria carece de um período de adaptação às condições do meio durante as primeiras 2 horas, o mesmo se observa na ausência de glucose em todas as curvas de crescimento (Figura 3.14). Após este período de adaptação, a bactéria entrou na fase de crescimento exponencial que teve uma duração de cerca de 4h (2h – 6h), para as curvas de crescimento 2 e 3 enquanto na curva 1 se observou uma fase log um pouco mais longa de aproximadamente 6h (2h – 8h).

Após as 6 h (curvas 2 e 3) ou as 8h (curva 1) os valores de D.O. deixam de aumentar exponencialmente, havendo apenas um pequeno aumento destes valores entre as 6 h e as 14h (curva 3) e entre as 8 h e as 14 h (curva 1), período que corresponde à fase estacionária de crescimento. Nesta fase a curva de crescimento 2 demonstra um comportamento anormal uma vez que os valores de absorvência sofreram oscilações ao longo deste período. Este comportamento poderá ser devido à aglomeração de colónias de microrganismos e à sua deposição no Erlenmeyer ou até mesmo na célula espectrofotométrica. Posteriormente, tem início a fase de declínio, o que corresponde à morte celular (14 h – 48 h).

Com a comparação das curvas de crescimento celular do *Bacillus* na presença e na ausência de glucose (Figura 3.13 e Figura 3.14, respetivamente), é possível verificar que a fase *lag* e a fase log de ambas as curvas tiveram aproximadamente a mesma duração, de 2h e 6h, respetivamente. A diferença entre as curvas reside na duração das fases estacionárias e de declínio, em que na curva de crescimento do *Bacillus* no meio com glucose a fase estacionária teve uma duração de 16 h, enquanto na curva de crescimento da bactéria no meio sem glucose a fase estacionária teve apenas uma duração de 6 h ou 8h, atingindo mais cedo o pico de crescimento das células e a morte celular.

Outra diferença entre as curvas que é possível observar é que na presença de glucose, no final da fase exponencial obteve-se um valor de DO_{600nm} mais elevado do que na ausência de glucose. Isto indica que o *Bacillus* cresce mais na presença de glucose, tal como seria de esperar. O mesmo também é visível com a observação do aspeto das duas culturas (Figura 3.15).

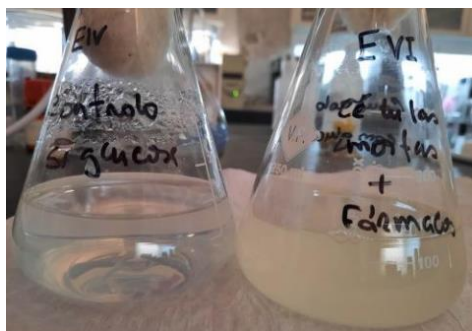


Figura 3.15 - Aspeto visual do *Bacillus* em meio líquido na ausência e na presença de glucose

Ao comparar os dados obtidos através do ensaio onde a cultura de *Bacillus* se desenvolveu na presença de glucose com dados relatados na literatura (Sahoo et al., 2016) observaram-se algumas diferenças. A duração da fase *lag* para qualquer uma das réplicas da curva de crescimento do ensaio foi de 2 horas. No entanto, a duração da fase *lag* descrita na literatura (Sahoo et al., 2016) foi relativamente superior, cerca de 5h. Esta diferença de duração permite-nos concluir que as condições utilizadas neste estudo, isto é, a composição do meio, a temperatura e a preparação do inóculo, são adequadas para o crescimento desta bactéria, visto que o seu período de adaptação foi inferior ao do reportado na literatura.

Em relação à fase log da curva de crescimento, para todas as curvas de crescimento apresentadas neste estudo, esta fase teve uma duração de cerca de 6 h. Na literatura (Sahoo et al., 2016) é descrito que esta fase teve uma duração de apenas 5 h. Apesar da diferença ser pequena, sugere que o meio de cultura continha uma maior disponibilidade de nutrientes para as células.

Ao contrário do estudo apresentado na literatura (Sahoo et al., 2016), em que o ensaio teve apenas uma duração de 12 horas, este estudo teve uma duração de 48 h e, por isso, apenas é possível fazer a comparação entre os dois estudos até às 12 h. A fase estacionária reportada na literatura começou logo ao fim de 10 h e permaneceu durante o restante ensaio. Contudo, neste estudo a fase estacionária para todas as curvas de crescimento iniciou-se ao fim de 8 h e permaneceu até às 24 h, altura em que lhe sucedeu a fase de morte celular.

3.5. Determinação dos parâmetros cinéticos do crescimento da bactéria *Bacillus*

A caracterização da cinética do crescimento dos microrganismos é de grande utilidade, uma vez que permite realizar comparações entre variadas condições de crescimento bem como identificar as condições ótimas para o desenvolvimento do microrganismo (como pH, temperatura, composição do meio, presença de substâncias tóxicas ou inibidoras, concentração de oxigénio dissolvido, entre outras).

A velocidade específica máxima do crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e o tempo de geração (g) são dois parâmetros cinéticos do crescimento de uma população microbiana importantes na avaliação dos efeitos de diferentes condições ambientais sobre o crescimento dos microrganismos.

Relativamente à velocidade específica de crescimento, esta é máxima e constante na fase log e pode ser calculada de acordo com a seguinte expressão:

$$\ln x = \ln x_i + \mu_{\text{max}}(t - t_i) \quad (1)$$

em que x é a D.O. no tempo t e x_i é a D.O. no tempo t_i .

Para determinar a taxa específica de crescimento, recorreu-se a uma regressão linear da reta que melhor se ajusta aos gráfico $\ln$ (D.O.) em função do tempo. O intervalo de tempo selecionado para esta análise correspondeu ao período em que o crescimento celular estava na fase exponencial. A partir do declive da reta obtida por meio da regressão linear, o valor de μ é determinado.

Com o conhecimento do valor de μ é possível calcular o tempo de geração através da seguinte expressão:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

em que g é o tempo de geração.

O número de gerações obtém-se através da divisão do número de horas em que a fase log ocorre pelo tempo de geração. Esta relação oferece informações importantes sobre a taxa de crescimento celular durante a fase exponencial e permite uma melhor compreensão acerca do comportamento e da dinâmica da população microbiana em estudo.

O conhecimento da duração da fase exponencial e do tempo de geração permite calcular o número de gerações, tal como se disse, através da seguinte expressão:

$$n = \frac{t \text{ (fase log)}}{g} \quad (3)$$

em que t é o tempo de duração da fase log e g é o tempo de geração.

Na Tabela 3.6 estão apresentados os parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de *Bacillus*, bem como as suas médias e desvios padrão.

Para o meio sem glucose, os parâmetros cinéticos das curva de crescimento foram calculadas da mesma maneira através da seguinte regressão linear e estão apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.6 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de *Bacillus* na presença de glucose

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP
Fase log (h)	2 – 8	1,9 – 7,8	2 – 8	5,9	-
Equação da reta	y = 0,2218x – 3,7196	y = 2265x – 3,8103	y = 0,2263x – 4,2426	-	-
R²	0,9947	0,9907	0,9917	-	-
μ_{máx} (h⁻¹)	0,222	0,227	0,226	0,225	0,0033
g (h)	3,12	3,06	3,06	3,08	0,0455
Nº gerações	1,92	1,93	1,96	1,94	0,0055

Tabela 3.7 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de *Bacillus* na ausência de glucose

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP
Fase log (h)	2 – 8	1,9 – 6,4	2 – 6	4,8	-
Equação da reta	y = 0,1618x – 4,2137	y = 0,1625x – 3,9875	y = 0,1614x – 4,385	-	-
R²	0,998	0,9995	0,9994	-	-
μ_{máx} (h⁻¹)	0,162	0,162	0,161	0,162	0,0005
g (h)	4,28	4,27	4,29	4,28	0,0140
Nº gerações	1,40	1,01	0,93	1,09	0,2518

Ao comparar as médias dos parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da *Bacillus* para ambos os casos (presença e ausência de glucose) é possível verificar, como era esperado, que o crescimento da bactéria ocorre mais rapidamente na presença de glucose, que serve como fonte de carbono e energia.

A seguinte tabela (Tabela 3.8) contém os valores médios obtidos neste estudo e valores publicados na literatura (Stojanović et al., 2020), sendo possível compará-los.

Tabela 3.8 – Parâmetros cinéticos obtidos no estudo realizado e na literatura

Estudo (média)			Literatura (Stojanović et al., 2020)			
Meio de cultura	s/glucose	c/glucose 1 g/L	s/glucose	c/glucose 5 g/L	c/glucose 10 g/L	c/glucose 15 g/L
μ (h ⁻¹)	0,162	0,225	0,26	0,329	0,282	0,321
g (h)	4,28	3,08	2,67	2,1	2,46	2,16
Nº gerações	1,09	1,94	-	-	-	-

Ao fazer a comparação entre os parâmetros cinéticos obtidos nos ensaios e os encontrados na literatura, um aspeto a ter em consideração é o facto de a concentração de glucose utilizada nos ensaios ter sido de apenas 1 g/L enquanto na literatura as concentrações testadas foram superiores (5 g/L, 10 g/L e 15 g/L). No entanto, os valores são da mesma ordem de grandeza, apesar do valor da taxa específica de crescimento do *Bacillus* no meio de cultura com glucose ser compreensivelmente inferior aos valores apresentados na literatura para qualquer uma das concentrações de glucose. Sendo a glucose uma fonte de energia e carbono para as bactérias é natural a taxa específica de crescimento ser maior quando há glucose em maior abundância.

À semelhança do que acontece no meio de cultura com glucose, o mesmo ocorre no meio de cultura sem glucose em que o valor da taxa específica de crescimento da cultura nos ensaios apesar de ser da mesma ordem de grandeza também é inferior ao valor apresentado na literatura, o que poderá estar relacionado com as condições de crescimento do microrganismo.

Relativamente aos tempos de geração, também na mesma ordem de grandeza, os valores obtidos foram logicamente superiores aos apresentados na literatura para ambos os meios de cultura com e sem glucose.

3.6. Estudo da capacidade de degradação da carbamazepina e do ibuprofeno pela bactéria *Bacillus*

Para avaliar a capacidade da cultura de *Bacillus* para degradar/remover os fármacos carbamazepina e ibuprofeno e estudar o efeito causado na curva de crescimento da bactéria devido à presença dos mesmos no meio de cultura, foram realizados 3 ensaios diferentes como descrito na secção 2.2.3.4 da metodologia experimental. O meio de cultura de dois dos ensaios foi dopado com apenas um dos fármacos (carbamazepina ou ibuprofeno) com uma concentração de 2 mg/L e 20 mg/L, respetivamente. No terceiro ensaio o meio de cultura foi dopado com uma mistura de quatro fármacos (carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno) com uma concentração inicial de 2 mg/L e 5 mg/L para cada um dos fármacos.

Como apresentado no esquema da secção 2.2.3.4, foram utilizados vários Erlenmeyers em cada um dos ensaios e todos os estudos foram realizados em meio líquido, em descontínuo, com uma agitação orbital de 200 rpm e a uma temperatura constante de 30°C.

Foram recolhidas amostras de cultura de 2 em 2 horas durante cerca de 13 h e depois uma última amostra foi recolhida às 24 h. Para todas as amostras recolhidas foi determinado o valor da DO_{600nm} e, no caso das amostras com fármacos, também se determinou as concentrações dos mesmos em solução por HPLC/UV-Vis.

3.6.1. Avaliação do efeito da exposição aos fármacos no crescimento da cultura de *Bacillus*

De modo a avaliar o efeito que a presença no meio de cultura dos fármacos em estudo tem no desenvolvimento da cultura da bactéria foram analisadas as curvas de crescimento da bactéria e os parâmetros cinéticos das culturas dos Erlenmeyers I, II, III e IV (I – Células + MC + glucose + fármaco; II – Células + MC + fármaco; III – Células + MC + glucose e IV – Células + MC, conforme o esquema da secção 2.2.3.4 da metodologia experimental).

Na Figura 3.16 estão apresentadas as curvas de crescimento da bactéria *Bacillus* no ensaio em que o meio de cultura foi dopado com carbamazepina com uma concentração

de 2 mg/L. No caso da carbamazepina não foi possível realizar os ensaios com uma concentração de 20 mg/L deste fármaco devido à baixa solubilidade deste composto em água.

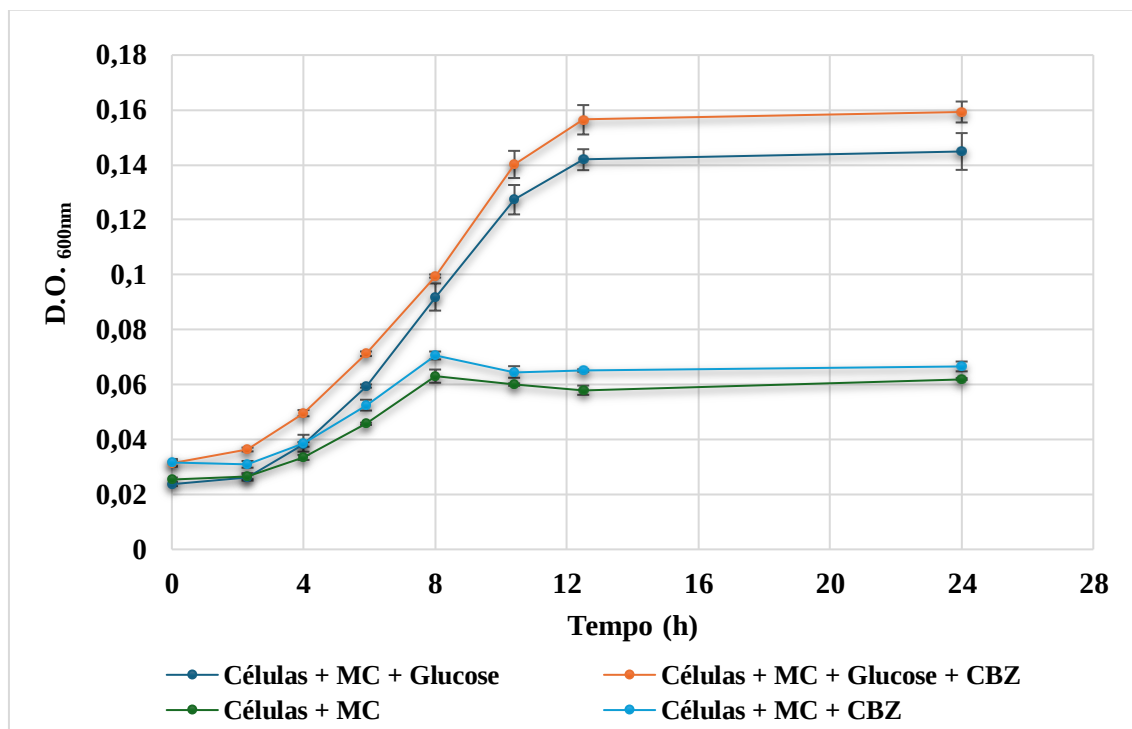


Figura 3.16 - Curvas de crescimento da *Bacillus* para as várias condições do ensaio com uma concentração de carbamazepina de 2 mg/L

Neste ensaio a duração da fase de latência (fase *lag*) foi semelhante em todas as condições de crescimento nos diferentes Erlenmeyers, tendo uma duração de cerca de 2 horas. Este tempo de duração da fase *lag* foi também semelhante ao obtido no ensaio de caracterização da curva de crescimento (secção 3.4).

Relativamente à duração da fase exponencial (fase *log*) também foi semelhante nos diferentes Erlenmeyers correspondentes às diferentes condições de crescimento do *Bacillus*. De facto, quer nos Erlenmeyers em que a cultura de *Bacillus* cresceu com glucose e com carbamazepina, quer nos Erlenmeyers em que a cultura de *Bacillus* cresceu sem glucose e sem carbamazepina, a duração da fase *log* foi cerca de 6 horas. A duração desta fase neste estudo foi igualmente semelhante à obtida no estudo da caracterização da curva de crescimento na ausência de fármacos (secção 3.4).

Apesar da duração da fase exponencial ser semelhante para todos os casos, ao comparar as curvas de crescimento da cultura no meio com carbamazepina na presença e na ausência de glucose é possível verificar que, dado que as DO_{600nm} iniciais nos vários Erlenmeyers são semelhantes, o crescimento do *Bacillus* é maior na presença de glucose, uma vez que no final da fase log o valor de DO_{600nm} é mais elevado. Estes dados indicam que não parece haver efeito tóxico ou inibitório associado à presença deste fármaco no meio de cultura para a concentração testada de 2 mg/L.

A duração da fase estacionária de crescimento para os microrganismos que cresceram na presença de glucose foi de cerca de 5 h (das 8 h às 13 h) quer na presença de CBZ quer na sua ausência. A partir das 13 h de crescimento, os valores da DO_{600nm} mantêm-se aproximadamente constantes. No entanto, tal como se pode observar na Figura 3.16, a duração da fase estacionária do crescimento do *Bacillus* na ausência de glucose parece ser inferior a 2 h (entre as 8 h e as 10 h) não se verificando depois disso variações apreciáveis dos valores da DO_{600nm} .

Na Tabela 3.9 estão apresentados os valores dos parâmetros cinéticos alusivos ao ensaio do crescimento da cultura na presença de carbamazepina (2 mg/L).

Tabela 3.9 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de *Bacillus* para as diferentes condições do ensaio com carbamazepina (2 mg/L)

	EI: Células + MC + Glucose + CBZ	EII: Células + MC + CBZ	EIII: Células + MC + Glucose	EIV: Células + MC
Fase log (h)	2,3 – 8	2,3 – 8	2,3 – 8	2,3 – 8
Equação da reta	$y = 0,1777x - 3,7142$	$y = 0,1464x - 3,8205$	$y = 0,2214x - 4,1473$	$y = 0,1525x - 3,9877$
R²	0,9985	0,9987	0,9994	0,9987
$\mu_{\max}$ (h⁻¹)	0,178	0,146	0,221	0,153
g (h)	3,90	4,73	3,13	4,54
Nº gerações	1,46	1,20	1,82	1,25

Os valores da taxa específica de crescimento das culturas que cresceram sem glucose, tanto na presença da carbamazepina (EII) como na sua ausência (EIV), são muito próximos um do outro (0,146 h⁻¹ e 0,153 h⁻¹, respetivamente). No entanto, o valor é ligeiramente inferior no Erlenmeyer em que o meio de cultura contém carbamazepina. As

culturas que cresceram na presença de glucose (EI e EIII) apresentaram valores da taxa específica de crescimento superiores. No caso do Erlenmeyer sem carbamazepina o valor de μ foi de $0,221 \text{ h}^{-1}$ enquanto no Erlenmeyer com carbamazepina o valor de μ foi ligeiramente inferior, de $0,178 \text{ h}^{-1}$. Apesar do valor da taxa específica de crescimento ser inferior nos Erlenmeyers que contêm o fármaco, estes valores são da mesma ordem de grandeza e por isso essas diferenças não são suficientemente elevadas para indicar que a presença da carbamazepina no meio influencia de forma pronunciadamente negativa o crescimento da bactéria.

Relativamente ao ibuprofeno, as curvas de crescimento do *Bacillus* nos ensaios em que o meio de cultura foi dopado com este fármaco com uma concentração de 2 mg/L são apresentadas na Figura 3.17.

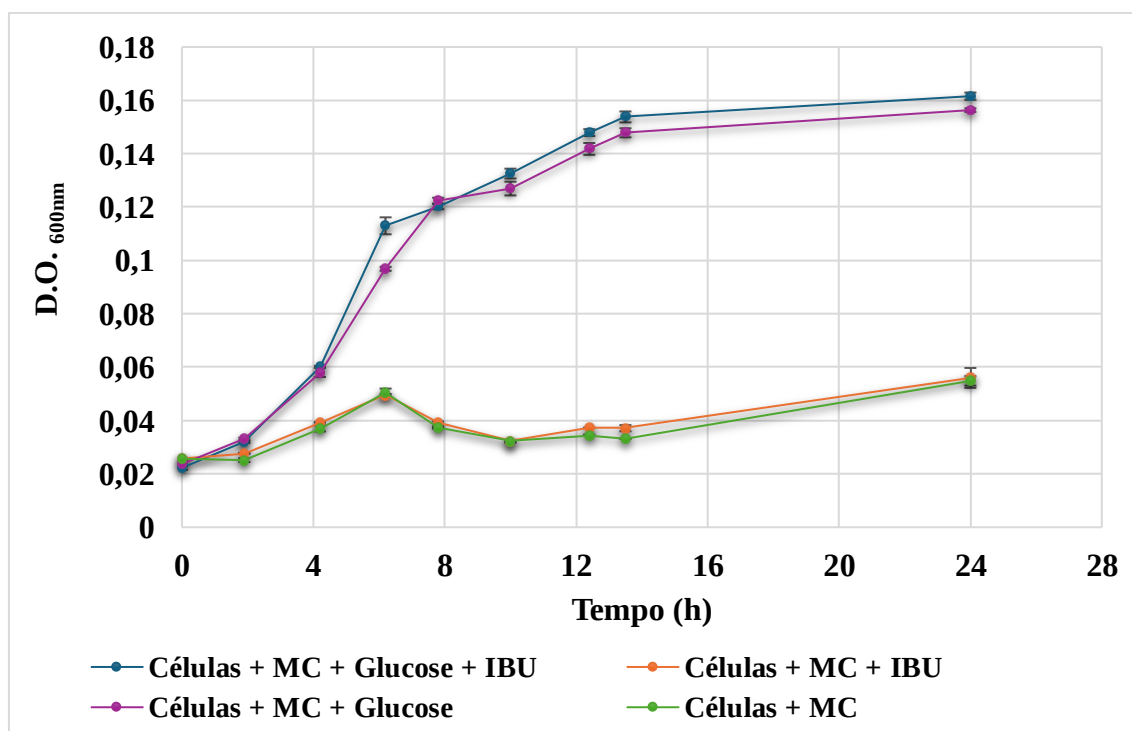


Figura 3.17 - Curvas de crescimento do *Bacillus* para as várias condições do ensaio com uma concentração de ibuprofeno de 2 mg/L

Neste ensaio a duração da fase *lag* das curvas de crescimento das culturas foi semelhante em todas as condições de crescimento utilizadas nos diferentes Erlenmeyers, tendo também uma duração de cerca de 2 horas. O mesmo já se tinha verificado no ensaio com a carbamazepina, o que indica que a fase *lag* do *Bacillus* não sofre alteração na presença de qualquer um dos fármacos estudados (carbamazepina e ibuprofeno).

Em relação à duração da fase log observaram-se variações entre os diversos Erlenmeyers. Para os Erlenmeyers em que a cultura de *Bacillus* cresceu com glucose, a duração da fase log foi cerca de 6 horas tanto para o meio de cultura em que o ibuprofeno se encontrava presente como para o meio de cultura em que o ibuprofeno estava ausente. Nos Erlenmeyers em que a cultura de *Bacillus* cresceu sem glucose, a duração da fase log foi de 4,5 h. Assim, verifica-se que a duração da fase log foi maior nas culturas que cresceram na presença de glucose.

No que diz respeito à duração da fase estacionária de crescimento para os microrganismos que cresceram na presença de glucose foi de cerca de 5 h (das 8 h às 13 h) quer na presença de ibuprofeno quer na sua ausência. A partir das 13 h de crescimento, os valores da DO_{600nm} mantêm-se aproximadamente constantes. No entanto, tal como se pode observar na Figura 3.17, a duração da fase estacionária do crescimento do *Bacillus* na ausência de glucose parece ser inferior a 2 h (entre as 6 h e as 8 h) não se verificando depois disso variações apreciáveis dos valores da DO_{600nm} . Este comportamento é semelhante ao observado nas curvas de crescimento obtidas na presença de carbamazepina no meio de cultura.

Comparando as curvas de crescimento da cultura no meio contendo o ibuprofeno, na presença e na ausência de glucose, dado que as DO_{600nm} iniciais nos vários Erlenmeyers são semelhantes, é possível verificar que o crescimento do *Bacillus* é maior na presença de glucose, uma vez que no final da fase exponencial o valor de DO_{600nm} é mais elevado. Estes dados, bem como estudos realizados, indicam que não parece haver efeito tóxico ou inibitório associado à presença deste fármaco no meio de cultura para a concentração testada de 2 mg/L (Marchlewicz, Guzik, Hupert-Kocurek, et al., 2017).

Na Figura 3.18 estão apresentadas as curvas de crescimento do *Bacillus* nos ensaios em que o meio de cultura foi dopado com ibuprofeno com uma concentração de 20 mg/L.

A duração da fase *lag* das curvas de crescimento deste ensaio foi igual às dos ensaios anteriores, ou seja, cerca de 2 h para todas as condições dos Erlenmeyers. No que diz respeito à duração da fase log, todas as curvas de crescimento tiveram uma fase log com duração de 6 h (2 h – 8 h) à exceção da curva de crescimento em que a cultura cresceu sem glucose e sem fármaco, caso em que a fase log teve então uma duração de 4 h. Como era de esperar, a duração da fase log é maior nas culturas que cresceram na presença de

glucose e, para a primeira situação (fase log com duração de 6 h) a duração da fase log foi igual à observada no estudo da caracterização da curva de crescimento (secção 3.4).

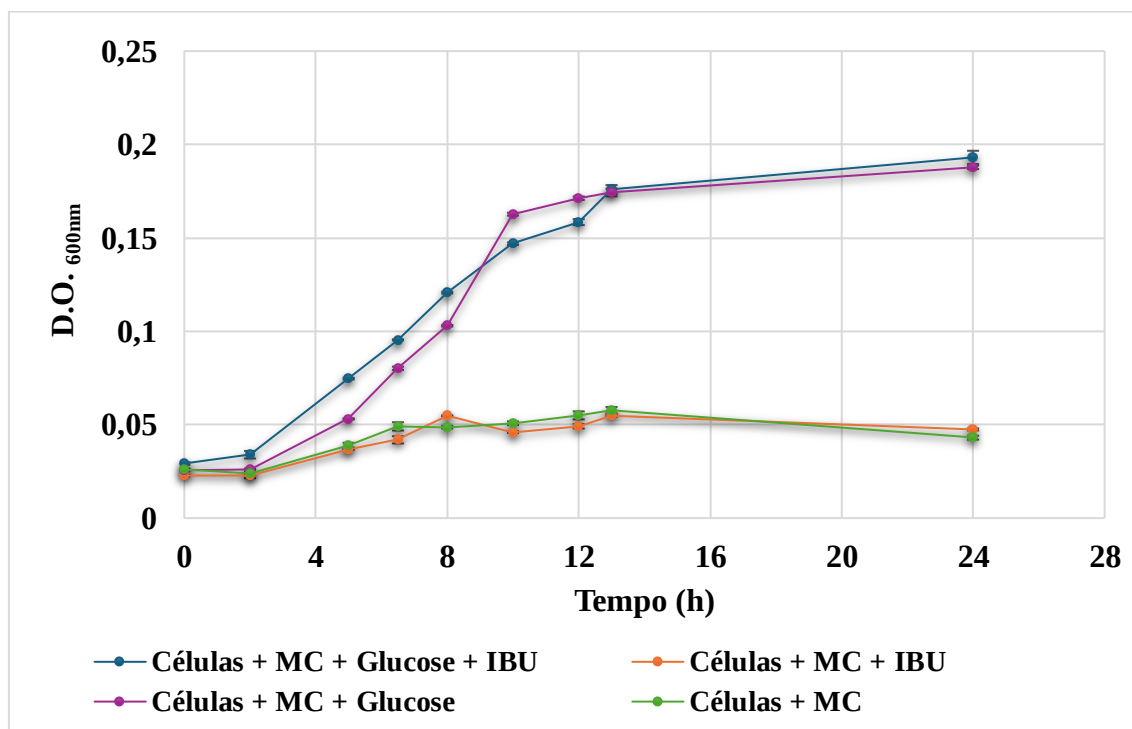


Figura 3.18 - Curvas de crescimento do *Bacillus* para as várias condições do ensaio com uma concentração de Ibuprofeno de 20 mg/L

No que diz respeito à duração da fase estacionária de crescimento para os microrganismos que cresceram na presença de glucose foi de cerca de 5 h (das 8 h às 13 h) quer na presença de ibuprofeno quer na sua ausência. A partir das 13 h de crescimento, os valores da DO_{600nm} mantêm-se aproximadamente constantes. No entanto, tal como se pode observar na Figura 3.18, a duração da fase estacionária do crescimento do *Bacillus* na ausência de glucose parece apresentar diferenças entre os meios contendo ibuprofeno dos meios sem ibuprofeno. Com a presença de ibuprofeno observa-se uma fase estacionária com uma duração de 4 h (entre as 6 h e as 10 h) enquanto na ausência de ibuprofeno esta fase tem uma duração mais curta, sendo mesmo inferior a 2 h. Depois desta fase não se verificam variações apreciáveis dos valores da DO_{600nm} .

Ao comparar as curvas de crescimento da cultura no meio contendo ibuprofeno (20 mg/L) na presença e na ausência de glucose, tal como foi observado anteriormente, e tendo em consideração que os valores de DO_{600nm} iniciais são semelhantes, verifica-se que o crescimento do *Bacillus* é maior quando existe glucose no meio de cultura, visto

que no final da fase exponencial o valor de DO_{600nm} é mais elevado neste caso. Estes dados e estudos anteriores indicam também que não parece haver um efeito significativamente tóxico ou inibitório associado à presença deste fármaco no meio de cultura para a concentração testada de 20 mg/L (Marchlewicz et al., 2016b; Marchlewicz, Guzik, & Wojcieszynska, 2017; Marchlewicz, Guzik, Hupert-Kocurek, et al., 2017).

Na Tabela 3.10 estão apresentados os valores dos parâmetros cinéticos obtidos para os ensaios do crescimento da cultura na presença de ibuprofeno na concentração de 2 mg/L.

Tabela 3.10 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de *Bacillus* para as diferentes condições do ensaio com Ibuprofeno (2 mg/L)

	EI: Células + MC + Glucose + IBU	EII: Células + MC + IBU	EIII: Células + MC + Glucose	EIV: Células + MC
Fase log (h)	2 – 7,8	2 – 6,4	2 – 7,8	2 – 6,4
Equação da reta	$y = 0,2377x - 3,8333$	$y = 0,1355x - 3,8312$	$y = 0,2265x - 3,8103$	$y = 0,1625x - 3,9875$
R²	0,9519	0,9935	0,9907	0,9995
$\mu_{\max}$ (h⁻¹)	0,238	0,136	0,227	0,162
g (h)	2,92	5,11	3,06	4,26
Nº gerações	2,02	0,84	1,93	1,01

À semelhança do que aconteceu com a carbamazepina, quer na presença do ibuprofeno (EII) quer na sua ausência (EIV), os valores da taxa específica de crescimento das culturas que cresceram no meio de cultura sem glucose são próximos (EII – 0,136 h⁻¹; EIV – 0,162 h⁻¹). Contudo, o valor foi ligeiramente inferior no caso do Erlenmeyer que continha fármaco. Em relação às culturas que cresceram na presença de glucose (EI e EIII), os valores da taxa específica de crescimento foram superiores. De facto, o Erlenmeyer sem fármaco (EIII) teve uma taxa específica de crescimento de 0,227 h⁻¹ e o Erlenmeyer com o ibuprofeno (EI) teve uma taxa específica de crescimento de 0,238 h⁻¹, ou seja, ainda ligeiramente superior à de EIII. Estes valores parecem indicar que a presença do fármaco (2 mg/L) no meio de cultura não terá uma influência negativa no crescimento da bactéria. De facto, estes resultados apontam, pelo contrário, para um estímulo do crescimento no meio contendo ibuprofeno e, por isso, este fármaco nesta

concentração não parece induzir efeitos de toxicidade que possam prejudicar o crescimento do *Bacillus*.

Na Tabela 3.11 estão apresentados os valores dos parâmetros cinéticos obtidos para os ensaios do crescimento da cultura na presença de ibuprofeno à concentração de 20 mg/L.

Tabela 3.11 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de *Bacillus* para as diferentes condições do ensaio com Ibuprofeno (20 mg/L)

	EI: Células + MC + Glucose + IBU	EII: Células + MC + IBU	EIII: Células + MC + Glucose	EIV: Células + MC
Fase log (h)	2 – 8	2 – 8	2 – 8	2 – 6
Equação da reta	$y = 0,2133x - 3,7567$	$y = 0,1413x - 4,0465$	$y = 0,233x - 4,0958$	$y = 0,1605x - 4,0526$
R²	0,9819	0,9901	0,9951	0,9997
$\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹)	0,213	0,142	0,233	0,161
g (h)	3,25	4,91	2,98	4,32
Nº gerações	1,85	1,22	2,02	1,39

Como se pode verificar, os valores da taxa específica de crescimento das culturas que cresceram no meio sem glucose, quer na presença do ibuprofeno com uma concentração de 20 mg/L (EII: $\mu = 0,142 \text{ h}^{-1}$) quer na sua ausência (EIV: $\mu = 0,161 \text{ h}^{-1}$) são próximos dos obtidos no estudo em que a concentração de ibuprofeno foi de 2 mg/L. Relativamente às culturas que cresceram na presença de glucose, no Erlenmeyer sem fármaco (EIII) a taxa específica de crescimento foi de $0,233 \text{ h}^{-1}$ enquanto no Erlenmeyer com o fármaco (EI) a taxa específica de crescimento foi ligeiramente inferior ($0,213 \text{ h}^{-1}$). Constata-se, assim, que estes valores são também próximos dos obtidos nos estudo em que a concentração de ibuprofeno foi de 2 mg/L. Estes valores mostram uma ligeira diminuição da taxa de crescimento associada à presença do ibuprofeno (20 mg/L) no meio de cultura, invertendo a tendência observada para a concentração de ibuprofeno de 2 mg/L, em que, pelo contrário, a taxa de crescimento aumentou ligeiramente. No entanto, estes efeitos sobre o crescimento da bactéria não parecem ser muito significativos e, assim, o fármaco parece apresentar baixa toxicidade para o *Bacillus* e não prejudicar significativamente o seu crescimento.

Nas figuras seguintes estão apresentadas as curvas de crescimento do *Bacillus* obtidas no ensaio em que o meio de cultura foi dopado com uma mistura de 4 fármacos (carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno). Começa-se por apresentar as curvas de crescimento correspondentes à mistura em que cada fármaco se encontra numa concentração de 2 mg/L (Figura 3.19).

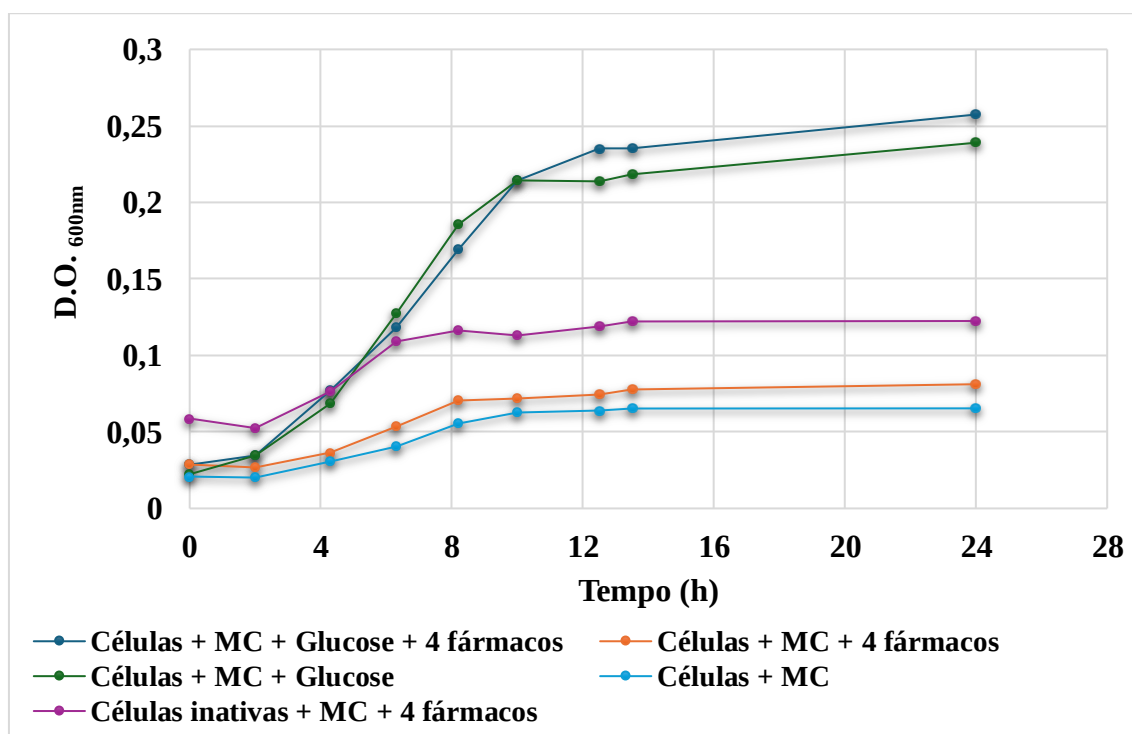


Figura 3.19 - Curvas de crescimento do *Bacillus* para as várias condições do ensaio com a mistura de 4 fármacos (carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno) com uma concentração de 2 mg/L de cada um dos fármacos

A partir da Figura 3.19 é possível verificar que, mesmo na presença da mistura de 4 fármacos, e à semelhança do que aconteceu nos ensaios anteriores, a fase *lag* teve uma duração igual ou parecida em todos os Erlenmeyers. Esta observação pode indicar que a mistura de 4 fármacos no meio de cultura da bactéria não apresenta uma elevada toxicidade para a mesma (pelo menos num período inicial) e, por isso, não afeta significativamente a fase da adaptação dos microrganismos.

Como em geral aconteceu nos ensaios anteriores, a fase log teve uma duração também semelhante em todos os cenários, durando cerca de 6 horas. De facto, esta duração observou-se nos Erlenmeyers em que o meio de cultura continha uma mistura de 4 fármacos (2 mg/L de cada fármaco), mas também se verificou nos ensaios anteriores,

nos Erlenmeyers contendo glucose e apenas um fármaco. Assim, apesar da quantidade de fármacos colocados no meio de cultura neste ensaio, não se verificaram alterações significativas na duração da fase exponencial da bactéria.

De seguida Figura 3.20 apresentam-se as curvas de crescimento correspondentes à mistura em que cada fármaco se encontra numa concentração de 5 mg/L.

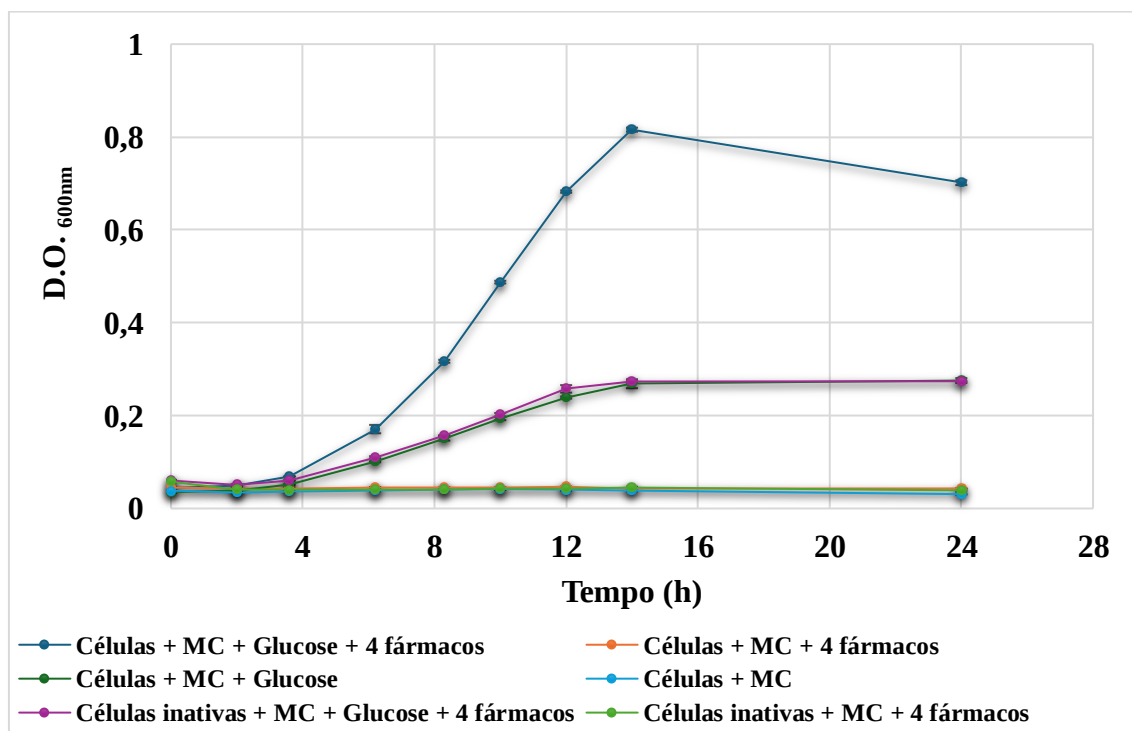


Figura 3.20 - Curvas de crescimento do *Bacillus* para as várias condições do ensaio com a mistura de 4 fármacos (carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno) com uma concentração de 5 mg/L de cada um dos fármacos

Como aconteceu nos ensaios discutidos anteriormente, mesmo na presença da mistura de 4 fármacos em concentrações de 5 mg/L de cada um, a fase *lag* teve durações idênticas em todas as curvas de crescimento (2 h). Em relação à fase *log*, a sua duração foi semelhante para as três curvas de crescimento dos Erlenmeyers que continham glucose, nomeadamente de cerca de 10 h (2 h – 12 h). No entanto, nos Erlenmeyers que não continham glucose não parece ter existido um crescimento significativo das culturas de *Bacillus*. Esta observação permite deduzir que na presença de glucose e da mistura de 4 fármacos (5 mg/L de cada) a bactéria consegue crescer normalmente, mas quando a glucose não está presente no meio de cultura, a toxicidade dos 4 fármacos deverá ser demasiado elevada para que o seu crescimento ocorra.

De seguida irão analisar-se os parâmetros cinéticos determinados nos ensaios do crescimento da cultura na presença de uma mistura de quatro fármacos. Os valores relativos à mistura de fármacos com concentração inicial de 2 mg/L de cada fármaco são apresentados na Tabela 3.12.

Tabela 3.12 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de *Bacillus* para as diferentes condições do ensaio com a mistura dos 4 fármacos com uma concentração inicial de 2 mg/L

	EI: Células + MC + Glucose + 4 fármacos	EII: Células + MC + 4 fármacos	EIII: Células + MC + Glucose	EIV: Células + MC	EV: Células inativadas + MC + 4 fármacos
Fase log (h)	2 – 8	2 – 8	2 – 8	2 – 8	2 – 8
Equação da reta	$y = 0,2528x - 3,7722$	$y = 0,1594x - 3,9584$	$y = 0,276x - 3,8824$	$y = 0,1618x - 4,2137$	$y = 0,1339x - 3,1693$
R²	0,9772	0,9945	0,9922	0,998	0,9481
$\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹)	0,253	0,159	0,276	0,162	0,134
g (h)	2,74	4,35	2,51	4,28	5,18
Nº gerações	2,19	1,38	2,39	1,40	1,16

Apesar de a cultura de *Bacillus* apresentar uma taxa específica de crescimento maior no Erlenmeyer que apenas continha glucose (EIII: $\mu = 0,276 \text{ h}^{-1}$), a bactéria também cresceu a uma velocidade elevada no Erlenmeyer com glucose e a mistura de 4 fármacos presentes no meio de cultura (EI: $\mu = 0,253 \text{ h}^{-1}$). Esta proximidade entre os valores sugere que, apesar da existência de 4 fármacos no meio de cultura, o *Bacillus* consegue tolerar a sua presença e crescer.

Como ocorreu nos primeiros ensaios, foi nos Erlenmeyers em que o meio de cultura não continha glucose que as culturas da *Bacillus* manifestaram taxas específicas de crescimento menores (EII: $\mu = 0,159 \text{ h}^{-1}$; EIV: $\mu = 0,162 \text{ h}^{-1}$). Apesar de ser no Erlenmeyer onde as bactérias cresceram na presença de fármacos mas na ausência de glucose (EII) que a taxa específica de crescimento foi mais baixa, este valor não sugere uma toxicidade que afete o crescimento do microrganismo, uma vez que a diferença entre os Erlenmeyers é quase nula.

A comparação dos parâmetros cinéticos das culturas de *Bacillus* dos Erlenmeyers na presença e na ausência de glucose, permite constatar que é na presença de glucose que os microrganismos crescem mais rapidamente e isto deve-se à sua função de servir como fonte de energia e carbono para as células, sendo este o fator que mais afeta o crescimento das culturas em estudo.

Em relação ao Erlenmeyer V, este deveria conter apenas células inativas e o objetivo era verificar se ocorre adsorção dos fármacos à biomassa. Contudo, foi possível observar algum crescimento celular, embora o valor da taxa específica de crescimento fosse o menor de todos. Será necessário de futuro otimizar as condições de inativação do *Bacillus*, para assim se poder avaliar a adsorção destes fármacos à biomassa e se poder identificar e caracterizar melhor os vários processos envolvidos na remoção destes compostos do meio de cultura.

De seguida são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos das curvas de crescimento do *Bacillus* num meio de cultura contendo a mistura dos quatro fármacos com concentração inicial de 5 mg/L de cada fármaco (Tabela 3.13).

Tabela 3.13 - Parâmetros cinéticos das curvas de crescimento da cultura de *Bacillus* para as diferentes condições do ensaio com a mistura dos 4 fármacos com uma concentração inicial de 5 mg/L

	EI – Células + MC + Glucose + 4 fármacos				EV – Células inativadas + MC + Glucose + 4 fármacos	
	EII – Células + MC + 4 fármacos	EIII – Células + MC + Glucose	EIV – Células + MC		EVI – Células inativas + MC + 4 fármacos	
Fase log (h)	2 – 12	2 – 12	2 – 12	-	-	-
Equação da reta	y = 0,3027x – 3,6682	y = 0,0062x – 3,1479	y = 0,2218x – 3,7196	y = 0,0251x – 3,4141	y = 0,1871x – 3,4007	y = 0,0041x – 3,2208
R²	0,9937	0,5751	0,9947	0,9925	0,9893	0,4621
μ_{máx} (h⁻¹)	0,303	0,006	0,222	0,025	0,181	0,004
g (h)	2,29	112,45	3,12	27,61	3,84	168,76
Nº gerações	2,62	0,05	1,92	0,22	1,56	0,04

Neste ensaio, e à semelhança do que acontece nos ensaios anteriores, os valores das taxas específicas de crescimento das culturas são mais elevadas nos Erlenmeyers que contêm glucose no seu meio de cultura (EI: $\mu = 0,303 \text{ h}^{-1}$; EIII: $\mu = 0,222 \text{ h}^{-1}$). Entretanto, como se pode observar na Figura 3.19 e pelos valores da Tabela 3.12, nos Erlenmeyers em que o meio de cultura não continha glucose não houve um crescimento relevante das culturas de *Bacillus* (EII: $\mu = 0,006 \text{ h}^{-1}$; EIV: $\mu = 0,025 \text{ h}^{-1}$). Este comportamento difere do observado nos ensaios anteriores em que, nos meios de cultura sem glucose, se observou sempre algum crescimento, embora menor do que nos meios com glucose. Assim, a quase total ausência de crescimento neste caso parece ser um comportamento anómalo para a qual não foi possível encontrar uma explicação, podendo colocar-se a hipótese de ter sido introduzido inadvertidamente algum contaminante tóxico no meio de cultura sem glucose desses Erlenmeyers durante a sua preparação.

Relativamente aos Erlenmeyers V e VI, que deveriam conter células inativas, estes serviram para avaliar a ocorrência de fenómenos de adsorção dos fármacos à biomassa. No entanto, apesar do Erlenmeyer VI não ter apresentado um crescimento de culturas, o Erlenmeyer que continha glucose (EV) apresentou uma taxa específica de crescimento considerável, o que demonstra, tal como já foi referido anteriormente, que o processo de inativação das células utilizado não foi eficiente.

Ao comparar as taxas específicas de crescimento dos Erlenmeyers que continham glucose e a mistura de 4 fármacos para diferentes concentrações de cada fármaco (2 e 5 mg/L) verifica-se que uma maior concentração de fármacos não interferiu significativamente com o crescimento das bactérias uma vez que os seus valores de μ ficaram próximos (EI (2 mg/L): $\mu = 0,253 \text{ h}^{-1}$; EI (5 mg/L) : $\mu = 0,303 \text{ h}^{-1}$). Neste caso até se observou que, com uma maior concentração de fármacos presente no meio de cultura, se obteve uma maior taxa específica de crescimento.

3.6.2. Avaliação da capacidade de degradação/remoção da carbamazepina e do ibuprofeno pela bactéria *Bacillus*

De modo a avaliar a capacidade de remoção da carbamazepina e do ibuprofeno pela bactéria *Bacillus*, bem como caracterizar a cinética de remoção de cada um dos fármacos, foram realizados três ensaios diferentes de acordo com a descrição da secção 2.2.3.4 da metodologia experimental.

Em cada um dos ensaios foram efetuadas avaliações da capacidade da bactéria remover os fármacos em duas condições: i) na presença (Erlenmeyer I: Células + Meio de Cultura + Glucose + Fármaco(s)) e ii) na ausência de glucose (Erlenmeyer II: Células + Meio de Cultura + Fármaco(s)). Para além disso, a possível adsorção dos fármacos à biomassa na ausência de glucose (Erlenmeyer VI: Células inativas + Meio de Cultura + Fármaco(s)) também foi avaliada. Outros processos de remoção de fármacos, que não são originados por atividade bacteriana, também foram avaliados, tais como hidrólise, adsorção nas paredes do recipiente e fotodegradação (Erlenmeyer VIII: Meio de Cultura + Fármaco(s)). Nestes dois últimos Erlenmeyers, VI e VIII, a glucose não foi adicionada ao meio de cultura destes sistemas para evitar estimular o crescimento das bactérias.

Todos os ensaios tiveram uma duração de 24 horas e foi utilizada uma solução contendo 2 mg/L de cada um dos fármacos.

Foi através da equação (4) que a percentagem de remoção dos fármacos foi calculada para os diferentes tempos de recolha de amostras.

$$\% \text{ remoção} = \frac{C_i - C_t}{C_i} \times 100 \quad (4)$$

em que C_i corresponde à concentração inicial ($t = 0$) e C_t corresponde à concentração ao fim de um determinado tempo t .

Na Figura 3.21 estão representadas as percentagens de remoção da carbamazepina no ensaio em que o meio de cultura foi dopado com uma mistura de 4 fármacos (carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno) com uma concentração de 2 mg/L de cada um.

Ao analisar a Figura 3.21 é possível verificar que os Erlenmeyers em que o meio de cultura continha glucose [EI e EI (2)] apresentaram percentagens de remoção de carbamazepina superiores em relação aos Erlenmeyers que não continham glucose [EII e EII (2)]: EI – 39 %; EI (2) – 33 %; EII – 23 %; EII (2) – 25 %. Esta diferença de valores de remoção pode explicar-se pelo maior crescimento das bactérias na presença de glucose (Tabela 3.9 e Tabela 3.12), visível também pelas curvas de crescimento apresentadas na Figura 3.22, aumentando assim a capacidade para a remoção do fármaco.

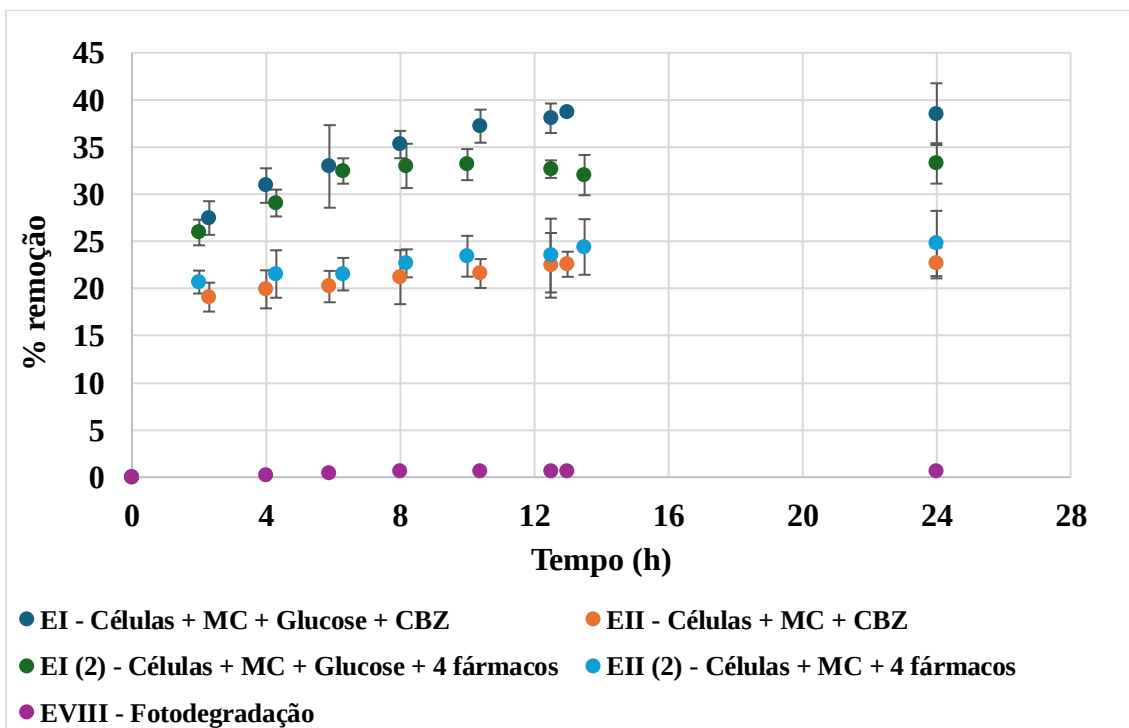


Figura 3.21 - Percentagens de remoção da carbamazepina para todas as condições testadas para a concentração de 2 mg/L

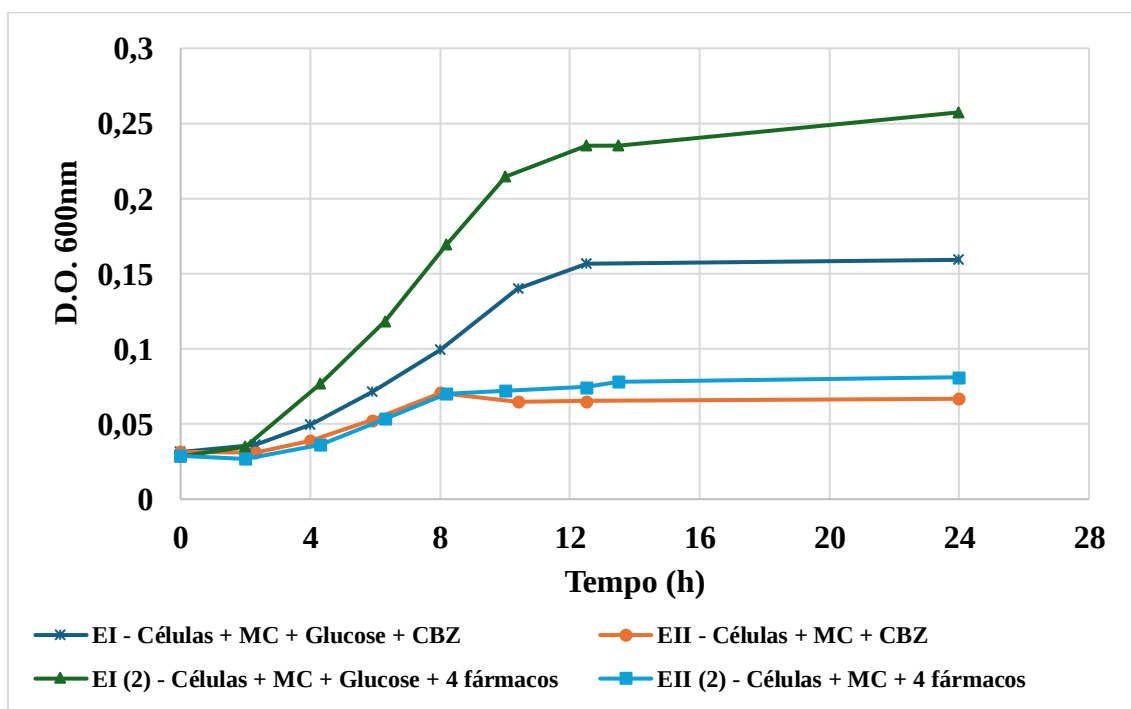


Figura 3.22 - Curvas de crescimento do *Bacillus* para todas as condições testadas para a concentração de 2 mg/L de carbamazepina

Apesar dos valores serem próximos entre si [ou seja, EI com EI (2) e EII com EII (2)], existe uma diferença aparentemente relacionada com a quantidade de fármacos no meio, em particular no caso dos meios contendo glucose. De facto, quando o meio de cultura continha glucose, pode-se constatar que no Erlenmeyer contendo 4 fármacos, e apesar de a densidade ótica da suspensão ser superior, o *Bacillus* removeu menos carbamazepina do que quando estava na presença de apenas um fármaco. Contudo, tal observação não é totalmente surpreendente, dado que a proporção relativa deste fármaco se torna menor por ser parte de uma mistura e, sobretudo, tendo em consideração que a biodegradabilidade da carbamazepina é geralmente reportada como sendo bastante baixa, havendo na mistura outros fármacos mais biodegradáveis.

Contudo, quando o meio de cultura não continha glucose, apesar de na presença de 4 fármacos se ter observado uma maior remoção da carbamazepina do que na presença apenas da carbamazepina, a diferença neste caso é bastante menor e dentro dos intervalos das barras de erro (ver Figura 3.21) pelo que se pode considerar pouco significativa.

É possível observar ainda uma relação entre a evolução temporal da remoção da carbamazepina no meio com e sem glucose e as respetivas curvas de crescimento. No caso do Erlenmeyer I grande parte da remoção do fármaco ocorre quando o crescimento bacteriano está na fase log. No Erlenmeyer II a remoção ocorre na fase log e na fase estacionária, sendo que a sua maioria ocorre nesta última fase.

Relativamente ao Erlenmeyer VIII, onde o meio de cultura dopado com os 4 fármacos sem adição de inóculo, a percentagem de remoção de carbamazepina foi menor que 0,5%. Este valor baixo de remoção indica que, perante as condições experimentais em que o ensaio foi realizado, a carbamazepina não sofre fotodegradação nem qualquer outro processo de remoção como precipitação, adsorção às paredes do recipiente ou hidrólise.

Apesar de não estar representado na Figura 3.21 a avaliação do Erlenmeyer VI (Células inativas + MC + Fármacos) também foi realizada. O propósito da execução deste Erlenmeyer era avaliar a potencial adsorção da carbamazepina à biomassa, contudo, não foi possível retirar conclusões dado que ocorreu crescimento celular durante o período do ensaio. Este crescimento celular deveu-se ao facto de não se ter conseguido inativar todas as células no início do ensaio e, por isso, não foi possível isolar a contribuição do processo de adsorção da carbamazepina à biomassa na remoção total deste fármaco.

De modo a avaliar o efeito que diferentes concentrações de fármaco (ou misturas de fármacos) poderão ter na sua remoção pelas bactérias, efetuou-se um novo ensaio em que se procurou avaliar as percentagens de remoção da carbamazepina de meios de cultura (com ou sem glucose) dopados com uma mistura de 4 fármacos (carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno) em concentração de 5 mg/L de cada um dos fármacos. Os resultados das percentagens de remoção ao longo de 24 h são apresentados na Figura 3.23 e comparados com os resultados obtidos nas mesmas condições com a concentração de 2 mg/L de carbamazepina.

A análise deste gráfico (Figura 3.23) permite fazer uma comparação dos efeitos que a concentração possui na remoção do fármaco. O Erlenmeyer onde ocorre a maior percentagem de remoção de carbamazepina é aquele que no seu meio de cultura contém glucose e apenas carbamazepina com concentração de 2 mg/L (39 %). Com uma percentagem inferior (33 %) está o Erlenmeyer com glucose no seu meio de cultura e a mistura de 4 fármacos com concentração de 2 mg/L de cada.

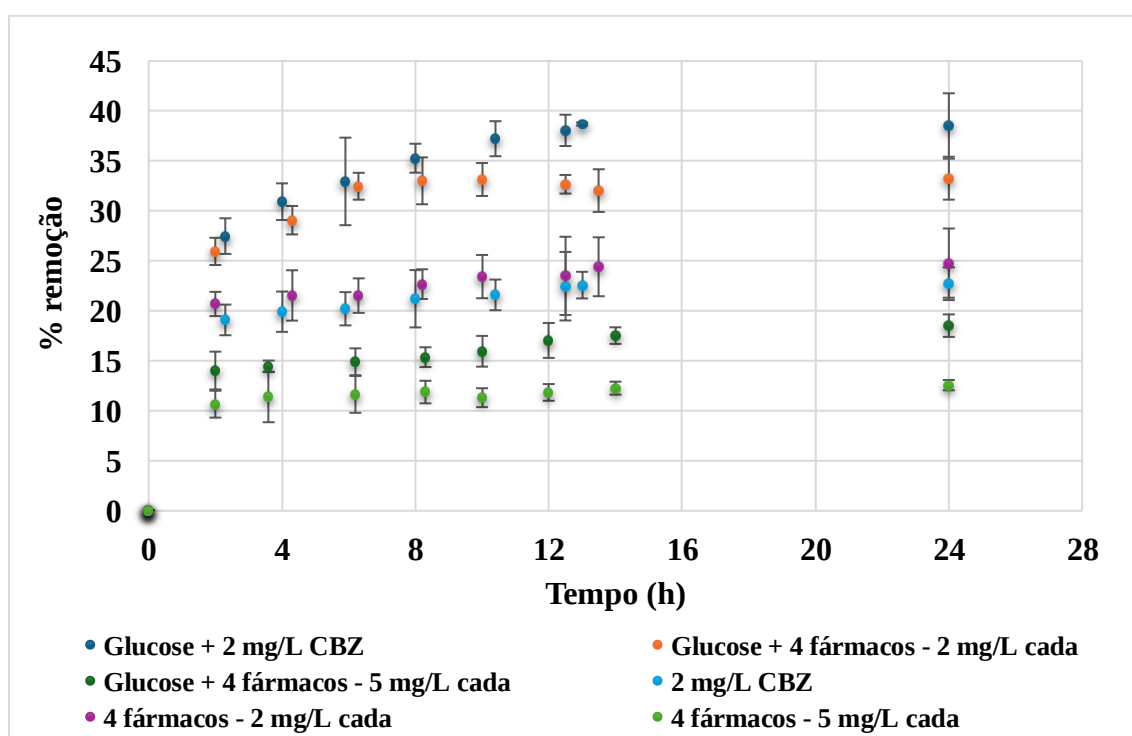


Figura 3.23 - Percentagens de remoção da carbamazepina para as diferentes condições com duas concentrações testadas (2 e 5 mg/L)

Como demonstrado nos gráficos anteriores, é na presença de glucose que ocorre as maiores percentagens de remoção e o mesmo se observa neste gráfico em que os 3 Erlenmeyers que não possuem glucose são os que apresentam uma remoção mais baixa.

No entanto, os Erlenmeyers sem glucose, mas com concentração de 2 mg/L de carbamazepina (23 %) ou mistura de 4 fármacos (25 %) conseguem apresentar uma percentagem de remoção superior aos Erlenmeyers com e sem glucose com uma concentração de 5 mg/L de cada fármaco (19 % e 13 %, respetivamente).

No geral, pode-se concluir que a concentração dos fármacos no meio de cultura, a presença de outros fármacos, a presença de glucose e a densidade celular são alguns dos principais fatores que afetam a remoção de carbamazepina pela cultura de *Bacillus*.

Na Figura 3.24 estão representadas as percentagens de remoção do ibuprofeno no ensaio em que o meio de cultura foi dopado com uma mistura de 4 fármacos (carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno) com uma concentração de 2 mg/L de cada um.

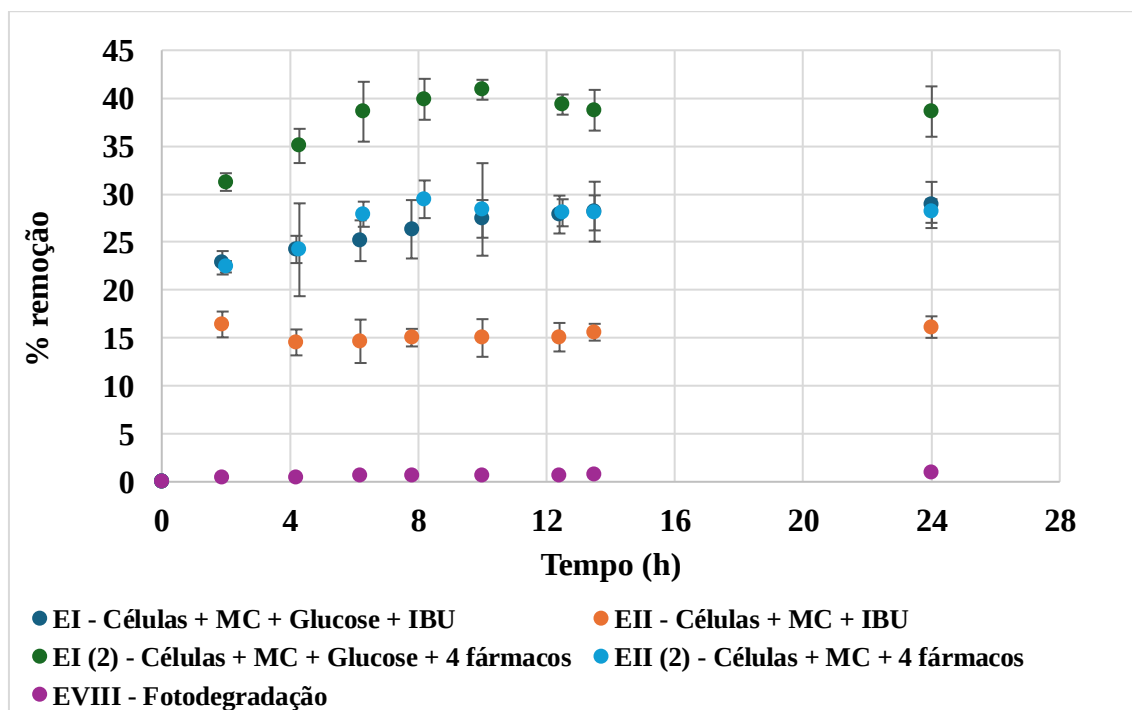


Figura 3.24 - Percentagens de remoção do ibuprofeno para todas as condições testadas para a concentração de 2 mg/L

Com a análise da Figura 3.24, e como acontece com a carbamazepina, é possível verificar que os Erlenmeyers EI e EI (2), em que o meio de cultura contém glucose, apresentam percentagens de remoção de ibuprofeno superiores em relação aos Erlenmeyers EII e EII (2), que não continham glucose: EI – 29 %; EI (2) – 39 %; EII – 16 %; EII (2) – 28 %. Esta diferença de valores de remoção poderá ser explicada,

principalmente, pela diferença no número de células de *Bacillus* formadas nos vários Erlenmeyers, sendo que nos meios contendo glucose ocorreu maior crescimento (Tabela 3.10 e Tabela 3.12). Consequentemente, com formação de um maior número de novas células, evidenciada pelas densidades óticas mais elevadas, naturalmente, obtém-se uma maior remoção do fármaco. Em estudos anteriores, também foi demonstrada a capacidade de remoção de fármacos por estirpes do *Bacillus*. Nestes casos, também ocorre maior remoção do ibuprofeno quando na presença de glucose como fonte de carbono (Marchlewicz et al., 2016b; Marchlewicz, Guzik, & Wojcieszynska, 2017; Marchlewicz, Guzik, Hupert-Kocurek, et al., 2017). Contudo, ao contrário do que se esperava e se observou no caso da carbamazepina, é nos Erlenmeyers em que o meio de cultura foi dopado com a mistura de 4 fármacos [EI (2) e EII (2)] que a remoção de ibuprofeno foi superior. De facto, tal como se considerou no caso do fármaco anterior, poder-se-ia supor que uma maior variedade de fármacos levaria a uma menor remoção do ibuprofeno em particular. No entanto, tal não se verificou e a razão poderá ser que, ao contrário da carbamazepina, o ibuprofeno é geralmente reportado como um fármaco facilmente biodegradável. Assim, a maior densidade ótica final (24 h) nos Erlenmeyers dopados com os 4 fármacos, EI (2) e EII (2), em relação aos Erlenmeyers análogos dopados apenas com ibuprofeno, EI e EII, poderá ser o fator mais decisivo para a sua remoção.

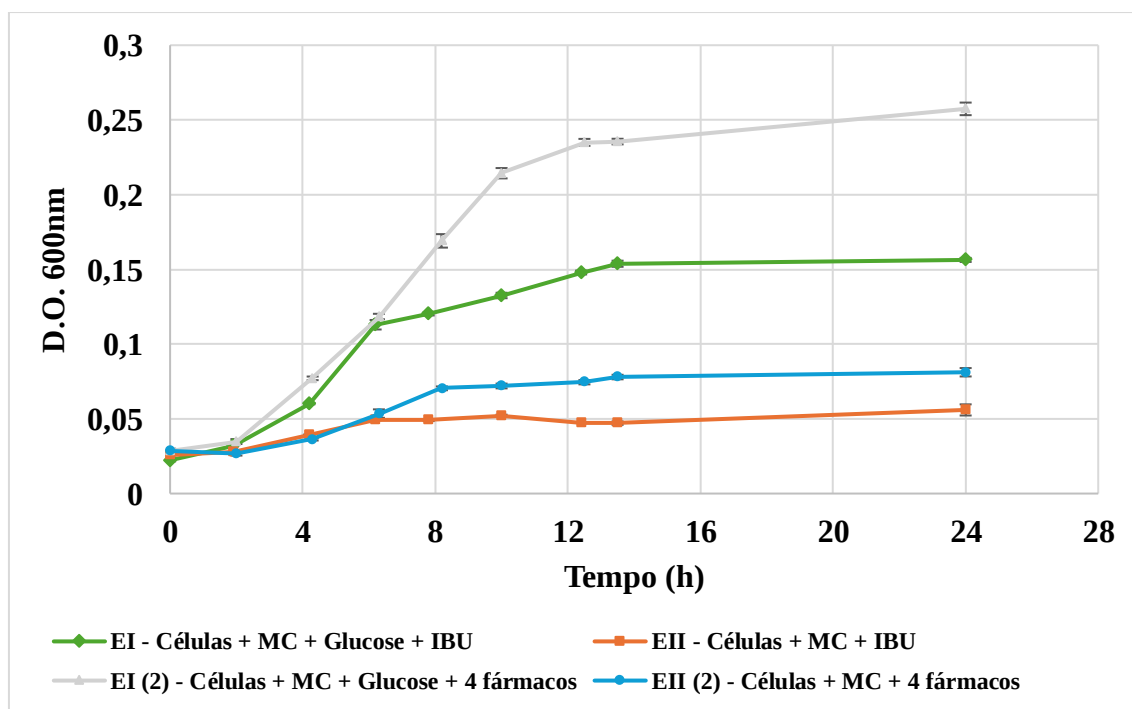


Figura 3.25 - Curvas de crescimento do *Bacillus* para todas as condições testadas para a concentração de 2 mg/L de ibuprofeno

É possível observar ainda uma relação entre a remoção do ibuprofeno no meio com e sem glucose e as respectivas curvas de crescimento (Figura 3.24 e Figura 3.25). Tanto no Erlenmeyer I como no Erlenmeyer II grande parte da remoção do fármaco ocorre quando o crescimento bacteriano está na fase log atingindo o pico máximo durante a fase estacionária.

Relativamente ao Erlenmeyer VIII, onde o meio de cultura foi dopado com os 4 fármacos sem adição de inóculo, e à semelhança do que acontece com a carbamazepina, a percentagem de remoção de ibuprofeno foi menor que 1%. Esta baixa remoção indica que, com as condições experimentais em que o ensaio foi realizado, o ibuprofeno não sofre fotodegradação nem qualquer outro processo de remoção como precipitação, adsorção às paredes do recipiente ou hidrólise.

Pelas mesmas razões descritas acima em relação à avaliação da carbamazepina, não foi possível avaliar a adsorção do ibuprofeno à biomassa microbiana (Erlenmeyer VI – Células inativas + MC + Fármacos).

Na Figura 3.26 estão apresentadas as percentagens de remoção do ibuprofeno obtidas nos ensaios em que o meio de cultura foi dopado com uma mistura de 4 fármacos (carbamazepina, ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno) com uma concentração de 2 mg/L e de 5 mg/L de cada um dos fármacos, bem como dos ensaios em que o meio de cultura continha apenas ibuprofeno nas concentrações de 2 e de 20 mg/L, de modo a avaliar o efeito que diferentes concentrações de fármaco (ou misturas de fármacos) poderão ter na sua remoção pelas bactérias.

Ao analisar este gráfico é possível fazer uma comparação semelhante à feita para a carbamazepina sobre os efeitos da concentração na remoção do ibuprofeno. Ao contrário do que acontece com a carbamazepina, o Erlenmeyer que possui maior percentagem de remoção de ibuprofeno é aquele que no seu meio de cultura contém glucose e uma mistura de 4 fármacos com concentração de 2 mg/L (39 %). De seguida, com uma percentagem de remoção de 29 % está o Erlenmeyer que contém glucose e uma concentração de 2 mg/L de ibuprofeno no seu meio de cultura. O Erlenmeyer que apresenta um valor de remoção próximo a este é o que contém uma mistura de 4 fármacos com uma concentração de 2 mg/L sem glucose no seu meio de cultura (28 %).

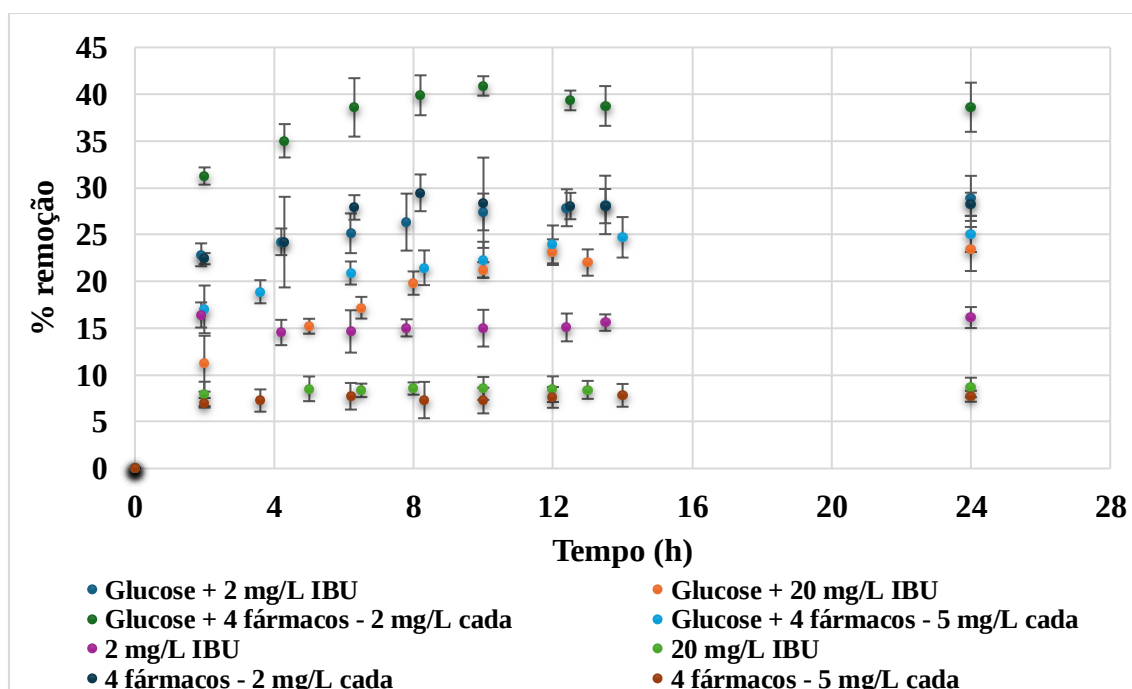


Figura 3.26 - Percentagens de remoção do Ibuprofeno para as diferentes condições com duas concentrações testadas (2, 20 e 5 mg/L)

Como demonstrado nos gráficos anteriores, é na presença de glucose que ocorrem as maiores percentagens de remoção do ibuprofeno. Por outro lado, com a exceção do Erlenmeyer sem glucose e com a mistura de 4 fármacos à concentração de 2 mg/L de cada, os Erlenmeyers que não possuem glucose são os que apresentam as remoções mais baixas.

À semelhança do que acontece com a carbamazepina, conforme a concentração de fármaco(s) aumenta, a percentagem de remoção diminui. Este comportamento pode ser observado no gráfico da Figura 3.26, onde se pode ver que os Erlenmeyers sem glucose que contêm concentrações de 20 mg/L de ibuprofeno ou a mistura de 4 fármacos (5 mg/L cada) são os que exibem percentagens de remoção mais baixas (9 % e 8 %, respetivamente). Apesar de existirem algumas exceções que contrariam o que era esperado acontecer, os resultados sugerem que, tal como se verifica na carbamazepina, a remoção de ibuprofeno tem alguma relação com a concentração dos fármacos.

Em geral, tal como se observou com a carbamazepina, também se pode concluir que a concentração dos fármacos no meio de cultura, a presença de outros fármacos, a presença de glucose e a densidade celular são alguns dos principais fatores que afetam a remoção de ibuprofeno pela cultura de *Bacillus*.

4. Conclusões e perspetivas futuras

O presente estudo teve como objetivo otimizar alguns dos componentes de um microcosmo de LCMs (materiais para a matriz de suporte e população microbiana) para a remoção de fármacos de águas contaminadas, nomeadamente, a carbamazepina e o ibuprofeno.

Inicialmente foi avaliada a eficiência de granulados de cortiça expandida. Os resultados foram positivos para ambos os fármacos, principalmente a carbamazepina que, devido à sua baixa biodegradabilidade é um dos fármacos mais difíceis de remover. Ao fim de 216 h, para uma concentração de 2,5 mg/L houve uma remoção 59,9 % e 34,4 % de carbamazepina e ibuprofeno, respetivamente. O mesmo acontece para uma concentração de 5 mg/L, em que ocorre uma maior percentagem de remoção de carbamazepina (60,2 %) do que de ibuprofeno (28,6 %).

Este estudo permitiu concluir que, apesar da remoção não ser total, a utilização deste material como matriz de suporte pode ter vantagens na sua eficiência de remoção, bem como meio de suporte para o desenvolvimento das plantas e microrganismos. Contudo, a sua adição à matriz vermiculite+LECA anteriormente testada, não mostrou um aumento significativo da sua performance. Pelo contrário, esta adição parece influenciar negativamente a remoção dos fármacos. Tendo sido estudadas 3 estratificações diferentes dos materiais, com diferentes proporções, os resultados também não foram os esperados, uma vez que não existiram diferenças significativas entre as estratificações na remoção dos fármacos.

O crescimento do *Bacillus subtilis* num meio contendo fármacos também foi estudado, bem como a sua capacidade de os remover. Para ambos os fármacos e em todas as concentrações testadas, não se verificou qualquer efeito tóxico ou inibitório no crescimento da bactéria. No entanto, quando esta se encontra na presença da mistura de 4 fármacos e sem glucose, a toxicidade destes fármacos é demasiado elevada para que o seu crescimento ocorra. Estes dados indicam que o crescimento da bactéria está fortemente associado à capacidade de remover fármacos, sendo a adição de glucose o principal fator de estímulo do crescimento.

Como referido ao longo da discussão de resultados, houve partes do estudo em que os resultados foram inconclusivos ou as suas conclusões não eram o esperado. Estes factos foram evidentes na comparação dos valores de remoção das três estratificações diferentes, onde não existiram diferenças significativas entre as mesmas, o que não era

esperado, visto que as capacidades de remoção dos diversos materiais são diferentes. Assim, colocou-se a hipótese de estes dados se deverem a problemas no procedimento de amostragem que não foi capaz de capturar a heterogeneidade da composição da matriz. Posto isso, futuramente seria importante repetir estes ensaios de modo a compreender a diferença entre as proporções de materiais obtendo uma matriz de suporte com melhor eficiência e capacidade de remoção dos fármacos.

Também no estudo do *Bacillus subtilis* é importante a repetição de alguns ensaios, nomeadamente os ensaios que continham células inativas, uma vez que foi possível observar crescimento microbiana quando não era suposto. Portanto, seria importante otimizar as condições de inativação da bactéria para se poder avaliar a adsorção destes fármacos à biomassa e melhorar a identificação e caracterização dos vários processos envolvidos na remoção dos fármacos.

Tendo em conta todos os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que tanto os granulados de cortiça expandida este material bem como a bactéria são uma boa adição aos LCMs, apresentando potencial no tratamento de águas contaminadas. Todavia, existem ainda muitos estudos necessários visto que neste trabalho apenas foram estudados dois componentes dos LCMs isoladamente. O passo seguinte deste estudo seria a inoculação destes microrganismos na estratificação selecionada de modo a compreender a eficiência conjunta destes dois componentes na remoção da carbamazepina e do ibuprofeno. De seguida é importante estudar a adição deste microrganismo e a nova matriz de suporte com o último componente dos LCMs, as plantas. Seria interessante observar a adaptação das plantas a uma nova matriz de suporte com a presença de uma bactéria. Tendo em conta os valores de remoção dos fármacos obtidos individualmente para a matriz de suporte e o microrganismo é de se esperar que, com o sistema a trabalhar em conjunto, estes valores de percentagens de remoção apresentados ao longo do trabalho aumentem.

Em estudos futuros também seria interessante ampliar a gama de fármacos estudados, tendo em conta as suas classes terapêuticas e o consumo global, e avaliar a capacidade de remoção dos granulados de cortiça expandida e do *Bacillus subtilis* dos mesmos.

Apesar de todos os percalços deste trabalho e da necessidade de vários estudos futuros, os resultados obtidos permitem encarar estes sistemas de tratamento alternativo

como uma solução para a remoção de fármacos de águas contaminadas. É também importante em estudos futuros o investimento na aplicação destes sistemas numa escala real com condições mais realistas, de modo, a compreender o que deve ser melhorado.

Referências bibliográficas

- Adeleye, A. S., Xue, J., Zhao, Y., Taylor, A. A., Zenobio, J. E., Sun, Y., Han, Z., Salawu, O. A., & Zhu, Y. (2022). Abundance, fate, and effects of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127284. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.127284>
- Afonso-Olivares, C., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2017). Occurrence and environmental impact of pharmaceutical residues from conventional and natural wastewater treatment plants in Gran Canaria (Spain). *Science of The Total Environment*, 599–600, 934–943. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.05.058>
- Aguilar-Romero, I., de la Torre-Zúñiga, J., Quesada, J. M., Haïdour, A., O’Connell, G., McAmmond, B. M., van Hamme, J. D., Romero, E., Wittich, R. M., & van Dillewijn, P. (2021). Effluent decontamination by the ibuprofen-mineralizing strain, *Sphingopyxis granuli* RW412: Metabolic processes. *Environmental Pollution*, 274, 116536. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.116536>
- al Falahi, O. A., Abdullah, S. R. S., Hasan, H. A., Othman, A. R., Ewadh, H. M., Al-Baldawi, I. A., Kurniawan, S. B., Imron, M. F., & Ismail, N. I. (2021). Simultaneous removal of ibuprofen, organic material, and nutrients from domestic wastewater through a pilot-scale vertical sub-surface flow constructed wetland with aeration system. *Journal of Water Process Engineering*, 43, 102214. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2021.102214>
- Al-Gheethi, A. A. S., & Ismail, N. (2014). Biodegradation of Pharmaceutical Wastes in Treated Sewage Effluents by *Bacillus subtilis* 1556WTNC. *Environmental Processes*, 1(4), 459–481. <https://doi.org/10.1007/S40710-014-0034-6/FIGURES/5>
- Almeida, Â., Soares, A. M. V. M., Esteves, V. I., & Freitas, R. (2021). Occurrence of the antiepileptic carbamazepine in water and bivalves from marine environments: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 86, 103661. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2021.103661>
- Amuguni, H., & Tzipori, S. (2012). *Bacillus subtilis*: A temperature resistant and needle free delivery system of immunogens. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(7), 979. <https://doi.org/10.4161/HV.20694>
- Ansari, A. A., Naeem, M., Gill, S. S., & AlZuaibr, F. M. (2020). Phytoremediation of contaminated waters: An eco-friendly technology based on aquatic macrophytes application. In *Egyptian Journal of Aquatic Research* (Vol. 46, Issue 4, pp. 371–376). National Institute of Oceanography and Fisheries. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.03.002>
- Asami, H., Golabi, M., & Albaji, M. (2021). Simulation of the biochemical and chemical oxygen demand and total suspended solids in wastewater treatment plants: Data-mining approach. *Journal of Cleaner Production*, 296, 126533. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2021.126533>
- Bilal, M., Mehmood, S., Rasheed, T., & Iqbal, H. M. N. (2020). Antibiotics traces in the aquatic environment: persistence and adverse environmental impact. *Current*

- Opinion in Environmental Science and Health*, 13, 68–74.
<https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.11.005>
- Black, C. A., Evans, D. D., White, J. L., Ensminger, L. E., & Clark, F. E. (2016). Methods of soil analysis: Part 2. *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*, 1–1572.
<https://doi.org/10.2134/AGRONMONOGR9.2.2ED>
- Brix, H., Arias, C. A., & Del Bubba, M. (2001). Media selection for sustainable phosphorus removal in subsurface flow constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 44(11–12), 47–54. <https://doi.org/10.2166/WST.2001.0808>
- Camacho-Muñoz, D., Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2014). Concentration evolution of pharmaceutically active compounds in raw urban and industrial wastewater. *Chemosphere*, 111, 70–79.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.03.043>
- Carlson, M., & Thompson, R. D. (2000). Analyte Loss Due to Membrane Filter Adsorption as Determined by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 38(2), 77–83.
<https://doi.org/10.1093/CHROMSCI/38.2.77>
- Carrajola, J. (2020). *Papel da matriz composta por materiais argilosos e carvão ativado na remoção de fármacos em LCM* [Dissertação de Mestrado em Bioquímica apresentada na Universidade de Évora].
- Chen, L., Li, Y., Lin, L., Tian, X., Cui, H., & Zhao, F. (2020). Degradation of diclofenac by *B. subtilis* through a cytochrome P450-dependent pathway. *Environmental Technology & Innovation*, 20, 101160. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2020.101160>
- Chonova, T., Keck, F., Labanowski, J., Montuelle, B., Rimet, F., & Bouchez, A. (2016). Separate treatment of hospital and urban wastewaters: A real scale comparison of effluents and their effect on microbial communities. *Science of the Total Environment*, 542, 965–975. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.161>
- Coelho, M. M., Lado Ribeiro, A. R., Sousa, J. C. G., Ribeiro, C., Fernandes, C., Silva, A. M. T., & Tiritan, M. E. (2019). Dual enantioselective LC–MS/MS method to analyse chiral drugs in surface water: Monitoring in Douro River estuary. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 170, 89–101.
<https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2019.03.032>
- Couto, C. F., Lange, L. C., & Amaral, M. C. 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.
<https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2019.100927>
- Del Bubba, M., Arias, C. A., & 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(14), 3390–3400.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00231-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00231-8)

- di Luca, G. A., Mufarrege, M. M., Hadad, H. R., & Maine, M. A. (2019). Nitrogen and phosphorus removal and *Typha domingensis* tolerance in a floating treatment wetland. *Science of The Total Environment*, 650, 233–240. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.09.042>
- Dordio, Belo, M., Martins Teixeira, D., Palace Carvalho, A. J., Dias, C. M. B., Picó, Y., & Pinto, A. P. (2011). Evaluation of carbamazepine uptake and metabolism by *Typha* spp., a plant with potential use in phytotreatment. *Bioresource Technology*, 102(17), 7827–7834. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.050>
- Dordio, & Carvalho, A. (2013). Organic xenobiotics removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of the support matrix. *Journal of Hazardous Materials*, 252–253, 272–292. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2013.03.008>
- Dordio, & Carvalho, A. (2015). Removal of pharmaceuticals in conventional wastewater treatment plants. Barrett, L. M. (Ed.) *Wastewater Treatment: Processes, Management Strategies and Environmental/Health Impacts*, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, 1–44.
- Dordio, & Carvalho, A. (2018). Removal Processes of Pharmaceuticals in Constructed Wetlands. In *Constructed Wetlands for Industrial Wastewater Treatment*. In S. Alexandros (Ed.), 584.
- Dordio, 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* (2nd Editio, p. 40).
- Dordio, Ferro, R., Teixeira, D., Palace, A. J., Pinto, A. P., & Dias, C. M. B. (2011). Study on the use of *Typha* spp. for the phytotreatment of water contaminated with ibuprofen. <https://doi.org/10.1080/03067311003782708>, 91(7–8), 654–667. <https://doi.org/10.1080/03067311003782708>
- Dordio, Miranda, S., Prates Ramalho, J. P., & Carvalho, A. J. P. (2017a). Mechanisms of removal of three widespread pharmaceuticals by two clay materials. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 575–583. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.091>
- Dordio, Silva, V., & Carvalho, A. J. P. (2017). Carbamazepine in the Environment: Sources, Fate and Adverse Effects. In B. A. Woods (Ed.), *Carbamazepine: Indications, Contraindications and Adverse Effects* (pp. 15–72).
- Dordio, A. V., Miranda, S., Prates Ramalho, J. P., & Carvalho, A. J. P. (2017b). Mechanisms of removal of three widespread pharmaceuticals by two clay materials. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 575–583. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.05.091>
- Enfrin, M., Dumée, L. F., & Lee, J. (2019). Nano/microplastics in water and wastewater treatment processes – Origin, impact and potential solutions. *Water Research*, 161, 621–638. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2019.06.049>
- 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(August 2019), 172813. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172813>
- Fernandes, Almeida, C. M. R., Salgado, M. A., Carvalho, M. F., & Mucha, A. P. (2021). Pharmaceutical compounds in aquatic environments— occurrence, fate and bioremediation prospective. *Toxics*, 9(10), 257. <https://doi.org/10.3390/TOXICS9100257/S1>
- Fernandes, M. J., Paíga, P., Silva, A., Llaguno, C. P., Carvalho, M., Vázquez, F. M., & Delerue-Matos, C. (2020). Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal. *Chemosphere*, 239, 124729. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124729>
- Galwa-Widera, M. (2019). Plant-based technologies for removal of pharmaceuticals and personal care products. *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology Emerging Contaminants and Micro Pollutants*, 297–319. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816189-0.00013-5>
- Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V. K., Tushara Chaminda, G. G., An, A. K., & Kumar, M. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, 6, 169–180. <https://doi.org/10.1016/J.GSD.2017.12.009>
- Golovko, O., Rehrl, A. L., Köhler, S., & Ahrens, L. (2020). Organic micropollutants in water and sediment from Lake Mälaren, Sweden. *Chemosphere*, 258, 127293. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.127293>
- Gorito, A. M., Ribeiro, A. R., Almeida, C. M. R., & Silva, A. M. T. (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 (Barking, Essex: 1987)*, 227, 428–443. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2017.04.060>
- Grandclément, C., Piram, A., Petit, M.-E., Seyssiecq, I., Laffont-Schwob, I., Vanot, G., Tiliacos, N., Roche, N., & Doumenq, P. (2020). *Biological Removal and Fate Assessment of Diclofenac Using Bacillus subtilis and Brevibacillus laterosporus Strains and Ecotoxicological Effects of Diclofenac and 49-Hydroxy-diclofenac*. <https://doi.org/10.1155/2020/9789420>
- Ilyas, H., & van Hullebusch, E. D. (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(13), 14342–14364. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-08165-W/TABLES/5>
- Infarmed. (2009). *Aprovado em 23-01-2009 infarmed*.
- Jardim Botânico UTAD | *Typha latifolia*. (2023). https://jb.utad.pt/especie/Typha_latifolia
- Kamilya, T., Majumder, A., Yadav, M. K., Ayoob, S., Tripathy, S., & Gupta, A. K. (2022). Nutrient pollution and its remediation using constructed wetlands: Insights into removal and recovery mechanisms, modifications and sustainable aspects.

- Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107444.
<https://doi.org/10.1016/J.JECE.2022.107444>
- Katsikaros, A. G., & Chrysikopoulos, C. v. (2021). Occurrence and distribution of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) detected in lakes around the world - A review. *Environmental Advances*, 6, 100131.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVADV.2021.100131>
- Kay, P., Hughes, S. R., Ault, J. R., Ashcroft, A. E., & Brown, L. E. (2017). Widespread, routine occurrence of pharmaceuticals in sewage effluent, combined sewer overflows and receiving waters. *Environmental Pollution*, 220, 1447–1455.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2016.10.087>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2019.117672>
- Kosek, K., Luczkiewicz, A., Fudala-Książek, S., Jankowska, K., Szopińska, M., Svahn, O., Tränckner, J., Kaiser, A., Langas, V., & Björklund, E. (2020). Implementation of advanced micropollutants removal technologies in wastewater treatment plants (WWTPs) - Examples and challenges based on selected EU countries. In *Environmental Science and Policy* (Vol. 112, pp. 213–226). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.envsci.2020.06.011>
- Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2014). Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, 466–467, 421–438.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.07.044>
- Kumar, M., Borah, P., & Devi, P. (2020). Priority and emerging pollutants in water. *Inorganic Pollutants in Water*, 33–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818965-8.00003-2>
- Li, X. qing, Hua, Z. lin, Wu, J. yi, & Gu, L. (2021). Removal of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in constructed wetlands: Considerable contributions of submerged macrophytes and the microbial community. *Water Research*, 197, 117080.
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2021.117080>
- Li, X., Wu, S., Yang, C., & Zeng, G. (2020). Microalgal and duckweed based constructed wetlands for swine wastewater treatment: A review. *Bioresource Technology*, 318, 123858. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123858>
- Liu, Y., Su, A., Tian, R., Li, J., Liu, L., & Du, G. (2020). Developing rapid growing *Bacillus subtilis* for improved biochemical and recombinant protein production. *Metabolic Engineering Communications*, 11, e00141.
<https://doi.org/10.1016/J.MEC.2020.E00141>
- Macário, M., Saraiva, A., Ericka, F., Luís, F., & Oliveira, M. (2018). Leitos húmidos construídos como alternativa aos sistemas de tratamento de águas residuais

- convencionais: revisão. *Revista Da UIIPS*, 6(3), 83–97. <https://doi.org/10.25746/ruiips.v6.i3.16150>
- Machado, A. I., Dordio, A., Fragoso, R., Leitão, A. E., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.002>
- Machado, Fragoso, R., Dordio, A., & Duarte, E. (2019). Furosemide in water matrix: HPLC-UV method development and degradation studies. *Rev. Ambient. Água*, 15. <https://doi.org/https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2406>
- Mackul'ak, T., Černanský, S., Fehér, M., Birošová, L., & Gál, M. (2019). Pharmaceuticals, drugs, and resistant microorganisms — environmental impact on population health. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 9, 40–48. <https://doi.org/10.1016/J.COESH.2019.04.002>
- Majewsky, M., Wagner, D., Delay, M., Bräse, S., Yargeau, V., & Horn, H. (2014). Antibacterial activity of sulfamethoxazole transformation products (TPs): General relevance for sulfonamide TPs modified at the para position. *Chemical Research in Toxicology*, 27(10), 1821–1828. <https://doi.org/10.1021/TX500267X>
- Marchlewicz, A., Domaradzka, D., Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2016a). *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a Gram-Positive Bacteria Able to Degrade Naproxen and Ibuprofen. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(6). <https://doi.org/10.1007/S11270-016-2893-0>
- Marchlewicz, A., Domaradzka, D., Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2016b). *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a Gram-Positive Bacteria Able to Degrade Naproxen and Ibuprofen. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(6). <https://doi.org/10.1007/S11270-016-2893-0>
- Marchlewicz, A., Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Nowak, A., Wilczyńska, S., & Wojcieszynska, D. (2017). Toxicity and biodegradation of ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b). *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(8), 7572–7584. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-8372-3>
- Marchlewicz, A., Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2017). Dynamics of ibuprofen biodegradation by *Bacillus* sp. B1(2015b). *Archives of Environmental Protection*, 43(2), 60–64. <https://doi.org/10.1515/AEP-2017-0020>
- Mendoza, A., Aceña, J., Pérez, S., López de Alda, M., Barceló, D., Gil, A., & Valcárcel, Y. (2015). Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard. *Environmental Research*, 140, 225–241. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2015.04.003>
- Mestre, A. S., Carvalho, A. P., Matos Lale, J., & Gomis Berenguer, A. (2019). Photocatalytic Degradation of Pharmaceuticals Carbamazepine, Diclofenac, and Sulfamethoxazole by Semiconductor and Carbon Materials: A Review. *Molecules*

- Michlig, N., Lehotay, S. J., & Lightfield, A. R. (2024). Comparison of filter membranes in the analysis of 183 veterinary and other drugs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 47(3). <https://doi.org/10.1002/JSSC.202300696>
- Mlih, R., Bydalek, F., Klumpp, E., Yaghi, N., Bol, R., & Wenk, J. (2020). Light-expanded clay aggregate (LECA) as a substrate in constructed wetlands – A review. In *Ecological Engineering* (Vol. 148, p. 105783). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.105783>
- Mufarrege, M. D. L. M., di Luca, G. A., Hadad, H. R., & Maine, M. A. (2021). Exposure of *Typha domingensis* to high concentrations of multi-metal and nutrient solutions: Study of tolerance and removal efficiency. *Ecological Engineering*, 159, 106118. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2020.106118>
- Muñiz-González, A. B. (2021). Ibuprofen as an emerging pollutant on non-target aquatic invertebrates: Effects on *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 81, 103537. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2020.103537>
- Murshid, S., & Dhakshinamoorthy, G. P. (2019). Biodegradation of Sodium Diclofenac and Mefenamic Acid: Kinetic studies, identification of metabolites and analysis of enzyme activity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 144, 104756. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2019.104756>
- Najafzadeh, M., & Zeinolabedini, M. (2019). Prognostication of waste water treatment plant performance using efficient soft computing models: An environmental evaluation. *Measurement*, 138, 690–701. <https://doi.org/10.1016/J.MEASUREMENT.2019.02.014>
- Nannou, C., Ofrydopoulou, A., Evgenidou, E., Heath, D., Heath, E., & Lambropoulou, D. (2019). Analytical strategies for the determination of antiviral drugs in the aquatic environment. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 24, e00071. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00071>
- Nguyen, H. T., Thai, P. K., Kaserzon, S. L., O'Brien, J. W., Eaglesham, G., & Mueller, J. F. (2018). Assessment of drugs and personal care products biomarkers in the influent and effluent of two wastewater treatment plants in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Science of The Total Environment*, 631–632, 469–475. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.02.309>
- Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., & Dong, H. (2020). Biological uptake, depuration and biochemical effects of diclofenac and carbamazepine in *Carassius carassius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111106. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2020.111106>
- Oliveira, M., Atalla, A. A., Frihling, B. E. F., Cavalheri, P. S., Migliolo, L., & Filho, F. J. C. M. (2019). Ibuprofen and caffeine removal in vertical flow and free-floating macrophyte constructed wetlands with *Heliconia rostrata* and *Eichornia crassipes*.

- Oropesa, A. L., Floro, A. M., & Palma, P. (2016). Assessment of the effects of the carbamazepine on the endogenous endocrine system of *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(17), 17311–17321. <https://doi.org/10.1007/S11356-016-6907-7/METRICS>
- Paíga, P., Correia, M., Fernandes, M. J., Silva, A., Carvalho, M., Vieira, J., Jorge, S., Silva, J. G., Freire, C., & Delerue-Matos, C. (2019). Assessment of 83 pharmaceuticals in WWTP influent and effluent samples by UHPLC-MS/MS: Hourly variation. *Science of The Total Environment*, 648, 582–600. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.08.129>
- Paíga, P., Santos, L. H. M. L. M., Ramos, S., Jorge, S., Silva, J. G., & Delerue-Matos, C. (2016). Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Science of the Total Environment*, 573, 164–177. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.089>
- Palma, P., Fialho, S., Lima, A., Novais, M. H., Costa, M. J., Montemurro, N., Pérez, S., & de Alda, M. L. (2020). Pharmaceuticals in a Mediterranean Basin: The influence of temporal and hydrological patterns in environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, 709, 136205. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.136205>
- Peña-Guzmán, C., Ulloa-Sánchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopez-Barrera, E., Alvarez, J., & Rodriguez-Pinzón, M. (2019). Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. In *Journal of Environmental Management* (Vol. 237, pp. 408–423). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>
- Pereira, A. M. P. T., Silva, L. J. G., Laranjeiro, C. S. M., Meisel, L. M., Lino, C. M., & Pena, A. (2017). Human pharmaceuticals in Portuguese rivers: The impact of water scarcity in the environmental risk. *Science of The Total Environment*, 609, 1182–1191. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.07.200>
- Petrie, B., Proctor, K., Youdan, J., Barden, R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2017). Critical evaluation of monitoring strategy for the multi-residue determination of 90 chiral and achiral micropollutants in effluent wastewater. *Science of The Total Environment*, 579, 569–578. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.11.059>
- Pillai, S. A., Chobisa, D., Urimi, D., & Ravindra, N. (2016). *Filters and Filtration: A Review of Mechanisms That Impact Cost, Product Quality and Patient Safety*.
- Quesada, H. B., Baptista, A. T. A., Cusioli, L. F., Seibert, D., de 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. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.02.009>
- Rathi, B. S., Kumar, P. S., & Vo, D. V. N. (2021). Critical review on hazardous pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, removal technologies and risk

- assessment. *Science of The Total Environment*, 797, 149134. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149134>
- Rivera-Jaimes, J. A., Postigo, C., Melgoza-Alemán, R. M., Aceña, J., Barceló, D., & López de Alda, M. (2018). Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: Occurrence and environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, 613–614, 1263–1274. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.09.134>
- Roberts, J., Kumar, A., Du, J., Hepplewhite, C., Ellis, D. J., Christy, A. G., & Beavis, S. G. (2016). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Australia's largest inland sewage treatment plant, and its contribution to a major Australian river during high and low flow. *Science of The Total Environment*, 541, 1625–1637. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.03.145>
- Sabri, N. A., Schmitt, H., Van Der Zaan, B., Gerritsen, H. W., Zuidema, T., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2020). Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 102245. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2018.03.004>
- Sahoo, K. K., Arakha, M., Sarkar, P., Robin, D. P., & Jha, S. (2016). Enhancement of properties of recycled coarse aggregate concrete using bacteria. *International Journal of Smart and Nano Materials*, 7(1), 22–38. <https://doi.org/10.1080/19475411.2016.1152322>
- Santos, M. T., Barreiros, A., & Albuquerque, A. (2016). *Tratamento de águas residuais - Operações e Processos de Tratamento Físico e Químico*.
- Schapira, M., Manor, O., Golan, N., Kalo, D., Mordehay, V., Kirshenbaum, N., Goldsmith, R., Chefetz, B., & Paltiel, O. (2020). Involuntary human exposure to carbamazepine: A cross-sectional study of correlates across the lifespan and dietary spectrum. *Environment International*, 143(July), 105951. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105951>
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(3), 446–459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Shahcheraghi, S., Ayatollahi, J., & Lotfi, M. (2015). Applications of Bacillus subtilis as an important bacterium in medical sciences and human life . *Tropical Journal of Medical Research*, 18(1), 1. <https://doi.org/10.4103/1119-0388.152530>
- Sharma, R., & Malaviya, P. (2022). Constructed wetlands for textile wastewater remediation: A review on concept, pollutant removal mechanisms, and integrated technologies for efficiency enhancement. *Chemosphere*, 290, 133358. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.133358>
- Silva, V. (2023). *Fitorremediação de fármacos em águas residuais*.
- Son, D. J., Kim, C. S., Park, J. W., Lee, J. H., Lee, S. H., Shin, S. K., & Jeong, D. H. (2022). Fate evaluation of pharmaceuticals in solid and liquid phases at biological

- process of full-scale municipal wastewater treatment plants. *Journal of Water Process Engineering*, 46, 102538. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2021.102538>
- Sousa, J. C. G., Barbosa, M. O., Ribeiro, A. R. L., Ratola, N., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2020). Distribution of micropollutants in estuarine and sea water along the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*, 154, 111120. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2020.111120>
- Sousa, J. C. G., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Ribeiro, C., Tiritan, M. E., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2019). Monitoring of the 17 EU Watch List contaminants of emerging concern in the Ave and the Sousa Rivers. *Science of The Total Environment*, 649, 1083–1095. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.08.309>
- Stamenković, S., Beškoski, V., Karabegović, I., Lazić, M., & Nikolić, N. (2018). Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1), e09R01-e09R01. <https://doi.org/10.5424/SJAR/2018161-12117>
- Stamenković-Stojanović, S., Karabegović, I., Beškoski, V., Nikolić, N., & Lazić, M. (2020). *Bacillus subtilis* NCIM2063 batch cultivation: The influence of the substrate concentration and oxygen transfer rate on the biomass yield. *Advanced Technologies*, 9(1), 44–49. <https://doi.org/10.5937/SAVTEH2001044S>
- Stojanović, S. S., Karabegović, I., Beškoski, V., Nikolić, N., & Lazić, M. (2019). *Bacillus* based microbial formulations: Optimization of the production process. *Hem. Ind*, 73(3), 169–182. <https://doi.org/10.2298/HEMIND190214014S>
- Stojanović, S. S., Karabegović, I., Beškoski, V., Nikolić, N., & Lazić, M. (2020). BACILLUS SUBTILIS NCIM2063 BATCH CULTIVATION: THE INFLUENCE OF THE SUBSTRATE CONCENTRATION AND OXYGEN TRANSFER RATE ON THE BIOMASS YIELD. *Advanced Technologies* 9(1), 44–49. <https://doi.org/10.5937/savteh2001044S>
- Tang, Y., Yin, M., Yang, W., Li, H., Zhong, Y., Mo, L., Liang, Y., Ma, X., & Sun, X. (2019). Emerging pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, and risk assessment. *Water Environment Research : A Research Publication of the Water Environment Federation*, 91(10), 984–991. <https://doi.org/10.1002/WER.1163>
- Tewari, A., Bagchi, A., & Raha, A. (2017). *Preparation, Estimation and Validation of the parameters of the standard curve of Ibuprofen by comparative study*. https://www.researchgate.net/publication/318786839_Preparation_Estimation_and_Validation_of_the_parameters_of_the_standard_curve_of_Ibuprofen_by_comparative_study
- Tran, N. H., Reinhard, M., & Gin, K. Y. H. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research*, 133, 182–207. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.12.029>

- Varma, M., Gupta, A. K., Ghosal, P. S., & Majumder, A. (2021). A review on performance of constructed wetlands in tropical and cold climate: Insights of mechanism, role of influencing factors, and system modification in low temperature. *Science of The Total Environment*, 755, 142540. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.142540>
- Vasilachi, I. C., Asiminicesei, D. M., Fertu, D. I., & Gavrilescu, M. (2021). Occurrence and Fate of Emerging Pollutants in Water Environment and Options for Their Removal. *Water* 2021, Vol. 13, Page 181, 13(2), 181. <https://doi.org/10.3390/W13020181>
- Verlicchi, P., al Aukidy, M., Jelic, A., Petrović, M., & Barceló, D. (2014). Comparison of measured and predicted concentrations of selected pharmaceuticals in wastewater and surface water: A case study of a catchment area in the Po Valley (Italy). *Science of the Total Environment*, 470–471, 844–854. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.026>
- Verlicchi, P., al Aukidy, M., & 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. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2012.04.028>
- Verlicchi, P., Zambello, E., & al Aukidy, M. (2013). Removal of Pharmaceuticals by Conventional Wastewater Treatment Plants. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 62, 231–286. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62657-8.00008-2>
- Wang, J., Wang, W., Xiong, J., Li, L., Zhao, B., Sohail, I., & He, Z. (2021). A constructed wetland system with aquatic macrophytes for cleaning contaminated runoff/storm water from urban area in Florida. In *Journal of Environmental Management* (Vol. 280, p. 111794). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111794>
- Xiong, P., Zhang, H., Li, G., Liao, C., & Jiang, G. (2021). Adsorption removal of ibuprofen and naproxen from aqueous solution with Cu-doped Mil-101(Fe). *Science of The Total Environment*, 797, 149179. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149179>
- Xu, C., Niu, L., Guo, H., Sun, X., Chen, L., Tu, W., Dai, Q., Ye, J., Liu, W., & Liu, J. (2019). Long-term exposure to the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) naproxen causes thyroid disruption in zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Science of The Total Environment*, 676, 387–395. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.04.323>
- Zhang, Y., Lv, T., Carvalho, P. N., Arias, C. A., Chen, Z., & Brix, H. (2016). Removal of the pharmaceuticals ibuprofen and iohexol by four wetland plant species in hydroponic culture: plant uptake and microbial degradation. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(3), 2890–2898. <https://doi.org/10.1007/S11356-015-5552-X>
- Zhang, Y., Peng, M., Wang, L., & Yu, C. (2018). Association of diurnal temperature range with daily mortality in England and Wales: A nationwide time-series study.

Science of The Total Environment, 619–620, 291–300.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.11.056>

Zhou, S., Di Paolo, C., Wu, X., Shao, Y., Seiler, T. B., & Hollert, H. (2019). Optimization of screening-level risk assessment and priority selection of emerging pollutants – The case of pharmaceuticals in European surface waters. *Environment International*, 128, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.04.034>

Ziajahromi, S., Neale, P. A., Rintoul, L., & Leusch, F. D. L. (2017). Wastewater treatment plants as a pathway for microplastics: Development of a new approach to sample wastewater-based microplastics. *Water Research*, 112, 93–99. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.01.042>

Anexos

A. Determinação do comprimento de onda de quantificação

Para a seleção do comprimento de onda a utilizar para a quantificação dos fármacos presentes na solução aquosa utilizada nos estudos, fez-se um varrimento de absorção molecular na zona do UV, entre os c.d.o de 200 e 350 nm, para cada uma das soluções padrão de 10 mg/L contendo apenas cada um dos fármacos isolados.

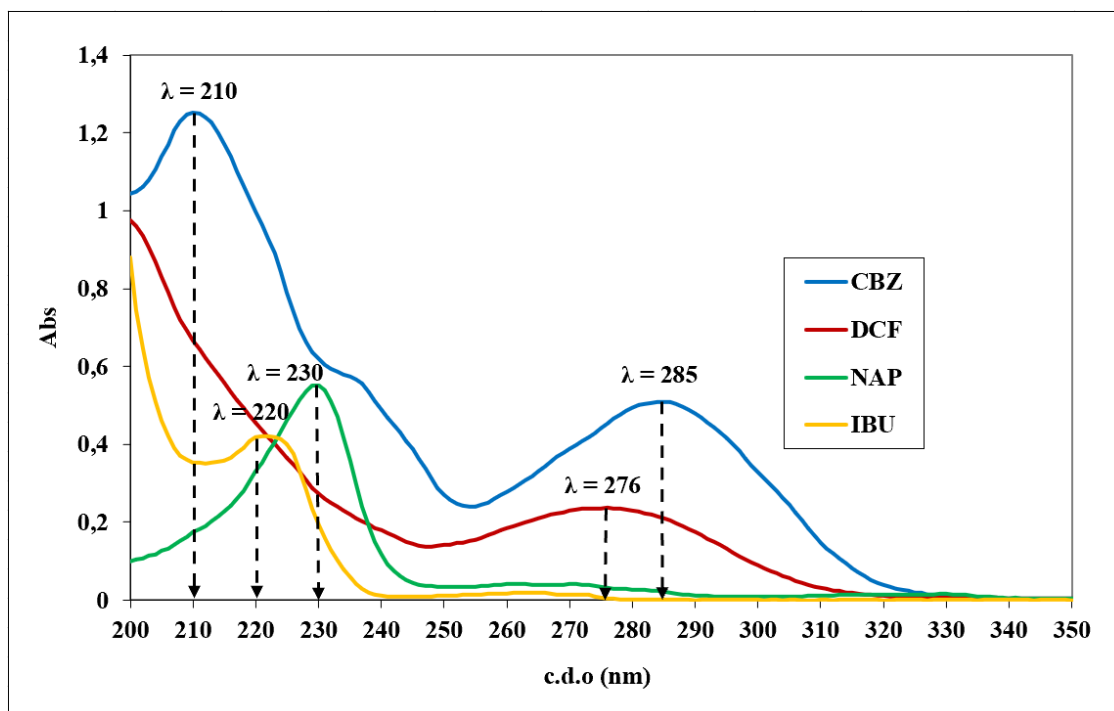


Figura 0.1 - Espectro de absorção molecular na zona do UV dos quatro fármacos

Uma vez que o equipamento utilizado possuía um detetor UV-Vis foi necessária a seleção de apenas um comprimento de onda que, mesmo não correspondendo ao máximo de absorvência dos quatro fármacos, permitiu a quantificação simultânea de todos os fármacos presentes em solução. Assim, o comprimento de onda selecionado foi de 220 nm, dado que é o máximo de absorvência para o ibuprofeno que é o composto com menor absorvência na gama dos UV e os restantes fármacos também possuem uma elevada absorvência a 220 nm.