



Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada

Programa de Doutoramento em Bioquímica

Tese de Doutoramento

Fitorremediação de fármacos em águas residuais

Vladimir Lenine Mendes da Silva

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

Évora 2024



Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada

Programa de Doutoramento em Bioquímica

Tese de Doutoramento

Fitorremediação de fármacos em águas residuais

Vladimir Lenine Mendes da Silva

Orientador(es) | Alfredo Jorge Palace Carvalho

Ana Vitória Dordio

Évora 2024



A tese de doutoramento foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor do Instituto de Investigação e Formação Avançada:

Presidente | Ana Teresa Caldeira (Universidade de Évora)

Vogais | Alfredo Jorge Palace Carvalho (Universidade de Évora) (Orientador)
Ana Paula Pinto (Universidade de Évora)
Maria Adelaide Araújo Almeida (Instituto Politécnico de Beja)
Maria Cristina Sousa Coutinho de Calheiros e Menezes de Noronha Madureira
(Universidade do Porto)
Renata Alexandra Alves Gomes Ferreira (Escola Superior Agrária de Beja
(ESAB/IPBeja))

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, por ser a fortaleza e esperança em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Doutor Alfredo Carvalho pela disponibilidade evidenciada durante a realização deste trabalho, pelas críticas construtivas, dedicação, incentivo e paciência e principalmente pelos conhecimentos que me transmitiu ao longo da minha jornada acadêmica.

À Professora Doutora Ana Vitória Dordio pelo constante apoio, orientação, compreensão, e importantes contribuições para a realização deste trabalho.

Aos meus pais por acreditarem em mim, pelo apoio, compreensão, incentivo e confiança.

A minha namorada e aos meus filhos por estarem sempre ao meu lado e por me darem todo o incentivo necessário e nunca me deixarem desistir. Agradeço todo o apoio e a amizade manifestada.

Ao Instituto Camões pelo financiamento da bolsa de estudo que me permitiu concluir com sucesso o programa de doutoramento em Bioquímica.

Por fim, um agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e académico e que estiveram sempre do meu lado durante o meu percurso académico.

Resumo

A detecção de fármacos em águas é um problema ambiental emergente, que decorre da reduzida eficiência da sua remoção pelas ETARs. Em regiões como Cabo Verde, onde há interesse na reutilização de águas residuais devido à escassez de água, este problema torna-se mais agudo. A fitorremediação surge como uma tecnologia atrativa, tendo sido já comprovadas boas eficiências deste tipo de solução na remoção de diversos micropoluentes orgânicos.

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a eficiência de remoção de vários fármacos (Sulfametoxazol, Trimetoprim, Ibuprofeno, Diclofenac, Naproxeno, Furosemida e Carbamazepina) de água dopada, utilizando um microcosmo de Leitos Construídos de Macrófitas (LCMs) com uma matriz de suporte constituída por Vermiculite 3 e LECA 2/4, e plantado com *Typha* spp., tendo em vista uma possível aplicação em Cabo Verde.

Foi avaliada a capacidade de remoção dos fármacos pela matriz, tendo-se verificado que a matriz por si só contribui para a remoção da maior parte da quantidade de fármacos presentes em solução (38% - 84%), após 168 horas de contacto. No entanto, globalmente o microcosmos de LCM atingiu elevadas eficiências de remoção (71% - 96%), pelo que a presença de plantas terá contribuído para uma remoção adicional de (9% - 35%) relativamente ao leito não plantado.

Para otimizar a eficiência da matriz de suporte, testou-se um novo material, a fibra de coco, que se revelou promissor.

A partir da análise dos efeitos no crescimento das folhas, nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos e aparente ausência de sinais visuais de toxicidade, e nas atividades de enzimas antioxidantes, é possível inferir que as plantas de *Typha* spp. conseguem tolerar os efeitos tóxicos decorrentes da exposição aos fármacos.

Ao longo dos 3 anos de ensaios, verificou-se que este sistema teve um aumento da eficiência na remoção dos fármacos, mantendo a matriz uma eficiência de remoção aproximadamente constante.

Palavras-chave: fitorremediação, fármacos, água residual, macrófitas, matriz de suporte

Phytoremediation of pharmaceuticals in wastewater

Abstract

Pharmaceuticals' detection in water is an emergent environmental problem which results from their generally low removal efficiencies by WWTPs. In regions such as Cape Verde, where there is a large interest in water reuse due to its scarcity, this problem becomes more acute. Phytoremediation emerges as an attractive technology, which has already shown good efficiencies in the removal of several types of organic micropollutants.

The main goal of this work was to evaluate the removal efficiency of some pharmaceuticals (Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Ibuprofen, Diclofenac, Naproxen, Furosemide and Carbamazepine) from doped water, using microcosms of Constructed Wetlands Systems (CWSs) with a support matrix composed by Vermiculite 3 and LECA 2/4, and planted with *Typha* spp., targeting a potential application in Cape Verde.

The support matrix capacity for pharmaceuticals removal was evaluated, and it was found that it alone contributed with the removal of most part of the amounts of pharmaceuticals initially present in solution (38% - 84%) after 168 hours of contact. However, the CWS microcosms attained quite high global removal efficiencies (71% - 96%), which allows estimating that the presence of the plants have contributed to an additional removal (9% - 35%) relatively to the non-planted systems.

As an attempt to further optimize the support matrix efficiency, a new material was tested, coconut fiber, which seemed promising.

From the analysis of the effects on leaf growth, the concentrations of photosynthetic pigments and the seemingly absence of visual signs of toxicity, and the activities of antioxidant enzymes, it is possible to infer that the plants of *Typha* spp. can tolerate the toxic effects caused by their exposure to these pharmaceuticals.

Throughout three years of assays, it was observed that these CWSs had an increase over the years for the pharmaceuticals removal efficiency, while the matrix alone kept an approximately constant efficiency.

Abreviaturas

Abs – Absorvância

ANOVA – Análise de variância

c.d.o. – Comprimento de onda

CAT – Catalase

CBZ – Carbamazepina

CitC-Fe³⁺ – Citocromo C-férrico

DAD – Detetor de Diode-Array (matriz de díodos), do inglês "Diode-Array Detector"

DCF – Diclofenac

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

FUR – Furosemida

GPX – Guaiacol-peroxidase

GSH – Glutathiona reduzida

h – Horas

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor DAD (Diode-Array Detector)

IBU – Ibuprofeno

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

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

LCM – Leitos Construídos de Macrófitas

LECA – Agregados de argila expandida (do inglês “Light Expanded Clay Aggregates”)

LOD – Limite de detecção instrumental (do inglês “Limit of Detection”)

LOQ – Limite de quantificação instrumental (do inglês “Limit of Quantitation”)

Min – Minutos

NADP⁺ – Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidada

NADPH – Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reduzida

NAP – Naproxeno

ND – Não Detetado

O₂ – Oxigénio molecular

O₂^{·-} – Radical anião superóxido

OH[·] – Radical hidroxilo

pKa – Constante de ionização

ROS – Espécies reativas de oxigénio (do inglês “Reactive oxygen Species”)

SMZ – Sulfametoxazol

SOD – Superóxido dismutase

SPE – Extração em fase sólida (do inglês “Solid-Phase Extraction”)

TCR – Taxa de crescimento relativo das plantas

TMP – Trimetoprim

U – Unidade de atividade enzimática

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
ÍNDICE GERAL.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
1. Problemática.....	1
2. Objetivos Científicos.....	5
3. Fundamento teórico.....	7
3.1. Os fármacos no ambiente.....	8
3.2. Seleção dos fármacos a estudar.....	11
3.3. Processos de remoção de fármacos de águas residuais.....	19
3.4. Leitões Construídos de Macrófitas como possível tecnologia de tratamento das águas contaminadas.....	23
3.4.1. Componentes dos LCM e processos de remoção.....	28
3.4.2. Papel da matriz na remoção dos fármacos.....	30
3.4.3. Papel das plantas e dos microrganismos na remoção dos fármacos.....	34
3.5. Resposta fisiológica e bioquímica das plantas ao <i>stress</i> abiótico.....	37
3.5.1. Fatores de crescimento e alterações na taxa de fotossíntese.....	39
3.5.2. Stress Oxidativo.....	40
3.5.3. Mecanismos de defesa antioxidante.....	40
4. Metodologia experimental.....	44
4.1. Reagentes e material.....	45
4.2. Metodologia analítica.....	46
4.2.1. Otimização das condições de quantificação dos fármacos em solução por HPLC-DAD.....	47
4.2.1.1. Otimização das condições de quantificação espectrofotométrica dos fármacos em solução.....	47
4.2.1.2. Condições de quantificação dos fármacos no HPLC-DAD.....	48
4.2.1.3. Validação do método analítico.....	50
4.3. Avaliação da capacidade de remoção do fármaco em microcosmos de LCMs plantados com <i>Typha</i> spp.....	51
4.3.1. Caracterização físico-química da matriz de suporte.....	51

4.3.2. Recolha e aclimação das plantas	51
4.3.3. Montagem dos microcosmos de LCMs.....	52
4.3.4. Condições de operação dos LCMs e recolha de amostras.....	55
4.3.5. Ensaio para avaliação de remoção de fármacos.....	56
4.3.5.1. Ensaio I.....	56
4.3.5.2. Ensaio II	56
4.3.5.3. Ensaio III.....	57
4.4. Resposta fisiológica e bioquímica das plantas ao stress abiótico.....	58
4.4.1. Parâmetros de crescimento	58
4.4.2. Determinação da clorofila e carotenoides	58
4.4.3. Determinação da atividade enzimática antioxidante	59
4.4.3.1. Extração do material vegetal	59
4.4.3.2. Catalase (CAT).....	59
4.4.3.3. Superóxido-dismutase (SOD)	60
4.4.3.4. Guaiacol Peroxidase (GPX)	60
4.5. Análise Estatística dos Resultados	61
5. Resultados e discussão	62
5.1. Otimização da metodologia analítica para a deteção e quantificação dos fármacos	63
5.1.1. Determinação do c.d.o.....	63
5.1.2. Otimização do volume de amostra a filtrar	64
5.1.3. Quantificação dos fármacos em solução aquosas e validação do método	72
5.2. Caracterização físico-química da matriz de suporte.....	74
5.3. Avaliação da capacidade de remoção dos fármacos em microcosmos de LCMs e resposta das plantas ao stress abiótico.....	77
5.3.1. Ensaio I.....	77
5.3.1.1. Condições relevantes dos ensaios	77
5.3.1.2. Remoção dos fármacos pelos microcosmos de LCM	82
5.3.1.3. Resposta fisiológica e bioquímica das plantas ao stress abiótico.....	86
5.3.2. Ensaio II	95
5.3.2.1. Condições relevantes dos ensaios	95
5.3.2.2. Remoção dos fármacos pelos microcosmos de LCM	99
5.3.2.3. Resposta fisiológica e bioquímica das plantas ao stress abiótico.....	102
5.3.3. Ensaio III	107
5.3.3.1. Condições relevantes dos ensaios	107

5.3.3.2. Remoção dos fármacos pelos microcosmos de LCM	111
5.3.3.3. Resposta fisiológica e bioquímica das plantas ao stress abiótico.....	113
5.3.4. Evolução da eficiência dos Leitos na remoção dos vários fármacos	117
5.4. Avaliação da fibra de coco como potencial material para matriz de suporte.....	131
6. Conclusões e perspectivas futuras.....	135
6.1. Conclusão	136
6.2. Limitações do estudo e recomendações para futuras investigações.....	141
7. Bibliografia.....	143
Anexos.....	158

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Possíveis vias de entrada de fármacos no meio ambiente	9
Figura 2 - Estrutura molecular do Sulfametoxazol.....	13
Figura 3 - Estrutura molecular da Trimetoprim.....	14
Figura 4 - Estrutura molecular de Ibuprofeno	14
Figura 5 - Estrutura molecular do Diclofenac	15
Figura 6 - Estrutura molecular do Naproxeno	16
Figura 7 - Estrutura molecular da Furosemida	17
Figura 8 - Estrutura molecular da Carbamazepina	18
Figura 9 - Classificação das diversas espécies de macrófitas utilizadas nos leitos	25
Figura 10 - Classificação de Leitos de Macrófitas	26
Figura 11 - Leito de Macrófitas com escoamento superficial	26
Figura 12 - Leito de Macrófitas com escoamento superficial.	27
Figura 13 - Leito de macrófitas com escoamento sub- superficial vertical.....	28
Figura 14 - Leito de macrófitas com escoamento sub- superficial horizontal.....	28
Figura 15 - Principais processos físicos, químicos e biológicos responsáveis pela remoção dos poluentes nos LCM.....	29
Figura 16 - Aspeto dos flocos de Vermiculite.....	32
Figura 17 - Pedras de argila expandida - LECA.....	33
Figura 18 - Fibra de Cocos.	34
Figura 19 - Exemplo de uma macrófita emergente, neste caso <i>Typha</i> spp.	36
Figura 20 - Respostas das plantas ao stress abiótico	38
Figura 21 - Montagem dos sistemas de microcosmos.....	53
Figura 22 - Fotografia dos microcosmos no início dos ensaios	54
Figura 23 - Espectro de absorção dos diferentes fármacos a 10 mgL^{-1} , com identificação do máximo da absorvância ao qual foi depois feita a quantificação do composto.....	63
Figura 24 - Percentagens de recuperação dos 6 fármacos em concentrações 2 mg L^{-1} filtrados utilizando membranas de nylon $0,45 \mu\text{m}$ (marca Filtratech e Labfil) e membranas de PTFE $0,45 \mu\text{m}$ (marca Labfil).....	67
Figura 25 - Percentagens de recuperação dos 6 fármacos em concentrações de 10 mg L^{-1} , filtrados utilizando membranas de nylon $0,45 \mu\text{m}$ (marca Filtratech e Labfil) e membranas de PTFE $0,45 \mu\text{m}$ (marca Labfil).....	71
Figura 26 - Valores do pH do meio nos leitos ao longo do período de estudo.....	81
Figura 27 - Percentagem de remoção da FUR, SMZ, DCF em função do tempo de contacto para o ensaio I - matriz + planta.	84
Figura 28 - Percentagem de remoção da FUR, SMZ, DCF em função do tempo de contacto para o ensaio I – matriz.....	84
Figura 29 - Taxa de crescimento relativa média da folha maior, da menor e do crescimento médio das plantas dos leitos I e II ao fim de 168h de experiência (média \pm DP). Diferentes letras significam valores significativamente diferentes para $P < 0.05$	87

Figura 30 - Pigmentos fotossintéticos presentes na parte aérea da <i>Typha</i> spp. após 0, 3 e 6 dias de exposição, sujeita às concentrações de 0 (Leito I) ou 2,5 mg/L dos fármacos em solução (Leito II)	90
Figura 31 - Atividade enzimática da SOD, CAT e GPX na parte aérea da <i>Typha</i> spp. aos 0, 3 e 7 dias de exposição, sujeita às concentrações de 0 (Leito I) e 2.5 mg/L de fármacos em solução (Leito II) (média ± DP, n=9). Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes para P<0,05.	94
Figura 32 - Valores do pH do meio nos leitos ao longo do período de estudo.....	98
Figura 33 - Percentagem de remoção de FUR, SMZ, DCF e NAP para os tempos de contacto de 0,5 h; 8,5 h e 168 h. – Ensaio II – Leitos plantados (II).	100
Figura 34 - Percentagem de remoção da FUR, SMZ, DCF e NAP para os tempos de contacto de 0,5; 8,5 e 168 h. – Ensaio II – Apenas Matriz (Leito III)	100
Figura 35 - Taxa de crescimento relativo média da folha maior, da menor e do crescimento médio das plantas de <i>Typha</i> nos Leitos dos Leitos I e II ao fim de 168h de experiência (média ± DP). Diferentes letras significam valores significativamente diferentes para P<0.05.....	103
Figura 36 - Pigmentos fotossintéticos presentes na parte aérea da <i>Typha</i> spp. após 0, 3 e 6 dias de exposição, sujeita às concentrações de 0 (Leito I) ou 2,5 mg/L dos fármacos em solução (Leito II).	104
Figura 37 - Atividades enzimáticas da SOD, CAT e GPX na parte aérea da <i>Typha</i> spp. aos 0, 3 e 7 dias de exposição às concentrações de 0 mg/L (Leito I) e 2.5 mg/L de fármacos em solução (Leito II) (média ± DP, n=9). Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes para P<0,05.	106
Figura 38 - Valores do pH do meio nos leitos ao longo do período de estudo.....	110
Figura 39 - Eficiência de remoção de SMZ, DCF, NAP, CBZ e IBU para os tempos de contacto de 0,5; 8,5 e 168 h. – Ensaio III – Leitos Plantados.....	111
Figura 40 - Eficiência de remoção de SMZ, DCF, NAP, CBZ e IBU para os tempos de contacto de 0,5; 8,5 e 168 h. – Ensaio III – Leitos apenas com matriz.	112
Figura 41 - Taxa de crescimento relativo média da folha maior, da menor e do crescimento médio das plantas dos leitos I e II ao fim de 168h de experiência (média ± DP). Diferentes letras significam valores significativamente diferentes para P<0.05.	113
Figura 42 - Pigmentos fotossintéticos presentes na parte aérea da <i>Typha</i> spp. após 0, 3 e 6 dias de exposição, sujeita às concentrações de 0 (leito I) ou 2,5 mg/L dos fármacos em solução (leito II).....	115
Figura 43 - Atividade enzimática da SOD, CAT e GPX na parte aérea da <i>Typha</i> spp. aos 0, 3 e 7 dias de exposição, sujeita às concentrações de 0 (leito I) e 2.5 mg/L de fármacos em solução (leito II) (média ± DP, n=9). Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes para P<0,05.	116
Figura 44 - Cinética de remoção da FUR nos diferentes ensaios/ Leitos.....	119
Figura 45 - Cinética de remoção da SMZ nos diferentes ensaios/ Leitos.	121
Figura 46 - Cinética de remoção da CBZ nos diferentes ensaios/ Leitos.....	122
Figura 47 - Cinética de remoção da NAP nos diferentes ensaios/ Leitos.....	124
Figura 48 - Cinética de remoção da DCF nos diferentes ensaios/ Leitos.....	125
Figura 49 - Cinética de remoção do IBU nos diferentes ensaios/ Leitos.	126

Figura 50 - Comparação entre ensaios da TCR da folha maior e da menor.....	127
Figura 51 - Comparação entre ensaios dos pigmentos fotossintéticos ao fim de 3 dias.	128
Figura 52 - Comparação entre ensaios dos pigmentos fotossintéticos ao fim de 6 dias.	128
Figura 53 - Atividade enzimática do SOD	129
Figura 54 - Atividade enzimática da CAT.....	130
Figura 55 - Atividade enzimática da SOD.....	131
Figura 56 - Percentagem de remoção de SMZ, CBZ e NAP ao fim de 48h de contato.	132
Figura 57 - Cinética de adsorção do SMZ, CBZ e NAP em função do tempo de contato com a fibra de coco.....	133

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos farmacêuticos detetados em amostras ambientais (ng L ⁻¹)	10
Tabela 2 - Principais características dos fármacos estudados	18
Tabela 3 - Taxa de remoção de alguns fármacos em ETARs convencionais, com as suas concentrações médias de influente e efluente (adaptado de Patel et al, 2019; Son et al., 2022).	21
Tabela 4 - Características e fornecedores dos reagentes utilizados	45
Tabela 5 - Características e fabricantes dos materiais utilizados	45
Tabela 6 - Retas de calibração dos fármacos e parâmetros de validação do método.....	72
Tabela 7 - Valores da Repetibilidade e Reprodutibilidade dos fármacos nas concentrações de 0,5; 2 e 4 mg/L	73
Tabela 8 - Parâmetros físico-químico dos materiais selecionados como matriz de suporte dos LCMs (n=6) e da sua mistura. Valores médios ± desvio padrão	75
Tabela 9 - Volume (mL) de líquido adicionado diariamente aos leitos e valores médios da taxa de evaporação/evapotranspiração de cada Leito.	78
Tabela 10 - Registo das condições meteorológicas no período de 21 a 27 de maio de 2019 (obtido de http://www.clima.ict.uevora.pt/verney)	79
Tabela 11 - Volume (mL) de líquido adicionado diariamente aos leitos e valores médios da taxa de evaporação/evapotranspiração de cada leito.	96
Tabela 12 - Registo das condições meteorológicas no período de 22 a 28 de maio de 2021	97
Tabela 13 - Volume (mL) de líquido adicionado diariamente aos leitos e valores médios da taxa de evaporação/evapotranspiração de cada leito.	108
Tabela 14 – Registo das condições meteorológicas no período de 04 a 10 de maio de 2022...	109
Tabela 15 – Evolução das eficiências de remoção dos fármacos ao longo dos três ensaios.....	117

1

Introdução

A qualidade da água é uma das grandes preocupações ambientais atuais. Em particular, a ocorrência e destino de poluentes como os fármacos no ambiente aquático tem-se tornado um problema emergente, pelos efeitos nefastos causados nos ecossistemas aquáticos, terrestres e para a saúde humana (Katsikaros & Chrysikopoulos, 2021; Palma et al., 2020; Son et al., 2022).

Os processos de tratamento convencionais utilizados na maioria das estações de tratamento de águas residuais (ETARs) são geralmente pouco eficientes na remoção destes contaminantes e muitas destas substâncias acabam por ser descarregadas com os efluentes tratados nos meios recetores hídricos (Dordio et al., 2018; Son et al., 2022; Wang & Wang, 2016). Em Portugal, como noutros países do mundo, vários estudos mostram a presença destes contaminantes em efluentes e lamas de ETARs, águas superficiais, águas subterrâneas, sedimentos, e até em águas destinadas ao consumo humano e em plantas comestíveis (Coelho et al., 2019; Fernandes et al., 2020; Fernandes et al., 2021; Paiga, 2019; Palma et al., 2020). De acordo com Palma et al. (2020), na região do Alentejo, onde se localiza o maior lago artificial de Portugal, uma grande variedade de fármacos nomeadamente analgésicos, antibióticos, reguladores lipídicos, beta-bloqueadores, entre outras classes, foi detetada em amostras de água. Um dos fármacos com acentuada toxicidade e que é dos mais frequentemente detetados em todos os tipos de águas, por ser um poluente pseudo-persistente e de baixa biodegradabilidade, é a Carbamazepina, que é muitas vezes tomada como um indicador de contaminação ambiental por fármacos. As fontes de contaminação dos meios aquáticos por este fármaco, o seu destino ambiental e os seus efeitos adversos foram já objeto da publicação de um capítulo de livro no âmbito desta Tese (Dordio et al., 2017). Por outro lado, em alguns países como Cabo Verde, onde a Química Analítica Ambiental não se encontra ainda tão desenvolvida, o estado deste problema encontra-se ainda por caracterizar, sendo, no entanto, de esperar que a situação seja comparável à já observada em outros locais do mundo.

As implicações resultantes desta situação sugerem a necessidade urgente de encontrar processos de tratamento de águas residuais complementares ou alternativos aos processos convencionais e que sejam simultaneamente eficientes e economicamente viáveis. Em particular em regiões onde há escassez de água e com poucos recursos

económicos, tornam-se necessárias soluções de baixo custo, mas cuja eficiência de tratamento permita a reutilização das águas residuais tratadas para diferentes fins, como por exemplo para irrigação.

Os Leitos Construídos de Macrófitas (LCMs) têm surgido como sistemas de tratamento complementares ou alternativos de águas residuais urbanas que contribuem para uma remoção mais eficiente de poluentes emergentes e/ou pseudo-persistentes como os fármacos. Estes sistemas têm como vantagens serem de relativamente baixo custo de operação e manutenção, tendo gastos energéticos bastante reduzidos e não necessitando de uma manutenção intensiva nem de mão-de-obra especializada para a sua operação regular. Relativamente à sua eficiência de tratamento, a sua boa integração paisagística é outra importante vantagem da sua utilização, especialmente em alguns casos como em sistemas de tratamento de águas residuais de resorts turísticos.

Pretende-se que nos LCMs (ou zonas húmidas construídas, ou fitoETARs) se obtenha um eficiente tratamento das águas residuais através dos mesmos tipos de processos de depuração que ocorrem nas zonas húmidas naturais, mas atuando de uma forma controlada e otimizada, utilizando como principais componentes a vegetação, solos e microrganismos típicos destes sistemas. Os LCMs são geralmente usados numa etapa secundária ou terciária do tratamento das águas residuais, tendo apresentado bons resultados na remoção de vários xenobióticos orgânicos incluindo diversos fármacos (Vystavna et al., 2017; Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2020; Llyas & Hullebusch, 2020). No entanto, a eficiência de remoção dos poluentes nos LCMs pode ser significativamente melhorada através de uma seleção criteriosa de materiais de suporte que possuam uma elevada capacidade para reter contaminantes por sorção, troca iónica ou outros processos físico-químicos, e de plantas e microrganismos que revelem uma boa tolerância aos poluentes e capacidade de os removerem/degradarem de águas contaminadas (Dordio & Carvalho, 2018).

Pretende-se com o presente trabalho explorar opções economicamente viáveis de LCMs que permitam um tratamento eficiente de águas residuais, incluindo uma remoção eficiente de fármacos, tendo em vista uma possível aplicação em Cabo Verde, e que possibilite um aproveitamento final das águas residuais tratadas.

Nesta tese, de seguida enunciam-se os principais objetivos do trabalho, seguindo-se um capítulo de fundamentação teórica, onde é feita uma breve e sumária revisão bibliográfica e se discute o estado da arte no tema da contaminação de águas com fármacos e da utilização e otimização de LCMs para o seu tratamento.

No capítulo seguinte são apresentadas as metodologias utilizadas no trabalho e é descrita a organização dos ensaios realizados no âmbito do estudo, com a esquematização do cronograma dos ensaios e a descrição dos procedimentos experimentais dos mesmos. Deve-se salientar que devido à inesperada situação excecional causada pelo surgimento da pandemia de Covid-19 durante o período de 2020-2021 (mas, em especial durante 2020) a concretização do plano de trabalho teve de sofrer consideráveis alterações ao plano inicial, precisamente no período que se previa originalmente ser de mais intenso trabalho, pelas restrições ao trabalho laboratorial impostas durante este período.

No capítulo 5 são apresentados os diversos resultados obtidos no trabalho, quer os obtidos nos estudos de otimização da metodologia analítica (dos quais resultou um artigo que se encontra em preparação), quer os resultantes dos vários ensaios, os quais são analisados em detalhe individualmente e posteriormente discutidos globalmente, analisando a evolução dos sistemas ao longo do tempo, na sequência dos vários ensaios realizados. Finalmente são apresentados os resultados de um estudo preliminar das propriedades adsorptivas de um material abundante em Cabo Verde, a fibra de coco, com vista à sua potencial aplicação em LCMs (também se encontra em fase adiantada de escrita um artigo sobre este estudo).

A tese conclui-se com um curto capítulo de conclusão em que se resumem as principais ideias que se podem extrair deste trabalho e se apontam perspetivas futuras para a continuação da exploração deste tema.

Finalmente, pretendemos ainda escrever 3 artigos que apresentem todos os resultados obtidos com os vários ensaios efetuados nos microcosmos do LCM proposto nesta tese, o qual, contudo, ainda se encontra numa fase de escrita bastante inicial. Prevê-se assim que, para além do já referido capítulo de revisão sobre a Carbamazepina, o trabalho realizado neste doutoramento dê origem à publicação de mais 3 artigos.

2

Objetivos Científicos

Este trabalho teve como objetivo principal contribuir para a otimização do funcionamento/ performance de Leitos Construídos de Macrófitas para a remoção de fármacos que possam estar presentes em águas. Assim, os objetivos mais específicos que contribuíram para isso foram:

- Otimizar a metodologia analítica utilizada para a quantificação dos fármacos em solução aquosa, nomeadamente testando a adequação de diferentes filtros normalmente utilizados no pré-tratamento de amostras e a otimização do volume de amostra a filtrar.

- Avaliar a capacidade de dois materiais argilosos processados industrialmente (Vermiculite esfoliada e LECA) para remover os sete fármacos em estudo (Sulfametoxazol, Trimetoprim, Ibuprofeno, Diclofenac, Naproxeno, Furosemida e Carbamazepina) de água dopada, tendo em vista a sua possível utilização como matriz de suporte onde se pretende implementar os LCMs (Cabo Verde).

- Avaliar a capacidade de adsorção da fibra de coco (um material abundante em Cabo Verde) na remoção dos fármacos testados, compreendendo melhor o processo de biossorção e auxiliar no desenvolvimento de pesquisas para encontrar novos biossorbentes alternativos no tratamento de águas residuais.

- Avaliar a eficiência de remoção dos fármacos em estudo da solução aquosa, utilizando um microcosmo de LCM tendo como matriz de suporte uma mistura de dois materiais argilosos (LECA e Vermiculite) plantado com *Typha* spp.

- Discernir o papel da planta *Typha* spp. no comportamento do LCM, em especial avaliando a sua contribuição para a eficiência de remoção dos fármacos estudados.

- Avaliar diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos da *Typha* spp. quando exposta aos fármacos, por forma a identificar a capacidade de resposta desta planta à toxicidade causada pela exposição aos fármacos:

- Taxa de crescimento relativo (TCR) da folha maior e da folha menor de cada planta dos Leitos;
- Concentração dos pigmentos fotossintéticos, nomeadamente a clorofila total $a+b$, clorofila a clorofila b e carotenoides;
- Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e guaiacol peroxidase (GPX).

3

Fundamento teórico

3.1. Os fármacos no ambiente

Nos últimos anos, uma grande variedade de compostos farmacêuticos, os seus metabolitos e produtos de transformação têm sido detetados em águas naturais (superficiais e subterrâneas), efluentes tratados, sedimentos e lamas de ETAR e até mesmo em águas destinadas ao consumo humano, revelando-se assim um sério problema ambiental (Saaristo et al., 2018; Richmond et al., 2018), comprometendo assim a qualidade de água potável e dos seus efeitos nefastos nas populações humanas que a consomem e nos seres aquáticos que vivem nestas condições (Palma et al., 2020; Katsikaros & Chrysikopoulos, 2021).

Foi com o avanço das técnicas analíticas nas últimas duas décadas, que se conseguiu demonstrar que a contaminação ambiental por poluentes emergentes entre os quais se incluem os fármacos é um problema real e atual. Com estas técnicas, foi possível identificar e quantificar um elevado número de fármacos presentes em concentrações muito baixas (ng/L - µg/L) nas amostras ambientais, graças à redução significativa dos limites de deteção e quantificação de substâncias orgânicas em matrizes ambientais (Palma et al., 2020).

Embora os fármacos estejam presentes em amostras ambientais em concentrações baixas, a poluição ambiental por este tipo de substâncias causa especial preocupação devido à sua persistência no meio ambiente e à sua atividade biológica. Os fármacos podem induzir efeitos adversos devido aos efeitos acumulativos, sinérgicos e à exposição contínua que ocorre especialmente em ecossistemas aquáticos mesmo em baixas concentrações (Katsikaros & Chrysikopoulos, 2021).

A baixa eficiência demonstrada pelos processos de tratamento das ETARs convencionais na remoção de muitos fármacos, é a principal fonte de entrada destes poluentes no ambiente aquático. De facto, as ETARs convencionais foram projetadas para a remoção dos poluentes que se encontram em maiores concentrações e não para remover poluentes como os fármacos e outros micropoluentes orgânicos, os quais não são, em geral, eficientemente removidos nestas estações, pois muitos dos compostos orgânicos xenobióticos são substâncias pouco biodegradáveis (Wang & Wang, 2016, Son et al., 2022). Consequentemente, muitas destas substâncias acabam por ser descarregadas com os efluentes nos meios recetores hídricos contaminando rios,

estuários, lagos, águas subterrâneas e até mesmo águas para consumo, estando presentes no ambiente na sua forma inalterada e/ou sob a forma de metabolitos ou produtos de degradação. A reutilização desses efluentes tem sido cada vez mais considerada como aplicação em diferentes fins, nomeadamente para regas de campos de golf e de outros espaços verdes (Dordio et al., 2018).

Na figura 1 estão esquematizadas as principais vias de entrada dos fármacos no ambiente bem como os seus possíveis destinos ambientais. Tal como já foi referido, os fármacos chegam ao ambiente principalmente através da descarga de efluentes das ETARs, constituindo uma ameaça potencial para os seres aquáticos e saúde pública (Dordio & Carvalho, 2018).

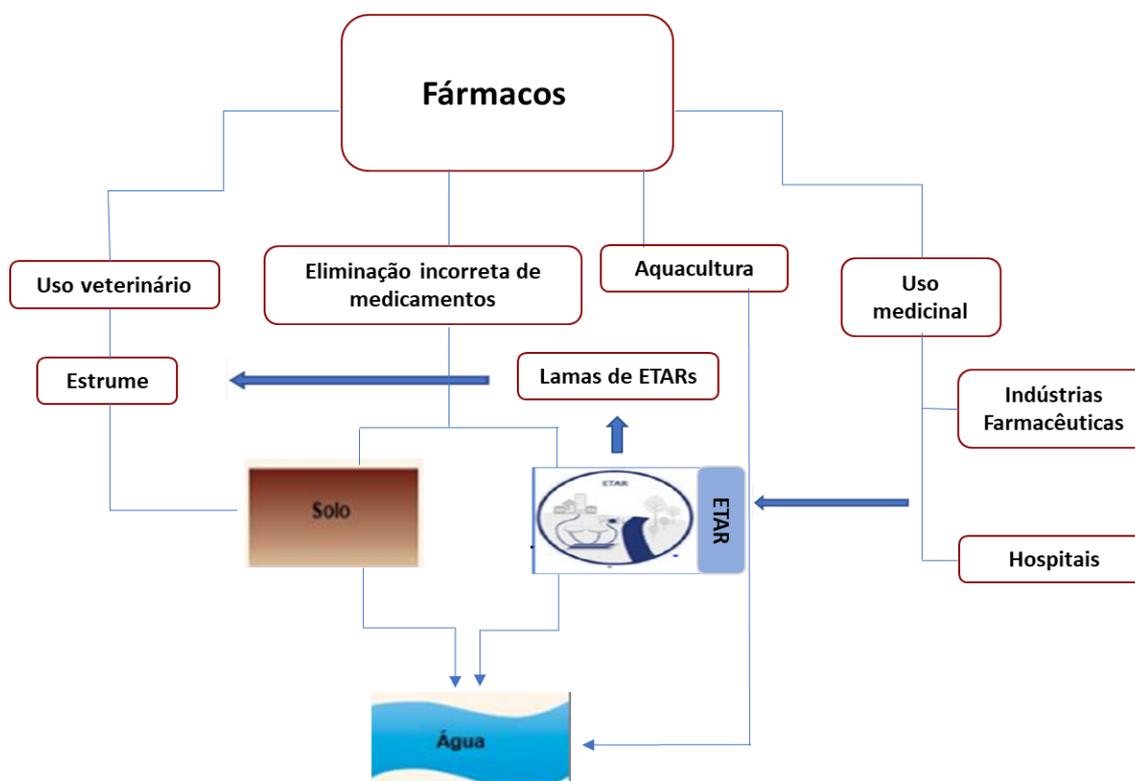


Figura 1 - Possíveis vias de entrada de fármacos no meio ambiente (adaptado de OECD, 2019)

Conforme se pode observar na figura 1, as lamas das ETARs podem ser reutilizadas como fertilizante na agricultura, contaminando desta forma os solos e, potencialmente,

águas subterrâneas por lixiviação. Outras fontes de poluição podem ser provenientes dos efluentes de explorações pecuárias intensivas e aquaculturas, de indústrias farmacêuticas e instalações hospitalares, e da eliminação incorreta de medicamentos fora de prazo de validade, ou que já não serão usados, e que muitas vezes são descartados de forma incorreta ao serem colocados diretamente no lixo doméstico ou despejados no esgoto (Mackulak et al., 2019).

Os produtos farmacêuticos, uma vez libertados no ambiente, têm efeitos bioquímicos tanto para o organismo humano como nos ecossistemas ambientais e estes apresentam uma série de riscos para todos os organismos vivos (resistência bacteriana aos antibióticos, alteração dos ciclos reprodutivos, neurotoxicidade, desregulação do sistema endócrino e cancro) (Li et al., 2016; Moreira et al., 2016).

Vários estudos de monitorização ambiental, têm evidenciado a presença frequente de fármacos (embora em concentrações baixas ng L^{-1} - $\mu\text{g L}^{-1}$) em diversos tipos de meios aquáticos, nomeadamente em amostras de água para consumo humano, águas superficiais, águas subterrâneas e em efluentes tratados (Palma et al., 2020).

Na tabela 1 apresentam-se alguns exemplos de fármacos detetados em águas superficiais, águas subterrâneas, água potável e em águas residuais.

Tabela 1 - Compostos farmacêuticos detetados em amostras ambientais (ng L^{-1})

Compostos	Água Superficial	Água Subterrânea	Água Potável	Efluentes ETAR	
Analgésicos e Anti-inflamatórios	Diclofenac	419 ^a	518 ^a	8,0 ^b	812 ^c
	Ibuprofeno				653 ^d
	Naproxeno				37-166 ^e
Antibióticos	Sulfametoxazol	360 ^f		0,23 ^c	
	Ciprofloxacina	21,3 ^g			
	Eritromicina		568 ^h		10-720 ⁱ
	Trimetoprim	0,56-3580 ⁱ	11 ⁱ	470-2330 ⁱ	0,9-11,300 ⁱ
Compostos Neuroativos	Carbamazepina	0,5-36,920 ⁱ		680-31,450 ⁱ	10-830,000 ⁱ
Reguladores lipídicos	Genfibrozil	9-17 ⁱ	10 ⁱ		2,31-20,4 ⁱ
Diuréticos	Furosemida	22 ^j			

a (Branchet et al., 2019) b (Tröger et al., 2018) c (Česen et al., 2019) d (Rosal et al., 2010) e (Ratola et al., 2012) f (Hanna et al., 2018) g (Castrignanò et al., 2018) h (Szekeres et al., 2018) i (Peña-Guzmán et al., 2019) j (Huerta-Fontela et al., 2011)

Os compostos farmacêuticos mais frequentemente detetados nas águas naturais e efluentes tratados pertencem às classes dos anti-inflamatórios, antibióticos, reguladores lipídicos, diuréticos e drogas neuroativas (Reis et al., 2018; Pereira et al., 2017).

O Naproxeno, Ibuprofeno e Diclofenac são dos anti-inflamatórios mais consumidos a nível mundial sendo também dos mais frequentemente detetados em amostras ambientais. Os antibióticos também pela sua presença constante no ambiente, tem sido objeto de diversos estudos, pois, pode provocar o desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes aos mesmos. Entre os antibióticos que estão nesta categoria e que são difíceis de biodegradação estão o Sulfametoxazol, Ciprofloxacina e o Trimetoprim (Paiga et al., 2016; Gonzalez et al., 2017; Pereira et al., 2016; Menz et al., 2019).

Segundo dados do INFARMED (2018), a maior parte dos fármacos detetados em diversas partes do mundo são também consumidos em Portugal e, conseqüentemente, muitos destes compostos estão presentes em amostras ambientais no território nacional. A mesma fonte indica que foram consumidas mais 4 milhões de embalagens de medicamentos em Portugal, no ano de 2018.

Presença de fármacos como o Diclofenac, Ibuprofeno, a Carbamazepina e a Hidroclorotiazida foi relatada num estudo feito em 2020, no qual foram identificados no total 27 fármacos diferentes, mas com preocupação maior para estes 4 fármacos, por apresentarem concentrações consideradas um risco moderado para o ecossistema aquático (Palma et al., 2020). A descarga contínua destes compostos pelas ETARs na bacia do Guadiana e conseqüentemente a sua remoção incompleta, bem como a sua aplicação destes na veterinária, estão na origem da sua deteção, conclui o estudo.

3.2. Seleção dos fármacos a estudar

Como já foi referido, nos últimos anos a presença de fármacos em ambientes aquáticos e os seus possíveis impactos ambientais têm vindo a ser um foco de estudo, pois não são ainda completamente conhecidas as suas conseqüências ambientais (Couto et al., 2019). Esta situação tem causado alguma preocupação na comunidade científica, tendo levado a investigações mais aprofundadas, pois parte destes compostos não são biodegradáveis,

não sendo eliminados nos processos de tratamento efetuados nas ETARs convencionais. A presença destes compostos, seus metabolitos e produtos de degradação no ambiente aquático pode induzir efeitos negativos nestes ecossistemas, principalmente devido à sua toxicidade e à possibilidade de serem afetadas funções biológicas importantes tais como a reprodutiva, ou de serem causadas alterações na morfologia de certos organismos aquáticos (Felis et al., 2020; Gogoi et al., 2018).

Dada a grande variedade de fármacos que têm sido detetados em amostras aquáticas, viu-se a necessidade de estabelecer critérios de seleção dos compostos a estudar neste trabalho. Assim, a seleção dos fármacos teve como critérios principais de escolha os seus consumos em Cabo Verde, em Portugal e noutros países, a sua disseminação no ambiente, o comportamento em ETARs convencionais, a biodegradabilidade, a toxicidade e a variedade de propriedades físico-químicas que os vários compostos apresentam, nomeadamente as características ácido-base, a hidrofobicidade (K_{ow}) e a solubilidade em água (pretende-se que os fármacos selecionados sejam representativos de diferentes tipos de comportamento físico-químico).

Com base nesses critérios e por forma a ter um estudo mais abrangente, decidiu-se seleccionar 7 fármacos para a realização dos ensaios, pertencentes a diferentes classes farmacológicas, como os antibióticos, anti-inflamatórios, diuréticos e antiepiléticos. Assim, os fármacos escolhidos para o presente estudo foram o Sulfametoxazol, Trimetoprim, Ibuprofeno, Diclofenac, Naproxeno, Furosemida e Carbamazepina.

3.2.1 Sulfametoxazol

O Sulfametoxazol (SMZ) é um antibiótico que é normalmente usado para o tratamento de infeções humanas e animais, pertencente à família das sulfonamidas (Huerta, 2016). As sulfonamidas inibem a síntese do desoxirribonucleico (ADN) graças aos seus efeitos bacteriostáticos (Oliveira, 2017). A estrutura química do fármaco encontra-se representada na figura 2. É muito consumido em todo o mundo, sendo por isso frequentemente detetado em amostras ambientais em concentrações na ordem das $\mu\text{g L}^{-1}$ e até mesmo em efluentes de ETARs, o que mostra que a sua remoção nas ETARs ainda é deficiente (Raposo, 2017).

Devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana (que diminui a sua eficiência se administrado sozinho) e dado ser ainda muito útil atualmente (por existirem poucas

alternativas), é atualmente usado principalmente em combinação com o antibiótico Trimetoprim (numa proporção de 5:1), sendo nesta formulação denominado de Cotrimoxazol (Bactrim), com aplicação para o tratamento de infecções urinárias, respiratórias e gastrointestinais. A combinação destes dois fármacos permite bloquear enzimas que catalisam estágios sucessivos na biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas essenciais ao crescimento e à divisão das bactérias. O SMZ é utilizado ainda em medicina veterinária, onde, para além da sua aplicação terapêutica, permite também estimular o crescimento de algumas espécies em aquacultura.

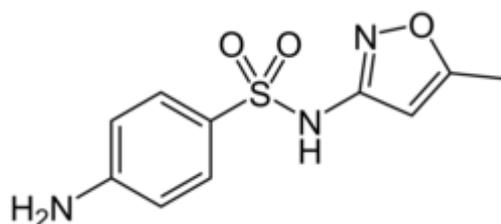


Figura 2 - Estrutura molecular do Sulfametoxazol

3.2.2 Trimetoprim

O Trimetoprim (TMP) é um antibiótico sintético que apresenta atividade antimicrobiana utilizado na profilaxia e no tratamento de infecções bacterianas, incluindo infecções gastrointestinais, respiratórias e urinárias (Martínez-Costa et al., 2018; Wang et al., 2019), cuja estrutura molecular está apresentada na figura 3. Devido aos efeitos agudos e crônicos que o uso de cotrimoxazol tem causado em seres humanos, o TMP tem começado a ser administrado em forma única, sem ser estar combinado com sulfametoxazol na forma de cotrimoxazol (Li & Zhang, 2017).

Nos últimos anos, houve um aumento da presença do TMP em águas residuais o que tem causado preocupação devido ao perigo de ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos e da formação de genes de resistência a antibióticos no ambiente aquático (Alharbi et al., 2016; Amarasiri et al., 2020).

Após a sua absorção pelo corpo humano, apenas 22,5% do composto é metabolizado, sendo o restante excretado através das fezes e da urina (Ji et al., 2016).

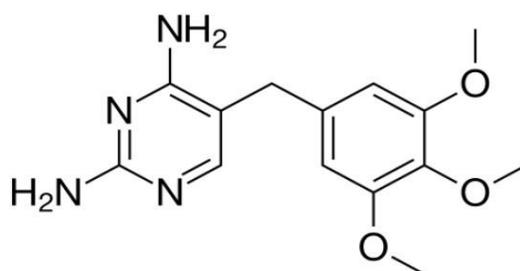


Figura 3 - Estrutura molecular da Trimetoprim

3.2.3 Ibuprofeno

O Ibuprofeno (IBU) é um fármaco com ação anti-inflamatória não esteroide (não derivado de hormonas), antipirética e analgésica que inibe a produção de prostaglandinas (substâncias que estimulam a inflamação), levando ao desenvolvimento da atividade anti-inflamatória (reduz a inflamação), analgésica (redução, e até supressão, da dor) e antipirética (redução, até supressão, da febre) (Timoneda, 2017).

É um composto derivado do ácido propiônico utilizado no tratamento da dor e febre, graças à funcionalidade da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2). Uma vez que tem sido amplamente utilizado como anti-inflamatório, com um elevado consumo por não necessitar de prescrição médica, a ocorrência deste fármaco no meio ambiente é muito frequente (Timoneda, 2017). Estando no grupo de medicamentos encontrados em ambientes aquáticos, nomeadamente em águas superficiais, as concentrações detetadas do IBU variam entre menos de 1,0 µg L⁻¹ até valores acima de 40 000 µg L⁻¹ (Stelato et al., 2016).

A estrutura molecular do IBU encontra-se esquematizada na figura 4.

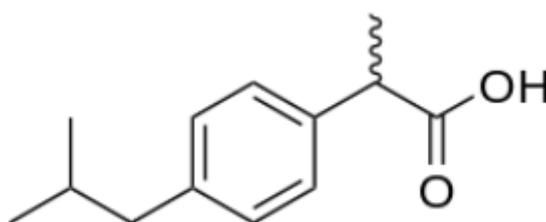


Figura 4 - Estrutura molecular de Ibuprofeno

3.2.4 Diclofenac

O Diclofenac (DCF) também pertence à classe dos anti-inflamatórios não-esteroides, sendo um dos fármacos mais consumidos a nível mundial, e frequentemente detetado em várias matrizes ambientais, nomeadamente em águas superficiais, águas subterrâneas, efluentes hospitalares e efluentes de ETAR (Silva et al., 2021; Rodrigues et al., 2021). É utilizado para reduzir a inflamação e aliviar a dor, devido às suas excelentes propriedades antirreumáticas, anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas, sendo depois eliminado sob a forma de glucuronídeos e sulfatos conjugados dos metabolitos (MedChemExpress, 2019). O DCF é um inibidor da síntese das prostaglandinas, sendo estas capazes de influenciar a produção da inflamação, dor e febre. A sua estrutura molecular está apresentada na figura 5. Cerca de 65 % da dose administrada do DCF é excretada maioritariamente pela urina, mas também pela via biliar (35%) e somente uma parte residual (menos de 1%) é excretada na forma não modificada (Hamilton et al., 2018; Gilman, 2018).

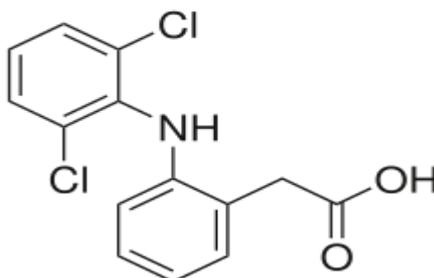


Figura 5 - Estrutura molecular do Diclofenac

3.2.5 Naproxeno

O Naproxeno (NAP) é um fármaco que pertence à classe dos anti-inflamatórios não esteroides, que é derivado do ácido propiônico (estrutura química apresentada na figura 6). Este possui uma ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética e é amplamente indicado para tratar o alívio da dor ligeira a moderada, dores de cabeça e menstruais, doenças reumáticas, osteoartrite e gota aguda (Gilman, 2018).

Tem sido frequentemente detetado em águas de superfície, água subterrâneas, e águas potáveis em concentrações baixas na ordem dos ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ (Stelato et al., 2016;

Cunha et al., 2017; Sharma et al., 2019), devido à sua grande utilização para fins terapêuticos, uma vez que a prescrição médica deste fármaco não é necessária, facilitando deste modo a sua comercialização. A sua ocorrência nestes meios, principalmente em água potável, pode representar um problema de saúde e ambiental em regiões onde há escassez de água e um tratamento deficitário nas ETARs (B. M. Sharma et al., 2019). Estudos indicam que a presença destes anti-inflamatórios no ambiente aquático pode causar alguns efeitos nefastos à saúde de peixes, moluscos e microcrustáceos (Liu et al., 2017; Fontes et al., 2018).

Biologicamente ativo e com baixo índice de biodegradabilidade, o NAP pode-se acumular em organismos aquáticos. Este fármaco é parcialmente metabolizado e excretado na urina (cerca de 95%) e fezes (< 5%), podendo ainda ser excretado sob a forma inalterada (<1%) (Drugbank, 2021). Estes resíduos inevitavelmente chegam às ETARs, onde não são completamente removidos, chegando assim facilmente ao meio recetor hídrico e a outros compartimentos ambientais (Tanoue et al., 2015).

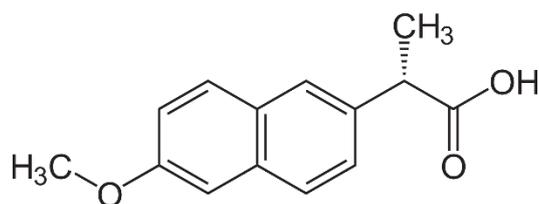


Figura 6 - Estrutura molecular do Naproxeno

3.2.6 Furosemida

A Furosemida (FUR) é um fármaco que tem sido amplamente utilizado devido à sua rápida ação diurética, sobretudo em quadros agudos, promovendo a excreção, por via urinária, de sódio, potássio e cloreto (Drugbank, 2022). Na figura 7 é possível observar a fórmula química da FUR.

Por ser um diurético forte, a FUR é utilizada em casos de emergência e de controlo de casos de hipertensão, tratamento de insuficiência cardíaca e renal, síndrome nefrótica, edema ou cirrose (Drugbank, 2022). É frequentemente detetado em amostras ambientais com concentrações na ordem dos $\mu\text{g L}^{-1}$ (superficiais e subterrâneas), em efluentes de ETARs e mesmo em águas para consumo humano, o que indica que a sua remoção nas ETARs convencionais é deficiente (Burcea et al., 2020; Palma et al., 2020).

A eficiência de remoção da FUR nas ETARs é muito variável, dependendo muito dos processos de tratamento utilizados, podendo rondar os 60% (Burcea et al., 2020).

Cerca de 50% de uma dose administrada de FUR é excretada sob a forma inalterada na urina (Ellison, 2019) De acordo com a Agência Médica Europeia a FUR é classificada como um dos poluentes ambientais com maior risco de toxicidade (Heidari et al., 2020).

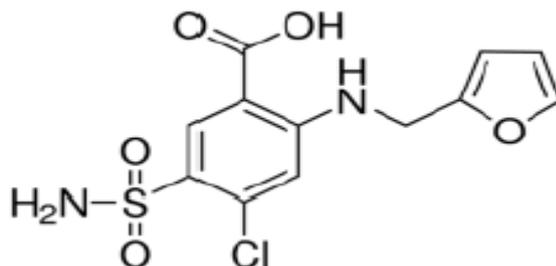


Figura 7 - Estrutura molecular da Furoseimida

3.2.7 Carbamazepina

A Carbamazepina (CBZ), cuja estrutura molecular está apresentada na figura 8, é um dos principais fármacos utilizados no tratamento da epilepsia e na doença bipolar e, em alguns casos, na nevralgia do trigêmeo (Santos, 2017). É da classe dos anticonvulsivos e derivado da carboxamida, sendo que a sua metabolização ocorre no fígado e a sua posterior excreção é realizada maioritariamente pela urina (cerca de 72%) e pelas fezes (28%) sob a forma não conjugada. Somente 1 a 3% dos produtos excretados correspondem ao composto original inalterado. A carbamazepina é metabolizada pelo citocromo P450 (CYP) 3A4 na forma de carbamazepina - 10, 11 - epóxido, um metabolito ativo, que pode ser responsável por alguns efeitos colaterais. O mesmo, através da ação da epóxido-hidroxilase microsossomial é inativado (Centro Nacional da Informação Biotecnológica, 2019b).

No meio ambiente, é um composto muito ativo, persistente, que pode sofrer a biodegradação ao entrar em contato com a água, originando deste modo os respetivos metabolitos, daí a importância de se fazer a sua monitorização para se evitar

consequências nefastas para o ecossistema aquático (Dordio et al., 2017; Rdewi et al., 2022).

Publicação do artigo de revisão:

Cap.3 – Carbamazepine in the environment sources, fate and adverse effects

Título do livro: *Carbamazepine: indications, contraindications and adverse effects*

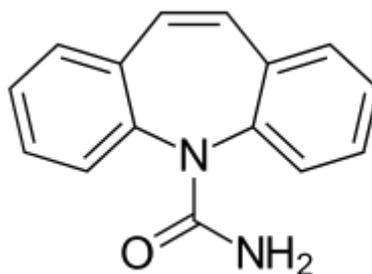


Figura 8 - Estrutura molecular da Carbamazepina

Na tabela 2 é apresentado um quadro resumo com as principais propriedades físico-químicas dos fármacos em estudo.

Tabela 2 - Principais características dos fármacos estudados

Fármacos	Fórmula Molecular (g/mol)	Massa Molar (g/mol)	pKa	Solubilidade em água (mg/L, 25°C)	Log Kow	Referências
Sulfametoxazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,28	5,7	610	0,89	(Pal, Gin, Lin, & Reinhard, 2010)
Trimetoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,32	6,60	500	0,91	(Pérez, Eichhorn, & Aga, 2005)
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,3	4,91	21,0	3,97	(Nallani, Paulos, Constantine, Venables, & Huggett, 2011)
Diclofenac	C ₁₄ H ₁₀ C ₁₂ NNaO ₂	296,147	4,15	2,37	4,5	(Altman, Bosch, Brune, Patrignani, & Young, 2015) (Fortunato, 2014)
Naproxeno	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230,27	4,2	15,9	3,18	(Miranda, 2014; Nam, Jo, Yoon, & Zoh, 2014)
Furosemida	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	330,739	3,8	73,1	2,03	(Nie et al., 2014)
Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236,30	13,9	17,7	2,45	(Drugbank, Carbamazepine, 2022)

Pela observação dos dados referentes às propriedades destes fármacos, verifica-se que em relação aos valores de solubilidade em água, o DCF é o único que apresenta um valor inferior a 10 mg. L^{-1} (o DCF é um ácido fraco com baixa solubilidade em água) sendo então importante recorrer a métodos analíticos sensíveis capazes de o detetar e quantificá-lo em valores tão baixos. Os compostos mais solúveis em água são o SMZ e o TMP, podendo representar uma dificuldade para a sua remoção deste meio.

Um dos parâmetros que afeta a retenção cromatográfica de compostos ionizáveis são os valores de pKa de cada composto. Para valores de pH mais baixos os ácidos serão mais retidos enquanto as bases serão mais retidas para valores de pH mais elevados.

A FUR, NAP, SMZ e o TMP são compostos moderadamente hidrofóbicos (geralmente assim considerado se $\log K_{ow}$ tiver o seu valor entre 0.5 e 3.5) e por isso com características favoráveis para a sua absorção pelas plantas (Pilon-Smits, 2005), pois são suficientemente lipofílicos para conseguirem atravessar a camada fosfolipídica das membranas celulares e suficientemente solúveis em água para poderem ser transportados no interior das plantas, pois, apresentando, assim, valores de $\log K_{ow}$ favoráveis à sua absorção pelas raízes das plantas e à translocação para a parte aérea (Pilon-Smits, 2005).

O IBU e DCF são dos compostos mais hidrofóbicos ($\log K_{ow}$ superior a 3.5), sendo que, assim, poderão ser fortemente adsorvidos às paredes celulares e à camada lipofílica da raiz, reduzindo as suas entradas e translocações no interior das plantas.

3.3. Processos de remoção de fármacos de águas residuais

Muitos fármacos não são eficientemente removidos pelas ETARs e, como consequência, acabam por ser descarregados com os efluentes nos meios recetores hídricos e disseminados pelos meios aquáticos em concentrações na ordem dos $\mu\text{g/L}$ e ng/L (Katsikaros & Chrysikopoulos, 2021). De facto, os processos de tratamento utilizados nas ETARs convencionais não são os mais adequados para a eliminação eficaz de produtos contendo substâncias ativas capazes de promover efeitos farmacológicos, pois elas foram projetadas e otimizadas para remover a matéria orgânica facilmente biodegradável, sólidos em suspensão e microrganismos patogénicos (Wang & Wang, 2016).

Tendo em conta as gamas de concentração dos fármacos encontrados nos efluentes tratados das ETARs, a exposição de organismos aquáticos aos poluentes farmacêuticos e aos seus metabolitos poderão ter graus de perigosidade diversos para o meio ambiente e para a saúde pública, dependendo também da toxicidade e modo de atuação de cada composto, dos efeitos de pseudo-persistência e efeitos cumulativos ou sinérgicos com outros fármacos. Assim, é justificada a preocupação em realizar mais estudos para se perceber o comportamento desses fármacos no meio hídrico. A exposição aos compostos farmacêuticos e os seus metabolitos que contaminam os meios hídricos (entre os quais, fontes de água para consumo humano) podem desencadear potenciais riscos para a saúde humana, como são os casos, por exemplo, de reações inflamatórias no fígado e desregulações do sistema endócrino. Já nos ecossistemas aquáticos, este tipo de poluentes pode provocar efeitos como a feminização dos peixes machos, o desenvolvimento de resistência de bactérias aos antibióticos e a diminuição da diversidade do plâncton (Li et al., 2014).

As percentagens de remoção dos fármacos em ETARs convencionais dependem de vários fatores e variam de ETAR para ETAR. Assim, podem ser influenciadas pelas condições de operação e tipo de processos utilizados no tratamento, pelas condições ambientais e pela própria composição das águas residuais (Wang & Wang, 2016). Na Tabela 3 é apresentado um resumo das percentagens de remoção de alguns fármacos em ETARs convencionais, contendo as respetivas concentrações médias presentes em influentes e efluentes.

Como se pode verificar na tabela 3, a eficiência de remoção nas ETARs convencionais de muitos fármacos, e em particular para os compostos selecionados para este estudo, é muito baixa. Os dados refletem a desadequação das ETARs convencionais no que diz respeito ao tratamento de águas contaminadas com fármacos.

Tabela 3 - Taxa de remoção de alguns fármacos em ETARs convencionais, com as suas concentrações médias de influente e efluente (adaptado de Patel et al, 2019; Son et al., 2022).

Compostos	Influente (ng/L)	Efluente (ng/L)	Remoção (%)
Analgésicos e Anti-inflamatórios			
Diclofenac	36,3	148,6	10-75
Ibuprofeno	3732	636	22-75
Naproxeno	2580	40	40-55
Paracetamol	37,5	33,1	99,9
Acido acetilsalicílico	5690	28,2	81
Antibióticos			
Sulfametoxazol	74,9	36,4	48,2
Cefradina	760	16	98,3
Eritromicina	13,7	2,8	88,4
Trimetoprim	25,2	23,8	0,6
Sulfadimetoxina	11,9	7,9	34,8
Compostos Neuroactivos			
Carbamazepina	84,6	121	4
Reguladores lipídicos			
Genfibrozil	14	1,5	84,7
Diuréticos			
Furosemida	413	166	59,8
Estimulantes			
Cafeína	11,3	4,9	99,9

Nas ETARs convencionais podem distinguir-se 3 ou 4 etapas principais para o tratamento das águas residuais e após estas o efluente é descarregado nos meios recetores hídricos. O pré-tratamento (cujo objetivo é a remoção de sólidos de maiores dimensões), o tratamento primário (onde são removidos os sólidos suspensos e gorduras) e o tratamento secundário (cujo objetivo principal é a remoção da matéria orgânica biodegradável, de nutrientes e microrganismos patogénicos) (Gonçalves, 2017). Em muitos casos (e, em especial, sempre que se pretende reutilizar a água tratada, por imposição de lei) é ainda utilizado um tratamento terciário ou de afinação, o qual terá o objetivo de remoção adicional, consoante os fins de utilização do efluente tratado (em particular para a rega de espaços verdes ou campos agrícolas), de alguns poluentes que não tenha sido removidos completamente nas etapas anteriores, como por exemplo microrganismos patogénicos (desinfecção), sólidos em suspensão (filtração,

eventualmente por processos de membranas), poluentes emergentes, etc. (Dordio et al., 2018). Nesta última etapa enquadra-se em muitos casos a utilização de LCMs.

Basicamente, nas duas primeiras etapas não se esperam remoções significativas de fármacos, pois ocorre pouca eliminação de micropoluentes devido à baixa atividade microbiológica existente nestas etapas (nesta fase os processos de tratamento são essencialmente físicos ou químicos) sendo de esperar na melhor das hipóteses alguma remoção por adsorção às partículas que sedimentam. Já na etapa secundária, o tratamento é essencialmente biológico, onde a matéria orgânica dissolvida é exposta à ação das bactérias que se desenvolvem naturalmente nas águas residuais, servindo de fonte de carbono e energia para os microrganismos e sendo desta forma biodegradada. Contudo, neste tipo de tratamento regista-se frequentemente uma capacidade limitada na remoção de muitos compostos farmacêuticos que estão presentes em águas residuais, nomeadamente os mais difíceis de biodegradar (Dordio & Carvalho, 2015; Yunlong et al., 2014).

Não se mostrando as ETARs eficientes na remoção de fármacos presentes em concentrações muito baixas e em muitos casos dificilmente biodegradáveis nas águas residuais, torna-se necessário recorrer a tratamentos complementares que permitam uma maior eficiência na remoção de fármacos, como a oxidação química (ozonização, oxidação catalítica), os processos de membrana e a adsorção em carvão ativado (Gomes et al., 2017, Quesada et al., 2019, Khanzada et al., 2020), embora vários destes tratamentos não sejam em geral utilizados em larga escala por serem dispendiosos e difíceis de implementar nas ETARs (Gomes et al., 2017), além de em alguns casos (como, por exemplo, os métodos oxidativos) originarem produtos tão ou mais tóxicos que do que os próprios fármacos (Gomes et al., 2017; Zaid et al., 2020).

Um sistema alternativo ou complementar de tratamento que tem vindo a ser estudado e aplicado nos últimos anos e que tem demonstrado uma elevada eficiência na remoção de fármacos são os Leitos Construídos de Macrófitas (LCMs) (Vystavna et al., 2017, Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2020; Llyas e Hullebusch, 2020). Estes sistemas em geral não originam produtos tóxicos em resultado da sua operação, além de apresentarem um baixo custo de operação e manutenção (Hanna et al., 2018; Ilyas & van Hullebusch, 2020; Li et al., 2020), sendo portanto opções atrativas e aparentemente viáveis.

3.4. Leitões Construídos de Macrófitas como possível tecnologia de tratamento das águas contaminadas

Há cada vez mais necessidade de proporcionar tipos de tratamento mais eficientes para a remoção dos fármacos de águas residuais e com menor impacto ambiental. Neste domínio, a tecnologia dos leitões construídos de macrófitas, zonas húmidas construídas ou ainda fito-ETARs, tem vindo a ganhar relevância na última década para o tratamento sustentável de águas residuais domésticas e industriais, permitindo deste modo servir pequenos aglomerados populacionais, onde a escassez de recursos humanos e económicos é uma realidade frequente, tornando-se este tipo de sistema adequado para zonas subdesenvolvidas e rurais.

A utilização crescente desta tecnologia, apresenta-se assim como uma opção atrativa para o tratamento biológico de águas residuais, que tem sido objeto de vários estudos na remoção dos compostos orgânicos difíceis de degradar, como pesticidas e fármacos (Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2016; Li et al., 2020; Llyas & Hullebusch, 2020). A sua simplicidade torna os LCMs uma tecnologia bastante eficiente, permitindo que a água residual final tenha a qualidade necessária para descarga segura no ambiente aquático ou então para a sua reutilização, como em irrigação.

Os LCMs, também conhecidos por zonas húmidas artificiais, são sistemas de tratamento de águas residuais, em que cooperam processos biológicos, físicos e químicos, promovidos pelos três componentes que os constituem (vegetação, matriz de suporte e microrganismos) e que são projetados e construídos para mimetizarem os processos naturais de depuração da água que ocorrem nas zonas húmidas naturais, mas fazendo-o num ambiente controlado e otimizado, de modo a ser obtido um eficiente tratamento das águas residuais. Este sistema pode ser usado como um método complementar/alternativo ao tratamento secundário ou terciário de efluentes nas ETARs convencionais.

Sendo os LCMs sistemas de baixo custo e de fácil operação, é possível a sua implementação e construção em países menos desenvolvidos de modo a diminuir a descarga de efluentes contaminados nos cursos de água e a sua disseminação para o ambiente. Isso vai ao encontro de um dos objetivos deste estudo, que pretende explorar

opções viáveis de LCMs para uma possível aplicação em Cabo Verde, implementando assim este sistema onde ainda não existe, de modo a alcançar a gestão sustentável de um recurso tão importante como é a água ao permitir um aproveitamento final das águas residuais tratadas, e de modo a diminuir o risco de proliferação de doenças.

Além do baixo custo de construção e de manutenção e, principalmente, a limitada necessidade de mão de obra, os LCMs apresentam ainda a vantagem de uma elevada eficiência na remoção de uma grande variedade de contaminantes aquáticos, nomeadamente os poluentes convencionais e alguns xenobióticos orgânicos, incluindo fármacos, presentes nas águas residuais (Vystavna et al., 2017; Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2020; Llyas e Hullebusch, 2020).

Este tipo de sistema apresenta ainda uma boa integração paisagística e elevados níveis de sustentabilidade no que se refere ao reduzido consumo de energia, pelo que poderá ser usado também em hotéis, condomínios privados, casas unifamiliares, tratamento de efluentes de pequenas indústrias onde existam pequenos aglomerados populacionais.

Como principal desvantagem, destaca-se a exigência que este tipo de sistema requer na sua instalação (uma grande área), em comparação com os sistemas tradicionais. Além disso, nos LCMs há um período de adaptação até que as plantas e os microrganismos se aclimatizem e atinjam a sua plena eficiência. Apresenta ainda como desvantagem a sazonalidade do processo, uma vez que a eficiência do tratamento está dependente das épocas vegetativas e não vegetativas das plantas (Dordio & Carvalho, 2018).

Os LCMs podem ser classificados com base no tipo de vegetação e também segundo o tipo de escoamento. No que diz respeito ao tipo de vegetação, as plantas classificam-se como flutuantes (a folhagem principal flutua na superfície da água, enquanto as plantas podem estar, ou não, enraizadas no solo), emergentes (plantas enraizadas no solo, mas com o caule e folhas fora de água) ou submersas (têm os órgãos vegetativos imersos na água e as plantas podem estar, ou não, enraizadas no solo), (Indika Herath & Vithanage, 2015) como apresentadas na figura 9.

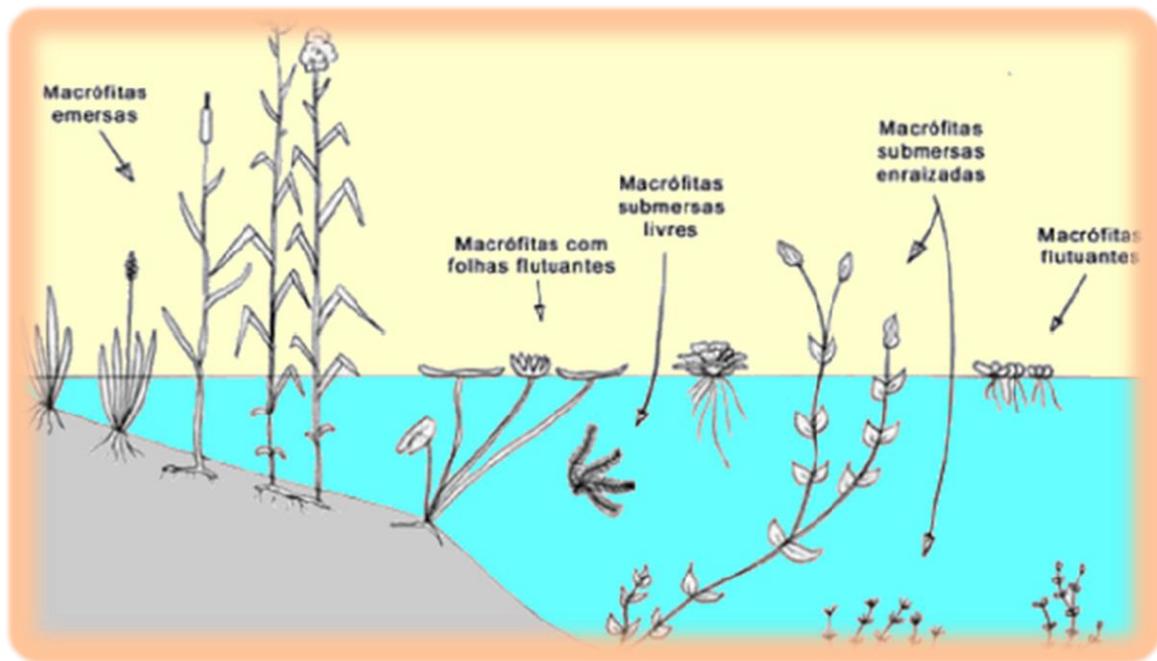


Figura 9 - Classificação das diversas espécies de macrófitas utilizadas nos leitos (adaptado de Fragoso et al., 2009).

Os LCMs podem também ser classificados de acordo com a forma como o efluente percorre o sistema, podendo ser de escoamento superficial ou sub-superficial. Os sistemas de escoamento sub-superficial podem ainda ser subdivididos em sistemas com escoamento horizontal ou vertical, conforme ilustra o esquema da figura 10.

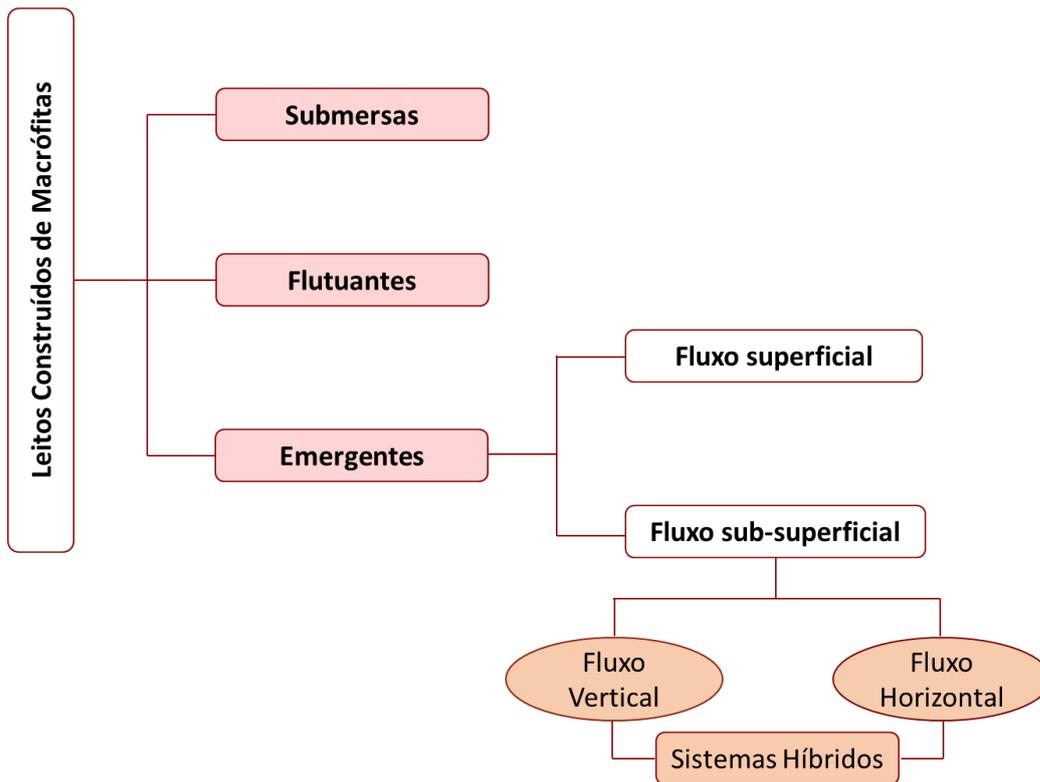


Figura 10 - Classificação de Leitos de Macrófitas (adaptado de Kadlec & Wallace, 2009).

Um sistema com escoamento superficial é caracterizado por ter o nível da água acima do substrato (figura 11). Este tipo de sistema proporciona uma melhor integração paisagística e habitat, uma vez que é muito semelhante às zonas húmidas naturais. Como desvantagens apresenta o facto de poder acumular odores desagradáveis e a proliferação de insetos e algas face ao contacto do efluente com a atmosfera.

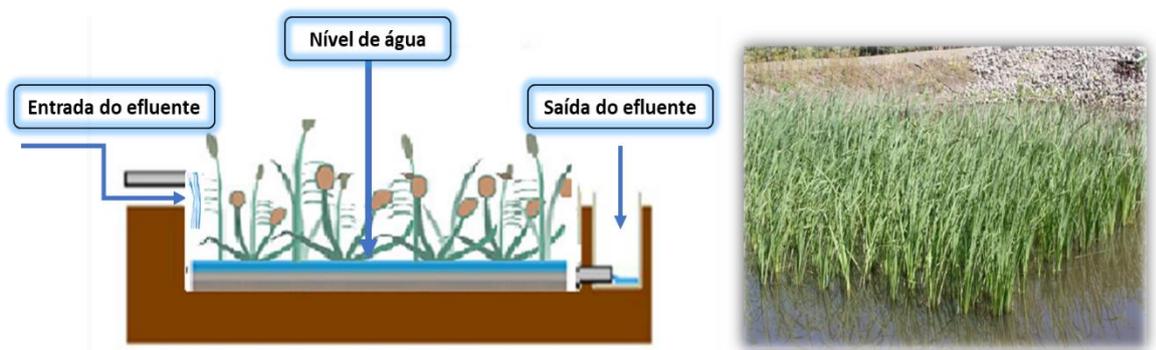


Figura 11 - Leito de Macrófitas com escoamento superficial (adaptado de Wallace & Knight, 2006).

Nos sistemas com escoamento sub-superficial (figura 12), o interior do leito apresenta um meio de enchimento poroso (normalmente gravilha), através do qual o efluente escoo e no qual são enraizadas as macrófitas. Neste sistema, o nível de água mantém-se abaixo da superfície do enchimento (matriz de suporte), tendo como principal vantagem, em relação ao fluxo superficial, a minimização de odores, de pragas e de desenvolvimento de algas e também com o menor risco de contacto das pessoas com a água residual, uma vez que esta é mantida abaixo da superfície do leito.



Figura 12 - Leito de Macrófitas com escoamento superficial.
(Fonte: www.wetlandspacific.com/images/stories/gallery/sn850216.jpg).

Os LCMs com escoamento sub-superficial podem ainda ser divididos em função da direção predominante do escoamento, a saber: vertical, onde o afluente é distribuído pela superfície do leito num escoamento preferencialmente vertical, através do meio poroso (figura 13); ou horizontal, quando o afluente é descarregado numa das extremidades do leito, deslocando-se horizontalmente, penetrando através do meio poroso e da rizosfera, que apresenta geralmente uma pequena inclinação, num movimento predominantemente horizontal (figura 14); ou, ainda, híbrido quando se trata de uma combinação de ambos. Este último, permite, por isso, um tratamento mais completo (Valipour & Ahn, 2016; Sharma & Malaviya, 2022).

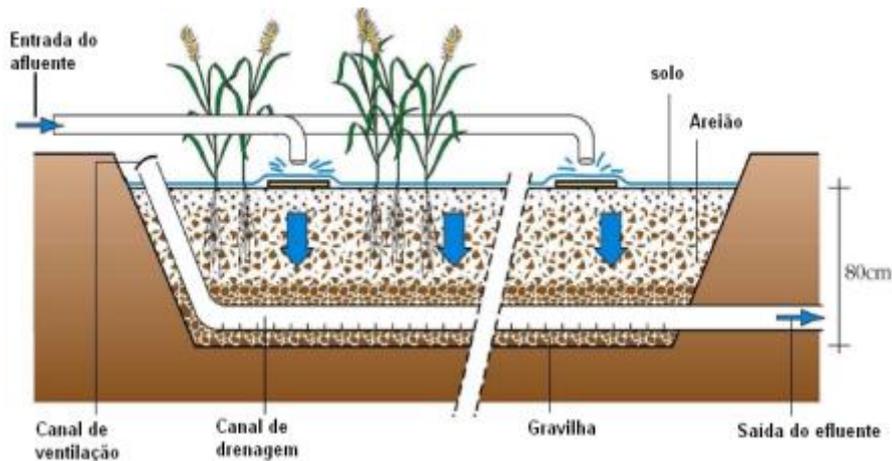


Figura 13 - Leito de macrófitas com escoamento sub- superficial vertical (adaptado de Tilley et al. 2014).

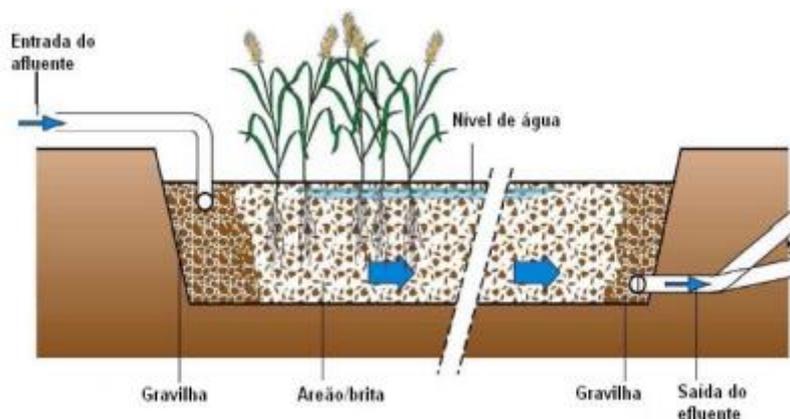


Figura 14 - Leito de macrófitas com escoamento sub- superficial horizontal (adaptado de Kadlec & Wallace, 2009).

Uma vez que a água residual num sistema de escoamento sub-superficial é mantida abaixo da superfície do leito, este apresenta algumas vantagens em relação ao sistema de escoamento superficial, nomeadamente a sua maior tolerância ao frio, a menor ocorrência de odores e de insetos. A matriz de suporte apresenta também algumas vantagens uma vez que proporciona uma maior superfície de contacto favorecendo os diferentes mecanismos que são estabelecidos, como a adsorção e a degradação microbiana.

3.4.1. Componentes dos LCM e processos de remoção

A remoção de poluentes nos LCMs envolve vários processos que estão interdependentes, distinguindo-se em bióticos (processos levados a cabo por organismos vivos, como plantas e microrganismos) ou abióticos (processos físicos ou químicos).

Este tipo de sistema de engenharia ecológica, combina todos estes processos físicos, químicos e biológicos, nomeadamente filtração, rizodegradação, reações de oxidação-redução, adsorção, absorção e precipitação, etc., os quais são levados a cabo pelas plantas, microrganismos e/ou materiais da matriz de suporte. Uma depuração de poluentes de forma otimizada, controlada e eficiente nos LCMs, envolve sempre uma ação concertada entre estes processos e as vários componentes do sistema, como a matriz de suporte, a vegetação e a população microbiana, conforme apresentada na figura 15 (Dordio & Carvalho, 2018).

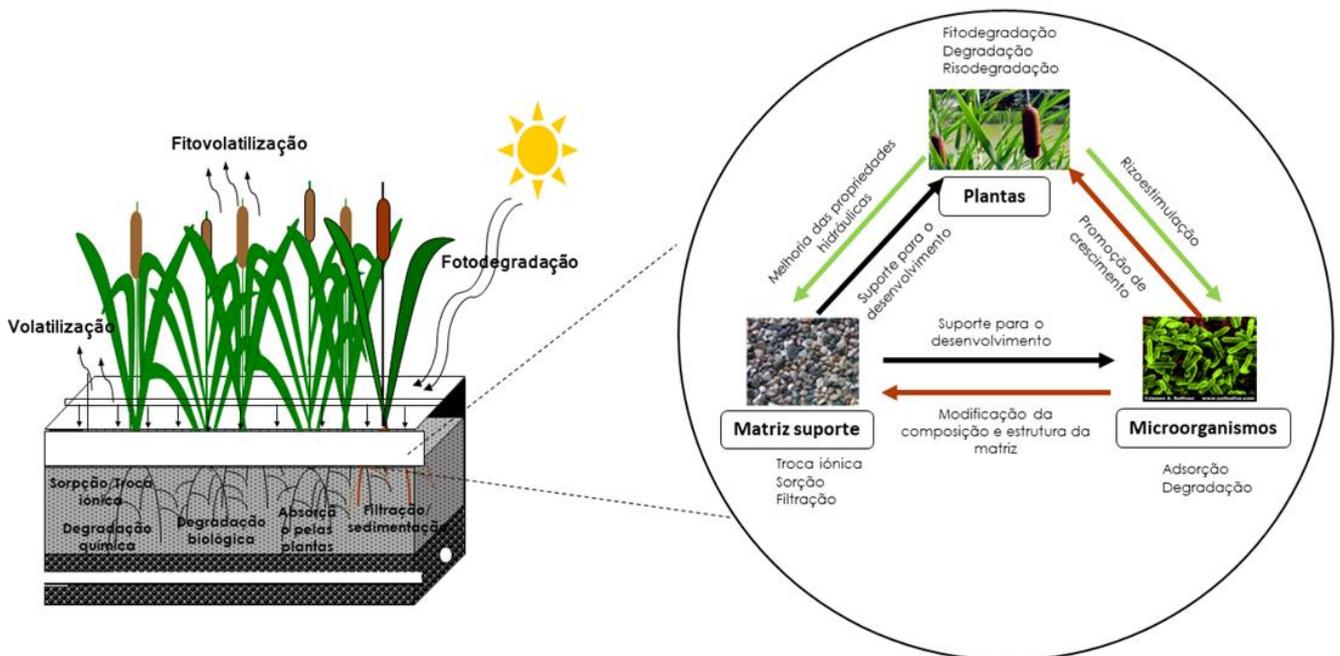


Figura 15 - Principais processos físicos, químicos e biológicos responsáveis pela remoção dos poluentes nos LCM (adaptado de Dordio et al, 2018).

Só uma seleção cuidadosa e criteriosa dos vários componentes (materiais usados como matriz de suporte, espécies plantas selecionadas e microrganismos) de um LCM permite aumentar a eficiência dos mesmos na remoção de uma variedade de poluentes das águas residuais. Para isso contribui muito o conhecimento dos papéis de cada um dos componentes na remoção dos poluentes. A compreensão de como interagem e a

caracterização detalhada de cada componente do LCM são muito importantes para alcançar uma otimização do funcionamento destes sistemas.

3.4.2. Papel da matriz na remoção dos fármacos

A matriz de suporte é um dos componentes fundamentais do LCM para a retenção ou remoção dos poluentes durante o tratamento das águas residuais no sistema, pois, contribui para o bom funcionamento e eficiência do sistema, servindo não apenas como suporte para o crescimento das macrófitas e dos microrganismos, mas também promovendo uma série de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem durante a remoção dos poluentes (Parde et al., 2021).

Nesta perspectiva, na escolha dos materiais a utilizar como matriz de suporte, deve-se ter em atenção algumas das suas características físicas e químicas, como as propriedades ácido-base (responsáveis pela sua carga elétrica de superfície), distribuições de tamanho de partículas, porosidade (que promove um bom arejamento do sistema e um fácil escoamento do efluente) e condutividade hidráulica (elevada condutividade hidráulica, permite maior área disponível para o fluxo da água), pois são fatores que afetam o desempenho do sistema. A capacidade de retenção dos poluentes pela matriz de suporte é também determinante na seleção dos materiais. Sendo assim, é importante a escolha de materiais que possuam uma elevada capacidade para a retenção desses poluentes. Outro aspeto que se deve ter em consideração é a resistência mecânica e química dos materiais (os materiais não devem libertar substâncias que possam ser uma fonte de toxicidade e coloquem em causa o desenvolvimento das plantas e dos microrganismos). Por último, o custo é um fator fundamental na seleção dos materiais da matriz de suporte, o qual está relacionado com a sua disponibilidade local e facilidade de acesso, bem como o tipo de pré-tratamento de que necessitam para poderem ser usados com eficiência (Dordio & Carvalho, 2018).

Neste trabalho, a matriz selecionada inclui uma mistura de dois materiais argilosos processados industrialmente, a vermiculite esfoliada (classe granulométrica nº3) e os agregados de argila expandida, designada por LECA (Light Expanded Clay Aggregates), da classe granulométrica 2/4. Estes materiais argilosos têm vindo a ser cada vez mais usados como matriz de suporte em LCM e têm demonstrado um bom

desempenho na remoção de alguns fármacos em águas contaminadas (Dordio et al., 2017; Machado et al., 2017; Thiebault, T., 2020). A razão para a escolha destes materiais prende-se com a sua adequação de qualquer um deles para o enraizamento de plantas (uma vez que ambos os materiais são usados em horticultura) e por proporcionarem uma elevada área superficial disponível para o desenvolvimento de populações microbianas. Além disso, estes materiais possuem uma comprovadamente elevada capacidade de retenção (por adsorção) de vários compostos orgânicos, onde se incluem diversos fármacos, para além de outras propriedades úteis tais como a elevada porosidade e condutividade hidráulica, e a sua extensa superfície específica. Outro fator importante a ter em conta é o seu baixo custo de aquisição (Özengin, et. al 2016; Dordio, et. al 2017).

As características de ambos os materiais, aliadas pela sua mistura, garantem um contato efetivo entre os poluentes e as partículas constituintes da matriz e propriedades adsorptivas adequadas, além de estar já verificado que esta mistura de materiais possibilita também um bom desenvolvimento da população microbiana e das plantas. Por estas razões, selecionaram-se estes dois materiais argilosos como composição da matriz de suporte a utilizar no presente estudo.

Entretanto, foi também privilegiado o estudo de materiais facilmente acessíveis em Cabo Verde, que possam ser usados fácil e eficientemente no seu estado natural, por exemplo componentes do solo e minerais abundantes em Cabo Verde, ou sub-produtos e resíduos agrícolas da região (e.g. fibra de casca de coco ou de cana-de-açúcar). Daí ter sido testada também a fibra de casca de coco como possível matriz de suporte, que é um material de baixo custo e abundante em Cabo Verde. Assim, a composição da matriz de suporte poderá ser alterada, com a incorporação de fibras de casca de coco como meio de suporte, também ela um material adsorvente com elevada capacidade de adsorção a compostos orgânicos e que facilmente se pode encontrar em C. Verde, além de ser um produto de baixo custo.

a) Vermiculite esfoliada

A vermiculite é um silicato hidratado de formato lamelar, contendo quantidades variáveis de ferro, magnésio, potássio e alumínio, apresentando-se sob a forma de laminais com uma coloração dourada. Quando aquecido a altas temperaturas, este

mineral tem a particularidade de expandir o seu volume dando origem a um material cuja densidade é baixa, permitindo desta forma ter uma elevada capacidade de adsorção e adquirir assim a designação de vermiculite esfoliada, forma como é também conhecida comercialmente (figura 16). Esse material esfoliado tem inúmeras utilidades: é utilizado como isolante térmico e acústico, em produtos da construção civil, horticultura, rações de animais e em muitas outras aplicações industriais (Dupré Minerals, 2016). Devido às suas excelentes características como a elevada área superficial, porosidade, hidrofobicidade, fazem da vermiculite um material adequado para o uso como meio de suporte nos LCM.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos nos últimos anos utilizando esse mineral como um adsorvente de vários compostos orgânicos, incluindo os fármacos presentes em águas contaminadas (Machado et al., 2017; Machado et al., 2020).



Figura 16 - Aspeto dos flocos de Vermiculite.

b) Agregados de Argila Expandida (LECA)

A LECA é um material sintetizado, que é produzido a partir de argila natural ao qual é submetida a temperaturas elevadas que atinge os 1200 °C em um forno rotativo. Em resultado desse aquecimento, o material adquire uma densidade inferior, ficando sob a forma de um agregado arredondado com granulometrias que variam entre 0-32mm, apresentando assim uma superfície relativamente dura, de cor acastanhada e porosa, conforme se pode constatar na figura 17. Na sua parte interna é constituída por muitos poros de tamanhos diversos (Sharifnia et al., 2016).



Figura 17 - Pedras de argila expandida – LECA.

A LECA é utilizada frequentemente como material de isolamento acústico e térmico. De entre as suas características, as mais relevantes para o seu uso como matriz de suporte são as de que tem uma elevada permeabilidade e durabilidade, é quimicamente inerte e ainda tem a vantagem de ter uma baixa densidade. Face as suas excelentes propriedades, recentemente têm sido feitos vários estudos, utilizando a LECA como matriz de suporte em LCM (Dordio et al., 2009; Nkansah et al., 2012; Sharifnia et al., 2013).

c) Fibra de coco

A fibra de coco (figura 18) é o tecido da casca do coco, proveniente do coqueiro comum (*Cocos nucifera*), planta de grande importância do ponto de vista económico e social, mas também agroindustrial. Todavia, uma boa parte dos resíduos do coco são queimados ou descartados como lixo. No entanto, este é um material que pode ser aproveitado pelas suas excelentes propriedades físicas e químicas. De facto, tem sido alvo de estudos, principalmente tendo em vista a sua utilização como filtro orgânico para o tratamento de águas residuais na remoção de metais pesados como o Cádmio e o Chumbo (Silva et al., 2013), embora ainda existam poucos trabalhos desenvolvidos nessa área. Para além disso, a fibra de coco, por ser quase inerte, apresentar elevada porosidade, oferecer resistência ao impacto, e devido à sua abundância e baixo custo de

aquisição (Sampaio et al., 2008) e por ser um material ecológico e facilmente reciclável, tem sido amplamente utilizado em várias áreas, nomeadamente na construção civil, agricultura, indústria de polímeros e ainda como isolante térmico e acústico (Pereira et al., 2013; Pimenta et al., 2015).



Figura 18 - Fibra de Cocos.

A fibra de coco apresenta um grande potencial, face ao elevado teor de matéria orgânica, composta principalmente por celulose e lignina, que lhe confere a rigidez e a dureza. Devido à sua superfície irregular e morfologia porosa, facilita a adsorção de metais pesados em solução (Azevedo, 2008).

Neste trabalho, destaca-se a utilização da fibra da casca de coco como um material com potencial aplicação em matriz de suporte em LCM, pelas vantagens que já foram enumeradas e por ser um material abundante em Cabo Verde, que é descartado para o meio ambiente sem qualquer tipo de tratamento.

3.4.3. Papel das plantas e dos microrganismos na remoção dos fármacos

Como já foi referido, é através da interação entre as plantas, solo e a população microbiana que nos LCMs se obtém a remoção dos poluentes do sistema. As plantas aquáticas são sem dúvida, uma parte essencial nesse processo, contribuindo diretamente para a redução / degradação de diferentes compostos presentes nos efluentes, através de fenómenos como adsorção, absorção, acumulação, metabolização, volatilização, e exsudação de enzimas que ajudam na degradação de poluentes na rizosfera (Dordio & Carvalho, 2018; Batool & Saleh, 2020) Por outro lado, contribuem para a estimulação e desenvolvimento da população microbiana na rizosfera, além de proporcionarem também aos leitos um bom enquadramento paisagístico.

As macrófitas são o tipo de plantas comumente utilizadas nos LCMs, pois têm a especificidade de estarem adaptadas ao meio aquático, uma vez que são plantas que se desenvolvem normalmente em solos húmidos e em ambientes saturados de água e/ou inundados. Os sistemas de arejamento interno destas plantas permitem-lhes, nestas condições, oxigenar os seus tecidos submersos, contribuindo desta forma para terem a capacidade de se desenvolver neste tipo de ambientes húmidos.

A seleção das plantas a utilizar no LCM tem bastante impacto na eficiência do tratamento dos poluentes. Assim, é necessário ter em conta algumas características na escolha das plantas, como a composição da água residual a ser tratada, as condições climáticas, o seu habitat. Para além disso, há que ter em conta ainda o lugar onde será implementando o LCM, a sua área disponível, a altura do leito e a identificação do tipo de plantas infestantes naturais da região (Rousso, 2017; Dias et al., 2020).

É igualmente necessário ter em conta plantas que tenham uma boa capacidade de interação e de absorção dos poluentes, com capacidade de crescerem rapidamente no efluente a tratar, que sejam de fácil colheita, que apresentem elevada produção da biomassa e uma grande resistência a pragas, doenças e aos poluentes. (Shadid et al., 2020).

Com base nas características acima referidas, a macrófita selecionada para o presente estudo foi a *Typha* spp., uma das espécies vegetais mais utilizadas em LCMs, a par de outras plantas como *Phragmites australis* (caniço) e o *Scirpus* spp. (bunho), que se destacam pelo seu uso extensivo no tratamento de efluentes com poluentes orgânicos e no campo da investigação, com vários estudos já realizados, apresentando um nível de eficiência muito elevado na remoção /degradação destes poluentes (Dordio et al., 2018; Dias et al., 2020)

De acordo com a literatura, a *Typha* spp. tem uma grande capacidade de tolerância a vários tipos de fármacos presentes em águas residuais, apresentando assim, uma elevada taxa de eficiência para os remover (Dordio & Carvalho, 2018; Evgenidou et al., 2015 e Yadav et al., 2017). sendo, por isso, a macrófita escolhida como componente vegetal para a constituição do LCM estudado neste trabalho.

A *Typha* spp. é uma macrófita emergente de água doce, mas também tolerante a águas salobras, que possui as folhas fora da água, mas que se encontram enraizadas no sedimento. Pertencente à família das *Thyphaceae* e comumente conhecida como Tábua e/ou Morrão dos fogueteiros, esta planta chega a ter uma altura que pode oscilar entre 1,5 e 3 metros. Cada rebento pode conter entre 12 a 16 folhas e possui rizomas rasteiros, que podem atingir os 70 cm de comprimento, apresentando um crescimento vegetativo rápido e denso. As suas raízes têm a capacidade de penetrar até 0,4 m no substrato (matriz de suporte). É encontrada em diversos habitats aquáticos e, devido à sua grande capacidade de adaptação, pode-se desenvolver em locais poluídos (figura 19).



Figura 19 - Exemplo de uma macrófita emergente, neste caso *Typha* spp.
(Fonte <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/typha-latifolia/>).

Esta planta é bastante resistente a pragas e doenças, propaga-se facilmente, podendo mesmo tornar-se uma espécie invasora (Liu et al., 2017). A *Typha* spp. pode ser semeada ou plantada na forma de rebentos, sendo o verão (junho a agosto) o período ideal para o seu desenvolvimento. Em Portugal, e em particular na região do Alentejo, utiliza-se com frequência esta espécie devido ao facto de ser relativamente abundante nos meios húmidos naturais (Dordio et al, 2011). Esta planta é também uma espécie cosmopolita, apresentando uma distribuição mundial, sendo, por esta razão, também de esperar a sua boa adaptação a Cabo Verde (Duarte et al, 2022).

O bom funcionamento dos LCMs deve-se também ao papel que os microrganismos desempenham na regulação de todo o processo, através do seu metabolismo, pois, conseguem disponibilizar nutrientes para as plantas promovendo o seu crescimento e desenvolvimento, e até mesmo protegendo-as de agentes causadores de doenças. Têm ainda a capacidade de degradar uma grande variedade de poluentes orgânicos e de auxiliar na manutenção da estrutura do substrato (Dordio & Carvalho, 2018; Yu et al., 2012). Estão presentes nas plantas, principalmente na rizosfera ou estão livres na água residual. Desenvolvem-se de uma forma natural nos LCMs e são expostos a vários tipos de fatores muito semelhantes aos que afetam o seu desenvolvimento em ETARs, tais como a presença de substâncias tóxicas, a origem e composição do efluente, nutrientes disponíveis, quantidade de oxigénio dissolvido, temperatura e pH.

Existem diversos tipos de bactérias que conseguem degradar compostos xenobióticos (Yu et al., 2012) e, face a esta diversidade, os microrganismos poderão contribuir para a resistência e resiliência do sistema ao stress pelas descargas de água residual.

3.5. Resposta fisiológica e bioquímica das plantas ao *stress* abiótico

As plantas podem ser sujeitas a diversos fatores de stress (abióticos e bióticos) derivados das condições adversas do meio a que são expostas, como a temperatura, seca, deficiência ou excesso de nutrientes, elevada salinidade do solo, exposição de metais pesados, poluentes, etc. As exposições de plantas a estas condições podem causar desequilíbrios nos processos celulares, tendo como um dos efeitos o aumento da presença de espécies reativas de oxigénio (ROS) que gera o stress oxidativo. O stress por sua vez altera o metabolismo das plantas, afetando-a no seu crescimento, desenvolvimento e produtividade e em casos extremos pode até resultar em morte celular (Choppala et al., 2014).

Como resposta, as plantas desenvolvem estratégias complexas de tolerância e defesa que lhes permitem lidar com os efeitos causados pelo stress. Assim, estas apresentam vários mecanismos de defesa contra o stress induzido pelo exterior, impedindo/reduzindo a acumulação de ROS nos seus tecidos celulares (Choppala et al., 2014). Estas estratégias passam pela ativação de mecanismos de eliminação e de defesa antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, criando desta forma um sistema protetor que controla os ROS que são produzidos em excesso (Gallego et al., 2012).

Plantas mais resistentes, com uma melhor adaptação ao meio e que são mais tolerantes aos fatores causadores de stress podem sobreviver, mas há casos em que as mesmas não conseguem responder da melhor forma, porque o nível de toxicidade é superior ao que está ao alcance das suas defesas e, conseqüentemente, os ROS em excesso causarão danos nas células que no extremo poderão levar à morte da planta. A figura 20, apresenta os principais fatores ambientais de stress e respostas das plantas aos seus efeitos.

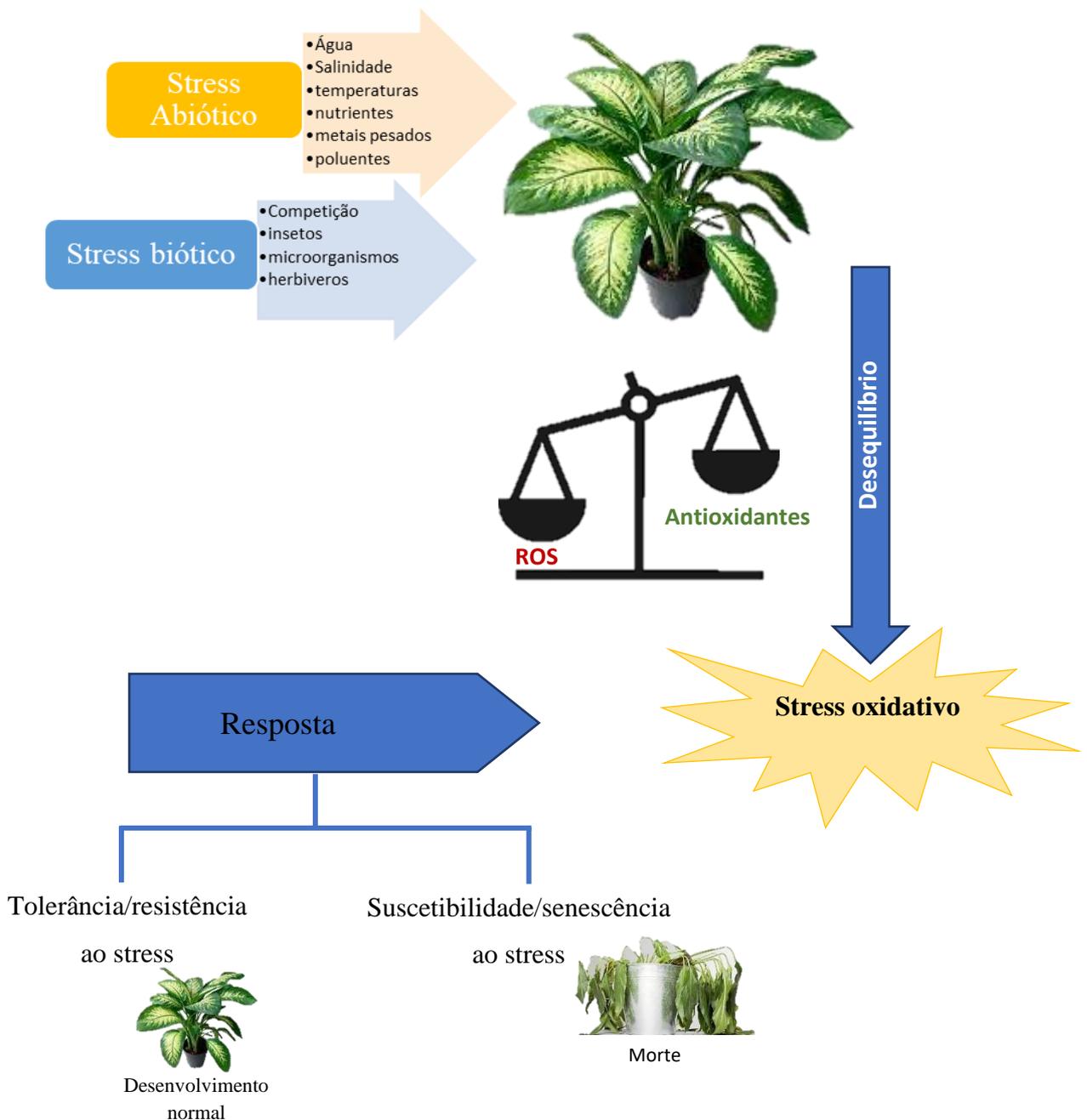


Figura 20 - Respostas das plantas ao stress abiótico (adaptado de Baweja & Kumar, 2020).

Assim, é importante avaliar a capacidade de adaptação da *Typha* spp. aos diferentes fármacos utilizados neste trabalho, por forma a verificar a viabilidade da sua utilização em LCMs no tratamento de águas contaminadas, já que a presença destes poluentes orgânicos podem constituir um fator de stress para as plantas.

3.5.1. Fatores de crescimento e alterações na taxa de fotossíntese

A exposição das plantas aos fármacos pode ter alguns efeitos negativos no seu normal funcionamento e desenvolvimento, nomeadamente nas taxas de germinação, formação de rebentos e até na produção de biomassa. A supressão de crescimento e produtividade das plantas pode ocorrer, estando muitas vezes ligada a uma diminuição da sua atividade fotossintética.

A fotossíntese é um processo metabólico fundamental das plantas, em que é utilizada água e dióxido de carbono para produzir glucose e oxigénio, através da utilização da energia solar absorvida pelos pigmentos fotossintéticos. Existem diferentes tipos de pigmentos fotossintéticos nas plantas: os principais são a clorofila a, a clorofila b e os carotenoides, sendo que as clorofilas a e b são os mais abundantes nas plantas verdes.

O stress afeta profundamente a capacidade das plantas para utilização da energia luminosa absorvida, produzindo desta forma a sobre-excitação da clorofila. E nessas condições, os carotenoides, que são pigmentos acessórios ao processo fotossintético, desempenham um papel determinante ao transferir a energia para a clorofila a, aumentando desta forma o aproveitamento da luz. Além disso, face às suas propriedades antioxidantes, estes pigmentos (carotenoides) contribuem para diminuir / evitar a formação de moléculas oxidativas prejudiciais à célula que estão na origem da diminuição da utilização da luz solar por parte das plantas.

A taxa fotossintética é seriamente afetada nas condições de stress e ocorre uma diminuição do teor de pigmentos fotossintéticos, o que visualmente é evidenciado pelo desenvolvimento de uma coloração amarela nas folhas (cloroses) (Dordio & Carvalho, 2011).

3.5.2. Stress Oxidativo

Durante os processos bioquímicos das plantas, os ROS são constantemente produzidos, fazendo assim naturalmente parte do seu metabolismo. Estas espécies são formas reduzidas de oxigénio que resultam do metabolismo aeróbio, encontrando-se nas células sob a forma de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($OH\cdot$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio singlete (1O_2). O radical hidroxilo é uma das espécies de ROS mais reativas, com um tempo de vida relativamente curto, de 1 ns. Por via da reação de Fenton, consegue-se originar este radical na presença do peróxido de hidrogénio, que é catalisada por ferro ou outros metais de transição (Mourato et al., 2012).

Nesta perspetiva, a maior parte dos radicais livres são eliminados por espécies antioxidantes das plantas (mecanismos de defesa). Contudo, em condições de stress, pode haver um aumento na produção de ROS que supera a capacidade de remoção do sistema antioxidante, causando um desequilíbrio que origina o stress oxidativo. Nestas condições, surgem os danos oxidativos, resultado da presença de quantidades excessivas de ROS, que acabam por oxidar e danificar os lípidos celulares, proteínas e DNA, destruindo os pigmentos fotossintéticos e, conseqüentemente, a inativação das suas enzimas (Choppala et al., 2014). Se o nível de ROS for descontrolado, poderá conduzir à morte celular das plantas. Daí, ser importante um controlo rigoroso do nível de ROS, para a prevenção da toxicidade e permitir que estas espécies reativas estejam envolvidas nos processos fisiológicos de sinalização e de regulação.

3.5.3. Mecanismos de defesa antioxidante

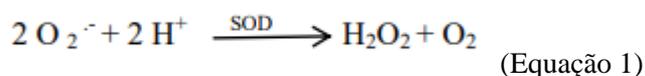
Em resposta às ameaças do meio, as plantas conseguem ativar os seus mecanismos de defesa para combater o stress oxidativo oriundo do excesso de ROS. Esse sistema de defesa antioxidante desempenha um papel importante, pois, são capazes de remover, neutralizar e ou reduzir os danos causados pelos radicais livres produzidos em grandes quantidades. Estes agentes antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos.

Entre os principais agentes antioxidantes enzimáticos, estão a enzima superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato-peroxidase (APX) e a guaiacol-

peroxidase (GPX), enquanto os não enzimáticos distinguem-se entre hidrossolúveis (ácido ascórbico) e lipossolúveis (os carotenoides e a vitamina E, onde está presente o α -tocoferol). Nas células das plantas, as enzimas antioxidantes atuam de forma coordenada, de modo a desintoxicar as espécies reativas de oxigénio como também realizar a regeneração dos substratos redutores, pertencentes ao sistema antioxidante não enzimático, como a glutatona e o ascorbato. A atividade destes sistemas, atuando de forma coordenada, irão proteger as células e os seus componentes contra os danos oxidativos a que as plantas estão sujeitas.

Apesar de cada enzima possuir um papel fundamental no controlo dos níveis de ROS produzidos nas células, o presente trabalho irá determinar a capacidade de apenas alguns destes antioxidantes (neste caso o SOD, CAT e GPX) na remoção dos radicais livres.

Assim, dentro das células, a SOD é a primeira linha de defesa contra a produção excessiva de ROS, sendo capaz de catalisar a dismutação do anião radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio, conforme a equação 1 (Mourato et al., 2012; Mourato et al., 2015).

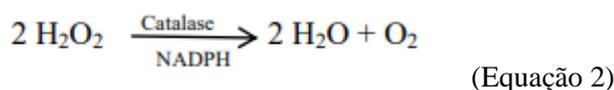


A SOD está presente em todos os compartimentos celulares vegetais, que são suscetíveis ao stress oxidativo, entre eles o citosol, mitocondrial, cloroplastos, glioxissomas, peroxissomas, apoplastos. É a principal enzima envolvida na defesa aos ROS e tem um papel fundamental como antioxidante na eliminação do poder tóxico do radical hidroxilo, convertendo assim todo o oxigénio prejudicial em peróxido de hidrogénio (menos reativo), que ainda assim precisa de ser removido por ação de outras enzimas, tais como a CAT, que irá catalisar a reação de dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 , ou peroxidases que removem o H_2O_2 de vários compartimentos celulares usando o ascorbato (APX) ou compostos fenólicos como o guaiacol (GPX) como substrato dador de eletrões (Mourato et al., 2012). Assim, para prevenir melhor os danos causados pelo stress oxidativo, é importante a conjugação da ação das várias enzimas antioxidantes: SOD, CAT, APX e GPX.

A APX é uma enzima responsável pela desintoxicação do H₂O₂, que usa ascorbato como substrato (dador de eletrões) para catalisar a decomposição do peróxido de hidrogénio em água, protegendo assim os cloroplastos e outros compartimentos celulares dos possíveis danos causados a partir do H₂O₂ e do radical hidroxilo.

Esta enzima consegue atuar mesmo na presença de concentrações baixas de H₂O₂, devido à sua elevada afinidade para esta espécie, enquanto outras enzimas como o caso da CAT são responsáveis pela remoção do seu excesso (M. Mourato et al., 2012)

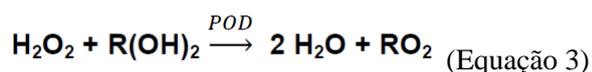
A CAT, uma hemoproteína citoplasmática, é uma enzima que está presente sobretudo nos peroxissomas, onde promove a dismutação do H₂O₂ a H₂O e O₂, (equação 2)



Esta enzima tem um papel fundamental na remoção de H₂O₂, que por sua vez já tem os seus níveis alterados pela atividade da SOD. Quando expostos a um stress oxidativo, há um aumento de peroxissomas (Mourato et al., 2012).

Mesmo sabendo que a CAT é responsável pela remoção de grandes quantidades de H₂O₂, a sua localização (peroxissomas) limita desta forma a capacidade de manter níveis baixos de H₂O₂ o suficiente, para que não ocorra danos oxidativos noutros setores da célula, como por exemplo nos cloroplastos.

E, por fim, a enzima GPX desempenha um papel fundamental ao nível do metabolismo das ROS, pois atua nos peróxidos catalisando a decomposição do peróxido de hidrogénio (equação 3).



Esta enzima é a principal defesa quando o H₂O₂ se encontra em baixas concentrações, competindo desta forma com a CAT, pelo substrato H₂O₂ (Mourato et al., 2012). Por ter uma boa afinidade com o H₂O₂, consegue atingir uma velocidade máxima de reação com menores quantidades de substrato. As peroxidases utilizam como agente redutor

um substrato que difere conforme o tipo das suas especificidades. No caso da guaiacol peroxidase são utilizados diversos fenóis aromáticos (Fijalkowski et al., 2020).

O fato de não existir uma defesa enzimática especializada, e considerando a potencialidade do radical hidroxilo OH[•], é essencial uma ação combinada e equilibrada entre as enzimas antioxidantes.

Em relação aos antioxidantes não enzimáticos destaca-se o ascorbato e a glutatona. O primeiro reage diretamente com os radicais hidroxilos, radicais de anião superóxido e singletos de oxigénio, sendo por isso o principal antioxidante primário responsável pela minimização de danos causados por stress oxidativo, graças também a sua ação sinérgica e conjunta com outros antioxidantes, como é o caso dos carotenoides. Já a glutatona, mantém o ascorbato na forma reduzida pela via ascorbato-glutatona, sendo por isso um tampão redox.

Devido ao seu sistema conjugado de duplas ligações, o carotenoide é um poderoso antioxidante que funciona como um inibidor de espécies reativas de oxigénio, que o torna um importante integrante dos mecanismos de defesa no combate ao stress (Esteban et al., 2015; Mourato et al., 2012).

4

Metodologia experimental

4.1. Reagentes e material

Ao longo deste trabalho, foram utilizados os seguintes reagentes e materiais para a realização dos ensaios experimentais, cujas principais características estão apresentadas nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Características e fornecedores dos reagentes utilizados

Reagente	Fórmula Química	Riscos	Molar (g mol ⁻¹)	Grau de Pureza (%)	Fornecedor
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	Tóxico; inflamável	41,05	HPLC gradiente	Merck
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	Corrosivo	98,00	85,0	Gomes dos Santos
Água para HPLC	H ₂ O		18,02		Fischer chemical
Metanol	CH ₃ OH	Tóxico Inflamável	32,04	99,8	VWR
Sulfametoxazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	Nocivo irritante	253,3	>98	Sigma-Aldrich
Trimetoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	Nocivo irritante	290,32	>98,0	Sigma-Aldrich
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	Nocivo	206,29	≥98 (GC)	Sigma-Aldrich
Diclofenac	C ₁₄ H ₁₁ CL ₂ NO ₂	Nocivo	296,147	≥ 99	Sigma-Aldrich
Naproxeno	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	Nocivo	252,24	98 - 102	Sigma-Aldrich
Furosemida	C ₁₂ H ₁₁ CLN ₂ O ₅ S	Perigos para a saúde	330,74	>97,0	Sigma-Aldrich
Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	Nocivo	236,269	97.0+% (HPLC)	Sigma--Aldrich

Tabela 5 - Características e fabricantes dos materiais utilizados

Material	Características	Fabricante
LECA (Light Expanded Clay Aggregates)	Granulometria 2/4 (2-6.3 mm) Porosidade (%) – 49 ± 1 Densidade aparente (kg m ⁻³) - 394 ± 10 pH (H ₂ O) – 9.04 ± 0.08	MaxitGroup, Portugal
Vermiculite	Granulometria 3 (0,8 - 5 mm) Porosidade (%) – 66 ± 1 Densidade aparente (kg m ⁻³) – 88 ± 2 pH (H ₂ O) - 7.44 ± 0.06	Aguiar Mello Lda
Fibra de Coco	-	Recolhida em Cabo Verde

Foram selecionados dois materiais argilosos numa primeira fase para serem utilizados como constituintes da matriz de suporte a utilizar nos microcosmos de LCMs durante os ensaios realizados, nomeadamente a vermiculite esfoliada com granulometria 3 e os agregados de argila expandida (LECA) com granulometria 2/4.

Tanto a LECA como a vermiculite e a fibra de coco tiveram que ser lavadas várias vezes com água ultrapura (Fisher Chemical), antes da sua respetiva utilização, permitindo, deste

modo, remover as partículas finas e os sólidos em suspensão que estes materiais apresentavam, devido ao desgaste mecânico. Para reduzir ao máximo o desenvolvimento da população microbiana presente nestes materiais, estes foram secos numa estufa a uma temperatura de 105°C, durante 24 horas.

Posteriormente a LECA e a vermiculite esfoliada foram misturadas numa proporção de 1:1 (v/v), servindo como matriz de suporte nos microcosmos de LCM estudados.

Foram ainda realizados outros ensaios de adsorção com a fibra de coco com o objetivo de compreender melhor o processo de biossorção e auxiliar no desenvolvimento de pesquisas para encontrar novos biossorbentes alternativos no tratamento de águas residuais.

4.2. Metodologia analítica

O doseamento dos fármacos presentes em soluções aquosas foi efetuado com recurso à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com deteção por DAD (Diode-Array Detection) de modo a permitir a separação e quantificação efetiva de cada composto, utilizando para tal um equipamento Agilent 1100 system equipado com detetor DAD (Agilent Technologies, Alemanha) e com um injetor manual Rheodyne 7725i, sendo manobrado através do software HP Chemstation.

Recorreu-se a esta técnica analítica, porque era necessário obter uma completa separação dos vários fármacos presentes nas amostras a analisar de modo a efetuar a sua quantificação seletiva, uma vez que as soluções utilizadas neste trabalho eram constituídas por misturas de vários fármacos. A técnica cromatográfica permite, após otimização das condições, a separação dos diversos analitos e proporciona assim uma quantificação seletiva, com uma elevada sensibilidade. A técnica de HPLC tem como principais vantagens permitir realizar análises com reduzidas quantidades de amostra, possibilitar efetuar a separação dos compostos em poucos minutos e apresentar alta resolução, que permite a deteção de mais de duzentas substâncias diferentes. Tem como principais desvantagens, contudo, ser um método relativamente caro (principalmente os reagentes e equipamentos) e pouco amiga do ambiente (já que as fases móveis são normalmente solventes orgânicos).

Relativamente à quantificação usando um detetor do tipo DAD, o qual permite a detecção UV/Vis a vários comprimentos de onda em simultâneo bem como a obtenção, ao longo do tempo, de espectros de absorção da amostra à saída do sistema cromatográfico, tem-se a vantagem de poder efetuar a quantificação aos vários comprimentos de onda ótimos para cada analito (i.e. aos seus comprimentos de onda de máxima absorvidade) permitindo assim a otimização para máxima sensibilidade, isto apesar deste tipo de detetores serem, em geral, de ligeiramente menor sensibilidade que os detetores UV/Vis mais simples, que efetuam a cada instante a detecção apenas a um único comprimento de onda.

Antes da realização das análises através do HPLC-DAD, foi necessário proceder à filtração das amostras antes da sua injeção, usando filtros com porosidade máxima de 0,45 μm , de modo a eliminar pequenas partículas que poderão danificar o equipamento de HPLC, causando entupimentos dos capilares e desgaste e deterioração da bomba

Antes de se iniciar a execução do plano de trabalhos referente aos ensaios de remoção dos fármacos nos LCMs foi necessário também proceder à otimização e validação da metodologia analítica a ser utilizada para a quantificação dos fármacos no HPLC-DAD.

4.2.1. Otimização das condições de quantificação dos fármacos em solução por HPLC-DAD

4.2.1.1. Otimização das condições de quantificação espectrofotométrica dos fármacos em solução

Para se maximizar a sensibilidade na quantificação dos compostos em estudo, determinou-se para cada um dos fármacos o valor de comprimento de onda (c.d.o.) para o qual as suas absorvâncias apresentavam um valor máximo. De acordo com a bibliografia consultada para os fármacos em estudo, estes valores estariam entre 200 e 400 nm (Patel & Solanki, 2012; Lopes, 2016; Mehta et al., 2012; Saumya & Panneerselvam, 2017). Assim com base nisso, obtiveram-se os espectros de absorção para soluções de cada um dos fármacos estudados à concentração de 10 mg L⁻¹, através

de um varrimento de comprimentos de onda que foi efetuado na zona do ultravioleta, num intervalo de c.d.o. entre 190 e 320 nm, o que permitiu a identificação de absorvância máxima para cada um dos fármacos (figura apresentada no ponto 5.1.1) e assim definir o c.d.o. de trabalho a ser utilizado no HPLC-DAD.

Utilizou-se uma concentração de 10 mg L⁻¹ pelo facto de, a esta concentração, serem obtidas absorvâncias elevadas, o que permite a identificação dos máximos de absorvância com maior precisão.

Na preparação das soluções de fármacos, a sua solubilização foi auxiliada com a adição de 1% de metanol, dada a baixa solubilidade de muitos desses compostos. As soluções foram armazenadas no escuro, de modo a evitar a fotodegradação.

4.2.1.2. Condições de quantificação dos fármacos no HPLC-DAD

Para se proceder à quantificação dos fármacos estudados em solução aquosa, por HPLC-DAD, utilizou-se uma coluna analítica de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, Alemanha), com dimensões de 250 mm × 4,6 mm e com tamanho das partículas de 5,0 µm, e, como fase móvel, recorreu-se a um sistema binário de solventes, composto por: A- acetonitrilo, B- água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fosfórico (H₃PO₄). A eluição ocorreu isocraticamente, tendo sido testadas diferentes proporções de A e B, de forma a obter uma composição da fase móvel que permitisse simultaneamente uma boa separação dos sete fármacos e uma redução do respetivo tempo de retenção dos analitos, reduzindo assim, conseqüentemente, o tempo de análise. Após otimização da composição do eluente, as proporções escolhidas foram de 55% de eluente A e 45% de eluente B.

As análises decorreram à temperatura ambiente (sem termostatização) e os volumes de amostra injetados foram de 20 µL. Foram realizadas três réplicas das injeções de cada amostra, que foram previamente filtradas através de um filtro de 0,45 µm de membrana de nylon, de marca Labfil.

Antes de se proceder à filtração das amostras, foi necessário otimizar o volume de amostra a filtrar para que a perda dos compostos em estudo, durante esta etapa fosse mínima, uma vez que se verificou em estudos anteriores que alguns fármacos (como é o caso da FUR) ficam parcialmente retidos em filtros de nylon (Machado et al., 2020). Por isso, é essencial realizar testes para averiguar as condições para efetuar o pré-tratamento do filtro que permita a saturação dos locais de adsorção dos polímeros, de modo a ajudar a minimizar essas perdas, i.e. de modo a que os mesmos já não estejam disponíveis para reter o analito quando for feita a filtração da amostra. É também útil testar filtros de diferentes materiais, que apresentem diferentes afinidades com os analitos e, conseqüentemente, os retenham em diferente extensão.

Assim, de forma a maximizar a percentagem de recuperação de todos os fármacos, procedeu-se à medição da absorvância das soluções dos fármacos em estudo (IBU, DCF, NAP, TMP, SMZ e CBZ) nas concentrações de 2 e 10 mg L⁻¹ antes e após a filtração, utilizando 3 filtros diferentes: filtros de membrana de nylon 0,45 µm (Ø = 25mm) da marca filtraTECH, filtros de membrana de nylon 0,45 µm (Ø = 25mm) da marca Labfil e filtros de membrana hidrofílica de PTFE 0,45 µm (Ø = 25mm) da marca Labfil, na perspectiva de otimizar o volume de amostra a filtrar para saturar os diferentes filtros. Os testes de filtração, foram feitos com recurso a seringas de plástico de 5ml da Ecoject. Foi recolhido sempre o último mililitro e meio de cada volume filtrado para posterior quantificação dos compostos. Para cada uma das concentrações testaram-se vários volumes (5, 10, 15, 20, 25 e 30 mL), até ter sido obtida uma percentagem de recuperação dos compostos de aproximadamente 100 %. Foram feitas 3 réplicas para cada volume testado.

Para reduzir a fotodegradação de alguns destes compostos, todas as soluções foram armazenadas na ausência de luz.

4.2.1.3. Validação do método analítico

O método analítico utilizado foi validado de acordo com o procedimento descrito no guia “ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 1994”. (ICH, 1994). Para isso, foram determinados um conjunto de parâmetros, nomeadamente a exatidão, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), linearidade da reta de calibração e ainda os limites de deteção e quantificação do equipamento.

De modo a analisar a exatidão e a repetibilidade do aparelho utilizaram-se soluções com 3 concentrações distintas, nomeadamente 0.5 mg L⁻¹ (concentração baixa), 2.0 mg L⁻¹ (concentração intermédia) e 4.0 mg L⁻¹ (concentração elevada). Para cada amostra fizeram-se 3 injeções consecutivas da mesma solução padrão, mantendo a composição da fase móvel e as mesmas condições de eluição. A repetibilidade foi avaliada como a dispersão ou desvio padrão relativo (% DPR) das áreas dos picos atribuídos ao analito. A exatidão, expressa em percentagem, foi calculada pela razão entre a média das concentrações determinadas experimentalmente e as concentrações teóricas (de preparação das soluções) (ICH, 1994).

Para avaliar a reprodutibilidade do aparelho, foram feitas 3 injeções em 5 dias diferentes de soluções com as mesmas concentrações de cada um dos fármacos. Também foi avaliada como a dispersão ou desvio padrão relativo (% DPR) das áreas dos picos atribuídos aos analitos (ICH, 1994).

As curvas de calibração foram obtidas, utilizando 7 soluções padrão com concentrações que variaram entre 0.25 e 4.0 mg L⁻¹. O método dos mínimos quadrados (regressão linear) foi aplicado para a análise da correlação linear na gama de concentrações usadas, permitindo dessa forma, obter o declive e o coeficiente de determinação (R²).

Os limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) para a técnica de HPLC-DAD, obtiveram-se a partir da determinação da concentração do analito correspondente ao sinal do branco mais 3,3 e 10 vezes o desvio padrão, respetivamente (ICH, 1994), valores estes obtidos através da interpolação da reta de calibração.

4.3. Avaliação da capacidade de remoção do fármaco em microcosmos de LCMs plantados com *Typha* spp.

4.3.1. Caracterização físico-química da matriz de suporte

As propriedades químicas que são determinadas pela composição dos materiais bem como as características físicas dos mesmos, são fatores importantes que afetam o desempenho da matriz e do sistema num leito construído de macrófitas, pois estes, influenciam de forma determinante a sua capacidade de adsorção de compostos orgânicos, as propriedades hidráulicas do sistema e o desenvolvimento da componente biota (plantas e população microbiana).

Com vista à caracterização físico-química da mistura LECA + Vermiculite (1:1, v:v), foi determinada a porosidade do meio (volume de vazios), a densidade aparente e o pH em água.

A porosidade do meio (o volume de vazios) foi estabelecida a partir da quantidade de água necessária para saturar um volume conhecido de cada material (n=5) (Brix et al., 2001; Del Bubba et al., 2003). Enquanto a densidade aparente foi determinada a partir da razão entre o peso seco e o volume aparente do material (n=5) (Brix et al., 2001; Del Bubba et al., 2003)

Já o pH foi determinado através da colocação de 10 g de mistura (LECA + vermiculite) em contacto com 75 mL de água (com pH 5,58) onde, após 30 minutos de agitação, efetuaram-se as medições potenciométricas, num total de 5 leituras.

4.3.2. Recolha e aclimação das plantas

Os rizomas com novos rebentos de *Typha* spp. foram recolhidos em abril de 2018, nas margens da Barragem do Maranhão, no concelho de Avis. A fim de remover as partículas de solo/ sedimentos as plantas foram lavadas com água corrente e as raízes foram mergulhadas numa solução diluída de hipoclorito de sódio (5%, v/v) para diminuir a população microbiana. Posteriormente, as plantas foram colocadas em recipientes de 20 litros e mantidas apenas em água durante cerca de 2 semanas. Após esse período inicial de aclimação, a água foi substituída por uma solução nutritiva de

Hoagland modificada e renovada 2 vezes por semana com o intuito de evitar alterações significativas de pH e deficiências de nutrientes.

Depois deste período de aclimação das plantas e com o desenvolvimento de novas raízes e rebentos, as plantas jovens com um tamanho e peso uniforme (com tamanho entre 30 e 40 cm e o peso de aproximadamente 90g) foram seleccionadas para a montagem dos ensaios nos leitos.

4.3.3. Montagem dos microcosmos de LCMs

O sistema de microcosmos foi montado de acordo com estudos previamente elaborados (Dordio et al., 2017) que tiveram o objetivo de otimizar o sistema para a remoção mais eficiente de fármacos.

Os ensaios foram realizados em microcosmos de LCMs, instalados em recipientes de PVC com as dimensões de 0,25 m de largura, 0,30 m de comprimento e 0,30 m de profundidade, tendo como matriz de suporte uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 3 (1:1, v: v) e plantados com *Typha* spp. A escolha da matriz de suporte foi baseada em estudos anteriores, onde a mesma apresentou elevadas eficiências na remoção de poluentes orgânicos xenobióticos presentes em águas, incluindo também alguns fármacos (Dordio et al., 2017).

Quatro dos leitos foram plantados em novembro de 2018 com plantas jovens, provenientes de rebentos de *Typha* spp. (densidade das plantas = 40 plantas/m²). Após a montagem dos microcosmos, estes foram deixados a aclimatar às novas condições por um período de aproximadamente 6 meses (até maio de 2019) permitindo assim que as plantas desenvolvessem novas raízes e rebentos e que a população microbiana se estabelecesse.

Em maio de 2019, altura em que foi realizado o Ensaio I as plantas tinham uma altura média 64 cm para a folha menor e 80 cm para a maior e uma densidade média nos leitos era agora de 87 plantas/m².

Os leitos montados foram organizados em 4 grupos, de acordo com a figura 21 onde estão ilustrados os esquemas dos diferentes sistemas utilizados:

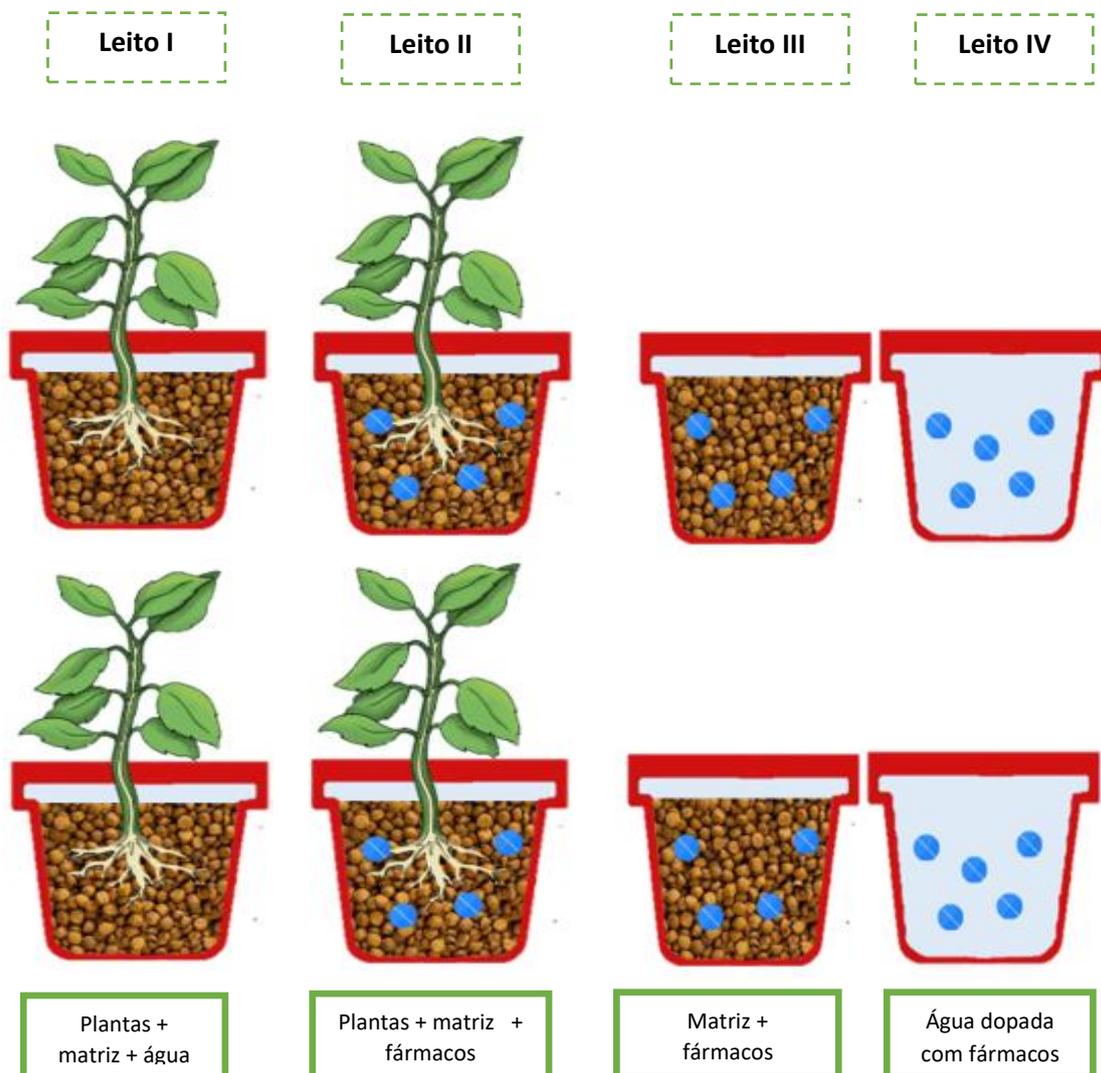


Figura 21 - Montagem dos sistemas de microcosmos

Leitos I (réplicas A e B): leitos plantados contendo apenas 3L de água destilada sem fármacos, com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos fitotóxicos dos fármacos nas plantas (serve de controlo para os parâmetros fisiológicos e bioquímicos das plantas não expostas aos fármacos).

Leitos II (réplicas C e D): leitos plantados contendo 3L de água dopada com 2,5 mg/L de cada um dos fármacos, com o objetivo de avaliar a capacidade dos LCMs para remover os compostos e analisar alguns efeitos fitotóxicos resultantes da exposição das plantas aos fármacos.

Leitos III (réplicas E e F): leitos não plantados com a mesma composição de matriz de suporte, ou seja, composta apenas pela LECA 2/4 e pela vermiculite esfoliada 3, contendo 3L água dopada, com 2,5 mg/L de cada um dos fármacos, com o objetivo de avaliar a capacidade da matriz (LECA + vermiculite) para remover estes fármacos.

Leitos IV (réplicas G e H): recipientes sem plantas nem matriz, onde foram colocados 3L de água dopada com 2,5 mg/L de cada um dos fármacos, com o objetivo de avaliar a remoção destes compostos por fotodegradação, hidrólise ou adsorção às paredes dos recipientes, i.e., para excluir o efeito de outros processos de remoção que não fossem às plantas, microrganismos ou matriz.

Com o objetivo de compensar as possíveis perdas de água do sistema por evapotranspiração, durante todo o período em que decorreu a estudo, em todos os leitos, foi sendo adicionada água destilada sempre que necessário de modo a manter o seu nível ligeiramente abaixo da superfície da matriz, permitindo assim garantir uma taxa de inundação de aproximadamente 100%. Na figura 22, apresenta-se uma fotografia dos microcosmos de LCMs utilizados na altura do início da realização dos ensaios.



Figura 22 - Fotografia dos microcosmos no início dos ensaios.

4.3.4. Condições de operação dos LCMs e recolha de amostras

No total foram realizados 3 ensaios utilizando os microcosmos de LCMs acima descritos. Estes ensaios foram realizados nos seguintes períodos:

- Ensaio I: 21 a 27 de maio de 2019;
- Ensaio II: 22 a 28 de maio de 2021;
- Ensaio III: 4 a 10 de maio de 2022

Não foi possível realizar os ensaios que estavam programados para o mês de maio de 2020 devido às restrições impostas pela situação de pandemia, que obrigaram à limitação de deslocações e de trabalho em laboratório.

Os ensaios foram intencionalmente realizados todos nas mesmas alturas do ano, de modo a que as condições climatéricas e estado de desenvolvimento dos leitos fossem idênticos nos vários ensaios para permitir uma comparação entre resultados.

Para a realização dos ensaios (I, II e III) utilizou-se em cada ensaio água dopada com uma mistura diferente de fármacos, estando cada fármaco presente numa concentração de 2,5 mg/L (sessão 4.3.5). Todas as experiências foram realizadas ao ar livre, conduzidas em modo descontínuo, mantendo-se o volume inicial de solução e sem o escoamento/passagem de qualquer outro tipo de solução durante a realização do ensaio. Quanto ao nível de líquido, manteve-se apenas ligeiramente abaixo da superfície da matriz como referido no ponto anterior.

Efetuaram-se recolhas de amostras de solução em todos os leitos no primeiro dia, logo no início da experiência ($t=0$), ao fim de 30 minutos, e depois ao fim de 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 6; 7,5 e 24 h. Posteriormente as recolhas foram efetuadas a cada 24 horas, até perfazer o total de horas dos ensaios I, II e III (respetivamente 216h, 120h e 168h).

Durante as recolhas, as amostras foram retiradas com recurso a uma pipeta graduada até aproximadamente a meia altura da profundidade dos recipientes, e em pontos aleatórios das superfícies dos leitos, por forma a garantir uma maior representatividade e homogeneidade da solução que se encontrava em cada leito. Em seguida as amostras foram filtradas, guardadas no frio e no escuro, até serem analisadas pelo HPLC-DAD.

Para compensar o volume de água perdido por evaporação e transpiração que ocorria diariamente, perfazia-se o volume que faltava nos microcosmos com água destilada até atingir o valor inicial.

O valor do pH da solução de todos os recipientes foi determinado para os diferentes tempos de amostragem.

Para a determinação dos parâmetros bioquímicos, foi recolhida aleatoriamente em cada um dos leitos parte aérea das plantas, para os mesmos tempos de ensaio. Após isso, o material vegetal foi cortado em pequenos pedaços e as amostras foram devidamente identificadas e conservadas a -80°C.

No início e no final da experiência, mediram-se os tamanhos da folha maior e da folha menor de cada uma das plantas dos leitos e verificou-se a existência de novas folhas ou rebentos. Fez-se também uma avaliação visual do aspeto das plantas registando o aparecimento de cloroses ou necroses.

4.3.5. Ensaio para avaliação de remoção de fármacos

4.3.5.1. Ensaio I

Neste ensaio foram selecionados dois antibióticos (SMZ e TMP) e um anti-inflamatório (DCF), uma vez que estas classes de fármacos estão entre as que mais frequentemente são detetadas em amostras ambientais, devido ao seu uso massivo e baixa remoção nas ETARs, causando problemas sérios como, no caso dos antibióticos, a resistência à sua ação desenvolvida pelos agentes patogénicos em resultado da sua contínua exposição. Testou-se também neste ensaio a FUR, pertencente à classe dos diuréticos, também bastante consumida e presente em amostras ambientais, embora não tanto como os outros fármacos acima referidos. Pelos motivos referidos, escolheu-se primeiro realizar um estudo somente com estas classes: antibióticos, anti-inflamatórios e diuréticos. Assim, os fármacos estudados neste ensaio foram o SMZ, TMP, DCF e FUR.

4.3.5.2. Ensaio II

Para além dos fármacos utilizados no ensaio I, e como não foi possível quantificar o TMP nesse ensaio, decidiu-se neste estudo alargar a variedade de fármacos estudados, englobando mais um fármaco da classe dos anti-inflamatórios, neste caso a NAP. No

entanto, apesar de não ser quantificado, continuou-se a manter o TMP no ensaio seguinte para se poder manter a mistura complexa e porque normalmente em amostras ambientais aparece sempre associado ao outro fármaco, o SMZ, pelo facto de serem administrados em conjunto. Assim, os fármacos estudados neste ensaio foram o SMZ, DCF e FUR e NAP.

4.3.5.3. Ensaio III

Foi introduzido um novo fármaco, a Carbamazepina, e uma nova classe, os psico ou neuro-fármacos, de modo a obter uma mistura mais complexa que se aproxime mais da situação real, permitindo assim avaliar com mais realismo a eficiência do tratamento de águas residuais para remoção dos mesmos.

Por outro lado, a FUR foi excluída deste ensaio pelo facto de haver já vários estudos atualmente publicados com este fármaco e pelas dificuldades com a sua quantificação devido à sua retenção nos filtros. Assim optou-se por fármacos mais representativos e mais comuns em amostras ambientais tais como o IBU e a CBZ. O IBU é dos anti-inflamatórios mais consumidos no mundo e frequentemente detetados em amostras ambientais, devido às grandes quantidades que normalmente entram nas ETARs, onde apesar de ter remoções elevadas (que podem situar-se à volta dos 90%) a porção não removida restante constitui ainda uma significativa carga poluente. Em relação à CBZ que é um composto neuroativo, não é consumida em quantidades tão elevadas como o IBU, mas apresenta uma baixa percentagem de remoção nas ETARs, pois são fármacos mais difíceis de biodegradar e, portanto, muito persistentes.

Nos últimos anos, estes poluentes emergentes têm sido objeto de vários estudos. Cada vez mais aumenta a importância de realizar estudos com estes fármacos, por forma a melhorar a eficiência da remoção dos mesmos nas ETARs e diminuição da sua emissão para o meio ambiente, dada a sua potencial ecotoxicidade e persistência, e surgem já países a sugerir normas que limitem as quantidades admissíveis em águas residuais tratadas. Assim, os fármacos estudados neste ensaio foram o SMZ, TMP, NAP, DCF, CBZ e IBU.

4.4. Resposta fisiológica e bioquímica das plantas ao stress abiótico

4.4.1. Parâmetros de crescimento

Através da medição do tamanho da folha maior e da menor de cada planta, foi avaliado o parâmetro do crescimento das plantas, tendo-se verificado a existência de novos rebentos e contado o número de folhas. A altura foi medida com uma fita métrica convencional começando na base do caule até à última inserção foliar.

4.4.2. Determinação da clorofila e carotenoides

Para a determinação da clorofila seguiu-se o método de extração de Lichtenthaler modificado (Lichtenthaler, 1983) previamente otimizado. Assim para a determinação da clorofila (a e b) e carotenoides pesaram-se 0,5 g de folhas e maceraram-se num almofariz com 2,0 g de areia até obtenção de um pó fino, que foi transferido para um copo onde se procedeu a 2 ou 3 extrações sequenciais:

- 1^a Extração: adicionou-se 15 mL de metanol e guardou-se em gelo, durante 20 minutos. Recolheu-se o sobrenadante para um tubo de centrífuga e guardou-se em gelo e no escuro até se proceder à centrifugação

- 2^a e 3^a Extração: adicionou-se 5 mL do solvente de extração e guardou-se em gelo durante 15 min. Recolheu-se os extratos para tubos de centrífuga e guardou-se no gelo e no escuro até se proceder à centrifugação.

Centrifugou-se todos os tubos durante 20 min. a 7500g e recolheu-se o sobrenadante dos tubos de centrífuga para um balão volumétrico de 25 mL e fez-se o volume com solvente de extração (metanol). Todo o procedimento de extração foi efetuado no escuro ou com baixa intensidade de luz e a temperaturas de 4°C. Para cada amostra efetuaram-se 3 réplicas da extração.

As medições de absorvância foram feitas no Espectrofotómetro UV/Vis da Thermo Electron Corporation Nicolet evolution 300, aos c.d.o. de 470 nm para determinação dos carotenoides, e 652 e 665 nm para a clorofila a clorofila b e clorofila total (a + b). Para valores de absorvância superiores a 1,0 efetuaram-se diluições do extrato com metanol. Utilizou-se como branco o metanol.

4.4.3. Determinação da atividade enzimática antioxidante

4.4.3.1. Extração do material vegetal

A preparação de extratos para a determinação da atividade enzimática consistiu na maceração, em almofariz frio, do material vegetal (folhas) com areia (2,0g), utilizando-se cerca de 0,5 g de folhas, ao que se adicionou 2 % (p/v) de polivinilpirrolidona insolúvel (PVP) e 10 mL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM (pH = 7,5) e 2 % (p/v) PVP). Transferiram-se as misturas para erlenmeyers, que foram colocados em banho de gelo, e agitaram-se as misturas por períodos de aproximadamente 10 segundos, seguidos de 2 minutos de repouso, prolongando-se este procedimento durante 10 minutos.

De seguida, o material vegetal foi centrifugado a 12000 g durante 20 minutos, a uma temperatura de 4 °C, em centrífuga refrigerada (Sigma-3-18K). O sobrenadante foi recolhido para tubos eppendorf, obtendo-se um extrato límpido, utilizado para determinação das atividades enzimáticas.

Realizaram-se 3 réplicas de cada extração. A recolha das amostras para determinação da atividade enzimática foi efetuada nos tempos 0, 3 e 6 dias.

4.4.3.2. Catalase (CAT)

A determinação da atividade da catalase baseia-se no método referido por (Aebi, 1984), em que a determinação da velocidade inicial é efetuada a partir da taxa de diminuição de absorvância devido à decomposição do H₂O₂, sendo a diminuição de absorvância proporcional à quantidade de enzima presente.

A atividade enzimática foi determinada num meio reacional que continha 1,5 mL de tampão fosfato 50 mM a pH = 7,1, 1,0 mL de H₂O₂ 10 mM e 0,2 mL de extrato, perfazendo um volume total de 2,7 mL. Após isso, foram efetuadas leituras em células de quartzo, durante 2 minutos no espectrofotómetro UV/Vis a 240 nm, a partir da qual se determinaram as velocidades iniciais. O branco foi feito com 0,2 mL de extrato e tampão fosfato até perfazer o volume de 2,7 mL. Efetuaram-se 3 réplicas da medição de absorvância.

A atividade foi medida segundo a diminuição de quantidade de H₂O₂. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a decomposição de 1 μmole de H₂O₂ por minuto, à 25 °C, nas condições dos ensaios, e foi expressa em U / mg FW (peso fresco de folha).

4.4.3.3. Superóxido-dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pelo método do citocromo C – Fe³⁺ usando xantina / xantina oxidase como fonte de radicais superóxido - método de McCord & Fridovich, descrito por (Rubio et al., 2002).

A atividade enzimática foi obtida pela leitura do aumento de absorvância em relação ao ensaio em branco, a 550 nm, durante 1-2 minutos num meio reacional que continha 0,875 mL de tampão fosfato 100 mM a um pH = 7,6, 1,0 mL de solução de xantina e CitC – Fe³⁺ 10 mM e 0,1 mL de extrato e 0,025 mL da solução de xantina-oxidase, perfazendo um volume total de 2,0 mL. O branco foi feito com 0,975 mL de tampão fosfato, 1,0 mL de solução de xantina e CitC – Fe³⁺ e 0,025 mL da solução de xantina perfazendo o volume de 2,0 mL

Foram feitas 3 réplicas da medição de absorvância. A atividade foi medida segundo o aumento da quantidade de Fe²⁺ (pois o Fe³⁺ do citocromo-C férrico é reduzido). Uma unidade de atividade enzimática (U) de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do citocromo-C férrico em 50% e foi expressa em U / mg FW (peso fresco de folha).

4.4.3.4. Guaiacol Peroxidase (GPX)

A determinação da atividade enzimática da GPX, foi baseada no método adaptado de (Gajewska et al., 2006), cuja reação catalisada pela peroxidase promove a oxidação do peróxido de hidrogénio e do guaiacol, com a formação de um produto corado, o tetraguaiacol. Foi observado através da leitura espectrofotométrica o aumento da absorvância devido à oxidação do guaiacol.

A atividade enzimática foi obtida pela leitura da absorvância a 470 nm, durante 2 min, usando um meio reacional constituído por 31 mM de guaiacol e 4 mM H₂O₂ em solução tampão de acetato de sódio (200 mM, pH 6,0).

A unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para catálise e a decomposição de 1 μmole de guaiacol por minuto e por mL à temperatura ambiente, usando o valor de $26,6 \text{ mM}^{-1}$ como coeficiente de absorvidade molar (ϵ), e foi expressa em U / mg FW (peso fresco de folha).

4.5. 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 (assinalados na Discussão). Neste trabalho a análise de ANOVA foi sempre realizada para um grau de confiança de 95%.

5

Resultados e discussão

5.1. Otimização da metodologia analítica para a detecção e quantificação dos fármacos

5.1.1. Determinação do c.d.o

A figura 23, mostra os espectros de absorção dos fármacos em estudo, onde se encontram assinalados os picos de absorção para cada composto cujos comprimentos de onda foram utilizados para a sua quantificação.

Como descrito no capítulo anterior da metodologia experimental (ponto 4.2.1), procedeu -se assim a um varrimento do espectro na região de Ultravioleta, entre os c.d.o de 190 e 330 nm para os diferentes ensaios, com soluções contendo os fármacos numa concentração de 10 mg L⁻¹, por forma a determinar o valor de comprimento de onda desses compostos em estudo no qual as absorvâncias apresentavam um valor máximo. Os c.d.o foram utilizados posteriormente para as respetivas quantificações por HPLC.

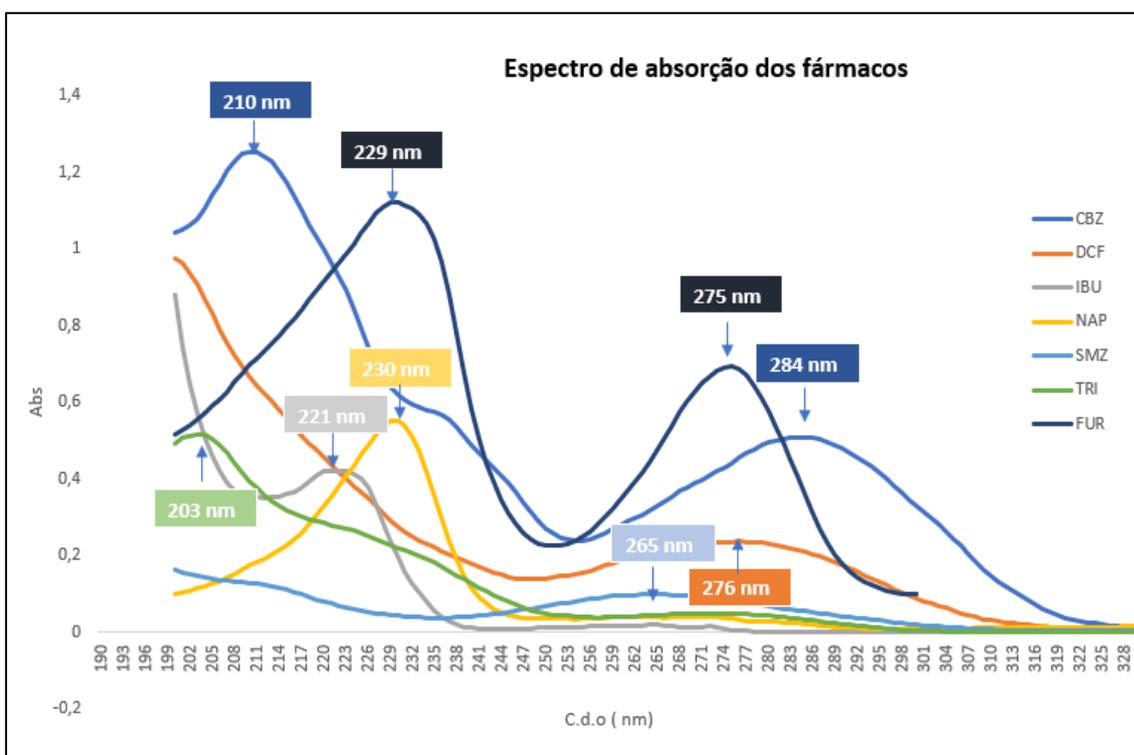


Figura 23 - Espectro de absorção dos diferentes fármacos a 10 mgL⁻¹, com identificação do máximo da absorvância ao qual foi depois feita a quantificação do composto.

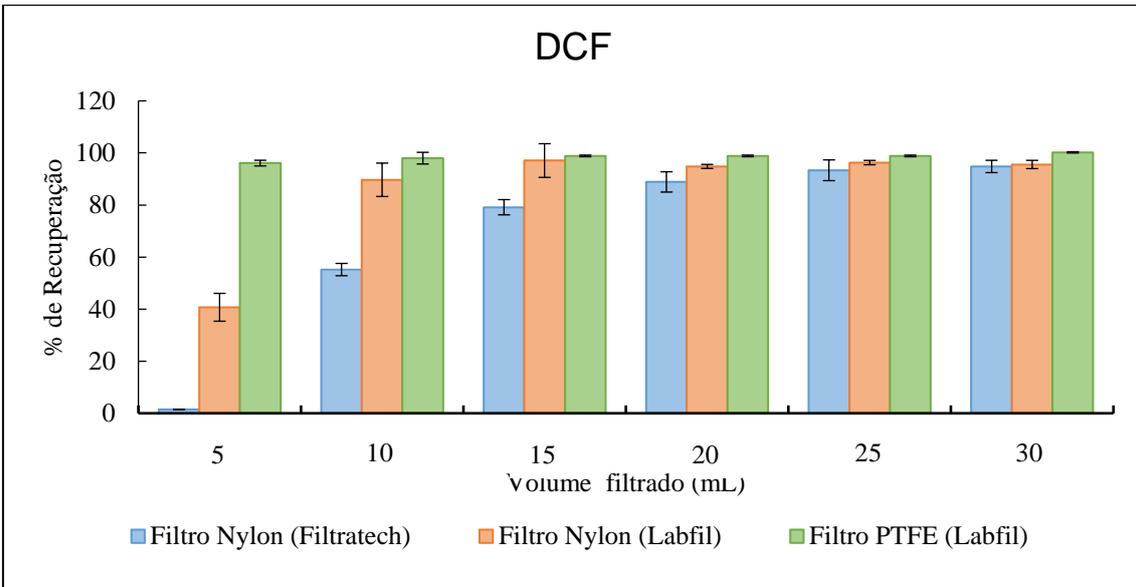
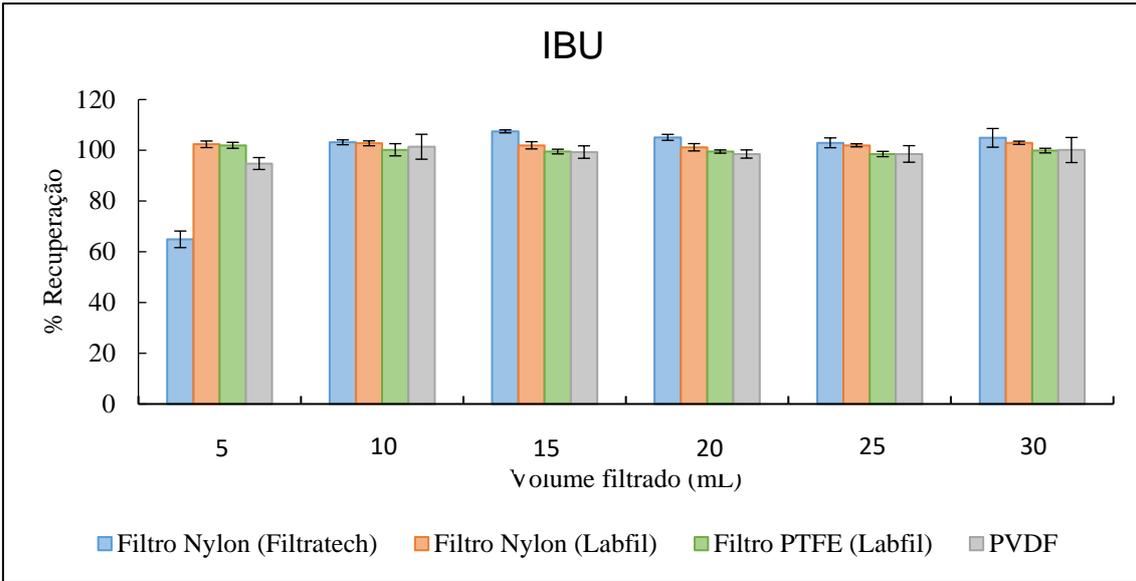
Da observação do espectro de absorção da figura 23, permite verificar que a CBZ apresenta dois c.d.o. de absorvância máxima, um por volta de 210 nm e outro a 284 nm, bem como a FUR (229 nm e 275 nm). Os restantes compostos apresentaram um c.d.o de absorvância máxima com os seguintes valores: IBU (221 nm), DCF (276 nm), NAP (230 nm), SMZ (265 nm), TMP (203 nm).

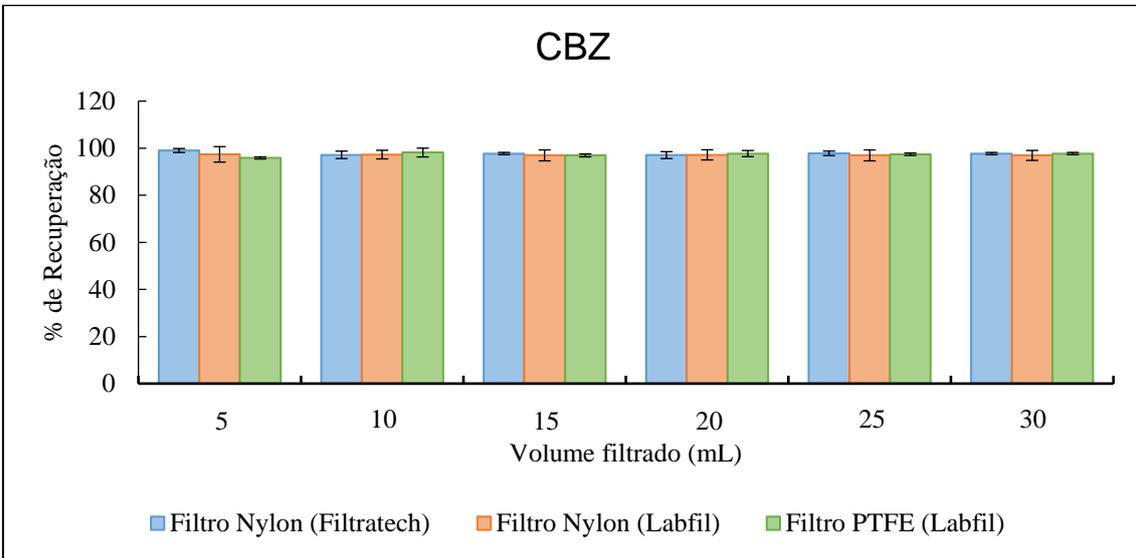
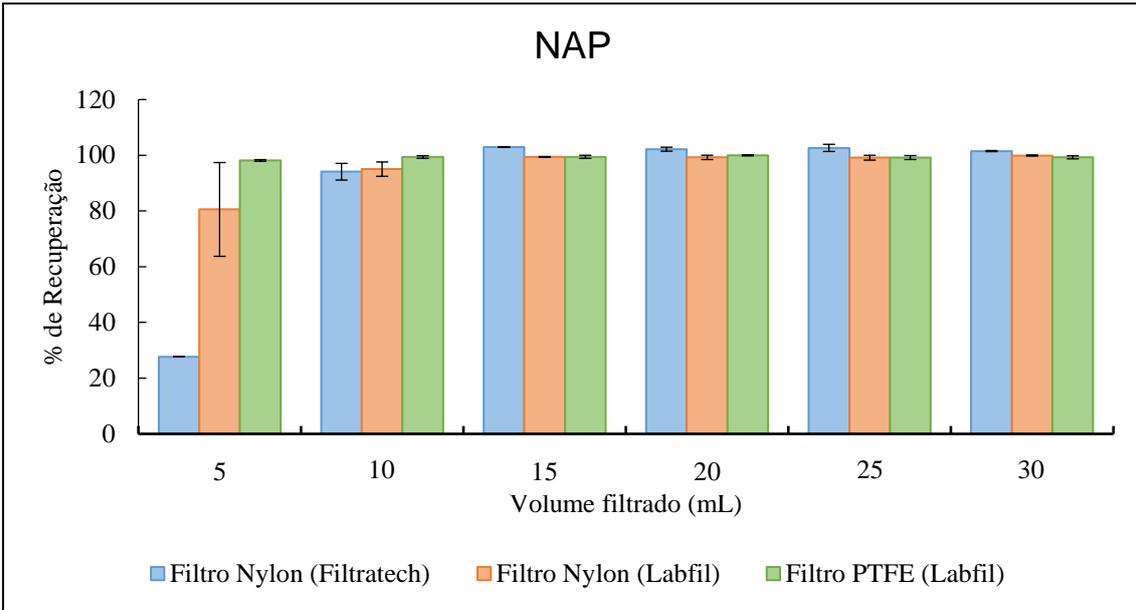
Estes valores são consistentes com os encontrados na literatura para estes compostos, sendo estes os comprimentos de onda normalmente utilizados para o doseamento destes compostos em solução aquosa (Alatas & Wulansari, 2008)(Yilmaz et al., 2011).

5.1.2. Otimização do volume de amostra a filtrar

Em estudos anteriores, já tinha verificado que alguns fármacos, como o caso da FUR ficaram bastante retidos nos filtros (Machado et al., 2020). Assim sendo, sentiu-se a necessidade de aprofundar a filtração de amostras com uma gama diversificada de outros fármacos, de modo a otimizar o volume a filtrar, tendo em vista a minimização das perdas de analito durante a filtração das amostras. Por esta razão, decidi realizar este estudo somente com o grupo de fármacos do ensaio III, do qual não faz parte a FUR.

Procurando otimizar o volume das soluções a filtrar para saturar o filtro, de forma a minimizar as perdas dos analitos durante a filtração, foram testados vários volumes crescentes de soluções contendo os 6 fármacos do ensaio III, nas concentrações de 2 mgL⁻¹ e 10 mgL⁻¹. Para tal, foram utilizados 3 tipos de filtros diferentes e as percentagens de recuperação obtidas nos vários testes estão apresentadas nas figuras seguintes.





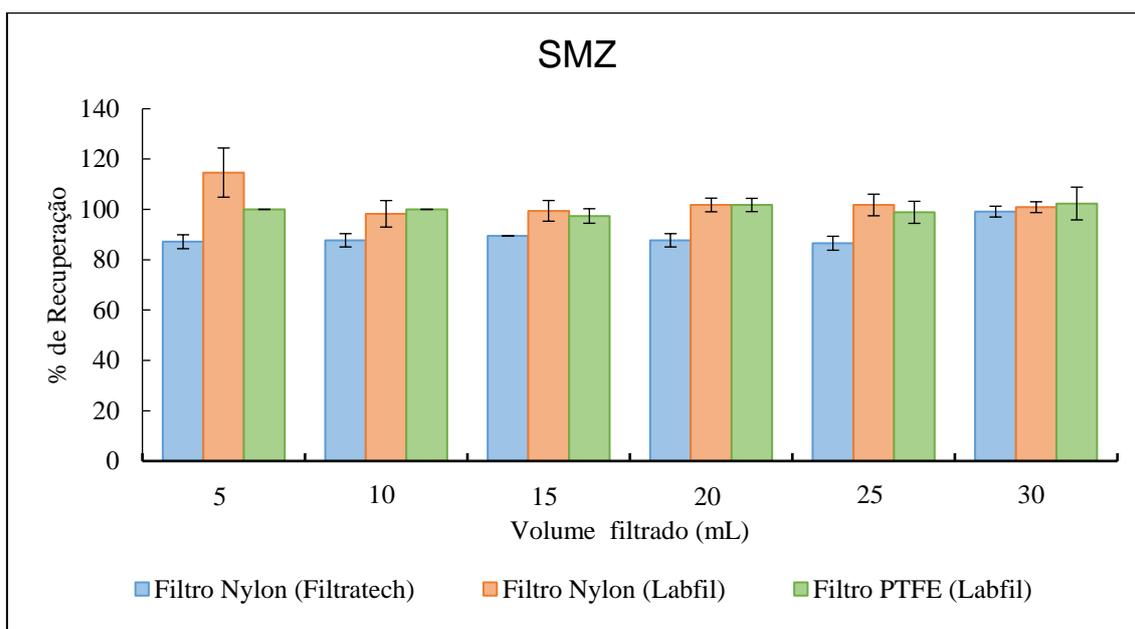
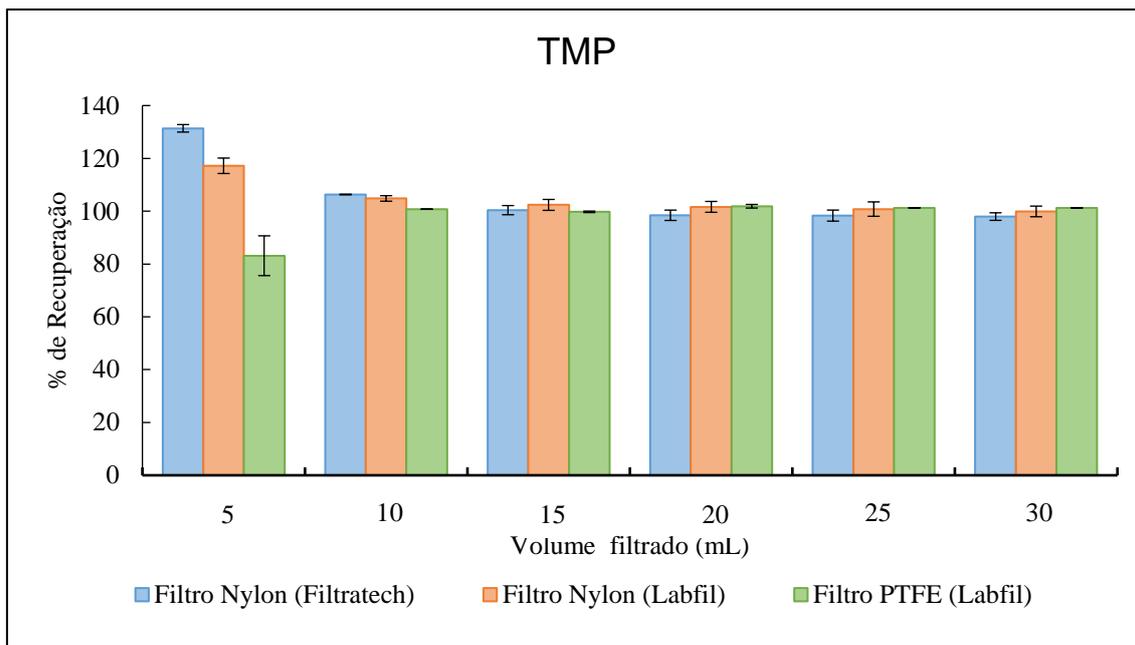


Figura 24 - Percentagens de recuperação dos 6 fármacos em concentrações 2 mg L^{-1} filtrados utilizando membranas de nylon $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (marca Filtratech e Labfil) e membranas de PTFE $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (marca Labfil).

Nos resultados obtidos com as soluções de concentração 2 mg L^{-1} verifica-se de um modo geral, uma maior variação das % de recuperação com os volumes de filtrado para as membranas de nylon (especialmente as do fabricante Filtratech) do que para as membranas de PTFE, as quais apresentam valores de % de recuperação bastantes estáveis com o volume de filtrado. Nitidamente, as membranas de nylon apresentam na maioria dos casos alguma retenção do analito, exigindo a passagem de pelo menos 10 mL de solução (em certos casos até 15 mL) até ser atingida a saturação da membrana, o que faz estabilizar o valor da % de recuperação próximo dos 100%. No caso das membranas de PTFE, por outro lado, a retenção parece ser pequena e a % de recuperação, como se disse, estabiliza próximo dos 100% com um volume de filtrado muito reduzido.

No caso concreto do composto DCF, verifica-se que existe uma grande retenção do composto nas duas membranas de nylon, enquanto, que com a membrana PTFE a retenção é menor. Aumentando-se o volume filtrado, verifica-se um aumento gradual da % de recuperação do analito nas membranas de nylon, com a membrana de PTFE a estabilizar a sua taxa de recuperação na ordem dos 99 %. Em relação ao IBU e NAP nota-se que ambos apresentam uma considerável retenção na membrana de nylon (marca Filtratech) para o volume inicial de 5ml. Para os restantes volumes testados a percentagem de recuperação dos dois compostos foi próxima de 100% nos 3 filtros utilizados. Um comportamento idêntico a estes dois compostos tem o SMZ para a membrana de nylon da marca Labfil e a membrana de PTFE. No entanto, a membrana de nylon da marca Filtratech tem um comportamento distinto neste caso, havendo uma retenção do composto com os primeiros 25 mL de filtrado, de tal modo só é recuperado, de modo mais ou menos estável, cerca 88% do analito com este volume de filtrado. Neste caso, com este tipo de filtro, só a filtração de 30 mL atinge uma recuperação de 100%.

Com os compostos CBZ e TMP a retenção nas 3 membranas é relativamente baixa, pois, filtrando apenas 5 mL de solução com uma concentração de 2 mg L^{-1} , a percentagem de recuperação do composto foi próxima de 100%, principalmente para o filtro de PTFE da Labfil. Para volumes de solução filtrados superiores a 10 mL, a percentagem de recuperação dos analitos aproxima-se de 100%, não se observando

diferenças significativas na percentagem de recuperação destes fármacos para volumes de filtrado superiores a este volume, o que provavelmente se deve já à saturação da membrana filtrante para um volume filtrado de 10 mL.

Conclui-se assim, que dos 3 filtros testados, aquele que apresenta melhor resultado é o da membrana PTFE (marca Labfil), embora o filtro de nylon (Labfil) apresente percentagens de recuperação bastante próximas deste, com um relativamente baixo volume de filtrado (~5 mL).

De modo a verificar mais alguma melhoria com outro tipo de filtro de melhor qualidade, testaram-se na solução de IBU filtros com membrana de PVDF com porosidade de 0,25 μm (ver Figura 24, gráfico relativo à solução de IBU). Não se observou, no entanto, qualquer vantagem deste tipo de filtro sobre o de PTFE de 0,45 0,25 μm .

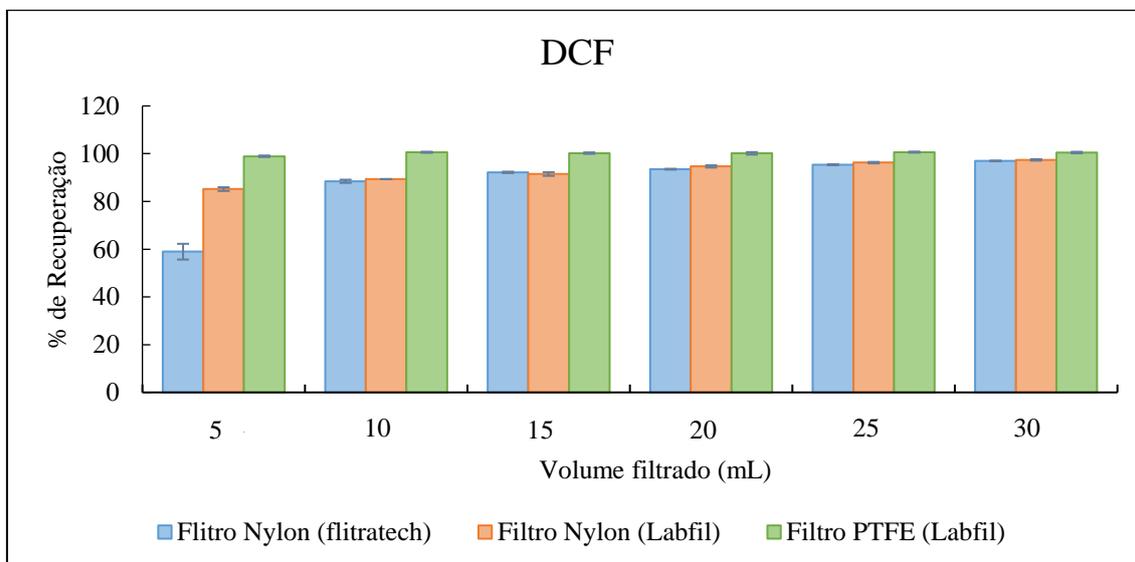
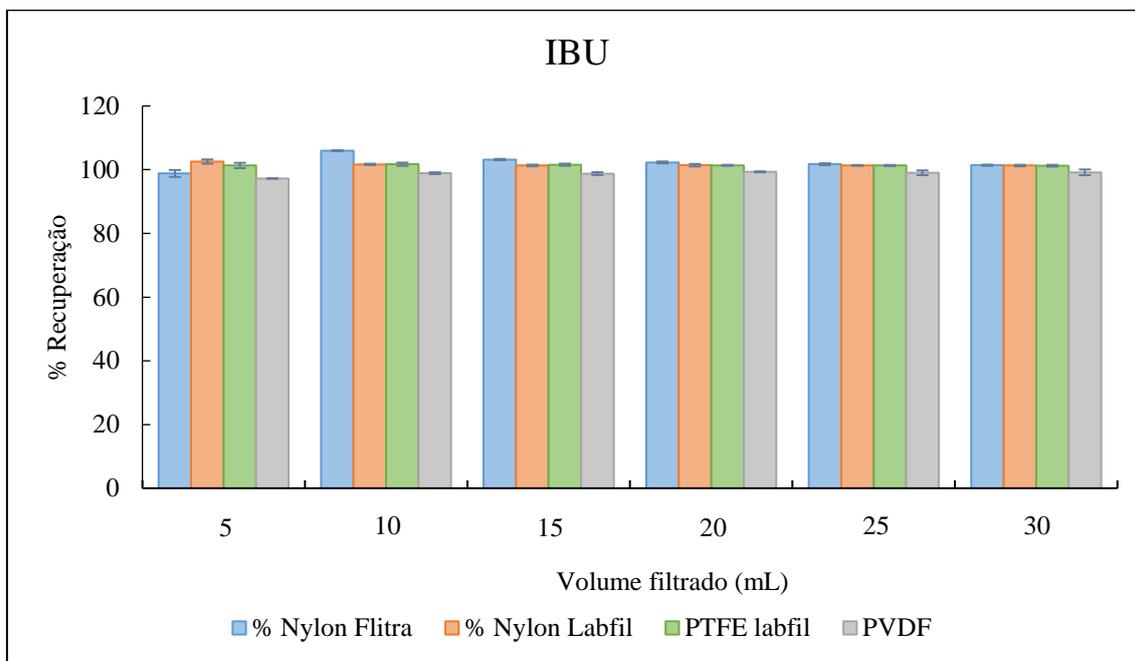
Devido à qualidade do material, o filtro de PTFE apresenta um custo elevado em relação ao do Nylon e apesar de apresentar uma retenção mínima para todos os fármacos testados, a escolha recaiu na utilização do filtro de nylon (marca Labfil), que é um dos mais comuns, menos dispendioso e mais versáteis filtros disponíveis no mercado com boas taxas de recuperação.

A partir de um volume de 10 mL pode-se observar que os três filtros em estudo apresentam percentagens de recuperação muito próximas de 100%. Assim, tendo em conta os resultados obtidos nestes ensaios, e de forma a garantir uma elevada percentagem de recuperação dos compostos, optou-se por realizar, previamente, uma filtração de 10 mL de uma solução padrão contendo 2 mg L⁻¹ de cada um dos compostos, por forma a garantir a saturação da membrana de nylon (Labfil) do filtro.

Só depois deste passo é que se procedeu a filtrações de 5ml das soluções a analisar, e recolheu-se o último mL e meio para análise no HPLC- DAD. Cada filtro foi utilizado no máximo 6 vezes, o que corresponde a um volume total filtrado de 30 mL, que foi o volume máximo utilizado durante os testes de recuperação.

Da observação da figura 25, onde estão apresentados os resultados das percentagens de recuperação dos mesmos fármacos, mas para a concentração, bastante superior, de 10 mg/L, pode-se verificar que, de modo geral, a percentagem de recuperação para as três membranas filtrantes é próxima de 100%, atingindo a saturação (devido à elevada concentração) com volumes de filtrado muito menores (< 5 mL) do que para a

concentração de 2 mg/L, excetuando o caso do DCF. De facto, constatou-se para este composto, à semelhança do que aconteceu para a concentração de 2 mg/L, que apresenta uma considerável retenção na membrana de nylon do filtro para volumes de solução filtrados inferiores a 10 mL.



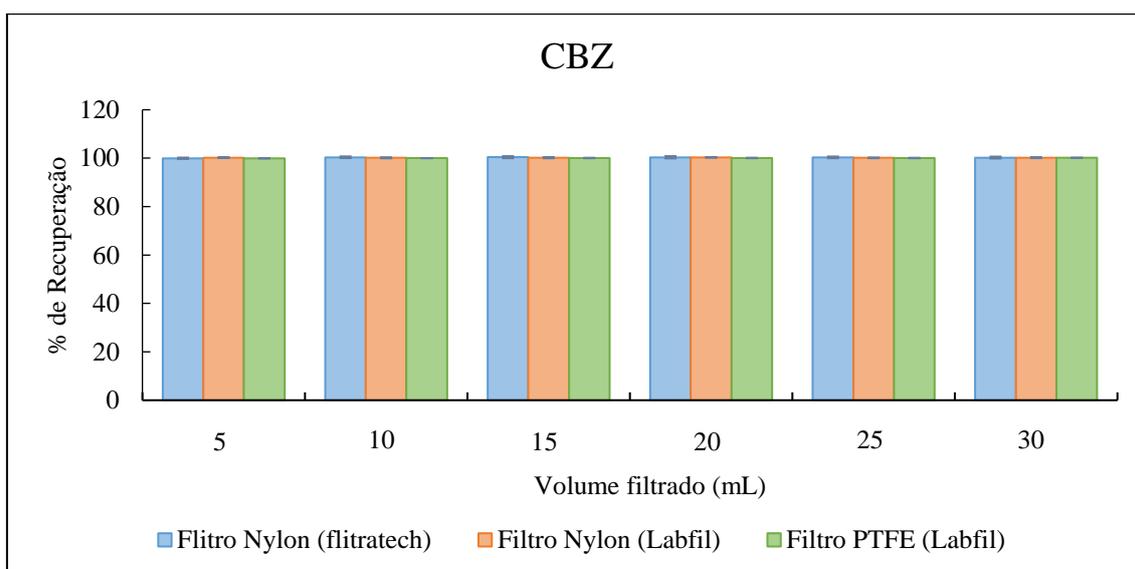
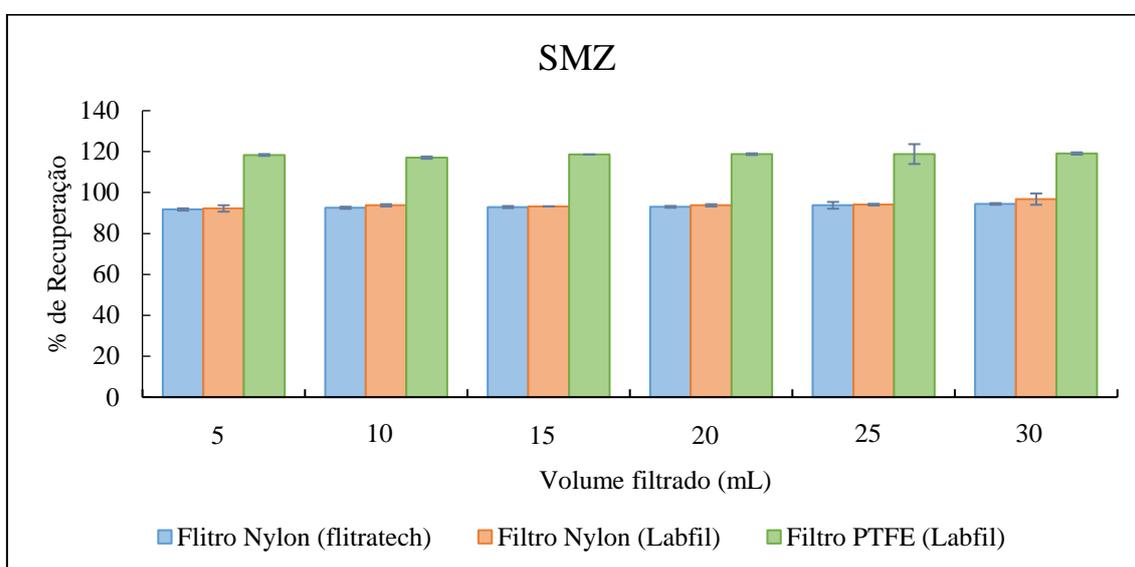
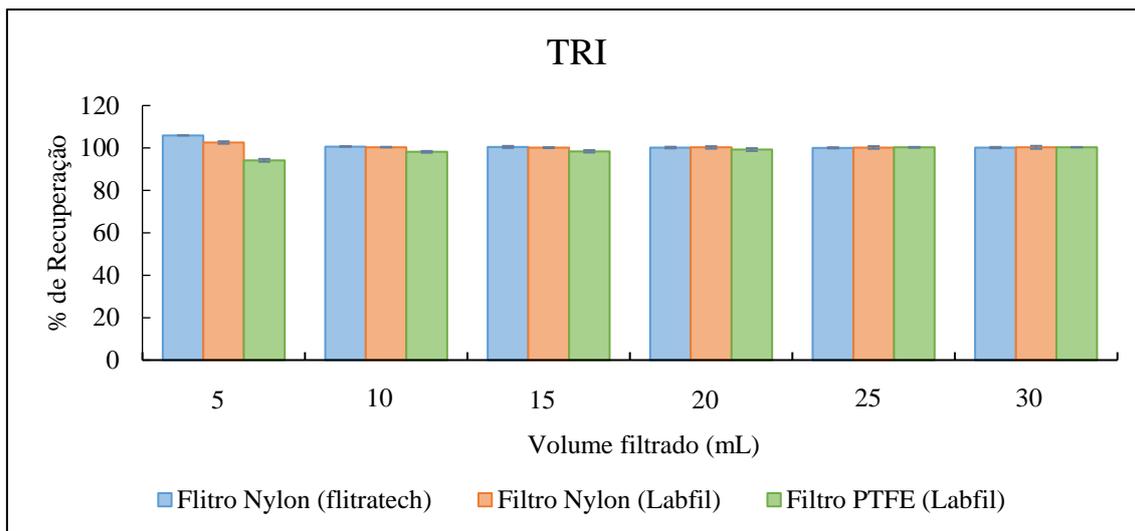


Figura 25 - Percentagens de recuperação dos 6 fármacos em concentrações de 10 mg L^{-1} , filtrados utilizando membranas de nylon $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (marca Filtratech e Labfil) e membranas de PTFE $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (marca Labfil).

5.1.3. Quantificação dos fármacos em solução aquosas e validação do método

Os fármacos em estudo foram quantificados, em solução aquosa, recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- injeção manual) com um detetor DAD, de acordo com as condições descritas na secção 4.2.1.1, da metodologia experimental.

Após a otimização dos vários parâmetros de trabalho, a atribuição dos picos de cada um dos compostos foi feita por comparação com os tempos de retenção obtidos dos cromatogramas das soluções padrão de cada composto isolado. Assim e com base nesses cromatogramas, identificaram-se os tempos de retenção para o TMP (2,1 min), SMZ (3,4 min), CBZ (4 min), NAP (6,5min), DCF (12,1 min), IBU (13,8 min) e FUR (3, 4 min).

De forma a quantificar os fármacos presentes na solução aquosa (água dopada com os fármacos) pelo método do padrão externo, construíram-se retas de calibração utilizando 7 soluções padrão, cujas concentrações variaram entre 0,25 e 4 mg L⁻¹ (secção 4.2.1.1 da metodologia experimental). As retas de calibração obtidas para estes fármacos encontram -se em anexo 1. Na tabela 6, estão apresentados os valores das retas de calibração dos fármacos bem como os parâmetros da validação do método.

Tabela 6 - Retas de calibração dos fármacos e parâmetros de validação do método

Fármacos	Eq. da reta	R ²	LOD	LOQ
SMZ	Y = 80,619x - 2,7455	0,9977	0,06	0,20
TRI	Y = 292,47x + 18,83	0,9927	0,11	0,37
IBU	Y = 41,955x - 1,1773	0,9977	0,06	0,21
DCF	Y = 141,4x - 2,5699	0,9976	0,06	0,21
NAP	Y = 327,84x - 6,1834	0,9953	0,09	0,29
FUR	Y = 60,163x + 1,2234	0,9995	0,04	0,12
CBZ	Y = 184x - 6,7603	0,9963	0,08	0,26

* LOQ e LOD: limites de quantificação e deteção instrumentais; DPR: desvio padrão relativo

Como se pode confirmar pelo valor do coeficiente de correlação, obteve-se uma boa reta de calibração para todos os compostos ($R^2 > 0.99$), o que permite assegurar que os valores de concentração determinados, por regressão linear são fiáveis na gama de valores considerado. De acordo com o descrito em 4.2.1.2 no que tange a validação do método analítico, os valores dos limites de deteção e quantificação instrumentais LOD e LOQ para a técnica de HPLC-DAD, foram calculados a partir da determinação da concentração do analito correspondente ao sinal do branco mais 3 e 10 desvios padrão, respetivamente, estando os valores dos fármacos apresentadas na tabela 6.

Relativamente à repetibilidade do equipamento, avaliada como a dispersão ou desvio padrão relativo (% DPR) das áreas dos picos atribuídos ao analito, os resultados encontram-se apresentados na tabela 7. Verificou-se que o equipamento de HPLC-DAD ao qual se recorreu para quantificar todos os fármacos em estudo, apresenta uma boa repetibilidade e reprodutibilidade (DPR < 5%) dentro da gama das concentrações testadas (0,5; 2 e 4 mg/L), exceto no caso do IBU para a concentração mais baixa (0,5 mg L⁻¹), caso em que se encontra no limiar deste limite. No entanto, e como seria de esperar, tanto a repetibilidade como a reprodutibilidade tiveram valores mais elevadas para as concentrações mais altas e diminuindo gradualmente à medida que as concentrações medidas vão sendo menores, o que está relacionado com a sensibilidade do equipamento.

Tabela 7 - Valores da Repetibilidade e Reprodutibilidade dos fármacos nas concentrações de 0,5; 2 e 4 mg/L

Fármacos	Repetibilidade			Reprodutibilidade		
	0,5 (mg/L)	2 (mg/L)	4 (mg/L)	0,5 (mg/L)	2 (mg/L)	4 (mg/L)
SMZ	4,3	3,8	0,7	3,2	2,8	1,4
TRI	3,4	1,0	0,5	3,9	2,2	1,1
IBU	5,2	1,5	1,4	5,7	1,7	1,7
DCF	3,3	4,6	2,4	2,7	3,0	2,0
NAP	4,2	3,3	2,1	3,4	2,6	1,6
FUR	0,5	2,1	*	*	*	*
CBZ	2,6	2,2	0,1	3,2	1,6	0,7

*não determinado

5.2. Caracterização físico-química da matriz de suporte

Dadas as boas eficiências demonstradas em estudos anteriores na remoção de poluentes orgânicos e xenobióticos presentes em águas, incluindo fármacos (Dordio & Carvalho, 2013; Dordio et al., 2017), a matriz de suporte selecionada para este estudo foi uma mistura de dois compostos argilosos, a LECA 2/4 e a vermiculite esfoliada 3 (1:1, v:v). Nos mesmos estudos, a vermiculite apresentou uma maior capacidade de adsorção desses fármacos por massa de adsorvente, enquanto, que a LECA removeu uma maior quantidade total dos fármacos para o mesmo volume de material (Dordio et al., 2017). Esta diferença, tem a ver com o facto da vermiculite apresentar uma densidade aparente mais baixa, e conseqüentemente, o mesmo volume de material testado corresponder a uma menor massa de adsorvente usado.

Observou-se ainda que a vermiculite apresentou uma cinética de adsorção mais rápida de fármacos, em comparação com a LECA, o que poderá estar relacionado com a sua maior porosidade e, em particular, a sua estrutura laminar, que disponibiliza uma maior quantidade de área superficial facilmente acessível (Dordio et al., 2017).

O facto destes materiais apresentarem características distintas, considerou-se que seria interessante experimentar a utilização de misturas destes dois, que poderiam juntar as vantagens de cada um deles, o que poderia melhorar a eficiência do sistema.

Além da sua elevada capacidade de retenção de compostos orgânicos, a seleção destes dois materiais para este estudo, teve em conta a sua capacidade tampão de pH e uma adequada condutividade hidráulica, bem como a sua disponibilidade e o baixo custo de aquisição.

Uma vez que as propriedades físicas e químicas dos materiais utilizados como matriz de suporte, influenciam a sua capacidade de adsorção dos fármacos, as propriedades hidráulicas do sistema e o desenvolvimento da componente biota (plantas e população microbiana), determinou-se a porosidade do meio (volume de vazios), a densidade aparente e o pH em água para a caracterização físico-química da mistura LECA + Vermiculite (1:1, v:v) que estão apresentados na tabela 8, resultado obtidos anteriormente por elementos do grupo.

Tabela 8 - Parâmetros físico-químico dos materiais selecionados como matriz de suporte dos LCMs (n=6) e da sua mistura. Valores médios \pm desvio padrão

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

[a] (Dordio et al., 2017)

Tanto a vermiculite exfoliada, bem como a argila expandida (LECA) sofreram processamento industrial, com o intuito de tornar estes materiais argilosos menos densos, passando os mesmos a exibir valores de porosidade relativamente elevados, em especial a vermiculite. A mistura destes dois materiais apresenta um valor de porosidade de 54% enquanto isoladamente a Vermiculite têm um valor de porosidade de 66 % e a LECA de 49%. Durante a mistura dos dois materiais, o empacotamento do material é alterado, ocorrendo um rearranjo das partículas, em que as mais pequenas vão ocupar parte do espaço livre entre as partículas de maiores dimensões.

A porosidade dos meios proporciona a existência de espaços vazios onde efetivamente ocorrem muitos dos processos de remoção dos poluentes, para além da importância que tem no arejamento dos LCMs. Estes materiais argilosos por apresentarem uma elevada porosidade, absorvem fácil e abundantemente água nas suas estruturas internas, permitindo deste modo maiores áreas de contacto com as soluções e com os poluentes a remover (Dordio & Carvalho, 2013; Dordio et al., 2017) além de permitir um maior arejamento da matriz, favorecendo o surgimento de condições aeróbias.

O facto de estes materiais apresentarem valores de porosidade relativamente elevados, permite-lhes possuírem densidades aparentes reduzidas, pois, a densidade aparente dos materiais varia de forma inversa à sua porosidade como se pode constatar da observação da tabela 8, apresentando a mistura dos dois materiais um valor de densidade aparente intermédio de 291 kg /m³.

Como o pH do meio é um fator que afeta a capacidade de adsorção nos materiais argilosos, bem como o desenvolvimento da vegetação e da população microbiana nos LCMs, mediram-se os valores de pH da solução durante o período de realização dos ensaios.

Como se pode observar na tabela 8, os materiais estudados apresentam propriedades entre a neutralidade e a alcalinidade. A vermiculite apresenta um valor de pH mais próximo da neutralidade (7,4), enquanto, que a LECA apresenta carácter alcalino (9), o que corresponde a uma superfície ligeiramente carregada positivamente em meios com pH próximo da neutralidade.

A LECA tinha sido caracterizada quimicamente em estudos anteriores (A. V. Dordio et al., 2017) e comprovou-se a existência, na sua composição, de alguns óxidos e carbonatos, os quais podem contribuir para este carácter alcalino do material.

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

Em termos gerais, os valores de pH obtidos para a vermiculite e a LECA estão de acordo com valores encontrados em outros estudos (Brix et al., 2001). A mistura destes dois materiais apresentou um pH intermédio, com um carácter ligeiramente alcalino (8,6), intermédio entre o valor da vermiculite e da LECA.

Os valores de pH do meio, correspondentes a um meio neutro ou ligeiramente alcalino, são propícios ao desenvolvimento das plantas e da população microbiana e favorecem ainda a adsorção de compostos com carácter ácido.

5.3. Avaliação da capacidade de remoção dos fármacos em microcosmos de LCMs e resposta das plantas ao stress abiótico

Dadas as boas eficiências comprovadas em estudos anteriores na remoção de outros fármacos (Machado et al., 2017), utilizando sistemas de LCMs plantados com *Typha* spp. com a mistura LECA 2/4 + Vermiculite 2, optou-se por avaliar a eficiência desse tipo de sistema na remoção conjunta de vários fármacos, divididos em 3 ensaios, contendo cada um diferentes classes fármaco-terapêuticas. Para o efeito, utilizou-se uma solução aquosa dopada com os fármacos numa concentração de 2,5 mg/L.

Tendo em conta as características descritas anteriormente, considerou-se que a utilização em conjunto dos dois materiais argilosos poderia melhorar a eficiência do sistema beneficiando das vantagens de cada um dos materiais. Este estudo é inovador pelo fato de englobar 3 ensaios diferentes, contendo várias classes de fármacos, cada um com a sua especificidade. Daí que se procurou neste trabalho comprovar a eficiência deste sistema para a remoção da mistura complexa destes fármacos.

5.3.1. Ensaio I

5.3.1.1. Condições relevantes dos ensaios

No início dos ensaios, em maio de 2019, as plantas dos microcosmos de LCMs encontravam-se já numa fase avançada do seu crescimento, apresentando folhas com um tamanho médio de cerca de 64 cm para a folha menor e 80 cm para a maior.

a) Evaporação e condições climatéricas

Foram controladas diariamente as taxas de evaporação/evapotranspiração para os vários leitos, antes da recolha das amostras, recorrendo-se à medição dos volumes de água destilada necessária para a reposição dos níveis iniciais de líquido nos leitos. Na tabela 9 estão apresentados os valores dessas medições.

Tabela 9 - Volume (mL) de líquido adicionado diariamente aos leitos e valores médios da taxa de evaporação/evapotranspiração de cada Leito.

Tempo (h)	Volume de líquido adicionado (mL)							Taxa média de Evaporação + Transpiração (mm/d)	Et/E ₀	Taxa média de Evaporação + Transpiração (mm/(planta.d))	Número de plantas no leito	Transpiração (mm/d)
	24	48	72	96	120	144	168					
I	670	900	860	840	1074	840	800	10,9	3,14	1,81	6	7,43
II	680	954	900	920	1050	900	836	11,5	3,32	1,77	6,5	8,04
III	240	250	280	270	300	290	248	3,5	----	----	----	----
IV	0	0	0	0	0	0	0	----	----	----	----	----

Leito I - Planta + matriz (controlo); **Leito II** - Planta + matriz + fármacos; **Leito III** - matriz + fármacos; **Leito IV** - fármacos

Da análise dos dados, é possível observar que o Leito III (não plantado, constituído pela apenas pela matriz de vermiculite e LECA) apresentou uma taxa de evaporação de 3,5 mm/dia, bastante inferior aos Leitos contendo a matriz e as plantas, tal como seria de esperar. Neste leito a perda de água ocorre apenas por evaporação e a taxa a que esta ocorre depende principalmente da temperatura e da humidade relativa do ar, cujos valores registados para o período do ensaio são apresentados na tabela 10. Pode-se constatar que a temperatura média e a humidade média durante este período foi de 21 °C e 50 %, respetivamente. O período em que se observou uma maior taxa de evaporação foi a 25 de maio, dia em que se registou a temperatura mais elevada desde o início dos ensaios e simultaneamente uma menor taxa de humidade (36, 2%), criando assim, condições propícias para a ocorrência de taxas de evaporação elevadas nos leitos.

Tabela 10 - Registo das condições meteorológicas no período de 21 a 27 de maio de 2019 (obtido de <http://www.clima.ict.uevora.pt/verney>)

Dias de ensaio	Maio de 2019							Média (n=7)
	21	22	23	24	25	26	27	
Temperatura média (°C)	19	21,9	19,3	19,4	22,4	24,9	22,4	21,3
Temperatura mínima (°C)	12,6	12,9	12,6	12,3	15,1	17,1	15,6	14,0
Temperatura máxima (°C)	27,6	31,1	28,4	27,3	29,7	32,8	31,3	29,7
Humidade média (%)	60,7	48,1	55,9	53,5	39,9	36,2	53,8	49,7
Humidade mínima (%)	29	24,4	25,2	25,9	21,3	20,5	29,8	25,2
Humidade máxima (%)	92,1	75,2	84,5	87,5	69,1	51,5	80,6	77,2
Precipitação (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0
Vel. Vento (m/s)	2,2	2,1	3	3,8	2,9	3,2	3,5	2,9
R. Global máxima (W/m ²)	999	1020	1010	982	1011	1012	1000	1004,8

Os valores de perda de água são mais baixos no Leito só com a matriz do que nos Leitos plantados (I e II), dado que neste leito sem plantas o volume de líquido foi perdido apenas por evaporação (essencialmente determinado pelas condições de temperatura e humidade do ar).

Por outro lado, nos Leitos plantados, para além da evaporação ocorre também transpiração das plantas, que constitui uma importante contribuição para as perdas de água nos leitos, variando assim a taxa de evapotranspiração entre 10,9 e 11,5 mm/dia. Assim sendo, é possível estimar os valores de água perdida através da transpiração das plantas, sendo estes de 7,4 e 8 mm/dia para os Leitos I e II, respetivamente. Note-se que além das condições que afetam a evaporação, outros fatores intrínsecos relacionados com a atividade das plantas, tais como a densidade de pés e o seu estado vegetativo, são determinantes e influenciam a taxa de transpiração das plantas e explicam as pequenas diferenças observadas nos vários leitos.

De fato, os Leitos I (duas réplicas) tinham uma média de 6 plantas enquanto os Leitos II (duas réplicas também) tinham uma média de 6,5 plantas o que explica que a taxa de evapotranspiração seja superior no segundo caso. No entanto, quando se comparam as taxas de evapotranspiração por planta, os valores já são bastante próximos, sendo até ligeiramente superior o valor do Leito I (com menos plantas), podendo, no caso dos

Leitos II, a exposição das plantas aos fármacos ser causadora de stress e eventualmente influenciar a absorção de água e transpiração destas plantas.

A taxa de transpiração das plantas é uma variável importante que se relaciona com a taxa de absorção de água e de todas as substâncias nela dissolvidas, que assim passam para o interior das plantas por processos passivos, nomeadamente os fármacos, para os quais não há mecanismos de transporte específicos. Espera-se, assim, uma intervenção de remoção dos poluentes pelas plantas mais importante naqueles espécimes (e também nos períodos do ano) em que a taxa de transpiração seja maior (Van Hoewyk et al., 2005).

Os valores de água perdidos através da transpiração das plantas determinados neste estudo, estão de acordo e dentro da mesma gama de grandeza com outros obtidos em trabalhos semelhantes realizados com a planta *Typha* (Dordio et al., 2010).

Para caracterizar as perdas de água por evapotranspiração em leitos plantados com *Thypha* spp., foi determinado neste estudo o parâmetro K_c , que é medido através da relação entre as perdas de água por evapotranspiração potencial da cultura (leitos plantados com *Typha*), E_t , e a evapotranspiração de referência (E_o) correspondente ao Leito sem plantas. Este parâmetro é influenciado pelas condições climáticas, nomeadamente a intensidade da radiação solar, a humidade e temperatura, bem como também pela espécie a que pertence a macrófita.

Verifica-se da tabela 9 que o Leito II apresenta um valor de K_c ligeiramente superior em relação ao Leito I. Sendo as condições climáticas e a espécie de macrófitas idêntica em ambos os casos, as diferenças poderão revelar efeitos da exposição aos fármacos (no Leito II) sobre o comportamento das plantas.

No entanto, os valores do K_c obtidos neste ensaio são consistentes e estão dentro dos parâmetros encontrados por outros autores, que utilizaram a mesma macrófita (*Typha* spp.), tendo reportado valores médios a variar entre os 2,9 e 6,51 (Pedescoll et al., 2013; Rashed, 2014; Pereira et al., 2016).

De referir que na tabela 9 não são apresentados dados relativos à evaporação no Leito IV, pois, o recipiente desse ensaio permaneceu tapado durante o período de realização das experiências por isso neste leito não ocorreu qualquer perda de água.

b) pH do meio

Uma vez que o pH do meio é um fator determinante para o desenvolvimento da vegetação e da população microbiana nos LCM e que, além disso, afeta também a capacidade dos materiais argilosos da matriz para adsorver compostos, procedeu-se então à medição dos valores de pH da solução em contacto com a matriz no início e no final dos ensaios. Os resultados encontram-se apresentados na figura 26.

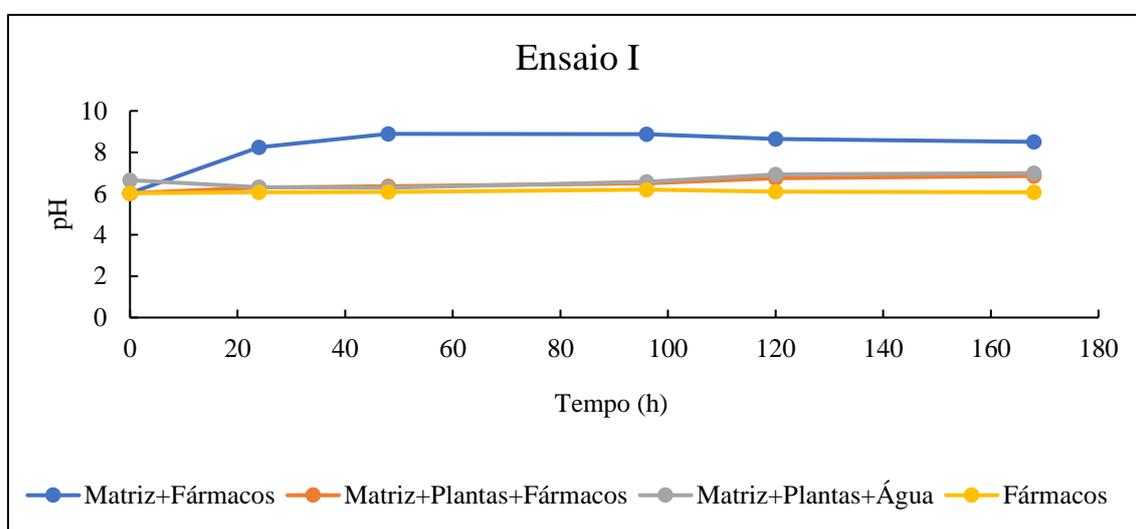


Figura 26 - Valores do pH do meio nos leitos ao longo do período de estudo.

Pela observação da figura 26, constata-se que a solução começa por ser inicialmente ligeiramente ácida (pH ~ 6,0) com os valores de pH nos vários leitos a variar ao fim do tempo de ensaio entre 6,0 e 8,9. Os valores iniciais ligeiramente ácidos são devido às características ácidas dos fármacos presentes em solução e também em resultado da exposição da solução ao ar.

Verifica-se um aumento dos valores de pH nos primeiros instantes de contacto da solução em todos os Leitos em que está presente a matriz (LECA + Vermiculite), excetuando para o Leito I (matriz + plantas + água destilada) o qual não continha fármacos dissolvidos na solução. O valor máximo de pH foi registado no final do ensaio no Leito III (matriz + fármacos), apresentando um valor de pH de 8,9.

Estes resultados das medições de pH nos vários Leitos sugerem que a matriz é responsável por este aumento do valor de pH. A LECA tinha sido caracterizada quimicamente em estudos anteriores (Machado et al., 2017) e comprovou-se a existência, na sua composição, de alguns constituintes como certos óxidos e carbonatos, que permitem explicar este carácter alcalino do material. O Leito IV (solução de fármacos, sem plantas nem matriz) foi o único em que o pH se manteve praticamente inalterado, à volta do valor inicial de 6,0.

Nos Leitos plantados (I e II) os valores de pH da solução não se tornaram tão alcalinos, tendo-se mantido mais próximos da neutralidade ao longo do período de realização do estudo e, portanto, um pouco mais baixos do que os valores de pH do leito apenas com a matriz (Leito III). Tal poderá ser devido ao efeito de alguns exsudados libertados pelas raízes das plantas, que levam a uma diminuição do pH do meio para valores próximos da neutralidade. Os valores de pH do meio, correspondentes a um meio neutro ou ligeiramente alcalino, são propícios ao desenvolvimento das plantas e da população microbiana e favorecem ainda a adsorção de compostos com carácter ácido, como o é o caso do SMZ. De fato, nas condições de ensaio, tal como verificadas acima, em especial, as moléculas de SMZ ($pK_a \approx 5,5$) estão parcialmente desprotonadas (i.e. numa forma aniónica) enquanto, que a superfície dos materiais argilosos da matriz de suporte, em particular a LECA ($PCZ \approx 9,5$), está carregada positivamente (pH do meio $< PCZ$). Tais condições permitem, em especial com a LECA, que a adsorção seja favorecida por interações eletrostáticas.

5.3.1.2. Remoção dos fármacos pelos microcosmos de LCM

Conforme descrito na secção 4.3.3, no total foram montados 4 Leitos distintos (com réplicas) com o intuito de avaliar:

- i. a capacidade de remoção dos fármacos pelos microcosmos de LCMs tendo como matriz uma mistura de LECA 2/4 e Vermiculite 3(1:1, v: v) e plantados com *Typha* spp. (**Leito II**)
- ii. a contribuição da matriz (**Leito III**) e das plantas (**Comparação entre Leito II e Leito III**) na remoção dos fármacos

-
- iii. a remoção dos fármacos por fotodegradação, hidrólise ou adsorção às paredes dos recipientes (**Leito IV** - contendo apenas a solução de fármacos)
 - iv. o efeito fitotóxico destes compostos (**Comparação entre Leito I** – não exposto a fármacos – e **Leito II**).

Procurou-se ainda caracterizar a cinética de remoção dos fármacos nos vários Leitos, um estudo que é muito importante para a definição do tempo de retenção hidráulica a utilizar em LCMs para tratamento de águas residuais.

O ensaio teve uma duração total de 168h. A solução de fármacos a que os leitos foram expostos continha uma concentração de 2,5 mg/L de cada um dos fármacos, nomeadamente, FUR, SMZ, DCF e TMP. Para o cálculo da percentagem de remoção da FUR, SMZ, e DCF nos vários tempos de amostragem, foi utilizada a expressão da equação 4:

$$\% \text{ remoção} = \frac{c_i - c_t}{c_i} \times 100 \quad (\text{equação 4})$$

onde c_i é a concentração inicial ($t = 0$) e c_t é a concentração ao fim de um determinado tempo de contacto (t). Os resultados obtidos encontram-se apresentados nos gráficos das Figuras 27 e 28. Note-se que não se encontram representadas nestes gráficos a taxa remoção e a cinética do fármaco TMP dado que em todas as amostras recolhidas não foi possível observar a presença do composto em solução a concentrações superiores ao limite de quantificação por serem excretados pelas plantas alguns compostos que interferem com a quantificação deste fármaco.

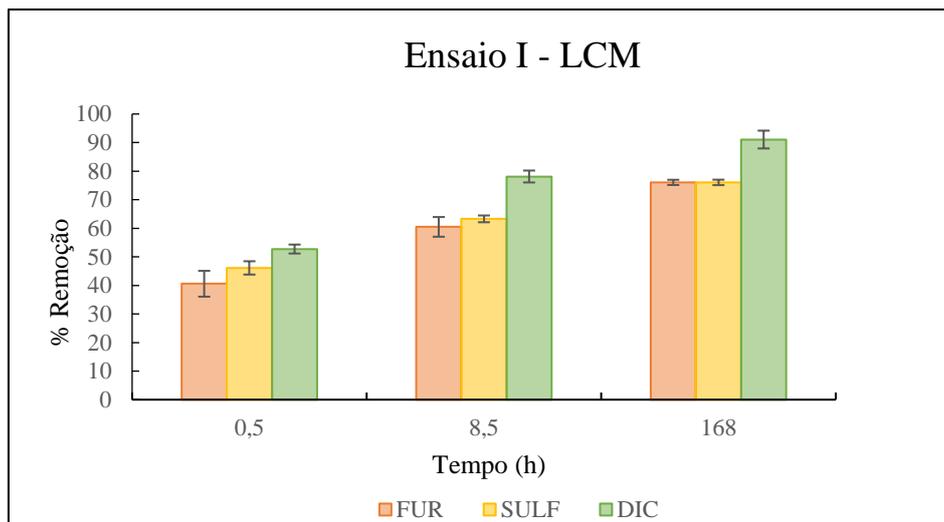


Figura 27 - Percentagem de remoção da FUR, SMZ, DCF em função do tempo de contato para o ensaio I - matriz + planta.

Verifica-se que os fármacos FUR e SMZ, apresentam remoções muito semelhantes entre si nos diferentes tempos de contato a que foram sujeitos nos Leitos (Fig. 27). Na primeira meia hora de experiência não se observaram diferenças significativas entre esses dois fármacos nas percentagens de remoção. O DCF foi o composto farmacêutico que apresentou maior taxa de remoção de entre os restantes fármacos em estudo, observando-se uma eficiência de remoção de 50 % logo na primeira meia hora de contacto e ao fim da experiência a eficiência de remoção já estava praticamente na ordem dos 90%.

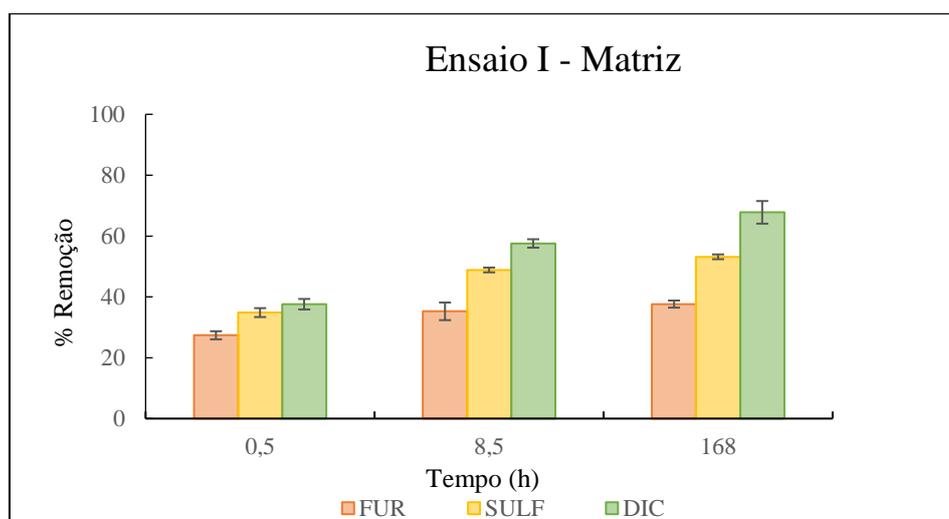


Figura 28 - Percentagem de remoção da FUR, SMZ, DCF em função do tempo de contato para o ensaio I – matriz.

Por sua vez as percentagens de remoção dos 3 fármacos obtidas nos Leitos não plantados (i.e., que continham na sua composição somente a matriz) foram, obviamente, sempre inferiores às obtidas com os Leitos plantados, sendo a remoção nos primeiros Leitos assegurados exclusivamente por adsorção enquanto nos últimos ocorrem também contribuições de outros processos promovidos pelas plantas. O composto mais removido da solução continuou a ser o DCF, que ao fim das 168h de contacto apresentava uma taxa de remoção de 67 %, ao contrário da FUR, que em todos os tempos de contacto dos Leitos com a solução é o fármaco com menor percentagem removida. Esta diferença pode estar relacionada com a diferença do pKa do DCF, que, sendo superior ao pKa da FUR, contribuiu favoravelmente para a adsorção do mesmo, nos diferentes constituintes da matriz que apresentam características essencialmente básicas.

Assim, no final da experiência, após 168 h de contacto entre a solução e os Leitos, a percentagem de remoção dos 3 fármacos que foram quantificados, foi superior nos Leitos plantados relativamente aos Leitos não plantados que continham só a matriz, tendo a presença das plantas contribuído, direta ou indiretamente, com um acréscimo de entre 34% FUR, 23% SMZ e 23% DCF para a eficiência de remoção destes fármacos. Tal contribuição poderá dever-se à ocorrência de vários processos relacionados com a presença das plantas no sistema, tais como a sua contribuição direta através da absorção dos fármacos para o seu interior ou a adsorção destes compostos às suas raízes; ou contribuições indiretas tais como estímulos ao desenvolvimento da população microbiana proporcionados por exsudados libertados pelas plantas bem como a ação de enzimas libertadas nesses exsudados e que também poderão ter um papel importante na degradação de alguns dos compostos.

Todos estes efeitos, permitem explicar a maior eficiência de remoção obtida no Leito plantado em comparação com os Leitos onde apenas há a matriz, mostrando as vantagens da utilização das plantas nos LCMs.

Foram relatados comportamentos semelhantes em estudos realizados em microcosmos com a matriz constituída por LECA, com condições de operações idênticas às do presente estudo, onde foi demonstrada a capacidade da *Typha* para remover diversos fármacos da água, incluindo a FUR e o DCF (Dordio & Carvalho, 2011; Machado et al., 2020).

5.3.1.3. Resposta fisiológica e bioquímica das plantas ao stress abiótico

Um fator de stress abiótico para a *Typha* spp. pode ser a presença no meio em que as plantas se desenvolvem de compostos xenobióticos, como sejam os fármacos utilizados nos ensaios dos microcosmos de LCMs, sendo previsível um aumento na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) em consequência dessa exposição, que induz nas plantas macrófitas mecanismos de defesa elaborados que lhes permitem por vezes compensar o stress originado por esses compostos.

Em resposta à situação de stress, podem acontecer alterações de alguns parâmetros fisiológicos (e.g. crescimento, formação de rebentos, fotossíntese) e bioquímicos das plantas (e.g. atividade de enzimas antioxidantes).

Assim, para avaliar os efeitos causados pelos fármacos na *Typha* spp., determinou-se a taxa de crescimento relativo (TCR) da folha maior e da menor, em todas as plantas usada nos ensaios, bem como as concentrações dos pigmentos fotossintéticos (clorofila total (a+b), clorofila a clorofila b e carotenoides) em amostras de folhas verdes destas plantas. Foi ainda determinada a atividade enzimática de algumas enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPX), envolvidas na resposta ao stress oxidativo pelas plantas sujeitas a uma determinada concentração dos fármacos.

A inspeção visual do aspeto das plantas, (como o aparecimento de cloroses ou necroses nas folhas), a contagem do número de novas folhas de cada planta, a observação de novos rebentos, também foram avaliados durante todo o período de realização da experiência, de modo a permitir um estudo mais completo sobre os efeitos de fitotoxicidade dos fármacos nas plantas.

a) Determinação da TCR

Os valores de TCR foram calculados de acordo com a equação 5 proposta por Hunt:

$$TCR = \frac{\ln p_2 - \ln p_1}{t} \quad (\text{equação 5})$$

onde p_1 e p_2 são respetivamente o tamanho inicial (cm) e final (cm) das folhas, e t é o período de duração do ensaio em horas.

Assim, foram comparados os valores obtidos nas plantas expostas à solução de fármacos (Leito II) com os obtidos nas plantas do controlo (Leito I) e os resultados estão apresentados na figura 29.

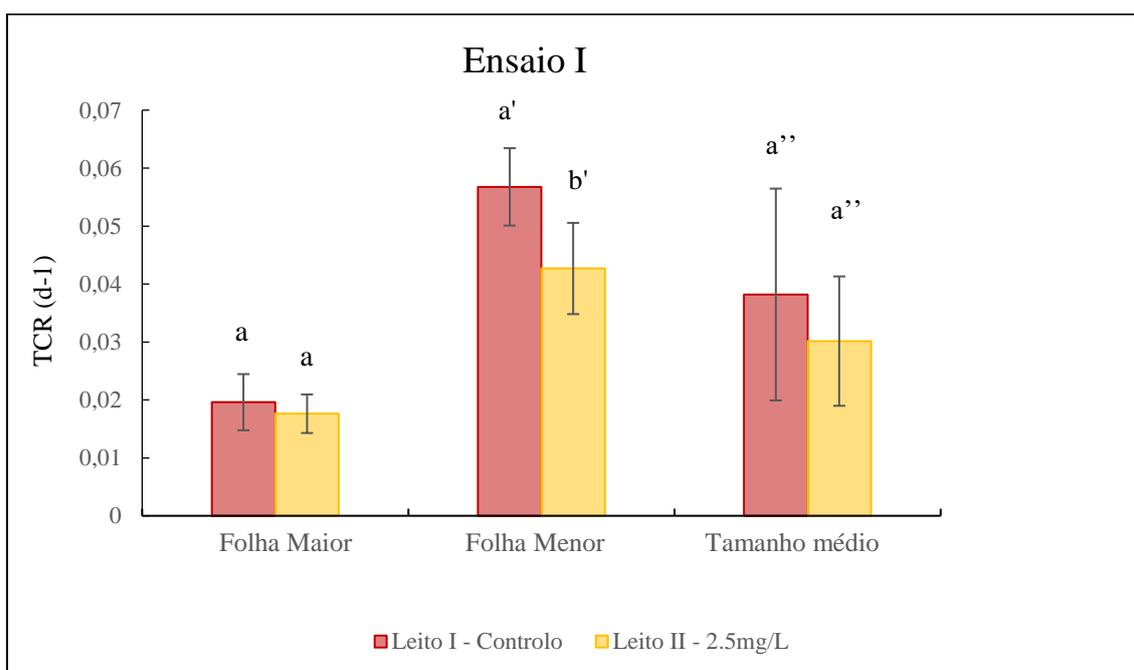


Figura 29 - Taxa de crescimento relativo média da folha maior, da menor e do crescimento médio das plantas dos leitos I e II ao fim de 168h de experiência (média \pm DP, $n = 6$). Diferentes letras significam valores significativamente diferentes para $P < 0.05$.

Comparando as TCR médias das folhas maior e menor das plantas dos Leitos I (controlo - sem fármacos) e II (Leito com fármacos), verificam-se algumas diferenças no crescimento das folhas, que são significativas para as folhas menores. Ambas as folhas das várias plantas na presença dos fármacos cresceram ligeiramente menos, em média,

do que no caso das plantas controlo, pelo que se pode concluir que os fármacos presentes no ensaio I, do qual fazem parte a FUR, SMZ, DCF e NAP, causam algum tipo de efeito nas plantas (inibição ou atraso no seu crescimento), o que é um sinal um sugestivo de possível toxicidade.

É de destacar ainda que as folhas maiores das plantas no Leito com os fármacos cresceram menos cerca de 10 %, em média, do que nos controlos, enquanto as folhas menores das plantas na presença dos fármacos cresceram, em média, menos aproximadamente 25% do que nos controlos. De facto, as diferenças são mais acentuadas nas folhas menores e a explicação pode dever-se ao facto destas folhas (mais jovens) estarem ainda numa fase de maior crescimento do que as maiores, sendo por isso mais acentuado e notório o efeito de uma inibição ou atraso do crescimento causada por efeitos tóxicos dos fármacos. Por outro lado, as folhas maiores já estarão numa fase muito mais próxima do fim do crescimento e estabilização do seu tamanho, sendo por isso menos visível na sua TCR o possível efeito tóxico dos fármacos no crescimento destas folhas mais antigas.

Ainda da observação da figura 29, é possível verificar através do tamanho médio das folhas, que o Leito II apresenta uma taxa de crescimento médio relativamente inferior à do Leito I (Leito que não está exposto aos fármacos), confirmando desta forma os efeitos tóxicos dos fármacos nas plantas, levando assim à inibição do seu crescimento.

Da inspeção visual feita às plantas expostas aos fármacos, durante o período que decorreu a experiência, as mesmas estavam viçosas e não apresentavam o aparecimento de cloroses (amarelecimento das folhas) e de folhas murchas ou secas na parte superior.

Comportamento idêntico foi verificado com plantas diferentes, por outros autores que observaram que quando as macrófitas eram expostas ao aumento dos fármacos levava a uma diminuição radicular (Marques & Nascimento, 2013; Singh & Prasad, 2014) bem como da parte aérea das plantas (Fernández et al., 2013; Marques & Nascimento, 2013). Essa repressão de crescimento das plantas, poderá ser um indicador de efeitos de toxicidade nas plantas.

b) Determinação dos Pigmentos Fotossintéticos

A presença de fármacos no meio aquático afeta, em geral, o comportamento das plantas, alterando com isso vários parâmetros fisiológicos, entre os quais os relacionados com o processo de fotossíntese. Assim, neste estudo foi avaliado o efeito que a exposição das plantas *Typha* spp. aos fármacos teve a nível da concentração dos seus pigmentos fotossintéticos tais como clorofila a, clorofila b, clorofila total (a + b) e carotenóides

Os valores da concentração destes pigmentos determinados nas plantas expostas aos fármacos (Leito II) foram comparados com os valores obtidos nas plantas do controlo (Leito I), para os 0, 3 e 6 dias de exposição.

A determinação das concentrações dos vários pigmentos foi obtida por medição das absorvâncias dos extratos a diferentes comprimentos de onda (665, 652 e 470 nm) e efetuando o cálculo das concentrações dos pigmentos de acordo as seguintes equações:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/ml}) = 16,72 (A_{665}) - 9,16 (A_{652}) \text{ (Lichtenthaler, 1983) (equação 6)}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/ml}) = 34,09 (A_{652}) - 15,28 (A_{665}) \text{ (Lichtenthaler, 1983) (equação 7)}$$

$$\text{Clorofila total (a+b) } (\mu\text{g/ml}) = 22,12 (A_{652}) + 2,71 (A_{665}) \text{ (Porra et al., 1989) (equação 8)}$$

$$\text{Carotenóides } (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1,63 [\text{Clorofila a}] - 104,96 [\text{Clorofila b}]) / 221 \text{ (Lichtenthaler, 1983) (equação 9)}$$

Os valores médios obtidos para a concentração de cada um dos pigmentos fotossintéticos, para o Leito II (contendo a solução com os fármacos) e para o Leito I (Controlo), representados no gráfico da figura 30.

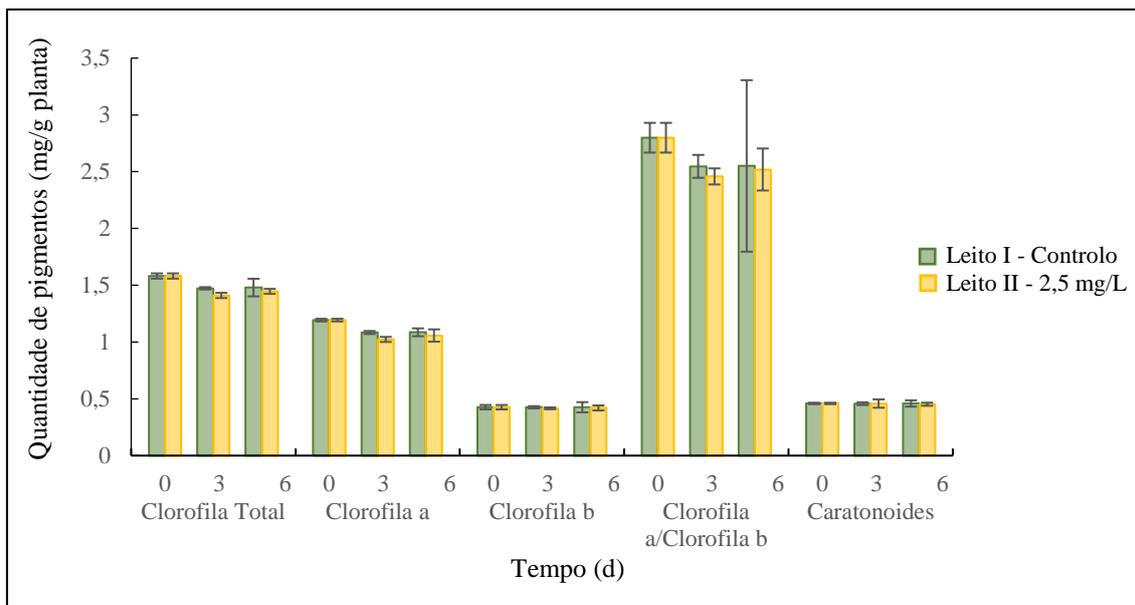


Figura 30 - Pigmentos fotossintéticos presentes na parte aérea da *Typha* spp. após 0, 3 e 6 dias de exposição, sujeita às concentrações de 0 (Leito I) ou 2,5 mg/L dos fármacos em solução (Leito II).

Analisando os resultados obtidos verifica-se que no início da experiência (0 dias) as concentrações para todos os pigmentos (clorofila total, clorofila a e b, clorofila a/clorofila b e carotenoides), eram praticamente iguais para as plantas do Leito II (expostas a 2,5 mg/L de fármacos) comparativamente às plantas do I (controlo), o que está de acordo com as expectativas pois para estas amostras ainda não tinha decorrido qualquer tempo de exposição que justificasse diferenças significativas.

Entretanto, após 3 e 6 dias de exposição aos fármacos as concentrações da clorofila total, clorofila a e b, e clorofila a/clorofila b diminuíram nas plantas expostas ao composto em relação às plantas do controlo, parecendo já haver uma inibição na síntese deste pigmento ou uma degradação do pigmento ou dos seus precursores. Este efeito, segundo alguns autores, é observado com frequência nas plantas em situações de stress (Gill & Tuteja, 2010; Sharma et al., 2012).

No que diz respeito aos carotenoides, ao longo de todo o tempo de duração da experiência, as concentrações mantiveram-se praticamente constantes nas plantas do controlo (Leito I) e nas plantas do Leito II. Esta observação poderá ser indicativa de uma diminuição da concentração do fármaco no interior da planta (eventual metabolização) ou uma capacidade da planta de lidar com a presença do composto

(destoxificação), parecendo haver assim uma resposta da planta à situação de stress causada pela presença do fármaco. É de notar que, para além de participarem como coadjuvantes no processo de fotossíntese, os carotenoides também possuem a capacidade de eliminar espécies reativas de oxigénio, tendo assim uma ação antioxidante que protege as células dos danos oxidativos decorrentes das situações de stress, em que normalmente aumentam as espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês “Reactive Oxygen Species”), especialmente o ião radicalar superóxido $\bullet\text{O}_2^-$ (Jomova & Valko, 2013; Tóth et al., 2015)

(Esteban et al., 2015) também descreve os carotenoides como potentes inibidores e sequestradores de ROS, reagindo com estes para formar espécies menos reativas através de diversos mecanismos reaccionais (Jomova & Valko, 2013).

A ação antioxidante dos carotenoides pode ocorrer em conjunto com outros compostos da planta. Desta forma, as células das plantas desenvolveram vários mecanismos, enzimáticos e não enzimáticos, que permitem controlar e eliminar o nível destas espécies reativas de oxigénio, evitando assim danos significativos nas células que, em casos extremos, podem conduzir à morte celular. O sistema enzimático antioxidante é um desses mecanismos protetores que eliminam ou reduzem os níveis de ROS por ações sequenciais e simultâneas de várias enzimas como catalases, peroxidases e superóxido dismutase.

c) Determinação da atividade enzimática

Assim, foram determinadas as atividades enzimáticas das enzimas SOD, CAT e GPX em amostras de folhas das plantas, por forma a caracterizar melhor a resposta enzimática antioxidante ativada pela *Typha* spp. em reação ao stress causado pela exposição das plantas aos fármacos do Leito II. Uma ação coordenada entre as atividades destas enzimas é fundamental, pois determina os níveis de ROS (superóxido, peróxido de hidrogénio, entre outros, na célula).

Embora cada enzima possua um papel fundamental no controlo dos níveis de ROS, este estudo dá maior relevância às enzimas SOD, CAT e GPX na remoção de ROS das plantas. A enzima SOD encontra-se na primeira linha de defesa contra o crescimento da

quantidade de ROS, sendo capaz de transformar o radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) no peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que, no entanto, é uma espécie ainda bastante reativa e potencialmente causadora de danos nas células (M. P. Mourato et al., 2015). Assim, o H_2O_2 também precisa de ser removido, o que pode ser conseguido por ação de outras enzimas, tais como a CAT, que irá catalisar a reação de dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 . Esta enzima, que no interior das células se encontra nos peroxissomas e mitocôndrias, tem um papel importante na remoção de H_2O_2 , que por sua vez já tem os seus níveis alterados pela atividade da SOD. (M. Mourato et al., 2012). Por sua vez, a enzima GPX é uma peroxidase que se encontra no citosol, nas paredes celulares, em vacúolos e também nos espaços extra-celulares. As peroxidases exercem um papel fundamental na detoxificação do peróxido de hidrogénio e/ou outros peróxidos orgânicos, que são produzidos em resultado da exposição a xenobióticos (tais como os fármacos) e pela ação da SOD que atua a montante. Estas enzimas catalisam a redução do H_2O_2 em H_2O (participando assim na sua remoção das células), necessitando, contudo, de um substrato que atue como agente redutor. A guaiacol peroxidase utiliza como substrato redutor, a guaiacol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$) para formar um composto corado, o tetraguaiacol., apresentando uma maior afinidade para os peróxidos que as CAT. Apesar de a CAT ser mais ativa em condições de stress, a guaiacol peroxidase protege as células quando ocorre níveis mais baixos de stress oxidativo (M. Mourato et al., 2012).

A atividade enzimática da SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do citocromo-C férrico em 50% e determina-se de acordo com a seguinte equação:

$$U = \frac{0.5 \times \left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{\text{controlo}}}{\left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)_{\text{amostra}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{amostra}}} \quad (\text{Equação 10})$$

onde $(\Delta A/\Delta t)$ é o declive da variação da absorvância a 550 nm com o tempo; V_{total} é o volume da mistura reacional (mL) e V_{amostra} corresponde à quantidade de extrato utilizado (mL).

Para o cálculo da atividade enzimática da CAT, em unidades de atividade enzimática, recorreu-se à seguinte equação:

$$U = \frac{Abs}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{1}{L} \times \frac{2,7}{V} \quad (\text{Equação 11})$$

onde $Abs/\Delta t$ é o declive da variação da absorvância a 240 nm com o tempo; Δt o intervalo de tempo; ϵ é a absortividade molar do H_2O_2 a 240 nm ($3,94 \times 10^{-3} \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$); L é a largura da célula (10 mm) e V é o volume de extrato utilizado (mL).

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a decomposição de 1 $\mu\text{mole } H_2O_2$ por minuto, a 25°C, nas condições dos ensaios.

A atividade enzimática da GPX é medida pela seguinte expressão (adaptada de (Gajewska et al., 2006), usando como coeficiente de absortividade molar do um valor de $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ do tetraguaiacol

$$\text{Atividade GPOD} = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \times \frac{V_t}{26,6 \times V} \quad (\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1} = \text{U mL}^{-1}) \quad (\text{Equação 12})$$

onde $\Delta Abs/\Delta t$ é o declive da parte linear da curva da cinética enzimática da GPX obtida no espectrofotómetro, durante um intervalo de tempo de 2 min; V é o volume de extrato (mL); V_t é o volume total na cuvette (mL).

Os valores obtidos para as atividades enzimáticas SOD, CAT e GPX na parte aérea da *Typha* spp. foram comparados com os valores da atividade das mesmas nas plantas do Leito I (controlo), para os tempos 0 (referência de 100%), 3 e 7 dias de exposição e os resultados estão apresentados na figura 31.

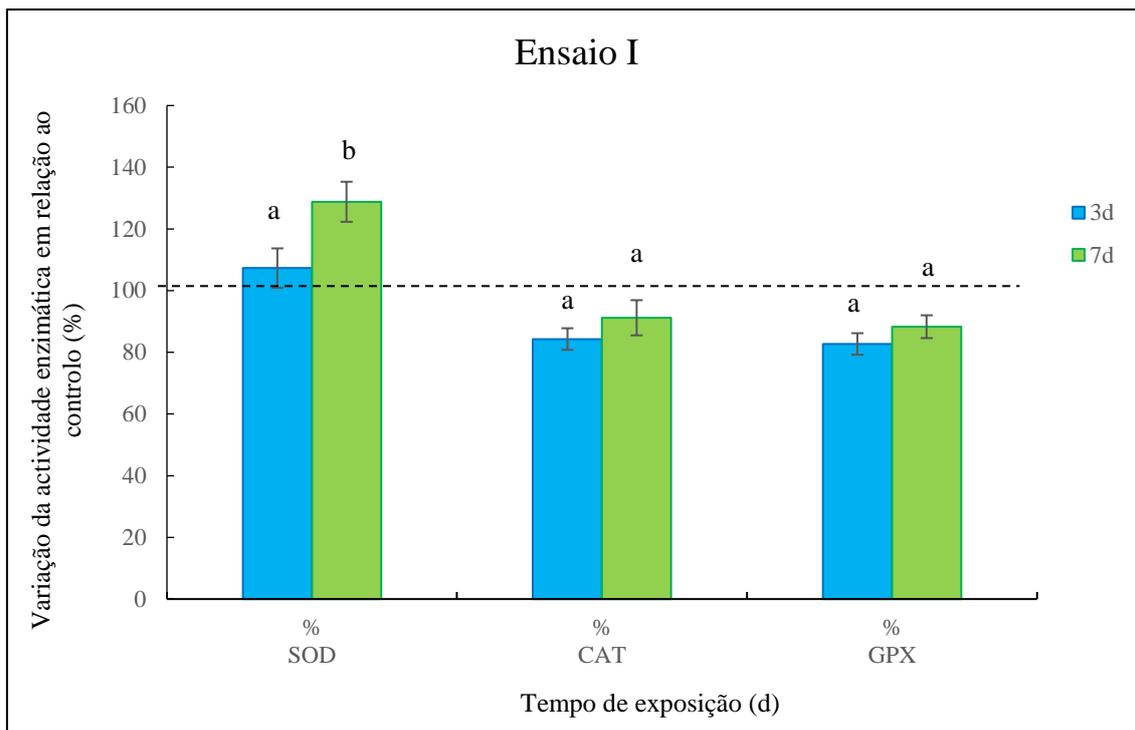


Figura 31 - Atividade enzimática da SOD, CAT e GPX na parte aérea da *Typha* spp. aos 0, 3 e 7 dias de exposição, sujeita às concentrações de 0 (Leito I) e 2.5 mg/L de fármacos em solução (Leito II) (média \pm DP, $n=9$). Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes para $P<0,05$.

Observa-se através da Figura 31 que ao fim de 3 dias de exposição, ocorreu um ligeiro aumento da atividade da enzima SOD nas folhas das plantas do leito II relativamente ao controlo (leito I), e que foi continuando ao longo do tempo a aumentar mais acentuadamente (mostrando os testes ANOVA diferenças significativas), tendo aos 7 dias de exposição já um aumento mais expressivo. Isto mostra que a presença dos fármacos em solução estimulou a enzima SOD na parte aérea da *Typha* spp, aumentando desta forma a sua atividade em resposta ao stress que é provocado nas plantas. Este aumento da atividade pode ser atribuído ao provável aumento da concentração do ião radicalar superóxido ($\bullet\text{O}_2\cdot$), que resulta da situação de stress provocada pela exposição das plantas aos fármacos. Estudos já publicados demonstram este aumento da atividade SOD na presença de vários poluentes tanto orgânicos como inorgânicos (Dordio et al., 2011; Ferrat et al., 2003). No entanto, este aumento da atividade da SOD pode ser um indicativo de uma capacidade da planta em lidar com a presença dos fármacos, em resposta ao stress.

Por outro lado, em relação à CAT, verificou-se um decréscimo da sua atividade enzimática nos primeiros tempos de exposição aos fármacos, o que poderá ter sido consequência da excessiva produção de ROS, devido à acumulação de fármacos dentro dos tecidos da parte aérea da *Typha* spp., e, possivelmente, um efeito de inibição destas enzimas em resultado destas condições adversas, desta forma causadora de uma redução da resposta enzimática. Contudo ao fim de 7 dias de exposição aos fármacos, parece ter havido uma recuperação da atividade enzimática da CAT, apesar de os testes ANOVA não comprovarem diferenças estatisticamente significativas. Significa isto que parece haver um estímulo da enzima CAT na parte aérea da *Typha* spp. ao fim deste período mais longo (7 dias). Este aumento da atividade pode ser atribuído ao provável aumento da concentração do seu substrato, H₂O₂, em resultado da ação da enzima SOD.

Relativamente à GPX, também responsável pela eliminação de H₂O₂, verificou-se uma diminuição da sua atividade nos primeiros dias da experiência (3 dias), indicando uma inibição desta enzima. A sua estimulação foi retardada, aumentando a sua atividade ao longo do tempo (7 dias) após o decréscimo inicial (apesar de os testes ANOVA não comprovarem diferenças estatisticamente significativas), sendo este aumento um pouco lento. Observou-se um comportamento bastante idêntico ao da enzima CAT, uma vez que esta enzima cumpre uma função idêntica à da CAT. As variações de atividade desta enzima GPX, poderão ser resultado do mesmo tipo de efeitos que se discutiu para a CAT. A conversão de H₂O₂ (resultante da atuação da SOD) em água, catalisada pela guaiacol peroxidase, poderá ajudar a diminuir os níveis de H₂O₂ e limitar os potenciais danos causados por elevados níveis de peróxido.

Devido à localização celular da GPX, e porque esta atua em diversos substratos fenólicos, esta enzima dá uma menor informação em relação aos mecanismos de tolerância face ao stress oxidativo.

5.3.2. Ensaio II

5.3.2.1. Condições relevantes dos ensaios

Neste ensaio que se iniciou em maio de 2021, as plantas dos microcosmos de LCMs encontravam-se já numa fase avançada do crescimento, com uma altura média de 85 cm, apresentando a folha menor um tamanho médio de cerca de 48 cm e a folha maior 122 cm e uma densidade média das plantas nos leitos era agora de 114 plantas/m².

a) Evaporação e condições climáticas

Sob influência das condições climáticas durante o período do ensaio as taxas de evaporação/evapotranspiração para os vários leitos foram semelhantes às do Ensaio I, e os valores encontram-se apresentados na tabela 11.

Tabela 11 - Volume (mL) de líquido adicionado diariamente aos leitos e valores médios da taxa de evaporação/evapotranspiração de cada leito.

Tempo (h)	24	48	72	96	120	144	168	Taxa média de Evaporação + Transpiração (mm/d)	Et/E ₀	Taxa média de Evaporação + Transpiração (mm/(planta.d))	Número de plantas no leito	Transpiração (mm/d)
Leito	Volume de líquido adicionado (mL)											
I	1100	1110	860	1050	1200	1140	1240	14,6	4,05	1,83	8	11,05
II	1140	1120	890	1072	1220	1180	1280	15,05	4,16	1,77	8,5	11,43
III	252	260	196	270	300	280	340	3,61	----	----	----	----
IV	0	0	0	0	0	0	0	----	----	----	----	----

Leito I - Planta + matriz (controlo); **Leito II** - Planta + matriz + fármacos; **Leito III** - matriz + fármacos; **Leito IV** - fármacos

Tal como seria de esperar, e à semelhança do que aconteceu no ensaio I, o Leito III, que é constituído somente pela matriz, apresentou taxas de perda de água bastante inferiores, nomeadamente de 3,6 mm/d, em relação aos Leitos plantados (I e II). O volume de líquido perdido deve-se neste caso apenas à evaporação, que condicionada pela temperatura e humidade relativa do ar. Os valores destas condições climáticas estão apresentados na tabela 12, onde se pode deduzir a influência destas duas variáveis na taxa de evaporação, nomeadamente observando que para o dia 26 em que se registou a maior perda de água se observou simultaneamente a temperatura mais elevada e uma diminuição da humidade.

Tabela 12 - Registo das condições meteorológicas no período de 22 a 28 de maio de 2021

Dias de ensaio	Maio de 2021							Média (n=7)
	22	23	24	25	26	27	28	
Temperatura média (°C)	14,8	14,7	16	18,9	22,8	20,4	22,5	18,6
Temperatura mínima (°C)	10,2	8,5	10,6	9,4	13	13,2	15,3	11,5
Temperatura máxima (°C)	20,7	21,8	23,3	29,3	31,1	25,9	30,8	26,1
Humidade média (%)	51,3	51,5	61,7	50	42	47	39,1	49,0
Humidade mínima (%)	28,7	26,5	39,5	23,7	23,5	32,9	24,2	28,4
Humidade máxima (%)	77,7	85,3	87,7	83,3	74,2	66,7	57,2	76,0
Precipitação (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0
Vel. Vento (m/s)	3,5	4,3	2,7	2,8	2	1,4	2,4	2,7
R. Global máxima (W/m ²)	873	1027	741	998	988	582	988	885,3

Já nos Leitos plantados, além da evaporação, também a taxa de transpiração das plantas constitui uma importante contribuição para as perdas de água, tendo variado assim a taxa de evapotranspiração entre 14,6 e 15 mm/dia, respetivamente para os Leitos I e II. Tendo em conta que o Leito I (2 réplicas) tinha em média 8 plantas enquanto o Leito II (igualmente com 2 réplicas) tinha em média 8,5 plantas, a diferente densidade de plantas dos Leitos explica o motivo da taxa de evapotranspiração ser superior no segundo caso.

Assim, é possível estimar os valores de água perdidos através da transpiração das plantas, sendo estes de 11 e 11,43 mm/dia para os Leitos I e II, o que constitui uma importante contribuição para a perda de água nos Leitos.

Analisando-se os resultados das Kc (Et/Eo) obtidas na tabela 11, com o Leito II a apresentar-se um valor de Kc ligeiramente superior em relação ao Leito I, verificou-se influência uma vez das condições climatéricas, a humidade e temperatura, bem como também pela espécie a que pertence a macrófita. A ligeira diferença pode deve-se principalmente a efeitos da exposição aos fármacos (no Leito II) sobre o comportamento das plantas.

b) pH do meio

Como já foi referido anteriormente, o pH do meio é um dos fatores que influencia significativamente a capacidade dos materiais argilosos para adsorver compostos, bem como o desenvolvimento da vegetação e da população microbiana nos LCMs. Por esta razão, determinaram-se os valores de pH da solução em contacto com a matriz de suporte ao longo do período de realização dos estudos. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na figura 32.

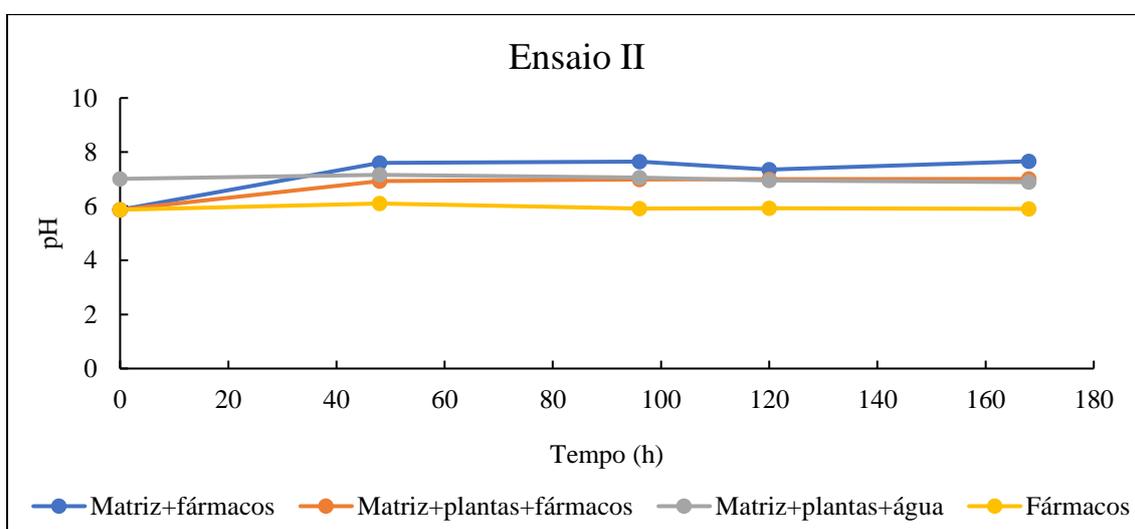


Figura 32 - Valores do pH do meio nos leitos ao longo do período de estudo.

Da análise dos dados, observou-se que os valores de pH da solução em contacto com as diferentes matrizes variaram entre 6 e 7,6 ao longo do período de realização do ensaio.

Os valores de pH da solução do Leito IV (sem plantas nem matriz) foram aqueles que apresentaram menores variações ao longo do tempo, mantendo-se praticamente constantes. Os valores iniciais de pH mantiveram-se ligeiramente ácidos devido às características ácidas dos fármacos presentes em solução e também em resultado da exposição da solução ao ar.

Verifica-se por outro lado que no Leito III (onde não se colocaram plantas, mas apenas a solução em contacto com a matriz) houve um maior aumento de pH durante o estudo, partindo de um valor inicial de 6,0 até um valor de ~7,6, o qual se manteve constante a partir das 48h em diante. O valor de pH final atingido é fortemente condicionado pela

composição química e mineralógica dos materiais da matriz, tal como já foi referido e discutido anteriormente (secção 5.3.1.1).

É de realçar também que nos Leitos plantados (I e II) os valores de pH foram muito semelhantes, sofrendo poucas alterações ao longo do ensaio, situando-se no final em valores intermédios e próximos da neutralidade.

Estes resultados demonstram que as plantas têm um efeito moderador da alcalinidade da matriz, o que poderá resultar da libertação de exsudados pelas plantas, os quais contêm normalmente ácidos orgânicos de baixo peso molecular, tais como o ácido oxálico, o málico, o fórmico ou o acético, que contribuem para a diminuição do pH do meio contendo a matriz e as plantas (Zhang et al., 2012). Tais condições de pH (meio neutro ou ligeiramente alcalino), são favoráveis ao desenvolvimento das plantas e da população microbiana.

5.3.2.2. Remoção dos fármacos pelos microcosmos de LCM

O procedimento para avaliar a eficiência de remoção dos fármacos neste ensaio II, bem como a caracterização da cinética do processo global em cada caso, foram os mesmos que os descritos no ponto 5.3.1.2 (Remoção dos fármacos pelos microcosmos de LCM - Ensaio I). As únicas diferenças foram nas concentrações dos fármacos utilizados na solução, bem como o aumento da variedade de fármacos nessa mistura.

Assim sendo, os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 33 e 34, onde constam as percentagens de remoção de FUR, SMZ, DCF e NAP nos diferentes Leitos apenas para alguns dos tempos de contato mais determinantes em termos cinéticos, nomeadamente 0,5; 8,5 e 168 h, correspondendo estes tempos, como veremos posteriormente, a diferentes etapas do processo e, no fim, a um estado já próximo do equilíbrio.

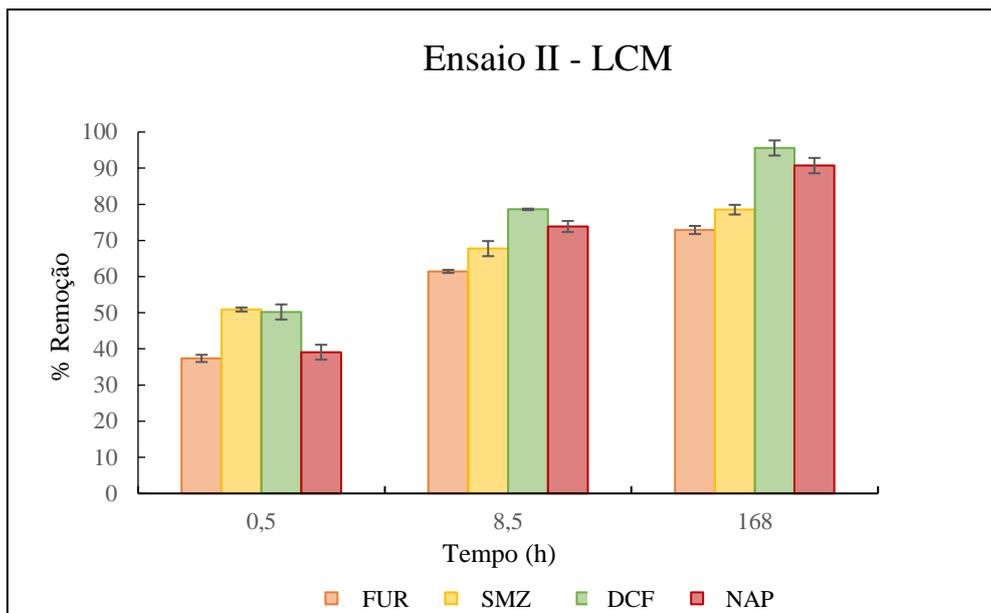


Figura 33 - Percentagem de remoção de FUR, SMZ, DCF e NAP para os tempos de contato de 0,5 h; 8,5 h e 168 h. – Ensaio II – Leitos plantados (II).

Como se pode observar na figura 33, à medida que se vai aumentando o tempo de contacto com os fármacos no Leito plantado, a taxa de remoção dos mesmos vai sempre aumentando até estabilizar, quando o sistema atinge o seu equilíbrio. Uma vez mais e à semelhança do que se verificou no ensaio I, o fármaco que apresenta maior taxa de remoção é o DCF, atingindo ao fim da experiência uma eficiência de remoção a rondar os 96%.

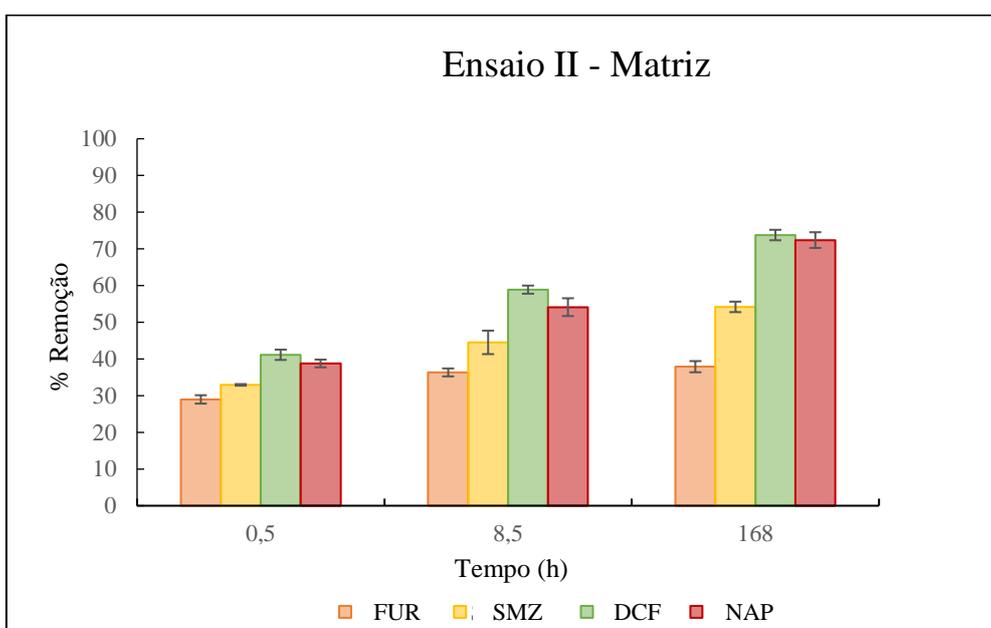


Figura 34 - Percentagem de remoção da FUR, SMZ, DCF e NAP para os tempos de contato de 0,5; 8,5 e 168 h. – Ensaio II – Apenas Matriz (Leito III).

É de notar também que relativamente à quantidade total de fármacos removida, a porção que o é logo na primeira meia hora de contacto, tal como a porção removida ao fim de 8,5 h e até ao final da experiência é muito diferente para os dois tipos de Leitos (fig. 33 e 34). Assim as capacidades máximas de remoção dos fármacos em estudo para os Leitos plantados são muito superiores às obtidas nos ensaios efetuados só com as matrizes, uma vez que ocorrem processos de remoção associados com a presença das plantas que se observam no Leito plantado e que obviamente estão ausentes nos Leitos não plantados, conforme já foi mencionado no ensaio I, o que contribui de certa forma para que se atinjam eficiências de remoção mais elevadas nos leitos plantados.

Observa-se ainda que, tanto no Leito plantado como no não plantado, a remoção do DCF é superior à remoção dos outros fármacos. Na realidade, dada a diferença entre os valores da hidrofobicidade desses compostos, seria previsível uma remoção pelas plantas diferenciada.

O DCF, sendo um composto mais hidrofóbico ($\log K_{ow} = 4.51$), embora possa sofrer absorção radicular e conseqüente translocação/metabolização no interior dos tecidos vegetais, seria de esperar que estivesse maioritariamente sujeito a adsorção/imobilização nas paredes celulares e camada lipofílica das raízes das plantas. Assim, a maior remoção deste composto nos Leitos plantados contraria a visão comumente aceite (Van Hoeyk et al., 2005).

A presença de FUR em folhas de *Typha*, já foi detetada noutros estudos, tais como em Machado et al. (2020), o que demonstra que esta planta consegue efetivamente absorver e translocar para a parte aérea este composto. Entretanto, fármacos moderadamente hidrofóbicos, tais como a carbamazepina ($\log K_{ow} \approx 2,45$), também já foram detetados nas partes aéreas de plantas (Dordio et al., 2011).

Deste modo, ao fim de 168h de experiência, a percentagem de remoção dos 4 fármacos, foram superiores nos Leitos plantados relativamente aos leitos que continham só a matriz, tendo a presença das plantas contribuído, direta ou indiretamente, para uma remoção adicional de entre 19 % (NAP) a 35% (FUR).

Estes valores confirmam o que foi referido anteriormente, que apesar dos processos associados com a matriz terem um efeito mais rápido na remoção dos fármacos, os processos mais lentos que ocorrem nos Leitos plantados associados à componente biota

permitem atingir maiores percentagens de remoção ao fim de um período mais longo. Esta maior eficiência de remoção obtida nos Leitos plantados poderá estar relacionada com a ocorrência de vários processos que, direta ou indiretamente, contribuíam para a remoção de fármacos, nomeadamente a adsorção dos fármacos às raízes e rizomas das plantas; a absorção dos fármacos pelas raízes e sua eventual translocação para as partes aéreas da planta com uma possível metabolização ou sequestração em compartimentos celulares adequados; um aumento da biodegradação na matriz, em particular na rizosfera, a qual é potenciada pelo efeito estimulante de alguns exsudados libertados pelas raízes das plantas no desenvolvimento dos micro-organismos; e ainda à transformação/degradação dos compostos catalisada por enzimas presentes nesses exsudados

5.3.2.3. Resposta fisiológica e bioquímica das plantas ao stress abiótico

Para avaliar os efeitos causados na planta *Typha* spp pelos fármacos que são objeto de estudo neste ensaio II, realizou -se, à semelhança do Ensaio I, a avaliação dos seguintes parâmetros:

- TCR,
- a determinação das concentrações de pigmentos fotossintéticos, nomeadamente clorofila a, clorofila b, clorofila total (a+b) e carotenoides
- a determinação da atividade enzimática de algumas enzimas antioxidantes (neste caso, a CAT e a SOD) envolvidas na resposta ao stress oxidativo das plantas sujeitas a uma determinada concentração de fármacos.

a) Determinação da TCR

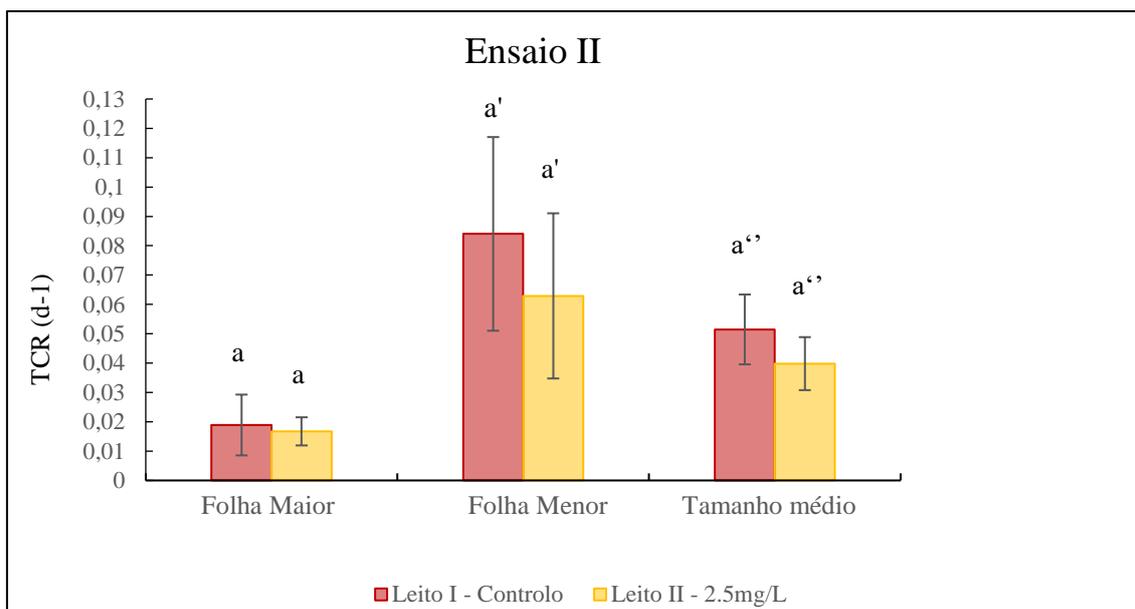


Figura 35 - Taxa de crescimento relativa média da folha maior, da menor e do crescimento médio das plantas de *Typha* nos Leitos dos Leitos I e II ao fim de 168h de experiência (média \pm DP, $n=6$). Diferentes letras significam valores significativamente diferentes para $P<0,05$.

Neste ensaio, a TCR das folhas apresentou uma redução em todas as plantas que estiveram em contacto com os fármacos relativamente às plantas do Leito de controlo, embora estas diferenças não possam ser consideradas estatisticamente significativas em resultado dos testes ANOVA.

Verificou-se um comportamento semelhante ao observado para o ensaio I, com as folhas mais jovens a mostrarem-se mais sensíveis à exposição aos fármacos (cresceram, em média, menos aproximadamente 25% do que nos controlos) do que as folhas mais desenvolvidas (cresceram em média menos cerca de 0,005 do que nos controlos). Tal seria de esperar face às menores necessidades nutricionais e estado de desenvolvimento mais avançado das folhas maiores, o que torna menos evidente o efeito da diminuição do crescimento nestes casos.

Os resultados obtidos vão de encontro aos trabalhos publicados por outros autores, que observaram também que a exposição das plantas aos fármacos, provocava inibição no crescimento da raiz (Marques & Nascimento, 2013; Singh & Prasad, 2014) bem como da parte aérea (Fernández et al., 2013; Marques & Nascimento, 2013), com possível efeito tóxico dos fármacos no crescimento destas folhas.

b) Determinação dos Pigmentos Fotossintéticos

Com o intuito de avaliar o efeito que a exposição das plantas aos fármacos tem nas concentrações de clorofila total ($a + b$), clorofilas a e b e carotenóides da *Typha* spp., procedeu-se à quantificação destes pigmentos nas folhas das plantas do Leito II e compararam-se os resultados com os obtidos nas plantas do controlo (Leito I) para o tempo de exposição de 0, 3 e 6 dias.

Assim, para a determinação das concentrações dos vários pigmentos seguiu-se o método de extração de Lichtenthaler modificado, previamente otimizado e os valores médios obtidos para a concentração de cada um dos pigmentos para o Leito I e II encontram-se representados na Figura 36.

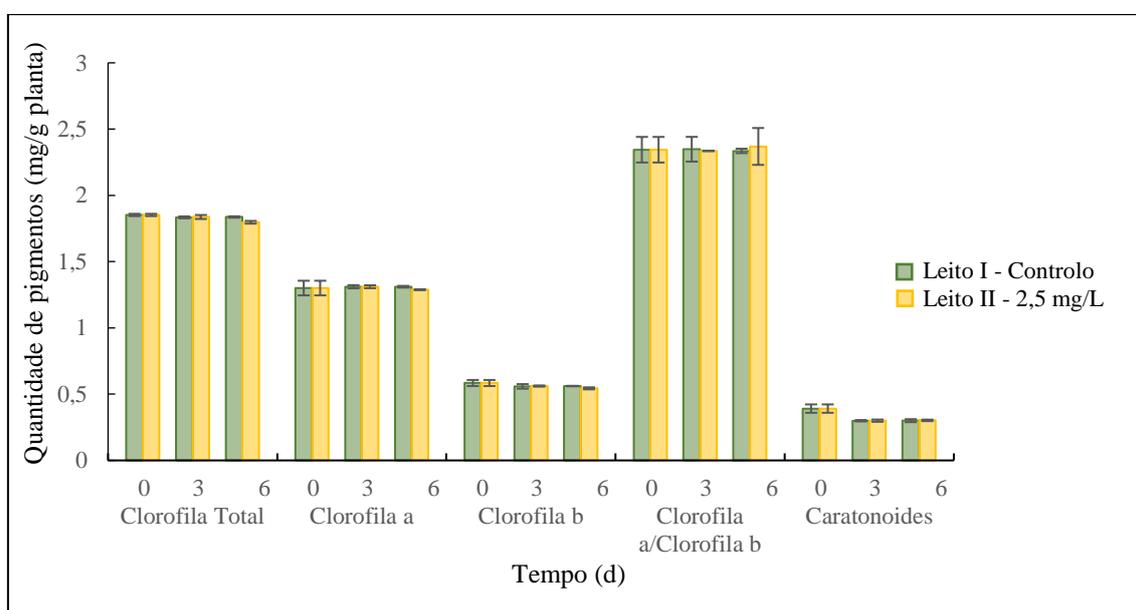


Figura 36 - Pigmentos fotossintéticos presentes na parte aérea da *Typha* spp. após 0, 3 e 6 dias de exposição, sujeita às concentrações de 0 (Leito I) ou 2,5 mg/L dos fármacos em solução (Leito II).

Pode-se observar na figura 36 que as concentrações da clorofila total, clorofila a e b , clorofila a / clorofila b e carotenóides das plantas expostas aos fármacos (Leito II) e das plantas controlo (Leito I) partem de valores muito próximos no início do ensaio (0 dias).

No entanto, para 3 e 6 dias de estudo observou-se uma ligeira diminuição das concentrações da clorofila total, clorofila a e b , e clorofila a /clorofila b nas plantas expostas aos fármacos, com exceção para clorofila a /clorofila b que ao fim de 6 dias de experiência a concentração destes pigmentos passou a ser ligeiramente superior à das plantas controlo. Isto poderá ser a indicação de que as plantas inicialmente ressentiram-

se da exposição ao agente tóxico, mas que com o passar de tempo foram capazes de lidar com a presença do composto (destoxificação) e reagir de forma positiva, recuperando dos seus efeitos nocivos.

No que concerne aos carotenóides, durante todo o tempo da experiência, as concentrações mantiveram-se praticamente iguais nas plantas do controlo (Leito I) e nas plantas do Leito II, o que pode ser indicativo do papel importante que carotenóides têm na resposta ao stresse causada pela sua exposição continuada aos fármacos presentes na solução.

De facto, para além da sua função de pigmento acessório na fotossíntese, os carotenóides possuem ainda uma capacidade antioxidante, i.e. de eliminação de espécies reativas de oxigénio.

c) Determinação da atividade enzimática

Como já foi dito anteriormente, o sistema enzimático antioxidante é um dos mecanismos protetores que eliminam ou reduzem os níveis de ROS, por ações sequenciais e simultâneas de várias enzimas como SOD, CAT, GPX, entre outras.

Procurou-se neste ensaio II, à semelhança do que é relatado na secção 5.3.1.3, determinar a atividade das enzimas SOD, CAT e GPX em folhas das plantas do Leito II e do Leito I (controlo), para os tempos 0, 3 e 7 dias de exposição à solução com fármacos.

Deste modo, os resultados obtidos para as atividades enzimáticas da SOD, CAT e GPX, determinadas na parte aérea da *Typha* spp., encontram-se apresentados na figura 37.

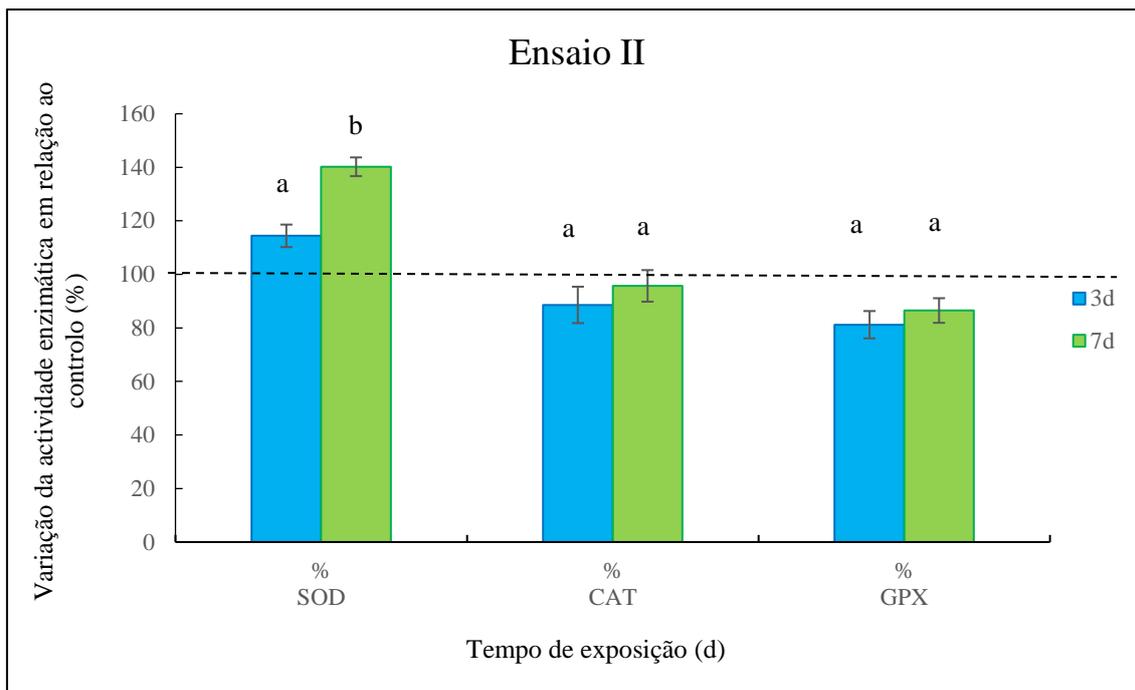


Figura 37 - Atividades enzimáticas da SOD, CAT e GPX na parte aérea da *Typha* spp. aos 0, 3 e 7 dias de exposição às concentrações de 0 mg/L (Leito I) e 2.5 mg/L de fármacos em solução (Leito II) (média \pm DP, $n=9$). Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes para $P<0,05$.

Neste ensaio, a resposta enzimática das plantas *Typha* spp. à presença dos fármacos em solução é muito semelhante ao que se verificou no ensaio I, tendo-se observado, conforme é visível na figura 37, um aumento significativo na atividade enzimática da SOD, com a CAT e a GPX a sofrerem uma ligeira diminuição nas suas atividades quando comparadas com as atividades enzimáticas observadas no Leito I.

Como se pode observar na figura 37, logo no período inicial do ensaio (3 dias) a atividade enzimática da SOD nas folhas das plantas expostas aos fármacos (Leito II) é superior à das plantas do Leito I (controlo). Ao fim de 7 dias de exposição, observa-se a continuação deste comportamento sendo este aumento até significativamente maior do que no período inicial. Como foi anteriormente referido para o ensaio I, o aumento da atividade da SOD provavelmente deve-se ao aumento da concentração em anião radicalar superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), provocada pela situação de stress a que as plantas foram sujeitas quando expostas aos fármacos, ocorrendo assim a conversão do ião radicalar

superóxido em H_2O_2 , o qual deverá ser posteriormente eliminado pela ação catalítica da CAT e restantes peroxidases.

Os efeitos da exposição aos fármacos bem como a produção e acumulação de ROS podem ser responsáveis pela inibição de algumas enzimas. Esta poderá ser a razão para a significativa diminuição da atividade das enzimas CAT e GPX que se observam na figura 37. Ao fim de 7 dias de exposição, porém, parece haver uma recuperação destas enzimas, CAT e GPX, com um aumento ligeiro das suas atividades (embora em ambos os casos não se possam considerar estes aumentos como estatisticamente significativos), o que poderá dever-se ao estímulo destas enzimas induzido pelo crescimento da concentração de H_2O_2 em resultado da eficiente ação da SOD.

Por outro lado, observa-se que os efeitos na atividade da GPX são um pouco mais pronunciados do que para a CAT, verificando-se uma maior inibição inicial desta enzima e também uma mais lenta recuperação posterior.

5.3.3. Ensaio III

5.3.3.1. Condições relevantes dos ensaios

O Ensaio III decorreu em maio de 2022. Na altura da realização dos ensaios as plantas já se encontravam em final de ciclo de vida, com a maioria das suas folhas já plenamente desenvolvidas, sendo a sua densidade média nos leitos de 134 plantas / m^2 . Durante a realização do ensaio, contudo, surgiram ainda novos rebentos nos dois leitos (Ensaio I e II).

a) Evaporação e condições climatéricas

Os níveis da coluna de água nos leitos foram controlados diariamente, à semelhança do que aconteceu anteriormente com os outros ensaios, e os valores de água de reposição para manutenção dos respetivos níveis encontram-se apresentados na tabela 13.

Tabela 13 - Volume (mL) de líquido adicionado diariamente aos leitos e valores médios da taxa de evaporação/evapotranspiração de cada leito.

Tempo (h)	24	48	72	96	120	144	168	Taxa média de Evaporação + Transpiração (mm/d)	Et/E ₀	Taxa média de Evaporação + Transpiração (mm/(planta.d))	Número de plantas no leito	Transpiração (mm/d)
Volume de líquido adicionado (mL)												
I	1300	1500	1600	1640	1710	1640	1580	20,9	5,0	2,0	10	16,7
II	1378	1540	1640	1650	1810	1680	1620	21,6	5,2	2,2	10	17,4
III	240	280	320	280	400	330	320	4,1	----	----	----	----
IV	0	0	0	0	0	0	0	----	----	----	----	----

Leito I - Planta + matriz (controlo); **Leito II** - Planta + matriz + fármacos; **Leito III** - matriz + fármacos; **Leito IV** - fármacos

Pode-se constatar que, no Leito III, o qual continha apenas a matriz de suporte, a perda diária de água foi inferior em relação aos Leitos plantados (I e II), tal como seria de esperar. De facto, nos Leitos sem plantas a perda de água é devida apenas à evaporação, enquanto nos leitos plantados, para além da evaporação, ocorre também transpiração das plantas. Os dados da temperatura e da humidade relativa do ar registados durante o período do ensaio estão apresentados na tabela 14, onde se pode verificar que no dia 08 de maio houve um aumento de temperatura e uma diminuição da humidade, situação que deverá ter favorecido a elevada taxa de evaporação que se observou nesse dia. No entanto, apesar de continuar o aumento gradual da temperatura no dia seguinte, não se registou um aumento da evapotranspiração, podendo esse facto estar relacionado com o aumento de humidade que também se verificou nesse dia.

Tabela 14 – Registo das condições meteorológicas no período de 04 a 10 de maio de 2022

Dias de ensaio	Maio de 2022							Média (n=7)
	4	5	6	7	8	9	10	
Temperatura média (°C)	18,3	20,7	21,7	22,3	24,3	25,1	23,9	22,3
Temperatura mínima (°C)	11,6	11,9	15,9	14,8	18,2	18,3	17,8	15,5
Temperatura máxima (°C)	24,2	27,3	28,1	28,7	30,1	32	31,7	28,8
Humidade média (%)	58,8	47,9	43,9	42,2	31,2	35,4	44,9	43,4
Humidade mínima (%)	31,6	23,5	24	15,8	15,8	16,8	25,4	21,8
Humidade máxima (%)	91,4	84,3	65,6	78,3	55,1	53,1	70,9	71,2
Precipitação (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0
Vel. Vento (m/s)	2,5	1,9	2,1	1,9	2	2,1	1,8	2,0
R. Global máxima (W/m ²)	1006	979	903	973	960	951	966	962,5

Em relação aos Leitos I e II, verificaram-se pequenas diferenças nas taxas de transpiração, com valores de 16,7 e 17,4 mm/dia respetivamente. Estas ligeiras diferenças podem dever-se ao fato de a transpiração ser afetada por vários fatores, entre os quais a quantidade de massa verde, já que quanto maior esta for, maior a quantidade de água que é perdida pelas plantas. À data da realização deste ensaio, as plantas destes Leitos já não se encontravam em ativo crescimento, e muitas delas já se encontravam mesmo no final do seu ciclo de vida. Além disso, os novos rebentos que, entretanto, foram surgindo eram ainda demasiado pequenos aquando do final dos ensaios.

À semelhança do que se verificou nos ensaios I e II, o K_c (E_t/E_o) é ligeiramente superior no Leito II em relação ao Leito I. Uma vez mais, os efeitos da exposição aos fármacos (no Leito II) poderão estar na base dessa ligeira diferença de valores de K_c para os dois leitos.

Assim, pelas diferenças residuais das taxas de transpiração observadas no Leito I e II, pode-se afirmar que, neste caso, a presença dos fármacos em solução não parece afetar de forma significativa a taxa de evaporação/transpiração.

b) pH do meio

No decorrer deste ensaio, procedeu-se também ao registo dos valores do pH das soluções em cada um dos leitos para os tempos de contato com a matriz de suporte ao longo do período de realização dos estudos e os resultados obtidos encontram-se representados na figura 38.

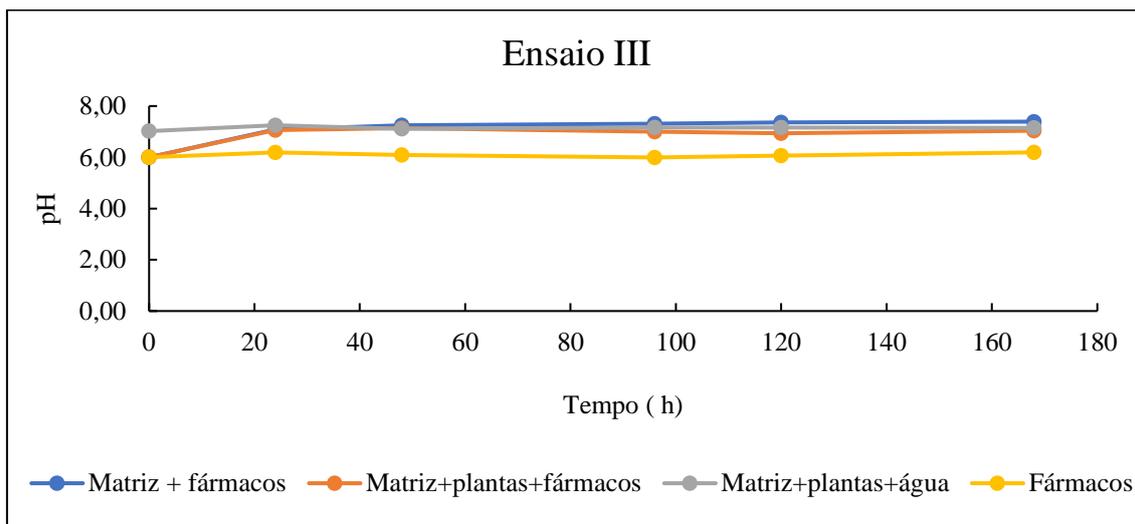


Figura 38 - Valores do pH do meio nos leitos ao longo do período de estudo.

Verificou-se que, no decorrer da realização dos estudos, os valores de pH para os vários Leitos variaram entre 6,0 e 7,4. A solução inicial contendo os seis fármacos estava ligeiramente ácida (pH ~ 6,0), o que se deve ao facto de a maioria dos fármacos estudados serem ácidos.

O Leito IV (que continha os fármacos apenas num recipiente sem plantas nem matriz), foi o que apresentou menores oscilações de valores de pH ao longo do período em que decorreu o estudo, sofrendo variação apenas entre 6,0 e 6,2. Tal como já referido, pelo facto de a maioria dos fármacos presentes na solução terem características ácidas (como o NAP, DFC, IBU e SMZ) e devido à exposição da solução ao ar, esta apresentou-se ligeiramente ácida.

O Leito III (matriz + fármacos), foi o que exibiu uma maior variação de pH, tendo iniciado com um valor de 6,0, que, entretanto, foi aumentando até ao final do estudo, atingindo então um valor de 7,4, o que sugere que o principal componente do sistema

responsável por este aumento terá sido o material que constitui a matriz, conforme anteriormente sugerido. A subida do pH neste leite deverá ter sido determinada essencialmente pela matriz, nomeadamente pelos materiais que a compõem, em especial alguns óxidos e carbonatos que, como já se disse anteriormente, entram na composição da LECA e lhe conferem um carácter ligeiramente alcalino.

Em relação aos Leitos plantados (I e II) as variações de pH da solução em contato com a matriz foram menores, tendo-se mantido estes valores ao longo de toda a experiência, próximos da neutralidade (pH ~ 7). Esta tamponização, conferindo características aproximadamente neutras à solução, é provavelmente um efeito devido às plantas, nomeadamente através de exsudados libertados por estas.

5.3.3.2. Remoção dos fármacos pelos microcosmos de LCM

A avaliação da capacidade de remoção dos fármacos bem como a caracterização da cinética neste ensaio III, foram realizadas da mesma forma que foi descrito no ponto 5.3.1.2. Os ensaios tiveram uma duração total de 168h, tendo sido utilizada nos Leitos II, III e IV uma solução contendo 2,5 mg/L de cada um dos seis fármacos, nomeadamente, a CBZ, IBU, NAP, DCF, TMP e SMZ e os resultados estão apresentados nas figuras 39 e 40.

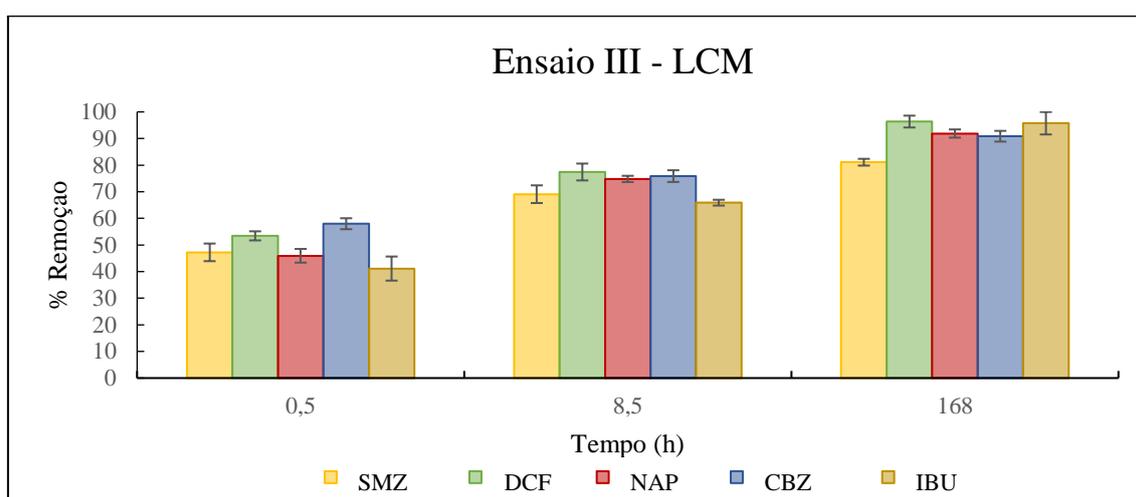


Figura 39 - Eficiência de remoção de SMZ, DCF, NAP, CBZ e IBU para os tempos de contato de 0,5; 8,5 e 168 h. – Ensaio III – Leitos Plantados.

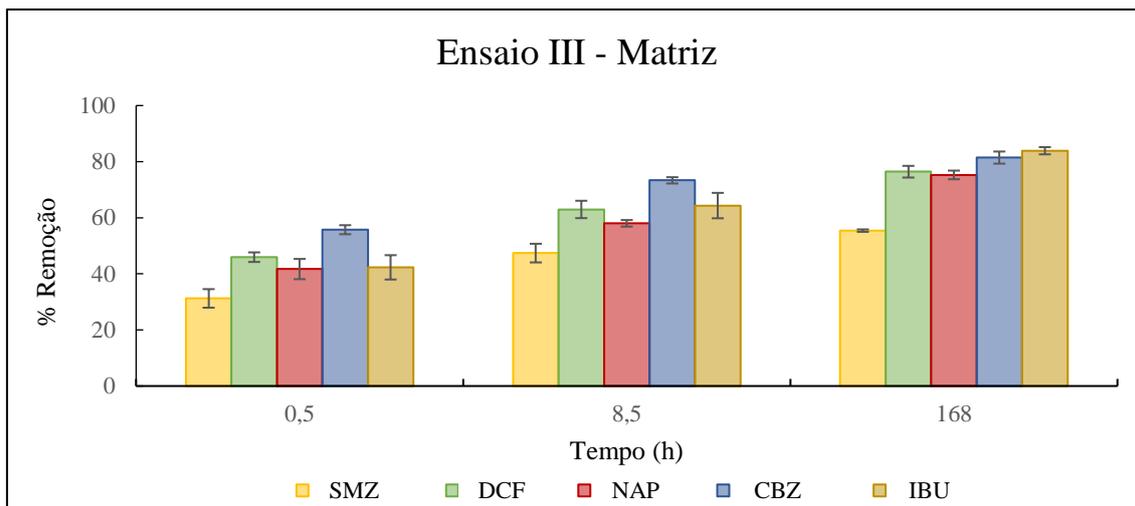


Figura 40 - Eficiência de remoção de SMZ, DCF, NAP, CBZ e IBU para os tempos de contato de 0,5; 8,5 e 168 h. – Ensaio III – Leitos apenas com matriz.

Em relação aos valores da eficiência de remoção dos 5 fármacos presentes nos Leitos com plantas e com a matriz, verifica-se que nos Leitos que continham apenas a matriz, foram sempre inferiores aos dos Leitos plantados, observando-se alguma remoção logo na primeira meia hora de contacto em ambos os Leitos para todos os fármacos, devendo esta remoção inicial destes compostos ser devida essencialmente a adsorção à matriz de suporte.

Ao fim de 168h de contato, a diferença começa a acentuar-se entre a percentagem de remoção nos Leitos plantados e nos Leitos contendo só a matriz. Tornou-se a partir deste período bastante importante a contribuição da componente biota, especialmente das plantas (uma vez que a carbamazepina, um dos compostos mais removido, é dificilmente biodegradável pelos microrganismos), na remoção dos 5 fármacos presentes na solução. Em condições semelhantes, já tinha sido constatado o mesmo comportamento em ensaios realizados anteriormente, para alguns desses compostos (Dordio et al 2010). De acordo com estes autores, a capacidade da *Typha* spp. para remover alguns fármacos como a carbamazepina também já tinha sido demonstrada em estudos de hidropónica.

Assim, no final da experiência, nas 168 h, a percentagem de remoção dos 5 fármacos nos Leitos não plantados foram bastantes inferiores (SMZ - 55 %, DCF - 76%, NAP - 75%, CBZ - 82% e IBU - 84%) relativamente aos Leitos plantados (SMZ - 81 % , DCF- 96%, NAP - 92%, CBZ - 91% e IBU - 96%), , tendo a presença das plantas contribuído, direta ou indiretamente, com um acréscimo de entre 9 % (IBU) a 26%

(SMZ) para a eficiência de remoção destes fármacos. Assim, à semelhança do que se registou nos ensaios I e II, neste ensaio também se verificou uma maior remoção dos fármacos no Leito plantado, o que sugere que a contribuição da componente biota, especialmente as plantas, desempenham um papel bastante benéfico para o funcionamento do sistema, contribuindo para um aumento significativo da sua eficiência. A contribuição das plantas pode ser de possibilitar a adsorção fármacos às suas raízes, absorção e translocação para as partes aéreas, e/ou estimulação das populações microbianas que biodegradam os compostos.

Desta forma, pode-se concluir que Leitos que tenham na sua constituição plantas macrófitas têm uma eficiência superior em relação aos não plantados.

5.3.3.3. Resposta fisiológica e bioquímica das plantas ao stress abiótico

a) Determinação da TCR

Os valores de TCR foram calculados utilizando a equação de Hunt, utilizada também nos outros dois ensaios, e os resultados obtidos estão apresentados no gráfico da figura 41.

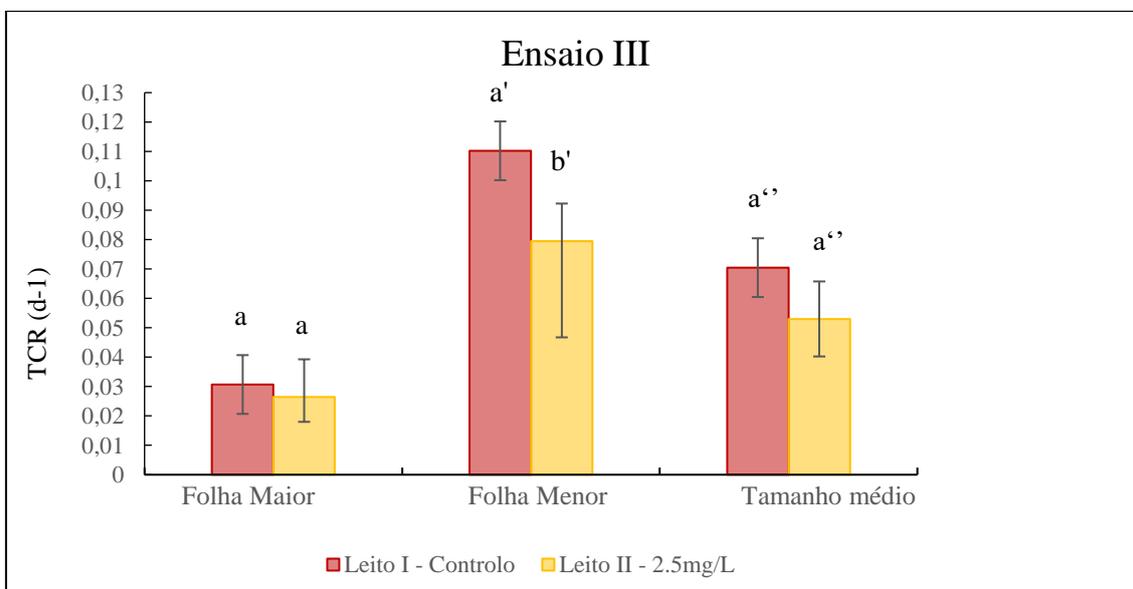


Figura 41 - Taxa de crescimento relativa média da folha maior, da menor e do crescimento médio das plantas dos leitos I e II ao fim de 168h de experiência (média \pm DP, $n = 6$). Diferentes letras significam valores significativamente diferentes para $P < 0,05$.

Da observação do gráfico 41, verifica-se que a TCR tanto da folha maior como da folha menor das várias plantas na presença dos fármacos (Leito II) é menor em média do que a das plantas controlo (sendo a diferença significativa no caso das folhas menores), pelo que se pode concluir que os fármacos presentes na solução inibem ou dificultam o seu crescimento, o que é sinal de alguma toxicidade, seguindo deste modo o mesmo comportamento que os outros ensaios anteriores.

À semelhança do que aconteceu nos outros ensaios, as diferenças nas TCR são mais acentuadas nas folhas menores (mais jovens) do que nas folhas maiores, podendo esta facto ser devido às diferentes fases de crescimento em que as folhas se encontravam e estão de acordo com o esperado. Assim na presença dos fármacos as plantas jovens cresceram em média menos cerca de 27,87 % do que nos controlos, enquanto as folhas maiores cresceram em média menos de 13,6 % do que nos controlos. É notório que a presença dos fármacos afetou mais as folhas jovens, podendo as plantas aqui estarem a exhibir alguns sinais de efeitos tóxicos causados pelos fármacos.

b) Determinação dos Pigmentos Fotossintéticos

De forma a avaliar os efeitos causados na *Typha* spp. pela sua exposição aos fármacos estudados neste ensaio, determinou-se a concentração da clorofila total ($a + b$), a e b e carotenóides nas plantas de *Typha* spp. A quantificação destes pigmentos determinados nas plantas expostas aos fármacos (Leito II) foi comparada com os valores obtidos nas plantas do controlo (Leito I), para os 0, 3 e 6 dias de exposição. A concentração de cada um dos pigmentos nas plantas para o Leito I e II encontram-se na Figura 42.

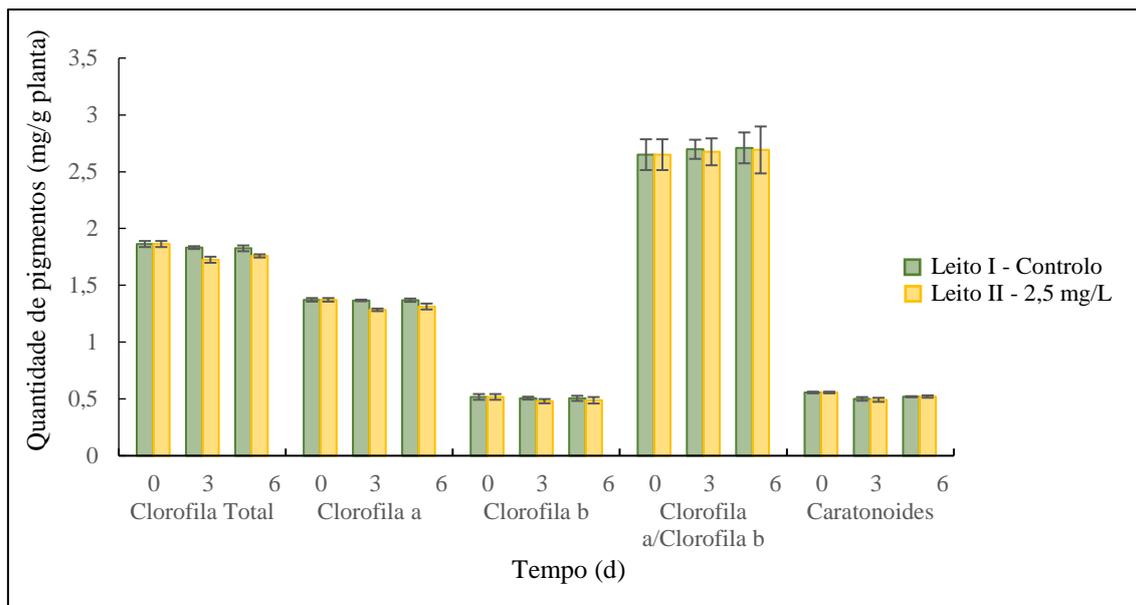


Figura 42 - Pigmentos fotossintéticos presentes na parte aérea da *Typha* spp. após 0, 3 e 6 dias de exposição, sujeita às concentrações de 0 (leito I) ou 2,5 mg/L dos fármacos em solução (leito II).

Comportamento semelhante aos dos ensaios I e II foi observado neste ensaio III. Logo no início da experiência aos 0 dias de exposição todos os pigmentos (clorofila total, clorofila a e b, clorofila a/clorofila b e carotenoides) permaneceram com concentrações idênticas entre as plantas do Leito I e as plantas do Leito II, tal como seria de esperar. No entanto, as concentrações destes pigmentos fotossintéticos após 3 e 6 dias de exposição, começaram a demonstrar uma inibição da sua síntese apresentando ligeiras diminuições em relação às plantas do controlo. No entanto, essas diferenças parecem ser ligeiramente menores ao fim de 6 dias, o que poderá indicar uma ligeira diminuição do efeito inibitório e recuperação das plantas. Em relação aos carotenoides as concentrações mantiveram-se praticamente constantes nos dois Leitos (controlo e com fármacos) em todos os dias de exposição a que estiveram sujeitos.

c) Determinação da atividade enzimática

Os mesmos procedimentos utilizados para os ensaios I e II, foram aplicados para este ensaio para determinar as atividades enzimáticas da SOD, CAT e GPX nas folhas das plantas *Typha* spp. Os valores obtidos e que estão apresentados na figura 43, foram comparados com os valores das atividades determinados nas plantas do controlo (Leito I) para os tempos 0, 3 e 7 dias de exposição das plantas aos fármacos.

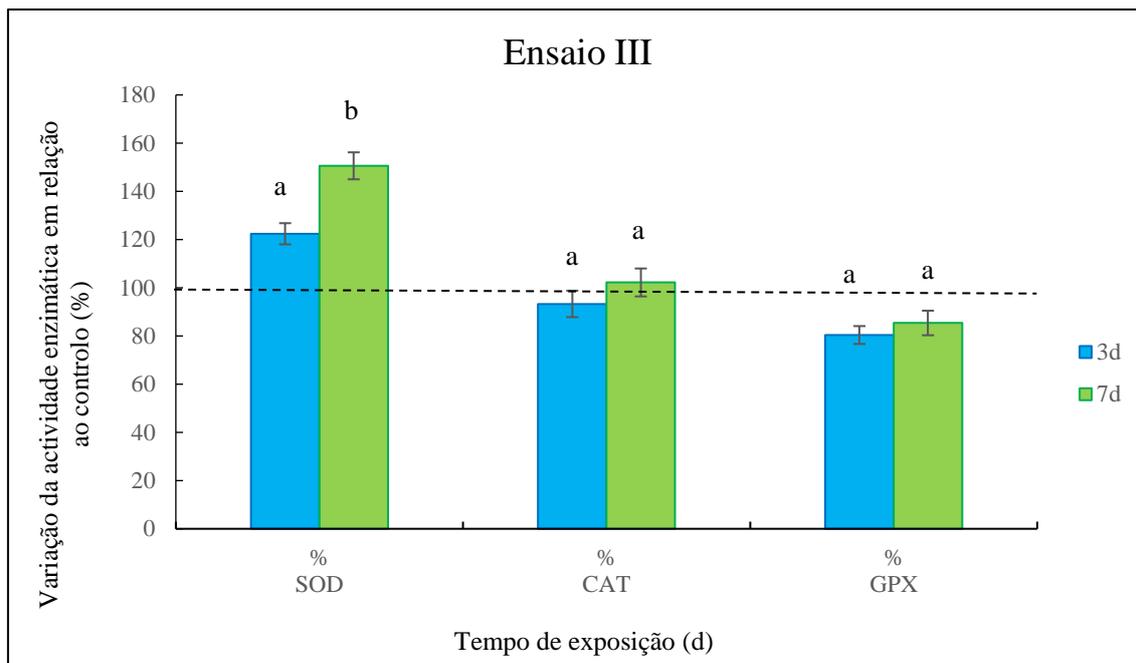


Figura 43 - Atividade enzimática da SOD, CAT e GPX na parte aérea da *Typha* spp. aos 0, 3 e 7 dias de exposição, sujeita às concentrações de 0 (leito I) e 2.5 mg/L de fármacos em solução (leito II) (média \pm DP, $n=9$). Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes para $P<0,05$.

Ao longo de 3 dias de experiência, verificou-se um aumento da atividade da SOD nas plantas do Leito II relativamente às do Leito I (controlo), com maior incidência aos 7 dias onde atinge um aumento ainda mais significativo. Este aumento da atividade enzimática da SOD pode ser um parâmetro indicativo da capacidade da planta em lidar com a presença dos fármacos, em resposta ao stress, combatendo desta forma o aumento da quantidade de ROIs.

A atividade da CAT ao fim de 3 dias de exposição ao fármaco sofreu uma diminuição nas plantas do Leito II relativamente às do Leito I, podendo esta alteração ser indicativa de inibição desta enzima em resultado da exposição aos fármacos. Porém, ao fim de 7 dias observa-se um aumento na atividade enzimática da CAT nas plantas do Leito II comparativamente ao controlo, mostrando-se a planta, assim, capaz de tolerar a presença dos fármacos presentes na solução e reagir à situação de stress, cujos efeitos foram observados no início dos ensaios.

Relativamente à resposta enzimática da GPX, causada pela exposição das plantas aos fármacos, observou-se, através da figura Z, uma diminuição da atividade da GPX nas folhas das plantas expostas aos fármacos, em particular ao fim de 3 dias de contato,

parecendo haver já alguma recuperação dessa atividade ao fim de 7 dias de exposição. Deste modo, a exposição aos fármacos parece causar algum stress à *Typha* spp., mas ao fim de 7 dias, as plantas parecem começar a ser capazes de tolerar a presença desses fármacos e a reagir, assim, à situação de stress.

Note-se, no entanto, que tal como nos ensaios anteriores, os aumentos de atividade da CAT e da GPX dos 3 para os 7 dias, dadas as proximidades das médias e as grandezas dos desvios padrões, não podem ser considerados estatisticamente significativos.

5.3.4. Evolução da eficiência dos Leitos na remoção dos vários fármacos

Ao longo dos três ensaios efetuados ao longo do tempo nestes microcosmos de LCMs, foi observada a evolução das eficiências de remoção dos fármacos que se podem constatar na Tabela 15.

Tabela 15 – Evolução das eficiências de remoção dos fármacos ao longo dos três ensaios

% remoção ao fim de 168h						
Fármacos	Ensaio I		Ensaio II		Ensaio III	
	L.Plantados	Matriz	L.Plantados	Matriz	L.Plantados	Matriz
FUR	71,3	37,6	72,9	37,9	-----	-----
SMZ	76,1	53,2	78,5	54,2	81,1	55,4
DCF	91,1	67,8	95,6	73,8	96,4	76,4
NAP	-----	-----	90,9	72,1	91,9	75,3
CBZ	-----	-----	-----	-----	90,9	81,5
IBU	-----	-----	-----	-----	95,8	83,9
Condições de ensaio						
T_{média ar} (° C)	21,3		18,6		22,3	
Humidade atmosférica (%)	49,7		49,0		43,5	
Evapotranspiração (mm/d)	11,5	3,5	15,1	3,6	21,6	4,1
Densidade média das plantas (planta/m²)	87		114		134	
pH da solução	6,9	8,5	7,0	7,7	7,0	7,4

Pode-se constatar pela tabela 15 que a % de remoção dos fármacos pelos leitos plantados em todos os ensaios foi elevada ($> 70\%$), sendo a FUR o fármaco menos removido e o DCF aquele com maior remoção. Esta diferença pode estar relacionada com a diferença de solubilidades do DCF em relação à FUR (esta é muito mais solúvel em água), o que contribuiu favoravelmente para a adsorção do DCF, nos diferentes constituintes da matriz.

A retenção na matriz tem o papel de maior contribuição, sendo responsável pela maior parte da remoção, tendo também as plantas desempenhando um papel bastante benéfico para o funcionamento do sistema, contribuindo direta ou indiretamente, com um acréscimo de remoção dos fármacos: Ensaio I (23 % a 34 %); Ensaio II (19 % a 35 %) e Ensaio III (9 % a 26 %).

Observou-se também que a % de remoção nos leitos plantados aumentou de ensaio para ensaio. Este aumento da remoção é parcialmente devido a um aumento da retenção pela matriz, mas também por uma maior contribuição das plantas, motivada por maiores densidades de plantas nos leitos e maiores taxas de evapotranspiração, conforme se pode verificar na tabela 15.

De modo a obter a maior eficiência de remoção dos fármacos nos LCMs, torna-se fundamental avaliar a influência do tempo de retenção na eficiência de remoção dos poluentes nos leitos, o que implica ter conhecimento do comportamento cinético dos processos de remoção.

Assim, efetuou-se o estudo cinético de remoção dos fármacos em estudo para os diferentes ensaios e leitos. Na figura 44 estão apresentados os perfis cinéticos determinados nos diferentes ensaios/leitos para a FUR.

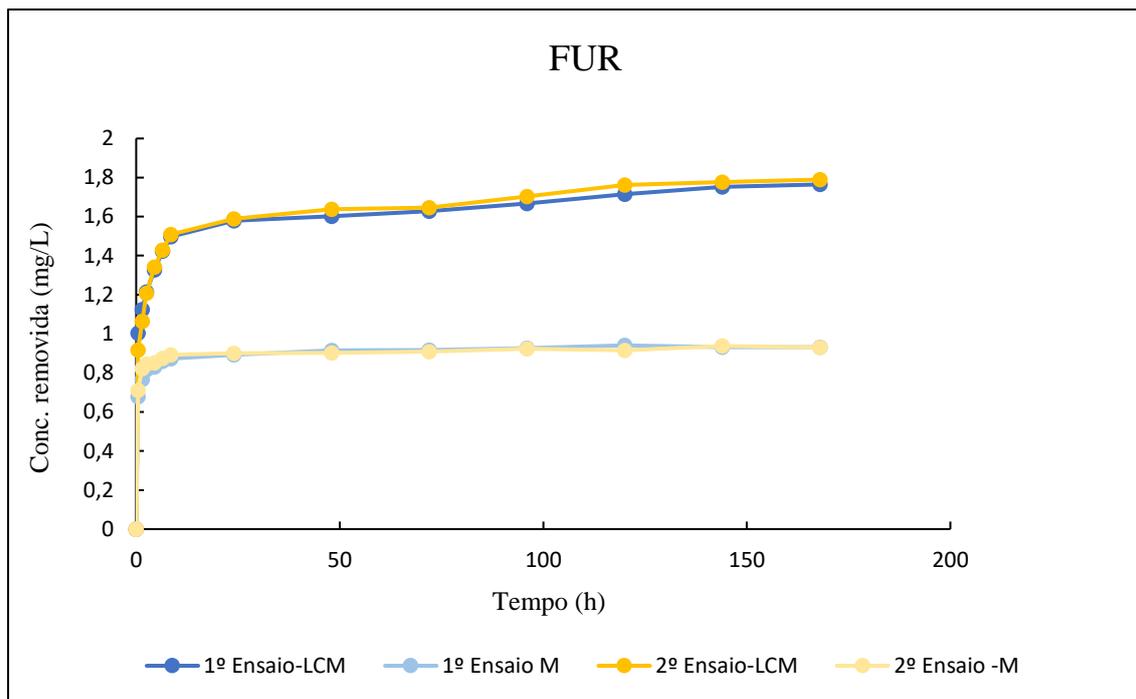


Figura 44 - Cinética de remoção da FUR nos diferentes ensaios/ Leitos.

Comparando as eficiências de remoção da FUR nos Leitos constituídos por matriz + plantas e nos Leitos constituídos apenas por matriz, pode-se observar que a cinética é caracterizada por duas etapas: uma etapa inicial de remoção muito rápida durante as primeiras 8,5h horas de contacto, em que se obtêm remoções de cerca de 60% e 36%, nos leitos II e III respetivamente. Estas observações sugerem que a remoção inicial, mais rápida, é devida essencialmente a processos a ocorrerem por contacto direto com a superfície da matriz, provavelmente através de adsorção (elevada porosidade da matriz, em particular da vermiculite, que devido à sua estrutura laminar, disponibiliza uma grande área superficial facilmente acessível para a adsorção dos fármacos), embora nos Leitos plantados deva, também, ter ocorrido uma forte adsorção às raízes das plantas que na altura da realização dos ensaios apresentavam um sistema radicular muito desenvolvido. Este último processo deverá ser o principal responsável pela diferença observada na percentagem de remoção da FUR, na primeira meia hora de contacto, entre os Leitos não plantados, que corresponde a uma taxa menor de remoção.

Posteriormente, verifica-se uma etapa de remoção mais lenta onde continua a ocorrer uma diminuição da quantidade da FUR na solução. A remoção aqui é mais lenta, pois, a adsorção mais extensa à superfície interna dos poros microscópicos, principalmente da

LECA, implica um processo de difusão, mais lento, para o seu interior. Adicionalmente, pode ter ocorrido a biodegradação do composto pelos microrganismos e/ou absorção pelas plantas, mas ambos os processos são relativamente lentos.

Verifica-se que a remoção da FUR para o Leito constituído por matriz + planta, aumentou continuamente durante todo o período da experiência nos dois ensaios (I e II) até atingir o equilíbrio. A partir das 120h o aumento da remoção é já muito pequeno, podendo-se considerar estar-se a partir deste tempo numa situação de equilíbrio ou muito próximo dele.

Já no Leito contendo somente a matriz, nota-se que os perfis cinéticos da FUR são muito semelhantes para os ensaios I e II, tendo sido atingido o equilíbrio ao fim de 48h.

Deste modo, verifica-se que ao fim de 168h de contacto, a matriz apenas é responsável, através de processos de adsorção, por uma remoção de aproximadamente 38% da quantidade inicial da FUR presente em solução para os ensaios I e II. E nos Leitos plantados, a percentagem de remoção da FUR situa-se a volta de 71% e de 73% respetivamente para os ensaios I e II. Com base nestes valores, pode-se concluir então que Leitos que tenham na sua constituição plantas macrófitas têm uma eficiência superior, as quais contribuem com 35 % para uma remoção adicional de fármacos. Estas plantas contribuem assim diretamente com absorção de fármacos para o seu interior, adsorção às raízes e/ou estímulos ao desenvolvimento da população microbiana e, indiretamente, através da libertação de enzimas entre os exsudados que também podem ter um papel importante na remoção de compostos.

Comparando as eficiências de remoção dos fármacos entre os ensaios I e II, observa-se que a matriz mantém a sua capacidade de remoção, já que os resultados obtidos nos Leitos não plantados nos dois ensaios são praticamente idênticos. Nos Leitos plantados verifica-se um ligeiro aumento na taxa de remoção, apesar de se irem acrescentando novos fármacos nos novos ensaios. Isto parece mostrar que as plantas se vão tornando mais eficientes na remoção dos fármacos nos novos ensaios, sendo sugestivo de que os sistemas plantados se vão gradualmente adaptando à exposição aos fármacos e tornando-se mais capazes de lidar com eles.

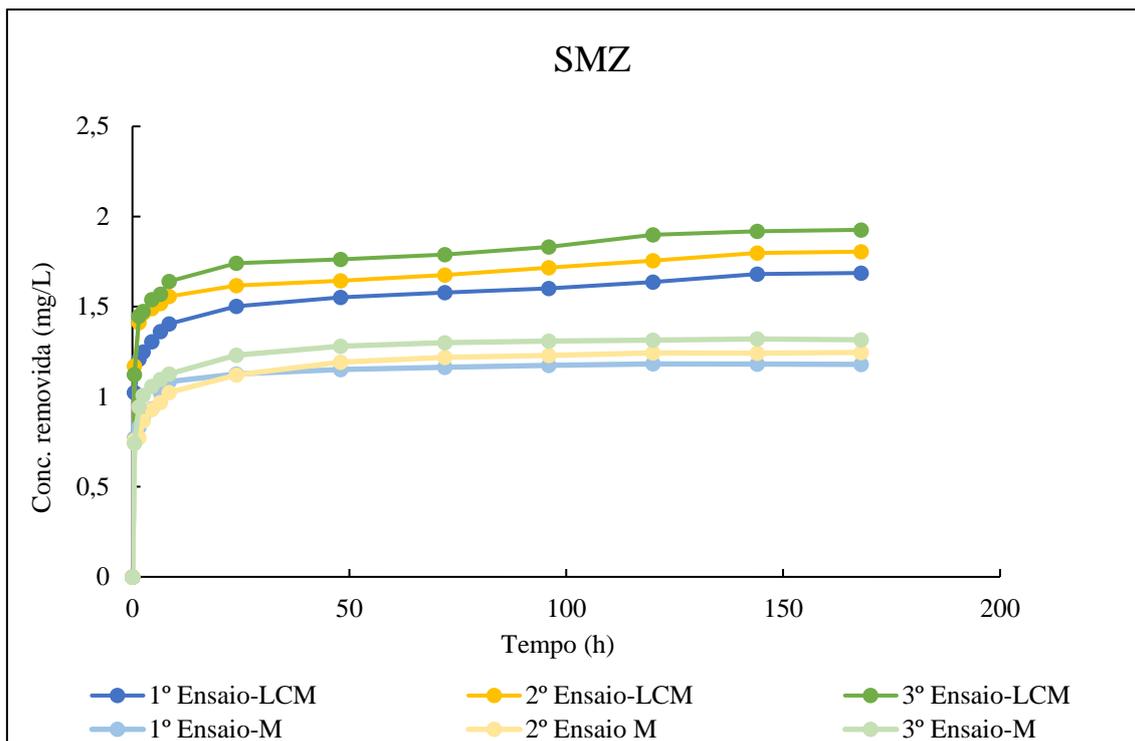


Figura 45 - Cinética de remoção da SMZ nos diferentes ensaios/ Leitos.

Em relação ao SMZ, como é possível verificar na figura 45, as cinéticas de remoção tanto no Leito plantado como no Leito não plantado, são muito rápidas, pois ao fim de meia hora, a quantidade removida deste composto durante os três ensaios, situava-se acima dos 46% da remoção e 32 % respectivamente, o que pode dever-se à adsorção do SMZ na superfície da matriz mais facilmente acessível, embora nos Leitos plantados deva, também, ter ocorrido alguma adsorção às raízes das plantas.

Numa fase posterior, observou-se uma fase mais lenta de remoção do fármaco nos dois Leitos (plantados e não plantados) em todos os ensaios. Esta remoção mais lenta pode ter ocorrido através dos processos de biodegradação do SMZ pelos microrganismos, ou também por adsorção adicional às porosidades internas dos materiais da matriz de suporte, o que implica um processo de difusão para o interior das estruturas da LECA e da Vermiculite que é mais lento. Adicionalmente, nos Leitos plantados poderá ter ocorrido absorção pelas plantas.

Assim perante essa fase lenta de remoção, nota-se que ao fim da experiência ainda não tinha sido atingido o equilíbrio para os processos de remoção do SMZ no Leito plantado. Entretanto, nos Leitos só com matriz, o equilíbrio foi atingido por volta 48 a 72 h, não

havendo deste modo aumentos significativos na remoção do fármaco a partir deste tempo.

Assim sendo, a remoção de SMZ no Leito plantado é bastante superior ao verificado nos Leitos apenas com matriz ao longo do período de realização da experiência para os três ensaios, pelas razões já anteriormente explicadas. Comparando a taxa de remoção nos 3 ensaios, verifica-se que, tanto para o Leito plantado como para o não plantado, o 3º ensaio é o que apresenta maior de eficiência de remoção.

Quando comparamos o desempenho de remoção nos três ensaios é possível verificar um aumento da eficiência de remoção à medida que se foram realizando novos ensaios. Esta melhoria poderá estar associada a uma capacidade das plantas se adaptarem aos fármacos e à sua toxicidade e se irem tornando mais eficientes na sua remoção. Em relação à matriz, embora haja uma variação pequena no aumento da eficiência de remoção, os valores estatisticamente não são significativamente diferentes, pelo que a matriz mantém aproximadamente a mesma eficiência de remoção ao longo dos 3 ensaios.

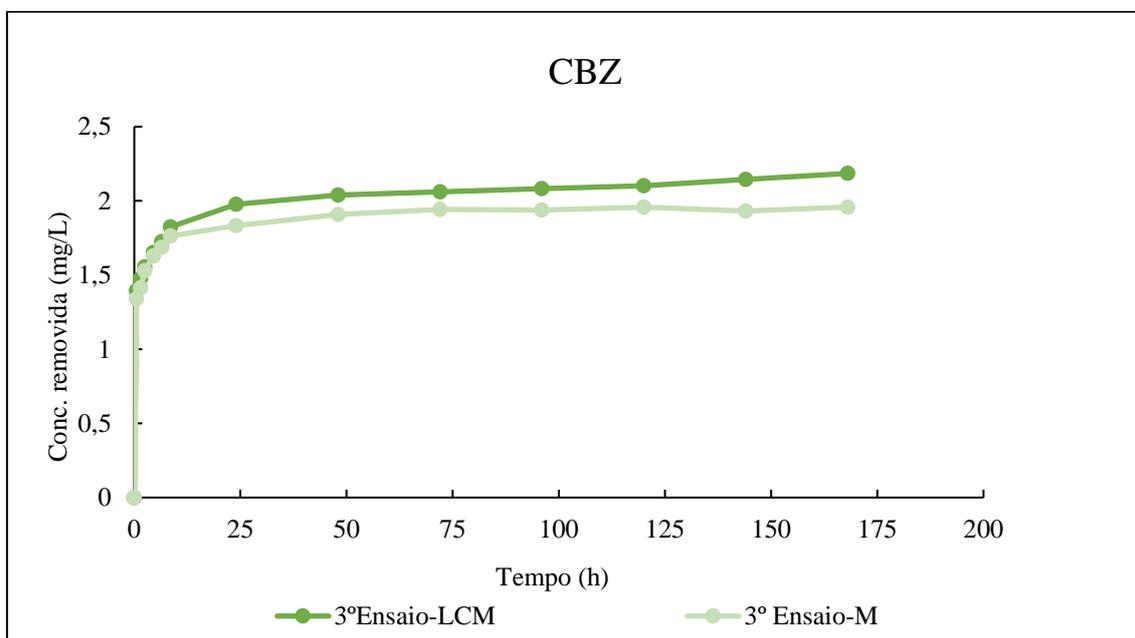


Figura 46 - Cinética de remoção da CBZ nos diferentes ensaios/ Leitos.

No caso da CBZ (a qual, como se disse, foi estudada apenas no 3º Ensaio), verifica-se através da figura 46, uma cinética bastante rápida logo nos tempos iniciais (até às 8,5 h) não se observando nesse período diferenças significativas nas eficiências de remoção da

CBZ no Leito plantado e no Leito só com a matriz. Foram alcançadas em ambos os Leitos remoções elevadas, sendo removida mais de metade da quantidade da carbamazepina nessa etapa. A razão poderá estar relacionada com a natureza da matriz de suporte e o tipo de interações entre esta e a carbamazepina.

É de notar que ao fim ao de 24 - 48 h os sistemas atingiram o equilíbrio tanto para o Leito plantado como para o não plantado respetivamente, pois não existem variações significativas na percentagem de remoção da carbamazepina a partir deste tempo. Nesta fase a cinética é mais lenta.

No final da experiência, a percentagem de remoção da CBZ no Leito plantado foi superior ao do leito não plantando, apresentando cerca de 90 % e 81 % taxa de remoção respetivamente. Foi concluído deste modo, que Leitos que tenham na sua constituição plantas macrófitas de *Typha* conseguem uma eficiência superior na remoção deste fármaco frequentemente reportado como recalcitrante.

Como se pode observar pelo gráfico da Figura 47, durante o tempo em que decorreu o ensaio (168 horas), a matriz, através do processo de adsorção, é responsável pela remoção de cerca de 72% e 75 % do NAP para os ensaios II e III, respetivamente, enquanto para o Leito Plantado, a quantidade removida deste composto ao fim dos 168h foi de 91 % para o ensaio II e 92 % para o ensaio III. Verifica-se, portanto, que em ambos os leitos, plantados ou só com matriz, as eficiências de remoção do NAP aumentam do ensaio II para o ensaio III.

A cinética aqui tem um comportamento semelhante aos outros fármacos, com uma fase inicial bastante rápida (até as 8.5h) e depois é caracterizada por uma fase mais lenta com poucas variações na percentagem de remoção do composto nos dois ensaios. Verifica-se ainda que os Leitos que tenham na sua constituição plantas macrófitas têm uma eficiência superior em relação ao leito apenas com a matriz.

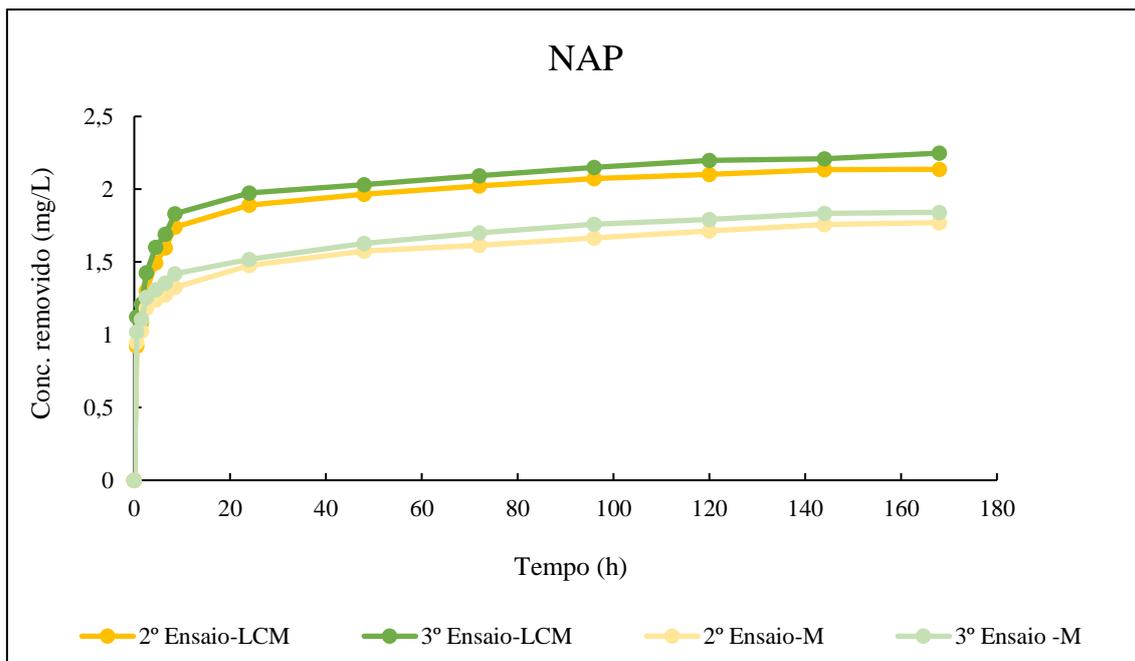


Figura 47 - Cinética de remoção da NAP nos diferentes ensaios/ Leitos.

Em relação à cinética de remoção do DCF nos diferentes ensaios realizados (figura 48), observa-se que é na fase inicial até às 8,5 horas, que o processo de remoção é mais rápido, e que a evolução vai -se tornando mais lenta ao longo do tempo até atingir o equilíbrio por volta das 120h.

A eficiência da remoção deste composto vai aumentando de ensaio para ensaio, tendo o ensaio 3 a maior de taxa de remoção em comparação com os restantes. Isto pode dever ao facto de que nos Leitos não plantados, possivelmente por haver mais materiais finos e, eventualmente, biofilmes para adicional adsorção e biodegradação e nos Leitos plantados, para além destas razões, maior desenvolvimento das raízes que aumenta a capacidade de adsorção dos mesmos, e por outro lado, maior robustez das plantas e melhor tolerância, permitindo maiores absorções pelas plantas.

Comparando as eficiências de remoção do DCF nos diferentes ensaios, novamente salta em evidência a contribuição das plantas para o aumento da percentagem de remoção do DCF, com percentagens de remoção nos Leitos plantados com *Typha* de 91%, 95 % e 96% respetivamente para os ensaios I, II e III enquanto nos Leitos só com a matriz a percentagem situava na 68%, 74% e 76% para ensaio I II e III respetivamente.

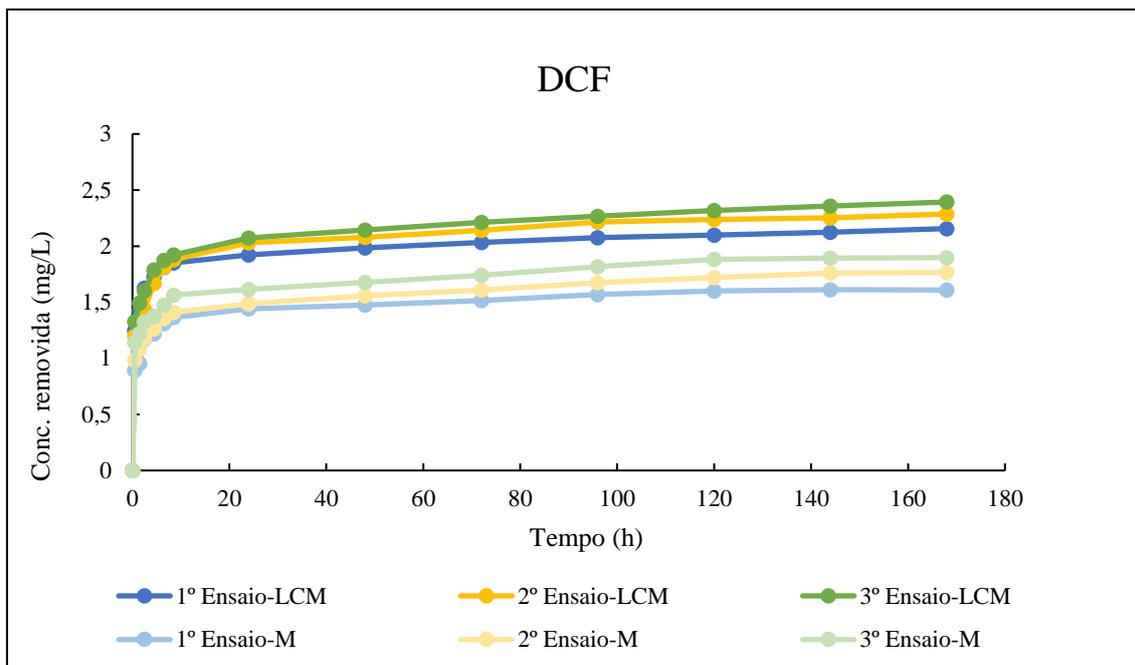


Figura 48 - Cinética de remoção da DCF nos diferentes ensaios/ Leitos.

No que se refere ao IBU, verifica-se através do gráfico da figura 49, que são nas primeiras de contato (até 8.5h) que ocorre a primeira fase, caracterizada por um pico de remoção bastante rápida do fármaco, devido provavelmente à adsorção do composto na superfície da matriz mais facilmente acessível, embora nos Leitos plantados deva também ter ocorrido alguma adsorção às raízes das plantas. Depois desta fase, o crescimento continua a ocorrer, mas de uma forma lenta em todos os ensaios, atingindo assim o seu equilíbrio por volta das 96h.

Ao fim da experiência (168h), constata-se que a matriz foi responsável, através de processos de adsorção, por uma percentagem de remoção de aproximadamente 84% do IBU, enquanto no Leito plantado com *Typha* a percentagem de remoção era bem superior, atingindo assim os 96%. A semelhança dos outros compostos em estudo, verifica-se que a presença de plantas no leito contribui para uma maior eficiência de remoção no sistema.

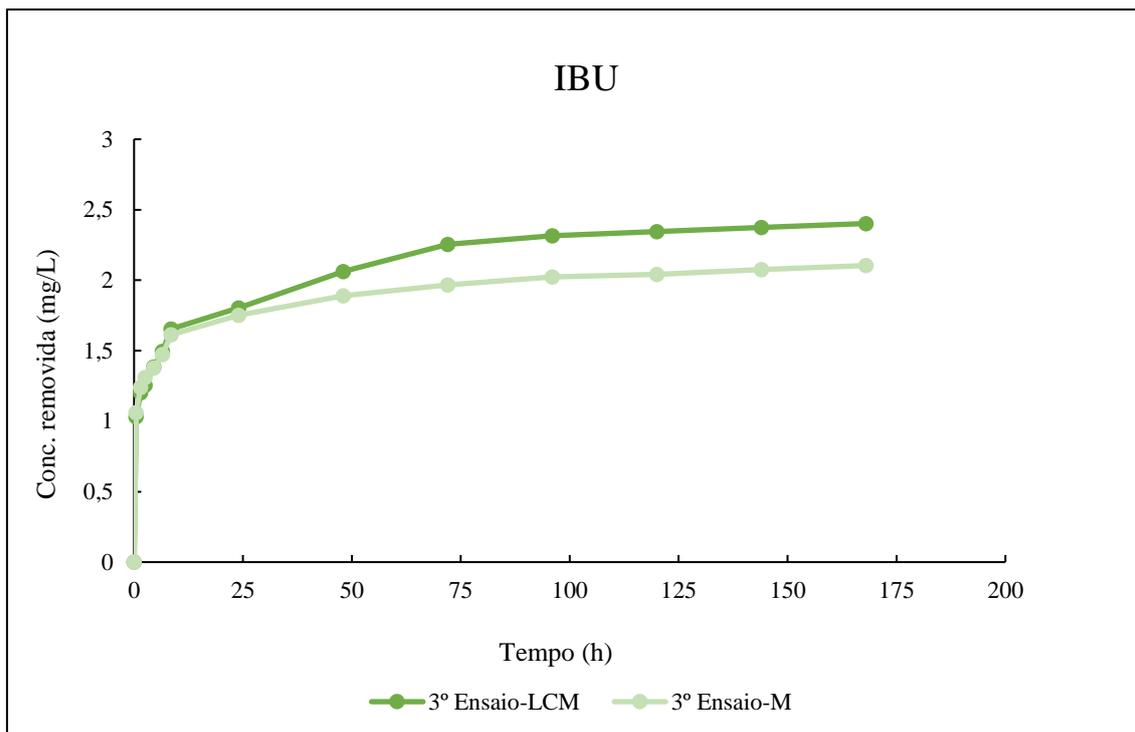


Figura 49 - Cinética de remoção do IBU nos diferentes ensaios/ Leitos.

Em relação à taxa de crescimento relativo (TCR) da folha maior e da menor, é possível verificar na figura 50, que à medida que vai se alargando o espectro dos fármacos testados (tanto quanto ao número como quanto à sua variedade), a TCR tanto da folha maior como da folha menor diminui de ensaio para ensaio, pelo que se pode inferir que os fármacos causam algum tipo de efeito nas plantas, levando deste modo a um atraso de crescimento ou inibição. Podemos assim supor que a carga tóxica para as plantas se vai tornando crescente, o que poderá ser devido ao aumento das quantidades totais de fármacos, mas também possivelmente por alguns dos novos fármacos introduzidos em novos ensaios terem maior toxicidade do que os de ensaios anteriores.

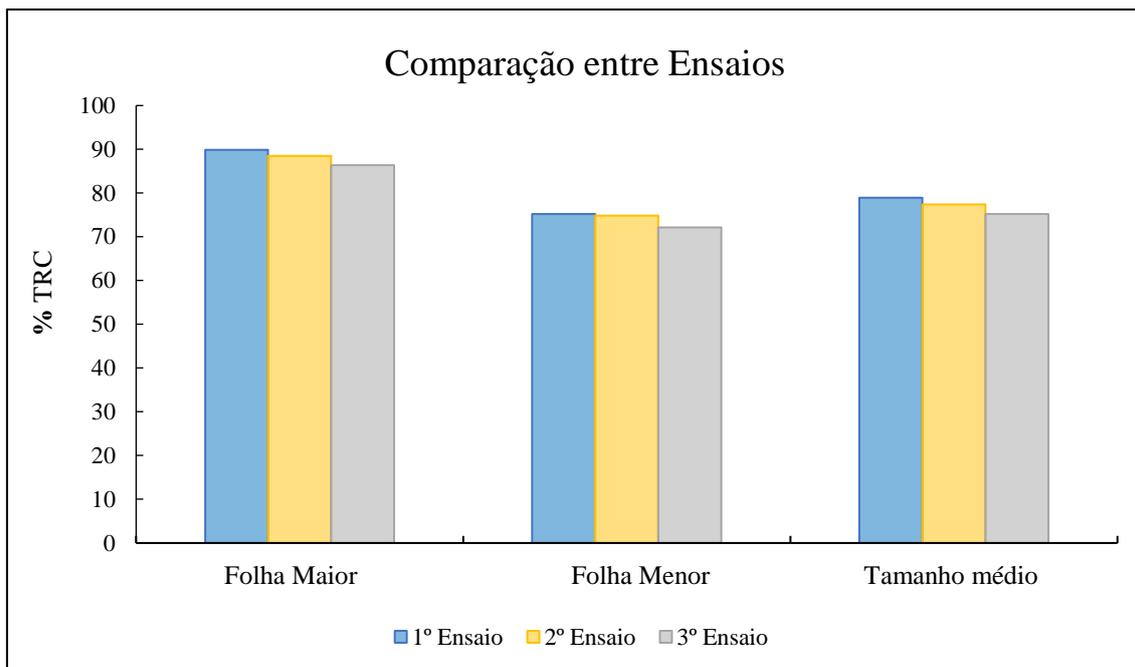


Figura 50 - Comparação entre ensaios da TCR da folha maior e da menor.

No que concerne aos pigmentos fotossintéticos, observa-se nas figuras 51 e 52 que ao fim de 3 e 6 dias de exposição dos Leitos plantados aos fármacos parece haver uma inibição na síntese dos pigmentos logo no ensaio I (com a exceção a Clorofila a/Clorofila b e carotenoides). Os carotenoides por terem na sua estrutura ligações duplas conjugadas, podem desempenhar ação antioxidante. Já nos ensaio II e III observa-se menores efeitos de inibição, o que poderá ser sugestivo de que o meio dos sistemas plantados se está a tornar mais adaptado e tolerante aos efeitos tóxicos produzidos pelos fármacos, isto apesar de a carga tóxica estar a ser aumentada gradualmente ao longo dos vários ensaios.

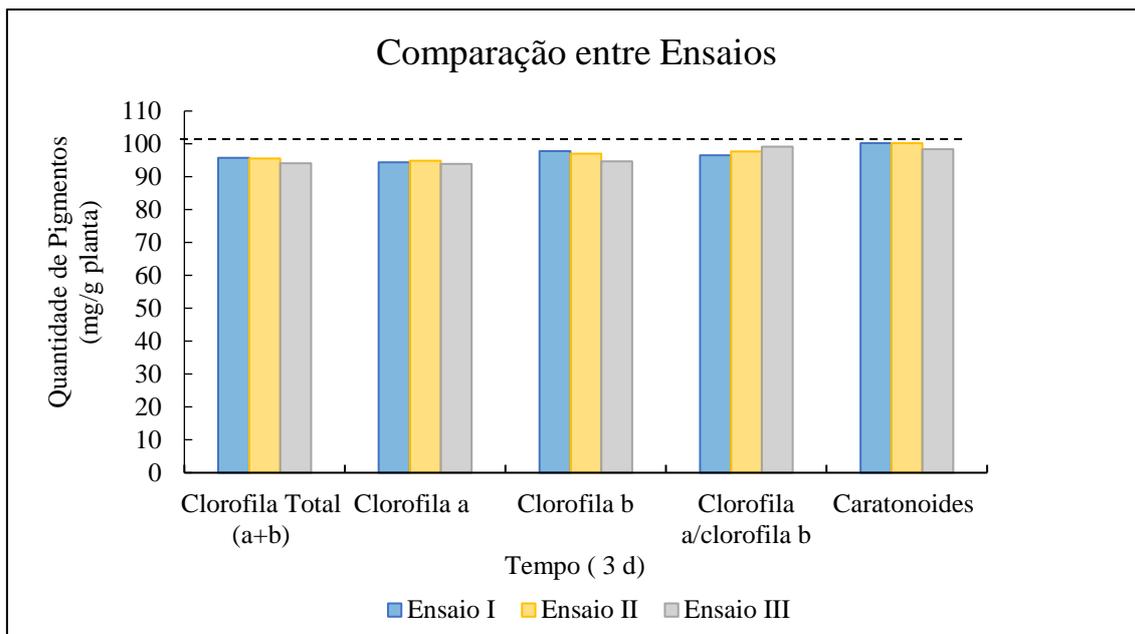


Figura 51 - Comparação entre ensaios dos pigmentos fotossintéticos ao fim de 3 dias.

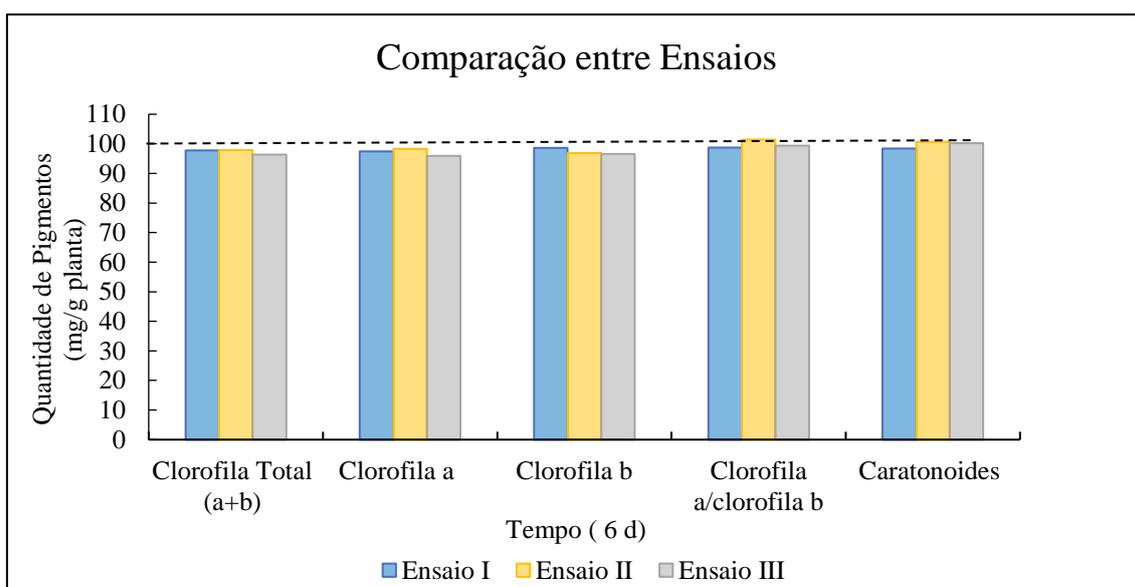


Figura 52 - Comparação entre ensaios dos pigmentos fotossintéticos ao fim de 6 dias.

Observa-se que nos três ensaios, a atividade enzimática da SOD (figura 53) aumenta de uma forma significativa nas plantas expostas aos fármacos comparativamente à do controlo, demonstrando, deste modo, que o radical superóxido está a ser convertido em H_2O_2 . Verifica-se que a atividade da SOD, a primeira linha do mecanismo enzimático de defesa antioxidante contra a produção excessiva de ROS, foi fortemente estimulada pela presença dos fármacos e à medida que ia se diversificando e aumentando o número dos fármacos em contacto com as plantas, a atividade da SOD foi-se tornando

significativamente maior, o que seria a alteração esperada dado o aumento da carga tóxica e consequentemente aumento de produção de ROS. Esta evolução ao longo dos vários ensaios mostra o papel ativo desta enzima nos mecanismos de defesa antioxidante, sendo que com o agravamento das condições de toxicidade não se verificou uma perda de eficiência ou até de inibição desta enzima, tendo se mostrado capaz de lidar de modo adequado com as condições de cada um dos ensaios.

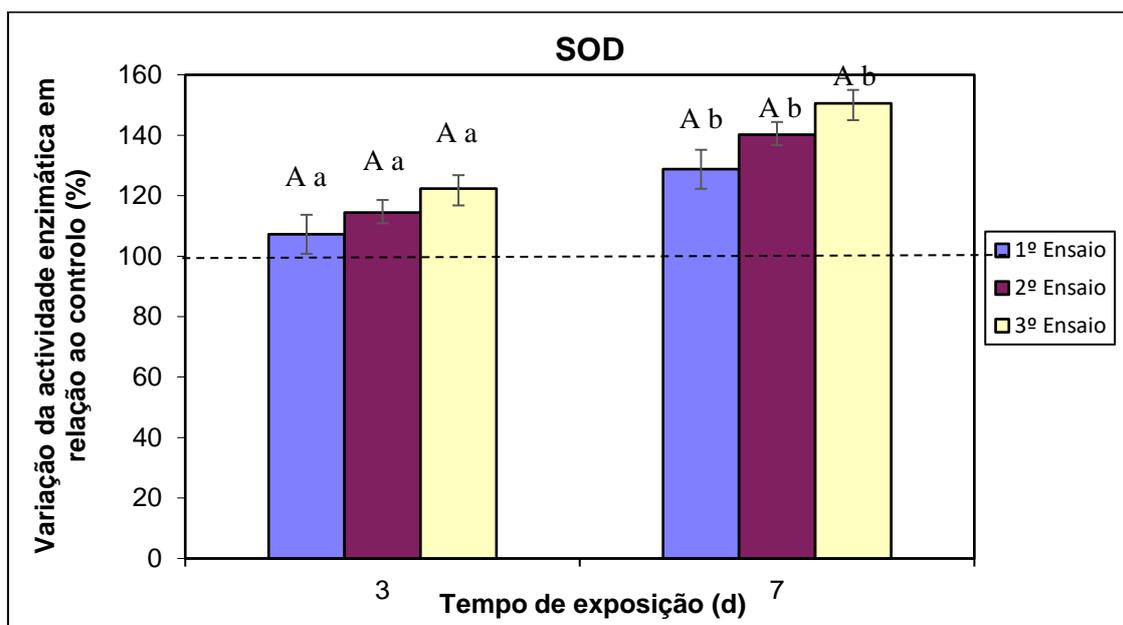


Figura 53 - Atividade enzimática do SOD (média \pm DP, $n=9$). Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes para $P<0,05$.

Por outro lado, em relação às restantes enzimas estudadas do sistema enzimático antioxidante, a CAT e a GPX, notou-se já alguns efeitos negativos que parecem relacionados com a toxicidade dos fármacos, os quais causaram inibição nestas duas enzimas (figura 54 e 55).

Assim, relativamente à CAT (figura 54), verifica-se o referido efeito de inibição da atividade desta enzima, sobretudo no período inicial de cada ensaio, mas que de ensaio para ensaio há um aumento da atividade enzimática desta enzima (ou seja, a inibição inicial vai-se tornando menos pronunciada). Este facto provavelmente poderá estar associado com a crescente atividade, de ensaio para ensaio, da enzima SOD que verificamos anteriormente, a qual terá originado a um crescimento mais rápido da concentração de H_2O_2 , o que, por sua vez, poderá ter induzido mais cedo a reação da enzima CAT com o crescimento da sua atividade após um efeito inicial de inibição da

enzima que, assim, terá sido mais curto. Este resultado reforça o papel importante que esta enzima desempenha aquando do controle dos níveis de H_2O_2 que é produzido em situações de stress, fazendo diminuir os danos oxidativos que estes possam provocar.

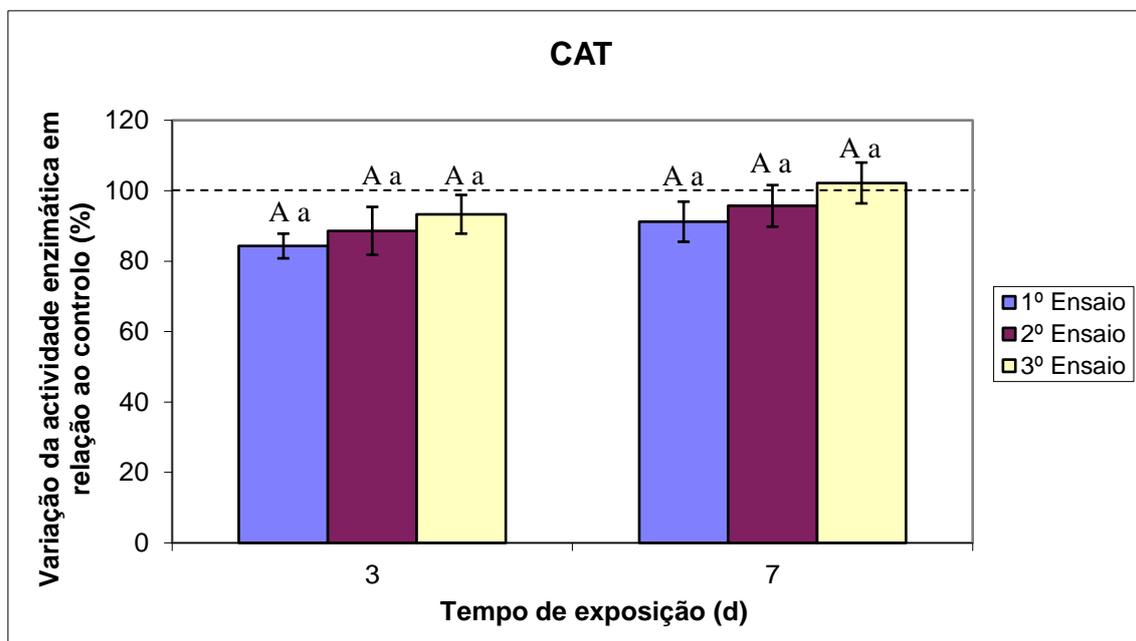


Figura 54 - Atividade enzimática da CAT (média \pm DP, $n=9$). Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes para $P<0,05$.

Na atividade enzimática da enzima GPX (figura 55), a qual sofreu um efeito de inibição inicial tal como se observou para a CAT e que já foi discutido anteriormente, não se observaram, contudo, diferenças significativas entre os três ensaios, ocorrendo apenas uma ligeira diminuição da atividade à medida que se iam diversificando os fármacos nos respetivos ensaios. Uma hipótese de explicação poderá ser que, no caso desta enzima, existiu fortuitamente um maior equilíbrio entre, por um lado, o efeito inibitório da carga tóxica crescente dos fármacos ao longo dos ensaios e, por outro, o efeito estimulante da produção de H_2O_2 pela atividade crescente da SOD, tal como se verificou anteriormente.

Assim, estes dois efeitos opostos poderão neste caso em particular ter sido de magnitude idêntica, o que terá levado a um certo cancelamento de ambos os efeitos e traduzindo-se numa aparente constância do comportamento da enzima de ensaio para ensaio.

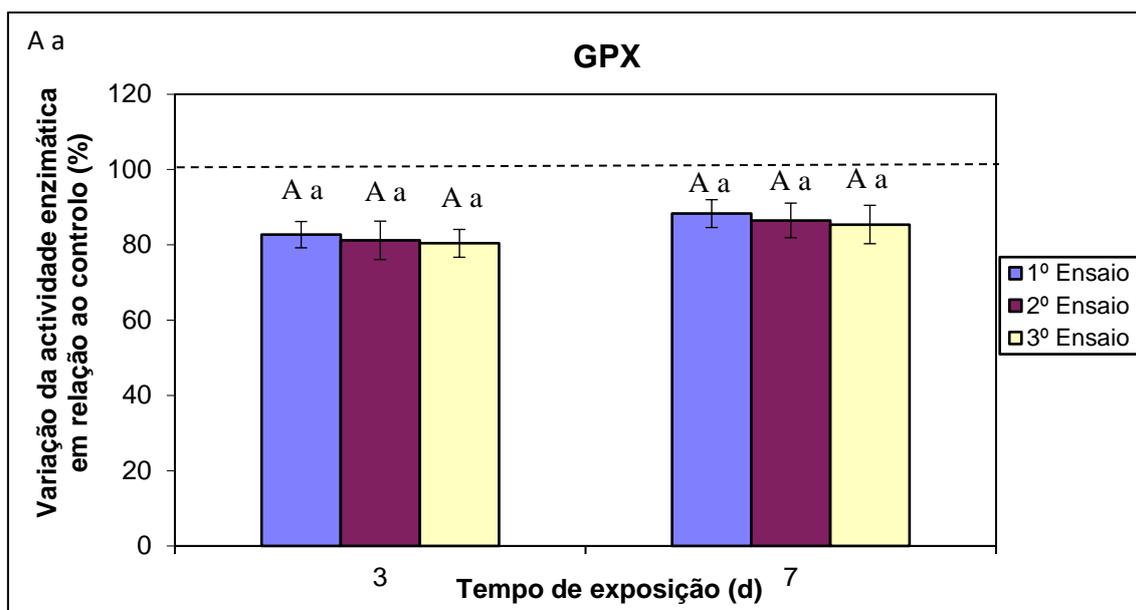


Figura 55 - Atividade enzimática da GPX (média \pm DP, $n=9$). Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes para $P<0,05$.

Em suma, ao longo destes três ensaios as plantas de *Typha* spp. parecem ter sido capazes de lidar com os efeitos tóxicos causados pelos fármacos e ser tolerantes à sua presença e constata-se que ao fim do terceiro ensaio, as plantas parecem ir tornando-se cada vez mais resistentes e a reagir, assim, à situação de crescente stress cujos efeitos foram observados desde o início dos ensaios. Perante a variedade dos compostos e pela quantidade que se foi adicionando nos ensaios, parece que as plantas estão a conseguir ativar as enzimas no combate a situações de stress, reagindo melhor ao longo do tempo.

5.4. Avaliação da fibra de coco como potencial material para matriz de suporte

Na tentativa de melhorar as propriedades da matriz de suporte utilizada nos LCMs, fez-se um estudo das propriedades de adsorção da fibra de coco. Escolheu-se este material em especial por ser um subproduto das atividades agrícolas em Cabo Verde. Sendo este material de baixo custo, por ser um material natural e facilmente reciclável, com utilidade em várias áreas, além de ser produzido em grandes quantidades em Cabo Verde, apresenta-se como uma hipótese interessante para o tratamento de efluentes. É por estas razões que se decidiu avaliar a capacidade de adsorção da fibra de coco na remoção dos fármacos testados e sua possível utilização como componente da matriz de suporte no tratamento de águas residuais.

Assim, realizou-se um estudo de adsorção pela fibra de coco de uma solução aquosa da mistura de três fármacos, SMZ, CBZ e NAP, com uma concentração de 2 mg/L da cada dos fármacos, cujos resultados se encontram apresentados na figura 56 e na figura 57.

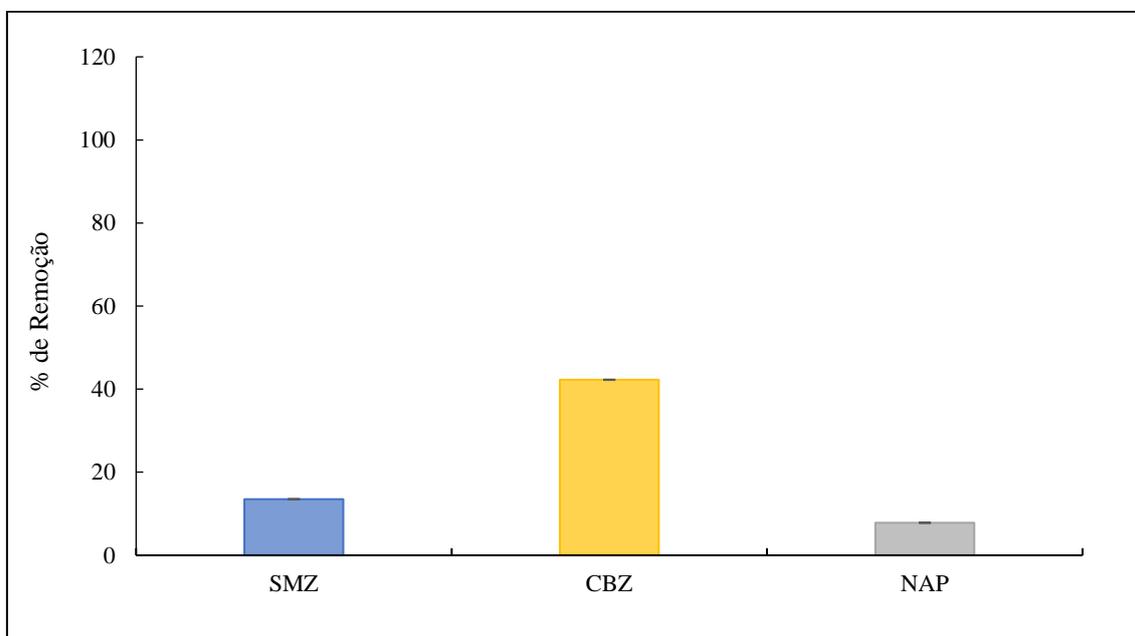


Figura 56 - Percentagem de remoção de SMZ, CBZ e NAP ao fim de 48h de contato.

Neste estudo verificou-se que a CBZ é o fármaco onde se obteve uma maior taxa de remoção na presença da fibra de coco (Fig. 56), apresentando, deste modo, 42 % de remoção ao fim de 48h de contato. Esse fato pode ser justificado pela maior superfície de contato apresentada pela fibra de coco à CBZ, apresentando uma interação do tipo van der Waals, de tal modo que permite uma maior adsorção a este composto (que é apolar) em detrimento de SMZ e NAP, que são compostos polares.

Deste modo, concluiu-se que a fibra de coco pode contribuir para a remoção de alguns micro-poluentes orgânicos tais como os fármacos contidos na solução testada, embora alguns dos fármacos também tenham apresentado valores de remoção baixos e, portanto, menor afinidade pela fibra de coco do que é a da carbamazepina.

Na Figura 57 é apresentado o perfil cinético da remoção dos fármacos em estudo, SMZ, CBZ e NAP, em função do tempo de contacto com a fibra de coco.

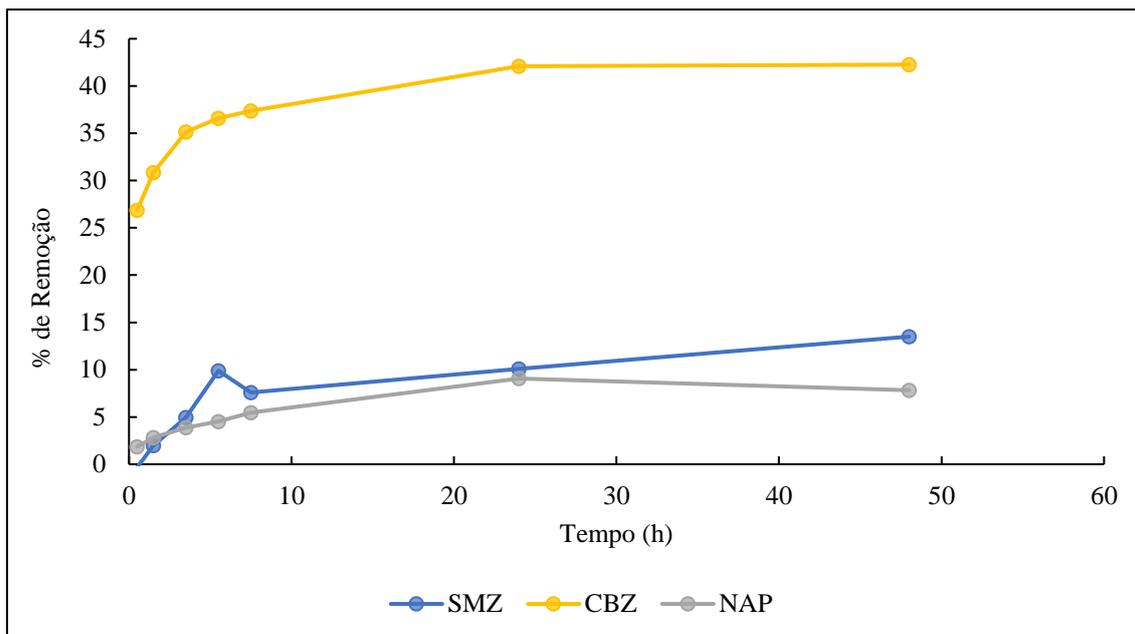


Figura 57 - Cinética de adsorção do SMZ, CBZ e NAP em função do tempo de contato com a fibra de coco.

Da observação da figura 57, pode-se verificar que a cinética de remoção dos fármacos pela fibra de coco é caracterizada por duas etapas, de modo idêntico ao comportamento que é verificado frequentemente para outros adsorventes, nomeadamente a vermiculite e a LECA, já estudados anteriormente. Assim, num passo inicial acontece um processo mais rápido logo durante as primeiras horas de contato (5, 5 h) em que pelo menos boa parte da quantidade dos fármacos é removida, provavelmente através de adsorção à superfície da fibra de coco mais facilmente acessível.

Na fase seguinte, verifica-se um passo de remoção mais lenta onde continua a ocorrer uma diminuição da quantidade dos fármacos presentes na solução, sendo atingida a concentração de equilíbrio por volta 24h das de contacto. Esta remoção adicional pode dever-se a adsorção mais extensa a uma parte da superfície interna menos acessível da fibra de coco, que implica um processo de difusão mais lento para o interior do material.

Deste modo, como mostra a figura 57, a fibra de coco é capaz de remover cerca de 42 % de um dos fármacos presente em solução (CBZ) durante o tempo em que decorreu o ensaio (48 horas), tempo este suficiente para se começar a atingir o equilíbrio.

Pelos resultados apresentados, verifica-se que a fibra de coco é um adsorvente eficaz para alguns fármacos bastante recalcitrantes, como é o caso da carbamazepina, e por isso tem algum potencial para aplicação no tratamento de águas residuais contaminadas com fármacos apresentando-se assim como uma opção que é complementar aos materiais argilosos, como a LECA e a Vermiculite utilizadas também neste estudo como matriz de suporte nos microcosmos de LCM que testámos. Onde estes materiais argilosos são menos eficientes, a fibra de coco poderá ser uma mais-valia, colmatando assim algumas das suas deficiências.

Tendo em conta que a fibra de coco é um resíduo que é produzido em grande escala em Cabo Verde e que requer o desenvolvimento de novas formas de aproveitamento, a possibilidade de utilização da mesma como material biossorvente, torna-se uma alternativa extremamente atrativa para o complemento da matriz usada nos LMC para o tratamento de águas residuais.

6

Conclusões e perspectivas futuras

6.1. Conclusão

Neste estudo avaliou-se a eficiência de um microcosmos de leitos construídos de macrófitas, utilizando uma mistura de dois materiais argilosos (LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 3) como matriz de suporte e plantado com *Typha* spp., para a remoção de vários fármacos: Sulfametoxazol, Trimetoprim, Ibuprofeno, Diclofenac, Naproxeno, Furosemida e Carbamazepina de uma solução aquosa, tendo-se obtido elevadas eficiências de remoção dos fármacos (71% - 96%), ao fim de 168 horas de exposição a uma solução dopada com 2,5 mg L⁻¹ de cada um dos fármacos presentes em solução, demonstrando assim o enorme potencial destes sistemas para tratar efluentes com este tipo de poluentes.

Verificou-se que a matriz de suporte utilizada nos leitos (LECA + Vermiculite), foi, só por si, responsável pela remoção da maior parte da quantidade de fármacos presentes em solução (38% - 84%). No final da experiência a remoção dos fármacos em todos os ensaios, foi superior nos Leitos plantados relativamente aos Leitos não plantados que continham só a matriz, tendo a presença de plantas contribuído, direta ou indiretamente para uma remoção adicional desses fármacos (9% - 35%). Assim, a componente biota, especialmente as plantas, desempenharam um papel determinante para o bom funcionamento do sistema, contribuindo para um aumento significativo da sua eficiência.

Deste modo, pode-se concluir que a utilização de certas espécies macrófitas nestes leitos pode contribuir para o seu bom desempenho permitindo alcançar uma eficiência superior em relação aos leitos não plantados. Esta maior eficiência de remoção obtida nos Leitos plantados poderá estar relacionada com a ocorrência de vários processos que, direta ou indiretamente, podem contribuir para a remoção de fármacos, nomeadamente a adsorção dos fármacos às raízes e rizomas das plantas; a absorção dos fármacos pelas raízes e sua eventual translocação para as partes aéreas da planta com uma possível metabolização ou sequestração em compartimentos celulares adequados; um aumento da biodegradação na matriz, em particular na rizosfera, a qual é potenciada pelo efeito estimulante de alguns exsudados libertados pelas raízes das plantas no desenvolvimento dos micro-organismos; e ainda à transformação/degradação dos compostos catalisada por enzimas presentes nesses exsudados.

A cinética do processo de remoção caracterizou-se por um passo inicial muito rápido (primeiras horas de exposição, até cerca de 8.5h), devendo-se essencialmente a processos que ocorrem por contacto direto com a superfície da matriz, provavelmente através de adsorção (elevada porosidade da matriz, em particular da vermiculite, que devido à sua estrutura laminar, disponibiliza uma grande área superficial facilmente acessível para a adsorção dos fármacos), embora nos Leitos plantados deva, também, ter ocorrido uma forte adsorção às raízes das plantas que na altura da realização dos ensaios apresentavam um sistema radicular muito desenvolvido. Subsequentemente, observou-se um processo mais lento onde continua a ocorrer uma diminuição da quantidade dos fármacos presentes na solução, sendo atingida a concentração de equilíbrio entre as 24 e as 48 horas de contacto entre as soluções de fármacos e os sistemas de LCM, com algumas exceções em que equilíbrio só foi atingido após 96 horas de contacto. Esta remoção adicional pode dever-se a adsorção mais extensa a uma parte da superfície interna dos poros microscópicos, principalmente da LECA, que implica um processo de difusão, mais lento, para o interior desses poros. Adicionalmente, pode ocorrer biodegradação dos compostos pelos microrganismos ou absorção pelas plantas, mas ambos os processos são também lentos.

Ao longo dos 3 anos de ensaios, verificou-se que o sistema dos Leitos plantados manteve a eficiência na remoção dos fármacos. Foi possível verificar um aumento da eficiência de remoção à medida que se iam realizando novos ensaios, com a introdução de novas classes de fármacos, tendo o ensaio 3 a maior taxa de remoção em comparação com os restantes. Esta melhoria de desempenho do sistema poderá estar associada a uma capacidade das plantas gradualmente se adaptarem aos fármacos e à sua toxicidade e se irem tornando mais eficientes na sua remoção. Esta capacidade dos Leitos plantados poderá dever-se ao facto de um maior desenvolvimento das raízes que aumenta a capacidade de adsorção dos mesmos, e por outro lado, maior robustez das plantas e melhor tolerância, permitindo maiores absorções pelas plantas.

Em relação à matriz, embora tenha havido uma variação pequena no aumento da eficiência de remoção, os valores estatisticamente não são significativamente diferentes, pelo que a matriz manteve aproximadamente a mesma eficiência de remoção ao longo dos 3 ensaios. Isto pode dever ao facto de nos leitos não plantados, possivelmente haver nos últimos ensaios mais materiais finos, com maior capacidade de adsorção, e, eventualmente, desenvolvimento de biofilmes para adicional adsorção e biodegradação,

o que poderá ter eventualmente compensado positivamente alguma degradação da eficiência dos leitos com o tempo.

Apesar dos excelentes resultados obtidos para a mistura utilizada como matriz de suporte (LECA + Vermiculite), decidiu -se avaliar a capacidade de adsorção da fibra de coco na remoção dos fármacos testados e sua possível utilização como componente adicional da matriz de suporte no tratamento de águas residuais, procurando desta forma aumentar a capacidade da matriz na retenção dos fármacos. Pelos resultados obtidos, conseguiu-se obter um aumento significativo das percentagens de remoção para alguns fármacos, principalmente para a carbamazepina (42%) embora para os outros fármacos tenha apresentado valores de remoção mais modestos. De qualquer modo, sendo a carbamazepina um dos poluentes notoriamente recalcitrantes, esta capacidade da fibra de coco de remover este fármaco é de salientar. Deste modo, concluiu-se que, não sendo a fibra de coco uma solução para a remoção de todo o tipo de micro-poluentes orgânicos, pode, no entanto, ser um eficiente complemento para a remoção de alguns deles, podendo assim ser um potencial componente de uma mistura de diversos materiais, com uma eficiência mais alargada para diversos tipos de poluentes. Em resumo, estes resultados demonstram as potencialidades deste material para aplicação no tratamento de águas residuais contaminadas com fármacos, apresentando-se como uma opção que é complementar aos materiais argilosos, como a LECA e a Vermiculite utilizadas também neste estudo, para inclusão na composição da matriz de suporte de LCMs com uma eficiência mais alargada para diversos tipos de micro-poluentes. Onde estes materiais argilosos são menos eficientes, a fibra de coco poderá ser uma mais-valia, colmatando assim algumas das suas deficiências.

No que toca à potencial fitotoxicidade para as plantas de *Typha* spp. provocada pela exposição aos fármacos estudados, a partir da determinação das suas taxas relativas de crescimento, observou-se de modo geral crescimento das plantas, embora tenha sido menor nas plantas expostas ao fármaco, sendo também essa diminuição mais acentuada nas folhas menores, i.e., as mais jovens. As taxas de crescimento foram diminuindo ao longo dos anos, de ensaio para ensaio, pelo que se pode inferir que os fármacos poderão ter causado algum tipo de efeito nas plantas. No entanto, estes efeitos observados deverão ser principalmente devidos ao aumento das quantidades totais de fármacos, bem como a uma maior variedade, com a introdução nos ensaios de novos fármacos com um

potencial aumento da toxicidade em relação aos ensaios anteriores, o que se terá refletido nestes parâmetros. De referir ainda que no decorrer das várias experiências as plantas expostas aos fármacos mostraram-se sempre viçosas e não apresentaram cloroses (amarelecimento das folhas), folhas murchas ou secas na parte superior.

Avaliou-se ainda a eventual influência da exposição aos fármacos nos níveis de concentração dos pigmentos fotossintéticos (clorofila total, a e b e carotenoides) nas folhas da *Typha* spp., tendo-se constatado uma inibição da sua síntese, apresentando ligeiras diminuições em relação às plantas do controlo. No entanto, de modo geral este efeito foi diminuindo para o final das experiências, o que poderá indicar uma ligeira diminuição do efeito inibitório e recuperação das plantas ao longo do tempo.

A resposta enzimática ao stress abiótico provocado pela presença dos fármacos foi também avaliada na parte aérea das plantas, tendo-se observado, relativamente às plantas de controlo, um aumento significativo da atividade da enzima superóxido dismutase nos 3 ensaios, demonstrando deste modo, uma resposta enzimática adequada ao aumento dos níveis do radical superóxido. Assim, este aumento da atividade desta enzima pode ser indicativo de uma capacidade da planta de lidar com a presença do composto xenobiótico (destoxificação), parecendo haver assim uma resposta da planta a esta situação de stress.

Relativamente à enzima catalase, verificou-se um efeito de inibição da atividade desta enzima, sobretudo no período inicial de cada ensaio, mas que de ensaio para ensaio foi-se tornando menos pronunciado. Em todos os ensaios, notou-se sempre alguma recuperação dessa atividade no final dos ensaios, observando-se, assim, uma reação positiva à situação de stress cujos efeitos foram observados no início dos ensaios.

Relativamente à atividade enzimática da enzima guaiacol peroxidase, a qual sofreu um efeito de inibição inicial tal como se observou para a catalase. não se observaram, contudo, diferenças significativas entre os três ensaios, ocorrendo apenas uma ligeira diminuição da atividade à medida que se iam diversificando os fármacos nos respetivos ensaios.

Entretanto, deve-se notar que não foi quantificada nas amostras a quantidade total de proteína, pelo que as atividades enzimáticas se encontram expressas em unidades de atividade enzimática (U) por massa fresca de planta, não se tratando, portanto, de atividades específicas (por unidade de massa de proteína). Assim, as diferenças entre as atividades enzimáticas medidas poderão ser afetadas por problemas experimentais na extração da enzima.

Da observação dos efeitos nos crescimentos das folhas, nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos e aparente ausência de sinais visuais de toxicidade, e na atividade enzimática anti-oxidante, parece poder concluir-se que as plantas de *Typha* spp. conseguem tolerar os efeitos tóxicos provocados pela exposição aos fármacos presentes no meio aquático em concentrações de 2,5 mg/L. Ao longo dos três ensaios as plantas de *Typha* spp. parecem ter sido capazes de lidar com os efeitos tóxicos causados pelos fármacos e ser tolerantes à sua presença e constata-se que ao fim do terceiro ensaio, as plantas parecem ir tornando-se cada vez mais resistentes e a reagir, assim, à situação de crescente stress cujos efeitos foram observados desde o início dos ensaios. Perante a variedade dos compostos e pela quantidade que se foi adicionando nos ensaios, parece que as plantas estão a conseguir ativar as enzimas no combate a situações de stress, reagindo melhor ao longo do tempo.

Durante o desenvolvimento/otimização da metodologia analítica, a aplicar à análise dos fármacos presentes nas amostras colhidas dos ensaios, verificou-se haver um problema com a ocorrência da retenção dos compostos a analisar pelos filtros que são usados no passo de filtração prévia das amostras que é necessário efetuar em análises por HPLC. Assim, fez-se um estudo de avaliação deste efeito em alguns tipos de filtros mais comuns e procurou-se otimizar o volume das soluções a filtrar para saturar os filtros, de forma a minimizar as perdas dos analitos durante a filtração. Este estudo foi submetido para publicação de um artigo. Conclui-se assim, que dos 3 filtros testados no estudo, aquele que apresentou melhor resultado foi o da membrana PTFE (marca Labfil), embora o filtro de nylon (Labfil) tenha apresentado percentagens de recuperação bastante próximas deste, com um relativamente baixo volume de filtrado (~5 mL). Devido à qualidade do material, os filtros de PTFE apresentam um custo mais elevado em relação aos filtros de nylon. Por esta razão, e apesar dos filtros de PTFE

apresentarem uma retenção mínima para todos os fármacos testados, a escolha recaiu na utilização do filtro de nylon (marca Labfil), que é um dos tipos de filtro mais comuns e menos dispendiosos. No entanto, de modo a mitigar o problema da retenção dos compostos por este tipo de filtro, é necessário antes de os utilizar efetuar um tratamento prévio que consiste em filtrar um volume da solução a analisar em quantidade suficiente para saturar a membrana com o composto. Foi determinado que esse volume teria de ser no mínimo de 5 mL.

6.2. Limitações do estudo e recomendações para futuras investigações

Em estudos deste tipo existem sempre limitações que eventualmente poderiam ter sido encaradas de outra forma. Uma destas limitações que se observou neste estudo foi o curto período de tempo para que as plantas pudessem atingir o pleno de desenvolvimento, bem como o acompanhamento ao longo das várias fases de desenvolvimento das plantas. Como já foi dito, durante a Primavera e o Verão, ocorre o desenvolvimento e crescimento das plantas, e este é o período, de maior atividade, em que o papel das plantas se fará sentir com maior importância. No Outono e no Inverno, por outro lado, verifica-se uma diminuição do seu crescimento, com morte de alguns componentes das plantas, resultando numa diminuição da atividade das plantas e num acréscimo de matéria orgânica no leito, o que pode interferir nos processos de tratamento.

Poderia se também estudar a relação entre a densidade das plantas e a eficiência dos leitos, e tentar otimizar este parâmetro uma vez que esta é tida como um parâmetro muito importante na remoção dos fármacos.

Tendo em conta os resultados positivos obtidos neste trabalho, seria muito importante numa perspetiva futura de trabalho alargar a gama de fármacos testados, dada a diversidade das várias classes farmacêuticas que normalmente são encontradas no meio aquático.

Seria interessante considerar também a hipótese de serem utilizadas outras espécies de macrófitas nos LCM que poderiam complementar à elevada eficiência da *Typha* spp.

Seria também interessante avaliar estas macrófitas em sistemas de LCM à escala piloto, nas condições de campo, por longos períodos.

Um outro aspecto a ter conta seria testar juntamente com a LECA e Vermiculite outras matrizes compostas por sub-produtos resultantes de atividades agrícolas, como o caso da fibra de coco, que é produzido em grande escala em Cabo Verde e que foi objeto de avaliação neste estudo para avaliação da capacidade de adsorção que este material apresenta na remoção dos fármacos e consequentemente a sua possível utilização como matriz de suporte no tratamento de águas residuais.

Sugere-se ainda testar outras concentrações dos fármacos que estejam mais próximas das concentrações ambientais.

E por último, seria interessante avaliar a atividade enzimática de outras enzimas antioxidantes não só no fim da experiência, mas sim ao longo de todo o processo.

7

Bibliografia

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro assay methods. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 105, 121-126.

Alatas, F., Wulansari, D. (2008). The development and validation spectrophotometric method for simultaneous determination sulfamethoxazole and trimetoprim in tablet by continuous wavelet transform. *Proceeding of the International Seminar on Chemistry*, 389-392.

Alharbi, S.K., Price, W.E., Kang, J., Fujioka, T., Nghiem, L.D. (2016). Ozonation of carbamazepine, diclofenac, sulfamethoxazole and trimethoprim and formation of major oxidation products. *Desalin. Water Treat.* 57, 1-12.

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

Amarasiri, M., Sano, D., Suzuki, S. (2020). Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: current knowledge and questions to be answered. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 50, 2016–2059.

Azevedo, B. de S. M. (2008). Utilização da fibra da casca de coco verde como suporte para a formação de biofilme visando o tratamento de efluentes. Universidade Federal do Rio de Janeiro. *Dissertação de Mestrado*.

Batool, A & Saleh, T. (2020). Removal of toxic metals from wastewater in constructed wetlands as a green technology; catalyst role of substrates and chelators, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 109924. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109924>.

Baweja, P., Kumar, G. (2020). Abiotic Stress in Plants: An Overview. In: Giri, B., Sharma, M.P. (eds) *Plant Stress Biology*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-9380-2_1

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

Brix, H., Arias, C. A., Bubba, M. (2001). Media selection for sustainable phosphorus removal in subsurface flow constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 44(11–12). <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0808>

Burcea, A., Boeraş, I., Mihuţ, C. M. (2020). Adding the Mureş River Basin (Transylvania, Romania) to the List of Hotspots with High Contamination with Pharmaceuticals. *Sustainability*. 12 (23) 10197.

Castrignanò, E., Kannan, A. M., Feil, E. J., Kasprzyk-Hordern, B. (2018). Enantioselective fractionation of fluoroquinolones in the aqueous environment using chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 206, 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.005>

Česen, M., Ahel, M., Terzić, S., Heath, D. J., Heath, E. (2019). The occurrence of contaminants of emerging concern in Slovenian and Croatian wastewaters and receiving Sava river. *Science of the Total Environment*, 650, 2446-2453. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.238>

Choppala, G., Saifullah, Bolan, N., Bibi, S., Iqbal, M., Rengel, Z., Kunhikrishnan, A., Ashwath, N., & Ok, Y. S. (2014). Cellular Mechanisms in Higher Plants Governing Tolerance to Cadmium Toxicity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33, 374-391. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.903747>

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>

Cunha, D.L., Paula, L.M., Silva, S.M.C., Bila, D.M., Fonseca, E.M., Oliveira, J.L.M. (2017). Ocorrência e remoção de estrogênios por processos de tratamento biológico de esgotos. *Ambiente e Água*, 12, 249-262, 2. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-água.1992>

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, 3390-3400. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00231-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00231-8)

Dias, S., Mucha, A. P., Duarte Crespo, R., Rodrigues, P., Almeida, C. M. R. (2020). Livestock Wastewater Treatment in Constructed Wetlands for Agriculture Reuse. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 8592.

Dordio, A., Belo, M., Martins Teixeira, D., Carvalho, A. J., Dias, C. M. B., Picó, Y., Pinto, A. P. (2011). Evaluation of carbamazepine uptake and metabolization by *Typha* spp., a plant with potential use in phytotreatment. *Bioresource Technology*, 102, 7827–7834. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.050>

Dordio, A., Carvalho, A. (2011). Phytoremediation: An option for removal of organic xenobiotics from water, in: *Handbook of. Phytoremediation*. Nova Science Publishers, 51–92.

Dordio, A., 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, A., Carvalho, A. (2015). Removal of pharmaceuticals in conventional wastewater treatment plants. In *Wastewater Treatment: Processes, Management Strategies and Environmental/Health Impacts*. Nova Science Publishers.

Dordio, A., Carvalho, A. (2018). Removal Processes of Pharmaceuticals in Constructed Wetlands. In *Constructed Wetlands for Industrial Wastewater Treatment*. Stefanakis Alexandros. <https://doi.org/10.1002/9781119268376.ch17>

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

Dordio, A., Miranda, S., Ramalho, J., Carvalho, A. (2017). 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, A., Pinto, J., Barrocas, D., Pinto, A., Carvalho, A. Teixeira, D. (2009). Atenolol removal in microcosm constructed wetlands. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89, 835–848. <https://doi.org/10.1080/03067310902962502>

Dordio, Ana, Carvalho, A., Teixeira, D. M., Dias, C. B., Pinto, A. P. (2010). Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using *Typha* spp. and LECA. *Bioresource Technology*, 101, 886–892. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.001>

Drugbank online (2022). Carbamazepine: Uses, Interactions, Mechanism of Action. Available from <https://go.drugbank.com/drugs/DB00564>

Drugbank online (2022). Furosemida: Uses, Interactions, Mechanism of Action. Available from <https://go.drugbank.com/drugs/DB00695>

DrugBank online. (2021). Naproxen: Uses, Interactions, Mechanism of Action. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00788>

Duarte, M.C., Gomes, I., Catarino, S., Brilhante, M., Gomes, S., Rendall, A., Moreno, Â., Fortes, A.R., Ferreira, V.S., Baptista, I., Dinis, H., Romeira, M. (2022). Diversity of Useful Plants in Cabo Verde Islands: A Biogeographic and Conservation Perspective. *Plants*, 11, 1313. <https://doi.org/10.3390/plants11101313>.

Dupré Minerals (2016). what is vermiculite? Disponível em: <https://www.dupreminerals.com/products/vermiculite-boards/>

Ellison, D. (2019). Clinical Pharmacology in Diuretic Use. *CJASN*. 14 (8) 1248-1257.

Esteban, R., Moran, J. F., Becerril, J. M., García-Plazaola, J. I. (2015). Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 119. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.04.009>

Evgenidou, E., Konstantinou, I., Lambropoulou, D. (2015). Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review, *Sci. Total Environ.* 505, 905-926.

Felis, E., Kalka, J., Sochacki, A., Kowalska, K., Bajkacz, S., Harnisz, M., & Korzeniewska, E. (2020). Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment - occurrence and environmental implications. *European Journal of Pharmacology*, 866, 172813. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172813>

Fernandes, J. P., 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, 257. <https://doi.org/10.3390/toxics9100257>

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>

Fernández, R., Bertrand, A., Reis, R., Mourato, M. P., Martins, L. L., González, A. (2013). Growth and physiological responses to cadmium stress of two populations of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. *Journal of Hazardous Materials*, 244–245. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.10.044>

Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Roméo, M. (2003). Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: Application to seagrasses. *Aquatic Toxicology*, 65, 187-204. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00133-4)

Fijalkowski, K. L., Kwarciak-Kozłowska, A. (2020). Phytotoxicity assay to assess sewage sludge phytoremediation rate using guaiacol peroxidase activity (GPX): A comparison of four growth substrates. *Journal of Environmental Management*, 263, 110413. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110413>

Fontes, M.K., Gusso-Choueri, P.K., Maranhão, L.A., Souza Abessa, D.M., Mazur, W.A., Campos, B.G., Guimarães, L.L., Toledo, M.S., Lebre, D., Marques, J.R., Felício, A.A., Cesar, A., Almeida, E.A., Pereira, C.D.S. (2018). A tiered approach to assess effects of diclofenac on the brown mussel *Perna*: a contribution to characterize the hazard. *Water Research*, 132, 361-370. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.077>

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

Fragoso, C. R., Ferreira, T., Marques, D. da M. (2009). Modelagem Ecológica em Ecossistemas Aquáticos (1st ed.). Oficina de textos. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4337.6725>

Gajewska, E., Skłodowska, M., Słaba, M., Mazur, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum*, 50(4). <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0102-5>

Gallego, S. M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Iannone, M. F., Rosales,

E. P., Zawoznik, M. S., Groppa, M. D., Benavides, M. P. (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 83, 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006>

Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

Gilman A, G. (2018). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 13th ed. Brunton, Laurence L., Hilal-Dandan, Randa, Knollmann BC, editor New York City.

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>

Gomes, J., Costa, R., Quinta-Ferreira, R. M., Martins, R. C. (2017). Application of ozonation for pharmaceuticals and personal care products removal from water. *Science of The Total Environment*, 586, 265–283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.216>

Gonçalves, J. C. (2017). *Análise das tecnologias correntes para o tratamento e secagem de lamas de ETAR* Analysis of current technologies for treatment and drying of sewage sludge. Universidade de Coimbra. Dissertação de mestrado.

Gonzalez-Alonso S., Merino LM., Esteban S., Lopez de Alda M., Barcelo D., Duran JJ., Lopez-Martinez J., Acena J., Perez S, Mastroianni N., Silva A., Catala M., Valcarcel Y. (2017). Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region. *Environ Pollut* 229:241–254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.060>

Hamilton Da., Ernst CC., Kramer WG, Madden D., Lang E, Liao E. (2018). Pharmacokinetics of Diclofenac and Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD) Following Administration of Injectable HP β CD-Diclofenac in Subjects With Mild to Moderate Renal Insufficiency or Mild Hepatic Impairment. *Clin Pharmacol Drug Dev.* ;7:110, 110-122.

Hanna, N., Sun, P., Sun, Q., Li, X., Yang, X., Ji, X., Zou, H., Ottoson, J., Nilsson, L. E., Berglund, B., Dyar, O. J., Tamhankar, A. J., & Stålsby Lundborg, C. (2018). Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: Its potential for resistance development and ecological and human risk. *Environment International*, 114, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.003>

Heidari, Z., Alizadeh, R., Ebadi, A. (2020). Degradation of furosemide using photocatalytic ozonation in the presence of ZnO/ICLT nanocomposite particles: *Journal of Molecular Liquids*, 319, 1141931. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133358>

Huerta, C. L. S. (2016). Removal and Degradation Pathways of Sulfamethoxazole Present in Synthetic Municipal Wastewater via an Anaerobic Membrane Bioreactor.

King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Kingdom of Saudi Arabia. Tese de Doutorado.

Huerta-Fontela, M., Galceran, M. T., Ventura, F. (2011). Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research*, 45, 1432–1442. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.036>

ICH. (1994). International Conference on Harmonisation. In *Validation of analytical procedures: Text and methodology, Harmonised tripartite guideline 2*, 1-5 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00861-7>

Ilyas, H., Hullebusch, E. (2020). Performance comparison of different types of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and their transformation products: a review. In *Environmental Science and Pollution Research* 27, 14342–14364). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08165-w>.

Indika Herath, Z., Vithanage, M. (2015). Phytoremediation in constructed wetlands. In *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, 2, 243–263. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10969-5_21

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

Ji, Y., Xie, W., Fan, Y., Shi, Y., Kong, D., Lu, J. (2016). Degradation of trimethoprim by thermo-activated persulfate oxidation: Reaction kinetics and transformation mechanisms. *Chemical Engineering Journal*, 286, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.10.050>

Jomova, K., Valko, M. (2013). Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry* 70, 102-110. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.054>

Kadlec, R. H., Wallace, S. (2009). *Treatment Wetlands Second Edition*. CRC Press Boca Raton, FL 33487-2742 <http://doi.org/10.1201/9781420012514>

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>

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>

Leal, J. S. G., Faxina, R. R. C., Santana, I. A., Bertolino, S. M. (2019). Polimento de efluente secundário em wetland de fluxo vertical com resíduo de cerâmica. *Revista IberoAmericana de Ciências Ambientais*, 10, 314-327, doi: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2019.004.00244>

-
- Li, J., Zhang, H. (2017). Factors influencing adsorption and desorption of trimethoprim on marine sediments: mechanisms and kinetics. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 21929–21937.
- 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>
- Li, Y., Zhang, J., Zhu, G., Liu, Y., Wu, B., Ng, W. J., Appan, A., Tan, S. K. (2016). Phytoextraction, phytotransformation and rhizodegradation of ibuprofen associated with *Typha angustifolia* in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Water Research*, 102, 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.049>
- Li, Y., Zhu, G., Ng, W. J., Tan, S. K. (2014). A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of the Total Environment*, 468–469, 908–932. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.018>
- Lichtenthaler, H. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions. Water Science and Technology*, 11, 591-592.
- Liu, J., Zhang, Z., Yu, Z., Liang, Y., Li, X., Ren, L. (2017). The Structure and Flexural Properties of *Typha* Leaves. *Applied Bionics and Biomechanics*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1249870>
- Liu, Y., Wang, L., Pan, B., Wang, C., Bao, S., Nie, X. (2017). Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 183, 104-113. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.020>
- Lopes, C. (2016). Remoção em fase líquida do fármaco diclofenac por adsorção em coluna de leito fixo com carvão vegetal ativado. Faculdade de Ciências e Tecnologia - Lisboa. Dissertação de mestrado. <https://run.unl.pt/handle/10362/19595>
- Machado, A., 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, Ana Isabel, Fragoso, R., Dordio, A., Duarte, E. (2020). Furosemide in water matrix: HPLC-UV method development and degradation studies. *Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 15, 1. <https://doi.org/10.4136/ambiente-agua.2406>
- Mackulak, T., Cernansky, S., Fehér, M., Birosová, L., Gál, M. (2019). Pharmaceuticals, drugs, and resistant microorganisms – environmental impact on population health. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 9, 40-48.
- Marques, M. C., Nascimento, C. W. A. (2013). Analysis of chlorophyll fluorescence spectra for the monitoring of Cd toxicity in a bio-energy crop (*Jatropha curcas*). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 127, 88-93.
-

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.07.016>

Martínez-Costa, J.I., Rivera-Utrilla, J., Leyva-Ramos, R., S´anchez-Polo, M., Velo-Gala, I. (2018). Individual and simultaneous degradation of antibiotics sulfamethoxazole and trimethoprim by UV and solar radiation in aqueous solution using bentonite and vermiculite as photocatalysts. *Appl. Clay Sci.* 160, 217–225.

MedChemExpress. (2019). Ibuprofen ((±)-Ibuprofen) | COX-1/2 Inhibitor. Available from: <https://www.medchemexpress.com/Ibuprofen.html>

Mehta, P., Sharma, C. S., Nikam, D., Ranawat, M. S. (2012). Development & Validation of Stability-Indicating UV Spectrophotometric Method For Estimation of Naproxen In Pharmaceutical Dosage Form. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 2, 291–303.

Menz, J., Olsson, O., Kümmerer, K. (2019). Antibiotic residues in livestock manure: does the EU risk assessment sufficiently protect against microbial toxicity and selection of resistant bacteria in the environment? *J. Hazard. Mater.* 120807. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120807>

Miranda, S. I. M. (2014). Remoção de Fármacos de Águas Contaminadas. Avaliação de vários Substratos. Universidade de Évora. Dissertação de mestrado.

Moreira, F. C., Soler, J., Alpendurada, M. F., Boaventura, R. A. R., Brillas, E., Vilar, V. J. P. (2016). Tertiary treatment of a municipal wastewater toward pharmaceuticals removal by chemical and electrochemical advanced oxidation processes. *Water Research*, 105, 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.036>

Mourato, M., Moreira, I. N., Leitão, I., Pinto, F. R., Sales, J. R., Martins, L. L. (2015). Effect of heavy metals in plants of the genus Brassica. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 7975-17998. <https://doi.org/10.3390/ijms160817975>

Mourato, M., Reis, R., Louro, L. (2012). Characterization of Plant Antioxidative System in Response to Abiotic Stresses: A Focus on Heavy Metal Toxicity. *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*. 12, 1-17. <https://doi.org/10.5772/34557>

Nallani, G. C., Paulos, P. M., Constantine, L. A., Venables, B. J., Huggett, D. B. (2011). Bioconcentration of Ibuprofen in Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) and Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere*, 84, 1371–1377.

Nam, S. W., Jo, B. Il, Yoon, Y., Zoh, K. D. (2014). Occurrence and Removal of Selected Micropollutants in a Water Treatment Plant. *Chemosphere*, 95, 156–165.

National Center for Biotechnology Information. (2019). PubChem Compound Summary for CID 2554, Carbamazepine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbamazepine>.

Nie, M., Yang, Y., Zhang, Z., Yan, C., Wang, X., Li, H., Dong, W. (2014). Degradation of chloramphenicol by thermally activated persulfate in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 246, 373-382. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.02.047>

Nkansah, M.A., Christy, A.A., Barth, T., Francis, G.W. (2012). The use of lightweight expanded clay aggregate (leca) as sorbent for pahs removal from water. *Journal of Hazardous Materials*, 217-218, 360-365.

OECD. (2019). *Pharmaceutical Residues in Freshwater*. In *OECD Studies on Water*. <https://doi.org/10.1787/c936f42d-en>.

Oliveira, C. (2017). *Fotodegradação do Sulfametoxazol Presente em Ambientes Aquáticos usando Radiação Solar Simulada*. Universidade de Aveiro. Tese de Mestrado

Özengin, Nihan., Elmaci, A. (2016). Removal of Pharmaceutical Products in a Constructed Wetland. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14, 4, 221. <https://doi.org/10.15171/ijb.1223>

Paíga, P., Ramos, S., Jorge, S., Silva, J. G., Delerue-Matos, C. (2019). Monitoring survey of caffeine in surface waters (Lis River) and wastewaters located at Leiria Town in Portugal. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 33440–33450. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06168-w>

Paiga, P., Santos, L., Ramos, S., Jorge, S., Silva, J., Delerue-Matos C. (2016). Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Sci Total Environ* 573:164–177. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.089>

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

Palma, P., Fialho, S., Lima, A., Novais, M. 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>

Parde, D., Patwa, A., Shukla, A., Vijay, R., Killedar, D. J., Kumar, R. (2021). A review of constructed wetland on type, treatment and technology of wastewater. *Environmental Technology and Innovation* 21, 101261. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.10126>

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

Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C., Mohan, D. (2019). *Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods*. *Chemical Reviews* 119 (6), 3510-3673

Pedescoll, A., Sidrach-Cardona, R., Sánchez, J. C., Bécares, E. (2013). Evapotranspiration affecting redox conditions in horizontal constructed wetlands under Mediterranean climate: Influence of plant species. *Ecological Engineering*, 58, 335-343. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.07.007>

-
- 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. *Journal of Environmental Management*, 237, 408–423. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>
- Pereira, A., Silva, L., Laranjeiro, C., Meisel, L., Lino, CM., Pena, A. (2017). Human pharmaceuticals in Portuguese rivers: The impact of water scarcity in the environmental risk. *Sci Total Environ* 609:1182-1191. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.200>
- Pereira, A., Silva, L., Lino, C., Meisel, L., Pena A. (2016). Assessing environmental risk of pharmaceuticals in Portugal: An approach for the selection of the Portuguese monitoring stations in line with Directive 2013/39/EU. *Chemosphere* 144:2507-2515. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.100>
- Pereira, C. L., Savastano, H., Payá, J., Santos, S. F., Borrachero, M. V., Monzó, J., Soriano, L. (2013). Use of highly reactive rice husk ash in the production of cement matrix reinforced with green coconut fiber. *Industrial Crops and Products* 49, 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.038>
- Péres, S., Eichhorn, P., Aga, D., (2005). Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole and trimethoprim at different stages of sewage treatment, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1361-1367.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review Plant Biology* 56, 15-39.
- Pimenta, A. S., Santos, R. C., Oliveira Carneiro, A. C., Castro, R. V. O. (2015). Utilização de resíduos de coco (*Cocos nucifera*) carbonizado para A produção de briquetes. *Ciencia Florestal*, 25, 137-144. <https://doi.org/10.5902/1980509817471>
- 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>
- Raposo, C. (2017). Resíduos de medicamentos e hormônios na água preocupam cientistas. *Jornal da Universidade de UFRGS*. <http://www.ufrgs.br/secom/ciencia/residuos-de-medicamentos-e-hormonios-na-agua-preocupam-cientistas/>
- Rashed, A. A. (2014). Assessment of aquatic plants evapotranspiration for secondary agriculture drains (case study: Edfina drain, Egypt). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2014.07.001>
- Ratola, N., Cincinelli, A., Alves, A., Katsoyiannis, A. (2012). Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. *Journal of Hazardous Materials*, 239–240, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.040>
- Rdewi, E. H., Abbas, K. K., AbdulkadhimAl-Ghaban, A. (2022). Removal pharmaceutical carbamazepine from wastewater using ZnO-TiO₂-MXene heterostructural nanophotocatalyst under solar light irradiation. *Materials Today: Proceedings*, 60, 1702-1711. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.12.229>
-

Reis, P., Pais, M., Duarte, B., Cacador, I., Freitas, A., Vila, Pouca., Barbosa, J., Leston, S., Rosa, J., Ramos, F., Cabral, HN., Gillanders, BM., Fonseca, VF. (2018). Screening of human and veterinary pharmaceuticals in estuarine waters: A baseline assessment for the Tejo estuary. *Mar Pollut Bull* 135:1079–1084. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.08.036>

Richmond, E.K., Rosi, E.J., Walters, D.M., Fick, J., Hamilton, S., Brodin, T., Sundelin, A., Grace, M. (2018). A diverse suite of pharmaceuticals contaminates stream and riparian food webs. *Nat Commun* 9, 4491 <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06822-w>

Rodrigues, J., Silva, S., Cardoso, V., Benoliel, M., Cardoso, E., MR, C. (2021). Screening and Seasonal Behavior of Analgesics, Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, and Antibiotics in Two Urban Wastewater Treatment Plants. *Environ Manage*; 68, 411-425. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34269831/>

Rosal, R., Rodríguez, A., Perdígón-Melón, J. A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M. J., Agüera, A., Fernández-Alba, A. R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, 44, 578–588. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.004>

Rouso, B. Z. (2017). Avaliação de um sistema híbrido de wetlands construídos empregados no tratamento de esgoto sanitário. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,

Rubio, M. C., González, E. M., Minchin, F. R., Webb, K. J., Arrese-Igor, C., Ramos, J., Becana, M. (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum*, 115, 531-540. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150407.x>

Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M.G., Brooks, B.W., Ehlman, S.M., McCallum, E.S., Sih, A., Sundin, J., Wong, B.B.M., Arnold, K.E. (2018). Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285, 20181297. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1297>.

Sampaio, R. A., Ramos, S. J., Guilherme, D. O., Costa, C. A., Fernandes, L. A. (2008). Produção de mudas de tomateiro em substratos contendo fibra de coco e pó de rocha. *Horticultura Brasileira*, 26, 499-503. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362008000400015>

Santos. (2017). Efeitos Crônicos de Carbamazepina em Danio Rerio: Uma Avaliação Multi-paramétrica. Universidade de Aveiro. Dissertação de mestrado

Saumya, V., & Panneerselvam, D. T. (2017). Development and validation of a uv spectrophotometric method for simultaneous estimation of naproxen and sumatriptan. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 7, 1418–1427. <https://doi.org/10.20959/wjpr20181-10586>

Shahid, M. J., AL-surhane Ameen A., Kouadri, F., Ali, S., Nawaz, N., Afzal, M., Rizwan, M. (2020). Role of Microorganisms in the Remediation of Wastewater in Floating Treatment Wetlands: A Review. *Sustainability*, 12, 5559.

-
- Sharifnia, S., Khadivi, M. A., Shojaeimehr, T., & Shavisi, Y. (2016). Characterization, isotherm and kinetic studies for ammonium ion adsorption by light expanded clay aggregate (LECA). *Journal of Saudi Chemical Society*, 20, S342–S351. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.12.003>
- Sharma, B. M., Bečanová, J., Scheringer, M., Sharma, A., Bharat, G. K., Whitehead, P. G., Klánová, J., Nizzetto, L. (2019). Health and ecological risk assessment of emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, and artificial sweeteners) in surface and groundwater (drinking water) in the Ganges River Basin, India. *Science of the Total Environment*, 646, 1459-1467. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.235>
- 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.
- Silva, K., Rezende, L. C. S. H., Silva, C. A. da, Bergamasco, R., Gonçalves, D. S. (2013). Caracterização físico-química da fibra de coco verde para a adsorção de metais pesados. *Engevista*, 15, 43–50.
- Silva, S., Cardoso, VV., Duart, L., Carneiro, RN., Almeida, C. (2021). Characterization of Five Portuguese Wastewater Treatment Plants: Removal Efficiency of Pharmaceutical Active Compounds through Conventional Treatment Processes and Environmental Risk. *Appl Sci*, 11, 7388. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3417/11/16/7388/htm>
- Singh, S., Prasad, S. M. (2014). Growth, photosynthesis and oxidative responses of *Solanum melongena* L. seedlings to cadmium stress: Mechanism of toxicity amelioration by kinetin. *Scientia Horticulturae*, 176, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.06.022>
- 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>
- Stelato, E.S., Oliveira, T.G., Stunges, G.M., Silva, E.C.P., Cuba, R.M.F., Minillo, A., Isiq, W.D. (2016). Avaliação da presença de resíduos de anti-inflamatórios não esteroides nos córregos veado e cedro do município de Presidente Prudente (SP), Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*, 39, 97-113. <https://doi.org/10.5327/Z2176-947820160050>
- Szekeres, E., Chiriac, C. M., Baricz, A., Szóke-Nagy, T., Lung, I., Soran, M. L., Rudi, K., Dragos, N., Coman, C. (2018). Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas. *Environmental Pollution*, 236, 734-744. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.107>
- Tanoue, R., Nomiya, K., Nakamura, H., Kim, J.-W., Isobe, T., Shinohara, R., Kunisue, T., Tanabe, S. (2015). Uptake and Tissue Distribution of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wild Fish from Treated-Wastewater-Impacted Streams. *Environmental Science & Technology*, 49, 11649-11658. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02478>
-

Thiebault, T. (2020). Sulfamethoxazole/Trimethoprim ratio as a new marker in raw wastewaters: A critical review. *Science of the Total Environment*, 715, 136916. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136916>

Tilley, E., Ulrich, L., Lüthi, C., Reymond, Ph. and Zurbrügg, C. (2014). *Compendium of Sanitation Systems and Technologies*. 2nd Revised Edition. Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag). Dübendorf, Switzerland

Timoneda, E. (2017). Utilización de Ibuprofeno por los Usuarios de la Farmacia Comunitaria. *Farmacéuticos Comunitarios*, 9, 34-38.

Tóth, T. N., Chukhutsina, V., Domonkos, I., Knoppová, J., Komenda, J., Kis, M., Lénárt, Z., Garab, G., Kovács, L., Gombos, Z., Van Amerongen, H. (2015). Carotenoids are essential for the assembly of cyanobacterial photosynthetic complexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1847, 1153-1165. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.05.020>

Tröger, R., Klöckner, P., Ahrens, L., & Wiberg, K. (2018). Micropollutants in drinking water from source to tap - Method development and application of a multiresidue screening method. *Science of the Total Environment*, 627, 1404-1432. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.277>

Valipour, A., Ahn, Y. H. (2016). Constructed wetlands as sustainable ecotechnologies in decentralization practices: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 180–197.

Van Hoewyk, D., Garifullina, G. F., Ackley, A. R., Abdel-Ghany, S. E., Marcus, M. A., Fakra, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Pilon, M., Takahashi, H., Pilon-Smits, E. A. H. (2005). Overexpression of AtCpNifS enhances selenium tolerance and accumulation in arabidopsis. *Plant Physiology*, 139, 1518-1528. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068684>

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

Wallace, S.D., Knight, R.L. (2006). Small-scale constructed wetland treatment systems: feasibility, design criteria, and O&M requirements. *Water Environment Research Foundation (WERF), Alexandria, Virginia. IWA Publishing*, 5. <https://doi.org/10.2166/9781780403991>

Wang, J., Wang, S. (2016). Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. *Journal of Environmental Management*, 182, 620-640. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.049>

Wang, Q., Pang, W.J., Mao, Y.D., Sun, Q., Zhang, P.F., Ke, Q., Yu, H.G., Dai, C.J., Zhao, M. (2019). Study of the degradation of trimethoprim using photo-Fenton oxidation technology. *Water* 11, 207.

Yadav, M. K., Short, M. D., Aryal, R., Gerber, C., Van den Akker, B., Saint, C. P. (2017). Occurrence of illicit drugs in water and wastewater and their removal during wastewater treatment. *Water Research*, 124, 713–727.

Yilmaz, B., Asci, A., Palabiyik, S. S. (2011). HPLC Method for Determination of Diclofenac in Human Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study in Turkey. *Journal of Chromatographic Science*, 49, 423–427. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt080>

Yu, Y., Wang, H., Liu, J., Wang, Q., Shen, T., Guo, W., Wang, R. (2012). Shifts in microbial community function and structure along the successional gradient of coastal wetlands in Yellow River Estuary. *European Journal of Soil Biology*, 49, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.08.006>

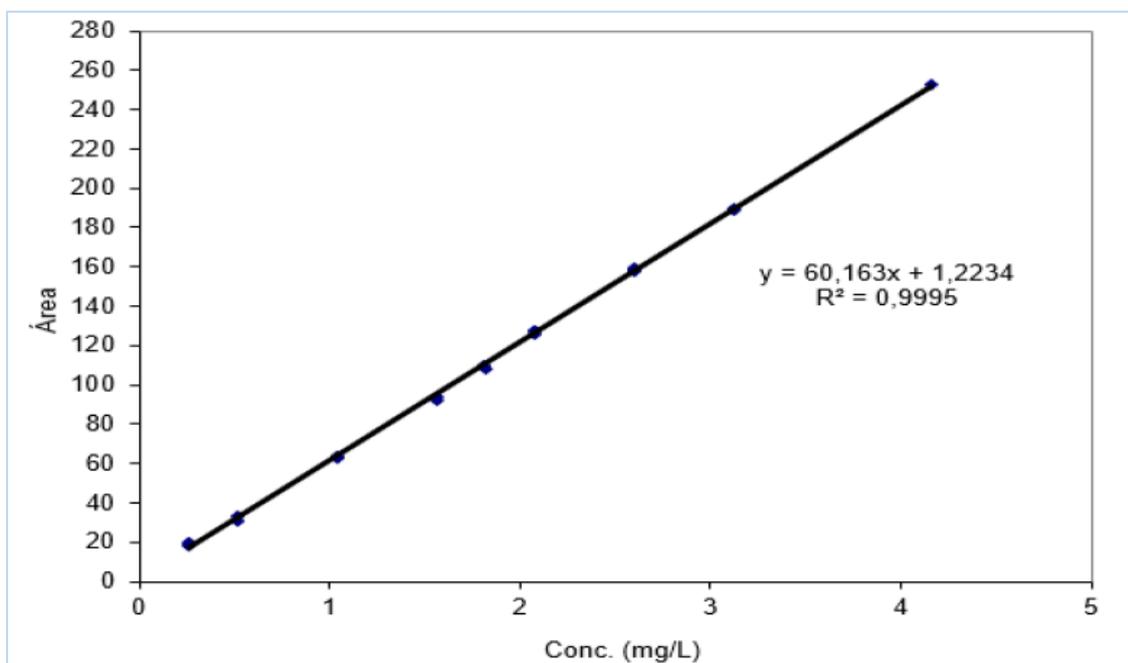
Yunlong, L., Wenshan, G., Huu Hao, N., Long Duc, N., Faisal Ibney, H., Jian, Z., & Shuang, L. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473–474, 619–664. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065%0A>.

Zaied, B. K., Rashid, M., Nasrullah, M., Zularisam, A. W., Pant, D., Singh, L. (2020). A comprehensive review on contaminants removal from pharmaceutical wastewater by electrocoagulation process. *Science of the Total Environment*, 726, 138095. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138095>

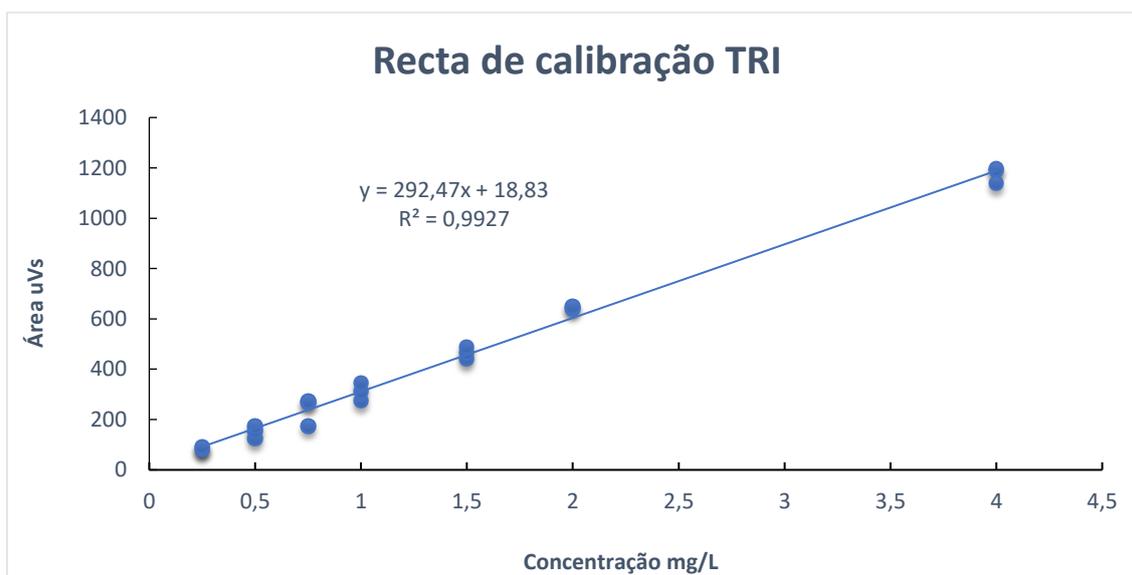
Zhang, T., Xu, D., He, F., Zhang, Y., Wu, Z. (2012). Application of constructed wetland for water pollution control in China during 1990-2010. *Ecological Engineering*, 47, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.06.022>

Anexos

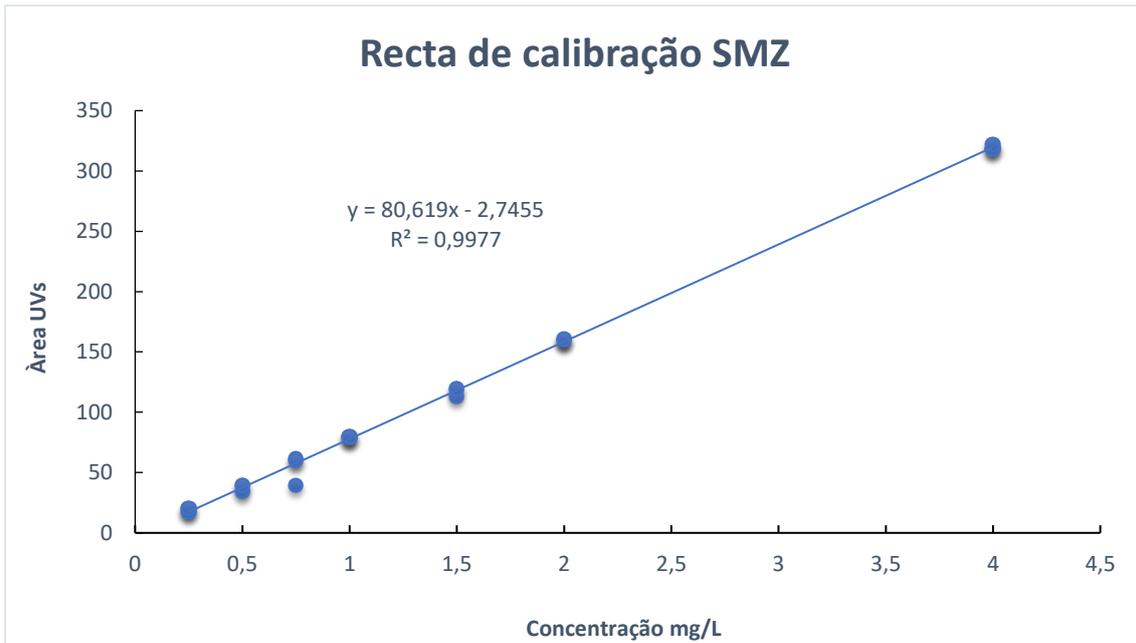
Retas de Calibração dos fármacos



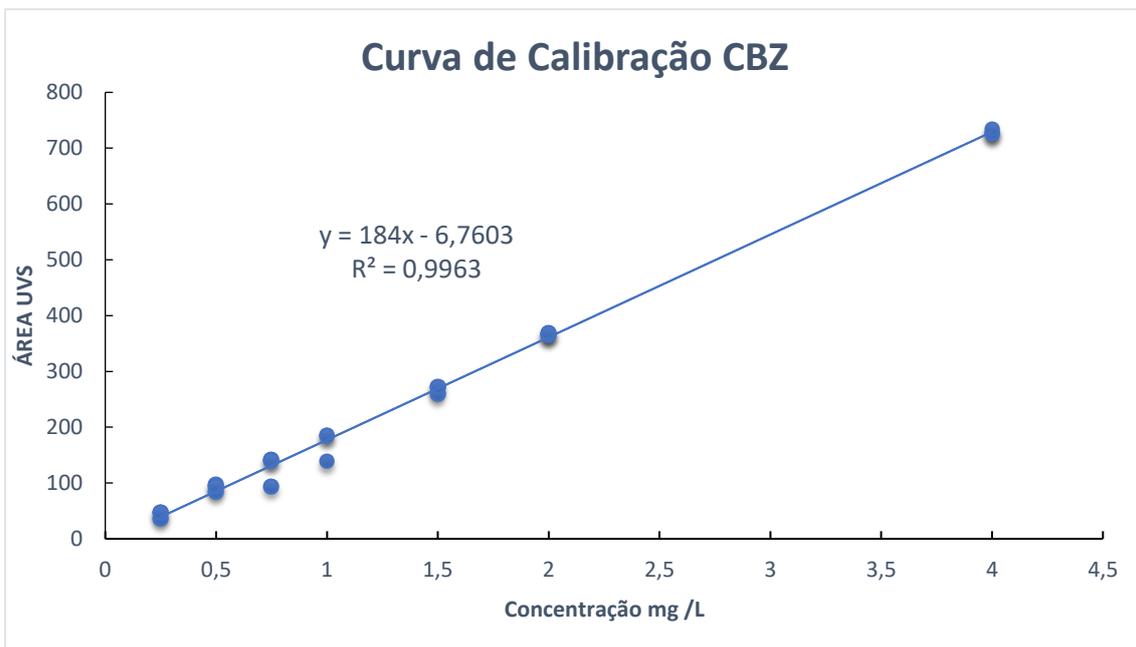
Reta de calibração para a Furosemida



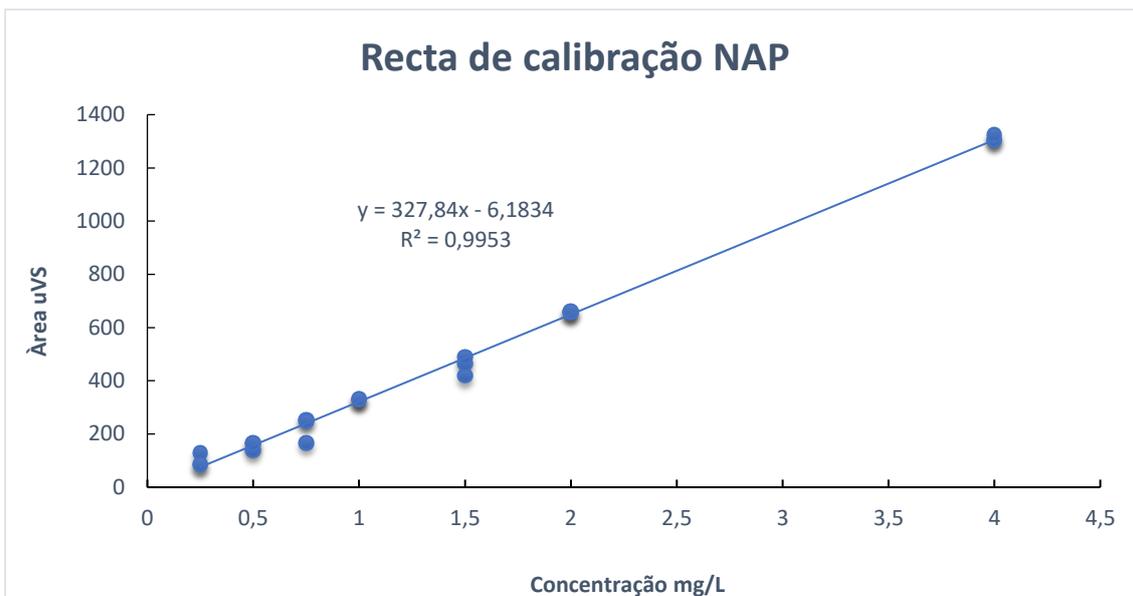
Reta de calibração para o Trimetoprim, obtida por HPLC-UV



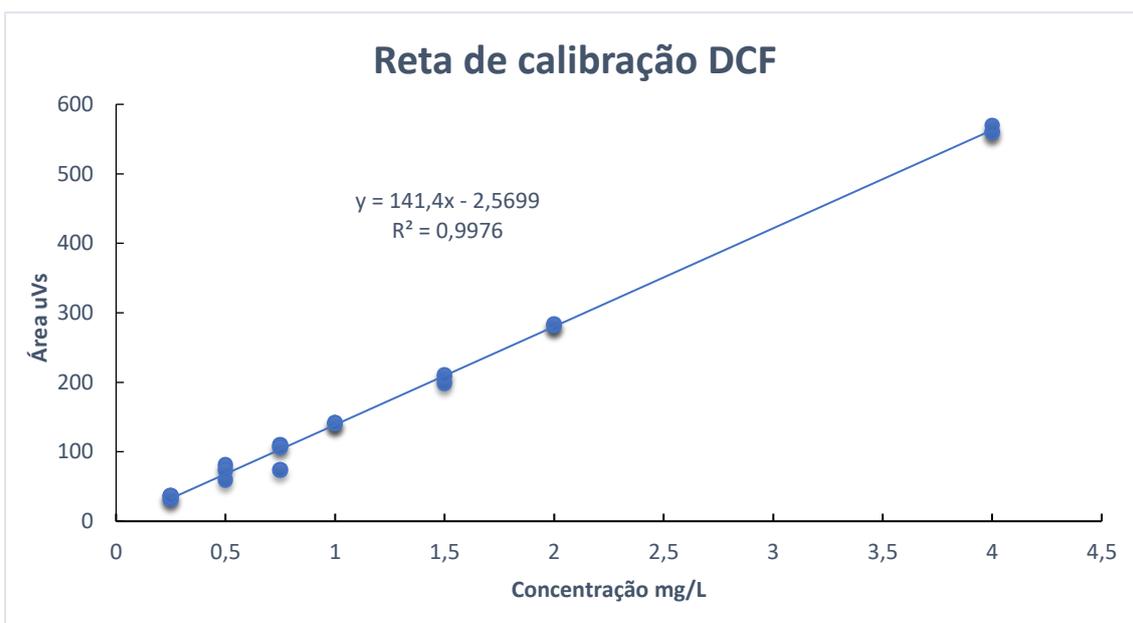
Retra de calibração para o Sulfametoxazol, obtida por HPLC-UV



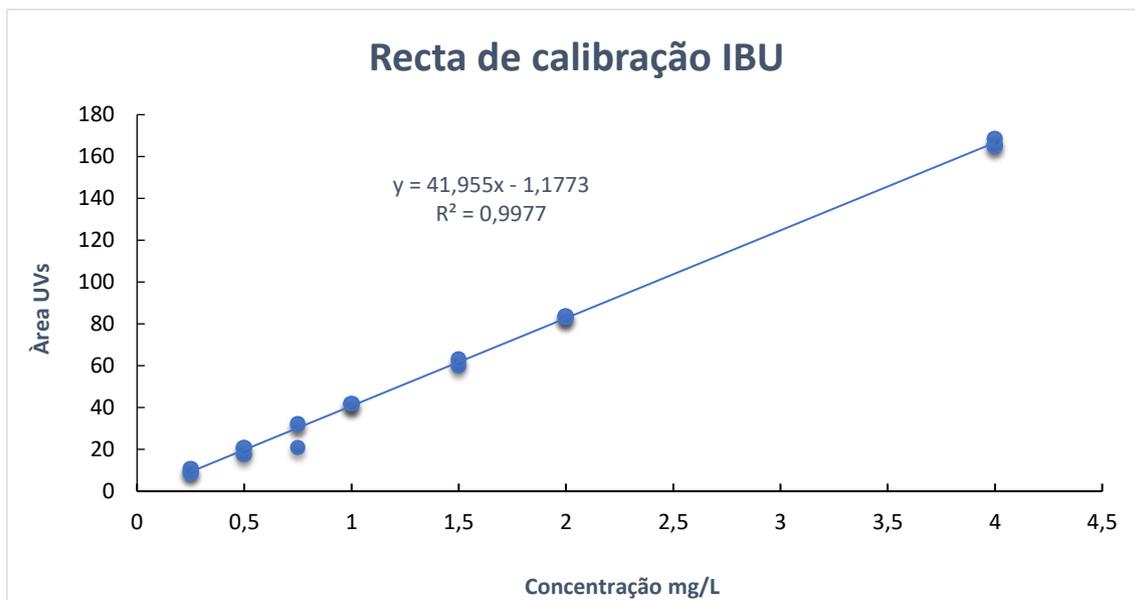
Retra de calibração para a Carbamazepina, obtida por HPLC-UV



Retra de calibração para Naproxeno, obtida por HPLC-UV



Retra de calibração para o Diclofenac, obtida por HPLC-UV



Retra de calibração para o Ibuprofeno, obtida por HPLC-UV