

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

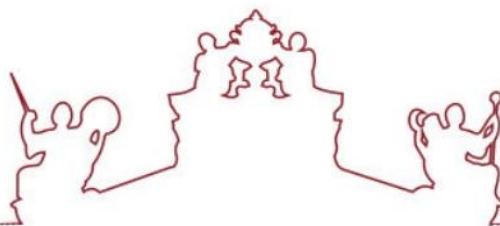
Dissertação

**Estratégias de biorremediação para águas poluídas com
fármacos**

Hugo Reinaldo Cunha Carrão

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

Évora 2025



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

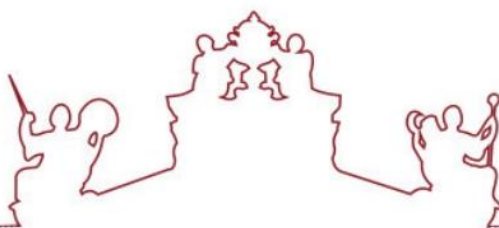
Dissertação

**Estratégias de biorremediação para águas poluídas com
fármacos**

Hugo Reinaldo Cunha Carrão

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

Évora 2025



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

Presidente | Ana Rodrigues Costa (Universidade de Évora)

Vogais | Alfredo Jorge Palace Carvalho (Universidade de Évora) (Orientador)
António Manuel Teixeira Martins do Canto (Universidade de Évora) (Arguente)

Resumo

Neste trabalho avaliou-se o potencial do *Bacillus pumilus* na remoção/biodegradação de fármacos frequentemente encontrados em águas residuais, nomeadamente, ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno e carbamazepina, visando a otimização de microcosmos de Leitos Construídos de Macrófitas (LCMs) para a remoção deste tipo de poluentes. A bactéria demonstrou capacidade de crescimento em meios contendo os fármacos isoladamente ou em mistura (2 a 8 mg/L), apresentando apenas toxicidade leve às concentrações mais elevadas. As eficiências máximas de remoção registadas após 50 horas foram de 11,5% para o ibuprofeno, 15,5% para o diclofenaco, 26,7% para o naproxeno e 14,4% para a carbamazepina.

Também se analisou a remoção dos fármacos após inoculação direta da bactéria numa matriz composta por materiais argilosos e cortiça granulada, observando-se ganhos na eficiência de remoção. Os resultados obtidos são promissores e sugerem a introdução e otimização da ação do *Bacillus pumilus* em LCMS para melhorar a eficiência de remoção de fármacos.

Palavras-chave: *Bacillus*; Bactérias; Fármacos; Leitos Construídos de Macrófitas; Biodegradação

Bioremediation strategies for water polluted with pharmaceuticals

Abstract

In this work an assessment was made of the potential of *Bacillus pumilus* for the removal/biodegradation of pharmaceuticals frequently found in wastewater, namely ibuprofen, diclofenac, naproxen and carbamazepine, aiming at the optimization of Constructed Wetland Systems (CWS) microcosms for the removal of this type of pollutant. Bacteria were able to grow in media containing the pharmaceuticals alone or in a mixture (2 to 8 mg/L), exhibiting only mild toxicity at higher concentrations. The maximum removal efficiencies after 50 hours were 11.5% for ibuprofen, 15.5% for diclofenac, 26.7% for naproxen and 14.4% for carbamazepine.

The removal of pharmaceuticals was also analyzed after direct inoculation of the bacteria into a matrix composed of clay materials and granulated cork, and gains in removal efficiencies were observed. The results obtained are promising and suggest introducing and optimizing the action of *Bacillus pumilus* in CWS to improve pharmaceutical removal efficiencies.

Keywords: *Bacillus*; Bacteria; Pharmaceuticals; Constructed Wetlands; Biodegradation

Índice

Resumo	1
Abstract	2
Índice	3
Índice de figuras	6
Índice de tabelas.....	8
Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	10
Problemática.....	12
Objetivos.....	13
1. Revisão bibliográfica.....	14
1.1 Fármacos: principais fontes e efeitos no ambiente	14
1.2 Fármacos em Portugal	17
1.2.1 Ibuprofeno	21
1.2.2 Naproxeno.....	22
1.2.3 Diclofenaco.....	23
1.2.4 Carbamazepina	24
1.3 Remoção de fármacos nas ETARs: Limitações e mecanismos	25
1.3.1 Processos complementares de tratamento de águas residuais	27
1.4 Leitões contruídos de macrófitas	32
1.4.1 Componentes dos LCM's	34
1.4.1.1 Vegetação.....	34
1.4.1.2 Typha spp.	35
1.4.1.3 População microbiana	36
1.4.1.4 Bacillus pumilus	37
1.4.1.5 Matriz de suporte	40
1.4.1.6 Agregados de argila expandida (LECA)	41
1.4.1.7 Vermiculite esfoliada	42
1.4.1.8 Cortiça termicamente tratada.....	43
1.4.2 Remoção de fármacos em LCMs	44
1.4.2.1 Processos bióticos	45
1.4.2.2 Processos abióticos.....	49
2. Metodologia Experimental	52
2.1 Reagentes e materiais.....	52
2.2 Método analítico para quantificação de fármacos em solução aquosa	54

2.2.1	Desenvolvimento do método	54
2.2.2	Otimização do método analítico.....	55
2.2.2.1	Determinação do comprimento de onda	55
2.2.2.2	Quantificação por HPLC/UV-Vis	55
2.2.2.3	Validação do método analítico	56
2.2.2.4	Seleção de filtros e otimização do volume de amostra a filtrar	58
2.3	Estudo da capacidade de remoção dos fármacos pela bactéria	58
2.3.1	Microrganismos	58
2.3.2	Meio de cultura e condições de crescimento	59
2.3.3	Preparação do inóculo.....	60
2.3.4	Estudo do crescimento, em descontínuo, das bactérias suspensas em meio líquido	61
2.3.5	Estudo da capacidade de remoção/degradação dos fármacos pela bactéria em meio líquido	62
2.4	Estudo da capacidade de adsorção dos fármacos à biomassa da bactéria <i>Bacillus pumilus</i>	64
2.4.1	Estudos de inativação de bactérias	64
2.4.2	Estudo da contribuição para remoção dos fármacos pela bactéria inoculada na matriz de suporte.....	67
2.4.2.1.	Preparação dos materiais.....	68
2.4.2.2.	Caracterização físico-química da matriz de suporte	68
2.4.2.3.	Avaliação da remoção dos fármacos pela matriz de suporte inoculada com <i>B. pumilus</i>	69
2.5	Análise estatística	70
3.	Resultados e discussão	71
3.1	Otimização do método analítico para a quantificação de fármacos em solução aquosa	71
3.1.1	Seleção do comprimento de onda de quantificação.....	71
3.1.2	Quantificação por HPLC/UV-Vis	73
3.1.3	Validação do método analítico	74
3.1.4	Otimização das condições de filtração das amostras.....	77
3.2	Caracterização das curvas de crescimento do <i>Bacillus pumilus</i>	80
3.3	Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento do <i>B. pumilus</i>	83
3.4	Estudo da capacidade de remoção de fármacos pela bactéria <i>B. pumilus</i> ..	86
3.4.1	Avaliação do efeito da exposição de fármacos no crescimento da cultura de <i>Bacillus pumilus</i>	86
3.4.1.1	Avaliação do efeito da concentração e da mistura dos fármacos no crescimento do <i>Bacillus pumilus</i>	90

3.4.2	Estudo da capacidade de remoção de fármacos pela bactéria <i>Bacillus pumilus</i> através de processos de adsorção	99
3.4.2.1	Estudo da inativação do <i>Bacillus pumilus</i>	100
3.5	Avaliação da capacidade de degradação/remoção dos fármacos em estudo pela bactéria <i>Bacillus pumilus</i>	103
3.6	Estudo da contribuição para remoção dos fármacos pela bactéria inoculada na matriz de suporte.....	110
4.	Conclusão e Perspetivas Futuras	121
5.	Bibliografia.....	124

Índice de figuras

Figura 1.1 – Principais vias de contaminação por fármacos e respectivos metabolitos, baseado na imagem de (Quesada et al., 2019).	17
Figura 1.2 - Esquema ETAR convencional.	27
Figura 1.3 - Classificação de leitos constuídos de macrófitas, relativamente ao escoamento. a) Fluxo superficial livre, b) Fluxo sub-superficial – horizontal e c) Fluxo sub-superficial – vertical Adaptado de (H. Zhang et al., 2023).	33
Figura 1.4 - Classificação de leitos construídos de macrófitas, relativamente à vegetação. Adaptado de (V. L. M. da Silva, 2024).	34
Figura 1.5 - <i>Typha</i> spp.	36
Figura 1.6 - <i>Bacillus pumilus</i>	37
Figura 1.7 – Grânulos de agregados expandidos de argila.	42
Figura 1.8 – Vermiculite expandida.	43
Figura 1.9 - Cortiça tratada termicamente.	44
Figura 1.10 - Interações entre os componentes dos leitos contruídos de macrófitas. Adaptado de (Dordio & Carvalho, 2018).	45
Figura 1.11 - Processos/mecanismos dos leitos construídos de macrófitas. Adaptado de (Dordio & Carvalho, 2018)	51
Figura 2.1 - Esquema do procedimento experimental efetuado para o estudo do crescimento de <i>B. pumilus</i> em descontínuo e estudo da remoção de fármacos em solução pelas bactérias. (Created with BioRender.com)	61
Figura 2.2 - Esquema geral da montagem de cada um dos ensaios para as três concentrações diferentes para cada um dos fármacos em estudo e para a mistura dos quatro fármacos. (MC - Meio de cultura) (Created with Biorender.com)	63
Figura 2.3 - Esquemas dos tratamentos de inativação. A - Tratamento térmico. B - Tratamento por ultrassons. C - Tratamento térmico + ultrassons. Created with BioRender.com	66
Figura 2.4 - Esquema do procedimento realizado para estudo da capacidade de remoção dos fármacos pela matriz inoculada com as bactérias. (Created with BioRender.com).	70
Figura 3.1 - Espectro de absorção molecular na zona do UV dos fármacos ibuprofeno, carbamazepina, naproxeno e diclofenaco.	72
Figura 3.2 - Cromatograma obtido por HPLC/UV-Vis para uma solução padrão com ibuprofeno (2 mg/L), naproxeno (2mg/L), diclofenaco (2 mg/L) e carbamazepina (2mg/L).	73
Figura 3.3 - Percentagens de recuperação para os diferentes fármacos a uma concentração de 2,5 mg/L, após filtração utilizando filtros PTFE.	78
Figura 3.4 - Percentagens de recuperação para os diferentes fármacos a uma concentração de 10 mg/L, após filtração utilizando filtros PTFE.	79
Figura 3.5 - Curva de crescimento do <i>Bacillus pumilus</i> em meio de cultura líquido com glucose (Rep1, Rep 2 e Rep 3) e sem glucose.	80
Figura 3.6 - Curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> . na presença de ibuprofeno (2 mg/L) e na ausência ou presença de glucose.	87
Figura 3.7 - Curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> . na presença de naproxeno (2 mg/L) e na ausência ou presença de glucose.	88
Figura 3.8 - Curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> . na presença de diclofenaco (2 mg/L) e na ausência ou presença de glucose.	89

Figura 3.9 - Curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> . na presença de carbamazepina (2 mg/L) e na ausência ou presença de glucose.....	90
Figura 3.10 - Curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> na presença de ibuprofeno em diferentes concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) e na sua ausência (controle).	91
Figura 3.11 - Curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> na presença de naproxeno em diferentes concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) e na sua ausência (controle).	93
Figura 3.12 - Curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> na presença de diclofenaco em diferentes concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) e na sua ausência (controle).	95
Figura 3.13 - Curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> na presença de carbamazepina em diferentes concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) e na sua ausência (controle).	96
Figura 3.14 - Curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> na presença dos quatro fármacos misturados (2 mg/L cada um), apenas na presença de glucose e na sua ausência (controles).....	97
Figura 3.15 - Percentagem de remoção de ibuprofeno para os três ensaios (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) nos Erlenmeyers I e VI.	104
Figura 3.16 - Percentagem de remoção de naproxeno para os três ensaios (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) nos erlenmeyers I e VI.....	106
Figura 3.17 - Percentagem de remoção de diclofenaco para os três ensaios (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) nos erlenmeyers I e VI.....	107
Figura 3.18 - Percentagem de remoção de carbamazepina para os três ensaios (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) nos erlenmeyers I e VI.....	108
Figura 3.19 - Taxas de remoção final dos fármacos em estudo, ao fim de 50 horas, para as concentrações de 2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L, estudados nos ensaios dos erlenmeyers I.	109
Figura 3.20 - Percentagem de remoção de ibuprofeno.	112
Figura 3.21 - Percentagem de remoção do naproxeno.	114
Figura 3.22 - Percentagem de remoção do diclofenaco.	115
Figura 3.23 - Percentagem de remoção da carbamazepina.	116
Figura 3.24 - Concentração de fármacos removidos após 144 horas nas diferentes condições de ensaio.	117
Figura 3.25 - Percentagem de remoção de cada fármaco após 144 horas nas diferentes condições de ensaio.....	118

Índice de tabelas

Tabela 1.1- Fármacos encontrados em amostras ambientais em Portugal, com concentrações mínimas e máximas.	18
Tabela 1.2- Propriedades físicas e químicas do ibuprofeno, (Adaptado de (Carvalho, 2025; PubChem, 2025c).....	22
Tabela 1.3- Propriedades físicas e químicas do naproxeno, (adaptado de (PubChem, 2025d; V. L. M. da Silva, 2024)	23
Tabela 1.4- Propriedades físicas e químicas do diclofenaco, (adaptado de(Fortunato, 2014; PubChem, 2025b).....	24
Tabela 1.5- Propriedades físicas e química da carbamazepina, (adaptado de (PubChem, 2025a; V. L. M. da Silva, 2024)	25
Tabela 1.6 - Taxas de remoção de diferentes fármacos por diferentes espécies de bactérias.	38
Tabela 2.1- Características das substâncias químicas utilizadas e os seus fornecedores.....	52
Tabela 2.2- Características físico-químicas dos materiais e misturas de materiais utilizados na composição da matriz de suporte.....	53
Tabela 2.3. Composição do meio de cultura (adaptado de (Marchlewicz et al., 2016).59	
Tabela 3.1 - Estatística de regressão das retas de calibração e valores de LDI e LQI calculados para cada um dos fármacos.	74
Tabela 3.2 - Parâmetros para avaliação da repetibilidade do HPLC/UV-Vis.	75
Tabela 3.3 - Parâmetros para avaliação da reprodutibilidade do HPLC/UV-Vis.	76
Tabela 3.4- Parâmetros cinéticos obtidos a partir do ensaio do crescimento do <i>Bacillus pumilus</i>	85
Tabela 3.5 - Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento do <i>B. pumilus</i> em estudos publicados.	85
Tabela 3.6 - Parâmetros cinéticos obtidos para as curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> para as diferentes concentrações de ibuprofeno (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L). .	92
Tabela 3.7 - Parâmetros cinéticos obtidos para as curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> para as diferentes concentrações de naproxeno (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L). .	94
Tabela 3.8 - Parâmetros cinéticos obtidos para as curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> para as diferentes concentrações de diclofenaco (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L). .	95
Tabela 3.9 - Parâmetros cinéticos obtidos para as curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> para as diferentes concentrações de carbamazepina (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L).	97
Tabela 3.10 - Parâmetros cinéticos obtidos para as curvas de crescimento do <i>B. pumilus</i> quando exposto aos quatro fármacos em simultâneo (2 mg/L de cada fármaco) e para o controlo com apenas a bactéria e meio com glucose.	98
Tabela 3.11 - Condições de inativação utilizadas no processo de inativação do <i>Bacillus pumilus</i>	102
Tabela 3.12 – Algumas características físico-químicas determinadas para a matriz de suporte estratificada composta por uma camada inicial de LECA 2/4+vermiculite 3 (1:1, v/v), seguida de uma camada de grânulos de cortiça expandida (3/5) e uma camada final de LECA+vermiculite (1:1,v/v) em proporções relativas 5:3:4.....	111
Tabela 3.13 - Comparação entre as percentagens de remoção dos fármacos pela matriz estratificada (com e sem microrganismos) obtidas no presente trabalho, ao fim	

de 144 h, e as obtidas noutros trabalhos com a mesma matriz estratificada, ao fim de
168 h. 120

Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

AC – Corrente alternada (do inglês *alternating current*)

AINE's – Anti-inflamatórios não esteróides

BRA – Bactérias resistentes a antibióticos

CBZ – Carbamazepina

c.d.o. – Comprimento de onda

DC – Corrente contínua (do inglês *direct current*)

DCF - Diclofenaco

DO_{600nm} – Densidade ótica a 600 nm

DPR – Desvio Padrão Relativo

EC – Eletrocoagulação

ETARs - Estações de Tratamento de Águas Residuais

FSL – Fluxo superficial livre

FSS – Fluxo sub-superficial

FSS-H – Fluxo sub-superficial horizontal

FSS-V – Fluxo sub-superficial vertical

g – Tempo de geração

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *high performance liquid chromatography*)

IBU - Ibuprofeno

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

LCMs - Leitos Construídos de Macrófitas

LDI – Limite de deteção instrumental

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

LQI – Limite de quantificação instrumental

MC – Meio de cultura

n – Número de gerações

NAP - Naproxeno

ND – Não detetado

PAO – Processos avançados de oxidação

PTFE – Politetrafluoretileno

ROS – Espécies reativas de oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

SC – Suspensão concentrada

US – Ultrassons

UV – Ultravioleta

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

μ máx – Velocidade específica máxima de crescimento

Problemática

Nos últimos anos, o aumento da detecção de poluentes emergentes em águas, como fármacos (e os seus metabolitos), produtos de cuidados pessoais, cosméticos, surfactantes, pesticidas e outros compostos com potencial de perturbação endócrina, têm gerado preocupação a nível mundial. Estes poluentes de origem antrópica, documentados devido aos seus efeitos adversos no ambiente e na saúde humana (Corcoran et al., 2010; Gogoi et al., 2018; Hejna et al., 2022), representam riscos complexos devido à sua persistência e potencial de bioacumulação.

Estes contaminantes, são de forma geral, detetados em concentrações muito baixas no ambiente (ng/L-µg/L), provenientes de origens variadas (Corcoran et al., 2010; Petrie et al., 2015). Porém, no caso dos fármacos as águas residuais urbanas tratadas constituem uma das principais vias de entrada no ambiente. Isto acontece porque as ETARs foram originalmente projetadas para remover poluentes convencionais, nomeadamente compostos orgânicos de origem fecal, compostos de azoto e fósforo, facilmente ou moderadamente biodegradáveis, e de microrganismos patogénicos. Por essas razões, estas infraestruturas não estão devidamente preparadas para remover poluentes emergentes mais complexos, como compostos farmacêuticos, cujas estruturas químicas e baixas concentrações apresentam um desafio à sua remoção (Couto et al., 2019; Dordio & Carvalho, 2018; Hernández-Tenorio et al., 2022; Martín-Pozo et al., 2019; Tiwari et al., 2017; Vystavna et al., 2017). Esta limitação das ETARs tornou evidente a necessidade de se desenvolver metodologias alternativas ou complementares que sejam eficientes e económicas na remoção de poluentes como os fármacos (Dordio et al., 2010, 2011).

Os sistemas de leitos contruídos de macrófitas (LCMs) são uma fitotecnologia que tem apresentado sucesso na remoção de xenobióticos orgânicos em solos, águas naturais e águas residuais contaminadas. Estes sistemas artificiais, são ecossistemas diversificados e naturalmente produtivos, que têm a capacidade de simular a capacidade depurativa de zonas húmidas naturais ao utilizar os mesmos processos físicos, químicos e biológicos de forma otimizada e controlada de modo a conseguir uma maior eficiência na remoção de poluentes. Além de apresentarem uma boa remoção de poluentes também têm a vantagem de apresentar baixos custos de operação e serem visualmente atrativos (Biswal & Balasubramanian, 2022; Dordio & Carvalho, 2018; Khalifa et al., 2020).

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal aprimorar a eficiência de microcosmos de Leitos Construídos de Macrófitas (LCMs), na remoção de ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno e carbamazepina presentes em soluções aquosas dopadas. Assim investigou-se o uso da bactéria *Bacillus pumilus* como inoculante em sistemas constituídos por *Typha spp.* e uma matriz de suporte estratificada (LECA + vermiculite e cortiça tratada na proporção de 5:3:4).

De modo a atingir o objetivo principal, é necessário cumprir objetivos específicos como:

- Otimizar e validar o método analítico para a quantificação dos fármacos presentes na solução aquosa, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV-Vis;
- Otimizar as condições de crescimento da bactéria *Bacillus pumilus*, em meio de cultura líquido;
- Caracterizar a cinética de crescimento bacteriano em descontínuo. Determinar parâmetros cinéticos de crescimento;
- Avaliar a capacidade de biodegradação/remoção dos fármacos em estudo pela bactéria em meio de cultura líquido, distinguindo a contribuição da adsorção e da metabolização;
- Avaliar a capacidade de biodegradação/remoção de fármacos pelo *Bacillus pumilus* inoculadas diretamente na matriz de suporte;
- Avaliar a eficiência de remoção de fármacos em microcosmos de LCMs inoculados com *Bacillus pumilus*;
- Avaliar a suscetibilidade dos fármacos serem removidos através de processos abióticos alternativos, que potenciem a sua remoção (ex: fotólise, hidrólise).

1.Revisão bibliográfica

1.1 Fármacos: principais fontes e efeitos no ambiente

Os poluentes emergentes têm recebido crescente atenção a nível global, destacando-se os fármacos como um dos principais focos de estudo. Este aumento de interesse está relacionado com o crescimento do consumo de medicamentos nas últimas décadas, impulsionado por vários fatores, como o crescimento da população, maior investimento no setor da saúde, avanços na pesquisa e desenvolvimento, a disponibilidade crescente de produtos farmacêuticos no mercado. Além disso, o envelhecimento da população nos países desenvolvidos tem contribuído para o aumento do uso de medicamentos, uma vez que pessoas idosas tendem a consumir mais medicamentos devido a problemas de saúde associados à idade (aus der Beek et al., 2016; dos Santos et al., 2021; Hernández-Tenorio et al., 2022; Ibáñez et al., 2021; T. Zhou et al., 2023).

Os fármacos são químicos biologicamente ativos utilizados para diagnosticar, tratar, aliviar e prevenir doenças em seres humanos e animais. Esta definição também se aplica a compostos veterinários e também se pode aplicar a drogas ilícitas, embora as estas sejam proibidas por lei. Anualmente são produzidos diferentes tipos de fármacos, como antibióticos, hormonas sintéticas, anti-inflamatórios, estatinas e citotoxinas que são consumidas regularmente, sendo que algumas delas são consumidas na ordem dos milhares de toneladas por ano (Dordio & Carvalho, 2018; Quesada et al., 2019; T. Zhou et al., 2023). Os produtos farmacêuticos são considerados um grupo de compostos de importância relevante no contexto de risco ambiental, uma vez que nos últimos anos tem-se reconhecido o risco que estes compostos podem causar, apesar dos primeiros relatórios da presença de produtos farmacêuticos em águas residuais e naturais terem sido publicados em 1977-1978, resultando num maior número de estudos de forma a perceber o seu impacto em diferentes ecossistemas (Caban & Stepnowski, 2021; Maculewicz et al., 2022).

Atualmente, graças ao avanço das técnicas analíticas e equipamentos laboratoriais, sabe-se que a presença destes compostos é ubíqua no ambiente, e cada vez mais se percebe os seus modos de ação em organismos que não eram originalmente os alvos, possibilitando estimar as consequências deste fenómeno (aus der Beek et al., 2016; Dordio & Carvalho, 2018; Ibáñez et al., 2021; Maculewicz et al., 2022).

Os compostos farmacêuticos diferenciam-se de outros contaminantes químicos uma vez que estes apresentam características específicas. Muitas destas substâncias são quimicamente complexas, com grande diversidade em termos de peso molecular, estrutura, funcionalidade e forma (Dordio & Carvalho, 2018; Quesada et al., 2019). Além do mais, possuem a capacidade de atravessar membranas celulares, o que contribui para a sua persistência no organismo e no ambiente, desde que não sejam inativadas ou degradadas antes de produzirem o seu efeito terapêutico desejado (Dordio & Carvalho, 2018; Quesada et al., 2019). Normalmente são moléculas polares com mais de um grupo ionizável, cujo grau de ionização, e outras propriedades físico-químicas, depende do pH do meio. Além disso tendem a ser lipofílicos, embora alguns sejam moderadamente solúveis em água. A sua persistência no ambiente pode variar significativamente: alguns fármacos como a eritromicina, naproxeno e sulfametoxazol podem persistir no ambiente cerca de um ano, enquanto outros, como o ácido clofíbrico e a carbamazepina podem persistir durante vários anos e tornar-se biologicamente ativos devido à sua acumulação (Dordio & Carvalho, 2018; Quesada et al., 2019). Após a sua administração, estas substâncias são absorvidas pelo corpo humano, distribuídas pelos diferentes tecidos e metabolizadas, podendo sofrer alterações na sua estrutura química. Esses processos podem dar origem a metabolitos que em conjunto com o composto original, contribuem para a ampliação do espectro de contaminantes presentes no ambiente (Dordio & Carvalho, 2018; Quesada et al., 2019).

Estas características permitem que os fármacos facilmente acabem em águas residuais tratadas, que ao serem descarregadas no ambiente, podem contaminar recursos destinados ao consumo humano (Mackuľak et al., 2019; J. L. Zhou et al., 2009).

Ao longo do ciclo de vida de um produto farmacêutico, existem diferentes etapas onde resíduos podem ser libertados nos sistemas hídricos. Logo na fase de fabrico, grandes quantidades de contaminantes farmacêuticos podem ser descarregadas no ambiente através de águas residuais não tratadas ou tratadas de forma insuficiente (T. Zhou et al., 2023). Adicionalmente, os efluentes domésticos, hospitalares e de explorações agropecuárias, constituem importantes fontes de contaminação, uma vez que uma grande proporção de fármacos e seus metabolitos são excretados na urina e fezes, visto que muitos compostos não são totalmente metabolizados e absorvidos pelo organismo. Estes resíduos acabam por ter como destino as águas residuais e posteriormente as estações tratamento de águas residuais (ETARs), onde nem sempre são eficazmente removidos (Dordio & Carvalho, 2018; R. Kumar et al., 2022; Tran et al., 2018; T. Zhou et al., 2023). Contudo é de notar que alguns hospitais tratam as suas águas residuais antes de serem descarregadas nos esgotos, de modo a minimizar a disseminação de doenças

infeciosas, mas a remoção dos contaminantes farmacêuticos continua a ser baixa (T. Zhou et al., 2023). Além das águas residuais, os resíduos sólidos provenientes de unidades de produção de fármacos, hospitais e residências são por norma depositados em aterros, o que leva a que uma grande quantidade e variedade de contaminantes farmacêuticos sejam detetados em lixiviados de aterros, que por sua vez podem contaminar os solos e águas subterrâneas (T. Zhou et al., 2023).

Outro comportamento que promove o aumento de fármacos na nossa cadeia alimentar é a utilização de excrementos, provenientes do gado e aves, como fertilizante em solos agrícolas. Também se deve ter em atenção que muitas vezes as lamas das ETARs são utilizadas como fertilizante, cerca de 40 % das lamas produzidas na União Europeia são aplicadas em terras agrícolas e outros 12 % são utilizadas indiretamente sob a forma de composto (M. Kumar et al., 2019; Mackuľak et al., 2019; Martín-Pozo et al., 2019; T. Zhou et al., 2023). Uma vez que a eficiência de remoção de compostos farmacêuticos no tratamento das lamas varia entre 0 % e 50 %, estes contaminantes acabarão por aparecer no ambiente (T. Zhou et al., 2023).

Nos países em desenvolvimento, onde os regulamentos sanitários não são rigorosos o suficiente, as águas residuais e os resíduos sólidos de indústrias, hospitais e residências são libertados diretamente no ambiente sem qualquer tipo de tratamento, estas descargas resultam numa ampla ocorrência de contaminantes farmacêuticos em ambientes aquáticos (T. Zhou et al., 2023).

Devido à descarga contínua de fármacos para o ambiente, até hoje, já foram identificados mais de 600 fármacos diferentes em ambientes aquáticos, em mais de 70 países diferentes, com concentrações entre os, ng/L e os µg/L, e a lista de contaminantes detetados continua a aumentar a um ritmo constante (Dordio & Carvalho, 2018; R. Kumar et al., 2022; Quesada et al., 2019; T. Zhou et al., 2023). Embora presentes em baixas concentrações a sua ecotoxicidade está associada à longa exposição, pela ação cumulativa e até mesmo sinérgica dos fármacos (Dordio & Carvalho, 2018; J. L. Zhou et al., 2009). Na **Figura 1.1** encontra-se um esquema simplificado de como os contaminantes chegam até às águas destinadas ao consumo humano.

Algumas das consequências da exposição contínua a produtos farmacêuticos são, por exemplo, o aumento do número de bactérias resistentes a antibióticos (BRA), tal como o aumento do aparecimento de genes resistentes a antibióticos, o que complica o tratamento de humanos e animais, para alguns patógenos (Mackuľak et al., 2019; Rayan, 2023).

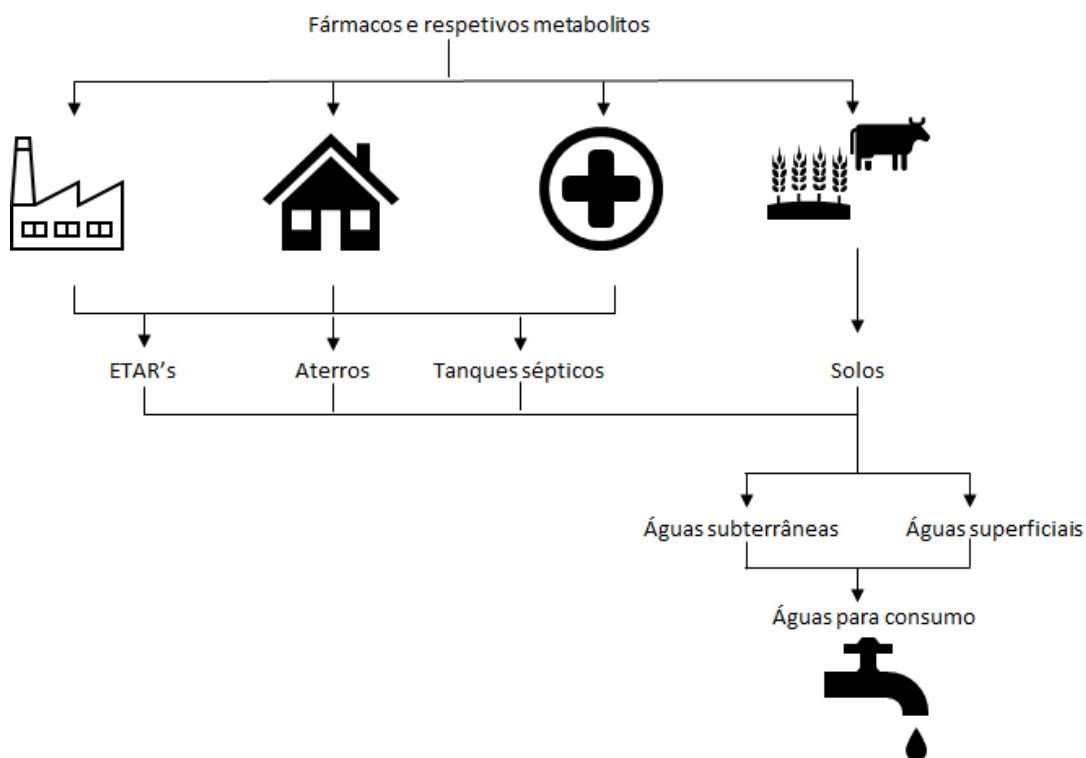


Figura 1.1 – Principais vias de contaminação por fármacos e respetivos metabolitos (adaptado de Quesada et al., 2019).

1.2 Fármacos em Portugal

Em Portugal, a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. (INFARMED), é responsável por regular e supervisionar os setores dos medicamentos e produtos de saúde a nível nacional. Esta entidade publica anualmente estatísticas relativas às quantidades de fármacos e princípios ativos vendidos no país. Conforme dados de 2023, registou-se um aumento de 2,2 % na venda de medicamentos em ambulatório em comparação com 2022. Os grupos farmacoterapêuticos mais vendidos foram os antilipídicos, moduladores do sistema renina-angiotensina, antidiabéticos, antidepressivos e os ansiolíticos, sedativos e hipnóticos. Entre os princípios ativos mais vendidos destacaram-se a atorvastatina, o paracetamol, a

metformina, o bisoprolol e a associação amoxicilina + ácido clavulânico (INFARMED, 2023).

O aumento do consumo de fármacos a nível nacional tem-se refletido na crescente presença destas substâncias no ambiente. Nos últimos anos, diversos estudos de monitorização em várias regiões permitiram identificar fármacos de diferentes classes terapêuticas em amostras ambientais. Os principais compostos identificados são anti-inflamatórios, antibióticos, beta-bloqueadores, estimulantes e diuréticos (de Jesus Gaffney et al., 2015, 2017; Moreira et al., 2022; Palma et al., 2020; T. L. da Silva et al., 2022; Sousa et al., 2020; Teixeira et al., 2020).

Na região do Alentejo, zona onde se desenvolve o presente trabalho, foram conduzidos estudos de monitorização na zona da Amieira e de Évora, abrangendo quatro ribeiras da bacia hidrográfica do Guadiana e cinco ETARs da área de Évora. Nestes estudos foi possível identificar-se variados fármacos em concentrações potencialmente perigosas, incluindo antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos, opioides e outros (Palma et al., 2020; S. Silva et al., 2021).

Na seguinte tabela encontram-se as concentrações de alguns fármacos encontrados em ambientes aquáticos em Portugal.

Tabela 1.1- *Fármacos encontrados em amostras ambientais em Portugal, com concentrações mínimas e máximas.*

Classe de Fármacos	Águas superficiais (ng/L)	Afluentes de ETAR (ng/L)	Efluentes de ETAR (ng/L)	Referências
Analgésicos/Antipiréticos				
Acetominofeno/paracetamol		55 – 623	N.D – 0,05	(de Jesus Gaffney et al., 2017)
	N.D – 527			(Paíga et al., 2016)
	173,91 – 699,60			(Palma et al., 2020)
Ácido acetilsalicílico		N.D – 0,63	N.D	(de Jesus Gaffney et al., 2017)

Classe de Fármacos	Águas superficiais (ng/L)	Afluentes de ETAR (ng/L)	Efluentes de ETAR (ng/L)	Referências
	25,0 – 294			(Paíga et al., 2016)
Anti-inflamatórios Não Esteróides				
		0,46 – 6,5	0,05 – 4,2	(de Jesus Gaffney et al., 2017)
<u>Diclofenaco</u>	N.D – 38			(Paíga et al., 2016)
	23,72 – 72,45			(Palma et al., 2020)
		8 – 53	N.D	(de Jesus Gaffney et al., 2017)
<u>Ibuprofeno</u>	53,7			(Paíga et al., 2016)
	72,14 – 255,80			(Palma et al., 2020)
		N.D – 38	N.D – 3,30	(de Jesus Gaffney et al., 2017)
<u>Naproxeno</u>	N.D – 260			(Paíga et al., 2016)
	50,61 – 90,05			(Palma et al., 2020)
Beta-Bloqueadores				
		0,57 – 2,9	0,22 – 0,69	(de Jesus Gaffney et al., 2017)
Atenolol	16,55 – 23,66			(Palma et al., 2020)
Metoprolol		N.D – 1,1	N.D – 0,09	(de Jesus Gaffney et al., 2017)

Classe de Fármacos	Águas superficiais (ng/L)	Afluentes de ETAR (ng/L)	Efluentes de ETAR (ng/L)	Referências
	12,23 – 22,46			(Palma et al., 2020)
Anti convulsionantes				
		0,82 – 6,5	0,32 – 1,6	(de Jesus Gaffney et al., 2017)
Carbamazepina	24,9 – 214			(Paíga et al., 2016)
	49,37 – 91,32			(Palma et al., 2020)
Antidepressivos				
Oxazepan		N.D – 1,7	N.D – 2,1	(de Jesus Gaffney et al., 2017)
		N.D – 0,05	N.D – 0,03	(de Jesus Gaffney et al., 2017)
Fluoxetina	2,01 – 19,5			(Paíga et al., 2016)
Antidiabéticos				
Metformina		70 – 325	0,05 – 58	(de Jesus Gaffney et al., 2017)

Ao observar-se a **Tabela 1.1**, de acordo com os resultados do estudo de monitorização de de Jesus Gaffney et al. (2017) é possível verificar-se uma diminuição da concentração dos compostos farmacêuticos do afluente da ETAR das Beírolas para o efluente, demonstrando que existe mais eficiência na remoção de um tipo de fármacos do que outros, também foi possível concluir-se neste estudo que a eficiência de remoção global dos fármacos nas ETARs está fortemente ligada com a eficiência do tratamento secundário.

1.2.1 Ibuprofeno

O ibuprofeno (IBU), ácido (RS)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanóico, é um fármacos anti-inflamatório não esteroide (AINE), derivado do ácido propiónico, utilizado para aliviar diversas dores, como enxaquecas, espondilite anquilosante, artrite reumatoide, dor pós-operatória (incluindo intervenções odontológica) e febre (Chahm & Rodrigues, 2017; Chopra & Kumar, 2020; Hadi Yatimzade et al., 2024; Índice, 2025a; Rastogi et al., 2024; A. B. P. M. de S. e Silva, 2020). É atualmente um dos fármacos mais vendido no mundo, sendo altamente prescrito e também amplamente vendido sem receita. Devido à sua elevada taxa de consumo, o ibuprofeno acaba por ser um dos AINEs mais frequentemente detetados em ambientes aquáticos, incluindo águas superficiais (rios, ribeiras e lagos), águas subterrâneas e efluentes de estações de tratamentos de águas residuais (ETARs) (Chahm & Rodrigues, 2017; Chopra & Kumar, 2020; Hadi Yatimzade et al., 2024; Rastogi et al., 2024).

As concentrações detetadas em ambientes aquáticos variam normalmente entre 37 ng/L a 30 µg/L, enquanto que em efluentes de águas residuais as concentrações variam entre 406 ng/L e 2,11 mg/L. A persistência do ibuprofeno é outra característica preocupante, com uma meia-vida que pode variar entre 4,6 dias e 63,6 dias, dependendo das características do corpo de água e das condições ambientais (Rastogi et al., 2024).

A presença deste composto tem sido documentada não só na água, mas também na biota aquática. Estudos comprovam a sua presença na bÍlis de peixes e sua absorção por plantas comestÍveis irrigadas com águas contaminadas, demonstrando o risco potencial de bioacumulação e a sua entrada na cadeia alimentar. (Chopra & Kumar, 2020; Hadi Yatimzade et al., 2024; Rastogi et al., 2024).

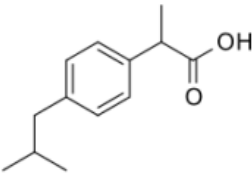
Este fármaco é excretado rapidamente pelos humanos, onde cerca de 15% é excretado inalterado conjugado com glicuronÍdeo ou tiol, e também na forma de metabolitos, como ácido carboxihidratrópico, hidroxibuprofeno e carboxibuprofeno (Chahm & Rodrigues, 2017; Chopra & Kumar, 2020; Hadi Yatimzade et al., 2024; Rastogi et al., 2024).

O crescente consumo de ibuprofeno pela população tem contribuído para o aumento da sua concentração e toxicidade em águas residuais e em diversos corpos hÍdricos, elevando o risco ambiental derivado da sua natureza bioativa, isto é, a sua capacidade de interagir com organismos vivos e provocar efeitos biológicos mesmo em baixas concentrações (Chopra & Kumar, 2020).

Alguns dos efeitos conhecidos devido a exposição prolongada a este fármaco são: danos genéticos e celulares, diminuição do estado de saúde e alterações de parâmetros sanguíneos em diversos organismos (Chopra & Kumar, 2020; Rastogi et al., 2024).

Na tabela abaixo encontram-se as principais propriedades físicas e químicas do ibuprofeno.

Tabela 1.2- Propriedades físicas e químicas do ibuprofeno, (Adaptado de (Carvalho, 2025; PubChem, 2025c)

Fármaco CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Solubilidade em água a 25°C (mg/L)	LogK _{ow}	pKa
Ibuprofeno 15687-27-1	C ₁₃ H ₁₈ O ₂		21	3,97	4,45

1.2.2 Naproxeno

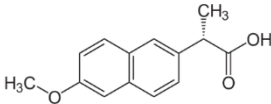
O naproxeno (NAP), ácido (+)-(S)-2-(6-metoxinaft-2-il) propanoico, é um AINE derivado do ácido propiônico, tal como o ibuprofeno, é utilizado principalmente para tratar dores, inflamações, febres e artrite reumatoide (Dzionic et al., 2024; Feng et al., 2021; Índice, 2025b; PubChem, 2025d). É o medicamento ácido polar mais popular utilizado pela população, está disponível sem receita e apresenta baixo custo, relativamente a outros AINE's. Em consequência do seu uso generalizado e da sua degradação incompleta nas ETARs Este fármaco integra a lista de substâncias monitorizadas em águas subterrâneas, águas superficiais e águas potáveis em todas as regiões sob jurisdição das Nações Unidas (Dzionic et al., 2024; Feng et al., 2021; Tehrani et al., 2023).

Nas regiões monitorizadas pelas Nações Unidas a concentração média global detetada foi de 0,050 µg/L e a concentração máxima confirmada no ambiente de 32 µg/L (Dzionic et al., 2024). Embora estas concentrações sejam inferiores ao seu valor de EC₅₀

(concentração efetiva para 50% dos organismos), o impacto ambiental é incerto, pois os efeitos tóxicos podem resultar de interações aditivas ou sinérgicas com outros poluentes presentes no meio. Agravando o problema, acontece que os metabolitos formados por processos físico-químicos e biológicos podem ter toxicidade superior à do composto original (Dzionic et al., 2024; Feng et al., 2021; Tehrani et al., 2023).

Na tabela seguinte encontram-se principais as características físicas e químicas do naproxeno.

Tabela 1.3- Propriedades físicas e químicas do naproxeno, (adaptado de (PubChem, 2025d; V. L. M. da Silva, 2024)

Fármaco CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Solubilidade em água a 25°C (mg/L)	LogK _{ow}	pKa
Naproxeno 22204-53-1	C ₁₄ H ₁₄ O ₃		15,9	3,18	4,15

1.2.3 Diclofenaco

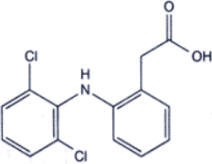
O diclofenaco (DCF), ácido 2-[2-(2,6-dicloroanilino) fenil] acético, é um AINE, derivado do ácido fenilacético, e um dos analgésicos mais utilizados no mundo. Este fármaco está disponível na forma de comprimido oral ou gel tópico sendo recomendado para tratar dor, inflamação aguda ou crónica, como na artrite reumatoide ou lesão aguda (índice, 2025b; Mirzaee et al., 2021; PubChem, 2025b). Devido ao seu extenso consumo é frequentemente detetado em ambientes aquáticos, onde as concentrações reportadas na literatura dependem da localização geográfica, chegando a alcançar valores da ordem de dezenas de ng/L (≈ 40 ng/L) (Liakh et al., 2023). A sua presença representa um risco ecotoxicológico para organismos aquáticos e potencialmente para humanos. Alguns dos efeitos tóxicos reportados em peixes são danos hepáticos, renais e branquiais, observados inclusive em concentrações baixas (≈ 1 µg/L) (Lu et al., 2024). Além disso estudos relatam que a exposição crónica ao diclofenaco está associada a

alterações hemodinâmicas renais, potencial aumento na incidência de tumores na tireoide e a disfunção glomerular (Lu et al., 2024) .

O diclofenaco também tem sido detetado em ambientes de produção agrícola e doméstica, incluindo frutas, vegetais, água potável e águas superficiais, o que pode representar outra via adicional de contaminação aos seres humanos. (Batucan et al., 2022).

Na **Tabela 1.4** encontram-se as características físicas e químicas do diclofenaco.

Tabela 1.4- *Propriedades físicas e químicas do diclofenaco, (adaptado de(Fortunato, 2014; PubChem, 2025b)*

Fármaco CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Solubilidade em água a 25°C (mg/L)	LogK _{ow}	pKa
Diclofenaco 15307-86-5	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂		2,37	4,51	4,15

1.2.4 Carbamazepina

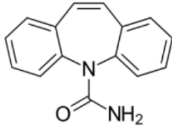
A carbamazepina (CBZ), 5H-Dibenzo[b,f]azepina-5-carboxamida, é um fármaco que demonstrou ser eficaz, como analgésico, medicamento não narcótico e anti convulsionante, sendo atualmente utilizado para o tratamento de alguns transtornos psicológicos, como esquizofrenia, epilepsia e transtorno bipolar, também tem sido utilizado para tratar outras doenças como fibromialgia, dor aguda e crônica (neuralgia do trigêmeo) (Almeida et al., 2021; Batucan et al., 2022; Bogusz et al., 2024; Cui et al., 2024; Índice, 2025a; Kasri et al., 2024; Koba et al., 2016; PubChem, 2025a). É um fármaco bastante utilizado, tendo sido reportado o seu consumo global por ano cerca de 1,014 toneladas recentemente (Almeida et al., 2021). Devido à sua utilização extensiva e ao facto da carbamazepina não ser totalmente metabolizada por humanos, sendo posteriormente excretada, maioritariamente como metabólitos hidroxilados e conjugados(carbamazepina diol e carbamazepina N-glicuronídeo), ser dificilmente

degradada nas ETARs, e apresentar resistência a transformações biológicas e fotoquímicas no ambiente, fazem com que a carbamazepina esteja presente e persista no meio ambiente (Almeida et al., 2021; Bogusz et al., 2024; Kasri et al., 2024; Koba et al., 2016).

Este fármaco tem sido detetado em concentrações que variam entre os ng/L a poucos µg/L em ambientes de água doce e marinho. A sua presença representa uma potencial ameaça à saúde humana e a organismos aquáticos. Alguns dos efeitos nocivos documentados em estudos são a alteração de respostas biológicas em bivalves, acontecendo inclusive a concentrações reduzidas (1 µg/L) de carbamazepina. (Almeida et al., 2021; Cui et al., 2024; Kasri et al., 2024).

Na tabela seguinte encontram-se as características físicas e química da carbamazepina.

Tabela 1.5-Propriedades físicas e química da carbamazepina, (adaptado de (PubChem, 2025a; V. L. M. da Silva, 2024)

Fármaco CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Solubilidade em água a 25° C (mg/L)	LogK _{ow}	pKa
Carbamazepina 298-46-4	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O		17,7	2,45	13,9

1.3 Remoção de fármacos nas ETARs: Limitações e mecanismos

Com o aumento de relevância do tema, sobre a detecção de fármacos no ambiente, e o consequente aumento de pesquisas sobre o tema, estabeleceram-se variadas rotas através das quais os fármacos (e metabolitos, e outros produtos de transformação/degradação) são transportados e distribuídos em diferentes ambientes (aus der Beek et al., 2016; Dordio & Carvalho, 2018).

As estações de tratamento de águas residuais são consideradas o principal fator na disseminação de produtos farmacêuticos (incluindo metabolitos e produtos de

transformação) no meio ambiente, uma vez que os libertam continuamente (Dordio & Carvalho, 2018; Felis et al., 2020; Gogoi et al., 2018; Morin-Crini et al., 2021; Pereira et al., 2016; Petrie et al., 2015). Os fármacos, tal como referido anteriormente, são introduzidos nos sistemas de esgotos à medida que são excretados pelo organismo, tanto na forma não-metabolizada (às vezes correspondendo à maioria da substância inicialmente ingerida) ou na forma de vários metabolitos, além disso, também são frequentemente introduzidos diretamente na rede de esgoto através do descarte inadequado de medicamentos expirados, sendo o destino comum destes contaminantes as ETARs (Dordio & Carvalho, 2018).

As ETARs convencionais, (**Figura 1.2**) foram projetadas com o objetivo de remover vários tipos de poluentes comuns, como matéria orgânica de origem fecal, nutrientes (compostos de azoto e fósforo) e microrganismos patogénicos, não estando devidamente equipadas para a remoção de contaminantes que se encontram em quantidades vestigiais ($\mu\text{g/L}$ e abaixo), como é o caso dos fármacos (Couto et al., 2019; Dordio & Carvalho, 2018; Hernández-Tenorio et al., 2022; Martín-Pozo et al., 2019; Tiwari et al., 2017; Vystavna et al., 2017). Consequentemente, a remoção destes compostos acaba por ser insuficiente, resultando na sua descarga contínua nos efluentes tratados e assim contribuindo para a contaminação dos ambientes aquáticos e de seguida na possível contaminação de sedimentos, de solos, de águas subterrâneas e dos mares (Couto et al., 2019; Dordio & Carvalho, 2018; Martín-Pozo et al., 2019; Taheran et al., 2018).

O tratamento de águas residuais nas ETARs tradicionais consiste na combinação de processos, físico-químicos e biológicos, divididos em diferentes etapas de tratamento do afluente. As principais etapas são, o pré-tratamento, o tratamento primário, secundário e, ocasionalmente, terciário (Gogoi et al., 2018; Jasim, 2020). O pré-tratamento consiste na remoção de matéria sólida de grandes dimensões (madeiras, papel, tecido, plástico), sólidos inorgânicos (areia, cascalho, metal e vidro) e de gorduras e óleos em excesso, através de processos físicos como a gradagem e a desarenação. No tratamento primário ocorre principalmente a remoção de sólidos em suspensão, através de sedimentação ou com recurso a clarificadores, a remoção de fármacos nesta fase é bastante limitada, sendo a adsorção o principal mecanismo de remoção (Couto et al., 2019). No tratamento secundário realiza-se um tratamento biológico de resíduos, normalmente o sistema de lamas ativadas, onde estão presentes uma grande variedade de microrganismos, como bactérias, protozoários, rotíferos, fungos, algas, etc. Estes organismos na presença de oxigénio conseguem converter resíduos orgânicos biodegradáveis em dióxido de carbono, água, material celular e em produtos inertes,

removendo deste modo uma grande quantidade de contaminantes. A maior remoção de fármacos nas ETARs ocorre durante esta fase, principalmente por biodegradação, um processo onde microrganismos decompõem compostos complexos em produtos mais simples (por vezes mais tóxicos), por via enzimática.(Couto et al., 2019; de Jesus Gaffney et al., 2017; Jasim, 2020; Tiwari et al., 2017; Tran et al., 2018). Finalmente pode existir um tratamento terciário onde ocorre a desinfecção das águas residuais e a remoção dos restantes nutrientes, para tal recorre-se à cloração ou utilização de raios ultravioleta (UV) (de Jesus Gaffney et al., 2017; Jasim, 2020).

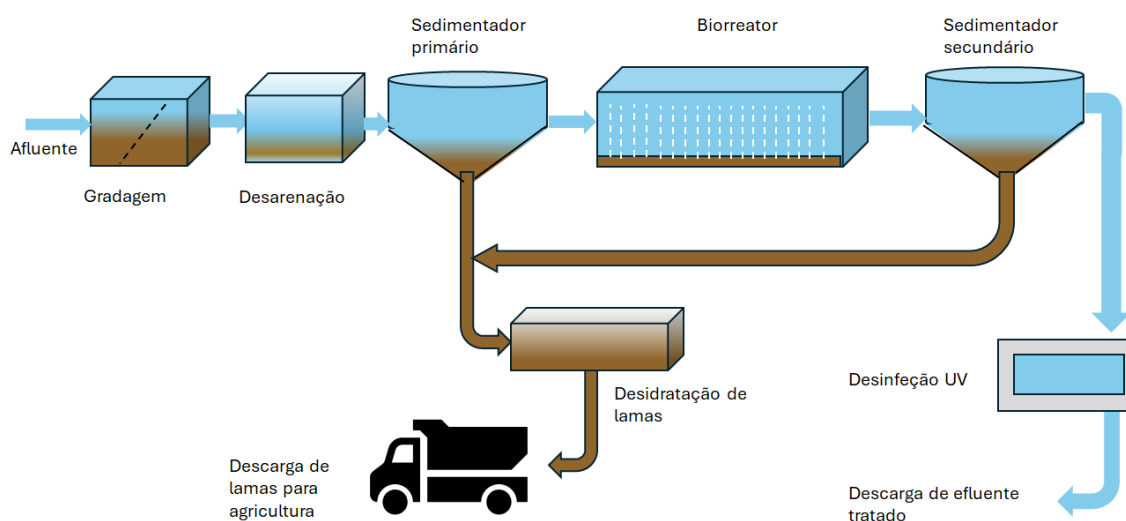


Figura 1.2 - Esquema de uma ETAR convencional.

1.3.1 Processos complementares de tratamento de águas residuais

Uma vez que as ETARs não garantem uma remoção eficiente de fármacos devido à sua ineficiência a lidar com este tipo de compostos, e acabam por descarregar efluentes ainda contaminados com alguns resíduos farmacêuticos, tornou-se necessário procurar processos de tratamento complementares e/ou alternativos que apresentem uma boa relação eficiência/preço e que apresentem facilidade de operar em larga escala (Dordio et al., 2010, 2011).

Variados métodos de tratamento têm sido explorados, para remover fármacos de águas residuais, como (Dordio & Carvalho, 2018; Eniola et al., 2022; Zaied et al., 2020):

a) Adsorção

A adsorção é um método amplamente reconhecido pela sua elevada eficácia na remoção de muitos fármacos presentes nas águas residuais. Destaca-se pela sua alta capacidade de remoção acoplada com um baixo consumo energético, pela sua facilidade de operação e reduzida produção de lodo. No entanto, apresenta algumas limitações, nomeadamente a regeneração do material é bastante dispendiosa, existem perdas de material adsorvente durante o processo de regeneração, diminuição da eficiência após regenerações sucessivas e sensibilidade à variação do pH. Além disso, também existe a possibilidade de poluição secundária associada ao descarte dos materiais adsorventes utilizados. Diversos tipos de materiais adsorventes têm sido utilizados, desde carvão ativado com origem mineral, animal ou vegetal, resina de troca iónica, nanotubos de carbono, quitosano, cinzas volantes a resinas orgânicas (Eniola et al., 2022; Morin-Crini et al., 2022; Nasrollahi et al., 2022; Quesada et al., 2019; Zaied et al., 2020).

b) Processos de filtração por membranas

Os processos de filtração por membranas incluem diversas técnicas, como microfiltração, nanofiltração, ultrafiltração, osmose inversa e osmose direta. Estes processos utilizam membranas que são fabricadas a partir de diferentes materiais, cujas características de filtragem específicas, como a hidrofobicidade, diâmetro dos poros e carga superficial, definem o tipo de contaminantes que podem ser removidos. As suas principais vantagens são que não necessitam de produtos químicos agressivos e podem-se aplicar para a remoção de uma ampla gama de fármacos. Em contrapartida apresentam desvantagens significativas: consumo elevado de energia, operação numa amplitude de fluxos estreita, o investimento é elevado mesmo para indústrias de pequena ou média escala, suscetibilidade ao *fouling*, isto é, o acumulo de contaminantes na superfície do material filtrante (principalmente em águas com carga poluente elevada), necessidade de processos de remoção adicionais para o concentrado obtido, custo de operação e manutenção elevado, e no modo de fluxo cruzado a alta taxa de fluxo pode destruir materiais com elevada sensibilidade. (R. Kumar et al., 2022; Nasrollahi et al., 2022).

c) Processos avançados de oxidação (PAO)

Os processos avançados de oxidação são tecnologias utilizadas para tratar águas contaminadas com fármacos, que também têm demonstrado eficácia na descontaminação de águas residuais municipais, industriais e têxteis. Estes processos necessitam que se formem radicais hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), através de combinações específicas de oxidantes, energia e catalisadores (como semicondutores), para degradar poluentes orgânicos persistentes, como os fármacos, em águas residuais. (Al-Juboori & Hilal, 2023; Eniola et al., 2022)

Os PAO são classificados de acordo com a sua natureza de fase, heterogéneo e homogéneo, ou consoante o método utilizado como base para a produção dos radicais hidroxilo, que englobam diversas tecnologias, nomeadamente:

1. Fotoquímicos – fotólise e foto-fenton
2. Sonoquímicos – ultrassons (US)/sonólise e cavitação hidrodinâmica
3. Químicos – ozonação
4. Eletroquímicos – Foto-eletro-fenton
5. Radiação – Radiação gama e feixe de eletrões

Por norma os PAO são eficientes e universais, ou seja, reagem com qualquer tipo de contaminante. As suas desvantagens são que algumas das tecnologias podem apresentar um consumo elevado de energia, como os US, e apresentam um elevado custo em comparação a métodos de tratamento convencionais. Adicionalmente, exigem quantidades de $\bullet\text{OH}$ e outros reagentes proporcionais à quantidade de contaminantes, tornando o processo pouco eficiente economicamente. Certas técnicas também requerem processos de pré-tratamento precisos e exigentes de forma a garantir um desempenho consistente, o que acresce aos custos de utilização. Por fim, a sua aplicação normalmente não é rentável quando se trata apenas para lidar com grandes volumes de águas residuais (Al-Juboori & Hilal, 2023; Eniola et al., 2022; Zaid et al., 2020).

d) Eletrocoagulação (EC)

A EC é um processo de tratamento de águas residuais que utiliza corrente elétrica como fonte de energia para promover a remoção de contaminantes. Este processo pode funcionar com corrente contínua (DC) ou corrente alternada (AC), sendo a DC a mais utilizada (Abdollahi et al., 2023; Vasudevan et al., 2011; Zaid et al., 2020).

Durante o processo de tratamento de águas residuais, são utilizados elétrodos de ferro (Fe) ou alumínio (Al), que se dissolvem por ação da corrente elétrica, libertando íons metálicos (Fe^{3+} ou Al^{3+}). Estes íons formam hidróxidos metálicos ao reagir com a água, que atuam como agentes coagulantes, sendo responsáveis pela adsorção e aprisionamento de contaminantes, facilitando a agregação e sedimentação de poluentes na água sob a forma de lamas (Abdollahi et al., 2023; Vasudevan et al., 2011; Zaied et al., 2020).

Os principais materiais utilizados nos elétrodos, nomeadamente, o ferro e o alumínio, são escolhidos pois não apresentam toxicidade, são acessíveis, baratos e eficazes. Entre as principais vantagens da EC destacam-se: a capacidade de tratar grandes volumes e cargas orgânicas maiores, uma ótima eficiência de remoção de matéria iónica e coloidal, a operação pode correr em contínuo, custo de elétrodos baixo e é um processo relativamente rápido. Porém também apresenta algumas limitações, como a necessidade de alteração dos elétrodos devido à sua dissolução, existe produção de lodo durante o processo necessitando de atenção adequada e existe limitação na capacidade de coagular certos contaminantes (Zaied et al., 2020).

e) Tratamentos híbridos

Os tratamentos híbridos consistem na combinação de diferentes métodos de tratamento de águas residuais, com o objetivo de aproveitar os mecanismos complementares de remoção de contaminantes e, deste modo, conseguir uma maior eficiência e qualidade de água residual tratada (Eniola et al., 2022; Nasrollahi et al., 2022).

Algumas combinações que apresentaram resultados positivos incluem a hibridização de ultrafiltração ou osmose inversa com carvão ativado em pó, o que permite aumentar a eficiência do processo e diminuir o *fouling* das membranas. Outra combinação eficaz é a junção de PAO com processos de filtração com membranas, que podem adotar diferentes configurações, por exemplo, utilizar PAO como um pré-tratamento para degradar compostos orgânicos antes da fase da separação por membranas, de modo a conseguir maior eficiência na remoção de poluentes (Nasrollahi et al., 2022).

A grande desvantagem dos tratamentos híbridos é que processos integrados requerem mais unidades de tratamento, consumindo assim mais energia e aumentando a complexidade operacional (Eniola et al., 2022; Nasrollahi et al., 2022).

f) Tratamentos biológicos

Nos tratamentos biológicos a remoção de contaminantes é realizada por microrganismos, como algas, bactérias e fungos, onde a matéria orgânica é utilizada tanto de forma aeróbica ou anaeróbica pelos microrganismos. Apresentam boa eficiência de remoção mesmo com cargas elevadas e baixas temperaturas, o processo de construção e de operação dos reatores é comparativamente simples, é possível ocorrer a produção de bioenergia durante o processo, sob a forma de metano, e é possível manter um pH constante e aceitável sem a adição de químicos. As suas desvantagens são que apenas conseguem remover patógenos e nutrientes de forma parcial, tornando um pós-tratamento necessário, o início do processo pode levar tempo devido à baixa taxa de progresso dos microrganismos para se tornarem ativos e existe produção de sulfeto de hidrogênio que provoca mau odor, sendo necessário o manuseamento adequado do biogás (Eniola et al., 2022; Zaied et al., 2020).

g) Leitos Construídos de Macrófitas (LCMs)

Os sistemas de leitos contruídos de macrófitas são uma fitotecnologia que pode ser utilizada como alternativa ou complemento às ETARs convencionais. Estas têm a vantagem de providenciar um tratamento eficiente e económico que consegue remover vários xenobióticos orgânicos incluindo diversos fármacos. As principais desvantagens são que a eliminação de contaminantes é impactada por diversos fatores, necessitam de grandes áreas para operar, maiores tempos de retenção e muitos fármacos não são degradados completamente (Dordio & Carvalho, 2018; Guedes-Alonso et al., 2020; Vystavna et al., 2017; Zaied et al., 2020).

Como é possível constatar não existe nenhum método de tratamento que consiga remover todos os poluentes farmacêuticos, contudo os avanços recentes, tanto em processos individuais como em processos híbridos, têm melhorado drasticamente a eficácia desta descontaminação (Eniola et al., 2022).

1.4 Leitos contruídos de macrófitas

Os sistemas de leitos contruídos de macrófitas, são ecossistemas abrangentes, biologicamente diversificados e naturalmente produtivos, que são utilizados com o objetivo de simular as capacidades depurativas das zonas húmidas naturais, ao fazer uso dos mesmos processos físicos, químicos e biológicos, mas de uma forma controlada e otimizando o funcionamento sinérgico entre os seus componentes a vegetação, os microrganismos e a matriz de suporte, de forma a alcançar uma remoção mais eficiente dos poluentes presentes nas águas contaminadas (Dordio & Carvalho, 2018; Khalifa et al., 2020).

Originalmente desenvolvidos com o objetivo de serem utilizados como alternativa ou complemento às ETAR convencionais e domésticas, os LCM foram, ao longo do tempo evoluindo e a sua utilização acabou por tornar-se mais extensa, sendo atualmente aplicados para tratar águas residuais agrícolas, municipais e industriais. Consequentemente passaram a remover um espetro mais alargado de poluentes, tal como os fármacos. A remoção específica de fármacos e outros contaminantes pelos LCMs tem sido bastante investigada, em escala laboratorial e piloto e implementada em grande escala (Dordio & Carvalho, 2018).

Estes sistemas têm apresentado baixos custos de operação, boas eficiências de remoção de uma grande variedade de poluentes e são esteticamente apelativos (Biswal & Balasubramanian, 2022; Dordio & Carvalho, 2018; Khalifa et al., 2020).

Os LCMs podem ser classificados em diferentes tipos dependendo do fluxo de escoamento da água e da vegetação (**Figura 1.3** e **Figura 1.4** respetivamente). Relativamente ao fluxo de escoamento estes podem ser divididos em dois grandes grupos: leitos contruídos de macrófitas com fluxo superficial livre (FSL) e leitos contruídos de macrófitas com fluxo sub-superficial (FSS), sendo este último subdividido dependendo da direção do fluxo da água em vertical ou horizontal. Os LCMs com fluxo superficial assemelham-se mais às zonas húmidas naturais, nestes sistemas as águas residuais fluem através de canais ou bacias com profundidade relativamente baixa sobre um substrato (Biswal & Balasubramanian, 2022; H. Zhang et al., 2023). Nos LCMs com fluxo sub-superficial com fluxo horizontal (FSS-H) as águas residuais fluem horizontalmente pela entrada através da matriz, sob a superfície da vegetação presente, enquanto que nos LCMs com fluxo sub-superficial com fluxo vertical (FSS-V) as águas residuais enchem periodicamente o leito, sendo posteriormente drenados por gravidade

numa direção vertical. Ambas as configurações de LCMs (FSS-H e FSS-V), apresentam as suas dificuldades, o que levou ao desenvolvimento de LCMs combinados, isto é, LCMs híbridos que apresentam as vantagens combinadas das configurações horizontais e verticais (Parde et al., 2021; Waly et al., 2022).

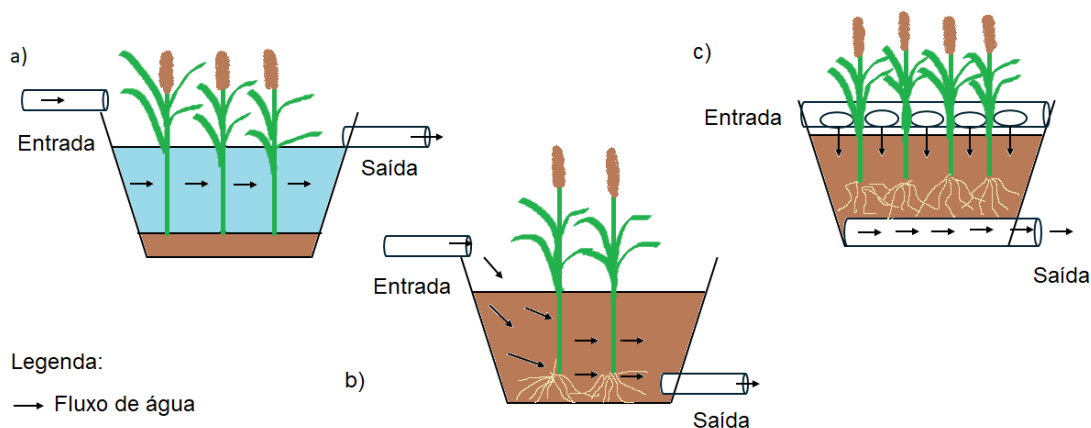


Figura 1.3 - Classificação de leitos construídos de macrófitas, relativamente ao escoamento. a) Fluxo superficial livre, b) Fluxo sub-superficial – horizontal e c) Fluxo sub-superficial – vertical (adaptado de H. Zhang et al., 2023).

Relativamente ao tipo de vegetação os LCMs podem ser classificados dependendo do tipo de planta macrófita predominante, como: LCMs com plantas emergentes (ex: *Phragmites australis*, *Typha spp.*), com plantas submergentes (ex: *Littorella uniflora*), com plantas flutuantes livres (ex: *Lemna minor*) ou com plantas de folhas flutuantes (ex: *Nymphaea alba*) (Dordio & Carvalho, 2013). As plantas macrófitas emergentes são as mais predominantemente encontradas nas zonas húmidas naturais, estas plantas crescem em solos saturados de água ou submersos, este tipo de macrófitas produz caules e folhas aéreas que se elevam bem acima do nível da água e possui um extenso sistema de raízes e rizomas. As plantas macrófitas submergentes crescem submersas dentro da zona fótica e têm o seu tecido fotossintético totalmente submerso com as flores expostas para a atmosfera. As macrófitas flutuantes livres não enraízam no substrato, estas flutuam livremente sobre ou dentro de água numa zona protegida e sem turbulência. As plantas macrófitas de folhas flutuantes enraízam em sedimentos submersos de água e possuem caules submersos, mas folhas flutuantes ou ligeiramente aéreas (Dordio et al., 2018).

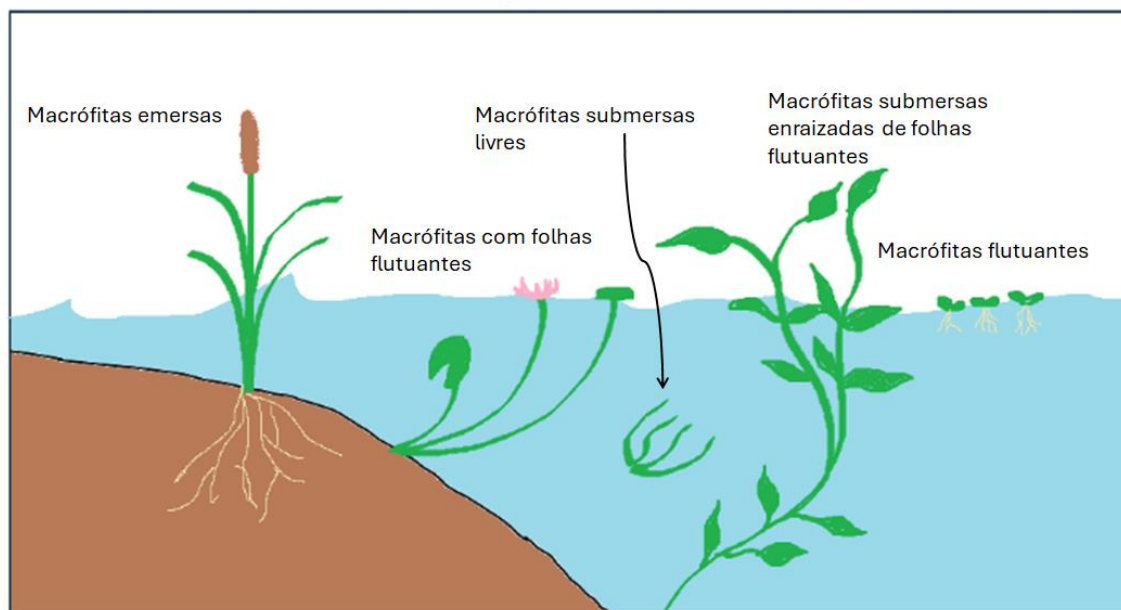


Figura 1.4 - Classificação de leitos construídos de macrófitas, relativamente à vegetação. (adaptado de Silva, 2024).

1.4.1 Componentes dos LCM's

Por norma os componentes principais nos leitos construídos de macrófitas são a vegetação, a matriz de suporte e a população microbiana. E é a partir do funcionamento interdependente destes componentes, através de vários processos químicos, físicos e biológicos, que os LCMs conseguem remover poluentes de águas residuais, incluindo fármacos (Dordio & Carvalho, 2018; Ingrao et al., 2020).

1.4.1.1 Vegetação

As plantas são um componente importante tanto para os LCMs como para as zonas húmidas naturais, apresentando influência direta e indireta na eficiência global do tratamento, logo é necessária que a seleção das espécies utilizadas seja criteriosa. As plantas contribuem de inúmeras formas nos LCMs, sendo as principais contribuições nos processos bióticos, na filtração, a capacidade de fornecer uma área de superfície o desenvolvimento de microrganismos e estimular o seu crescimento, promover a

condutividade hidráulica da matriz de suporte, transportar e libertar oxigénio através das raízes, e ter a capacidade de imobilizar ou eliminar poluentes. As espécies de plantas selecionadas devem ser capazes de acumular grandes quantidades de poluentes, ter uma grande adaptabilidade, ter um crescimento rápido, ter um bom sistema radicular e ser de fácil manutenção (Ansari et al., 2020; Dordio & Carvalho, 2018; H. Zhang et al., 2023).

Além da escolha das espécies deve-se ter em atenção a densidade e disposição das diferentes espécies de plantas de forma a não haver interferências na eficiência global do tratamento. Este tipo de planeamento permite que se mitiguem as variações de eficiência que ocorrem inevitavelmente no sistema em resultado das variações de atividade das plantas devido às variações sazonais e aos seus ciclos de atividade (Dordio & Carvalho, 2018).

Normalmente utilizam-se plantas macrófitas nos LCMs, que também são as que se encontram naturalmente em zonas húmidas naturais. Algumas macrófitas aquáticas apresentam uma elevada tolerância e rápida recuperação à exposição a vários tipos de contaminantes incluindo os fármacos como é o caso das *Typha* spp, *Lemna minor* e *Phragmites* spp (Ansari et al., 2020; Dordio & Carvalho, 2018) . Atualmente conhecem-se variadas espécies que, dependendo do sistema de LCMs utilizado, condições ambientais da localidade, carga de poluentes e características das águas residuais podem ser utilizadas. Na europa utiliza-se com maior regularidade a *Phragmites* spp e a *Typha* spp (Ansari et al., 2020; Dordio & Carvalho, 2018).

1.4.1.2 *Typha* spp.

A planta a utilizar para a instalação futura de um microcosmos de LCMs será a *Typha* spp. (**Figura 1.5**), uma planta macrófita emergente, enraizada, monocotiledónea, que apresenta uma distribuição cosmopolita, existindo cerca de 49 espécies e híbridos registados. As espécies de *Typha* crescem numa grande variedade de habitats aquáticos e semi-aquáticos, como zonas húmidas, margens de lagos, margens de lagoas, estuários costeiros, valas à beira de estradas e canais de drenagem e irrigação agrícola (Ciotir et al., 2017; Sesin et al., 2021).

A *Typha* spp., para além de estar amplamente distribuída globalmente, também apresenta a capacidade de beneficiar os ecossistemas envolventes tornando-a num

elemento fundamental em ambientes de água doce e salobra em muitos continentes. Esta consegue contribuir para o ciclo de nutrientes do ecossistema, qualidade da água e biodiversidade, além disso, pode funcionar como um depósito de nutrientes, através da absorção e armazenamento nos seus tecidos, o que pode ajudar a reduzir a eutrofização (Sesin et al., 2021). Os seus grandes rizomas subterrâneos têm a capacidade de estabilizar sedimentos, diminuindo assim a turbidez da água sobrejacente, as suas raízes conseguem libertar oxigénio, aumentando a disponibilidade de oxigénio na rizosfera e, assim, promover o crescimento de outras espécies de plantas e de microrganismos. A *Typha* spp. é ainda capaz de libertar aleloquímicos com efeito inibitório sobre o crescimento excessivo e prejudicial de fitoplâncton, contribuindo assim para o equilíbrio ecológico. Como produtores primários as *Typha* spp. apoiam a biodiversidade ao fornecer alimento e abrigo a aves e mamíferos, e influenciando a composição de zooplâncton, algas e comunidades de peixes larvais (Ciotir et al., 2017; Sesin et al., 2021).

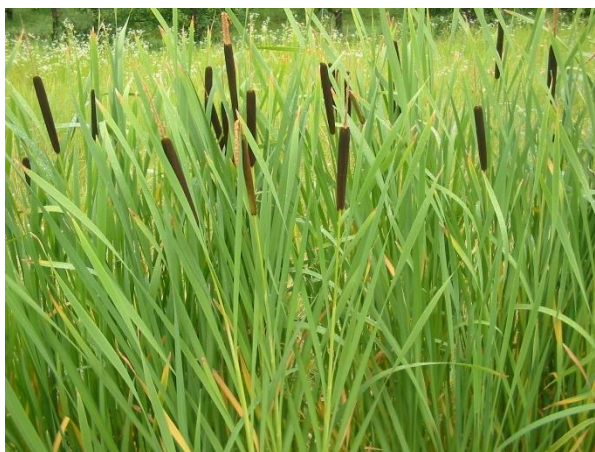


Figura 1.5 - *Typha* spp.

1.4.1.3 População microbiana

As populações microbianas, são os principais responsáveis pela remoção dos fármacos nos LCMs, tendo sido reportadas taxas de contribuição de remoção de antibióticos até aos 94%, sendo por isso considerados vitais nos LCMs (Liu et al., 2019). As populações microbianas desenvolvem-se naturalmente nos LCMs e por norma são bastante diversas, tendo sido identificadas bactérias, actinomicetes, fungos, protozoários, algas, entre outros (Dordio & Carvalho, 2018; Liu et al., 2019; H. Zhang et al., 2023).

As características dos microrganismos presentes nos LCMs são influenciadas pelas espécies de plantas presentes e pelos materiais utilizados na matriz de suporte, podendo ser estas características modificadas através da inoculação dos LCMs com estirpes mais adequadas para o próprio sistema. As proteobactérias, os bacteroidetes e as acidobactérias são possivelmente os microrganismos com maior capacidade de degradar antibióticos e outros fármacos (Dordio & Carvalho, 2018; Liu et al., 2019).

A presença de uma comunidade microbiana diversa facilita a formação de biofilmes microbianos, que contêm uma mistura diversificada de bactérias aeróbias e anaeróbias que são úteis na degradação de matéria orgânica. Esta é uma capacidade essencial nos LCMs (Dordio & Carvalho, 2018).

1.4.1.4 *Bacillus pumilus*

Para este estudo selecionou-se o *Bacillus pumilus* (**Figura 1.6**), uma bactéria gram-positiva, com um diâmetro de cerca de 0,7 μm , formadora de esporos, com formato elipsoidal/cilíndrico, que é possível de se encontrar em variados ambientes, como águas marinhas, sedimentos de águas profundas e solo. Esta espécie apresenta resistência significativa a fatores de stress ambientais, como falta ou escassez de nutrientes, secas, radiação UV, desinfetantes químicos e enzimas oxidantes (Bouchard-Rochette et al., 2022; Dobrzyński et al., 2022, 2023; Ghebray, 2020).

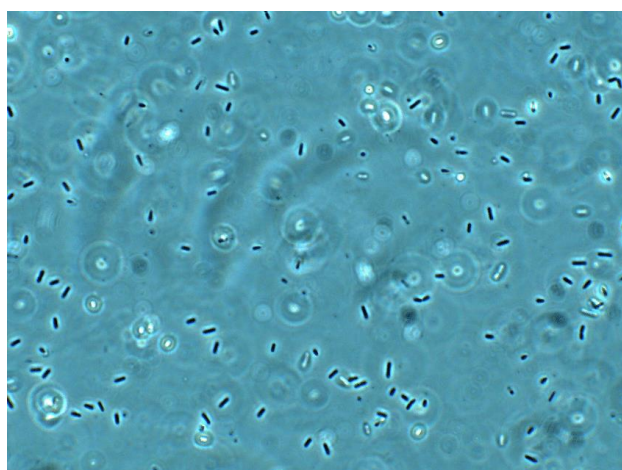


Figura 1.6 - *Bacillus pumillus*.

Anteriormente um integrante do grupo do *Bacillus subtilis*, o *Bacillus pumilus* é uma bactéria do género *Bacillus* que tem levantado interesse como um potencial substituto de pesticidas convencionais para o tratamento de doenças nas plantas, devido à sua capacidade de produzir endósporos, estimular as defesas naturais das plantas, competir por nutrientes e espaço e produzir metabólitos secundários tóxicos, nomeadamente os lipopéptidos, que contribuem para um biocontrolo eficaz (Bouchard-Rochette et al., 2022; Dobrzyński et al., 2022, 2023).

O *Bacillus pumilus* consegue crescer numa temperatura mínima de 5°C e a uma temperatura máxima que varia entre os 40-50°C, as suas células, que são denominadas de células vegetativas quando estão metabolicamente ativas e têm capacidade de multiplicação. A sua multiplicação ocorre por fissão e depende de vários fatores, como pH, atividade da água, temperatura, condições atmosféricas, flora competidora e disponibilidade de nutrientes. Quando a quantidade de nutrientes é baixa ou as condições não são favoráveis, através da esporulação o *Bacillus pumilus* produz esporos de forma que a bactéria sobreviva e fique metabolicamente inativa (Ghebray, 2020).

Pouco se conhece sobre a sua capacidade de biodegradar fármacos, mas a sua capacidade de produzir enzimas extracelulares, como lacases e peroxidases, que têm a capacidade de metabolizar estruturas aromáticas e os resultados de estudos anteriores com outras espécies de *Bacillus*, que indicam que estes têm vias catabólicas para fármacos, sugerem que o *Bacillus pumilus* tem potencial na biorremediação (Dobrzyński et al., 2022; Gałazka et al., 2023; Gangola et al., 2018).

Na tabela abaixo encontram-se resultados de alguns estudos onde se utilizaram diferentes espécies de bactérias para remover fármacos, e as respetivas condições.

Tabela 1.6 - Taxas de remoção de diferentes fármacos por diferentes espécies de bactérias.

Microrganismo	Fármaco	Condições do ensaio	Remoção (%)	Referências
<i>Bacillus thurigiensis</i> <i>B1(2015b)</i>	IBU [25 mg/L]	Temperatura: 30°C Velocidade de agitação: 130 rpm Meio de cultura: Meio de sais minerais suplementado com 25 mg/L de Ibu e 1 mg/L de glucose	Após 20 dias: 46,26	(Marchlewicz et al., 2016)

Microrganismo	Fármaco	Condições do ensaio	Remoção (%)	Referências
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	IBU [92,37 mg/L]	Temperatura: 25°C Velocidade de agitação: 150 rpm Meio de cultura: meio mínimo de sais minerais	Após 8 horas: 90,87	(Sharma et al., 2019)
<i>Bacillus thurigiensis B1(2015b)</i>	NAP [6 mg/L]	Temperatura: 30°C Velocidade de agitação: 130 rpm Meio de cultura: Meio de sais minerais suplementado com 6 mg/L de Nap e 1 mg/L de glucose	Após 35 dias: 100	(Marchlewicz et al., 2016)
<i>Planococcus sp.S5</i>	NAP [2 mg/L]	Temperatura: 30°C Velocidade de agitação: n/d Meio de cultura: Meio de sais minerais suplementado com 0,5 g/L de glucose e 2 mg/L naproxeno	Após 26 dias: 100	(Dzionic et al., 2024)
<i>Stenotrophomonas maltophilia KB2</i>	NAP [6 mg/L]	Temperatura: 30°C Velocidade de agitação: n/d Meio de cultura: Meio de sais minerais suplementado com 6 mg/L de naproxeno	Após 35 dias: 28	(Wojcieszynska et al., 2014)
<i>Stenotrophomonas maltophilia KB2</i>	NAP [6 mg/L]	Temperatura: 30°C Velocidade de agitação: 130 rpm Meio de cultura: Meio de sais minerais suplementado com 6 mg/L de naproxeno e 1 mg/L de glucose	Após 35 dias: 78	(Wojcieszynska et al., 2014)
<i>Klebsiella huaxiensis KB7</i>	DCF [1,5 mg/L]	Temperatura: 30°C Velocidade de agitação: 130 rpm Meio de cultura: Meio de sais minerais suplementado com 1,5 mg/L de Dcf	Após 14 dias: 57,75	(Żur et al., 2021)

Microrganismo	Fármaco	Condições do ensaio	Remoção (%)	Referências
<i>Achromobacter spanius S11</i>	DCF [40 mg/L]	Temperatura: 37°C Velocidade de agitação: 150 rpm Meio de cultura: Meio mínimo de sais minerais suplementado com 40 mg/L de Dcf	Após 6 dias: 97,79±0,84	(Mohamed et al., 2023)
<i>Gordonia polyisoprenivorans C</i>	CBZ [10 mg/L]	Temperatura: 30°C Velocidade de agitação: n/d Meio de cultura: n/d	Após 30 dias: >50	(Wang et al., 2023)
<i>Labrys portucalensis F11</i>	CBZ	Temperatura: 25°C Velocidade de agitação: 150 rpm Meio de cultura: Meio mínimo de sais minerais	Após 30 dias: 95,4	(Bessa et al., 2019)

1.4.1.5 Matriz de suporte

A matriz de suporte ou substrato nos leitos construídos de macrófitas LCMs desempenha, de forma semelhante ao solo na natureza, a função de servir como local de ancoragem e suporte físico para as raízes das plantas do sistema, além disso proporciona uma superfície propícia ao desenvolvimento da população microbiana. Adicionalmente o substrato também contribui de forma indireta para fornecimento de oxigênio, água e nutrientes às raízes das plantas e microrganismos, ao criar um ambiente poroso que favorece circulação de ar, retenção de humidade e troca de substâncias essenciais (Dordio & Carvalho, 2018).

Além de fornecer suporte físico para as plantas e microrganismos, a matriz é um meio que deve permitir a circulação uniforme das águas residuais através do sistema. Desempenha ainda um papel importante no tratamento das águas residuais ao

favorecer a formação de biofilmes microbianos e filtrar alguns dos poluentes presentes nas águas residuais. As propriedades físico-químicas da matriz, como a porosidade, pH, granulometria e composição mineral, influenciam diretamente a capacidade de adesão de microrganismos, a atividade metabólica, a adsorção de poluentes orgânicos e de proporcionar condições para que ocorram processos químicos. Outro fator importante a ter em conta na seleção da matriz é o custo de mercado, disponibilidade e a acessibilidade, especialmente em contextos de implementação em larga escala ou zonas com recursos limitados (Dordio & Carvalho, 2018; Mlih et al., 2020).

1.4.1.6 Agregados de argila expandida (LECA)

Os agregados de argila expandida (**Figura 1.7**) são um material natural que passa por um processo de alteração artificial, sendo obtido ao submeter grânulos húmidos de argila a altas temperaturas, que variam entre 1000 e 1300°C. Durante este processo térmico a argila sofre uma expansão rápida devido à libertação de gases, consequência da evaporação da água presente nos poros, da decomposição de carbonatos e óxidos férricos e da combustão de materiais orgânicos naturais e agentes de expansão adicionados. O resultado é um material leve, altamente poroso e de baixa densidade aparente (Machado et al., 2017; Mlih et al., 2020).

O processo da queima também provoca alterações químicas à composição do material, eliminando formas minerais hidratadas e carbono, distinguindo a LECA do material bruto utilizado. O produto final é caracterizado por ser quimicamente inerte, não biodegradável e apresenta um pH neutro a ligeiramente alcalino, dependendo da origem e composição da argila bruta. A temperatura e o tempo de queima podem influenciar as características finais da LECA, temperaturas mais elevadas e tempos de queima mais longos estão associados ao aumento da densidade e diminuição da porosidade (Machado et al., 2017; Mlih et al., 2020).

A LECA normalmente é comercializada sob o formato de grânulos intactos ou triturados. Os grânulos inteiros são amplamente utilizados em aplicações geotécnicas e na construção civil, por sua vez, a forma triturada é utilizada em sistemas hidropónicos e em processos de filtração de água. Porém nos últimos tem-se verificado um aumento na sua aplicação como matriz de suporte em LCM's (Dordio et al., 2017; Mlih et al., 2020).



Figura 1.7 – Grânulos de agregados expandidos de argila.

1.4.1.7 Vermiculite esfoliada

A vermiculite (Figura 1.8) é um mineral de argila silicatada trioctaédrica do tipo mica, com uma estrutura em camadas 2:1 (2 folhas de sílica tetraédrica: 1 folha de alumínio octaédrico). Este mineral não é tóxico para o ambiente, apresenta disponibilidade e é de baixo custo, além disso, apresenta propriedades físico-químicas bastante vantajosas, como alta capacidade de troca iônica, devido à sua carga negativa permanente, é quimicamente inerte, neutro tanto para bases como para ácidos e é biologicamente resistente. Originalmente era um material bastante apreciado para a construção (Assis Neto et al., 2023; Brião et al., 2021; de Vargas Brião et al., 2021; Shi et al., 2024).

Tal como a LECA, a vermiculite na sua forma esfoliada é cada vez mais utilizada como matriz de suporte para LCMs. A forma esfoliada da vermiculite é obtida através de um processo térmico, onde esta deve ser aquecida a temperaturas que variam entre 800 e 1000°C, que a fazem expandir 6 a 20 vezes o seu tamanho original, caso a temperatura seja superior aos 1000°C a vermiculite transforma-se em clinoenstatite, perdendo a sua capacidade de atuar como isolante térmico, importante para reduzir a variabilidade sazonal nos LCMs. Pretende-se que o produto final tenha características como, baixa elasticidade, baixa densidade, área de superfície elevada, porosidade e alta capacidade de adsorção e absorção (Assis Neto et al., 2023; Brião et al., 2021; Dordio et al., 2017).



Figura 1.8 – *Vermiculite esfoliada*

1.4.1.8 Cortiça termicamente tratada

Em Portugal o sobreiro é umas das árvores mais abundantes, cobrindo cerca de 23% da área florestal e juntamente com a Espanha, Marrocos e Argélia é um dos maiores produtores de cortiça, colhendo em conjunto mais de 200 000 toneladas de cortiça por ano, sendo que a maior parte do material destina-se à produção de rolhas e de discos de cortiça para a indústria vinícola. De forma a minimizar o desperdício a política da União Europeia (Diretiva Quadro de Resíduos 1999/31/EC), tenta que a quantidade de cortiça depositada em aterros diminua, deste modo, têm sido exploradas novas aplicações para este material, entre eles a construção, onde é utilizada devido à sua capacidade de isolamento térmico e acústico em paredes e pisos (Aguilar et al., 2022; Machado et al., 2017).

Outras aplicações empregam subprodutos da cortiça, como granulados de cortiça e pó de cortiça, que apresentam diferentes granulometrias, densidades e, também, alta porosidade e capacidade de adsorção. Estas características tornam esses materiais promissores para uso na purificação de águas e água residuais (Aguilar et al., 2022; Machado et al., 2017).

Na figura abaixo encontra-se uma imagem dos grânulos de cortiça expandida tratada termicamente.



Figura 1.9 – Grânulos de cortiça expandida tratados termicamente.

1.4.2 Remoção de fármacos em LCMS

A depuração de águas em LCMS é alcançada através da ação conjunta dos três principais componentes do sistema (vegetação, população microbiana e matriz de suporte), envolvendo uma grande variedade de processos físicos, químicos e biológicos (**Figura 1.10**). Esses processos são semelhantes aos que acontecem em zonas húmidas naturais, que são capazes de degradar xenobióticos. Porém nos LCMS esses processos podem ser otimizados para tratar contaminantes específicos, ao aprimorar condições que influenciam a eficiência de remoção de poluentes. Tais condições incluem as propriedades dos fármacos, as concentrações de entrada, as características da água residual, os parâmetros de operação dos LCMS (tempo de retenção hidráulico, taxa de inundação do leito, taxa de arejamento), os parâmetros de design (configuração dos LCMS, o tipo e densidade de macrófitas, propriedades do material da matriz de suporte) e ainda as condições climáticas (temperatura) (Dordio & Carvalho, 2018, 2013; Vystavna et al., 2017).

Os principais processos responsáveis pela degradação de fármacos são a sorção/adsorção, biodegradação e a absorção pelas plantas, estes processos podem ser classificados como bióticos ou abióticos (Dordio & Carvalho, 2018).

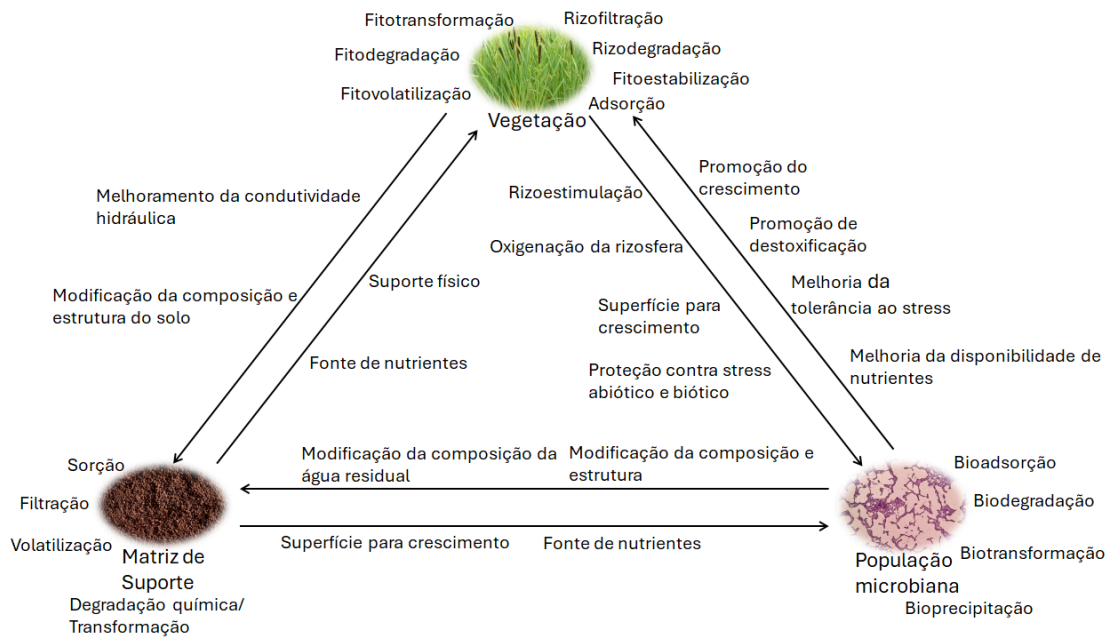


Figura 1.10 - Interações entre os componentes dos leitos contruídos de macrófitas. (adaptado de Dordio & Carvalho, 2018).

1.4.2.1 Processos bióticos

Os LCMs são essencialmente sistemas biológicos, e como tal, os processos bióticos desempenham um papel de grande importância na remoção de vários poluentes incluindo os fármacos. Os principais componentes bióticos nos LCMs são as plantas e os microrganismos (Dordio & Carvalho, 2018).

As plantas têm um papel fundamental pois não só contribuem indiretamente para o desenvolvimento da população microbiana na rizosfera, como também contribuem de forma direta na remoção de fármacos, através da sua capacidade de absorção e posterior metabolização, acumulação ou mineralização/volatilização, translocação de microcontaminantes, adsorção às raízes e através da segregação de exsudados ou enzimas que catalisam a degradação química dos poluentes (Dordio & Carvalho, 2018; H. Zhang et al., 2023).

A absorção direta de poluentes orgânicos pelas plantas é um processo que ao longo dos últimos anos é considerado cada vez mais importante nos processos bióticos. A absorção de xenobióticos é possível, pois, apesar das raízes das plantas não possuírem transportadores específicos para compostos xenobióticos orgânicos como os fármacos,

estes podem ser absorvidos e transportados no seu interior (translocação) por difusão, assim as plantas conseguem absorver vários tipos de xenobióticos e degradá-los/transformá-los (fitodegradação) (Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2014; Ravikumar et al., 2022; Salah et al., 2023).

A difusão de fármacos para o interior das plantas está dependente das características físico-químicas dos fármacos como a hidrofobicidade (expresso pelo logaritmo do coeficiente de partição octanol/água, $\text{Log}K_{ow}$), solubilidade em água e concentração. Normalmente, fármacos com uma hidrofobicidade moderada, caracterizada por um $\text{Log}K_{ow}$ entre 0,5 e 3,5 são considerados suficientemente lipofílicos para atravessarem a bicamada lipídica das células membranares da planta e solúveis o suficiente para se dissolverem nos fluídos das células das plantas (Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2014; Ravikumar et al., 2022). Por exemplo, a carbamazepina, que apresenta um $\text{Log}K_{ow}$ de 2,45, é absorvida rapidamente pelas raízes da *Typha* spp., sendo posteriormente transportada para o caule e folhas, apresentando uma alta taxa de acumulação nas folhas. Contrariamente, o diclofenaco, com um $\text{Log}K_{ow}$ de 4,51 tem dificuldade em ser transportado para o interior de algumas espécies de plantas como a *Scirpus validus* (Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2014; Ravikumar et al., 2022; D. Zhang et al., 2014). E fármacos polares, solúveis em água e não-iônicos como a cafeína, que apresentam valores de $\text{Log}K_{ow}$ inferiores a 0,5, descobriu-se que são facilmente absorvidos e translocados nos tecidos das plantas, isto levou à hipótese que compostos altamente solúveis em água são provavelmente impulsionados pelo fluxo de água da transpiração na absorção da planta e na translocação pelos tecidos celulares da planta (Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2014; Ravikumar et al., 2022; D. Zhang et al., 2014).

Outros estudos verificaram que a absorção de alguns fármacos é independente da sua hidrofobicidade e que o seu valor de $\text{Log}K_{ow}$ tem um valor preditivo limitado em sistemas de plantas aquáticas (Dordio & Carvalho, 2018; D. Zhang et al., 2014).

Após a absorção dos fármacos pelas plantas, estes podem ser completamente ou parcialmente degradados, através de processos metabólicos (fitodegradação), de forma a desintoxicar as plantas. Esses processos têm como objetivo final transformar os fármacos em produtos menos tóxicos, quer por uma decomposição mais ou menos extensa em moléculas mais pequenas (possivelmente voláteis), ou por conjugação/estabilização e consequente incorporação dos produtos em conjugados nas paredes das células vegetais e vacúolos ou lignificados. Algumas plantas aquáticas superiores têm a capacidade de metabolizar compostos orgânicos tóxicos ou xenobióticos (como pesticidas ou fármacos) através de processos bioquímicos, em

formas menos tóxicas, como CO₂ e H₂O (água) ou compostos intermédios estáveis que são armazenados nas plantas. Além disso algumas plantas conseguem através de uma relação simbiótica com microrganismos endófitos, também realizar a metabolização total ou parcial de compostos orgânicos (Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2014; Ravikumar et al., 2022; D. Zhang et al., 2014).

Um dos problemas no desenvolvimento das técnicas de fitorremediação, deve-se ao destino dos produtos intermédios da metabolização presentes no interior das plantas, pois deve-se evitar que estes compostos potencialmente ainda ecotóxicos retornem ao meio ambiente através da deposição de materiais vegetais mortos, tornando-se assim importante estudar a localização destes compostos no interior das plantas de modo a encontrar o melhor destino à biomassa das plantas no final do seu ciclo de vida. Outro aspeto importante a avaliar é a toxicidade causada pelos fármacos às plantas, devendo proceder-se à análise da atividade radicular, da taxa de crescimento relativo das plantas e das concentrações de pigmentos fotossintéticos nos tecidos vegetais, de forma a ponderar se a planta é a mais indicada para a remoção desse fármaco (Li et al., 2014; D. Zhang et al., 2014).

Indiretamente, as plantas estimulam o desenvolvimento e a atividade da população microbiana na sua rizosfera, ao segregar substâncias como exsudatos, enzimas, mucilagem e material celular morto. Além disso, fornecem oxigénio, uma característica comum nas macrófitas, o que promove processos oxidativos de contaminantes e o desenvolvimento de microrganismos aeróbios, que são mais eficientes em processos biodegradação (Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2014; H. Zhang et al., 2023).

Os microrganismos presentes nos LCMs são os principais responsáveis pela transformação e mineralização de nutrientes e poluentes orgânicos. A biodegradação por ação de microrganismos pode ocorrer em condições aeróbias e anaeróbias, dependendo da extensão do arejamento do leito e da quantidade de oxigénio libertado pelas plantas, bem como da estrutura dos compostos orgânicos. A capacidade de conseguir degradar um composto orgânico depende da sua composição química e do desenvolvimento dos microrganismos no sistema, sendo que compostos orgânicos com estruturas mais simples e maior solubilidade em água são mais facilmente degradados por microrganismos, enquanto que a facilidade de degradação de fármacos vai depender de algumas das suas características, por exemplo, fármacos estruturalmente simples, com alta solubilidade em água e baixa taxa de adsorção são mais facilmente degradados devido à sua semelhança com compostos orgânicos presentes na natureza logo acabam por ser utilizados como fontes de energia. Por outro lado, fármacos com

estruturas mais complexas diferentes das que estão presentes na natureza costumam ser degradados lentamente, pois os microrganismos não possuem os genes que codificam as enzimas necessárias para a sua degradação (Dordio & Carvalho, 2018, 2013; Li et al., 2014; Overton et al., 2023; D. Zhang et al., 2014; H. Zhang et al., 2023). Nos casos em que a degradação é mais difícil pode haver recurso a enzimas não específicas, existindo degradação, num ritmo mais lento através de reações não específicas, que não contribuem para o crescimento microbiano (co-metabolismo) (Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2014).

Apesar da população microbiana presente nos LCMs ser bastante diversificada é improvável que os fármacos sejam removidos apenas pela ação da biodegradação, uma vez que a sua concentração em comparação com outros poluentes em águas residuais é bastante baixa, logo pode não ser o suficiente para induzir a produção de enzimas capazes de degradar os produtos farmacêuticos. Outro fator que se deve ter em atenção é o facto de muitos destes fármacos inibirem o crescimento ou metabolismo dos microrganismos selecionados, pelo que é necessário efetuar estudos prévios onde se verifiquem os efeitos dos fármacos no desenvolvimento, funcionamento e estabilidade das comunidades microbianas (D. Zhang et al., 2014).

A ação de transformação por parte dos microrganismos também é bastante afetada pelas condições do meio, o que pode levar à utilização de diferentes mecanismos, levando que a partir de um composto inicial se venham a obter vários produtos diferentes. Outros fatores que podem influenciar a degradação de compostos orgânicos nos LCMs são: os materiais da matriz de suporte, a vegetação, o potencial de oxidação-redução, a temperatura, o pH, os nutrientes disponíveis e a presença de substâncias tóxicas (Dordio & Carvalho, 2018; Li et al., 2014; D. Zhang et al., 2014).

Os processos bióticos acontecem de forma simultânea e podem contribuir de diferentes formas para a remoção de fármacos, tal irá depender das propriedades dos compostos e das suas interações com os componentes bióticos (Dordio & Carvalho, 2018).

1.4.2.2 Processos abióticos

Os processos abióticos são todos os processos físicos e químicos que contribuem, sem a intervenção direta ou indireta de organismos vivos, para a transformação/degradação e remoção de fármacos nos LCMs. Os processos abióticos considerados mais relevantes são a degradação fotolítica e a sorção (Dordio & Carvalho, 2018; Overton et al., 2023; D. Zhang et al., 2014).

A degradação fotolítica é um dos processos abióticos mais discutidos pois acredita-se ser um dos principais processos na remoção de fármacos em LCMs. A eficiência deste tipo de processo está dependente de fatores como a disponibilidade de luz solar para a fotólise, a intensidade da luz, atenuação da luz pela profundidade da água, turbidez da água, o espectro de absorvância do fármaco e o rendimento quântico da fotólise na matriz aquosa (Fatta-Kassinos et al., 2011; D. Zhang et al., 2014; H. Zhang et al., 2023).

A fotólise pode ser direta ou indireta. Na fotólise direta, a radiação solar incide nos fármacos, estes absorvem a radiação ultravioleta que leva à sua dissociação, por sua vez a fotólise indireta consiste na utilização de moléculas presentes na natureza, por exemplo: nitratos, nitritos e matéria orgânica dissolvida, que geram espécies reativas de oxigênio (ROS), como o $\bullet\text{OH}$, oxigênio singuleto ($^1\text{O}_2$), radicais alquil-peróxido ($\bullet\text{OOR}$) e eletrões hidratados (um eletrão libertado durante o processo de ionização de uma molécula de água pela água e cercado por moléculas de água que estão orientadas de modo a que o eletrão não consiga escapar) sob radiação solar (Fatta-Kassinos et al., 2011; H. Zhang et al., 2023).

Recentemente vários estudos foram feitos para investigar os mecanismos da fotólise de fármacos sob a luz solar, tendo-se verificado que fármacos da mesma classe podem ser fotodegradados através de diferentes vias de fotólise. Com o passar dos anos o estatuto de processo chave dado à degradação fotolítica de produtos farmacêuticos em ambientes aquáticos foi baixando, porque os estudos realizados sobre a fotólise dos fármacos foram feitos principalmente em corpos de água superficiais, como lagos, rios e mar aberto. Além disso verificou-se que nos LCMs com FSS, a luz solar tinha dificuldades em penetrar no substrato, devido ao abrigo proporcionado pela vegetação, impedindo assim que a fotólise seja um dos principais processos na remoção de fármacos. No entanto pode-se abrir uma exceção em LCMs de FSL, uma vez que dispõem de uma superfície de água relativamente aberta (H. Zhang et al., 2023).

Atualmente o conhecimento sobre o comportamento da fotólise na degradação de fármacos em LCMs é considerado escasso, o que pode ser atribuído ao seu papel menor nos LCMs de FSS (H. Zhang et al., 2023).

A sorção é de momento o processo abiótico mais importante que ocorre em LCMs. Este tipo de processo pode ocorrer à superfície das raízes, à superfície de meios sólidos, quando há utilização de matriz de suporte, ou em biofilmes formados sobre as superfícies mencionadas. A sorção permite a retenção a curto prazo, tal acontecimento permite que quando ocorre desorção os poluentes sejam “entregues” a outros componentes dos LCMs como as plantas e os microrganismos, caso ocorra imobilização irreversível dos contaminantes o material sorvente acaba por ficar saturado e perder capacidade de sorção ao longo do tempo. A sorção também influencia a distribuição de substâncias na fase aquosa e em superfícies sólidas, o que possibilita uma melhor regulação do destino final destes compostos (Dordio & Carvalho, 2018; D. Zhang et al., 2014).

A sorção é um processo que ocorre naturalmente e que tem uma variedade de mecanismos envolvidos, onde estão incluídas interações hidrofóbicas, interações de Van der Waals, interações eletrostáticas e trocas iónicas (Li et al., 2014; Overton et al., 2023; Salah et al., 2023; Singh et al., 2024; H. Zhang et al., 2023).

A capacidade de sorção vai depender bastante do tipo de materiais que compõem a matriz de suporte e das suas propriedades químicas, por exemplo, fármacos polares ou iónicos têm tendência para ser adsorvidos ao material da matriz, enquanto fármacos apolares tendem a ser adsorvidos em materiais de matriz ricos em matéria orgânica. O comportamento de sorção dos fármacos depende das suas propriedades físico-químicas como a constante de dissociação ácida (pK_a), $\text{Log}K_{ow}$ e do coeficiente de sorção linear ($\text{Log}K_d$) e de como estes interagem com a matriz sólida do LCM (Dordio & Carvalho, 2018; Overton et al., 2023; H. Zhang et al., 2023). Outros fatores que podem influenciar a capacidade de sorção são as características das águas residuais, como a quantidade de oxigénio dissolvido, o pH, a composição de eletrólitos e a quantidade de substâncias presentes, que levam à saturação do material sorvente e consequentemente diminuem o seu tempo de vida. É essencial uma boa condutividade hidráulica do meio e uma boa área de contacto entre o meio sorvente e a água residual (Dordio & Carvalho, 2018).

O processo de sorção não deve ser visto como uma solução isolada, mas sim como um processo que se deve usar em sinergia com os restantes processos presentes nos LCMs de FSS, que tem a capacidade de elevar a eficiência do processo global (Dordio & Carvalho, 2018).

Nos LCMs também podem ocorrer outros processos abióticos como a hidrólise, precipitação, volatilização, reações redox, etc, mas estes não costumam contribuir de forma significativa para a remoção dos fármacos (**Figura 1.11**) (Dordio & Carvalho, 2018).

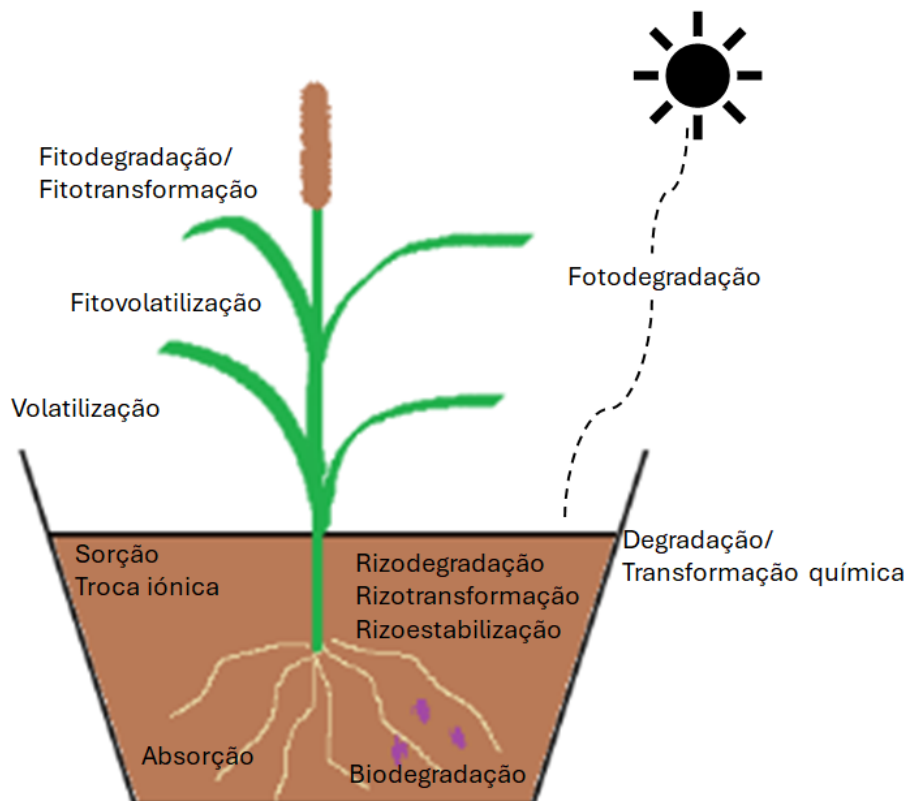


Figura 1.11 - Processos/mecanismos dos leitos construídos de macrófitas (adaptado de Dordio & Carvalho, 2018)

2. Metodologia Experimental

2.1 Reagentes e materiais

As soluções aquosas utilizadas durante o trabalho experimental foram preparadas a partir de quatro compostos farmacêuticos puros, o diclofenaco, o ibuprofeno, o naproxeno e a carbamazepina. Na **Tabela 2.1** encontram-se presentes as principais características e os fornecedores dos reagentes utilizados.

Tabela 2.1- Características das substâncias químicas utilizadas e os seus fornecedores.

Substância química	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	Grau de pureza (%)	Fornecedor
Acetonitrilo	C ₂ H ₃ N	41,05	> 99,9	Merck
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	98,00	85,0	JMGS
Água para HPLC	H ₂ O	18,02	-	Fischer chemical
Carbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236,269	98,8	Acofarma
Cloreto de amónio	NH ₄ Cl	53,49	≥ 99,5	ACS reagent
Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	136,09	> 99,0	Sigma Aldrich
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	> 99,0	Himedia
Hidrogenofosfato de sódio di-hidratado	Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O	177,99	-	Sigma Aldrich
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,28	> 98	Biosynth
Metanol	CH ₃ OH	32,4	99,8	VWR
Sulfato de magnésio hexa- hidratado	MgSO ₄ . 6 H ₂ O	228,46	> 99	Riëdel-de Haën

No âmbito dos esforços de otimização dos componentes de LCMs destinados à remoção de fármacos de águas contaminadas, que se têm realizado no grupo de investigação e em que se enquadra o presente trabalho, têm-se estudado para potencial utilização como matriz de suporte, a mistura de dois materiais argilosos processados industrialmente, nomeadamente a vermiculite esfoliada (Aguiar & Mello, Lda, Portugal) com granulometria 3 e os agregados de argila expandida (LECA) (MaxitGroup, Portugal) com granulometria 2/4, numa mistura de 1:1 (v/v), com a qual têm sido alcançados resultados promissores (Carrajola, 2020; Dordio, Silva, et al., 2017; V. L. M. da Silva, 2024).

Adicionalmente, de modo a melhorar a capacidade da matriz de suporte em remover os fármacos, promover o desenvolvimento da vegetação e da população microbiana, melhorar as condições do meio (arejamento, nutrientes, etc.) e o funcionamento do sistema, estudou-se também em trabalhos anteriores a adição de um outro material, granulado de cortiça expandida com granulometria 3-5 mm (Amorim Cork Isolation), numa combinação por estratos da mistura de materiais argilosos e do granulado de cortiça. As proporções e granulometrias otimizadas dos materiais utilizados nestas matrizes de suporte foram já alvo de estudos anteriores (Carvalho, 2025).

Assim, no presente trabalho, em que se estudou os efeitos da inoculação de uma matriz de suporte com um microrganismo, o *Bacillus pumilus*, a seleção dos materiais e a definição das suas proporções nesta componente foram feitos tendo em atenção os resultados obtidos nesses estudos precedentes.

Na tabela seguinte são apresentadas as características físico-químicas dos materiais e misturas utilizados na matriz de suporte.

Tabela 2.2- Características físico-químicas dos materiais e misturas de materiais utilizados na composição da matriz de suporte.

Material	Vermiculite ^a	LECA ^a	Mistura Vermiculite:LECA (1:1, v:v) ^b	Cortiça 3/5 ^c
Granulometria (mm)	3 (0,8 – 5,0)	2/4 (2,0 – 6,3)	0,5 – 3,0	3 – 5
Porosidade (%)	66 ± 1	49 ± 1	54 ± 2	45 ± 1
Densidade aparente (kg/m³)	88 ± 2	294 ± 10	291 ± 14	67 ± 2
pH (H₂O)	7,44 ± 0,06	9,04 ± 0,08	8,67 ± 0,05	6,70 ± 0,06

a) (Dordio, Miranda, et al., 2017); b) (V. L. M. da Silva, 2024); c) (Carvalho, 2025)

2.2 Método analítico para quantificação de fármacos em solução aquosa

2.2.1 Desenvolvimento do método

Para a análise quantitativa dos fármacos em solução aquosa utilizou-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) com detecção por espectrofotometria UV-Vis. Para este fim foi utilizado um equipamento da VWR HITACHI composto por uma bomba L-2130 (Elite Lachrom), um autosampler L-2200 (Elite Lachrom) e um detetor UV L-2400 (Elite Lachrom).

A técnica de HPLC/UV-Vis é altamente seletiva e sensível capaz de obter resultados com elevada precisão e exatidão.

Durante o estudo quantificaram-se o diclofenaco, ibuprofeno, carbamazepina e naproxeno em soluções contendo uma mistura destes 4 fármacos, tendo sido avaliadas as melhores condições de separação e quantificação seletiva de cada um destes fármacos.

A validação do método é um processo essencial antes de se proceder à quantificação de substâncias por HPLC/UV-Vis. Este processo garante a fiabilidade dos resultados e a precisão das medições.

A validação do método permite:

- a) Avaliar a precisão e a exatidão das medições, garantindo que o método fornece resultados consistentes e próximos do valor real da substância analisada. A falta de validação pode resultar em resultados imprecisos ou enviesados, comprometendo a qualidade dos dados;
- b) Determinar a sensibilidade do método, isto é, a capacidade de detetar e quantificar com precisão baixas concentrações da substância de interesse. Além disso, é possível estabelecer o limite de detecção/quantificação, que representa a menor quantidade da substância que pode ser detetada/quantificada com confiança. Essas

informações são cruciais para assegurar que o método seja adequado para a análise pretendida.

Com base nas razões mencionadas, antes de se proceder à quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis realizou-se a otimização e validação do método analítico.

2.2.2 Otimização do método analítico

2.2.2.1 *Determinação do comprimento de onda*

Além de soluções aquosas simples compostas por um único fármaco dissolvido, também se estudaram soluções contendo os 4 fármacos, de modo a aumentar a complexidade do meio. Foi por isso necessário otimizar as condições de análise para possibilitar a quantificação seletiva mas simultânea de cada um dos compostos.

Inicialmente selecionou-se o comprimento de onda a utilizar na deteção e quantificação, por HPLC/UV-Vis, dos fármacos presentes na solução. Os espectros de absorção molecular de soluções de 10 mg/L de cada fármaco foram registados em um espectrofotómetro no intervalo de 200 a 350 nm. A concentração elevada de 10 mg/L proporcionou um bom espectro de absorção, apesar da concentração ser significativamente superior à concentração que se desejava realizar os ensaios finais de remoção (2 mg/L).

Devido ao equipamento VWR HITACHI estar equipado apenas com um detetor UV-Vis, foi necessário selecionar um comprimento de onda que permitisse a quantificação simultânea de todos os compostos, mesmo que este não correspondesse ao máximo de absorvância de alguns deles na faixa UV-Vis avaliada.

2.2.2.2 *Quantificação por HPLC/UV-Vis*

Para a separação cromatográfica dos fármacos, utilizou-se uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, com dimensões de 250 mm × 4,6 mm e com tamanho de partículas de 5,0 µm). Utilizou-se também como fase móvel, um sistema binário de solventes composto por acetonitrilo (solvente A) e água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fosfórico (H₃PO₄) (solvente B).

O método de eluição isocrática foi o preferido uma vez que permite a quantificação destes fármacos num intervalo de tempo adequado, enquanto que a utilização de um programa de gradientes iria requerer um período de equilibração e estabilização da coluna entre cada injeção de amostra, tornando o processo de análise de várias amostras consecutivas muito longo. A composição otimizada da fase móvel foi de 60 % de eluente A e 40 % de eluente B, pois dentro das composições testadas foi a que apresentou melhores resultados.

As análises realizaram-se à temperatura ambiente, utilizando-se um volume de amostra de 20 µL, e cada injeção foi repetida três vezes. Antes da análise as amostras foram filtradas por membranas de PTFE de 0,45 µm.

O método do padrão externo foi utilizado, para se proceder à quantificação dos fármacos, utilizando soluções padrão com concentrações conhecidas variando de 0,25 a 10 mg/L, de forma a se construir uma curva de calibração. As soluções padrão foram preparadas a partir de uma solução *stock* que continha uma mistura dos quatros fármacos, com uma concentração de 10 mg/L para cada um dos compostos. Cada solução padrão foi injetada três vezes no equipamento com as condições anteriormente otimizadas. O método do padrão externo foi adotado, pois é simples e fácil de interpretar.

A solução *stock* foi preparada dissolvendo-se cada fármaco em água MilliQ com a adição de uma pequena quantidade de metanol (nunca excedendo 0,5 % do volume) de modo a melhorar a solubilidade dos fármacos em água, dado que, em geral, a sua solubilidade é baixa. Todas as soluções preparadas foram armazenadas no escuro de forma a evitar a fotodegradação.

2.2.2.3 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi conduzida seguindo as diretrizes do guia “EMA/CHMP/ICH. (2023). ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures”(EMA/CHMP/ICH, 2023). Nesse contexto, avaliaram-se os seguintes parâmetros: exatidão, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), linearidade da curva de calibração e os limites de deteção e quantificação.

Para a técnica de HPLC/UV-Vis os valores para o limite de deteção instrumental (LDI) e para o limite de quantificação instrumental (LQI) foram determinados através de um

critério segundo o qual se pode, com um certo grau de segurança, distinguir do ruído de fundo o sinal usado para detecção/quantificação do analito. Este critério, em que como medida do ruído de fundo se considera o desvio padrão da solução de branco (i.e., o desvio padrão da ordenada da origem da reta de calibração), está estabelecido em (EMA/CHMP/ICH, 2023) pelas seguintes equações:

$$LDI = \frac{3,3\delta}{S} \quad 2.1$$

$$LQI = \frac{10\delta}{S} \quad 2.2$$

, onde δ é o desvio padrão da ordenada da origem da reta de calibração e S é o respetivo declive.

A exatidão deve ser estabelecida para a toda a gama de resultados obtidos no estudo e normalmente é demonstrada através da comparação dos resultados obtidos (medidos) com os resultados esperados (teóricos, sob as condições de teste regulares do procedimento analítico. Neste trabalho, a exatidão foi obtida através da razão percentual entre a concentração média obtida experimentalmente e a concentração teórica correspondente (EMA/CHMP/ICH, 2023).

A precisão deve ser investigada com amostras autênticas e homogêneas ou, caso não estejam disponíveis, amostras artificialmente preparadas (EMA/CHMP/ICH, 2023).

A repetibilidade é uma medida de dispersão ou desvio-padrão relativo (%DPR) das áreas dos picos dos analitos (EMA/CHMP/ICH, 2023). Para avaliação destes parâmetros utilizaram-se soluções padrão com quatro concentrações diferentes dentro da faixa de concentrações dos fármacos utilizados nos ensaios (0,25; 0,50; 2,5 e 5 mg/L). Realizaram-se três injeções sucessivas de cada solução, mantendo-se a fase móvel e as condições de eluição.

Para a avaliação da reprodutibilidade do aparelho, o mesmo conjunto de soluções padrão foi utilizado, mas sendo as injeções feitas em dois dias distintos.

A curva de calibração foi obtida utilizando nove soluções padrão (0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,50; 5,00; 7,50; 10,00 mg/L), numa gama de concentrações que incluía os níveis de concentração utilizados na realização dos ensaios. A análise da correlação linear na gama de concentrações utilizadas foi realizada através da aplicação do método dos mínimos quadrados (regressão linear) para obter o valor do declive e do coeficiente de determinação (R^2).

2.2.2.4 Seleção de filtros e otimização do volume de amostra a filtrar

Antes de se injetar qualquer amostra num equipamento de HPLC é imperativo filtrá-la através de membranas filtrantes de baixa porosidade de forma a evitar a obstrução dos capilares e da coluna. No entanto, estudos prévios (Carrajola, 2020; Machado et al., 2020; V. L. M. da Silva, 2024) indicaram que alguns fármacos, como o diclofenaco, podem ser parcialmente retidos em certos tipos de membranas filtrantes tais como as membranas de nylon. Assim, com o intuito de maximizar a recuperação de todos os fármacos, realizaram-se estudos com membranas filtrantes de PTFE, para minimizar as perdas de analito durante este procedimento preparatório.

Foram conduzidos estudos de recuperação do analito filtrado utilizando soluções contendo os quatro fármacos para duas concentrações diferentes (2,5 e 10 mg/L). Os filtros utilizados foram as membranas de PTFE, referidos anteriormente, da marca Labfil, com uma porosidade de 0,45 µm e um diâmetro de 25 mm.

Para otimizar o volume de solução a filtrar, testaram-se quatro volumes diferentes (5 mL, 10 mL, 15 mL e 20 mL). Foram realizadas três réplicas para cada volume testado e foram utilizados volumes crescentes de solução até se obter percentagens de recuperação de fármacos próximas de 100 %.

2.3 Estudo da capacidade de remoção dos fármacos pela bactéria

2.3.1 Microrganismos

Neste estudo, foi utilizada a bactéria da espécie *Bacillus pumilus*, isolada de uma suspensão comercial. As bactérias usadas como pré-inóculo estavam em uma

suspensão concentrada (SC) contendo 97,74 % de *Bacillus pumilus* QST 2808 (1×10^9 ufc/g).

2.3.2 Meio de cultura e condições de crescimento

Os meios de cultura têm como função fornecer aos microrganismos os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e multiplicação. Diferentes espécies de microrganismos possuem necessidades nutricionais diferentes. Assim, os meios de cultura devem ser selecionados de forma a satisfazer as necessidades do microrganismo em estudo.

Para o crescimento da cultura de *B. pumilus* em meio líquido selecionou-se um meio de cultura contendo na sua composição nutrientes (macronutrientes e micronutrientes) que também possam ser disponibilizados de forma natural por materiais argilosos, como a LECA e a vermiculite expandida, as quais irão fazer parte da matriz de suporte do microcosmos de LCMs onde posteriormente os microrganismos serão inoculados.

A composição do meio de cultura utilizado para o crescimento do *B. pumilus* em meio líquido encontra-se na tabela abaixo. A glucose, principal fonte de carbono e energia, foi adicionada antes da inoculação sempre que necessário.

Tabela 2.3. Composição do meio de cultura (adaptado de (Marchlewicz et al., 2016).

Reagentes	Concentração (g/L)
NH ₄ Cl	5,0
MgSO ₄ .6H ₂ O	0,185
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,879
KH ₂ PO ₄	0,5
Glucose	1

O pH do meio de cultura foi ajustado ao valor de 7,1 (Marchlewicz et al., 2016). O crescimento da cultura de *B. pumilus* foi realizado numa incubadora orbital (OHAUS, modelo ISLD04HDG) à temperatura constante de 30°C e com agitação constante a uma frequência de 200 rpm.

2.3.3 Preparação do inóculo

Para a obtenção do inóculo a utilizar nos ensaios foi necessário prepararem-se inicialmente pré-inóculos sucessivos (**Figura 2.1**). No primeiro pré-inóculo (pré-inóculo I) adicionou-se, num Erlenmeyer de 250 mL, um volume de 200 mL de meio de cultura com glucose e um determinado volume de suspensão comercial, a qual continha as células de *B. pumilus*. O volume de suspensão comercial foi selecionado de modo a se obter um valor próximo de 0,8 para a densidade ótica da cultura, medida ao comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}). De seguida, colocou-se o pré-inóculo na incubadora orbital, com temperatura constante de 30°C e agitação de 200 rpm, durante 24 horas. Após este período preparou-se um novo pré-inóculo (pré-inóculo II) adicionando-se, num Erlenmeyer de 250 mL, um volume de 200 mL de meio de cultura contendo glucose e um volume do pré-inóculo I, contendo as novas células de *B. pumilus*. (**Figura 2.1**). O volume do pré-inóculo I foi selecionado de forma a se obter um valor de aproximadamente 0,03 para a DO_{600nm} . De seguida, a cultura foi submetida a agitação na incubadora orbital a 200 rpm durante 24 horas e a uma temperatura constante de 30°C. Os inóculos assim obtidos foram posteriormente utilizados para os estudos de crescimento microbiano e para a avaliação da capacidade de remoção/degradação dos fármacos pela bactéria.

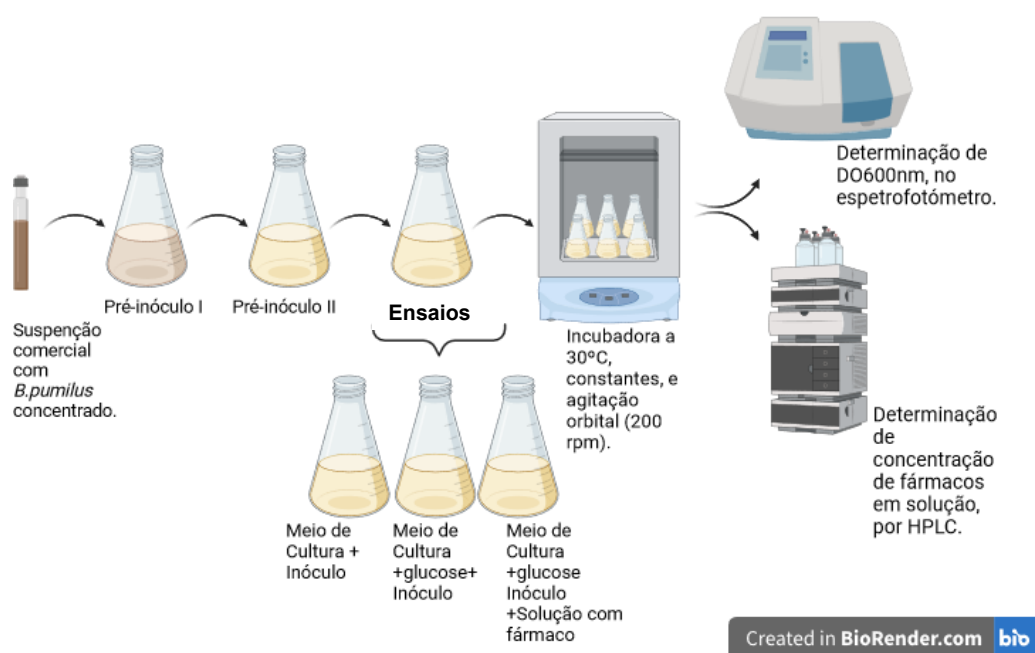


Figura 2.1 - Esquema do procedimento experimental efetuado para o estudo do crescimento de *B. pumilus* em descontínuo e estudo da remoção de fármacos em solução pelas bactérias. (Created with BioRender.com)

2.3.4 Estudo do crescimento, em descontínuo, das bactérias suspensas em meio líquido

A caracterização da curva de crescimento da bactéria *B. pumilus* realizou-se em modo descontínuo e em meio líquido, com agitação orbital (200 rpm) e temperatura constante de 30°C, utilizando-se o método da turbidimetria. Deste modo, obteve-se a curva de crescimento com base na determinação dos valores de DO_{600nm} das amostras recolhidas ao longo do tempo.

Para dar início ao estudo do crescimento do *B. pumilus*, inoculou-se um volume adequado de inóculo num Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura com glucose. O volume de inóculo adicionado foi escolhido de forma a que após a sua adição ao meio de cultura fosse obtida uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,03. Em seguida, acompanhou-se o crescimento da população microbiana recolhendo-se amostras do meio de cultura e determinaram-se os valores da DO_{600nm} de 2 em 2 horas durante cerca de 12 h. Posteriormente recolheram-se amostras correspondentes apenas às 24 h, 48h, 72 h e 96 h.

Este estudo efetuou-se também na ausência de glucose no meio de cultura, seguindo-se o mesmo procedimento experimental.

2.3.5 Estudo da capacidade de remoção/degradação dos fármacos pela bactéria em meio líquido

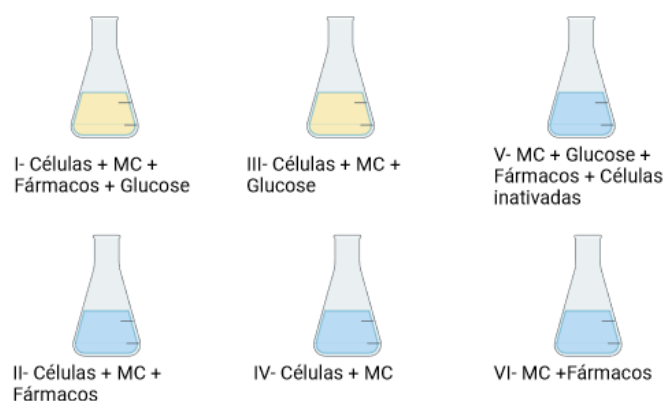
Para se avaliar a capacidade da bactéria *B. pumilus* crescer e remover/degradar os fármacos carbamazepina, diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno, realizaram-se ensaios em meio de cultura líquido, em que este foi dopado com soluções contendo apenas um dos fármacos referidos, com as concentrações iniciais de 2 mg/L, 4 mg/L ou 8 mg/L.

De forma a se avaliar a capacidade da bactéria para se desenvolver e remover os fármacos em misturas mais complexas, realizou-se ainda um ensaio onde o meio de cultura foi dopado com uma mistura de quatro fármacos, com uma concentração inicial de 2 mg/L de cada um deles.

Todos os ensaios foram conduzidos em modo descontínuo, em meio líquido, com agitação orbital (200 rpm) e temperatura constante a 30°C. As amostras foram recolhidas de 2 em 2 horas durante cerca de 12 horas, tendo de seguida sido recolhidas amostras apenas às 24 h, 48 h, 72 h e 96 h.

Para todas as amostras recolhidas em todos os Erlenmeyers, determinaram-se os valores de DO_{600nm} e, no caso das amostras contendo fármacos, determinaram-se também as suas concentrações em solução por HPLC/UV-Vis.

Na **Figura 2.2** apresenta-se um esquema geral das montagens para cada um dos ensaios.



Created in BioRender.com bio

Figura 2.2 - Esquema geral da montagem de cada um dos ensaios para as três concentrações diferentes para cada um dos fármacos em estudo e para a mistura dos quatro fármacos. (MC - Meio de cultura) (Created with Biorender.com)

Assim, no total, realizaram-se treze ensaios (três concentrações para cada um dos quatro fármacos e uma concentração para a mistura dos quatro fármacos) de acordo com as seguintes condições:

- **Erlenmeyer I:** foram colocados 200 mL de meio de cultura contendo glucose, nos quais foi inoculado um volume de cultura de *Bacillus pumilus*, resultando num valor inicial de DO_{600nm} de aproximadamente 0,03. Neste meio, foi adicionado um dos quatro fármacos na concentração a estudar (2, 4 ou 8 mg/L) para investigar a capacidade da bactéria em o remover/degradar e para avaliar os potenciais efeitos da exposição ao fármaco no desenvolvimento da cultura bacteriana.
- **Erlenmeyer II:** foram adicionados 200 mL de meio de cultura sem glucose, nos quais foi inoculado um volume de cultura de *Bacillus pumilus*, resultando num valor inicial de DO_{600nm} de aproximadamente 0,03. Neste meio, também foi adicionado o fármaco estudado, na concentração a estudar, para avaliar a capacidade da bactéria em o remover/degradar, mas com o objetivo adicional de avaliar o efeito da presença de glucose na remoção do fármaco.
- **Erlenmeyer III:** foram colocados 200 mL de meio de cultura contendo glucose, nos quais foi inoculado um volume de cultura de *Bacillus pumilus*, resultando num valor inicial de DO_{600nm} de aproximadamente 0,03. Este Erlenmeyer foi utilizado para avaliar os potenciais efeitos da exposição ao fármaco estudado no desenvolvimento da cultura bacteriana, por comparação do crescimento da

bactéria neste Erlenmeyer sem fármaco com o do Erlenmeyer I, onde o fármaco estava presente.

- **Erlenmeyer IV:** contendo 200 mL de meio de cultura sem glucose, onde foi inoculado um volume de cultura de *Bacillus pumilus* num valor inicial de DO_{600nm} de aproximadamente 0,03. Este Erlenmeyer foi usado também para avaliar o impacto da presença do fármaco no desenvolvimento da cultura, mas no caso em que o meio não continha glucose, comparando-o com o crescimento no Erlenmeyer II.
- **Erlenmeyer V:** contendo 200 mL de meio de cultura com glucose, ao qual foi adicionado um volume de cultura de *Bacillus pumilus* resultando num valor inicial de DO_{600nm} de aproximadamente 0,2. Neste meio, também foi adicionado o fármaco estudado, na concentração a estudar. Posteriormente, o conteúdo deste Erlenmeyer foi sujeito a um procedimento de inativação das células da bactéria, conforme descrito na secção seguinte. Este Erlenmeyer foi usado para avaliar a possível remoção dos fármacos por adsorção à biomassa das células inativadas (i.e., sem atividade metabólica e, portanto, incapazes de biodegradar os compostos).
- **Erlenmeyer VI:** contendo 200 mL de meio de cultura sem glucose, ao qual foi adicionado apenas o fármaco na concentração a estudar, para avaliar a sua potencial remoção por processos abióticos como a fotodegradação, hidrólise ou adsorção às paredes do recipiente.

Para os ensaios em que se estudaram as concentrações iniciais de 4 e 8 mg/L, apenas se efetuaram os estudos dos meios com adição de glucose (Erlenmeyers I, III, V e VI).

2.4 Estudo da capacidade de adsorção dos fármacos à biomassa da bactéria *Bacillus pumilus*

2.4.1 Estudos de inativação de bactérias

De forma a se avaliar a possível remoção dos fármacos através da sua adsorção às células, procedeu-se à inativação destas. A escolha do método de inativação deve considerar a natureza do fármaco, as propriedades desejadas da biomassa (como carga

superficial, porosidade e composição química) e a manutenção da integridade da parede celular, que desempenha um papel crucial no processo de adsorção.

Entre os métodos que podem ser utilizados, o tratamento térmico e a aplicação de ultrassons destacam-se por sua eficácia e simplicidade operacional. Assim, a inativação das células realizou-se através de tratamento térmico, ultrassons (US) e a combinação dos dois tratamentos.

O tratamento térmico é amplamente utilizado para garantir a destruição de células vegetativas e esporos, comuns em *Bacillus*. Já os ultrassons, por meio da cavitação acústica, causam danos mecânicos à estrutura celular, levando à inativação sem comprometer significativamente os sítios de adsorção na superfície celular. Ambos os métodos permitem a obtenção de biomassa inativa, porém funcional, preservando as características morfológicas e químicas necessárias para estudos de interação entre fármacos e componentes da parede celular. A combinação de ambos os métodos, ou a sua aplicação sequencial, pode ser explorada para maximizar a eficiência de inativação de *Bacillus* sem causar danos excessivos à estrutura celular.

A inativação de *Bacillus* por tratamento térmico e/ou por ultrassons é influenciada por diversos fatores físicos, químicos e biológicos que devem ser cuidadosamente considerados para otimizar esses processos. No tratamento térmico, a eficácia depende da temperatura aplicada, do tempo de exposição, da fase de crescimento do microrganismo (esporos são mais resistentes que células vegetativas) e da composição do meio. Já no caso do tratamento por ultrassons, fatores como a intensidade e frequência das ondas ultrassônicas, o tempo de exposição, a temperatura durante o processo (muitas vezes associado a um leve aquecimento, conhecido como termo-ultrassom), além da composição e viscosidade do meio, afetam significativamente a eficácia do processo.

Assim, inicialmente testou-se apenas tratamento térmico nos seguintes sistemas:

- dois Erlenmeyers com inóculo em água miliQ (sem glucose) com um valor de DO_{600nm} de aproximadamente 0,0400 (correspondente ao valor no início da fase log de crescimento);
- um Erlenmeyer com meio de cultura contendo glucose e inóculo, com DO_{600nm} de aproximadamente 0,0400;
- um Erlenmeyer (que serviu de controlo) contendo inóculo em água miliQ, com DO_{600nm} de aproximadamente 0,0380, o qual não foi submetido aos procedimentos de inativação.

Os Erlenmeyers (exceto o de controlo) foram sujeitos a três procedimentos de inativação distintos, tal como é esquematizado na **Figura 2.3**.

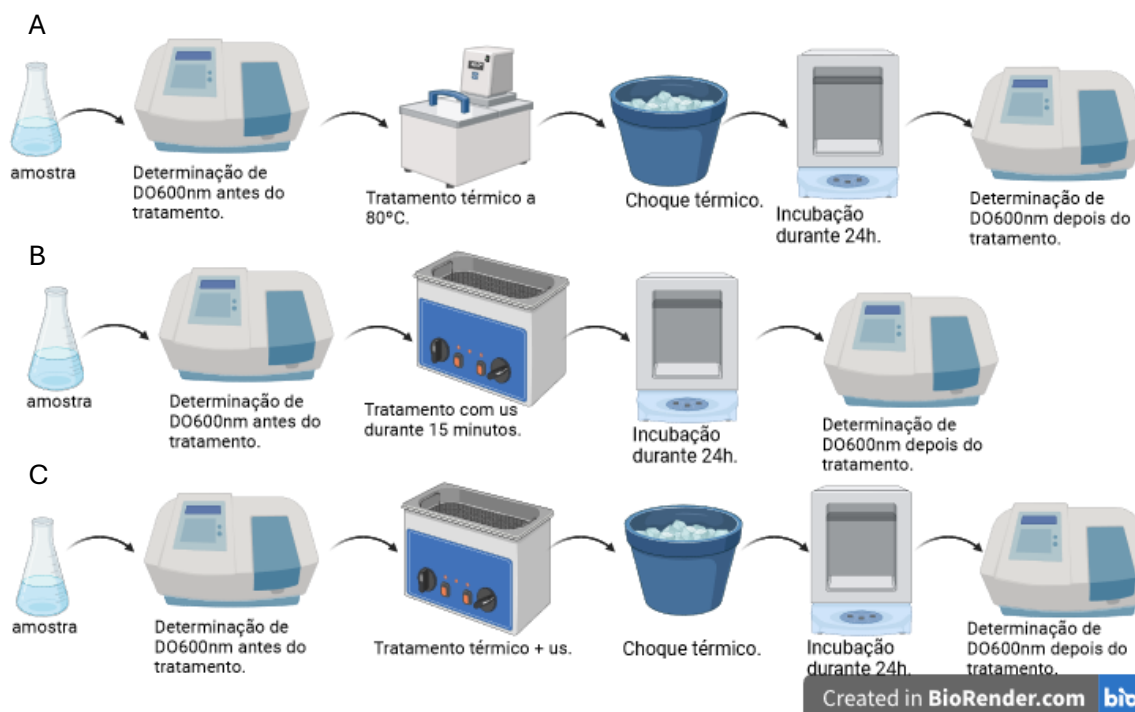


Figura 2.3 - Esquemas dos tratamentos de inativação. A - Tratamento térmico. B - Tratamento por ultrassons. C - Tratamento térmico + ultrassons. Created with BioRender.com

No **procedimento A** (tratamento térmico), após a mediação da DO_{600nm} inicial, os Erlenmeyers foram colocados num banho com temperatura aproximada de $80^{\circ}C$, durante 15 minutos, seguido de arrefecimento com choque térmico. Após o arrefecimento foram colocados na incubadora orbital, com temperatura constante de $30^{\circ}C$ e agitação orbital (200 rpm), durante 24 horas. Passadas as 24 horas houve nova determinação da DO_{600nm} , de forma a se verificar se a inativação foi efetiva.

No **procedimento B** (tratamento por ultrassons), após a mediação da DO_{600nm} inicial, realizou-se o tratamento por US, o qual foi realizado a temperatura ambiente, com uma frequência ultrassónica de 37 kHz durante 15 minutos. De seguida, colocaram-se os Erlenmeyers na incubadora, com as mesmas condições descritas acima para o procedimento A, durante 24 horas. Passadas as 24 horas determinou-se novamente a DO_{600nm} , para se verificar se houve inativação.

No **procedimento C** (tratamento térmico em conjunto com ultrassons), após a mediação da DO_{600nm} inicial, o tratamento realizou-se a uma temperatura constante de

aproximadamente 65°C e uma frequência de 37 kHz, durante 5 minutos. De seguida arrefeceram-se os Erlenmeyers com choque térmico, e após arrefecimento incubaram-se durante 24 horas, com as mesmas condições dos procedimentos anteriores. Passadas as 24 horas determinou-se novamente a DO_{600nm} , para verificar se o tratamento de inativação foi eficaz. Posteriormente, repetiu-se este procedimento, mas a uma diferente temperatura (60°C) e duração de ultrassons (15 minutos), tendo-se mantido idênticas todas as restantes condições.

Os inóculos foram preparados conforme especificado em 2.3.3.

2.4.2 Estudo da contribuição para remoção dos fármacos pela bactéria inoculada na matriz de suporte

Em estudos prévios realizados por membros da equipa de investigação foi avaliada a capacidade de uma matriz de suporte composta por uma mistura de agregados de argila expandida (LECA) 2/4 e vermiculite esfoliada 3, na proporção de 1:1 (v:v), para a remoção de diversos fármacos. Os resultados obtidos revelaram-se, de forma geral, promissores (Carrajola, 2020; Dordio, Miranda, et al., 2017; V. L. M. da Silva, 2024).

Em trabalhos realizados por Carvalho (2025) e Andrade (2025) foi também avaliado o efeito da incorporação de grânulos de cortiça expandida 3/5 na composição da matriz de suporte composta pela mistura de LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 3, na proporção de 1:1 (v:v). Assim, nesses trabalhos foram estudadas matrizes compostas por estratificações em camadas de mistura de LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 3 (1:1;v:v) e camadas de granulados de cortiça expandida 3/5 mm. Apesar da adição dos granulados de cortiça não ter resultado num aumento da remoção dos fármacos estudados (Andrade, 2025; Carvalho, 2025) pensa-se que a presença de grânulos de cortiça na composição da matriz pode eventualmente contribuir para a melhoria do funcionamento do sistema promovendo o desenvolvimento da vegetação e da população microbiana, melhorando as condições do meio (arejamento, nutrientes, etc.).

No presente trabalho, partindo-se da matriz estratificada com a mistura LECA+vermiculite e os grânulos de cortiça, atrás referida, pretendeu-se estudar a possibilidade de aumentar a eficiência de remoção de fármacos por esta matriz de suporte através da sua inoculação com o *B. pumilus*, tentando tirar partido de

mecanismos de remoção proporcionados por esta bactéria e, eventualmente, obter efeitos sinérgicos da combinação da matriz de suporte com os microrganismos.

Deste modo, procedeu-se a um conjunto de ensaios numa matriz estratificada cuja composição, tendo por base os referidos resultados obtidos em ensaios realizados por outros elementos do grupo de investigação (Andrade, 2025; Carvalho, 2025), consistiu de uma camada inicial de LECA 2/4 + vermiculite 3 (1:1, v:v), seguida de uma camada de grânulos de cortiça expandida 3/5 e uma nova camada final de LECA 2/4+vermiculite 3 (1:1, v:v), numa proporção 5:3:4.

2.4.2.1. Preparação dos materiais

Os agregados de argila expandida (LECA), a vermiculite esfoliada e os grânulos de cortiça expandida, antes de serem utilizados, foram submetidos a lavagens sucessivas com água ultrapura (Fisher Chemical), seguidas de secagem em estufa a 105 °C por um período de 24 horas. Este procedimento teve como finalidade a remoção de partículas finas e sólidos em suspensão resultante do desgaste mecânico, bem como a redução da carga microbiana eventualmente presente nos materiais. Após esta etapa, a vermiculite e a LECA foram homogeneamente misturadas na proporção volumétrica de 1:1 (v:v).

2.4.2.2. Caracterização físico-química da matriz de suporte

Antes de se iniciar o estudo da influência da presença da bactéria na matriz de suporte para remoção dos fármacos, é importante ter-se em atenção as características físico-químicas dos materiais que compõem a matriz, pois condicionam o seu papel na remoção de poluentes nos LCMs. As propriedades físico-químicas dos materiais que constituem a matriz estão intrinsecamente relacionadas com a capacidade de sorção de poluentes, as propriedades hidráulicas do sistema e o desenvolvimento das plantas e população microbiana. Assim, para a caracterização físico-química da matriz a utilizar nos ensaios determinaram-se a densidade aparente, a porosidade do meio (% de volume vazio) e pH da água.

A densidade aparente foi determinada através da razão entre a massa do material (peso seco) e o volume aparente (incluindo volumes de vazios entre partículas) do material (número de repetições=4) (Brix et al., 2001; Carvalho, 2025; Del Bubba et al., 2003). A porosidade determinou-se com base na quantidade de água que foi precisa para saturar um volume conhecido do material estratificado (número de repetições=4) (Brix et al., 2001; Carvalho, 2025; Del Bubba et al., 2003). Para se determinar o pH, colocou-se a estratificação submersa em água destilada e após algum tempo realizaram-se medições potenciométricas (número de repetições=4) (Black et al., 2016; Carvalho, 2025).

2.4.2.3. Avaliação da remoção dos fármacos pela matriz de suporte inoculada com *B. pumilus*

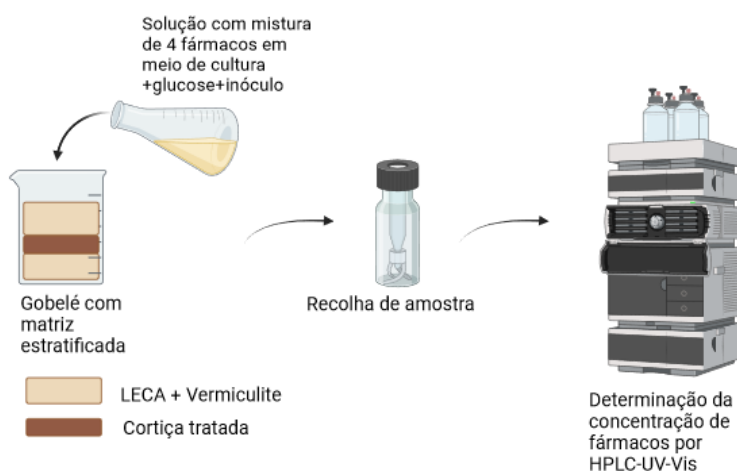
Como o objetivo de avaliar a capacidade de remoção dos fármacos pela matriz de suporte inoculada com *B. pumilus* foram realizados 2 ensaios para uma mistura dos quatro fármacos a duas concentrações distintas (4mg/L e 10 mg/L) de cada um deles. Assim, em mais detalhe, cada um dos ensaios foi montado da seguinte forma:

- dois copo com a matriz de suporte composta por uma camada inicial de LECA 2/4 + vermiculite 3 (1:1, v:v), seguida de uma camada de grânulos de cortiça expandida 3/5 e uma nova camada final de LECA 2/4+vermiculite 3 (1:1, v:v), numa proporção 5:3:4, aos quais apenas se adicionou água, os quais serviram de controlo;
- dois copos com a matriz de suporte composta por uma camada inicial de LECA 2/4 + vermiculite 3 (1:1, v:v), seguida de uma camada de grânulos de cortiça expandida 3/5 e uma nova camada final de LECA 2/4+vermiculite 3 (1:1, v:v), numa proporção 5:3:4, aos quais se adicionou a solução aquosa de mistura de quatro fármacos estudada, com o objetivo de avaliar a remoção apenas pela matriz (sem adição de inóculo);
- dois copos com a matriz de suporte composta por uma camada inicial de LECA 2/4 + vermiculite 3 (1:1, v:v), seguida de uma camada de grânulos de cortiça expandida 3/5 e uma nova camada final de LECA 2/4+vermiculite 3 (1:1, v:v), numa proporção 5:3:4, aos quais se adicionou a solução aquosa de mistura de quatro fármacos estudada, num meio de cultura contendo glucose e inóculo ($DO_{600\text{ nm}}, \approx 0,2$). Estes copos foram colocados na incubadora a uma temperatura

constante de 30°C e tiveram o objetivo de avaliar o efeito causado pela adição do inóculo na capacidade de remoção dos fármacos pelo sistema.

O inóculo preparou-se conforme especificado em 2.3.3.

Após a montagem dos ensaios, estes foram executados conforme esquematizado na **Figura 2.4**, tendo-se recolhido amostras a cada duas horas até às 12 horas e, posteriormente, também às 24, 48, 72, 96, 144 e 168 horas. Finalmente determinaram-se por HPLC/UV-Vis as concentrações dos fármacos nas amostras recolhidas.



Created in BioRender.com 

Figura 2.4 - Esquema do procedimento realizado para estudo da capacidade de remoção dos fármacos pela matriz inoculada com as bactérias. (Created with BioRender.com).

2.5 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística destes resultados foi realizada com recurso ao programa Microsoft EXCEL. Além disso aplicou-se a análise de variâncias (ANOVA fator único) para a comparação de alguns resultados. Em todos os casos, as análises de ANOVA foram conduzidas com um nível de confiança de 95%.

3. Resultados e discussão

3.1 Otimização do método analítico para a quantificação de fármacos em solução aquosa

3.1.1 Seleção do comprimento de onda de quantificação

Como havia sido mencionado anteriormente, a separação dos quatro fármacos (ibuprofeno, diclofenaco, carbamazepina e naproxeno) presentes na solução e a sua quantificação foram realizadas com recurso à técnica analítica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com deteção por espectrofotometria de UV-Vis, onde se utilizou um aparelho VWR HITACHI equipado com detetor UV-Vis de comprimento de onda (c.d.o.) único variável. As condições de análise, foram as condições otimizadas descritas na secção 2.2.2.2 Quantificação por HPLC/UV-Vis.

Os detetores UV-Vis são amplamente utilizados em HPLC, pois são economicamente mais acessíveis e, geralmente, são pouco afetados por pequenas flutuações de fluxo e temperatura. Estes detetores apresentam variadas configurações sendo uma das mais comuns o detetor de c.d.o. único variável. Porém, o detetor utilizado apenas permite as determinações a um único c.d.o. aquando da análise cromatográfica, embora o valor desse c.d.o. possa ser arbitrário e variar entre análises. De forma a selecionar-se o c.d.o. a utilizar no HPLC/UV-Vis para a quantificação dos quatro fármacos presentes na solução aquosa, procedeu-se de acordo com o método descrito em 2.2.2.1

Determinação do comprimento de onda, tendo-se obtido os seguintes espectros **Figura 3.1** para os diferentes fármacos.

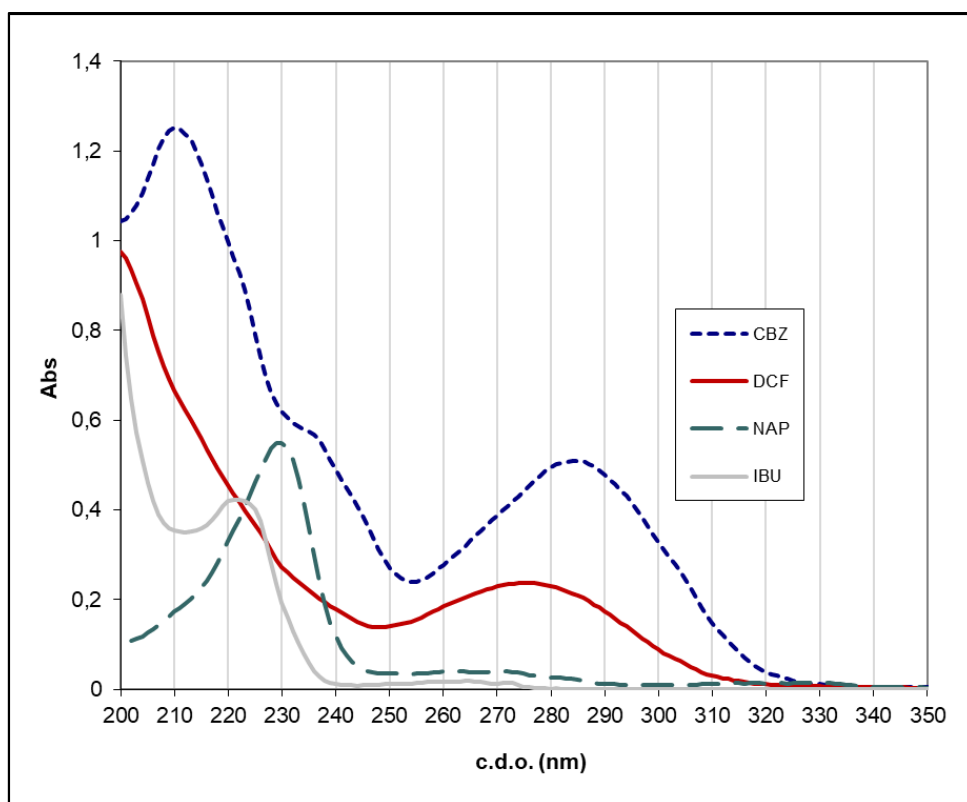


Figura 3.1 - Espectro de absorção molecular na zona do UV dos fármacos ibuprofeno, carbamazepina, naproxeno e diclofenaco.

Observando os espectros na figura acima é possível verificar que cada fármaco estudado apresenta um diferente valor de c.d.o. correspondente ao máximo de absorvância, nomeadamente: 221 nm para o ibuprofeno, 210 nm para a carbamazepina, 228 nm para o naproxeno e 271 nm para o diclofenaco.

De modo a realizar-se a quantificação dos quatro fármacos em simultâneo neste equipamento (uma vez que não possui um detetor *Diode Array* (DAD), mas apenas um detetor UV-Vis de c.d.o. único variável) foi necessário seleccionar um único c.d.o. que correspondesse a uma zona de elevada absorvância para todos os fármacos, possibilitando deste modo a sua quantificação simultânea. Assim, foi seleccionado o c.d.o. de 220 nm, o qual corresponde ao máximo de absorvância para o ibuprofeno (o composto com menor absorvância na gama dos UV), mas que também é adequado para quantificar os restantes compostos, pois a 220 nm os outros três fármacos apresentam igualmente uma absorvância elevada.

3.1.2 Quantificação por HPLC/UV-Vis

Os perfis cromatográficos individuais de cada um dos fármacos e da solução contendo os quatro fármacos foram obtidos com detecção em UV-Vis a um c.d.o. de 220 nm. Realizaram-se injeções das soluções padrão de cada composto isolado e da mistura dos quatro fármacos, seguindo as condições referidas anteriormente, de modo a possibilitar a identificação de cada um dos compostos no cromatograma. Na **Figura 3.2**, é possível visualizar-se os cromatogramas obtidos por HPLC/UV-Vis para a solução padrão contendo os quatros fármacos com uma concentração de 2 mg/L de cada fármaco.

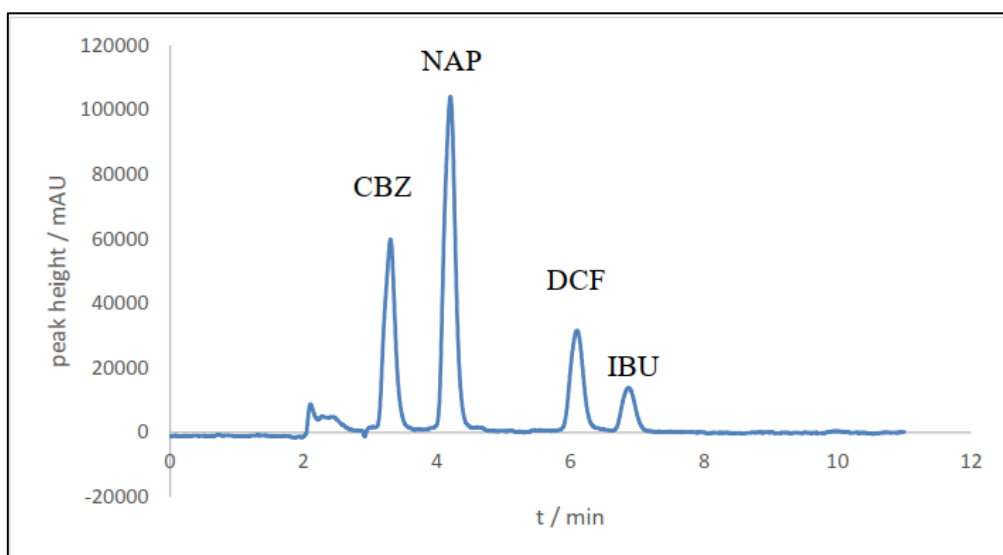


Figura 3.2 - Cromatograma obtido por HPLC/UV-Vis para uma solução padrão com ibuprofeno (2 mg/L), naproxeno (2mg/L), diclofenaco (2 mg/L) e carbamazepina (2mg/L).

Para se identificarem os picos correspondentes a cada fármaco fez-se a comparação dos tempos de retenção obtidos nos cromatogramas de soluções padrão de cada composto isolado, com os tempos de retenção obtidos na solução padrão com a mistura dos quatro compostos.

Identificaram-se os seguintes tempos de retenção: 3,3 min para a carbamazepina, 4,2 min para o naproxeno, 6,1 min para o diclofenaco e 6,9 min para o ibuprofeno.

3.1.3 Validação do método analítico

Para se realizar a validação do método analítico seguiram-se as diretrizes do guia “EMA/CHMP/ICH. (2023). ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures” (EMA/CHMP/ICH, 2023). Os parâmetros avaliados foram a exatidão, a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), a linearidade da curva de calibração e os limites de detecção e quantificação instrumentais.

Com o objetivo de se efetuar a quantificação dos fármacos em solução aquosa, contruíram-se as curvas de calibração para cada um dos quatro fármacos estudados (parâmetros das retas apresentados na **Tabela 3.1**) e avaliaram-se o limite de detecção (LDI), o limite de quantificação (LQI) e o coeficiente de determinação (R^2), do método analítico.

Na **Tabela 3.1** estão apresentados os parâmetros estimados, incluindo a equação da reta, o LDI, o LQI, bem como o coeficiente de determinação.

Tabela 3.1 - Estatística de regressão das retas de calibração e valores de LDI e LQI calculados para cada um dos fármacos.

Fármacos	Carbamazepina	Ibuprofeno	Naproxeno	Diclofenaco
Equação da reta	$y = 479601x + 10404$	$y = 178858x + 2993$	$y = 681804x + 13300$	$y = 266065x + 4836$
R^2	0,9999	0,9997	0,9999	0,9998
LDI (mg/L)	0,031	0,052	0,027	0,038
LQI (mg/L)	0,094	0,158	0,081	0,114

Analisando-se as equações das retas de calibração é possível verificar que o R^2 é superior a 0,9997 em todos os casos. O R^2 mostra o quão próximos os valores medidos estão da reta de regressão que foi ajustada, sendo que este coeficiente varia entre 0 e 1. Isto assegura que os valores de concentração determinados por regressão linear são confiáveis dentro das gamas de concentrações em que foram construídas as curvas.

Verificou-se que, entre os fármacos analisados, o naproxeno e o ibuprofeno apresentam, respetivamente, os menores e os maiores limites de detecção e de quantificação. No entanto, para todos os compostos estudados os limites de quantificação encontram-se

abaixo das concentrações determinadas experimentalmente neste estudo, pelo que não apresentam impedimento à sua quantificação rigorosa.

Analizou-se também a exatidão e a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) seguindo a metodologia descrita na secção 2.2.2.3 Validação do método analítico, para todos os fármacos. Na tabela seguinte estão apresentados todos os resultados utilizados para a avaliação da repetibilidade e exatidão (% nominal) do aparelho.

Tabela 3.2 - Parâmetros para avaliação da repetibilidade do HPLC/UV-Vis.

Fármacos	[Medida] (mg/L)	DPR (%)	[Teórica] (mg/L)	% Nominal
Carbamazepina	0,29	5,97	0,30	98
	0,56	2,67	0,60	94
	2,94	1,15	2,98	99
	5,88	0,82	5,95	99
Ibuprofeno	0,29	21,87	0,28	102
	0,52	9,71	0,56	92
	2,78	1,96	2,80	99
	5,53	1,32	5,60	99
Naproxeno	0,24	3,15	0,25	96
	0,47	2,65	0,50	93
	2,49	0,95	2,53	98
	4,98	0,61	5,05	99
Diclofenaco	0,25	4,02	0,26	96
	0,48	5,99	0,52	92
	2,52	1,29	2,58	98
	5,09	1,18	5,15	99

O valor de DPR (%) é obtido pela divisão do desvio-padrão pela média das medições, multiplicado por 100 de forma a obter-se um resultado em percentagem. Já o valor de % Nominal foi obtido através da divisão da concentração real pela concentração teórica

(nominal), multiplicada por 100. Este valor permite avaliar a quantidade de fármaco perdida no procedimento analítico, sendo o valor ideal de 100%.

Na **Tabela 3.3** estão apresentados todos os resultados utilizados para a avaliação da reprodutibilidade do aparelho.

Tabela 3.3 - Parâmetros para avaliação da reprodutibilidade do HPLC/UV-Vis.

Fármacos	[Medida] (mg/L)	DPR (%)	[Teórica] (mg/L)	% Nominal
Carbamazepina	0,29	4,66	0,30	98
	0,55	2,48	0,60	93
	2,95	1,05	2,98	99
	5,96	1,95	5,95	100
Ibuprofeno	0,28	19,4865	0,28	100
	0,53	5,33	0,56	95
	2,76	2,24	2,80	98
	5,58	2,11	5,60	110
Naproxeno	0,24	4,19	0,25	95
	0,47	3,47	0,51	93
	2,51	1,51	2,53	99
	5,05	1,96	5,05	100
Diclofenaco	0,26	7,63	0,26	99
	0,46	3,41	0,52	89
	2,55	2,34	2,58	99
	5,13	2,11	5,15	102

Para todos os compostos e todas as concentrações testadas (0,25; 0,5; 2,5 e 5 mg/L), com exceção de um caso nitidamente anômalo (a concentração mais baixa de ibuprofeno), o método analítico desenvolvido e otimizado para a quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis demonstrou boas repetibilidade (DPR < 9,8 %) e reprodutibilidade (DPR < 7,7%) para todos os fármacos. Como era expectável, os valores de DPR tendem a aumentar à medida que as concentrações analisadas diminuem, refletindo maior variabilidade relativa às concentrações mais baixas. Este

comportamento decorre do facto de as incertezas associadas às medições (ruído de fundo) tomarem um maior peso relativo quando os valores absolutos medidos são baixos, resultando numa maior dispersão relativa dos dados nessas condições.

Os resultados da exatidão para as concentrações testadas (no mesmo dia e em diferentes dias) são elevados para todos os fármacos (geralmente acima dos 98%) indicando a aparente ausência de erros sistemáticos cometidos por este procedimento analítico. A maior diferença observada entre a concentração medida e a teórica ocorreu para a quantificação de uma solução de 0,52 mg/L de diclofenaco, com uma % nominal de 89%, correspondendo a um erro relativo de 11%.

3.1.4 Otimização das condições de filtração das amostras

Como mencionado anteriormente, a filtração prévia das amostras por membranas de baixa porosidade é um passo essencial para a utilização da técnica analítica de HPLC/UV-Vis.

Deve-se ter em atenção que as membranas filtrantes selecionadas podem reter alguns dos compostos orgânicos, isto porque, dependendo do material das membranas filtrantes, da concentração do composto em solução e de outras características do composto tais como a polaridade, grau de ionização e capacidade de estabelecimento de interações, pode ocorrer uma interação entre a membrana e o composto que leve a que o composto seja adsorvido ao material da membrana filtrante. Tal já foi observado em vários estudos que se encontram reportados na literatura (Carlson & Thompson, 2000; Machado et al., 2020; Pillai et al., 2016), bem como em trabalhos anteriores realizados por colegas do grupo de trabalho (Andrade, 2025; Carvalho, 2025; V. L. M. da Silva, 2024).

Tem-se verificado que a retenção de compostos orgânicos polares é particularmente relevante em membranas de nylon. Este material polimérico apresenta grupos funcionais ácido carboxílico e amina, além de ligações amida, que podem estabelecer interações eletrostáticas e/ou ligações de hidrogénio com analitos de carácter ácido ou básico. Tais interações intermoleculares podem, de facto, favorecer a retenção dos analitos pela matriz polimérica da membrana filtrante (Machado et al., 2020). Este possível efeito indesejável levou a que neste trabalho apenas fossem utilizadas membranas filtrantes de PTFE, da marca Labfil, com uma porosidade de 0,45 µm, para

as quais não se observa normalmente este tipo de efeitos (Andrade, 2025; Carlson & Thompson, 2000; Carvalho, 2025; Machado et al., 2020; Pillai et al., 2016).

O politetrafluoroetileno (PTFE) é um fluoropolímero sintético muito apolar, caracterizado por uma estrutura alifática em que todos os átomos de hidrogénio da cadeia carbonada são substituídos por átomos de flúor, eliminando praticamente a formação de momentos dipolares significativos (Michlig et al., 2024). Esta natureza apolar confere ao PTFE baixa afinidade por compostos polares, reduzindo a sua capacidade de interação e adsorção desses analitos (Michlig et al., 2024).

Para garantir a máxima recuperação dos fármacos no passo de filtração procedeu-se à otimização do volume de solução a filtrar previamente de forma a preparar a membrana seguindo os passos mencionados em 2.2.2.4 Seleção de filtros e otimização do volume de amostra a filtrar.

Na figura seguinte estão representados os resultados das percentagens de recuperação dos quatro fármacos no filtro de PTFE para a concentração de 2.5 mg/L considerando os diferentes volumes de solução filtrada.

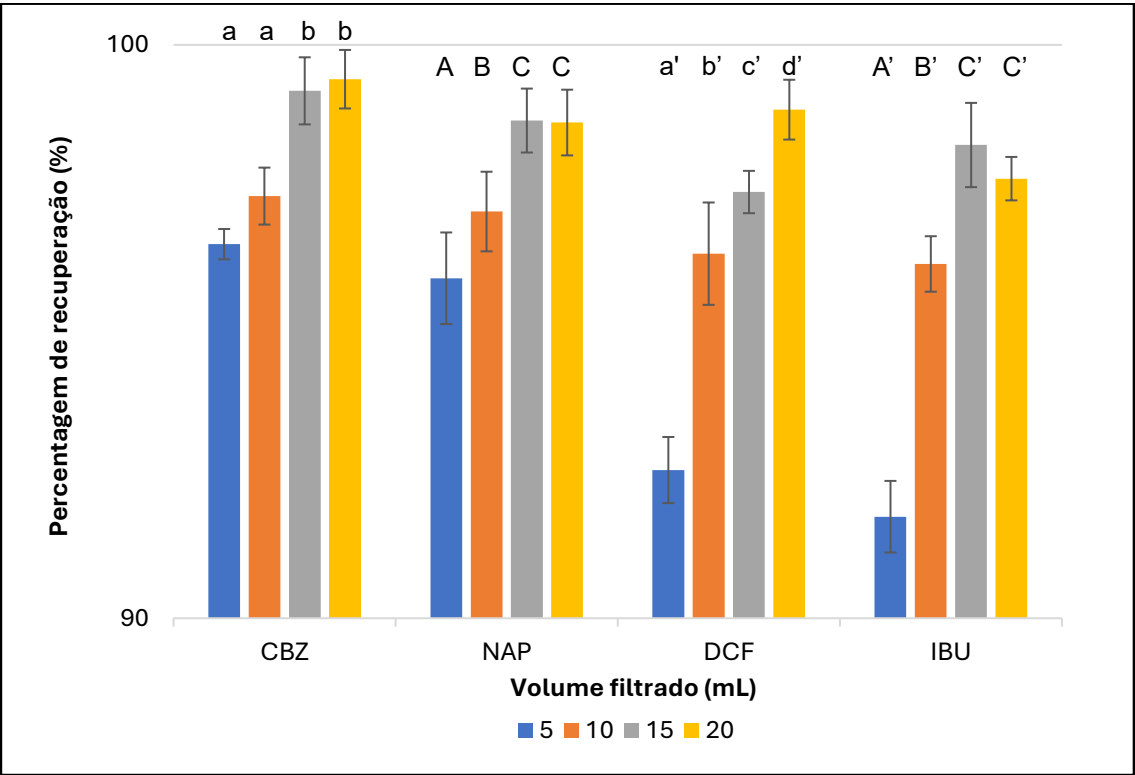


Figura 3.3 - Percentagens de recuperação para os diferentes fármacos a uma concentração de 2,5 mg/L, após filtração utilizando filtros PTFE. Letras diferentes significam que os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem a comparações de % recuperação para a CBZ. Letras maiúsculas correspondem a comparações de % de recuperação entre o NAP. Letras minúsculas com

apóstrofe correspondem a comparações de % de recuperação entre o DCF. Letras maiúsculas com apóstrofe correspondem a comparações de % de recuperação entre o IBU.

Na figura seguinte estão representados os resultados das percentagens de recuperação dos quatro fármacos no filtro de PTFE para a concentração de 10 mg/L considerando os diferentes volumes de solução filtrada.

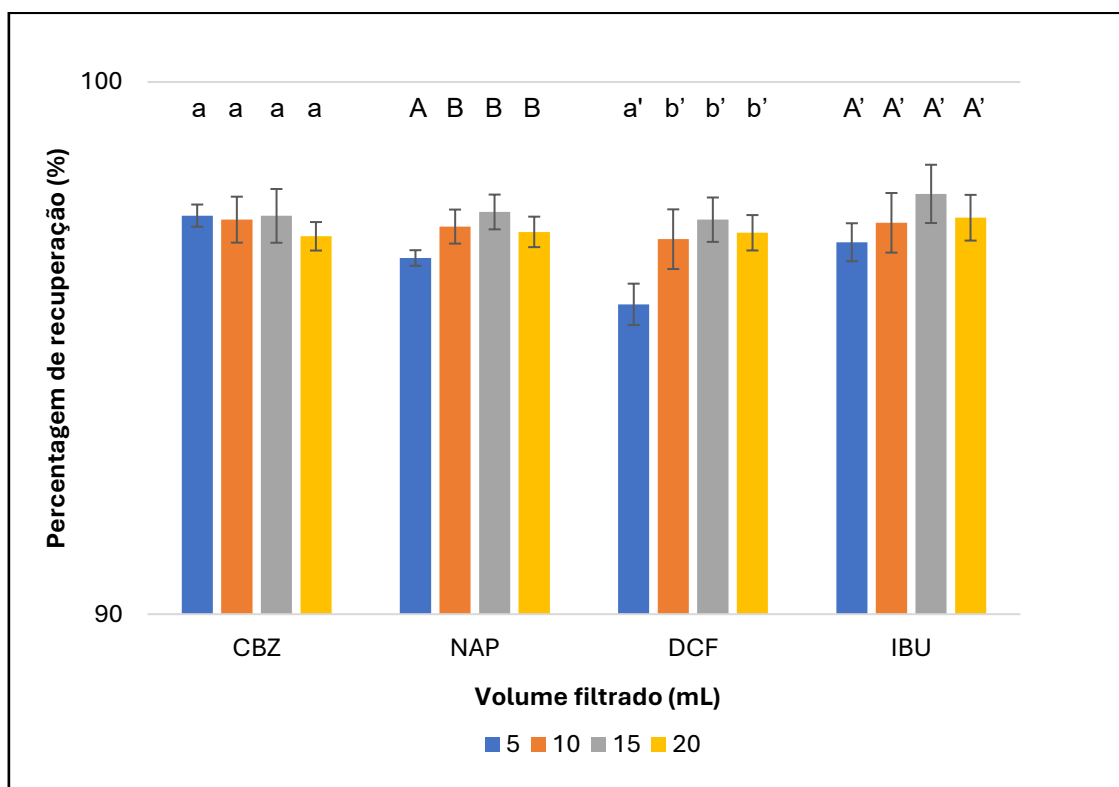


Figura 3.4 - Percentagens de recuperação para os diferentes fármacos a uma concentração de 10 mg/L, após filtração utilizando filtros PTFE.

Letras diferentes significam que os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras minúsculas correspondem a comparações de % recuperação para a CBZ. Letras maiúsculas correspondem a comparações de % de recuperação entre o NAP. Letras minúsculas com apóstrofe correspondem a comparações de % de recuperação entre o DCF. Letras maiúsculas com apóstrofe correspondem a comparações de % de recuperação entre o IBU.

Observando as figuras, no geral, percebe-se que quanto maior for o volume filtrado e maior a concentração do fármaco, maior será a percentagem de recuperação dos compostos.

Comparando as percentagens de recuperação obtidas para os diferentes volumes de filtrado, verifica-se que com um volume filtrado de 5 mL resultam, normalmente, percentagens de recuperação mais baixas. No entanto, a partir de um volume de filtrado de 10 mL, em todos os casos, as recuperações são sempre superiores a 95%. Para a concentração de 10mg/L não se observaram diferenças significativas entre as % de

recuperação de cada fármaco a partir dos volumes de 10 mL. Porém, para a concentração de 2,5 mg/L, tal só se verificou a partir dos 15.

Deste modo, decidiu-se que o volume a utilizar para a preparação dos filtros era de pelo menos 15 mL da solução de fármaco a analisar no HPLC/UV-Vis.

Assim, em todos os ensaios para a quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis foram utilizados filtros de PTFE da Labfil, previamente submetidos ao pré-tratamento descrito anteriormente.

3.2 Caracterização das curvas de crescimento do *Bacillus pumilus*

De forma a caracterizar o crescimento do *B. pumilus* em descontínuo em meio líquido, na presença de glucose como fonte de carbono e na sua ausência, determinou-se ao longo do tempo o valor da densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}), durante cerca de 50 horas. As medições realizaram-se às 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 26 e 50 horas de acordo com o procedimento descrito na secção 2.3.4.

Na **Figura 3.5** apresentam-se três réplicas da curva de crescimento da bactéria *B. pumilus* em modo descontínuo, realizado em meio líquido contendo glucose como fonte de carbono e uma curva de crescimento da bactéria obtida nas mesmas condições, mas na ausência de glucose no meio.

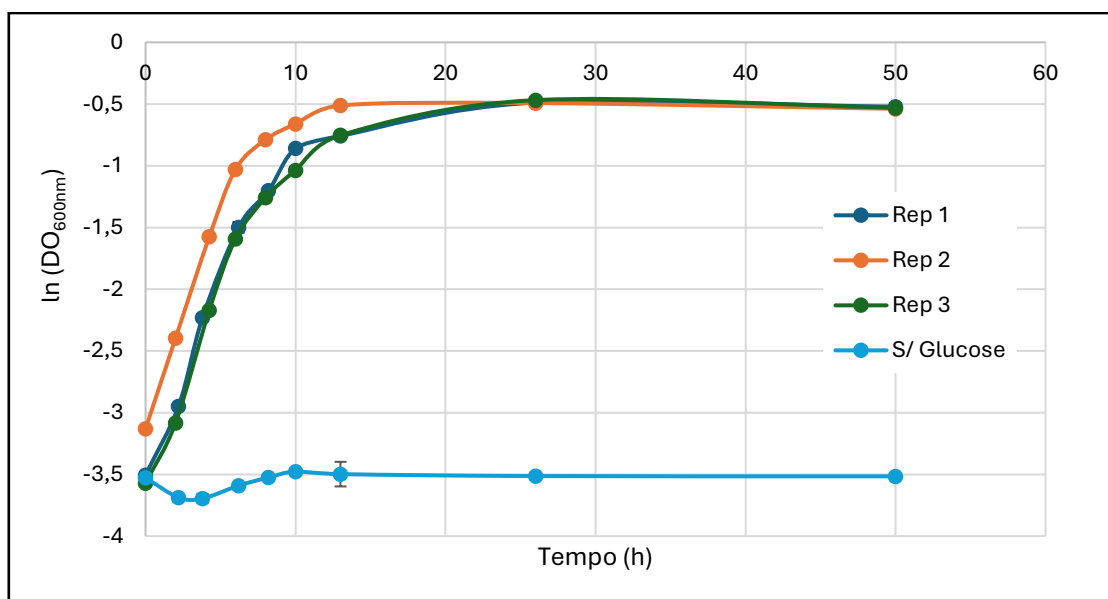


Figura 3.5 - Curva de crescimento do *Bacillus pumilus* em meio de cultura líquido com glucose (Rep1, Rep 2 e Rep 3) e sem glucose.

Da análise da curva de crescimento do *Bacillus pumilus* no meio de cultura sem glucose, apresentada na **Figura 3.5**, é possível verificar-se que na ausência de glucose a bactéria não apresentou crescimento, uma vez que não se verificaram alterações significativas na DO_{600 nm} durante o período de estudo, o que leva à hipótese de que a bactéria necessita da glucose como fonte de carbono e energia para se multiplicar.

Da observação das curvas de crescimento do *Bacillus pumilus*, obtidas em meio de cultura com glucose, apresentadas na **Figura 3.5**, pode-se concluir que ocorreu multiplicação celular e que estas curvas apresentam as quatro fases típicas do crescimento microbiano em modo descontínuo.

Numa primeira fase, que se designa de fase de latência ou *lag*, as bactérias necessitam de algum tempo de adaptação à composição do meio (fonte de carbono, macro e micronutrientes) e às condições de crescimento (temperatura, pH, disponibilidade de oxigénio, etc.). No presente trabalho, esta fase teve uma duração inferior a 2 horas, não tendo sido possível determinar exatamente qual a sua duração, pois para o tempo de 2 h o valor da DO_{600nm} para as 3 curvas era já cerca de 1,5 a 2 vezes superior ao valor inicial da DO_{600nm}. De facto, como se estabeleceu no início dos ensaios um período de amostragem de 2 em 2 h, a colheita da primeira amostra só foi feita ao fim de 2 h de ensaio, não havendo, portanto, qualquer outra amostra recolhida a um tempo mais curto. Como tal, não foi possível determinar exatamente a duração desta fase.

Durante a fase *lag* o microrganismo realiza diversas atividades metabólicas para se adequar ao ambiente e preparar-se para o crescimento exponencial. Durante este

período, a síntese de proteínas, enzimas e outras moléculas é ativada para se adaptar às novas fontes de nutrientes disponíveis e à composição do meio de cultura.

A duração da fase *lag* pode ser influenciada pelo estado metabólico das células do inóculo, por exemplo se se encontram num estado metabólico ativo (com elevada taxa de crescimento e síntese de biomoléculas essenciais) ou, em contraste, se estão em estados de metabolismo reduzido ou latente, como a fase estacionária ou a formação de esporos. A duração desta fase é também influenciada por todas as condições que condicionam o crescimento microbiano, nomeadamente pela composição do meio de cultura, pela disponibilidade de nutrientes e por condições ambientais como a temperatura, pH, disponibilidade de oxigénio e velocidade de agitação do meio.

Como a duração desta fase foi relativamente curta, pode-se inferir que os inóculos de *Bacillus pumilus* usados nos estudos, preparados de acordo com o descrito na secção 2.3.3, eram compostos por células relativamente jovens e que se adaptaram rapidamente às condições de crescimento, o que valida o modo de preparação dos inóculos adotado.

Quando as bactérias estão devidamente adaptadas e prontas para crescer ativamente, a curva entra na fase de crescimento exponencial, onde o número de células aumenta rapidamente. De seguida a curva entra na fase estacionária onde o número de células se mantém constante (porque a taxa de multiplicação é aproximadamente igual à taxa de morte) e finalmente entra na fase de declínio (em que deixa de haver multiplicação e, eventualmente, todas as células acabam por morrer). As durações destas duas fases dependem da disponibilidade de nutrientes e da acumulação de produtos tóxicos no meio de cultura.

Na **Figura 3.5** verifica-se que às 2 horas a bactéria já está no início da fase de crescimento exponencial ou fase *log*, durando esta fase até pelo menos às 6 horas. Durante a fase *log*, as bactérias multiplicam-se a uma velocidade específica de crescimento (μ), que é máxima e constante, tal como o tempo de geração (*g*). A velocidade de divisão varia de espécie para espécie de bactéria e está dependente das condições ótimas para cada organismo, tais como disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura e composição do meio. De qualquer modo, durante esse intervalo de tempo ocorre a maior proliferação de microrganismos, o que deveria possibilitar a maior metabolização ou co-metabolização de substâncias como os fármacos, bem como uma maior extensão da adsorção dessas substâncias à biomassa, que se encontra também a crescer a um ritmo exponencial.

Da observação das curvas de crescimento 1, 2 e 3 (**Figura 3.5**) conclui-se que a fase estacionária terá ocorrido entre as 6 h e as 26 h. No entanto, numa das curvas (curva 2) verificou-se que essa réplica do estudo entrou na fase seguinte (de declínio) mais cedo do que as restantes, as quais seguiram um perfil de crescimento mais ou menos paralelo entre si e, portanto, nesse caso a fase estacionária teve uma duração mais breve. Este período mais curto para a fase estacionária poderá ter resultado de um consumo mais rápido dos nutrientes devido ao facto de o número inicial de células (evidenciado pelo valor da DO_{600nm}) ser maior nesta réplica, o que terá levado neste caso a um maior crescimento e mais rápido esgotamento dos nutrientes.

Entretanto, deve-se também salientar que entre as 13h e as 26 h do crescimento microbiano não foi possível fazer a recolha de amostras, o que impossibilita a determinação do instante exato em que ocorreu o fim da fase estacionária de crescimento.

Posteriormente, ao fim de 26 h (ou 13h no caso da curva 2) entrou-se na fase de declínio ou morte, em que o número de bactérias viáveis diminuiu, podendo as bactérias terem morrido ou ficado inativadas. No entanto, isto não significa necessariamente uma diminuição da DO_{600nm} pois por este método é contabilizado o número de células totais, incluindo as células mortas ou inativadas. No entanto, neste caso verificou-se de facto uma pequena diminuição nos valores de absorvância nesta fase. Acredita-se que tal resultado se deve à aglomeração das células quando estas cessam atividade e sua sedimentação, levando à clarificação da solução e consequente diminuição da densidade ótica.

Comparando o crescimento da bactéria neste estudo com o de outro estudo onde também se utilizou o *B. pumilus* em condições semelhantes (Reyes-cortes et al., 2021) observou-se que os valores obtidos de DO_{600nm} são da mesma ordem de grandeza com os registados no presente estudo. Também foi possível observar-se semelhanças nas curvas de crescimento e com os tempos de duração das diferentes fases com as deste estudo.

Também se realizou a comparação com o estudo de (Avendaño et al., 2015), onde o *B. pumilus* também foi utilizado, porém com condições ligeiramente diferentes. Observou-se que na fase exponencial do estudo de (Avendaño et al., 2015) os valores observados para DO_{630nm} encontravam-se na mesma ordem de grandeza dos apresentados na **Figura 3.5**.

Estes resultados destacam a influência das condições específicas do meio de cultura na dinâmica de crescimento bacteriano. Deste modo, é possível afirmar-se que as

condições de crescimento selecionadas para este estudo (nomeadamente, a temperatura, a concentração de glucose, a composição geral do meio de cultura, o valor do pH do meio e a velocidade de agitação) foram adequadas para o desenvolvimento da bactéria, tendo assim sido adotadas para os restantes ensaios.

3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento do *B. pumilus*

A determinação dos parâmetros cinéticos é indispensável, uma vez que estes permitem retirar conclusões sobre como as diferentes condições de crescimento podem influenciar o desenvolvimento das bactérias e definir quais as condições ótimas para o seu desenvolvimento. Normalmente fatores ambientais, tais como a composição do meio de cultura, o pH, a temperatura, a disponibilidade de O₂ e a presença de substância tóxicas ou inibidoras, entre outros, influenciam significativamente a velocidade de crescimento.

Os parâmetros cinéticos determinados neste trabalho foram a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), o tempo de geração (g) e o número de gerações (n).

Para o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento tem-se a seguinte equação:

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0} \quad 3.1$$

onde x corresponde à DO_{600nm} medida no tempo t e x_0 corresponde à DO_{600nm} medida no início do ensaio, t_0 . Sabendo que $\mu_{m\acute{a}x}$ é máxima e constante, é possível obter-se o tempo de geração através da seguinte equação:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad 3.2$$

e com o tempo de geração é possível calcular-se o número de gerações:

$$n = \frac{\Delta t (fase \log)}{g} \quad 3.3$$

Para a determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento do *B. pumilus* na presença de glucose, realizou-se uma regressão linear da reta que melhor se ajusta ao gráfico $\ln$ (Abs) vs tempo, para cada uma das três réplicas obtidas nos ensaios laboratoriais (**Figura 3.5**). Para esta análise selecionou-se o intervalo de tempo correspondente à fase exponencial de crescimento (2 - 6 h). A partir dos declives das retas obtidas por regressão linear obtiveram-se os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ para cada réplica. Na **Tabela 3.4** encontram-se os parâmetros cinéticos obtidos para cada uma das réplicas.

Tabela 3.4- Parâmetros cinéticos obtidos a partir do ensaio do crescimento do *Bacillus pumilus*.

Parâmetros cinéticos	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Média	DP	DPR (%)
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	0,358	0,343	0,374	0,358	0,0158	4,3981
g (h)	1,94	2,02	1,85	1,94	0,0851	4,3929
n	2,06	1,98	2,16	2,07	0,0909	4,3981

Na **Tabela 3.5** encontram-se alguns valores de parâmetros cinéticos de crescimento para o *B. pumilus* obtidos em estudos diferentes.

Tabela 3.5 - Parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento do *B. pumilus* em estudos publicados.

Meio de cultura	(Reyes-cortes et al., 2021)				(Avendaño et al., 2015)		
	Controlo	0,2% (p/v) sais	0,3% (p/v) sais	NaCl 0 mol/L	NaCl 0,23 mol/L	MgCl ₂ 0 mol/L	MgCl ₂ 0,2 mol/L
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	0,773 ± 0,0114	0,563 ± 0,018	0,567 ± 0,029	0,4700	0,3300	0,4500	0,2300
g (h)	0,8967	1,231	1,223	1,500	2,100	1,600	3,000

Comparando os parâmetros cinéticos obtidos no estudo realizado por Reyes-cortes et al. (2021) para a mesma bactéria que é estudada no presente trabalho, verifica-se que

os valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos em ambos os estudos encontram-se na mesma ordem de grandeza. Porém, os reportados no trabalho acima citado são superiores aos do presente estudo, principalmente para o controlo. Relativamente aos valores de g , consequentemente, os obtidos por Reyes-cortes et al. (2021) são inferiores aos deste estudo, o que corresponde a uma cinética de crescimento mais rápida.

Ao realizar-se a comparação com o estudo de Avendaño et al. (2015) é possível observar-se que os valores de $\mu_{\text{máx}}$ são ligeiramente superiores aos obtidos no presente trabalho (**Tabela 3.4**) quando não existem sais presentes e que, nas mesmas condições, os valores de g são ligeiramente inferiores, indicando cinéticas de crescimento mais rápidas. Quando são adicionados o NaCl e o MgCl_2 observa-se uma diminuição nos valores de $\mu_{\text{máx}}$ e consequentemente um aumento dos valores de g tornando a cinética de crescimento idêntica à deste estudo.

Deste modo, pode-se afirmar que a cinética de crescimento obtida neste estudo é ligeiramente inferior às reportadas em outros estudos em condições semelhantes reportados na literatura, quando não são adicionados outros fatores à cultura.

3.4 Estudo da capacidade de remoção de fármacos pela bactéria *B. pumilus*

Com o objetivo de avaliar a capacidade do *Bacillus pumilus* para remover fármacos, nomeadamente, o ibuprofeno, o naproxeno, o diclofenaco e a carbamazepina, e também estudar o impacto que estes fármacos têm no crescimento da bactéria, realizaram-se ensaios a três diferentes concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) de cada um dos quatro fármacos separadamente. No ensaio relativo à concentração de 2 mg/L também se comparou o crescimento do *B. pumilus* na presença e ausência de glucose, de maneira a se verificar se, na ausência de glucose, a bactéria utilizaria algum dos fármacos como fonte de carbono e energia. Nos ensaios restantes (4 mg/L e 8 mg/L), apenas se estudou o crescimento da bactéria na presença de glucose, conforme descrito na secção 2.3.5.

Os ensaios realizaram-se em meio líquido, em modo descontínuo, com agitação orbital a 200 rpm e a temperatura constante de 30°C. Recolheram-se inicialmente amostras de 2 em 2 horas durante cerca de 12 horas e, posteriormente, apenas às 26 h, 50 h, 74 h

e 98 h. Em todas as amostras efetuaram-se medições da DO_{600nm} de modo a se avaliar o crescimento bacteriano. Para além disso, nas amostras com fármacos quantificaram-se as suas concentrações em solução por HPLC/UV-Vis.

3.4.1 Avaliação do efeito da exposição de fármacos no crescimento da cultura de *Bacillus pumilus*

De forma a se avaliar o efeito da presença dos fármacos no crescimento da bactéria *B. pumilus*, nas três concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L), analisaram-se curvas de crescimento da bactéria, tal como os respetivos parâmetros cinéticos das culturas presentes nos Erlenmeyers I (Células + MC + Glucose + Fármaco), conforme descrito na secção 2.3.5 Porém, tal como se referiu anteriormente, estudou-se o efeito dos fármacos no crescimento bacteriano na ausência de glucose (Erlenmeyer II: Células + MC + Fármaco) apenas para as soluções com concentração de 2 mg/L.

Os ensaios realizados que não continham fármacos (Erlenmeyer III: Células + MC + Glucose; Erlenmeyer IV: Células + MC) utilizaram-se como controlos, de forma a proceder-se à comparação do crescimento da bactéria livre da exposição a fármacos.

As curvas de crescimento referentes ao estudo do crescimento do *B. pumilus* exposto ao fármaco, presente no meio de cultura na concentração de 2 mg/L, na presença e na ausência de glucose, encontram-se na figura abaixo, para o caso do ibuprofeno.

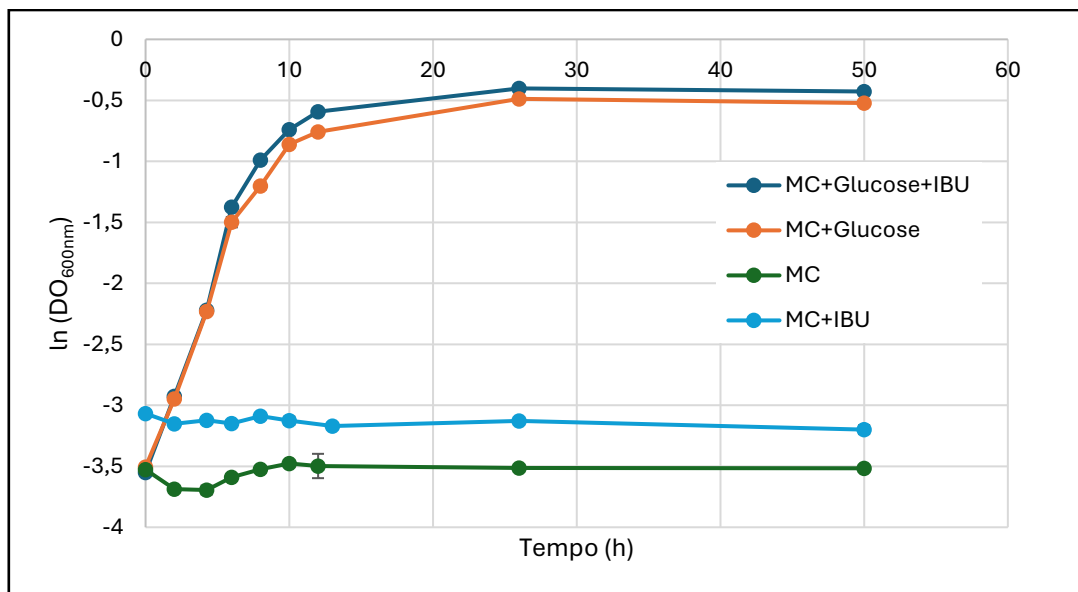


Figura 3.6 - Curvas de crescimento do *B. pumilus*. na presença de ibuprofeno (2 mg/L) e na ausência ou presença de glucose.

Ao analisar-se a figura é possível verificar que na ausência de glucose não se observa crescimento da bactéria, tal como já havia sido observado na secção 3.2 Também é possível concluir-se que com uma concentração de 2 mg/L de ibuprofeno, na ausência de glucose, a bactéria não utiliza este fármaco como fonte de carbono e energia para o seu desenvolvimento.

Ao comparar-se o crescimento na presença de glucose é possível verificar-se que os valores de DO_{600nm} foram idênticos nas culturas com ibuprofeno e sem ibuprofeno, demonstrando que, a uma concentração de 2 mg/L, o fármaco não beneficia nem prejudica o desenvolvimento da bactéria.

Na **Figura 3.7** encontram-se apresentadas as curvas de crescimento referentes ao estudo realizado em condições idênticas com o naproxeno, para a concentração de 2 mg/L, na presença e na ausência de glucose.

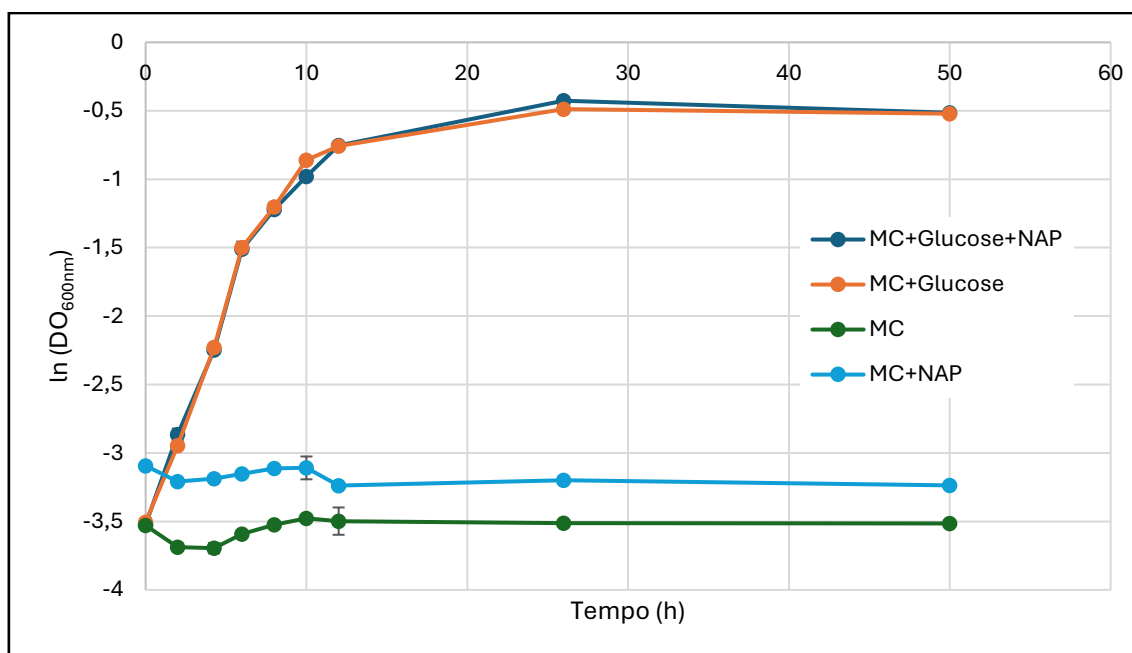


Figura 3.7 - Curvas de crescimento do *B. pumilus*. na presença de naproxeno (2 mg/L) e na ausência ou presença de glucose.

Neste ensaio também se verificou que na ausência de glucose a bactéria não cresceu, de onde se pode concluir que o *B. pumilus* não faz uso do naproxeno, a uma concentração de 2 mg/L, como fonte de carbono e energia alternativa à glucose. Também se verifica que, tal como no ensaio com ibuprofeno, na presença de glucose no meio de cultura, o perfil de crescimento da bactéria não apresenta alterações significativas na ausência ou na presença no meio de naproxeno a uma concentração de 2 mg/L.

Na **Figura 3.8** encontram-se apresentadas as curvas de crescimento referentes ao estudo realizado em condições idênticas com o diclofenaco, para a concentração de 2 mg/L, na presença e na ausência de glucose.

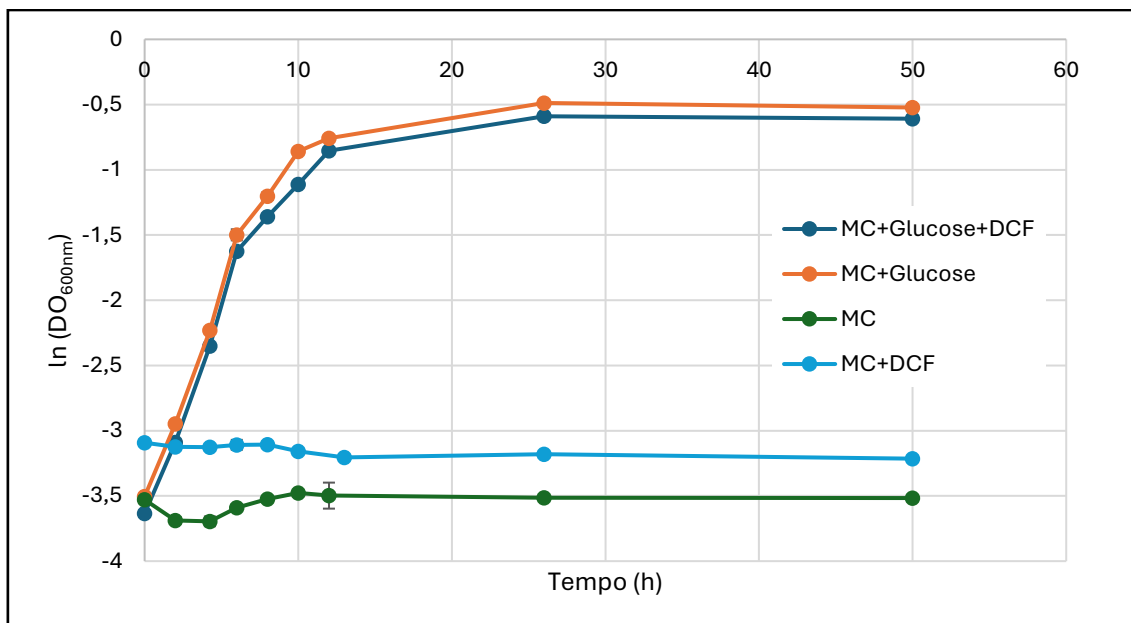


Figura 3.8 - Curvas de crescimento do *B. pumilus*. na presença de diclofenaco (2 mg/L) e na ausência ou presença de glucose.

Ao observar-se as curvas de crescimento pode-se verificar que a bactéria na ausência de glucose não apresentou desenvolvimento significativo e que a uma concentração de 2 mg/L não utiliza o diclofenaco como fonte de carbono e energia alternativa. Também é possível verificar-se que a esta concentração na presença de glucose o fármaco não altera significativamente o perfil de crescimento da bactéria.

Na **Figura 3.9** encontram-se apresentadas as curvas de crescimento referentes ao estudo realizado em condições idênticas às anteriores com a carbamazepina, para a concentração de 2 mg/L, na presença e na ausência de glucose.

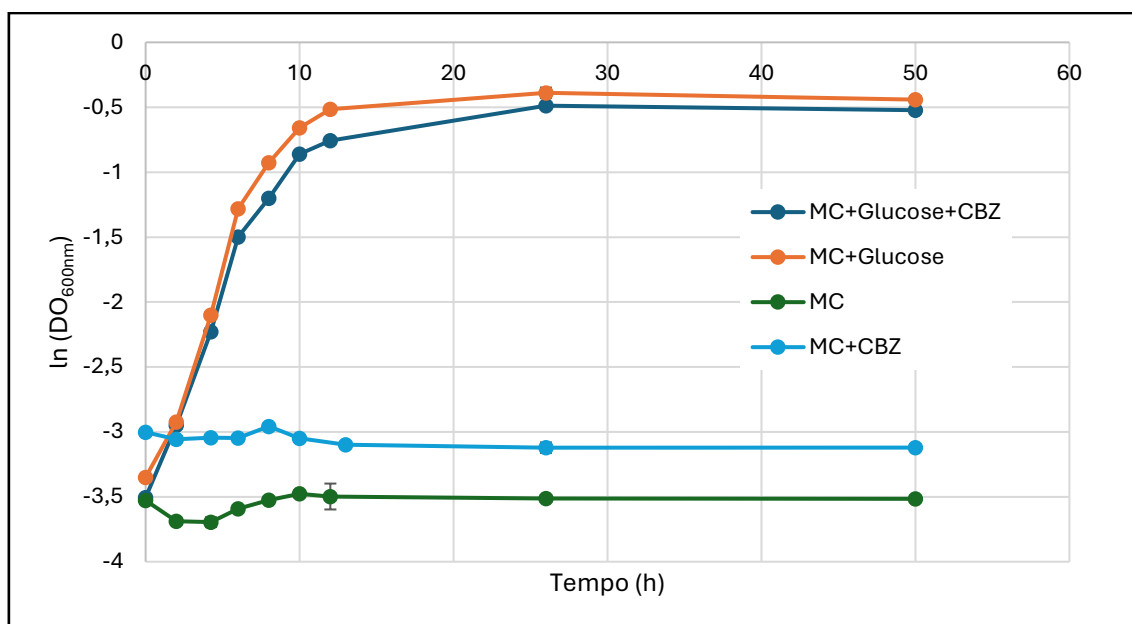


Figura 3.9 - Curvas de crescimento do *B. pumilus*. na presença de carbamazepina (2 mg/L) e na ausência ou presença de glucose.

Ao analisar-se as curvas de crescimento verificou-se que, tal como para os fármacos anteriores, a bactéria na ausência de glucose não utilizou o fármaco à disposição como fonte de carbono alternativa. Também conforme os estudos anteriores, não se verificaram alterações no perfil de crescimento da bactéria nos estudos na presença de glucose quer na ausência quer na presença de carbamazepina numa concentração de 2 mg/L.

Tendo em atenção os resultados obtidos nos ensaios com ausência de glucose, em que não foi observável qualquer crescimento significativo do *B. pumilus*, decidiu-se que nos ensaios com concentrações superiores não se iria incluir no esquema de montagem o Erlenmeyer II (sem glucose), tal como descrito na secção 2.3.5.

3.4.1.1 Avaliação do efeito da concentração e da mistura dos fármacos no crescimento do *Bacillus pumilus*

De forma a se avaliar o efeito do aumento da concentração dos fármacos estudados no crescimento do *Bacillus pumilus*, procedeu-se ao estudo das curvas de crescimento, tal como dos parâmetros cinéticos, para ensaios dos Erlenmeyers I (Células + MC+ glucose

+ fármaco) em que se utilizaram concentrações superiores à de 2 mg/L já estudada, nomeadamente, 4 mg/L e 8 mg/L. O crescimento da bactéria foi acompanhado durante um período de aproximadamente 50 horas, através da medição DO_{600nm} , com recolhas de 2 em 2 horas nas primeiras 12 horas, sendo posteriormente efetuadas recolhas às 26 horas e 50 horas. As concentrações das amostras com fármacos foram quantificadas por HPLC/UV-Vis.

Procedeu-se do mesmo modo para avaliar o efeito no crescimento do *Bacillus pumilus* causado pela mistura dos quatro fármacos estudados, a uma concentração de 2 mg/L cada um.

Na figura abaixo é possível observarem-se as curvas de crescimento relativas à exposição da bactéria ao ibuprofeno em diferentes concentrações, na presença de glucose.

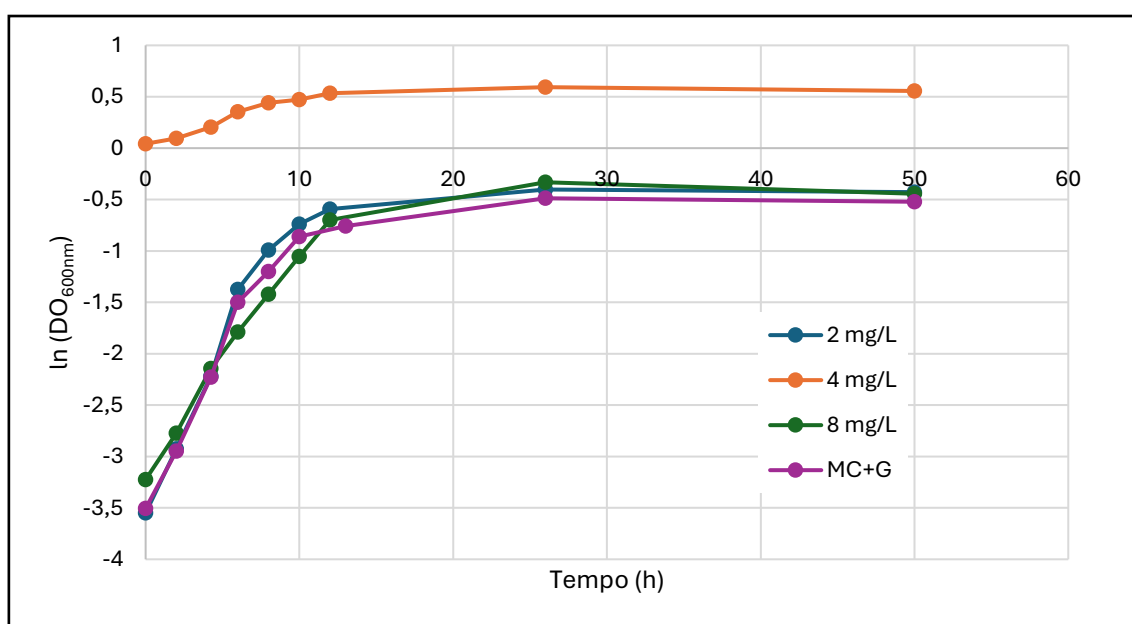


Figura 3.10 - Curvas de crescimento do *B. pumilus* na presença de ibuprofeno em diferentes concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) e na sua ausência (controlo).

Analisando as curvas de crescimento na **Figura 3.10** observou-se que entre os ensaios realizados às diferentes concentrações do fármaco não existem grandes alterações nos perfis de crescimento da bactéria nem nas durações das várias fases, sendo possível observar-se que a fase de adaptação (fase *lag*), em todos os casos, é menor do que 2 horas, pois nas primeiras medições da DO_{600nm} (às 2 h) em todos os ensaios verifica-se já algum crescimento e a entrada na fase log, a qual se prolonga até às 6 horas.

Posteriormente ainda se verifica crescimento bacteriano até às 26 horas, porém este crescimento já não é exponencial (correspondendo, assim, à fase estacionária). A partir das 26 horas e até às 50 horas não se verifica mais crescimento, mas, pelo contrário, observa-se a estabilização, correspondendo à fase de declínio ou morte, e até, em alguns casos acentuadamente, uma diminuição da DO_{600nm} . Tal como já se discutiu anteriormente, este último efeito é devido à ocorrência de alguma aglomeração de células, o que facilita a sua sedimentação, deixando estas células assim de contribuir para a densidade ótica.

O valor mais elevado da DO_{600nm} foi registado para a cultura com 8 mg/L de ibuprofeno.

As principais diferenças observáveis são referentes à curva de crescimento da bactéria quando a concentração de ibuprofeno em solução é de 4 mg/L, verificando-se neste caso um ligeiro encurtamento na fase *lag*, levando a que o início da fase log ocorra aqui um pouco mais cedo. Entretanto, nas seguintes fases não se verificaram diferenças notórias na sua duração.

Dado não se terem observado diferenças salientes entre os crescimentos da bactéria em presença das diferentes concentrações de ibuprofeno, tal parece indicar que a concentração deste fármaco não parece ter um efeito significativo sobre as durações das fases de crescimento do microrganismo.

A partir dos resultados obtidos para o crescimento do *B. pumilus* neste ensaio, procedeu-se à determinação dos parâmetros cinéticos relevantes para o crescimento da bactéria na presença do ibuprofeno.

Tabela 3.6 - Parâmetros cinéticos obtidos para as curvas de crescimento do *B. pumilus* para as diferentes concentrações de ibuprofeno (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L).

Parâmetros cinéticos	MC+G (Controlo)	2 mg/L	4 mg/L	8 mg/L
Fase exponencial (h)	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	0,358	0,385	0,327	0,247
g (h)	1,94	1,80	2,12	2,80
n	2,07	2,22	1,89	1,43

Observando a **Tabela 3.6** é possível verificar-se que, à medida que a concentração de ibuprofeno aumenta no meio de cultura, a velocidade específica máxima diminui e, conseqüentemente, também o número de gerações do *B. pumilus*, enquanto que o

tempo de duplicação aumenta. Deste modo, pode-se chegar à conclusão de que o aumento de concentração de ibuprofeno parece ter um efeito de inibição do desenvolvimento da bactéria, tornando-se mais acentuado para concentrações mais elevadas, especialmente a de 8 mg/L. Por outro lado, também é possível observar-se que para a concentração de 2 mg/L os parâmetros cinéticos são um pouco superiores aos do controlo, o que parece indicar que, a esta concentração, não só não se verifica o efeito de inibição do crescimento, mas pelo contrário, até parece existir um ligeiro estímulo ao desenvolvimento da bactéria.

Na figura seguinte encontram-se as curvas de crescimento da bactéria na presença do naproxeno, em diferentes concentrações, e na presença de glucose.

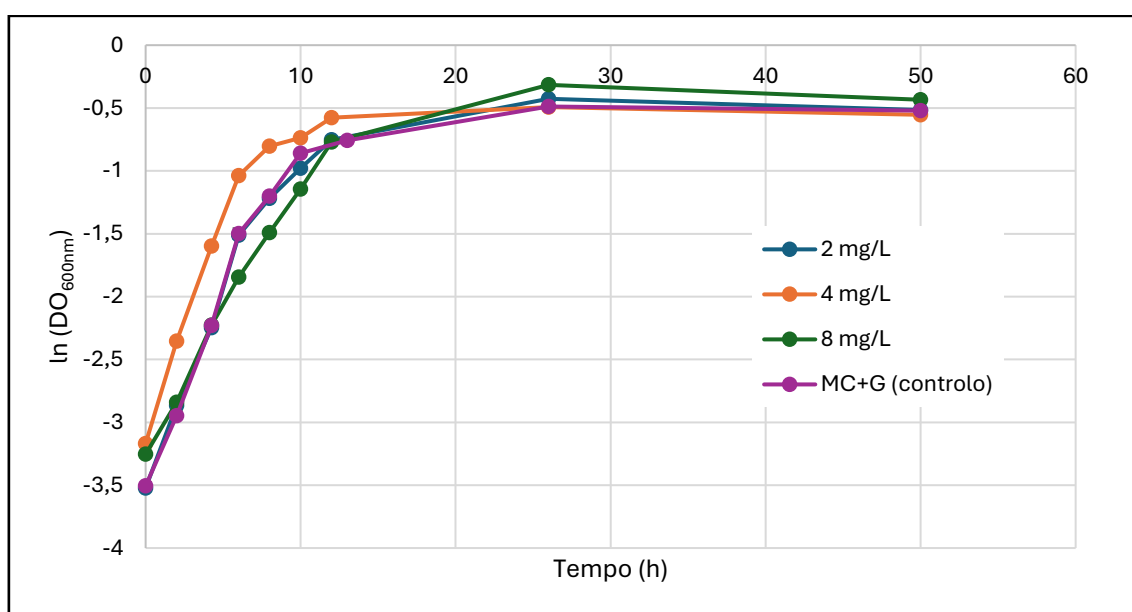


Figura 3.11 - Curvas de crescimento do *B. pumilus* na presença de naproxeno em diferentes concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) e na sua ausência (controle).

Visualizando as curvas de crescimento na **Figura 3.11**, é possível observar que não existem variações no perfil de crescimento do *B. pumilus* relativamente aos ensaios anteriores, sendo as durações de todas as fases idênticas às da curva de controlo. Tal como no ensaio referente ao ibuprofeno, o valor mais alto da DO_{600nm} registado foi o da cultura exposta à concentração de 8 mg/L de fármaco. Também a esta concentração foi especialmente evidente o efeito, já observado no caso de alguns ensaios com o ibuprofeno, de uma diminuição acentuada da DO_{600nm} na fase de declínio, o que, como já se explicou, será devido à aglutinação de parte das células do *B. pumilus*, tornando a solução mais límpida.

Na **Tabela 3.7**, encontram-se os parâmetros cinéticos relativos às curvas de crescimento da bactéria exposta a diferentes concentrações de naproxeno no meio de cultura, na presença de glucose.

Tabela 3.7 - Parâmetros cinéticos obtidos para as curvas de crescimento do *B. pumilus* para as diferentes concentrações de naproxeno (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L).

Parâmetros cinéticos	MC+G (Controlo)	2 mg/L	4 mg/L	8 mg/L
Fase exponencial (h)	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,358	0,336	0,330	0,250
g (h)	1,94	2,06	2,10	2,77
n	2,07	1,94	1,90	1,44

Da observação dos valores apresentados na tabela anterior, pode-se verificar que com o aumento da concentração de naproxeno também ocorre uma diminuição na velocidade específica de crescimento máxima e no número de gerações bem como um aumento no tempo de duplicação. Neste caso da exposição ao naproxeno, este efeito observa-se para todas as concentrações, mesmo a mais baixa (2 mg/L). Tal facto pode ser explicado por um possível efeito tóxico do naproxeno que parece ter causado alguma inibição do crescimento do *B. pumilus*, que se agrava com o aumento da concentração deste composto. Este efeito foi também especialmente acentuado no ensaio com a concentração de naproxeno mais elevada (8 mg/L), em que o valor de $\mu_{\text{máx}}$ sofreu uma redução muito significativa.

Na **Figura 3.12** estão representadas as curvas de crescimento para diferentes concentrações de diclofenaco, na presença de glucose.

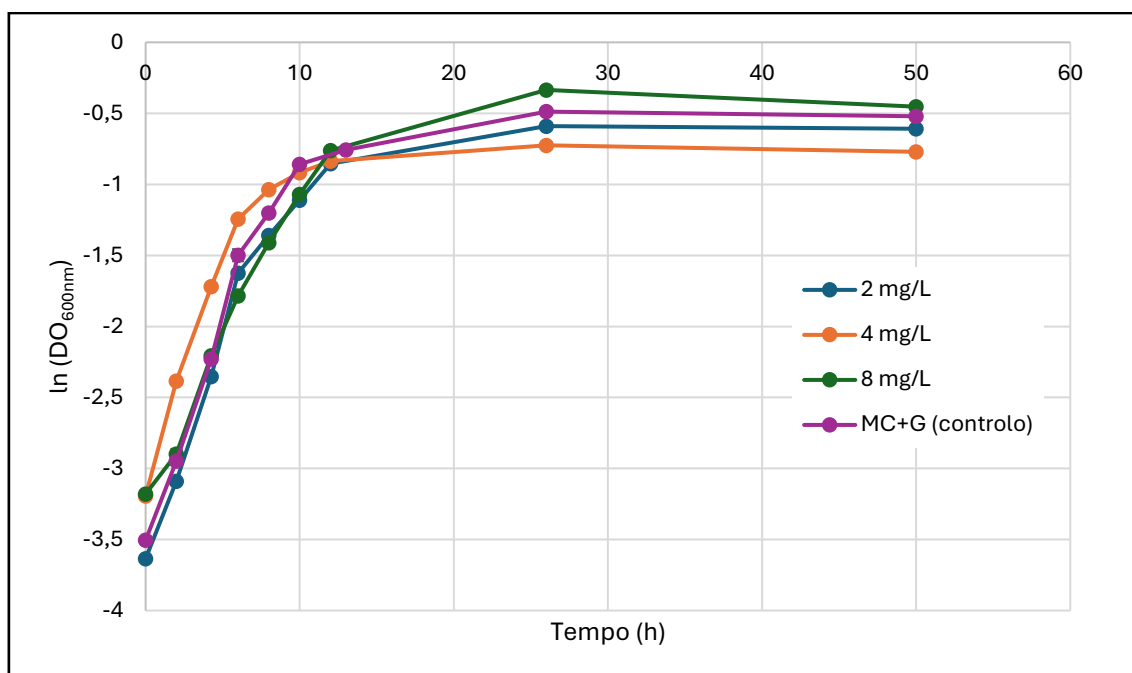


Figura 3.12 - Curvas de crescimento do *B. pumilus* na presença de diclofenaco em diferentes concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) e na sua ausência (controle).

As curvas de crescimento apresentadas na figura acima mostram, mais uma vez, que as diferentes concentrações do fármaco estudado, a este nível de concentrações, não afetam o perfil de crescimento do *B. pumilus*, sendo possível observar que os tempos das várias fases é bastante idêntico ao do controle. As principais diferenças observáveis entre as diversas curvas são os valores de DO_{600nm} registados, sendo significativamente inferiores para as concentrações de 2 mg/L e 4 mg/L e superiores para a concentração de 8 mg/L e para o controle.

Na **Tabela 3.8**, apresentam-se os parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento do *Bacillus pumilus* exposto a diferentes concentrações de diclofenaco, na presença de glucose.

Tabela 3.8 - Parâmetros cinéticos obtidos para as curvas de crescimento do *B. pumilus* para as diferentes concentrações de diclofenaco (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L).

Parâmetros cinéticos	MC+G (controle)	2 mg/L	4 mg/L	8 mg/L
Fase exponencial (h)	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,358	0,361	0,286	0,285
g (h)	1,94	1,92	2,43	2,48
n	2,07	2,09	1,65	1,61

Pela análise dos parâmetros cinéticos, apresentados na tabela acima, observa-se que, tal como nos fármacos anteriores, o aumento da concentração do fármaco leva a uma diminuição de $\mu_{\text{máx}}$ e de n e um aumento de g , que se acredita ser devido aos efeitos tóxicos do fármaco. No entanto, a este respeito, o comportamento do diclofenaco assemelha-se mais ao do ibuprofeno, já que para a concentração de 2 mg/L também não parece ter-se verificado toxicidade, sendo os valores dos parâmetros até ligeiramente mais favoráveis ao crescimento, indicando que a esta concentração o diclofenaco parece ter um efeito estimulante para o crescimento bacteriano. Por outro lado, a redução no valor de $\mu_{\text{máx}}$ para as concentrações mais elevadas do fármaco (4 mg/L e 8 mg/L) é idêntica, o que parece significar que os efeitos tóxicos do diclofenaco se fazem sentir para concentrações relativamente mais baixas do que nos outros fármacos estudados.

Na **Figura 3.13**, estão apresentadas as curvas de crescimento para as diferentes concentrações de carbamazepina, na presença de glucose.

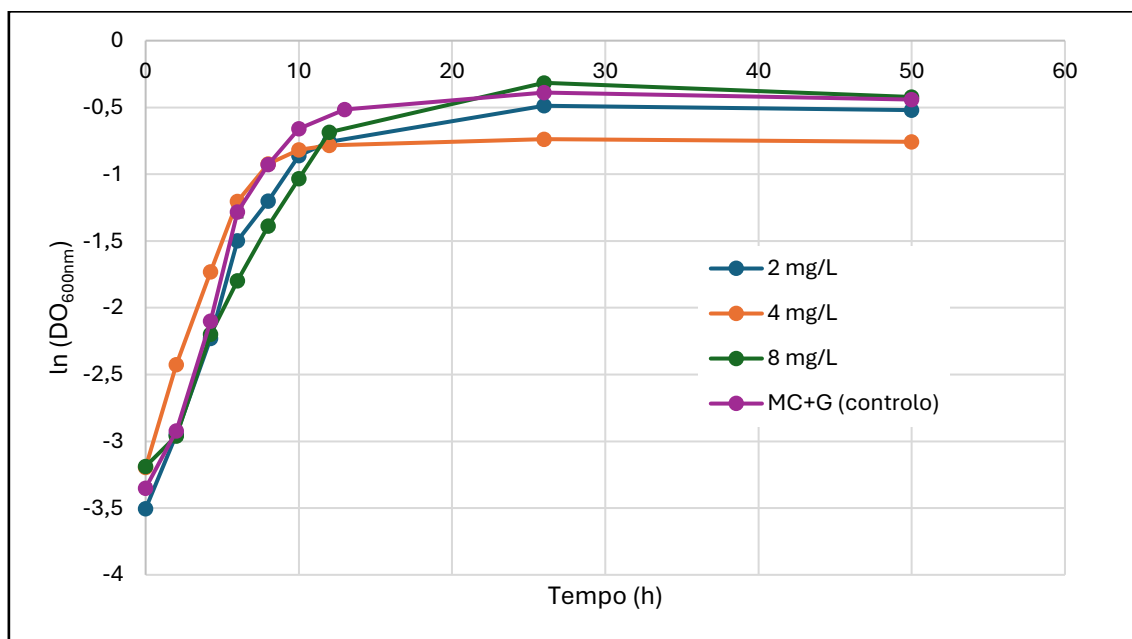


Figura 3.13 - Curvas de crescimento do *B. pumilus* na presença de carbamazepina em diferentes concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) e na sua ausência (controlo).

Analisando as curvas de crescimento na **Figura 3.13** verifica-se que, tal como para os fármacos anteriores, o crescimento do *B. pumilus* quando exposto à carbamazepina em diferentes concentrações mantém o perfil de crescimento, sem alterações na duração das fases.

Na **Tabela 3.9**, são apresentados os parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento da bactéria exposta à carbamazepina em diferentes concentrações.

Tabela 3.9 - Parâmetros cinéticos obtidos para as curvas de crescimento do *B. pumilus* para as diferentes concentrações de carbamazepina (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L).

Parâmetros cinéticos	MC+G (controle)	2 mg/L	4 mg/L	8 mg/L
Fase exponencial (h)	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2	2,2 - 6,2
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,358	0,358	0,306	0,285
g (h)	1,94	1,94	2,27	2,43
n	2,07	2,06	1,76	1,65

Os parâmetros cinéticos na **Tabela 3.9** mostram um comportamento cinético semelhante aos dos anteriores fármacos, exibindo uma gradual diminuição da cinética de crescimento à medida que é aumentada a concentração de fármaco, evidenciando alguns efeitos de toxicidade e inibição do crescimento da bactéria dependendo da concentração de fármaco. Também no caso da carbamazepina, a concentração de 2 mg/L não mostra ainda causar efeitos significativos de toxicidade ao *B. pumilus*, apresentando valores idênticos ao do controle.

Na figura seguinte é possível observar as curvas de crescimento para a combinação dos quatro fármacos em estudo, a uma concentração de 2 mg/L cada um deles.

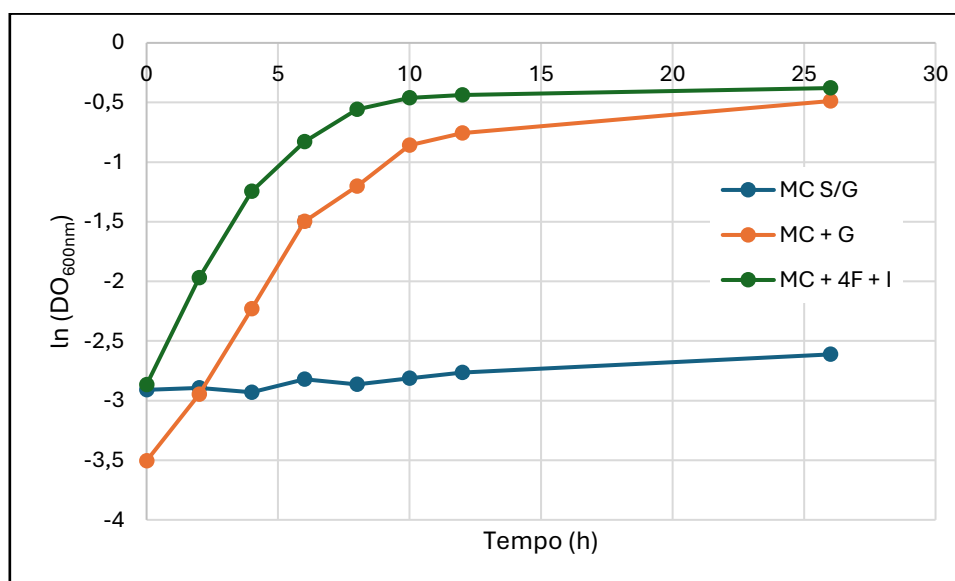


Figura 3.14 - Curvas de crescimento do *B. pumilus* na presença dos quatro fármacos misturados (2 mg/L cada um), apenas na presença de glucose e na sua ausência (controles).

Observando a **Figura 3.14** podemos afirmar que, tal como se tinha já verificado anteriormente, também neste caso, a mistura dos 4 fármacos não constitui uma fonte de carbono e energia alternativa à glucose, dado que praticamente não se observa crescimento da bactéria na ausência desta no meio de cultura. Comparando com o controlo contendo glucose, a mistura dos quatro fármacos a uma concentração de 2 mg/L não altera de forma significativa o perfil de crescimento do *B. pumilus*. A principal diferença é uma ligeira antecipação do início da fase log no caso da cultura contendo a mistura de fármacos, mas que não afeta a duração desta fase de crescimento.

Na tabela abaixo encontram-se os parâmetros cinéticos obtidos para o crescimento da bactéria na presença dos quatro fármacos misturados, com uma concentração de 2 mg/L de cada um deles.

Tabela 3.10 - Parâmetros cinéticos obtidos para as curvas de crescimento do *B. pumilus* quando exposto aos quatro fármacos em simultâneo (2 mg/L de cada fármaco) e para o controlo com apenas a bactéria e meio com glucose.

Parâmetros cinéticos	MC + G (Controlo)	MC+ G + 4F (2 mg/L)
Fase exponencial (h)	2,2 - 6,2	2 - 6
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,358	0,285
g (h)	1,94	2,43
N	2,07	1,65

Os parâmetros cinéticos apresentados na **Tabela 3.10** mostram que, na cultura com a mistura de fármacos, se observa um valor inferior para a velocidade específica de crescimento e para o número de gerações e um valor superior do tempo de duplicação. Estes resultados sugerem que a mistura de fármacos apresenta alguma toxicidade para esta bactéria, sendo que os valores dos parâmetros cinéticos para a mistura dos quatro fármacos são semelhantes aos observados para as concentrações elevadas de fármacos isolados.

De facto, a presença simultânea de vários fármacos no meio de cultura pode causar efeitos negativos acrescidos sobre o crescimento dos microrganismos, tanto por ação direta sobre as bactérias de uma forma cumulativa pelos vários compostos, quanto através de interações entre eles, com destaque para interações sinérgicas que podem

potenciar a toxicidade individual de cada composto, ou seja, resultando num efeito combinado que é maior do que a soma dos efeitos individuais.

3.4.2 Estudo da capacidade de remoção de fármacos pela bactéria *Bacillus pumilus* através de processos de adsorção

As bactérias são capazes de degradar, transformar ou reter fármacos através de diferentes processos biológicos e físico-químicos. Os principais processos envolvidos da despoluição de águas contaminadas com fármacos são a biodegradação, a bioadsorção e a bioacumulação (absorção dos fármacos e seu armazenamento dentro da célula).

A biodegradação é o processo mais importante na transformação dos fármacos em compostos menos tóxicos, que pode ocorrer através de metabolismo primário, co-metabolismo ou pela produção de enzimas extra-celulares que promovem a quebra das moléculas dos fármacos.

Na bioadsorção, os fármacos presentes na água aderem à superfície das células bacterianas ou aos biofilmes formados pelas comunidades microbianas. Embora neste caso a remoção dos fármacos não esteja diretamente relacionada com o metabolismo dos microrganismos, está, ainda assim, associada com o seu crescimento, na medida em que o aumento da biomassa proporciona maior superfície sobre a qual os poluentes poderão adsorver.

A bioadsorção às células bacterianas desempenha um papel importante na remoção de fármacos de águas contaminadas, especialmente em sistemas de tratamento biológico. Embora muitas vezes ocorra em conjunto com a biodegradação, a bioadsorção representa um processo físico-químico distinto e eficiente para reduzir a concentração de contaminantes emergentes, como os fármacos, no meio aquático.

A bioadsorção é geralmente um processo rápido, funcionando como uma etapa inicial na retenção dos fármacos, que pode reduzir rapidamente a quantidade de fármacos dissolvidos na água, diminuindo sua biodisponibilidade imediata e toxicidade. Por outro lado, pode também favorecer a biodegradação, concentrando os fármacos próximos à célula, tornando-os mais acessíveis às enzimas extracelulares ou aos mecanismos de transporte celular, o que pode aumentar a eficiência global da sua remoção biológica.

A retenção inicial dos fármacos, ainda que apenas temporária, proporcionada pela bioadsorção, pode também ser importante no caso de fármacos com baixa biodegradabilidade, já que evita que esses fármacos persistam no ambiente ou atinjam os recursos hídricos. A bioadsorção atua, assim, como uma barreira inicial contra a poluição farmacêutica, permitindo que os fármacos sejam capturados, concentrados e posteriormente degradados ou imobilizados.

De forma a avaliar a capacidade do *Bacillus pumilus* para remover os fármacos estudados (ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco e carbamazepina) por adsorção à sua biomassa, realizaram-se ensaios para cada um dos fármacos a diferentes concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L), tal como descrito na secção 2.4, bem como ensaios com misturas dos quatro fármacos a diversas concentrações (2 mg/L, 4 mg/L e 10 mg/L) (2.4).

Nestes ensaios partiu-se de valores de DO_{600nm} iniciais correspondentes aos valores verificados após o crescimento exponencial, conforme foi obtido nos estudos da caracterização do crescimento bacteriano (ver secção 3.2). A cultura foi depois sujeita a métodos de inativação, utilizando tratamentos térmicos e por ultrassons, conforme descrito em 2.4.1.

Os ensaios realizaram-se em meio líquido, em modo descontínuo, com agitação orbital a 200 rpm e a temperatura constante de 30°C. Recolheram-se amostras antes dos tratamentos de inativação e novamente 48 horas após os tratamentos. Em todas as amostras efetuaram-se medições da DO_{600nm} para se avaliar se houve crescimento bacteriano e quantificaram-se as concentrações de fármacos em solução pela técnica de HPLC/UV-Vis, seguindo a metodologia otimizada descrita na 2.2.2.2 Quantificação por HPLC/UV-Vis.

3.4.2.1 Estudo da inativação do *Bacillus pumilus*

Para estudar a adsorção dos fármacos à biomassa, é essencial utilizar métodos de inativação celular que eliminem a atividade metabólica sem comprometer significativamente a integridade estrutural da célula, nomeadamente da sua biomembrana. Tal garante que a interação entre o fármaco e a célula ocorra por adsorção e não por mecanismos ativos de transporte ou biotransformação.

Como já foi referido na secção 3.4.2, neste trabalho procurou-se estudar a eficácia do tratamento térmico, do banho de ultrassons e da conjugação dos dois métodos na inativação de células de *Bacillus pumilus*.

Em ambos os métodos, o equilíbrio entre a eficácia da inativação e a preservação da estrutura celular é fundamental quando o objetivo é utilizar a biomassa em estudos de adsorção, já que danos excessivos podem alterar os locais de ligação dos fármacos ou reduzir a área superficial disponível para interação.

A eficácia da inativação de bactérias por tratamento térmico e banho de ultrassons depende de diversos fatores físicos e biológicos. No tratamento térmico, a temperatura e o tempo de exposição são determinantes, sendo que temperaturas mais altas e períodos mais prolongados aumentam a inativação. Além disso, o tipo de bactéria, a fase de crescimento e a composição do meio também influenciam a resistência celular ao calor. Já no banho de ultrassons, a intensidade e frequência das ondas, o tempo de sonicação, a temperatura gerada no processo e as propriedades do meio (como viscosidade e volume) afetam diretamente a eficiência da cavitação e, consequentemente, da inativação. A escolha adequada desses parâmetros é essencial para garantir a morte celular sem comprometer a estrutura da biomassa, especialmente com o objetivo de estudar a contribuição da adsorção na remoção dos fármacos.

As condições de inativação escolhidas para se avaliar a capacidade de adsorção dos fármacos à biomassa do *Bacillus pumilus* foram as de tratamento térmico a 65°C em conjunto com banho de ultrassons durante 5 minutos, seguida de tratamento térmico durante 5 minutos e no final um choque térmico em gelo durante 10 minutos.

De forma a se avaliar a eficácia dos métodos de inativação, procedeu-se ao registo da DO_{600nm} antes de se realizar o tratamento de inativação das bactérias e 48 horas após a realização do procedimento. A observação de um aumento da DO_{600nm} seria demonstrativo da ineficácia do procedimento de inativação testado.

Na **Tabela 3.11**, encontram-se as diferentes condições em cada ensaio de inativação e as respetivas DO_{600nm} antes e depois do tratamento.

Tabela 3.11 - Condições de inativação utilizadas no processo de inativação do *Bacillus pumilus*.

Aquecimento T (°C)	Tempo de tratamento (minutos)	Ultrassons	Banho de gelo	Meio com glucose	DO _{600nm} inicial	DO _{600nm} final
80	15	X	✓	X	0,0414	0,0330
80	15	X	✓	X	0,0421	0,0362
Ambiente	15	✓	X	X	0,0428	0,0374
Ambiente	15	✓	X	X	0,0466	0,0417
65	5	✓	✓	X	0,0456	0,0434
65	5	✓	✓	X	0,0436	0,0400
60	15	✓	✓	X	0,0902	0,0500
60	15	✓	✓	X	0,0834	0,0431
80	15	X	✓	✓	0,0440	0,4400

Como se pode observar, em todos os testes realizados nas culturas de bactérias em meio sem glucose, não se observou qualquer aumento da DO_{600nm}, o que inicialmente foi interpretado como sendo indicativo da eficácia do procedimento de inativação. Assim, inicialmente considerou-se que os vários procedimentos utilizados eram todos eficazes na inativação deste tipo de bactéria. No entanto, dado que em estudos do crescimento do *B. pumilus* na ausência de glucose se tinha verificado anteriormente que nestas condições não ocorria crescimento da bactéria secção 3.2, realizou-se então uma experiência usando um dos procedimentos que se tinha assumido ser eficaz, mas adicionando, neste caso, glucose ao meio de cultura. O que foi observado foi que a DO_{600nm} nestas condições sofreu um aumento ao fim das 48 h, ao contrário do observado nas experiências anteriores.

Assim, revendo as conclusões que tinham sido inicialmente retiradas deste estudo, conclui-se agora que uma possível explicação para o não aumento da DO_{600nm} observado nos testes do procedimento de inativação poderá ser a ausência da glucose

e não o procedimento de inativação testado, dado o *B. pumilus* ter já demonstrado elevada sensibilidade a esse parâmetro em estudos anteriores (secção 3.2). Portanto, não foi possível concluir com este estudo se algum dos procedimentos de inativação propostos é realmente eficaz.

No entanto, para a realização dos ensaios referentes à avaliação da capacidade de adsorção dos fármacos às células do *B. pumilus* optou-se por proceder à inativação das bactérias utilizando o procedimento C (secção 2.4.1), i.e. um tratamento térmico em conjunto com um banho de ultrassons. O tratamento realizou-se a uma temperatura constante de aproximadamente 60°C e uma frequência de 37 kHz, durante 15 minutos.

3.5 Avaliação da capacidade de degradação/remoção dos fármacos em estudo pela bactéria *Bacillus pumilus*

De forma a se avaliar a capacidade do *B. pumilus* de remover/degradar os fármacos em estudo, tal como caracterizar a cinética do processo, determinou-se ao longo do período de ensaio a percentagem de remoção dos fármacos. Realizaram-se ensaios com soluções de fármacos com concentrações de 2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L, com durações totais de 50 h, 96 h e 96 h, respetivamente, na presença de glucose, tal como descrito na secção 2.3.5 para o Erlenmeyer I (contendo células, meio de cultura, glucose e fármacos).

No estudo da remoção de fármacos considerou-se que os processos que mais terão contribuído para a sua remoção foram a biodegradação e a adsorção à biomassa bacteriana. Como forma de diferenciar os dois processos, também se estudou a remoção dos fármacos no Erlenmeyer V onde as células foram inativadas por tratamento térmico e de ultrassons, esperando assim eliminar a contribuição da biodegradação pelo *B. pumilus* e assegurar que a remoção fosse devida principalmente ao processo de adsorção à biomassa bacteriana.

Além dos processos anteriores, também se avaliou outros possíveis processos que eventualmente podem contribuir para a remoção dos fármacos, independentes da atividade bacteriana, como a hidrólise, a adsorção às paredes do recipiente e a

fotodegradação, que foram avaliados no Erlenmeyer VI, este apenas continha meio de cultura e os fármacos, sem adição de glucose, de forma a evitar o crescimento de microrganismos.

Na figura seguinte encontram-se apresentadas as percentagens de remoção obtidas para o ibuprofeno, nos Erlenmeyers I e VI, para as diferentes concentrações estudadas e para os diferentes tempos de amostragem. Entretanto, nos Erlenmeyers V, em que se pretendia avaliar a extensão da adsorção do fármaco à biomassa das bactérias inativadas, verificou-se ao fim dos ensaios que as DO_{600nm} eram significativamente superiores aos valores iniciais, evidenciando a ocorrência de crescimento celular. Concluiu-se, portanto, que o procedimento de inativação das bactérias não foi eficaz nestas experiências, pelo que não se pode garantir que a remoção de ibuprofeno tenha ocorrido apenas por adsorção à biomassa das bactérias. Assim, não tem interesse a apresentação aqui dos resultados dos Erlenmeyers V.

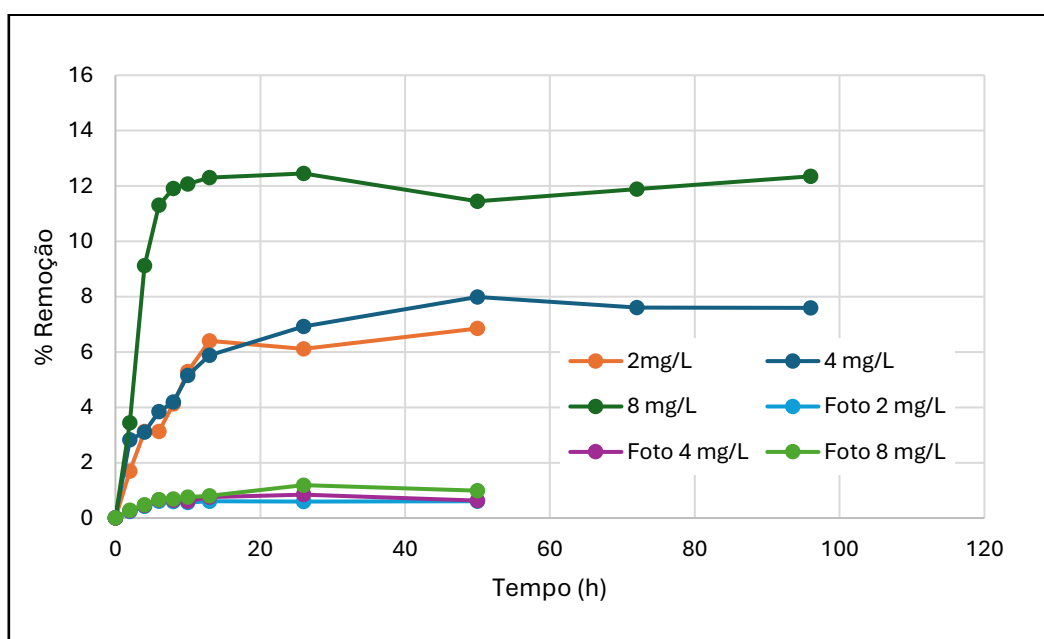


Figura 3.15 - Percentagem de remoção de ibuprofeno para os três ensaios (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) nos Erlenmeyers I e VI.

Relativamente aos resultados que estão apresentados na **Figura 3.15**, pode-se constatar que no Erlenmeyer VI (que continha apenas ibuprofeno, sem inóculo), a remoção do fármaco durante o período em que se realizou o estudo foi muito baixa, sendo inferior a 1,2 %. Estes resultados levam a deduzir que nas condições experimentais deste ensaio, a fotodegradação e outros processos abióticos de remoção,

como a hidrólise, precipitação ou adsorção às paredes do recipiente, não contribuíram de forma significativa para a remoção do ibuprofeno, podendo assim afirmar-se que as remoções de ibuprofeno obtidas nos ensaios anteriores devem-se principalmente à presença do *B. pumilus*.

Nos ensaios realizados com o Erlenmeyer I, observou-se que as percentagens de remoção para as diferentes concentrações de ibuprofeno, variaram entre 6,8 % e 12,3 %, sendo que grande parte da remoção aconteceu durante a fase log do crescimento bacteriano. Foi possível observar-se que as remoções de ibuprofeno para as concentrações estudadas seguiram um perfil temporal semelhante, especialmente para as concentrações de 2 mg/L e 4 mg/L. Em todos os ensaios, a remoção foi rápida, com maior parte do ibuprofeno a ser removido nas primeiras 10 horas. Após esse período observou-se, para as concentrações de 2 mg/L e 4 mg/L, alguma remoção, porém foram mais lentas e com menor quantidade de fármaco removido.

A rapidez da remoção inicial, que não é característico dos processos de degradação microbiana, sugere que a adsorção à biomassa formada durante o crescimento bacteriano tenha sido o principal mecanismo de remoção. Mas tal hipótese não foi possível de corroborar, porque os resultados do Erlenmeyer V foram inconclusivos, devido à inativação não ter sido eficaz.

Na **Figura 3.16**, estão apresentadas as eficiências de remoção obtidas nos ensaios realizados com diferentes concentrações de naproxeno, ao longo do tempo.

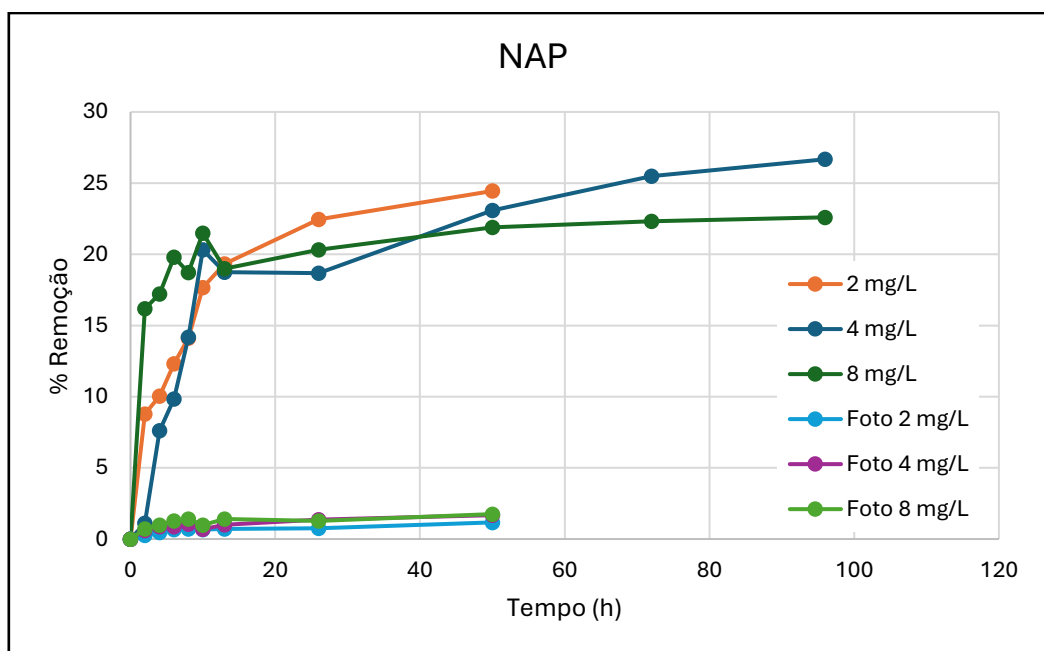


Figura 3.16 - Percentagem de remoção de naproxeno para os três ensaios (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) nos erlenmeyers I e VI.

Relativamente aos ensaios de avaliação da adsorção do naproxeno à biomassa (Erlenmeyer V), tal como para os ensaios do ibuprofeno a inativação bacteriana não foi eficaz, logo não foi possível retirar conclusões sobre a contribuição da adsorção à biomassa para a remoção do fármaco.

No que se refere à contribuição dos processos abióticos, avaliados no Erlenmeyer VI, é possível observar-se na **Figura 3.16** que a remoção durante o período do estudo foi mínima, sendo inferior a 2 %. Assim, pode-se concluir, que os processos abióticos não tiveram uma contribuição significativa para a remoção do naproxeno nos ensaios anteriores.

Na **Figura 3.16**, também se encontram os resultados obtidos no Erlenmeyer I, para os ensaios de remoção do naproxeno. Nestes ensaios as percentagens de remoção de naproxeno variaram entre os 23 % e 27 %, para as diferentes concentrações. Tal como foi observado para o ibuprofeno, também o perfil cinético de remoção do naproxeno é rápido, nas primeiras 6 horas, seguindo-se depois uma remoção mais lenta e menos acentuada. Deste modo, coloca-se também a hipótese que o mecanismo que mais contribui para a remoção do naproxeno é a adsorção à biomassa ocorrida na primeira etapa do estudo, o que não foi possível comprovar devido aos resultados inconclusivos no Erlenmeyer V

Na **Figura 3.17**, estão representadas as percentagens de remoção obtidas para o diclofenaco nos três ensaios para os diferentes tempos de amostragem.

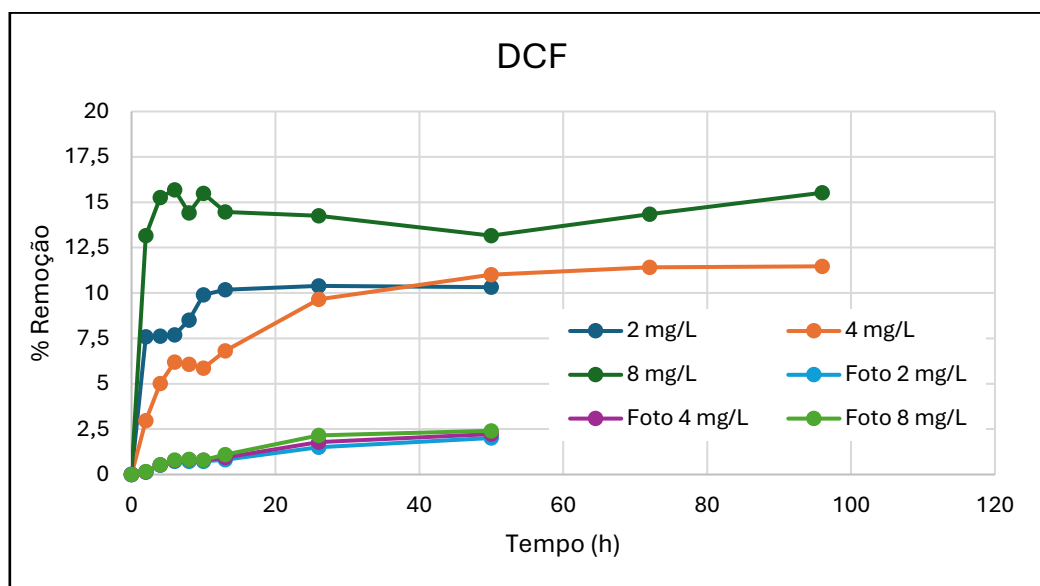


Figura 3.17 - Percentagem de remoção de diclofenaco para os três ensaios (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) nos erlenmeyers I e VI.

Tal como nos ensaios anteriores, também não foi possível retirar qualquer conclusão sobre a contribuição do processo de adsorção do diclofenaco à biomassa bacteriana, porque os ensaios de inativação (Erlenmeyer V) não foram bem-sucedidos.

Analisando a **Figura 3.17**, pode-se verificar que no Erlenmeyer VI, onde se avaliou a contribuição dos processos abióticos, que não houve remoção de fármaco relevante, sendo esta inferior a 2,5 %, durante o tempo da realização do estudo. Conclui-se, assim, que processos como a fotodegradação, hidrólise e adsorção às paredes do recipiente não contribuíram significativamente para a remoção do diclofenaco.

Relativamente aos resultados obtidos para o Erlenmeyer I, observou-se uma remoção que variou entre os 10 % e os 15,5 %, para as várias concentrações, ocorrendo grande parte da remoção durante a fase de crescimento exponencial da bactéria. O perfil temporal de remoção do diclofenaco é semelhante ao dos fármacos anteriores, apresentado uma remoção rápida nas primeiras 6 horas, seguido de uma remoção mais lenta e menos significativa. Tal como para os fármacos anteriores, colocou-se a hipótese de que a remoção do diclofenaco é realizada principalmente por processos de adsorção à biomassa, o que não pode ser confirmado devido aos resultados inconclusivos do Erlenmeyer V.

Na próxima figura, encontram-se os resultados relativos à remoção de carbamazepina, nos três ensaios, ao longo do tempo.

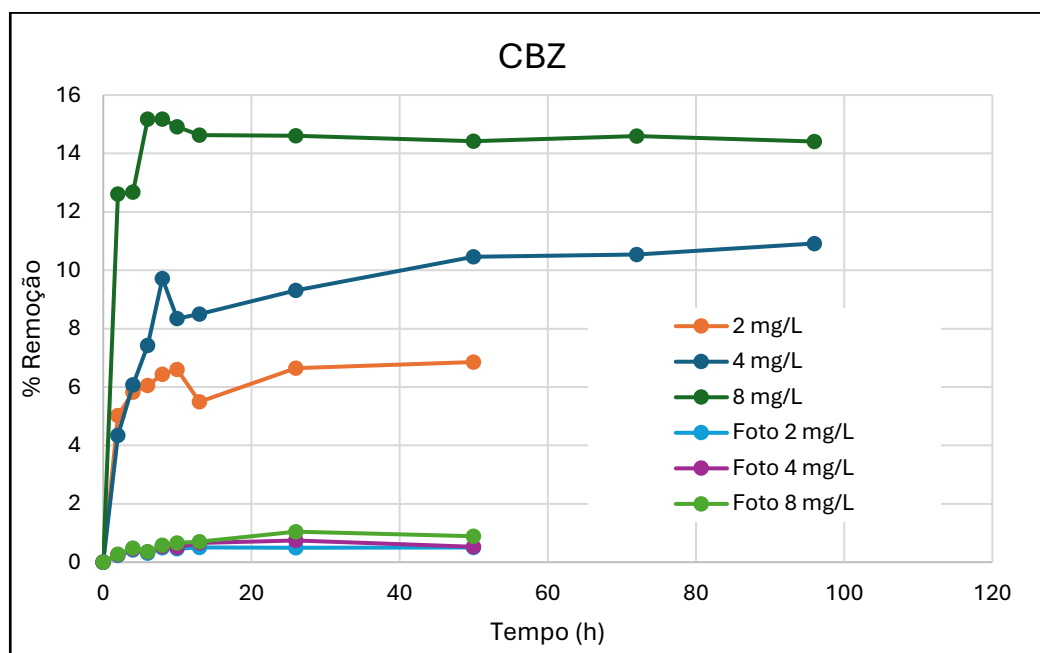


Figura 3.18 - Percentagem de remoção de carbamazepina para os três ensaios (2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L) nos erlenmeyers I e VI.

Quanto aos ensaios da avaliação da adsorção da carbamazepina à biomassa bacteriana, no Erlenmeyer V, mais uma vez não se conseguiu retirar conclusões, pois a inativação bacteriana não foi eficaz, confirmada pelo crescimento bacteriano.

Em relação à contribuição dos processos abióticos para a remoção da carbamazepina, avaliados pelos ensaios realizados no Erlenmeyer VI, é possível observar-se na **Figura 3.18** que, tal como nos ensaios anteriores a remoção da carbamazepina não foi considerável, tendo sido inferior a 1,1 % durante o período do estudo. Assim torna-se possível concluir que nenhum dos fármacos, nas condições da experiência, tiveram remoções significativas pelos processos abióticos.

Na **Figura 3.18**, também é possível observar-se os resultados obtidos nos Erlenmeyers I para os ensaios de remoção da carbamazepina. As remoções obtidas para a carbamazepina nestes ensaios variaram entre 6,9 e 14,4 %. Mais uma vez verificou-se que a remoção aconteceu rapidamente durante as primeiras 6 horas do ensaio, seguida de uma remoção mais lenta e menos expressiva, exceto para a concentração de 8 mg/L, que se manteve estável e sem remoção adicional até ao final do estudo.

Com o ensaio da carbamazepina foi possível constatar que em todos os ensaios a remoção ocorreu nas primeiras 6 horas do estudo, o que reforça a hipótese que a remoção dos fármacos acontece principalmente por adsorção à biomassa bacteriana. No entanto não foi possível confirmar a hipótese devido ao facto de os processos de inativação utilizados não terem sido eficazes.

Na **Figura 3.19**, comparam-se as remoções finais dos quatro fármacos estudados nos ensaios dos Erlenmeyers I.

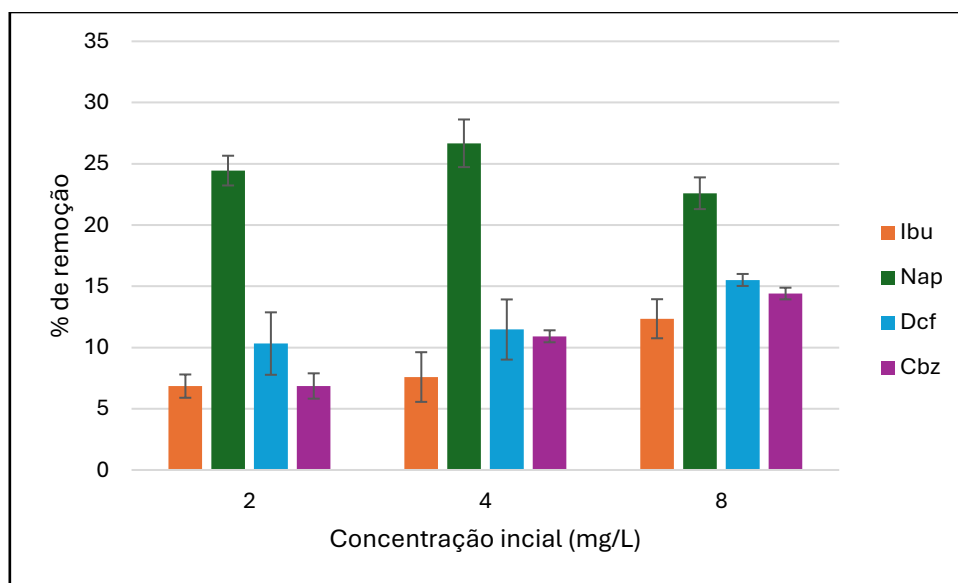


Figura 3.19 - Taxas de remoção final dos fármacos em estudo, ao fim de 50 horas, para as concentrações de 2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L, estudados nos ensaios dos erlenmeyers I.

Analisando a figura acima, é possível concluir-se que o fármaco que foi mais removido do meio de cultura foi o naproxeno, apresentado uma percentagem de remoção máxima de aproximadamente 26,7 %, no ensaio onde a concentração inicial foi de 4 mg/L. Para as restantes concentrações as percentagens de remoção foram semelhantes no final do ensaio. Depois do naproxeno, o fármaco que apresentou maior percentagem de remoção foi o diclofenaco, apresentando uma percentagem de remoção máxima de aproximadamente 15,5 %. Ao contrário do naproxeno, para o diclofenaco observaram-se percentagens de remoção maiores com o aumento da concentração inicial, tendo sido observada a percentagem de remoção máxima para a concentração de 8 mg/L. A carbamazepina foi o fármaco que se seguiu, com uma taxa de remoção máxima de 14,4%, observada para a concentração inicial de 8 mg/L. Tal como no caso do diclofenaco, a carbamazepina apresenta percentagens de remoção superiores à medida que a sua concentração inicial aumenta. Por fim, verificou-se que o ibuprofeno apresentou as menores percentagens de remoção, sendo o valor máximo de

aproximadamente 12,3 %, obtido para a concentração de 8 mg/L. No ibuprofeno também se verificou que à medida que a concentração inicial aumentava também as percentagens de remoção de fármaco aumentavam.

Com estes resultados não se observou que os efeitos tóxicos dos fármacos em elevadas concentrações tenham tido impacto nas taxas de remoção. Também se verificou que o ibuprofeno, que é considerado o fármaco mais biodegradável dos que estão em estudo, apresentou taxas de remoção inferiores aos restantes. Tal resultado suporta, em conjunto com a rapidez inicial de remoção dos fármacos, a hipótese de que o principal processo de remoção dos fármacos no ensaio com os Erlenmeyers I é a adsorção à biomassa, apesar de, tal como foi dito, não ter sido possível obter uma confirmação inequívoca de tal hipótese.

3.6 Estudo da contribuição para remoção dos fármacos pela bactéria inoculada na matriz de suporte

Em estudos anteriores já foi observada uma elevada eficiência de matrizes de vermiculite e LECA na remoção de vários fármacos de águas contaminadas (Dordio et al., 2010, 2018, 2017; Dordio & Carvalho, 2013; Machado et al., 2017). Entretanto, o uso combinado de adsorção em matriz sólida e biodegradação bacteriana pode representar uma abordagem ainda mais eficiente, de baixo custo e ambientalmente sustentável para a remoção de fármacos. De facto, a integração entre adsorção e biodegradação pode apresentar vantagens significativas em relação ao uso isolado de cada processo. A adsorção rápida retira o contaminante da água, enquanto a biodegradação atua de forma gradual, evitando a saturação da matriz e possibilitando a regeneração parcial do adsorvente.

Neste sentido, pretendeu-se neste trabalho também avaliar a potencial vantagem em inocular com o *Bacillus pumilus* uma matriz de suporte, já anteriormente estudada (Andrade, 2025; Carvalho, 2025), para remoção dos fármacos em estudo.

A matriz de suporte avaliada era composta por uma camada inicial de LECA+vermiculite (1:1, V/V), seguida de uma camada de grânulos de cortiça expandida (3/5) e uma nova camada final de LECA+vermiculite (1:1, V/V). As proporções relativas das 3 camadas

foram de 5:3:4. Na tabela seguinte apresentam-se algumas características desta matriz de suporte.

Tabela 3.12 – Algumas características físico-químicas determinadas para a matriz de suporte estratificada composta por uma camada inicial de LECA 2/4+vermiculite 3 (1:1, v/v), seguida de uma camada de grânulos de cortiça expandida (3/5) e uma camada final de LECA+vermiculite (1:1,v/v) em proporções relativas 5:3:4.

Características	Média	±	D.P.
Densidade aparente (Km/m ³)	253	±	3
Porosidade (%)	49	±	1
pH (H ₂ O)	8,85	±	0,18

Tal como se pode observar na tabela anterior, as propriedades físicas (densidade aparente e porosidade) desta matriz são intermédias da mistura de LECA+vermiculite e dos granulados de cortiça que a compõem (ver **Tabela 2.2** , na secção 2.1). De facto, a porosidade desta matriz é próxima da porosidade média dos dois materiais que a compõem. Já densidade aparente é mais próxima da densidade da mistura LECA+vermiculite, provavelmente porque esta componente existe em maior abundância na matriz estratificada.

Entretanto, o pH da matriz estratificada tem um carácter alcalino até ligeiramente mais acentuado do que o pH da amostra da mistura de LECA+vermiculite determinando anteriormente (mas, ainda assim, muito próxima desta) e relativamente distante do carácter neutro da cortiça. Mais uma vez, o facto desta característica química da matriz ser mais próxima do componente argiloso deverá ser devido à quantidade relativa deste componente ser superior. Quanto ao facto de o valor de pH da matriz estratificada ser superior ao do componente argiloso, tal poderá ser devido à heterogeneidade da LECA (que é o componente que confere o carácter alcalino, já que a vermiculite tem também um carácter próximo da neutralidade) o que por vezes causa ligeiras diferenças no pH de diferentes amostras, mesmo dentro do mesmo lote de material.

Nos ensaios realizados com a matriz estratificada inoculada com *B. pumilus*, montados e realizados conforme descrito em 2.4.2.3. Avaliação da remoção dos fármacos pela

matriz de suporte inoculada com *B. pumilus*, determinou-se ao longo do tempo a remoção de fármacos de uma solução onde os quatro fármacos se encontravam misturados. Em resumo: dois ensaios, com duração de 168 horas, utilizaram-se soluções com uma mistura dos 4 fármacos com concentrações de 4 mg/L e 10 mg/L de cada fármaco, respetivamente. Dos vários copos contendo matriz estratificada em que foram realizados os ensaios, dois deles não continham fármacos (apenas água), tendo uma função de sistemas de controlo; outros dois continham solução de mistura dos quatro fármacos e glucose, mas sem inóculo (H_2O), tendo a função de determinar a contribuição apenas da matriz para a remoção dos fármacos; e os restantes dois copos tinham solução de mistura dos quatro fármacos e glucose, bem como o inóculo (mo), de modo a determinar o aumento na remoção dos fármacos associada à adição do inóculo.

Foram colhidas amostras dos sistemas em estudo a cada duas horas até às 12 horas. Posteriormente, a recolha das amostras realizou-se às 24, 48, 72, 86, 144 e 168 horas

Na figura abaixo encontram-se as percentagens de remoção, pela ação da matriz sozinha e em conjunto com o *B. pumilus*, do ibuprofeno numa mistura de quatro fármacos, às concentrações de 4 e 10 mg/L de cada fármaco.

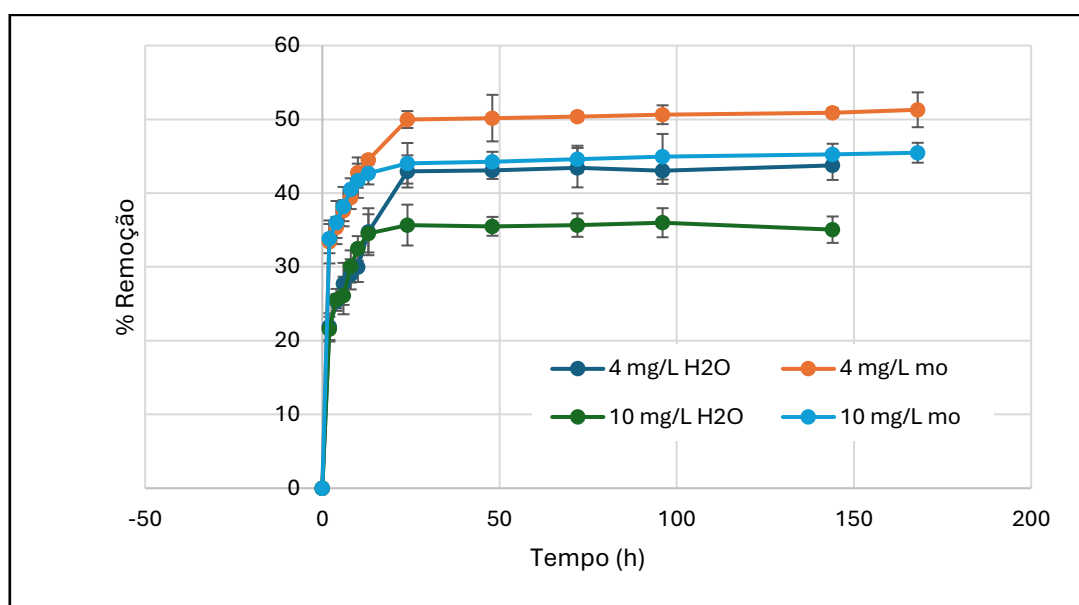


Figura 3.20 - Percentagem de remoção de ibuprofeno.

Como é possível observar-se na **Figura 3.20**, em todos os casos ocorreu uma remoção do ibuprofeno bastante rápida (mais de 50% do total removido) logo durante as primeiras 2 horas do estudo, supondo-se que esta remoção inicial muito rápida seja principalmente devida a fenómenos de adsorção. Também em todos os casos seguiu-

se depois uma remoção ligeiramente mais lenta até às 24 horas. É comum processos de adsorção ocorrerem em dois regimes cinéticos diferentes: um mais rápido, que ocorre diretamente sobre as superfícies externas, mais acessíveis, da matriz sólida; e outro, mais lento, controlado por difusão, em que os compostos têm de migrar para o interior das porosidades dos materiais para aí adsorverem.

Após as 24 horas é possível verificar-se que a remoção do fármaco praticamente estabiliza ou ocorre a uma taxa já bastante lenta, o que hipoteticamente significará que foi atingido o equilíbrio de adsorção. A partir deste período, alguma remoção adicional do fármaco só poderá ser conseguida por outros processos mais lentos, tais como, por exemplo, nos casos das matrizes inoculadas com *B. pumilus*, a degradação do composto por ação de enzimas produzidas pela bactéria.

Nos ensaios onde os microrganismos foram inoculados na matriz sólida (4 mg/L mo e 10 mg/L mo) é possível observar-se que a cinética do processo global não se alterou significativamente, mas a remoção final de ibuprofeno foi superior relativamente à obtida só pela matriz (nos ensaios 4 mg/L H₂O e 10 mg/L H₂O), provavelmente devido à adsorção à biomassa das bactérias e, possivelmente, também devido a alguma biodegradação do fármaco.

Na **Figura 3.20** também se percebe que a percentagem de remoção é superior para as concentrações iniciais de 4 mg/L em comparação como os ensaios de concentração inicial de 10 mg/L. De facto, a quantidade absoluta removida é superior quando a concentração inicial é superior, mas, em termos relativos, essa quantidade removida corresponde a uma menor percentagem da quantidade inicial. Tal facto decorre de o processo de adsorção normalmente ser descrito por uma relação não-linear (a isotérmica de adsorção, para a qual existem vários modelos, tais como o de Langmuir, o de Freundlich, etc.). Excetua-se o equilíbrio de partição, em que realmente a quantidade transferida de uma para outra fase é proporcional à quantidade inicial, dando origem, nesse caso, a uma percentagem de remoção constante, independente da concentração inicial. Portanto, a observação de uma percentagem de remoção que diminui à medida que a concentração inicial aumenta não é surpreendente, bem pelo contrário, constituindo um comportamento relativamente comum.

Na **Figura 3.21**, encontram-se as percentagens de remoção relativas ao naproxeno, presente numa mistura de fármacos com concentrações de 4 ou 10 mg/L de cada um, pela matriz sólida apenas ou inoculada com *B. pumilus*.

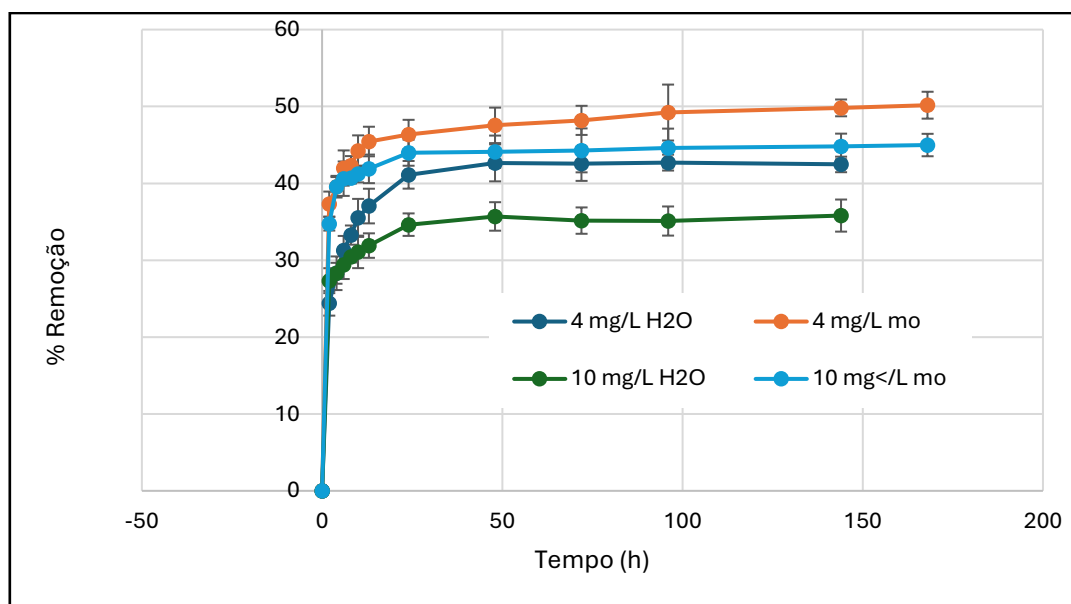


Figura 3.21 - Percentagem de remoção do naproxeno.

Analisando as percentagens de remoção do naproxeno na figura acima, é possível verificar-se que, tal como com o ibuprofeno, também ocorre uma remoção rápida do fármaco nas primeiras 2 horas do estudo, período durante o qual ocorre mais de metade da remoção total do ensaio. Segue-se uma remoção ligeiramente mais lenta e sustentada até às 24 horas, estabilizando a remoção até ao final do ensaio, principalmente nos ensaios sem microrganismos, sendo possível verificar-se aumentos remoção muito baixos para os ensaios onde se utilizaram microrganismos.

Na **Figura 3.21** também se regista que a remoção de naproxeno foi superior na presença de microrganismos na matriz, o que sugere adsorção adicional à biomassa do *B. pumilus* e, possivelmente, até alguma biodegradação.

A percentagem de remoção do naproxeno foi também superior para as concentrações de 4 mg/L em comparação com as concentrações de 10 mg/L, exibindo também neste caso uma relação não-linear entre concentração inicial e quantidade removida, natural num fenómeno de adsorção.

Na **Figura 3.22** encontram-se as percentagens de remoção do diclofenaco, pela ação da matriz sólida, ou desta combinada com os microrganismos, em que o fármaco se encontrava numa mistura de 4 fármacos com concentrações de 4 ou 10 mg/L de cada um deles.

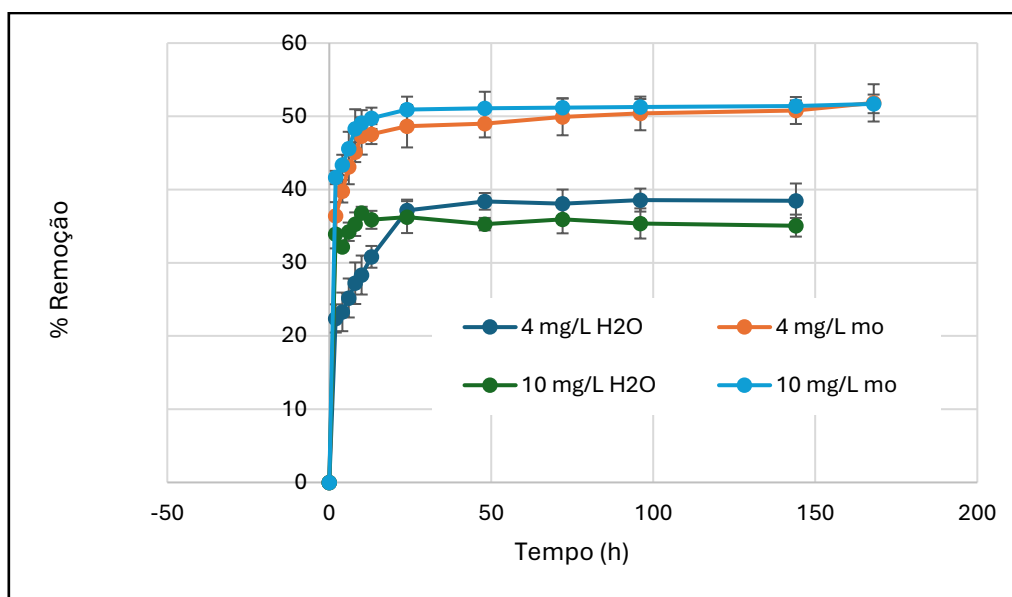


Figura 3.22 - Percentagem de remoção do diclofenaco.

Observando as percentagens de remoção representadas na figura, verifica-se existir novamente uma remoção bastante rápida e maioritária (> 60 % do total removido) logo durante as primeiras 2 horas, seguida de uma remoção um pouco mais lenta até às 24 horas. Após este período, a remoção estabiliza. Contudo, é possível observar-se um pequeno aumento de remoção após as 24 horas para as concentrações de 4 mg/L e 10 mg/L na presença de microrganismos.

Também se verificou que houve maior remoção do diclofenaco, quando os microrganismos foram inoculados na matriz sólida, reforçando a hipótese que a presença de microrganismos aumenta a capacidade de remoção de fármacos, seja por adsorção à biomassa ou biodegradação.

Ao contrário do que foi possível constatar nas **Figura 3.20** e **Figura 3.21**, para o diclofenaco verificou-se não existir muita diferença nas percentagens de remoção do diclofenaco entre as concentrações de 4 e 10 mg/L mo e entre 4 e 10 mg/L H₂O. Num processo de adsorção, uma relação linear entre concentração em solução e quantidade adsorvida é por vezes observada para concentrações baixas da substância adsorvida, mas poderá também ser indicativa de uma situação mais complexa, com vários processos diferentes a ocorrer em simultâneo.

Na figura seguinte encontram-se as taxas de remoção para a carbamazepina, pela matriz sólida sozinha ou em cooperação com microrganismos, em que a carbamazepina

faz parte de uma mistura de quatro fármacos com concentrações de 4 ou 10 mg/L de cada fármaco.

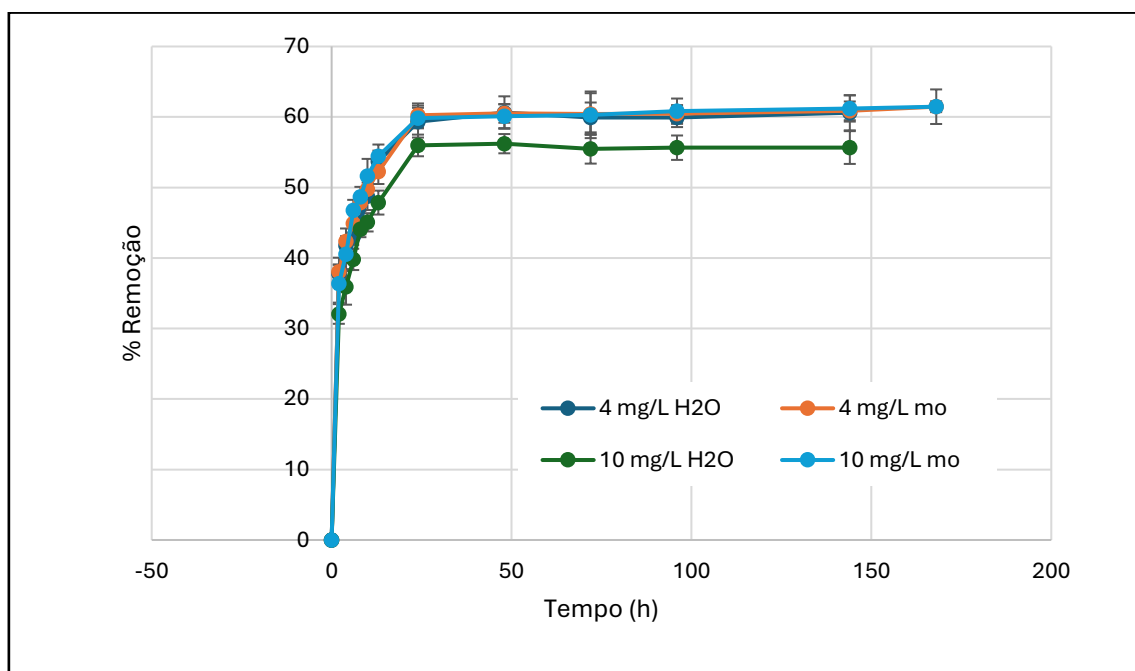


Figura 3.23 - Percentagem de remoção da carbamazepina.

Para a carbamazepina é possível verificar-se na **Figura 3.23**, que a cinética de remoção é semelhante à dos outros fármacos, existindo uma remoção rápida durante as primeiras 2 horas (> 58 % do total removido), seguido de remoção mais lenta até às 24 horas acabando por estabilizar até ao final do ensaio, apenas se verificando alguma remoção nos ensaios com microrganismos.

Tal como para os fármacos anteriores, verificou-se que a remoção de carbamazepina foi superior quando o *B. pumilus* estava presente na matriz de suporte, suportando a hipótese que os microrganismos têm um efeito benéfico na remoção de fármacos. No entanto, a diferença entre as percentagens de remoção para os ensaios com a matriz sozinha e para a matriz inoculada com microrganismos foi a menor registada entre todos os fármacos estudados.

Na **Figura 3.23** também é possível observar-se que, tal como para o diclofenaco, não existem diferenças entre as concentrações de 4 e 10 mg/L H2O e entre 4 e 10 mg/L mo. Este comportamento da carbamazepina parece o de um típico exemplo de um equilíbrio de partição entre uma fase aquosa e uma fase lipídica (por exemplo, de um biofilme),

mas pode também corresponder a uma situação mais complexa, com vários tipos de processos diferentes envolvidos.

Na figura seguinte encontram-se as concentrações removidas de cada fármaco após 144 horas.

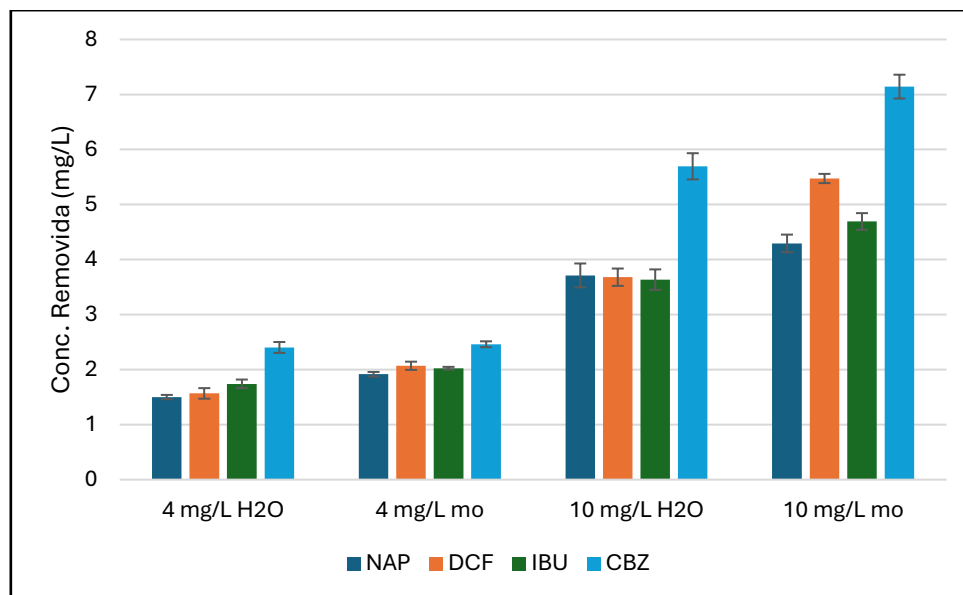


Figura 3.24 - Concentração de fármacos removidos após 144 horas nas diferentes condições de ensaio.

É possível confirmar da análise da figura que quanto maior a concentração, maior é a remoção absoluta de fármaco, sendo esta relação observável para os quatro fármacos testados. É possível concluir que a carbamazepina foi o fármaco removido em maior quantidade para todas as diferentes condições testadas. Isto pode indicar que a carbamazepina é o fármaco que apresenta maior afinidade à matriz de suporte, sendo mais rapidamente adsorvida, havendo depois competição entre os restantes fármacos pelos locais de adsorção ainda disponíveis.

É possível ainda verificar que a remoção dos fármacos é superior nos sistemas em que o *B. pumilus* está presente. Este resultado evidencia o papel positivo que a bactéria tem na remoção de fármacos, tendo a capacidade de adsorvê-los à sua biomassa ou biodegradá-los.

Comparando as remoções para as concentrações mais baixas (4 mg/L H2O e 4 mg/L mo) percebe-se que não existe muita diferença nas remoções totais. Estes resultados sugerem que os efeitos do *B. pumilus* são mais evidentes para

concentrações mais elevadas, onde é possível visualizar uma diferença significativa quando a bactéria está presente.

Analisando e comparando as remoções dos vários fármacos ao fim de 144 h em termos percentuais, conforme representado na **Figura 3.25** abaixo, pode-se verificar que as percentagens de remoção de cada fármaco foram próximas nas diferentes condições de ensaio, com umas exceções pontuais (NAP 4 mg/L mo um pouco superior às restantes condições e o DCF 4 mg/L H₂O um pouco inferior às restantes condições) e, sobretudo, com a exceção do ensaio onde os fármacos se encontravam misturados em concentrações de 10 mg/L na ausência de microrganismos, o qual apresentou percentagens de remoção inferiores para todos os fármacos em relação às restantes condições.

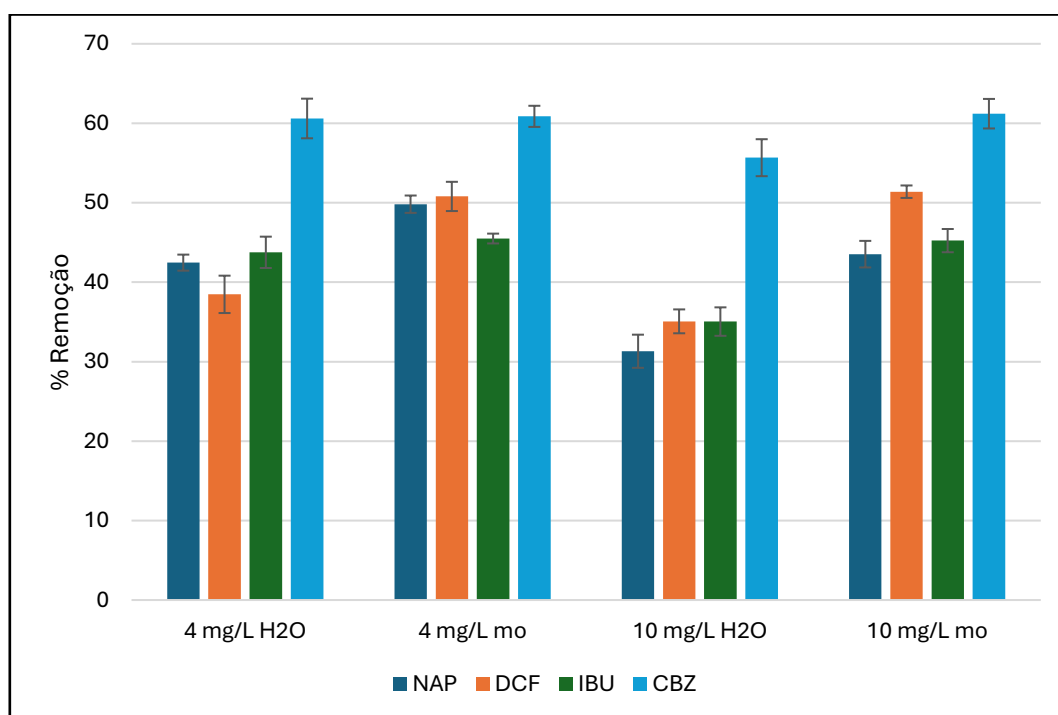


Figura 3.25 - Percentagem de remoção de cada fármaco após 144 horas nas diferentes condições de ensaio.

Assim, de forma geral pode-se inferir que a eficiência de remoção dos fármacos estudados por culturas de *Bacillus pumilus* é significativamente influenciada por fatores como a concentração do fármaco no meio de cultura, a presença simultânea de outros compostos farmacêuticos, a disponibilidade de glucose como fonte adicional de carbono e energia. Por outro lado, outros fatores que se pode supor como muito relevantes são a densidade celular da bactéria, a temperatura e o pH do meio, variáveis cujo efeito seria importante avaliar em futuros estudos.

Deste estudo preliminar parece poder concluir-se que a inoculação de *B. pumilus* em leitos construídos com macrófitas pode constituir uma estratégia promissora para melhorar a remoção de fármacos, em que, pelo menos, os processos de adsorção pela biomassa microbiana proporcionam um aumento da capacidade de retenção dos fármacos, mas também eventuais processos de biodegradação poderão também contribuir para a eficiência global da remoção dos fármacos.

De facto, a combinação da adsorção e biodegradação dos fármacos por bactérias representa uma abordagem sinérgica eficiente para a remoção destes compostos em processos de fitorremediação. Numa primeira etapa, a adsorção dos fármacos pela matriz, em biofilmes sobre esta e na superfície celular das bactérias, por um lado, retira rapidamente os contaminantes do meio aquático, reduzindo assim o seu potencial ecotóxico e, por outro lado, facilita a concentração local dos contaminantes e aumenta a sua disponibilidade para o metabolismo bacteriano. Em seguida, os fármacos podem ser metabolizados ou co-metabolizados, levando à sua transformação em compostos menos tóxicos ou, até, à sua mineralização completa. Assim, pode conseguir-se uma remoção permanente dos fármacos e a regeneração dos meios adsorventes.

É de salientar que a capacidade do *Bacillus* de formar esporos e sobreviver em condições adversas contribui para a estabilidade e eficiência deste processo biotecnológico em ambientes bastante diversos.

Comparando os resultados deste ensaio com os resultados de trabalhos anteriores realizados por membros do mesmo grupo de trabalho (Andrade, 2025; Carvalho, 2025), em que foi avaliada a remoção do mesmo conjunto de fármacos por uma matriz de suporte com uma composição e estratificação semelhantes às usadas neste trabalho (camada inicial de LECA 2/4+vermiculite 3 (1:1, v/v), seguida de uma camada de grânulos de cortiça expandida (3/5) e uma nova camada final de LECA+vermiculite (1:1, v/v), numa proporção relativa das 3 camadas de 5:3:4), procurou-se avaliar a reprodutibilidade do comportamento da matriz de suporte utilizada em comum nestes três trabalhos.

Apresenta-se na tabela seguinte um resumo dos resultados obtidos para as percentagens de remoção dos fármacos estudados nos vários trabalhos, pela matriz de suporte estratificada. Note-se, porém, que a concentração testada nos trabalhos de Carvalho (2025) e de Andrade (2025) é um pouco mais baixa (2,5 mg/L) do que a menor concentração testada neste trabalho (4 mg/L). Além disso, o tempo de ensaio nesses dois trabalhos foi de 168 h, ou seja, um pouco mais prolongado do que o deste trabalho. No entanto, ao fim desse tempo, em ambos os estudos referidos, tinha já sido atingido

o equilíbrio e já não se observavam alterações significativas nas remoções dos fármacos.

Tabela 3.13 - Comparação entre as percentagens de remoção dos fármacos pela matriz estratificada (com e sem microrganismos) obtidas no presente trabalho, ao fim de 144 h, e as obtidas noutros trabalhos com a mesma matriz estratificada, ao fim de 168 h.

Fármaco	Presente trabalho		(Carvalho, 2025)	(Andrade, 2025)
	Matriz	Matriz + M.O.	Matriz	Matriz
Carbamazepina	60,6 %	60,9 %	63,9 %	-
Ibuprofeno	43,8 %	45,5 %	44,8 %	-
Diclofenaco	38,5 %	50,8 %	-	38,1 %
Naproxeno	42,4 %	49,8 %	-	44,8 %

Nota: Os fármacos estavam presentes em todos os casos numa mistura dos 4 fármacos. No entanto, a concentração de cada um era de 4 mg/L no presente trabalho e de 2,5 mg/L nos restantes trabalhos.

De um modo geral verifica-se que há bastante proximidade e consistência entre os resultados obtidos no presente trabalho e os obtidos nos trabalhos de Carvalho (2025) e de Andrade (2025), o que confirma o comportamento reprodutível da matriz estudada e reforça a atribuição dos aumentos das remoções dos fármacos nas matrizes inoculadas ao efeito benéfico da presença dos microrganismos.

4. Conclusão e Perspetivas Futuras

Este trabalho teve como objetivo principal estudar, em variadas condições, a capacidade da bactéria *Bacillus pumilus* para remover/degradar quatro fármacos (ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco e carbamazepina) presentes num meio de cultura líquido. O estudo visa, eventualmente, uma futura inoculação desta bactéria num microcosmos de LCM com o objetivo de aumentar a eficiência global do sistema na remoção deste tipo de poluentes.

De forma a se conseguir alcançar o objetivo principal acima enunciado, inicialmente procedeu-se à caracterização da curva de crescimento do *Bacillus pumilus* e obtenção dos parâmetros cinéticos respetivos, de modo a definir as condições ambientais e durações dos ensaios posteriores, bem como avaliar eventuais efeitos tóxicos ou inibitórios do crescimento bacteriano causados pelos fármacos.

Os resultados obtidos evidenciam a importância das condições específicas do meio de cultura na dinâmica de crescimento bacteriano. Em particular, concluiu-se que é fundamental para o crescimento do *B. pumilus* a disponibilidade de uma fonte de carbono e energia como a glucose para esta bactéria se desenvolver, uma vez que este glúcido é utilizado como principal substrato energético e precursor na biossíntese de macromoléculas essenciais. Entretanto, outras condições que não foram exploradas, tais como o pH e a temperatura, mas que se sabe serem também relevantes para o crescimento bacteriano, mostraram-se adequadas tal como foram escolhidas para este estudo, mas poderão ainda ser otimizadas em estudos futuros.

Avaliou-se também a capacidade da cultura de *B. pumilus* se desenvolver sob a exposição aos fármacos em estudo às concentrações de 2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L e de degradar estes compostos. Os resultados obtidos mostraram que a bactéria consegue crescer na presença de todos os fármacos em estudo nas três concentrações testadas. Contudo, observou-se, para todos os fármacos, efeitos de toxicidade crescentes à medida que a sua concentração aumentava, evidenciados por uma diminuição do crescimento bacteriano. Segundo os parâmetros cinéticos obtidos, o fármaco que teve um efeito inibitório superior sobre a bactéria foi o ibuprofeno na concentração de 8 mg/L. Em estudos futuros seria interessante testar mais algumas concentrações mais elevadas de modo a determinar a concentração letal (LC₅₀) para o *B. pumilus* de cada um dos fármacos estudados.

Observou-se também que houve remoção dos fármacos do meio de cultura para todas as concentrações testadas, sendo que ao fim de 50 horas as percentagens de remoção obtidas para os vários fármacos atingiram valores nas gamas de: 6,8% a 11,5%, para o ibuprofeno; 23% a 27%, para o naproxeno; 10% a 15,5%, para o diclofenaco; e 6,9% e 14,4%, para a carbamazepina. Constatou-se que a remoção dos fármacos ocorreu rapidamente durante as primeiras 6 horas do ensaio, correspondendo às fases *lag* e *log*, e após esse período verificou-se uma remoção lenta e pouco acentuada. O facto de se terem observado percentagens de remoção superiores na primeira fase de crescimento, quando a multiplicação celular ainda não se iniciou ou é reduzida e a densidade ótica é semelhante em todos os sistemas, suporta a hipótese de que a remoção dos fármacos ocorreu principalmente devido a processos de adsorção à biomassa bacteriana. Outros dados que suportam esta hipótese são a maior remoção de fármacos à medida que a sua concentração inicial aumenta e o facto de o ibuprofeno (o fármaco considerado mais biodegradável do conjunto estudado) ter neste estudo apresentado a percentagem de remoção máxima mais baixa de todas, até do que a da carbamazepina (um fármaco conhecido por ser difícil de biodegradar).

Neste trabalho tentou-se obter uma compreensão mais detalhada sobre os mecanismos de remoção de fármacos responsáveis pelos resultados alcançados. Porém, como os processos de inativação bacteriana não foram bem sucedidos, não foi possível distinguir a contribuição para a remoção dos fármacos devida aos processos de adsorção à biomassa da contribuição dos processos associados ao metabolismo das bactérias. Assim, estes ensaios não foram conclusivos no sentido de esclarecer estes pormenores importantes. No futuro seria útil repetir este estudo, mas procedendo com mais cuidado previamente na procura de um processo de inativação realmente eficiente para o *B. pumilus*, de forma a ser possível distinguir a contribuição dos processos de adsorção e de biodegradação na remoção de cada um dos fármacos.

Também se tentou perceber em ensaios com um carácter de estudo preliminar se, ao inocular uma cultura de *B. pumilus* numa matriz de suporte já testada anteriormente e que tinha demonstrado alguma eficiência na remoção dos fármacos em estudo, a presença destes microrganismos no sistema contribuía para uma remoção melhorada dos fármacos. Os resultados obtidos mostram que a presença desta bactéria é de facto benéfica, obtendo-se alguma melhoria da performance da matriz inoculada relativamente à matriz sem este microrganismo. Assim, estes resultados promissores sugerem que este é outro estudo que seria importante prosseguir no futuro, de modo a ajustar as condições que possam potenciar a ação das bactérias, por exemplo, otimizando a densidade de microrganismos a inocular e aplicando uma estratégia de

aclimação dos microrganismos à matriz e às condições de trabalho. De facto, a adaptação dos microrganismos à matriz de suporte é essencial para o estabelecimento das populações microbianas que possam contribuir com um efeito positivo sobre as percentagens de remoção de poluentes.

Em estudos futuros também poderia ser esclarecedor efetuar um acompanhamento mais prolongado dos sistemas, uma vez que os processos de biodegradação de compostos orgânicos complexos efetuados pelos microrganismos são por norma lentos. Seria também útil caracterizar os processos metabólicos que levam à degradação dos fármacos de forma a se perceber se esta ocorre através de metabolização ou por co-metabolização, proceder-se à identificação dos principais metabolitos resultantes da degradação e avaliar a toxicidade desses metabolitos.

Futuramente pretende-se inocular as culturas de *B. pumilus* em microcosmos de LCM e acompanhar o seu desenvolvimento, avaliando se a sua presença contribui para o aumento da remoção de fármacos, e caracterizando melhor o papel desempenhado pela componente biota (plantas + microrganismos) e suas interações e potenciais sinergias. De qualquer modo, tal como se disse, há ainda diversos estudos que poderão ser muito importantes para melhor alcançar este último objetivo, ajudando a clarificar qual a melhor forma de introduzir e otimizar o desempenho do *Bacillus pumilus* em LCMs projetados para a remoção de fármacos de águas contaminadas.

5. Bibliografia

- Abdollahi, J., Alavi Moghaddam, M. R., & Habibzadeh, S. (2023). The role of the current waveform in mitigating passivation and enhancing electrocoagulation performance: A critical review. *Chemosphere*, 312, 137212.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.137212>
- Aguilar, L., Pérez, L. M., Gallegos, Á., Fores, E., Arias, C. A., Bosch, C., Verdum, M., Jove, P., de Pablo, J., & Morató, J. (2022). Effect of aeration on nitrogen removal-associated microbial community in an innovative vertical cork-based constructed wetland for winery wastewater treatment. *Ecological Engineering*, 185, 106781.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2022.106781>
- Al-Juboori, R. A., & Hilal, N. (2023). Pharmaceuticals removal from wastewater: Ultrasound technology and its potential amalgamation with membrane processes. *Journal of Water Process Engineering*, 53, 103810.
<https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2023.103810>
- Almeida, Â., Soares, A. M. V. M., Esteves, V. I., & Freitas, R. (2021). Occurrence of the antiepileptic carbamazepine in water and bivalves from marine environments: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 86, 103661.
<https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2021.103661>
- Andrade, A. L. A. (2025). *Novas Estratégias de Remoção de Anti-inflamatórios em Leitões Construídos de Macrófitas. Naproxeno e Diclofenac, Dois Casos de Estudo* [Tese de Mestrado]. Universidade de Évora.
- Ansari, A. A., Naeem, M., Gill, S. S., & AlZuaibr, F. M. (2020). Phytoremediation of contaminated waters: An eco-friendly technology based on aquatic macrophytes application. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(4), 371–376.
<https://doi.org/10.1016/J.EJAR.2020.03.002>
- Assis Neto, P. C. de, Sales, L. P. B., Oliveira, P. K. S., Silva, I. C. da, Barros, I. M. da S., Nóbrega, A. F. da, & Carneiro, A. M. P. (2023). Expanded Vermiculite: A Short Review about Its Production, Characteristics, and Effects on the Properties of Lightweight Mortars. *Buildings* 2023, Vol. 13, Page 823, 13(3), 823.
<https://doi.org/10.3390/BUILDINGS13030823>
- aus der Beek, T., Weber, F. A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 823–835.
<https://doi.org/10.1002/ETC.3339>
- Avendaño, R. E., Montoya, L., Olmos, J., & Ramírez, S. I. (2015). Growth of *Bacillus pumilus* and *Halomonas halodurans* in sulfates: prospects for life on Europa. *Boletín de La Sociedad Geológica Mexicana*, 67(3), 367–375.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-33222015000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=en

- Batucan, N. S. P., Tremblay, L. A., Northcott, G. L., & Matthaei, C. D. (2022). Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. *Environmental Advances*, 7, 100164. <https://doi.org/10.1016/J.ENVADV.2021.100164>
- Bessa, V. S., Moreira, I. S., Murgolo, S., Mascolo, G., & Castro, P. M. L. (2019). Carbamazepine is degraded by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Science of The Total Environment*, 690, 739–747. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.06.461>
- Biswal, B. K., & Balasubramanian, R. (2022). Constructed Wetlands for Reclamation and Reuse of Wastewater and Urban Stormwater: A Review. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 836289. <https://doi.org/10.3389/FENV.2022.836289/BIBTEX>
- Black, C. A., Evans, D. D., White, J. L., Ensminger, L. E., & Clark, F. E. (2016). Methods of soil analysis: Part 2. *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*, 1–1572. <https://doi.org/10.2134/AGRONMONOGR9.2.2ED>
- Bogusz, A., Tomczyk, B., Trzcińska, M., Mirosław, B., & Gworek, B. (2024). Effect of zeolites on the reduction of the ecotoxicity of carbamazepine in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 277, 116320. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2024.116320>
- Bouchard-Rochette, M., Machrafi, Y., Cossus, L., Thuy An Nguyen, T., Antoun, H., Droit, A., & Tweddell, R. J. (2022). *Bacillus pumilus* PTB180 and *Bacillus subtilis* PTB185: Production of lipopeptides, antifungal activity, and biocontrol ability against *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 170, 104925. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2022.104925>
- Brião, G. de V., da Silva, M. G., & Vieira, M. G. A. (2021). Expanded vermiculite as an alternative adsorbent for the dysprosium recovery. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 127, 228–235. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2021.08.022>
- Brix, H., Arias, C. A., & Del Bubba, M. (2001). Media selection for sustainable phosphorus removal in subsurface flow constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 44(11–12), 47–54. <https://doi.org/10.2166/WST.2001.0808>
- Caban, M., & Stepnowski, P. (2021). How to decrease pharmaceuticals in the environment? A review. *Environmental Chemistry Letters* 2021 19:4, 19(4), 3115–3138. <https://doi.org/10.1007/S10311-021-01194-Y>
- Carlson, M., & Thompson, R. D. (2000). Analyte Loss Due to Membrane Filter Adsorption as Determined by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 38(2), 77–83. <https://doi.org/10.1093/CHROMSCI/38.2.77>
- Carrajola, J. (2020). *Papel da matriz composta por materiais argilosos e carvão ativado na remoção de fármacos em LCM* [Tese de Mestrado]. Universidade de Évora.
- Carvalho, C. S. C. (2025). *Ensaio preliminares para a otimização da remoção de Carbamazepina e Ibuprofeno em Leitos Construídos de Macrófitas* [Tese de Mestrado]. Universidade de Évora.

- Chahm, T., & Rodrigues, C. A. (2017). Removal of ibuprofen from aqueous solutions using O-carboxymethyl-N-laurylchitosan/ γ -Fe₂O₃. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 7, 139–148. <https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2017.03.001>
- Chopra, S., & Kumar, D. (2020). Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation. *Heliyon*, 6(6), e04087. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E04087>
- Ciotir, C., Szabo, J., & Freeland, J. (2017). Genetic characterization of cattail species and hybrids (*Typha* spp.) in Europe. *Aquatic Botany*, 141, 51–59. <https://doi.org/10.1016/J.AQUABOT.2017.03.005>
- Corcoran, J., Winter, M. J., & Tyler, C. R. (2010). Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(4), 287–304. <https://doi.org/10.3109/10408440903373590>
- 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>
- Cui, Q., Fan, M., Liu, X., Feng, Y., Zhang, W., Zuo, Q., Zhao, X., & Wu, F. (2024). Activation ability of Yellow River (Huanghe) suspended sediment to degrade carbamazepine pollutants in water environment using peroxymonosulfate: Performance, mechanism, and potential toxicity evaluation. *Separation and Purification Technology*, 337, 126422. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2024.126422>
- de Jesus Gaffney, V., Almeida, C. M. M., Rodrigues, A., Ferreira, E., Benoliel, M. J., & Cardoso, V. V. (2015). Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. *Water Research*, 72, 199–208. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.10.027>
- de Jesus Gaffney, V., Cardoso, V. V., Cardoso, E., Teixeira, A. P., Martins, J., Benoliel, M. J., & Almeida, C. M. M. (2017). Occurrence and behaviour of pharmaceutical compounds in a Portuguese wastewater treatment plant: Removal efficiency through conventional treatment processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(17), 14717–14734. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-9012-7>
- de Vargas Briaõ, G., da Silva, M. G. C., & Vieira, M. G. A. (2021). Efficient and selective adsorption of neodymium on expanded vermiculite. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 60(13), 4962–4974. https://doi.org/10.1021/ACS.IECR.0C05979/SUPPL_FILE/IE0C05979_LIVESLIDES.MP4
- Del Bubba, M., Arias, C. A., & Brix, H. (2003). Phosphorus adsorption maximum of sands for use as media in subsurface flow constructed reed beds as measured by the Langmuir isotherm. *Water Research*, 37(14), 3390–3400. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00231-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00231-8)
- Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., & Dybek, B. (2022). Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1069053. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1069053/BIBTEX>

- Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., Kulkova, I., Kowalczyk, P., & Kramkowski, K. (2023). Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1194606. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1194606/XML/NLM>
- Dordio, A., & Carvalho, A. J. P. (2018). Removal Processes of Pharmaceuticals in Constructed Wetlands. *Constructed Wetlands for Industrial Wastewater Treatment*, 343–403. <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. *Artificial or Constructed Wetlands*, 286–325. <https://doi.org/10.1201/9781315184265-16>
- Dordio, A., Carvalho, A. J. P., 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(3), 886–892. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.09.001>
- Dordio, A., Silva, V., & Carvalho, A. (2017). Carbamazepine in the Environment: Sources, Fate and Adverse Effects. In *Carbamazepine: Indications, Contraindications and Adverse Effects* (1st ed., pp. 37–90). Nova Science Pub Inc.
- Dordio, A. V., Belo, M., Martins Teixeira, D., Palace Carvalho, A. J., Dias, C. M. B., Picó, Y., & Pinto, A. P. (2011). Evaluation of carbamazepine uptake and metabolism by *Typha* spp., a plant with potential use in phytotreatment. *Bioresource Technology*, 102(17), 7827–7834. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.06.050>
- Dordio, A. V., & Carvalho, A. J. P. (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. V., Miranda, S., Prates Ramalho, J. P., & Carvalho, A. J. P. (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>
- dos Santos, C. R., Arcanjo, G. S., de Souza Santos, L. V., Koch, K., & Amaral, M. C. S. (2021). Aquatic concentration and risk assessment of pharmaceutically active compounds in the environment. *Environmental Pollution*, 290, 118049. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.118049>
- Dzionic, A., Wojcieszynska, D., Marchlewicz, A., Smutek, W., Potocka, I., Jatowiecki, Ł., Borgulat, J., Płaza, G., & Guzik, U. (2024). Naproxen as environmental pollution, its effect on bacteria metabolism and degradation mechanism in immobilized *Planococcus* sp. S5. *Chemical Engineering Journal*, 481, 148174. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2023.148174>
- EMA/CHMP/ICH. (2023). *Committee for Medicinal Products for Human Use ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures*. www.ema.europa.eu/contact
- Eniola, J. O., Kumar, R., Barakat, M. A., & Rashid, J. (2022). A review on conventional and advanced hybrid technologies for pharmaceutical wastewater treatment. *Journal of Cleaner Production*, 356, 131826. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.131826>

- Fatta-Kassinou, D., Vasquez, M. I., & Kümmerer, K. (2011). Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes – Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere*, 85(5), 693–709. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2011.06.082>
- 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>
- Feng, X., Qiu, B., Dang, Y., & Sun, D. (2021). Enhanced adsorption of naproxen from aquatic environments by β -cyclodextrin-immobilized reduced graphene oxide. *Chemical Engineering Journal*, 412, 128710. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2021.128710>
- Fortunato, A. C. I. (2014). *Ocorrência de Diclofenac, Ibuprofeno e Paracetamol em águas residuais em Portugal*.
- Gałązka, A., Jankiewicz, U., & Szczepkowski, A. (2023). Biochemical Characteristics of Laccases and Their Practical Application in the Removal of Xenobiotics from Water. *Applied Sciences* 2023, Vol. 13, Page 4394, 13(7), 4394. <https://doi.org/10.3390/APP13074394>
- Gangola, S., Sharma, A., Bhatt, P., Khatri, P., & Chaudhary, P. (2018). Presence of esterase and laccase in *Bacillus subtilis* facilitates biodegradation and detoxification of cypermethrin. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31082-5>
- Ghebray, A. (2020). *Growth and Inactivation of Bacillus Pumilus with heat nad high-pressure processing*. University of Stavenger.
- 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>
- Guedes-Alonso, R., Montesdeoca-Esponda, S., Herrera-Melián, J. A., Rodríguez-Rodríguez, R., Ojeda-González, Z., Landívar-Andrade, V., Sosa-Ferrera, Z., & Santana-Rodríguez, J. J. (2020). Pharmaceutical and personal care product residues in a macrophyte pond-constructed wetland treating wastewater from a university campus: Presence, removal and ecological risk assessment. *Science of The Total Environment*, 703, 135596. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.135596>
- Hadi Yatimzade, M., Ahmadpour, A., Ghahramaninezhad, M., & Moatamed Sabzevar, A. (2024). Optimizing the efficient removal of ibuprofen from water environment by magnetic carbon aerogel: kinetics, isotherms, and thermodynamic studies. *Journal of Molecular Liquids*, 408, 125337. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2024.125337>
- Hejna, M., Kapuści, D., Nska, K., & Aksmann, A. (2022). *Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Review on Eco-Toxicology and the Remediation Potential of Algae*. <https://doi.org/10.3390/ijerph19137717>

- Hernández-Tenorio, R., González-Juárez, E., Guzmán-Mar, J. L., Hinojosa-Reyes, L., & Hernández-Ramírez, A. (2022). Review of occurrence of pharmaceuticals worldwide for estimating concentration ranges in aquatic environments at the end of the last decade. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 8, 100172. <https://doi.org/10.1016/J.HAZADV.2022.100172>
- Ibáñez, M., Bijlsma, L., Pitarch, E., López, F. J., & Hernández, F. (2021). Occurrence of pharmaceutical metabolites and transformation products in the aquatic environment of the Mediterranean area. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 29, e00118. <https://doi.org/10.1016/J.TEAC.2021.E00118>
- Índice. (2025a). *Carbamazepina - Informação Científica*. <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/carbamazepina/informacao-cientifica>
- Índice. (2025b). *Diclofenac - Informação Científica*. <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/diclofenac/informacao-cientifica>
- Índice. (2025a). *Ibuprofeno - Informação Científica*. <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/ibuprofeno/informacao-cientifica>
- Índice. (2025b). *Naproxeno - Informação Científica*. <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/naproxeno/informacao-cientifica>
- INFARMED. (2023). *MEIO AMBULATÓRIO MONITORIZAÇÃO DO CONSUMO DE MEDICAMENTOS Dezembro de 2023*. <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/monitorizacao-mercado/relatorios/ambulatorio>
- Ingrao, C., Failla, S., & Arcidiacono, C. (2020). A comprehensive review of environmental and operational issues of constructed wetland systems. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 13, 35–45. <https://doi.org/10.1016/J.COESH.2019.10.007>
- Jasim, N. A. (2020). The design for wastewater treatment plant (WWTP) with GPS X modelling. *Cogent Engineering*, 7(1). <https://doi.org/10.1080/23311916.2020.1723782>
- Kasri, S. S., Mohamad-Nasir, N., Abdul-Talib, S., Lokman, N. F., Hashim, S. N., Liu, Z., & Tay, C. C. (2024). Strategic enzymatic biodegradation of pharmaceutical pollutant carbamazepine by bacteria *Rhodococcus zopfii*. *Environmental Technology & Innovation*, 34, 103567. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2024.103567>
- Khalifa, M. E., El-Reash, Y. G. A., Ahmed, M. I., & Rizk, F. W. (2020). Effect of media variation on the removal efficiency of pollutants from domestic wastewater in constructed wetland systems. *Ecological Engineering*, 143, 105668. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2019.105668>
- Koba, O., Golovko, O., Kodešová, R., Klement, A., & Grabic, R. (2016). Transformation of atenolol, metoprolol, and carbamazepine in soils: The identification, quantification, and stability of the transformation products and further implications for the environment. *Environmental Pollution*, 218, 574–585. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2016.07.041>

- Kumar, M., Jaiswal, S., Sodhi, K. K., Shree, P., Singh, D. K., Agrawal, P. K., & Shukla, P. (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International*, 124, 448–461. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2018.12.065>
- Kumar, R., Qureshi, M., Vishwakarma, D. K., Al-Ansari, N., Kuriqi, A., Elbeltagi, A., & Saraswat, A. (2022). A review on emerging water contaminants and the application of sustainable removal technologies. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 6, 100219. <https://doi.org/10.1016/J.CSCEE.2022.100219>
- 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>
- Liakh, I., Harshkova, D., Hrouzek, P., Bišová, K., Aksmann, A., & Wielgomas, B. (2023). Green alga *Chlamydomonas reinhardtii* can effectively remove diclofenac from the water environment – A new perspective on biotransformation. *Journal of Hazardous Materials*, 455, 131570. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2023.131570>
- Liu, X., Guo, X., Liu, Y., Lu, S., Xi, B., Zhang, J., Wang, Z., & Bi, B. (2019). A review on removing antibiotics and antibiotic resistance genes from wastewater by constructed wetlands: Performance and microbial response. *Environmental Pollution*, 254, 112996. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.112996>
- Lu, X., Li, W., Liu, Y., Li, Y., He, X., Chen, L., & Zhang, Y. (2024). Quaternized polydimethylaminoethyl methacrylate polymer brushes functionalized magnetic graphene oxide for efficient removal of diclofenac from complex environments: synthesis, adsorption performance, DFT calculation and mechanism. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12(1), 111762. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2023.111762>
- Machado, A. I., Dordio, A., Fragoso, R., Leitão, A. E., & Duarte, E. (2017). Furosemide removal in constructed wetlands: Comparative efficiency of LECA and Cork granulates as support matrix. *Journal of Environmental Management*, 203, 422–428. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2017.08.002>
- Machado, A. I., Fragoso, R., Dordio, A. V. M. N. B., & Duarte, E. (2020). Furosemide in water matrix: HPLC-UV method development and degradation studies. *Revista Ambiente & Água*, 15(1), e2406. <https://doi.org/10.4136/AMBI-AGUA.2406>
- Mackuľak, T., Černanský, S., Fehér, M., Birošová, L., & Gál, M. (2019). Pharmaceuticals, drugs, and resistant microorganisms — environmental impact on population health. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 9, 40–48. <https://doi.org/10.1016/J.COESH.2019.04.002>
- Maculewicz, J., Kowalska, D., Świacka, K., Toński, M., Stepnowski, P., Białk-Bielińska, A., & Dołzonek, J. (2022). Transformation products of pharmaceuticals in the environment: Their fate, (eco)toxicity and bioaccumulation potential. *Science of The Total Environment*, 802, 149916. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149916>

- Marchlewicz, A., Domaradzka, D., Guzik, U., & Wojcieszńska, D. (2016). *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a Gram-Positive Bacteria Able to Degrade Naproxen and Ibuprofen. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(6), 1–8. <https://doi.org/10.1007/S11270-016-2893-0/FIGURES/3>
- Martín-Pozo, L., de Alarcón-Gómez, B., Rodríguez-Gómez, R., García-Córcoles, M. T., Cipa, M., & Zafra-Gómez, A. (2019). Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review. *Talanta*, 192, 508–533. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.09.056>
- Michlig, N., Lehotay, S. J., & Lightfield, A. R. (2024). Comparison of filter membranes in the analysis of 183 veterinary and other drugs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 47(3), 2300696. <https://doi.org/10.1002/JSSC.202300696>
- Mirzaee, S. A., Noorimotlagh, Z., Ahmadi, M., Rahim, F., Martinez, S. S., Nourmohammadi, A., & Jaafarzadeh, N. (2021). The possible oxidative stress and DNA damage induced in Diclofenac-exposed Non-target organisms in the aquatic environment: A systematic review. *Ecological Indicators*, 131, 108172. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2021.108172>
- Mlih, R., Bydalek, F., Klumpp, E., Yaghi, N., Bol, R., & Wenk, J. (2020). *Light-expanded clay aggregate (LECA) as a substrate in constructed wetlands-A review*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2020.105783>
- Mohamed, M. S. M., Asair, A. A., Fetyan, N. A. H., & Elnagdy, S. M. (2023). Complete Biodegradation of Diclofenac by New Bacterial Strains: Postulated Pathways and Degrading Enzymes. *Microorganisms*, 11(6), 1445. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11061445/S1>
- Moreira, D. G., Aires, A., de Lourdes Pereira, M., & Oliveira, M. (2022). Levels and effects of antidepressant drugs to aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 256, 109322. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2022.109322>
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Fourmentin, M., Ribeiro, A. R. L., Noutsopoulos, C., Mapelli, F., Fenyvesi, É., Vieira, M. G. A., Picos-Corrales, L. A., Moreno-Piraján, J. C., Giraldo, L., Sohajda, T., Huq, M. M., Soltan, J., Torri, G., Magureanu, M., Bradu, C., & Crini, G. (2022). Removal of emerging contaminants from wastewater using advanced treatments. A review. *Environmental Chemistry Letters* 2022 20:2, 20(2), 1333–1375. <https://doi.org/10.1007/S10311-021-01379-5>
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Liu, G., Balaram, V., Ribeiro, A. R. L., Lu, Z., Stock, F., Carmona, E., Teixeira, M. R., Picos-Corrales, L. A., Moreno-Piraján, J. C., Giraldo, L., Li, C., Pandey, A., Hocquet, D., Torri, G., & Crini, G. (2021). *Emerging Contaminants: Analysis, Aquatic Compartments and Water Pollution*. 1–111. https://doi.org/10.1007/978-3-030-69079-3_1
- Nasrollahi, N., Vatanpour, V., & Khataee, A. (2022). Removal of antibiotics from wastewaters by membrane technology: Limitations, successes, and future improvements. *Science of The Total Environment*, 838, 156010. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.156010>

- Overton, O. C., Olson, L. H., Majumder, S. Das, Shwiyat, H., Foltz, M. E., & Nairn, R. W. (2023). Wetland Removal Mechanisms for Emerging Contaminants. *Land* 2023, Vol. 12, Page 472, 12(2), 472. <https://doi.org/10.3390/LAND12020472>
- Paíga, P., Santos, L. H. M. L. M., Ramos, S., Jorge, S., Silva, J. G., & Delerue-Matos, C. (2016). Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Science of The Total Environment*, 573, 164–177. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.08.089>
- Palma, P., Fialho, S., Lima, A., Novais, M. H., Costa, M. J., Montemurro, N., Pérez, S., & de Alda, M. L. (2020). Pharmaceuticals in a Mediterranean Basin: The influence of temporal and hydrological patterns in environmental risk assessment. *Science of The Total Environment*, 709, 136205. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.136205>
- 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 & Innovation*, 21, 101261. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2020.101261>
- Pereira, A. M. P. T., Silva, L. J. G., Lino, C. M., Meisel, L. M., & 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>
- Petrie, B., Barden, R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, 72, 3–27. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.08.053>
- Pillai, S. A., Chobisa, D., Urimi, D., & Ravindra, N. (2016). *Filters and filtration: A review of mechanisms that impact cost, product quality and patient safety*. 8, 271–278.
- PubChem. (2025a). *National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 2554, Carbamazepine*. National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 2554, Carbamazepine. Retrieved June 30, 2025 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbamazepine>
- PubChem. (2025b). *National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 3033, Diclofenac*. National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 3033, Diclofenac. Retrieved June 30, 2025 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac>
- PubChem. (2025c). *National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 3672, Ibuprofen*. National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 3672, Ibuprofen. Retrieved June 29, 2025 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ibuprofen>

- PubChem. (2025d). *National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 156391, Naproxen. Retrieved June 30, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2S_-2-_6-methoxynaphthalen-2-yl_propanoic-acid*. National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 156391, Naproxen. Retrieved June 30, 2025 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2S_-2-_6-Methoxynaphthalen-2-Yl_propanoic-Acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/156391>
- 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>
- Rastogi, A., Chaudhary, S., Tiwari, M. K., & Ghangrekar, M. M. (2024). Ibuprofen degradation by mixed bacterial consortia: Metabolic pathway and microbial community analysis. *Chemosphere*, 359, 142354. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2024.142354>
- Ravikumar, Y., Yun, J., Zhang, G., Zayed, H. M., & Qi, X. (2022). A review on constructed wetlands-based removal of pharmaceutical contaminants derived from non-point source pollution. *Environmental Technology & Innovation*, 26, 102504. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2022.102504>
- Rayan, R. A. (2023). Pharmaceutical effluent evokes superbugs in the environment: A call to action. *Biosafety and Health*, 5(6), 363–371. <https://doi.org/10.1016/J.BSHEAL.2023.10.005>
- Reyes-cortes, J. L., Azaola-espinosa, A., Lozano-aguirre, L., & Ponce-alquicira, E. (2021). Physiological and genomic analysis of bacillus pumilus uamx isolated from the gastrointestinal tract of overweight individuals. *Microorganisms*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9051076/S1>
- Salah, M., Zheng, Y., Wang, Q., Li, C., Li, Y., & Li, F. (2023). Insight into pharmaceutical and personal care products removal using constructed wetlands: A comprehensive review. *Science of The Total Environment*, 885, 163721. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.163721>
- Sesin, V., Davy, C. M., & Freeland, J. R. (2021). Review of Typha spp. (cattails) as toxicity test species for the risk assessment of environmental contaminants on emergent macrophytes. *Environmental Pollution*, 284, 117105. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.117105>
- Sharma, K., Kaushik, G., Thotakura, N., Raza, K., Sharma, N., & Nimesh, S. (2019). Fate of ibuprofen under optimized batch biodegradation experiments using Micrococcus yunnanensis isolated from pharmaceutical sludge. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(12), 8315–8328. <https://doi.org/10.1007/S13762-019-02400-9/FIGURES/6>
- Shi, L., Qiu, J., Wang, W., Ding, Z., Zhang, W., Liang, J., Li, P., & Fan, Q. (2024). Influence of cations and low molecular weight organic acids on Cs(I) adsorption on montmorillonite and vermiculite. *Journal of Molecular Liquids*, 402, 124778. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2024.124778>

- Silva, A. B. P. M. de S. e. (2020). *Solubilidade de princípios ativos em água através de líquidos iônicos biocompatíveis* [Universidade Nova de Lisboa].
<http://hdl.handle.net/10362/119703>
- Silva, T. L. da, Costa, C. S. D., Silva, M. G. C. da, & Vieira, M. G. A. (2022). Overview of non-steroidal anti-inflammatory drugs degradation by advanced oxidation processes. *Journal of Cleaner Production*, 346, 131226.
<https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.131226>
- Silva, V. L. M. da. (2024). *Fitorremediação de fármacos em águas residuais* [Tese de Doutoramento]. Universidade de Évora.
- Silva, S., Cardoso, V. V., Duarte, L., Carneiro, R. N., & Almeida, C. M. M. (2021). Characterization of five portuguese wastewater treatment plants: Removal efficiency of pharmaceutical active compounds through conventional treatment processes and environmental risk. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(16), 7388.
<https://doi.org/10.3390/APP11167388/S1>
- Singh, S., Pant, A., Dutta, K., Rani, R., Vithanage, M., & Daverey, A. (2024). Phytoremediation of pharmaceuticals and personal care products using the constructed wetland. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 6, 104–116.
<https://doi.org/10.1016/J.ENCECO.2024.04.001>
- Sousa, J. C. G., Barbosa, M. O., Ribeiro, A. R. L., Ratola, N., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2020). Distribution of micropollutants in estuarine and sea water along the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*, 154, 111120.
<https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2020.111120>
- Taheran, M., Naghdi, M., Brar, S. K., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2018). Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 10, 122–126.
<https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2018.05.010>
- Tehrani, E., Faraji, A. R., Shojaei, N., Shahinmehr, S., Najafi, A., Hekmatian, Z., Tehrani, Z., & Bornas, B. (2023). An overview of the characteristics, toxicity, and treatment methods for the degradation of pharmaceutically active compounds: Naproxen as a case study. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(6), 111575.
<https://doi.org/10.1016/J.JECE.2023.111575>
- Teixeira, P., Tacão, M., Pureza, L., Gonçalves, J., Silva, A., Cruz-Schneider, M. P., & Henriques, I. (2020). Occurrence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a Portuguese river: blaNDM, blaKPC and blaGES among the detected genes. *Environmental Pollution*, 260, 113913.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.113913>
- Tiwari, B., Sellamuthu, B., Ouarda, Y., Drogui, P., Tyagi, R. D., & Buelna, G. (2017). Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. *Bioresource Technology*, 224, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.11.042>
- Tran, N. H., Reinhard, M., & Gin, K. Y. H. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical

- regions-a review. *Water Research*, 133, 182–207.
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.12.029>
- Vasudevan, S., Lakshmi, J., & Sozhan, G. (2011). Effects of alternating and direct current in electrocoagulation process on the removal of cadmium from water. *Journal of Hazardous Materials*, 192(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2011.04.081>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2017.08.009>
- Waly, M. M., Ahmed, T., Abunada, Z., Mickovski, S. B., & Thomson, C. (2022). Constructed Wetland for Sustainable and Low-Cost Wastewater Treatment: Review Article. *Land* 2022, Vol. 11, Page 1388, 11(9), 1388. <https://doi.org/10.3390/LAND11091388>
- Wang, Y., Gao, J., Zhou, S., & Lian, M. (2023). Microbial degradation of carbamazepine by a newly isolated of *Gordonia polyophrenivorans*. *Environmental Technology & Innovation*, 32, 103322. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2023.103322>
- Wojcieszynska, D., Domaradzka, D., Hupert-Kocurek, K., & Guzik, U. (2014). Bacterial degradation of naproxen – Undisclosed pollutant in the environment. *Journal of Environmental Management*, 145, 157–161.
<https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2014.06.023>
- 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, D., Gersberg, R. M., Ng, W. J., & Tan, S. K. (2014). Removal of pharmaceuticals and personal care products in aquatic plant-based systems: A review. *Environmental Pollution*, 184, 620–639. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2013.09.009>
- Zhang, H., Wang, X. C., Zheng, Y., & Dzakpasu, M. (2023). Removal of pharmaceutical active compounds in wastewater by constructed wetlands: Performance and mechanisms. *Journal of Environmental Management*, 325, 116478.
<https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2022.116478>
- Zhou, J. L., Zhang, Z. L., Banks, E., Grover, D., & Jiang, J. Q. (2009). Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2–3), 655–661.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2008.11.070>
- Zhou, T., Zhang, Z., Liu, H., Dong, S., Nghiem, L. D., Gao, L., Chaves, A. V., Zamyadi, A., Li, X., & Wang, Q. (2023). A review on microalgae-mediated biotechnology for removing pharmaceutical contaminants in aqueous environments: Occurrence, fate, and removal mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 443, 130213.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2022.130213>
- Žur, J., Marchlewicz, A., Piński, A., Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2021). Degradation of diclofenac by new bacterial strains and its influence on the physiological status of cells. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 124000.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.124000>

