Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Análises Químicas Ambientais

Dissertação

Avaliação de sistemas híbridos LCM e adsorção em carvão ativado na remoção de fármacos

Marta Alexandra Modesto Cristóvão

Orientador(es) | Isabel Pestana Paixão Cansado

Ana Vitória Martins Neves Barrocas Dordio

Évora 2020

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Análises Químicas Ambientais

Dissertação

Avaliação de sistemas híbridos LCM e adsorção em carvão ativado na remoção de fármacos

Marta Alexandra Modesto Cristóvão

Orientador(es) | Isabel Pestana Paixão Cansado

Ana Vitória Martins Neves Barrocas Dordio

Évora 2020

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

Presidente	|	Ana Paula Honrado Pinto (Universidade de Évora)
Vogais	|	Isabel Pestana Paixão Cansado (Universidade de Évora) (Orientador) Paulo Alexandre Mira Mourão (Universidade de Évora) (Arguente)

Évora 2020

Agradecimentos

À Professora Doutora Isabel Cansado pela disponibilidade, dedicação, pelo apoio, incentivo, orientação, compreensão, amizade, conhecimentos científicos e importantes contribuições para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Vitória Dordio pelos conhecimentos científicos transmitidos, pelo apoio, amizade e disponibilidade evidenciada durante a realização deste trabalho.

Ao meu filho Santiago a quem dedico em especial este trabalho, que embora pequeno em idade foi grande em pensamento, sabendo apoiar e compreender as minhas dificuldades e ausências. Ao meu marido Francisco pelo incentivo dado durante esta etapa, mas principalmente por acreditar em mim e nas minhas capacidades para atingir os meus objetivos.

À minha sogra, pela compreensão, apoio e incentivo demonstrado.

Aos meus colegas que me acompanharam ao longo deste percurso, agradeço o apoio e a amizade manifestada.

"O conhecimento nos faz responsáveis". (Che Guevara)

Resumo

A crescente presença de fármacos em efluentes tratados obriga ao desenvolvimento de metodologias eficientes, a custos reduzidos para a sua redução/remoção. Os processos de tratamento convencionais das ETARs não são geralmente eficazes na remoção de fármacos. A remoção destes compostos com carvões ativados (CA), ou por leitos construídos de macrófitas (LCM), individualmente, também apresentam limitações. Este trabalho teve como principal objetivo a avaliação da remoção do sulfametoxazol, usando um microcosmo de LCM, seguido de um processo de adsorção em três CA. Nos LCM, inicialmente, a cinética de remoção do sulfametoxazol foi muito rápida, pois durante a primeira meia hora, no leito plantado e no não plantado, a remoção foi de 75,3% e 39,4%, respetivamente. O CA em pó apresentou uma cinética de remoção muito rápida e a capacidade máxima de remoção nas condições de trabalho chegou aos 177 mg g^{-1}. A sequência dos dois processos mostra-se promissora para a remoção do sulfametoxazol em particular em situações de derrames/emergências.

Palavras chave: Leitos Construídos de Macrófitas, Sulfametoxazol, Carvões ativados Comerciais, Vermiculite, LECA, Gravilha.

Abstract

Evaluation of pharmaceuticals removal by hybrid constructed wetland systems followed by activated carbon adsorption

The increasing presence of pharmaceuticals in treated wastewaters calls for the development of new efficient methodologies for their mitigation/removal, but which are also low cost. The conventional wastewater treatment processes of WWTPs are not generally effective in removing pharmaceuticals. The removal of these compounds using activated carbon (AC), or by constructed wetlands systems (CWS) also present limitations, each by itself alone. This work had as the main goal the evaluation of sulfamethoxazole removal from the liquid phase, using a microcosm of CWS, followed by adsorption to three ACs. In the CWS, initially, sulfamethoxazole removal kinetics was very fast, as during the first half-hour both in the planted bed an in the unplanted one the removal was of 75.3% and 39.4%, respectively. Powdered AC presented a very fast kinetics and sulfamethoxazole removal capacity of 177 mg g^{-1}. The sequence of the two processes seems promising for the removal of sulfamethoxazole, in particular in spilling/emergency situations.

Palavras chave Constructed wetlands, Sulfamethoxazole, Commercial activated carbons, Vermiculite, Light expanded clay aggregates (LECA).

Abreviaturas

°C- graus Celsius

ANOVA - Análise variância

cdo – Comprimento de onda

CA - carvão ativado

CAG – carvão ativado granular

CAP – carvão ativado em pó

Ceq- concentração de equilíbrio

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

DQA – Diretiva Quadro da Água

ETARs – Estação tratamento de águas residuais

EU – União Europeia

HPLC – high-performance liquid chromatography

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

IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry

Kow – coeficiente de partição octanol-água

LCM – Leitos Construídos de Macrófitas

LDI – Limite de deteção instrumental

LECA – Light Expanded Clay Aggregates

LLE – Extração líquido líquido

LQI – Limite de quantificação instrumental

MBR - reatores de membranas

Max. - Máximo

Min. - Mínimo

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

pKa – Constante de ionização

RO – Osmose reversa

SMX - Sulfametoxazol

SNS – Sistema Nacional de Saúde

ZHA - Zonas húmidas artificiais

SPE – Solid-Phase Extraction: Extração em fase sólida

TMP - Trimetoprim

UV/Vis- ultravioleta visível

Índice Geral

1. Introdução 2

1.1. Enquadramento histórico do tratamento de águas residuais 2

1.2. Problemática dos fármacos: Ocorrência e impacto ambiental 3

1.3. Antibióticos no meio ambiente 6

1.4. Antibióticos em Portugal 7

1.5. Resistência a antibióticos 9

1.6. Sulfametoxazol 10

1.8. Processos avançados ou alternativos ao tratamento secundário 13

1.9. Uso da adsorção na remoção de poluentes 14

1.10. Adsorção em carvões ativados 15

1.10.1. Adsorção química versus adsorção física 15

1.10.2. Parâmetros que influenciam a remoção de poluentes da fase líquida 16

1.11. Carvões ativados 17

1.12. Leitos construídos de macrófitas como possível tecnologia de tratamento das águas contaminadas com fármacos 19

1.12.1. Função da matriz dos LCM na remoção dos fármacos 20

1.12.2. Vermiculite esfoliada 20

1.12.3. Agregados de Argila Expandida 21

1.12.4. Papel das plantas na remoção dos fármacos 21

1.12.5. *Typha* spp. 22

1.13. Métodos instrumentais de análise 22

1.13.1. Espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível 23

1.13.2. Cromatografia líquida de alta eficiência 24

1.13.3. Vantagens e Desvantagens do sistema de HPLC 25

1.13.4. Validação dos Métodos Analíticos 25

2. Metodologia Experimental 28

2.1. Reagentes e materiais 28

2.2. Metodologia analítica 31

2.3. Otimização das condições de quantificação dos fármacos em fase aquosa 32

2.3.1. Condições de quantificação dos fármacos por UV/VIS 32

2.3.2. Condições de quantificação dos fármacos por HPLC 32

2.4. Uso de carvões ativados na remoção do sulfametoxazol da fase líquida 35

2.4.1. Seleção dos carvões ativados 35

2.4.2. Estudo Cinético 35

2.4.3. Influência da temperatura na remoção do sulfametoxazol 36

2.4.4. Influência do pH do meio na remoção do sulfametoxazol 36
2.4.5. Isotérmicas de adsorção do sulfametoxazol pelos CA 36
2.5. Avaliação da capacidade de remoção dos fármacos em microcosmos de LCMs plantados com *Typha* spp. 37
2.5.1. Descrição dos microcosmos de LCMs 37
2.5.2. Condições de operação dos LCMs e recolha de amostras 39
2.5.3. Analise estatística dos resultados 39
3. Apresentação e Discussão dos Resultados 41
3.1 Otimização da metodologia analítica para a quantificação do sulfametoxazol 42
3.1.1. Espectrofotometria de Ultravioleta/Visível 42
3.1.2. Curvas de Calibração dos diferentes fármacos obtidas por espectrofotometria de UV/VIS 42
3.1.3. Estudo Cinético 45
3.1.4. Influência da temperatura na adsorção de sulfametoxazol 48
3.1.5. Influência do pH do meio na adsorção de sulfametoxazol 49
3.1.6. Isotérmicas 49
3.2. Quantificação do sulfametoxazol em solução aquosa por HPLC 51
3.3. Validação do método analítico 53
3.4. Otimização do volume a filtrar 53
3.5. Avaliação da capacidade de remoção do fármaco em microcosmos de LCMs plantados com *Typha* spp. 54
3.6. Remoção dos fármacos pelos microcosmos de LCMs 57
4. Conclusões e Perspetivas Futuras 63
5. Referências Bibliográfica 65

Índice de Figuras

Figura 1. 1 – Rotas dos fármacos no meio ambiente, adaptado de Mompelat et al., 2009 4
Figura 1. 2 - Locais de amostragem no estuário do rio Douro (Madureira et al., 2010)..... 8
Figura 1. 3 – Esquemas das etapas do tratamento convencional de uma ETAR 12
Figura 1. 4 - Representação esquemática da estrutura porosa de um carvão ativado, parcialmente adaptado (Moura, 2004)..... 17
Figura 1. 5 - Componentes de um sistema de cromatografia líquida de alta resolução, retirado de (Skoog et al., 2009)..... 24

Figura 2. 1- LECA ……..29
Figura 2. 2 - Vermiculite esfoliada 29
Figura 2. 3 - Carvão ativado da Panreac, sobre a forma de pó fino..... 31
Figura 2. 4 - Carvão ativado sobre a forma de grânulos da Norit..... 31
Figura 2. 5 - Preparação das suspensões de CAs nas soluções contendo o sulfametoxazol 37
Figura 2. 6 - Representação esquemática dos ensaios realizados durante a experiência 38

Figura 3. 1 - Espectro de absorção molecular obtido por UV-Vis para o trimetoprim, furosemida, diclofenac e sulfametoxazol..... 42
Figura 3. 2 - Retas de calibração do trimetoprim, obtidas por espetrofotometria de UV-VIS, a 204 e 271 nm. 43
Figura 3. 3 - Reta de calibração do diclofenac, obtida por espectrofotometria de UV-VIS, a 275 nm. 44
Figura 3. 4 - Reta de calibração da furosemida, obtida por espetrofotometria de UV-VIS, a 278 nm. 44
Figura 3. 5 - Retas de calibração do sulfametoxazol, obtidas por espetrofotometria de UV-VIS, em meios com diferentes valores de pH. 45
Figura 3. 6 - Percentagem de remoção do sulfametoxazol em função do tempo de contacto, com o CA da Panreac e os dois CA da Norit..... 46
Figura 3. 7 - Percentagem de remoção da furosemida em função do tempo de contacto, em 3 carvões ativados. 46
Figura 3. 8 - Percentagem de remoção do diclofenac em função do tempo de contacto, em 3 carvões ativados. 47
Figura 3. 9 - Percentagem de remoção dos três fármacos no CA da Panreac, em função do tempo de contacto. 48
Figura 3. 10 - Influência da temperatura na remoção do sulfametoxazol nos diferentes CAs 49
Figura 3. 11 - Isotérmicas de adsorção do sulfametoxazol, obtidas nos três carvões ativados, a 25ºC. 50
Figura 3. 12 - Isotérmicas de adsorção do sulfametoxazol, diclofenac e furosemida, obtidas no Norit 1240 W, a 25ºC. 51

Índice de Tabelas

Tabela 1. 1 - Presença de fármacos em amostras ambientais 5
Tabela 1. 2 - Principais características físico-químicas do sulfametoxazol..... 10
Tabela 1. 3 - Concentração típica do sulfametoxazol em afluentes e efluentes e eficiências de remoção em estações de tratamento de águas residuais..... 11
Tabela 1. 4 - Valores de eficiências de remoção do sulfametoxazol com diferentes processos de tratamento avançados (EPA, 2010) 13

Tabela 2. 1 - Principais caraterísticas e fornecedores dos reagentes utilizados 28
Tabela 2. 2 - Características e fabricantes dos materiais utilizados..... 28
Tabela 2. 3 - Características físico-químicas da LECA, da vermiculite e da mistura dos dois materiais..... 30
Tabela 2. 4 - Principais características texturais e químicas dos carvões ativados..... 30

I Introdução

1.Introdução

1.1. Enquadramento histórico do tratamento de águas residuais

Em dezembro de 2000, entrou e vigor a Directiva Quadro da Água (DQA) ou a Directiva 200/60/CE, que se centralizou na proteção do meio ambiente, alterando o paradigma da politica de gestão da água em vigor, sendo agora realçado e explicitado da seguinte forma "a água não é um produto comercial como outro qualquer, mas um património que deve ser protegido, defendido e tratado como tal" (Diretiva 200/60/CE, 2000).

O objetivo da DQA é definir um quadro de proteção das águas de superfície interiores, das águas costeiras, das águas de transição e também das águas subterrâneas, numa perspetiva de proteção comunitária (Diretiva 200/60/CE, 2000).

Os parâmetros de qualidade da água devem ser delineados, de acordo com os diferentes usos a que se destinam, tipos de recolha, tratamento a que são submetidos e pontos de descarga dos efluentes no meio aquático, sendo que os mesmos estão regulados em vários decretos-lei, diplomas ou portarias. Entre estes salienta-se o Decreto-Lei nº152/97, de 19 de junho, que transpõe a Diretiva 91/270/CEE do Conselho, de 21 de maio de 1991, e que engloba a recolha, o tratamento e a descarga das águas residuais urbanas no meio aquático, e o Decreto-Lei nº236/98, de 1 de agosto, que estabelece os critérios e os objetivos de qualidade, tendo como finalidade proteger o meio aquático, tendo em conta os usos a que são destinadas, transpondo de uma maneira geral as várias diretivas em vigor.

O objetivo do tratamento das águas residuais é a remoção da sua carga poluente, que inclui a redução da cor, de compostos inorgânicos, dos sólidos suspensos, de matéria orgânica e nutrientes, sendo este realizado com recurso a diferentes processos físicos, químicos e biológicos. O objetivo último é a obtenção de um efluente de qualidade adequada aos fins a que se destinam e onde as normas de descarga impostas pela legislação em vigor sejam cumpridas.

1.2. Problemática dos fármacos: Ocorrência e impacto ambiental

É de conhecimento geral que, a esperança média de vida do Homem tem aumentado nas últimas décadas. O aumento da qualidade de vida e da saúde está diretamente relacionado com o aumento do consumo de fármacos a nível mundial, sendo que os mesmos são cada vez mais eficazes no combate a muitas doenças, tornando-se mesmo imprescindíveis na prevenção ou tratamento de algumas doenças e em vários procedimentos hospitalares.

Como resultado do aumento dos cuidados de saúde, mas também dos cuidados pessoais, uma diversidade de compostos orgânicos tem sido identificada nos diferentes recursos hídricos. Em particular, os produtos de uso farmacêutico têm merecido especial destaque devido ao impacto negativo que a exposição continuada provoca, em diferentes ecossistemas, mas com destaque para a saúde humana e animal (Fent et al., 2006). Refira-se que, o uso continuado e indiscriminado de produtos farmacêuticos assim como o desenvolvimento de novas técnicas avançadas de separação, identificação e quantificação analítica levaram a que estes fossem detetados em águas residuais, superficiais e até em águas potáveis, sendo por isso considerados como micropoluentes prioritários nos compartimentos aquáticos (Santos et al. 2013).

Os compostos farmacêuticos são produzidos por forma a garantirem e preservarem as suas propriedades químicas, conservando a sua eficiência face ao fim terapêutico a que se destinam. Depois de consumidos, os mesmos estão sujeitos a diferentes processos metabólicos no organismo, no entanto, é referido na literatura que, entre 50% a 90%, de um fármaco pode ser expelido, pelo ser humano, na sua forma inalterada ou ainda numa forma combinada com outros compostos polares que poderão ativar ou inativar o fármaco (Jelic et al., 2012).

Os fármacos chegam continuamente ao meio ambiente, sob a forma inalterada ou na forma de misturas complexas com os respetivos metabolitos. Estes surgem devido à excreção por via urinária ou através das fezes humanas e animais, ao despejo de medicamentos fora de validade em descargas de águas não tratadas, nas estações de tratamento de águas residuais, domésticas, hospitalares e de indústrias farmacêuticas.

Existem vários estudos de investigação que demonstram que no meio ambiente ainda estão presentes muitos compostos farmacêuticos, que provém essencialmente dos esgotos domésticos, e cujas rotas de contaminação se encontram resumidas na conforme figura 1.1, que não foram removidos das ETARs, e que constituem uma ameaça potencial aos organismos aquáticos e à saúde pública (Kümmerer et al., 2009, Pal et al., 2010 e Pal et al., 2013). Um dos problemas adjacentes à contaminação do meio ambiente, provenientes da difusão dos fármacos ou mais concretamente dos antibióticos, relacionam-se com o desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos.

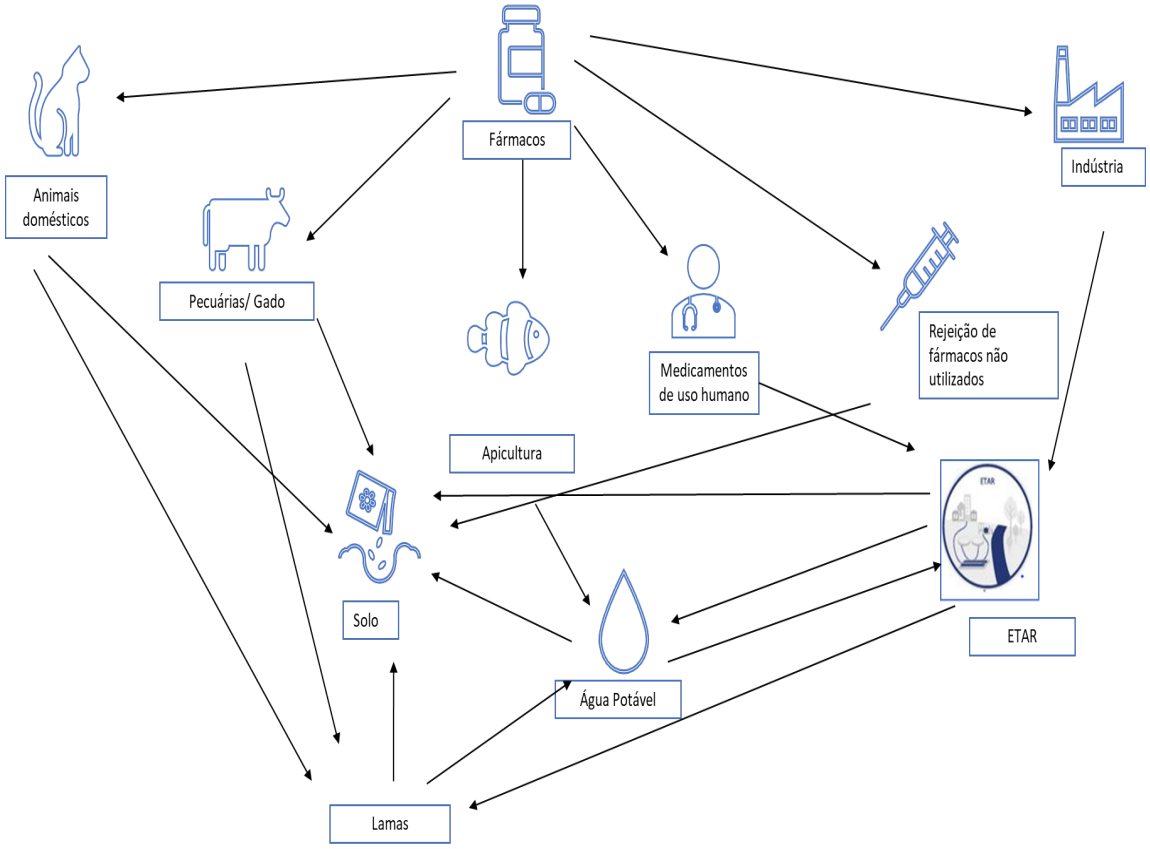


Figura 1. 1 – Rotas dos fármacos no meio ambiente, adaptado de Mompelat et al., 2009

Nos últimos anos, e em especial com a aplicação de técnicas mais avançadas na quantificação analítica (que vai desde a etapa da preparação das amostras, à análise laboratorial com recurso à espectrofotometria de ultravioleta visível, cromatografia de alta eficiência, cromatografia em fase gasosa, etc.), têm sido identificados e detetados, fármacos com limites de deteção na ordem dos ng L^{-1} (Jelic et al., 2012). Apesar das baixas concentrações detetadas, os medicamentos podem ser prejudiciais para os vários sistemas aquáticos, devido aos efeitos acumulativos e sinergéticos, provocados por uma exposição continuada aos mesmos (Dordio e Carvalho, 2013).

A contaminação do meio ambiente com produtos farmacêuticos e os seus metabolitos pode ocorrer por fontes antropogénicas pontuais e/ou difusas. As primeiras referem-se a apenas uma fonte identificável, que provem de locais isolados, como por exemplo, lixiviados dos aterros sanitários, emissários de efluentes domésticos, hospitalares e industriais, sendo as águas superficiais e subterrâneas os principais recetores (Jury et al., 2010). As fontes difusas surgem em extensas áreas e de uma forma mais discreta, devido às baixas concentrações apresentadas têm um menor impacto nos meios recetores. As fontes difusas estão frequentemente associadas à aplicação nas áreas agrícolas de dejetos de animais provenientes da exploração pecuária, a derrames clandestinos de efluentes domésticos e ainda à eliminação de forma incorreta de medicamentos fora da validade (Jelic et al., 2012).

Vários estudos, tem revelado a presença de resíduos de fármacos em diferentes ambientes aquáticos. Na Tabela 1.1 estão apresentadas as concentrações médias de alguns fármacos que foram encontrados no meio ambiente, em vários países, quer em amostras de água para consumo humano, águas residuais ou mesmo águas naturais.

Tabela 1. 1 - Presença de fármacos em amostras ambientais

Composto	Água superficial	Água subterrânea	Água potável	Efluentes de ETARs	Referências
Analgésicos e anti-inflamatórios (ng L^{-1})					
Ibuprofeno	-	3110	-	-	(Barnes *et al.,* 2008)
	ND-4.5[c]	-	ND-0.6[c]	17.7-219[c]	(Togola e Budzinski, 2008)
	-	-	-	119 (300) [b]	(Lin e Tsai, 2009)
	-	-	-	653[a]	(Rosal *et al.,* 2010)
	-	-	-	<ALQ - 369	(Santos *et al.,* 2013)
Diclofenac	-	61	-		(Lin *et al.,* 2008)
	1.36-33.2c	-	ND-2,5[c]	210.7-486.4[c]	(Togola e Budzinski, 2008)
	-	-	-	6-431[c]	(Rosal *et al.,* 2010)
	-	-	-	24.6-83.1	(Santos *et al.,* 2013)
Beta-bloqueadores					
Atenolol	-	-	-	40-440	(Vieno *et al.,* 2006)
	-	-	-	517-2438[c]	(Rosal *et al.,* 2010)
	-	-	-	411-782	(Santos *et al.,* 2013)
Antibióticos					
Sulfametoxazol		410a			(Sacher *et al.,* 2001)
	-	-	-	1.48	(Castiglioni *et al.,* 2005)
	10a	-	-	70	(Bendz *et al.,* 2005)
	-	-	226	-	(Lin *et al.,* 2008)
	-	-	-	1335 (7350)[b]	(Lin e Tsai, 2009)
	-	-	-	104-370[c]	(Rosal *et al.,* 2010)
	-	-	-	20-162[c]	(Ratola *et al.,* 2012)
	-	-	-	340-1676	(Santos *et al.,* 2013)
Ofloxacina	-	-	-	14(30)[b]	(Vieno *et al.,* 2006)
	-	-	123	-	(Lin *et al.,* 2008)
	-	-	-	1651[a]	(Rosal *et al.,* 2010)
	-	-	-	110-366	(Santos *et al.,* 2013)

ND- Não detetado. a – Máximo. b- Média(máximo). c- Mínimo-Máximo. ALQ – Abaixo do limite de quantificação.

As estações de tratamento de águas residuais (ETARs), são a principal fonte de entrada de fármacos no ambiente aquático. Independentemente da zona geográfica, as águas residuais urbanas contêm resíduos de fármacos, sendo diferentes no tipo do fármaco, na quantidade e na abundância. Os fármacos que são libertados no ambiente estão sujeitos a uma sucessão de processos físicos, químicos e biológicos que podem incluir a sorção, hidrólise, biotransformação, biodegradação, reações redox, fotodegradação, volatilização e precipitação/dissolução (Monteil et al., 2018). Os processos que prevalecem dependem das propriedades físico-químicas do medicamento, da sua concentração e também das características do ambiente, ou mais concretamente dos ecossistemas aquáticos (Monteil et al., 2018).

As principais propriedades dos fármacos potencialmente capazes de afetar o seu comportamento no ambiente são: a estrutura molecular, polaridade, constante de dissociação (K_a), solubilidade em água, coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), coeficiente de sorção sólido-água (k_d) e persistência (Miranda, 2014).

A presença de fármacos no ambiente, quer seja em águas superficiais, subterrâneas ou na água potável é um problema crescente ao qual se tem dado cada vez mais atenção, embora a presença destes seja relativamente baixa. Um dos motivos, pelo qual estes fármacos são detetados no ambiente, deve-se ao facto de serem estáveis nas águas e por isso difíceis de remover por parte das ETARs. Entre os antibióticos que pertencem a esta categoria de fármacos de difícil biodegradação estão o sulfametoxazol, a ofloxacina e a ciprofloxacina (Miranda, 2014 e Silva, 2012).

1.3. Antibióticos no meio ambiente

Os antibióticos são substâncias naturais, químicas ou sintéticas que apresentam atividade antibacteriana, antiparasitária e antifúngica, ou seja, que inibem o crescimento de bactérias e de outros microrganismos (Danner et al., 2019). O equilíbrio natural, que se verificava entre bactérias totalmente suscetíveis e resistentes tem sofrido alterações nos últimos 70 anos, devido à utilização massiva de antibióticos e outras substâncias com atividade antimicrobiana.

De acordo com alguns autores, e segundo os dados do INFARMED, em Portugal também foram detetados muitos dos fármacos detetados noutras partes do mundo, tendo em conta esta analogia, é de esperar que o antibiótico em estudo também esteja presente em amostras ambientais em Portugal, no entanto, os estudos de monotorização de antibióticos em território nacional são relativamente escassos (Miranda, 2014 e Thiebault, 2020).

Os antibióticos podem ser classificados consoante a sua estrutura química ou com base no seu mecanismo de ação. Com base na estrutura química, estes podem ser classificados em macrólidos, quinolonas, beta-lactâmicos, sulfonamidas, tetraciclinas, entre outros. Dentro de cada classe, os mesmos apresentam pequenas diferenças, que são responsáveis pela diferenciação de algumas propriedades como a polaridade e a solubilidade (Kümmerer, 2009).

O Centro Europeu de Controlo e Prevenção de Doenças (ECDC) é uma fonte de informação sobre o consumo de antibióticos na Europa, com relevo para a utilização na medicina humana, onde o consumo é expresso em doses diárias definidas (DDD). De acordo com alguns estudos que foram realizados, entre 2004 e 2008, o consumo de antibióticos tem vindo a aumentar gradualmente, no entanto, entre 2008 e 2013 verificaram pequenas inversões em algumas tendências de consumo (Carvalho e Santos, 2016). Sendo mesmo apontado um decréscimo de 4% no consumo de antibióticos em Portugal, entre outubro de 2015 e setembro de 2016 (Comissão de Farmácia e Terapêutica, 2016).

1.4. Antibióticos em Portugal

O estudo efetuado por Madureira et al. em 2010, ao longo do rio Douro, cujos pontos de amostragem estão indicados na figura 1.2, teve como objetivo principal averiguar a presença de compostos farmacêuticos no seu estuário. Procurando englobar classes de fármacos com diferentes propriedades físico-químicas, assim como comportamentos diferenciados e permanência no ambiente, os autores investigaram os seguintes fármacos: trimetoprim (TMP), propranolol, sulfametoxazol (SMX), carbamazepina, diazepam e o fenofibricacido, que é o metabolito ativo do fenofibrato. Foi referida uma predominância da presença destes fármacos, na parte inferior do rio, ou seja, mais perto da foz. A explicação para esta prevalência foi atribuída à localização das ETARs de Sobreiras e Freixo (as ETARs maiores), que descarregavam os seus efluentes, contendo uma significativa quantidade de fármacos nos cursos de águas superficiais.

As concentrações de sulfametoxazol identificadas em vários pontos, eram próximas de 15 ng L^{-1} em seis locais, mais próximo dos 20 ng L^{-1} em 11 locais e em três locais foram identificadas concentrações próximo 30 ng L^{-1} (Madureira et al., 2010). O sulfametoxazol e trimetoprim são normalmente comercializados e utilizados em associação um com o outro (razão de 5:1), e na realidade, estes foram detetados com frequência nos mesmos locais de amostragem avaliados (33% - SMX e 34% - TMP). É de referir, que as concentrações encontradas foram relativamente diferentes, para o TMP a mesmas variaram entre 3,89 ng L^{-1} a 15,7 ng L^{-1}, enquanto que para o SMX as mesmas eram superiores e variaram entre 9.14 ng L^{-1} e 38.5 ng L^{-1}.

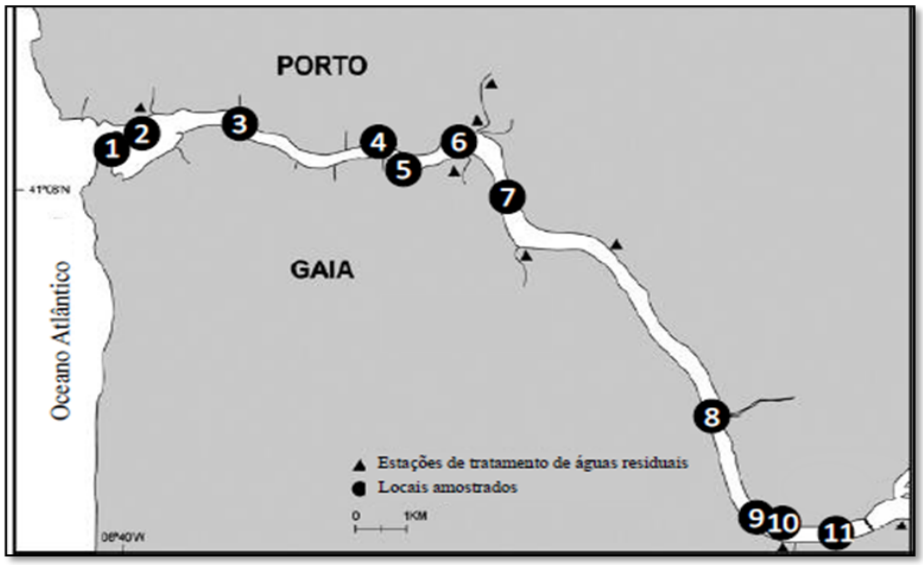


Figura 1. 2 - Locais de amostragem no estuário do rio Douro (Madureira et al., 2010)

Nos trabalhos de Madureira et al, 2010, e comparativamente aos valores obtidos noutros países, as concentrações identificadas foram mais baixas. Os autores atribuíram esta diferença a uma menor taxa de consumo do antibiótico SMX na medicina humana e veterinária em Portugal, ou a um melhor desempenho das ETARS (Madureira et al., 2010).

Numa compilação de resultados, apresentada por Miranda em 2014, o sulfametoxazol foi identificado em amostras de águas superficiais, cujas concentrações variaram entre 10 e 480 ng L^{-1}, nas águas subterrâneas com cerca de 410 ng L^{-1} e por fim em águas para consumo cujas concentrações podiam atingir os 226 ng L^{-1} (Miranda, 2014). Estes resultados põem a claro as limitações dos tratamentos normalmente utilizados nas ETARs e que apresentam deficiências na remoção destes fármacos, sendo assim necessário pensar em alternativas viáveis.

Um estudo recente, realizado em Portugal, sobre a monitorização deste fármaco em águas residuais, foram detetados em Coimbra, nos afluentes das ETARs numa recolha de 7 amostras, uma concentração de sulfametoxazol que foi até aos 0.912 µg L^{-1}. A origem deste fármaco foi atribuída às águas residuais dos hospitais da cidade e da região, o que levou a uma avaliação das características dos efluentes destes hospitais. Os resultados de 4 estudos, em que 2 foram realizados às águas residuais do hospital, de forma geral, e os outros 2 foram realizados nos efluentes da especialidade da pediatria, sendo recolhidas 9 amostras em cada local, mostraram uma diferença significativa nas concentrações de sulfametoxazol presentes nos dois pontos de recolha. As águas residuais do hospital apresentam concentrações de sulfametoxazol que variam de 1.897 a 3.015 µg L^{-1}, no entanto, as águas residuais provenientes da unidade pediátrica apresentaram concentrações muito inferiores variando entre 0.090 e 0.401 µg L^{-1} (Thiebault, 2020).

1.5. Resistência dos organismos aos antibióticos

O desenvolvimento de resistência, de uma grande variedade de organismos a vários tipos de antibióticos, está a tornar-se um problema emergente para a medicina. Sendo os efluentes das várias unidades hospitalares, enviados diretamente para as ETARs, estas tornam-se locais prediletos ao desenvolvimento e propagação de bactérias resistentes a antibióticos. Estas populações incluem dois tipos de organismos, os intrinsecamente resistentes e as bactérias que tem determinantes genéticos capazes de aumentar essa resistência (Jury et al., 2010).

Os tanques de tratamento de águas residuais são locais de eleição para a multiplicação e proliferação da resistência a antibióticos pelas bactérias, devido à presença de elevadas doses de bactérias fecais e à presença de antibióticos em concentrações subletais (Jury et al., 2010).

Uma das formas de redução das bactérias, tais como os coliformes e enterecocos presentes nas águas residuais, é através do tratamento biológico (Novo e Manaia, 2010). Contrariamente ao esperado, em algumas ETARs, é possível registar um acréscimo da percentagem relativa de bactérias resistentes a antibióticos, após o tratamento (Jury et al., 2010).

Estudos reportaram que, o tratamento por lamas ativadas não é eficaz, ou é menos eficiente na eliminação, em particular, de *E. faecium* resistentes a ciprofloxacina, e de *enterecocos* resistentes à amoxicilina ($p < 0{,}001$) (Ferreira da Silva et al., 2006). Refira-se também que o efeito do prevalecimento de bactérias resistentes a antibióticos, após o tratamento do efluente varia consoante o método de tratamento utilizado, o tempo de retenção hidráulica, o antibiótico em causa e o tipo de bactérias em estudo (Novo e Manaia, 2010).

A presença de antibióticos em reduzidas concentrações (tetraciclinas, ciprofloxacina, e β-lactâmicos) pode induzir uma proliferação seletiva de bactérias resistentes. Mas a presença de metais pesados (cobre, arsénio), desinfetantes e alguns produtos de uso pessoal também desempenham um papel de relevo no desenvolvimento e disseminação da resistência bacteriana (Knapp et al., 2011, Jury et al., 2010, Baker-Austin et al., 2006).

A utilização de antibióticos a nível mundial tem sofrido um acréscimo significativo, tendo sido estimado um consumo anual que pode variar entre 100.000 a 200.000, sendo estes dados retirados de "Centers for disease control and prevention", em anos anteriores a 2010 (Dias, 2010). Estão referenciados centenas de antibióticos, alguns dos quais são utilizados apenas em internamento hospitalar, sendo normalmente classificados em grandes grupos, de acordo com a sua estrutura química predominante, teremos então:

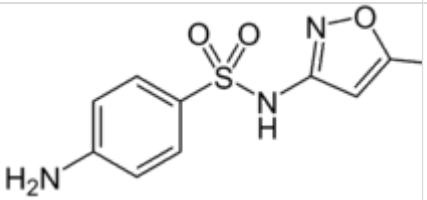
- penicilinas, inibidores de beta-lactamase, cefalosporinas
- monobactâmicos
- carbapenemes
- glicopeptídeos

- macrólidos e lincosaminas (azitromicina, eritromicina)
- tetraciclinas (tetraciclina, doxiciclina)
- quinolonas e fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina),
- aminoglicosídeos
- sulfonamidas (Sulfametoxazol, sulfadimidiazina)
- Outros antibacterianos (cloranfenicol, rifamicinas, linezolide, fosfomicina) (INSA, 2010).

1.6. Sulfametoxazol

No decorrer deste trabalho será dado maior relevo ao sulfametoxazol, pois este é um composto sensível à radiação ultravioleta, polar e cujas principais propriedades físico-químicas estão incluídas na tabela 1.2.

Tabela 1. 2 - Principais características físico-químicas do sulfametoxazol

Nome comum	**Sulfametoxazol**	**Referencias**
Nome IUPAC	4-amino-N-(5-metilisoxazol-3-isoxazolil) benzenossulfonamida	
Forma molecular e estrutura		
Classe	Antibiótico	
Massa molecular (g/mol)	253,28	
pKa	1.6 –5.7	Pal *et al.,* 2010 Behera et al., 2011
Formula Química	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	
Solubilidade em água (mg L^{-1})	610[c]	Ziylan e Ince, 2011
Log Kow	0.89	Pal et al., 2010
Coeficiente de partição do solo Koc	2.06-3.47	Pal *et al.,* 2010
cdo de absorvância max (nm)	268	Knapp et al., 2011
Tempo de meia vida (Horas)	10	DrugBank, 2019

O sulfametoxazol é um antibiótico sintético, extremamente consumido em todo o mundo, conforme demostrado em vários estudos, tendo sido confirmada a sua presença na ordem das dezenas ou centenas de μg L^{-1}, no ambiente e em concentrações que variaram de 14.8 e 297.0 ng L^{-1} em águas superficiais (Richard et al., 2013). O mesmo pertence ao grupo das sulfanamidas, que tem a capacidade de interferir na síntese de ácido fólico em bactérias suscetíveis. Este está muitas vezes associado ao trimetoptrim (mais conhecido como Bactrim®), sendo utilizado no tratamento de infeções urinárias, respiratórias e gastrointestinais, tendo um tempo de meia vida de 10 horas (DrugBank, 2019). É também utilizado na veterinária, mais concretamente na aquacultura, para estimular o crescimento de algumas espécies. O sulfametoxazol e o trimetoprim trabalham sinergeticamente para bloquear dois passos consecutivos na biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas essenciais ao crescimento e à divisão das bactérias.

1.7. Processos de remoção de fármacos nas ETARs convencionais

As águas residuais contêm muitos compostos, incluindo nutrientes, metais pesados e poluentes orgânicos e inorgânicos, que resultam do uso doméstico, agrícola ou industrial, que lhes conferem propriedades que podem ser prejudiciais para o meio ambiente. O tratamento escolhido visa reduzir os impactos negativos da descarga do efluente no meio ambiente (Gomes, 2011 e Oliveira, 2012).

As taxas de remoção dos fármacos em ETARs convencionais são influenciadas pela composição das águas residuais, condições climatéricas, condições de operação do processo e pelo método de tratamento utilizado (Gracia-Lor et al., 2012). Na tabela 3 apresentam-se alguns dados referentes às concentrações de sulfametoxazol que foram registadas em águas residuais e nos efluentes tratados assim como as suas percentagens de remoção em ETARs convencionais. Os dados refletem a desadequação das ETARs convencionais face ao tratamento de águas contaminadas por fármacos e em particular contaminadas com sulfametoxazol.

Tabela 1. 3 - Concentração típica do sulfametoxazol em afluentes e efluentes e eficiências de remoção em estações de tratamento de águas residuais

Composto	Concentração Afluente (ng L^{-1})	Concentração Efluente (ng L^{-1})	Eficiência Remoção (%)	Referência
Sulfametoxazol	162-530	104-370	17.3	(Rosal *et al.*, 2010)
	79-216	20-162	51.9	(Ratola *et al.*, 2012)

Nas ETARs, o tratamento de águas residuais pode ser efetuado com recurso a uma sequência de operações e processos de natureza física, química e biológica, que estão incluídos nos diferentes níveis de tratamento, nomeadamente no tratamento preliminar, primário, secundário, terciário, como ilustrado no esquema da figura 1.3.

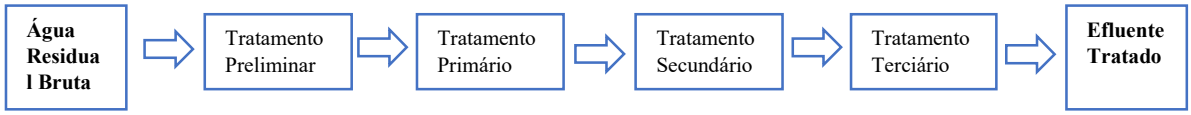


Figura 1. 3 – Esquemas das etapas do tratamento convencional de uma ETAR

Na primeira etapa de tratamento estão incluídas as operações de gradagem, o desarenamento e a remoção de gorduras, tendo como finalidade subsequente a proteção dos sistemas mecânicos das ETARs, evitando interferências operacionais provocadas por objetos arrastados pelas águas residuais (Gomes, 2011). O tratamento primário inclui normalmente um decantador, onde são removidos os sólidos suspensos orgânicos e inorgânicos mais densos e os materiais que flutuam são retirados à superfície, com recurso a escumadeiras ou raspadores. A decantação primária pode remover em média entre 50-70% dos sólidos suspensos sedimentáveis (Gomes, 2011). A baixa atividade microbiológica faz com que a eliminação de micropoluentes orgânicos e de fármacos nestas duas etapas, seja relativamente reduzida, e que seja principalmente devida à adsorção destes poluentes às partículas de sólidos suspensos, que são removidas nos sedimentadores.

Existem vários processos que podem fazer parte de um tratamento secundário de águas residuais, alguns são predominantemente biológicos, entre os quais os filtros percoladores, os sistemas de lamas ativadas e as lagoas de oxidação. As lamas ativadas são o processo de biomassa suspenso mais utilizado, onde ocorre a mistura por agitação e arejamento da água residual com a biomassa (microrganismos), originando uma lama biológica, que é posteriormente, separada da fase líquida no decantador secundário. Após a decantação, o excesso de lamas é removido para posterior tratamento da fase sólida (Gomes, 2011). No tratamento secundário regista-se frequentemente uma capacidade limitada de remoção de muitos fármacos presentes na água, nomeadamente os mais difíceis de biodegradar (Garcia-Lor et al., 2012).

Por último, o tratamento terciário pode ser considerado como uma etapa adicional, onde se houver necessidade de remoção ou inativação de organismos patogénicos, por questões de saúde pública, a desinfeção poderá ser efetuada, com recurso por exemplo, à cloragem, ozonização ou por radiação ultravioleta (Gomes, 2011).

Os tratamentos realizados nas ETARs resultam na remoção de quantidades significativas de matéria orgânica, nutrientes e de outros poluentes, como por exemplo, os metais (Gagnon et al., 2014). Os produtos farmacêuticos e em particular os antibióticos foram identificados como poluentes emergentes, fazendo perceber que a remoção dos mesmos é ineficiente nas ETARs que utilizam apenas os tratamentos tradicionais nos respetivos processos de tratamento. Na literatura são propostas algumas formas de remoção destes poluentes, tais como a oxidação avançada, fotodegradação e adsorção, processos esses que serão descritos no ponto seguinte (Melo et al., 2009).

1.8. Processos avançados ou alternativos ao tratamento secundário

A oxidação química (inclui a ozonação e oxidação catalítica), a radiação ultravioleta, a filtração por membranas, os reatores de membranas e a adsorção em diferentes adsorventes, com destaque para o uso do carvão ativado, entre outros, são os tratamentos mais estudados na remoção de fármacos das águas residuais (Verlicchi et al., 2012).

Em Portugal estes métodos de tratamento são pouco utilizados devido aos elevados custos, no entanto, é obrigatório quando a descarga de águas residuais ocorre em zonas sensíveis, definidas pelo Decreto-Lei n.º 152/97, 19 de junho, alterado pelo Decreto-Lei n.º 172/2001, 26 de maio e revisto posteriormente pelo Decreto-Lei n.º 149/2004.

Na tabela 1.4 estão apresentados alguns dos processos de tratamento avançados mais utilizados em ETARs e as respetivas eficiências de remoção do sulfametoxazol. Os processos mais comuns nas ETARs são a desinfeção, com recurso à oxidação por via química, com recurso ao cloro, ozono ou por UV. Em alguns países, estes processos já são obrigatórios por lei no tratamento de águas para consumo e mesmo em águas residuais.

Tabela 1. 4 - Valores de eficiências de remoção do sulfametoxazol com diferentes processos de tratamento avançados (EPA, 2010)

Eficiência de remoção (%)					**nº de sistemas usados no cálculo da % de remoção**
	Tecnologia	**Min.**	**Max.**	**Média**	
Sulfametoxazol	Desinfeção com cloro	47	98	73	2
	Ozonização	-	-	96	1
	Desinfeção UV	-	-	33	1

1.9. Uso da adsorção na remoção de poluentes

Como uma parte relevante do trabalho incide nos fenómenos de adsorção, serão então descritos alguns dos adsorventes mais utilizados para esse fim. Um adsorvente é um material, normalmente, de natureza porosa e com uma elevada área superficial que pode adsorver substâncias na sua superfície externa ou no interior da sua porosidade. Existem diversos tipos de adsorventes que são utilizados em estudos de remediação ambiental, entre os quais se destacam, a bentonite, o carvão ativado granulado (Granulated Activated Carbon - GAC), os biochars (Ahmed et al., 2015), os excedentários florestais e agrícolas.

A bentonite, que é uma argila mineral, apresenta uma elevada área superficial e um elevado volume de poros, sendo por isso frequentemente utilizada em processos de adsorção. A bentonite pode ser utilizada como adsorvente de antibióticos no tratamento de águas para consumo ou residuais, mas, os estudos de remoção de antibióticos de efluentes líquidos usando a bentonite são relativamente poucos. Na literatura, a bentonite foi utilizada num sistema em tanques (descontinuo) na remoção de ciprofloxacina, a partir de uma solução aquosa, onde foi possível atingir uma eficácia de remoção de 99%. No mesmo estudo, é ainda referido, que o uso de carvões ativados (CA) em diferentes condições experimentais, permitiu alcançar níveis de remoção superiores aos alcançados com a bentonite. Ou seja, em amostras reais de águas residuais, a remoção da amoxicilina com a bentonite foi de 88%, enquanto que, com o CA foi possível atingir os 95%. A remoção foi sempre inferior a 100%, devido à presença de fenómenos de competição de adsorção de outras substâncias presentes na água (Ahmed et al., 2015).

Os CA são referidos como apresentando capacidades de remoção excecionais face a uma diversidade de poluentes, quer estejam presentes na fase gasosa ou na fase líquida. No entanto, o preço é referido frequentemente como sendo um fator limitante à sua utilização massiva. Na literatura é referida a necessidade de encontrar alternativas aos CA presentes no mercado, mas que sejam suficientemente eficazes na remoção destes antibióticos. Os biochar (BC) são carvões vegetais obtidos por pirólise e estes apresentam-se como uma possível alternativa aos CA. Uma grande vantagem dos BCs é o facto de existir bastante matéria prima, obtida a partir da biomassa agrícola, entre outros resíduos sólidos, que estão disponíveis a baixo custo (Ahmed et al., 2015).

Num estudo da remoção do sulfametoxazol e da sulfapiridina, com recurso a BC, foi referido que o carvão vegetal, obtido a partir do pinheiro apresenta maior capacidade de remoção de fármacos face aos carvões vegetais já estudados. Também foi referido, que esta diferença de desempenho (próximo de 100%) pode dever-se ao facto destes carvões serem submetidos a diferentes condições termoquímicas durante a sua preparação e à classe de antibiótico em estudo (Ahmed et al., 2015).

1.10. Adsorção em carvões ativados

O carvão ativado exibe excelentes propriedades que permitem que seja utilizado na clarificação, purificação de líquidos e tratamento de efluentes provenientes das várias fileiras industriais, assente principalmente na sua capacidade de adsorção elevada. Para além da adsorção, o carvão ativado tem outras aplicações, tais como em suportes de catalisadores, na medicina, em filtros de ar e armazenamento de gás (Cansado et. al, 2018). Estima-se que a procura mundial de CA continue a aumentar, e a China e os Estados Unidos da América são os países que mais contribuem para este aumento da procura e do respetivo preço (Maneerung, 2016).

A adsorção em carvões ativados é uma das formas mais utilizadas para remover contaminantes orgânicos de águas residuais numa escala industrial. Os CA são materiais com uma elevada percentagem de carbono, que apresentam propriedades excecionais por exibiram uma área superficial aparente e uma porosidade muito desenvolvida (Cansado et al., 2018).

As grandes desvantagens associadas à utilização dos CA prendem-se com o custo de produção e de regeneração dos mesmos, relativamente elevado. De um modo geral, um bom adsorvente deve possuir algumas características, como o baixo custo, seletividade face ao poluente em causa, elevada área superficial interna, boa resistência mecânica e oferecer ainda a possibilidade de regeneração e reutilização.

A eficiência da adsorção em CA está diretamente relacionada com a elevada área superficial dos CA, com o volume poroso e com o tamanho dos poros e por outro lado, com as características dos poluentes em estudo, tais como, a funcionalidade, o tamanho da molécula, o pKa, a acidez e a solubilidade em água (Thiebault, 2020). Em estudos mais recentes, os CA apresentaram uma eficiência na remoção de vários fármacos, de águas residuais, que variou entre os 74% e o 100%. No caso concreto da remoção de sulfametoxazol, das águas residuais por CA, foi apresentada uma percentagem de remoção de 100%, em apenas 3 minutos (Ahmed et al., 2015).

1.10.1. Adsorção química versus adsorção física

Durante a adsorção química estabelecem-se ligações semelhantes às ligações covalentes, com transferência de eletrões entre o material adsorvente e o poluente em questão, que depois de adsorvido passa a ser designado por adsorvato. Na adsorção física as forças são predominantemente do tipo de Van der Waals, sendo ligações mais fracas do que as que ocorrem na adsorção química. Mas é este tipo de interações que ocorre na maior parte dos fenómenos de adsorção que têm lugar por exemplo nos processos de purificação, descoloração e tratamento de efluentes líquidos, o que permite uma fácil desadsorção do poluente e a regeneração dos materiais adsorventes (Belo et al., 2017, Cansado, 2003 e Cansado et al., 2018).

1.10.2. Parâmetros que influenciam a remoção de poluentes da fase líquida

A capacidade máxima de adsorção de um CA face a vários poluentes na fase líquida pode ser influenciada por diversos parâmetros, tais como: a natureza física e química do adsorvente (estrutura porosa, teor de cinzas, grupos funcionais), da natureza do soluto, (pka, presença e o tipo de grupos funcionais, polaridade, solubilidade em água, do tamanho e peso molecular), e ainda das propriedades da solução e das condições do meio aquoso, (pH, força iónica, temperatura e tempo de contacto). Os compostos com diâmetros moleculares inferiores têm maior facilidade em difundir para o interior do sólido e consequentemente a adsorção é preferencial (Cansado et al., 2010 e Cansado et al., 2019).

Uma diversidade de fatores pode influenciar a cinética e a capacidade de adsorção de um determinado adsorvente, (Cansado et al., 2018), entre eles:

- Velocidade de agitação – o aumento da agitação favorece a dispersão de partículas homogêneas do adsorvente na solução, e aumenta a interação entre adsorvente e adsortivo.
- Relação sólido-líquido - quanto maior for a relação entre sólido-líquido, maior será a quantidade de adsortivo retida na superfície do sólido.
- Tamanho das partículas - quanto menor for o tamanho das partículas do adsorvente maior é a superfície de contato, com a solução e em particular com o poluente.
- Concentração inicial - uma concentração elevada do adsortivo é favorável à adsorção.
- O valor do pH do meio – tem de ser otimizado para cada par poluente e adsorvente em estudo.
- Área superficial – os poluentes ficam retidos na superfície, uma elevada área superficial disponível promove a adsorção.
- Temperatura – se os fenómenos de adsorção são predominantemente exotérmicos. A dessorção será então endotérmica, o que permite a regeneração dos materiais adsorventes, com destaque no caso particular para a regeneração dos CA, que podem ser regenerados quando submetidos a temperaturas elevadas.

1.11. Carvões ativados

O carvão ativado é um material constituído predominantemente por átomos de carbono, onde podem estar presentes alguns heteroátomos, tais como: os halógenos, o oxigénio, o nitrogénio, o hidrogénio e o enxofre. O CA é um sólido, com uma estrutura amorfa, mas que apresenta uma porosidade interna bastante desenvolvida, ou seja, apresenta um volume de poros, relativamente elevado, quando expresso por unidade de massa. A área superficial pode atingir frequentemente os 1000 m^2g^{-1}, mas pode alcançar os 3200 m^2g^{-1} (Cansado et al., 2018, González-García, 2018)

O carvão ativado é assim referido por se distinguir de outros materiais que também são compostos essencialmente por átomos de carbono, mas que não sofreram um processo de ativação. Após ser ativado, o carvão diferencia-se do carbonizado por apresentar uma porosidade interna que parece uma rede de pequenos túneis, que vão sucessivamente dos macroporos, aos mesoporos e culminam nos microporos, como ilustrado na figura 1.4.

Os CA são frequentemente referidos como tendo excelentes propriedades de adsorção, que advém da sua enorme área superficial interna e do seu volume de poros bem desenvolvido. Entre as várias aplicações destaca-se a remoção de impurezas dissolvidas em solução e a capacidade de armazenar seletivamente gases, líquidos ou impurezas no interior dos seus poros, apresentando portanto um excelente poder de clarificação, desodorização e purificação de líquidos ou gases (Belo et al., 2017, González-García, 2018),

Os CA podem ser obtidos, a partir de uma diversidade de precursores que podem incluir desperdícios da agricultura, indústria, etc., e a ativação, propriamente dita, pode ser realizada de duas formas diferentes, ou sejam a ativação física e a ativação química.

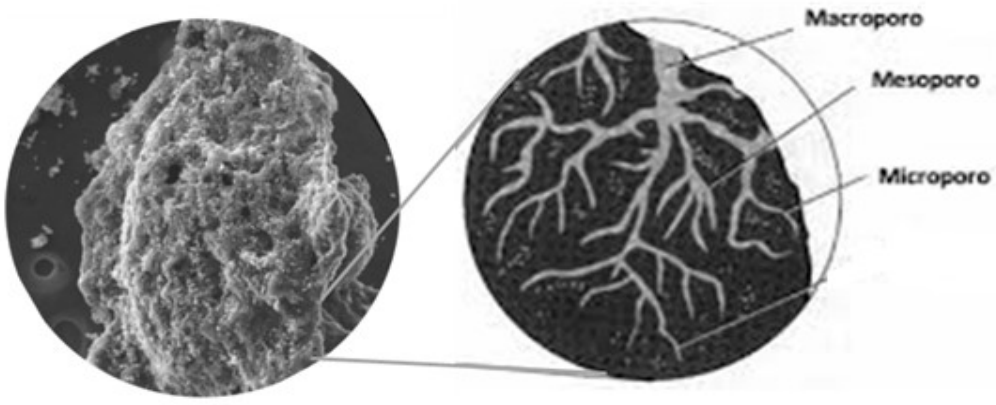


Figura 1. 4 - Representação esquemática da estrutura porosa de um carvão ativado, parcialmente adaptado (Moura, 2004)

A ativação física é normalmente realizada em duas etapas sucessivas. Primeiro o precursor é submetido a elevadas temperaturas, num forno próprio para essa finalidade, sob um fluxo de gás inerte, sendo esta etapa designada por carbonização. A ativação física, propriamente dita, ocorre quando, a elevadas temperaturas, o gás inerte é substituído por um gás com poder oxidante, ou seja, um agente de ativação, tal como o dióxido de carbono, ar ou vapor de água. Durante esta etapa, ocorre a formação de novos poros devido à presença de reações de oxidação, podendo ocorrer ainda a abertura de alguns poros que se tivessem formado durante a carbonização. Este processo de ativação ocorre a temperaturas relativamente elevadas, ou seja, entre os 700 e 1000ºC e o desenvolvimento de porosidade é função do tempo de contato entre o material de carbono e o agente de ativação, que pode variar entre 30 e 1200 minutos (Cansado et al., 2018).

A ativação química é realizada durante uma única etapa. O precursor é misturado com os agentes químicos ativantes escolhidos e é posteriormente submetido a uma temperatura elevada, entre 400 e 700ºC, ou seja, normalmente inferior à temperatura usada durante a ativação física. Como agentes químicos podem ser usados, o ácido fosfórico, o hidróxido de sódio ou de potássio e o carbonato de potássio, entre outros (Cansado, 2019). No final da ativação química, o material é retirado do forno e é lavado sucessivas vezes, para que o excesso de agente ativante, que não foi consumido, seja removido da superfície ou da porosidade do CA (Cansado, 2019).

O conhecimento do tamanho médio dos poros torna-se fundamental para identificar à priori potenciais aplicações para os materiais adsorventes e em particular para os CA. De acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), os poros, dos diferentes materiais são classificados com base no seu tamanho médio (Rouquerol, et al., 1994 e Cansado, 2003), em:

- Micróporos - dimensões inferiores a 2 nm;
- Mesoporos - dimensões entre os 2 e os 50 nm;
- Macroporos - dimensões superiores a 50 nm.

Refira-se que, vários estudos têm-se debruçado sobre o uso de outras tecnologias, que utilizem materiais mais baratos e que sejam de fácil operação e manutenção, no tratamento de efluentes líquidos. Entre os quais salienta-se, o recurso a leitos construídos de macrófitas ou zonas húmidas artificiais e que se têm mostrado eficientes na remoção de alguns fármacos, entre os quais são referidos o ácido clofíbrico, o ibuprofeno e a carbamazepina (Dordio et al., 2010).

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

Os leitos construídos de macrófitas, ou as zonas húmidas construídas, são sistemas de tratamento de águas residuais, baseados essencialmente em processos biológicos. Os sistemas são compostos por uma matriz de suporte, onde estão cultivadas plantas que estão em contato direto com as águas residuais e que servem de suporte ao desenvolvimento dos vários microrganismos. O tratamento de águas residuais, nos leitos de macrófitas, resulta do efeito sinergético que ocorre entre os vários componentes, ou seja, a matriz de suporte, as raízes, os rizomas e os microrganismos associados às plantas e a parte área das plantas.

Os diferentes microrganismos, que se desenvolvem na rizosfera, contribuem de forma direta e numa relação de simbiose com as raízes das plantas, para o aumento da degradação da matéria orgânica. Os produtos de degradação servem de alimento para as próprias plantas, uma vez que são de fácil absorção, por seu lado, os microrganismos também beneficiam desta simbiose pois absorvem os compostos libertados nos exsudados pelas raízes das plantas (WU et al., 2012).

Outros fatores contribuem também para o bom desempenho do sistema, como por exemplo, a presença de regiões predominantemente aeróbicas, na zona submersa composta pelo sistema radicular, pois as plantas têm a capacidade de deslocar o oxigénio presente nas folhas para as raízes. Por outro lado, as plantas impedem que o sol chegue até às zonas húmidas, impedindo assim o desenvolvimento das algas. Enquanto a água residual percorre os diferentes leitos, entra em contato com as raízes e com os rizomas das plantas e com o meio poroso onde podem ocorrer fenómenos como a filtração, reações de oxidação-redução, adsorção, absorção e precipitação. Estas transformações contribuem também para um incremento na remoção de nutrientes e para uma redução de alguns microrganismos patogénicos (Dordio et al., 2008).

Alguns leitos de macrófitas existem naturalmente, mas outros são construídos de forma a simular os primeiros. Os leitos de macrófitas podem ser construídos num ambiente em que as condições de funcionamento são controladas, mas que desempenham funções semelhantes às que ocorrem nos leitos naturais no que se refere ao tratamento de águas residuais.

Na realidade, alguns trabalhos têm revelado que os LCM foram eficazes na remoção de vários fármacos, beneficiando das vantagens já referidas anteriormente. Foram também referidas algumas desvantagens inerentes a estes sistemas, tais como a sazonalidade do processo, a necessidade de uma área de instalação relativamente grande e ainda a necessidade de um período de espera até que as plantas e os microorganismos se aclimatizem e atinjam a sua eficiência plena. As desvantagens referidas podem ser minimizadas ou agravadas pelas alterações das condições meteorológicas. Só uma seleção cuidadosa dos vários constituintes (matriz de suporte, plantas e microorganismos) de um LCM permite aumentar a eficiência dos mesmos na remoção de uma diversidade de poluentes das águas residuais (Dordio e Carvalho, 2013).

1.12.1. Função da matriz dos LCM na remoção dos fármacos

A matriz de suporte é um dos componentes fundamentais dos LCM, num primeiro tempo a mesma serve de suporte ao crescimento das macrófitas e dos microrganismos, e possibilita a ocorrência de uma série de processos físico-químicos e biológicos que por efeitos sinérgicos contribuem para a remoção dos poluentes.

A escolha dos vários materiais que compõem a matriz deve considerar a resistência mecânica e química dos materiais, reduzindo assim a libertação de substâncias tóxicas que possam colocar em causa o crescimento das plantas e dos microorganismos, bem como proporcionar uma elevada porosidade ao leito para que promova um bom arejamento e um fácil escoamento do efluente.

No trabalho aqui apresentado, a matriz selecionada inclui uma mistura de dois materiais argilosos, são eles, a Vermiculite Esfoliada, com uma granulométrica nº 2 e os Agregados de Argila Expandida (Light Expanded Clay Aggregates) que são comercializados sob a designação de LECA 2/4. Uma matriz de composição semelhante já tinha sido utilizada com sucesso na remoção de alguns fármacos, em trabalhos prévios, por elementos pertencentes ao mesmo grupo de trabalho e desta forma pretende-se dar continuidade e estabelecer termos de comparação com os trabalhos realizados. Foi ainda referido que, a matriz de composição previamente definida, possibilitou um bom desenvolvimento da população microbiana e das plantas e ainda um contacto profícuo com os poluentes anteriormente estudados (Dordio, et. al 2017).

Seguidamente serão descritas algumas das caraterísticas de forma mais pormenorizada de cada um destes materiais argilosos.

1.12.2. Vermiculite esfoliada

A vermiculite é um material argiloso, composta essencialmente por silicatos de alumínio-ferro-magnésio hidratados e que se apresenta sobre a forma de laminas com uma coloração suavemente dourada. Quando submetida a temperaturas relativamente elevadas, a argila tem a particularidade de expandir o seu volume, originando um material cuja densidade é comparativamente baixa, o que lhe permite apresentar elevadas capacidades de adsorção, e adquire a designação de vermiculite esfoliada.

1.12.3. Agregados de Argila Expandida

A LECA é preparada a partir de argila de origem natural, através de um processo de transformação a temperaturas relativamente elevadas, ou seja, por volta dos 1200 °C. Com o aumento da temperatura, ocorre a libertação de gases, que conduz à formação de uma porosidade interna, fazendo com que a mesma adquira uma densidade inferior, ficando sobre a forma de grânulos esféricos com uma superfície relativamente dura e de cor acastanhada.

A LECA é um material que apresenta excelentes características, sendo frequentemente utilizada como materiais de isolamento térmico e acústico, apresentando ainda elevada resistência ao fogo. As excelentes propriedades apresentadas, faz com tenha também sido estudado frequentemente como material constituinte da matriz dos LCM. A LECA apresenta uma capacidade de lixiviação quase nula, isto possibilita a sua reutilização durante várias vezes sucessivas, contribuindo para um arejamento da mesma e promovendo assim uma elevada capacidade de drenagem.

1.12.4. Papel das plantas na remoção dos fármacos

A componente da vegetação é formada principalmente por plantas macrófitas, isto é, plantas que se desenvolvem normalmente em solos que se encontram praticamente sempre húmidos ou inundados, sendo o seu ambiente predileto os solos saturados com água. Estas plantas possuem um sistema de arejamento interno, que lhes permite uma oxigenação dos tecidos que se encontram submersos, e lhes confere uma capacidade de desenvolvimento em ambientes alagados.

As macrófitas que fazem parte dos LCM também contribuem de forma direta para a redução de diferentes poluentes, através de fenómenos de adsorção, absorção, acumulação, metabolização e volatilização dos poluentes. Por outro lado, os exsudados libertados pelas raízes podem conter enzimas que ajudam a degradar os poluentes que se encontram nas proximidades da rizosfera. Para aumentar a eficiência de tratamento nos LCM, as plantas devem ser selecionadas tendo por base determinadas caraterísticas predominantes, entre as quais se salientam, por exemplo, uma boa capacidade de interação e de absorção dos poluentes presentes no efluentes a tratar, um sistema radicular profundo e denso, uma taxa de crescimento e produção de biomassa relativamente rápida e de fácil colheita, devendo ainda apresentar uma grande resistência aos poluentes, a pragas e doenças.

A identificação do local de construção de um LCM assenta no conhecimento das condições climáticas, na avaliação da área livre para esse fim, na definição da altura do leito e do tipo de fluxo a implementar, assim como na identificação da presença de plantas infestadoras naturais da região e que possam proliferar de forma espontânea. Com base nestes pressupostos, a macrófita selecionada foi a *Typha* spp.. Na realidade, estudos efetuados anteriormente revelaram que a mesma apresenta uma elevada tolerância a vários fármacos e que contribui de forma eficaz e efetiva para a sua remoção de águas contaminadas (Evgenidou et al., 2015 e Yadav et al., 2017).

1.12.5. *Typha* spp.

A *Typha* spp. é uma planta herbácea que predomina em ambientes aquáticos ou palustres. A sua altura pode oscilar entre 1.5 e 3 m, sendo os seus caules relativamente eretos, com um diâmetro de 0.9 a 12 cm, de onde brotam as flores e uma série de folhas retas e basais, podendo variar em número até às 16 folhas, que apresentam um comprimento que pode ser superior a 120 cm.

As plantas da *Typha spp.* são relativamente robustas e apresentam uma quantidade significativa de rizomas que podem apresentar um diâmetro superior aos 3 cm, cujo comprimento pode ir até aos 70 cm. Estes encontram-se preferencialmente à superfície, estendendo-se a uma profundidade abaixo do nível do solo que pode ir até aos 10 cm. Estas plantas são facilmente identificáveis em prados com solos húmidos, pântanos e nas margens de lagos ou lagoas ou estuários e linhas de água, devido à presença de uma espiga densa e castanha escura no cimo do respetivo caule. Estas plantas crescem facilmente em solos com grandes quantidades de matéria orgânica, ou em solos essencialmente minerais de textura fina, mas de preferência que contenham alguma matéria orgânica nas camadas superficiais. As mesmas reproduzem-se facilmente podendo ser semeadas ou plantadas na forma de pequenos rebentos, sendo que o seu rápido desenvolvimento, faz que se tornem com frequência em plantas invasoras (Liu, 2017).

1.13. Métodos instrumentais de análise

Um método analítico é um conjunto de procedimentos que envolve uma sequência de técnicas laboratoriais, criteriosamente desenvolvidas que permitem a identificação, deteção e quantificação com rigor de um analito numa determinada matriz de composição diversificada. Para cumprir o tal objetivo, o método deve ser fiável, acessível e apropriado ao analito em análise tendo em consideração a matriz onde está incluído e a sua concentração.

No presente trabalho destacam-se dois métodos de análise, a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-VIS) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

1.13.1. Espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível

A espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-VIS) é um método analítico muito utilizado numa diversidade de áreas. É utilizada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, no doseamento dos iões ferrosos presentes na água para consumo, ou na identificação do princípio ativo em fármacos. Esta é uma técnica fiável, reprodutível, pouco dispendiosa, de fácil utilização e amiga do ambiente.

Por espectrofotometria podem ser analisadas espécies que absorvem numa gama de radiação que abrange os comprimentos de onda (cdo) que vão desde os 190 aos 800 nm. As bandas de absorção nestas regiões do espectro correspondem a transições eletrónicas de baixa energia (Skoog et al., 2009). As leituras de absorvância dos diferentes compostos devem ser registadas ao comprimento de onda em que cada analito apresenta um valor máximo de absorvância, por forma a aumentar a seletividade e sensibilidade do aparelho face a cada analito e, reduzir os respetivos limites de deteção e de quantificação (Skoog *et al*., 2009). Por seu lado, a identificação e a quantificação de diferentes substâncias com base na espectrofotometria de UV-VIS estão fundamentadas na lei de Lambert-Beer, expressa através da equação seguinte:

$$\mathbf{A = \varepsilon \times b \times C} \qquad \textbf{(Equação 1)}$$

Onde:

A - É a absorvância;

ε - É o coeficiente de absorção ou absortividade molar, sendo característica da espécie absorvente e podendo variar com o cdo utilizado (L / (mol cm));

C - É a concentração do analito em estudo (mol/L);

b - É o percurso ótico, identificado facilmente como a distancia entre as duas faces paralelas, da célula de trabalho utilizada (cm).

1.13.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia foi desenvolvida pelo botânico russo Mikhail Twett no início do século XX (Pombinho de Matos, 2015). É um método, de separação, identificação e quantificação de compostos, com utilização em todos os ramos da ciência. Os equipamentos utilizados em cromatografia de fase líquida têm sofrido atualizações, sendo as últimas versões designadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e podem ainda estar acoplados a um aparelho de massa. De uma maneira geral, o equipamento de HPLC engloba um sistema de bombas, um injetor, (cujas últimas versões englobam um injetor automático), uma coluna cromatográfica (que pode estar em ambiente de temperatura controlada), um detetor, (normalmente um sistema de deteção em UV-VIS) e um sistema de registo e tratamento de dados, como exemplificado na figura 1.5.

A cromatografia líquida de alta eficiência é muito aplicada, em várias fileiras industriais pois permite uma separação efetiva das várias substâncias que se encontram presentes na mesma amostra, através de um contato preferencial entre os mesmos e a coluna. Esta técnica é muito utilizada principalmente na indústria farmacêutica, para a identificação de compostos não voláteis ou termicamente estáveis, apresentando uma elevada sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, permitindo a deteção e quantificação de analitos até à ordem dos ppb.

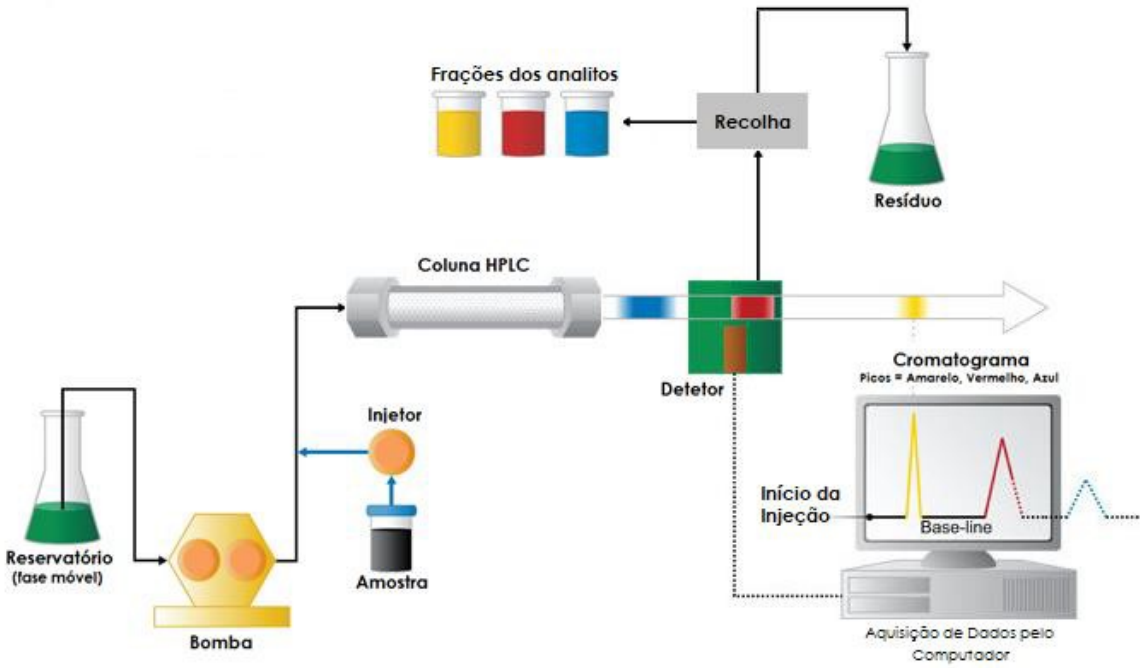


Figura 1. 5 - Componentes de um sistema de cromatografia líquida de alta resolução, retirado de (Skoog et al., 2009)

1.13.3. Vantagens e Desvantagens do sistema de HPLC

A técnica de HPLC apresenta algumas vantagens, entre as quais se destacam a sua aplicabilidade na quantificação de diversos tipos de analitos, englobando tanto pequenas moléculas orgânicas e iões como também grandes biomoléculas e polímeros, bem como a sua capacidade de separação e a sua sensibilidade. Finalmente, a precisão e robustez demostrada faz desta técnica uma ferramenta indispensável para o controlo de qualidade em diversas áreas de aplicação (Kupiec, 2004 e Dong, 2013).

A principal desvantagem reporta-se ao custo relativamente elevado do equipamento e dos solventes e ou eluentes utilizados, pois os solventes utilizados têm de ter qualidade elevada e adequada ao HPLC e ainda por ser uma técnica pouco amiga do ambiente (Smith, 2019).

1.13.4. Validação dos Métodos Analíticos

Nos nossos dias, as trocas comerciais assentam numa relação de confiança entre o produtor ou prestador de serviços e o consumidor e que têm por base a existência de um sistema de controlo e garantia de qualidade, durante as várias etapas do processo de produção. É necessário que os laboratórios de análise disponham de meios humanos e físicos que lhes permitam demonstrar, de forma clara, que comprem todos os requisitos de qualidade exigidos pelos clientes ou impostos por lei. A não validação de um método de trabalho, pode conduzir à obtenção de resultados não confiáveis e pôr em causa todo o rigor exigido na realização do trabalho, assim como a metodologia utilizada (Ludwig, H., 2010 e Ram et al. 2012).

1.13.4.1. Parâmetros da Validação de Métodos Analíticos

O “ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)” é um livro de referência que descreve os passos a seguir nas várias etapas de validação de um método analítico. A validação de um método deve ser adaptada a cada situação de trabalho particular, no entanto, a determinação de alguns parâmetros, de validação, assegura a obtenção de resultados confiáveis, entre eles é recomendável a avaliação da especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limites de deteção e quantificação do aparelho e ainda a robustez do método (ICH, 1994).,

Objetivos

- Avaliar a eficiência global de remoção do sulfametoxazol, um antibiótico do grupo das sulfonamidas, usando um microcosmo de leitos construídos de macrófitas seguido de um processo de adsorção com recurso a três carvões ativados comerciais;
- Avaliar a eficiência de remoção de fármacos nos leitos construídos de macrófitas, com matriz de LECA e vermiculite e plantados com a *Typha* spp;
- Avaliar a eficiência de remoção do fármaco por meio do processo de adsorção em carvão ativado;

Específicos

- Identificar o comprimento de onda de absorvância máxima para o composto farmacêutico em estudo;
- Determinar as curvas de calibração do composto isoladamente por espectrofotometria de UV-VIS;
- Identificar o tempo de equilíbrio para completar a adsorção de cada composto;
- Definir a gama de concentrações iniciais a usar nos vários ensaios;
- Determinar as capacidades de remoção do fármaco pelos diferentes CA por espectrofotometria de UV/VIS;
- Obtenção de isotérmicas de adsorção nos CA;
- Otimizar as condições de separação e de quantificação do sulfametoxazol por HPLC-UV-Vis, e validar o método analítico;
- Determinar a eficiência da remoção do fármaco nos microcosmos de LCM e a eficiência da remoção da matriz;
- Avaliar a capacidade dos CA na remoção do fármaco isoladamente e na presença de *outros fármacos*;
- Avaliar e quantificar a capacidade máxima de remoção de fármacos pelos diferentes CA;
- Relacionar as propriedades químicas e texturais dos CA com a capacidade de remoção de sulfametoxazol.

II Metodologia Experimental

2.Metodologia Experimental

2.1. Reagentes e materiais

As características mais relevantes e os fornecedores dos reagentes e materiais utilizados neste trabalho estão apresentados nas tabelas 2.1 e 2.2, respetivamente.

Tabela 2. 1 - Principais caraterísticas e fornecedores dos reagentes utilizados

Substância	Formula Química	Riscos e Segurança	Massa Molar (g mol^{-1})	Grau de Pureza (%)	Fornecedor
Acetonitrilo	C_2H_3N	Tóxico; Inflamável	41.05	HPLC gradiente	Merck
Ácido fosfórico	H_3PO_4	Corrosivo	98.00	85.0	JMGS
Metanol	CH_3OH	Tóxico; Inflamável	32.04	99.8	VWR
Sulfametoxazol	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	Irritante para os olhos e vias respiratórias	253.3	>98	Fluka

As várias soluções utilizadas no HPLC, ou na composição do eluente, foram preparadas com água destilada de HPLC gradient grade, da marca Fisher chemical.

Tabela 2. 2 - Características e fabricantes dos materiais utilizados

Material	Características	Fabricantes
Vermiculite Esfoliada	Granulometria 3 (0.8-5 mm)	Aguiar Mello Lda
Agregados de argila expandida - LECA	Granulometria 2/4 (2-6.3 mm)	MaxitGroup, Portugal Gravilha Granulometria
CA 1240 W	Granulometria (mesh 12-40) (0.6 – 0.7 mm)	Norit, Cabot Corporation
CA 1240 X	Granulometria (mesh 12-40) (0.6 – 0.7 mm)	Norit, Cabot Corporation
CA Panreac	Pó fino	Panreac, Panreac Applichem

Antes da sua utilização, a vermiculite e a LECA foram lavadas várias vezes com água ultra-pura (Fisher Chemical) de forma a remover as partículas finas e os sólidos em suspensão. Estas

foram subsequentemente secas numa estufa à temperatura de 105 ºC, durante 24 h, permitindo reduzir ao máximo o desenvolvimento da população microbiana no material. De seguida, a LECA e a vermiculite foram misturadas uniformemente numa proporção de 1:1 (v:v), e esta mistura foi usada como matriz de suporte nos microcosmos de LCM estudados. Nas figuras 2.1 e 2.2 estão incluídas algumas fotografias ilustrativas dos dois materiais argilosos utilizados nos microscosmos de LCM, ou sejam a LECA e a vermiculite esfoliada. Na tabela 2.3 estão incluídas algumas características físico-químicas da LECA, da vermiculite e da mistura final entre os dois materiais. É possível verificar que a mistura entre os dois materiais apresenta características físico-químicas intermédias.

Figura 2. 1- Aspeto - LECA

Figura 2. 2 – Aspeto -Vermiculite esfoliada

Tabela 2. 3 - Características físico-químicas da LECA, da vermiculite e da mistura dos dois materiais

Material	Vermiculite [a]	LECA [a]	Mistura LECA/vermiculite (1:1 v/v) [b]
Porosidade (%)	66 ± 1	49± 1	54 ± 2
Densidade aparente (kg m^{-3})	88 ± 2	394 ± 10	291 ± 14
pH (H_2O)	7.44 ± 0.06	9.04±0.08	8.67 ± 0.05

a) Dordio et al. 2017; b) Valores determinados anteriormente no laboratório

Para a realização deste trabalho foram selecionados dois carvões ativados da Norit, o Norit 1240X e o Norit 1240W e um carvão ativado da Panreac. Na tabela 2.4 apresentam-se algumas das principais características destes carvões ativados, que tinham sido previamente determinadas no laboratório, por outros elementos do grupo de investigação.

Nas figuras 2.3 e 2.4 estão ilustrados exemplos de amostras de dois carvões ativados comerciais que foram utilizados no decorrer deste trabalho, um é comercializado sobre a forma de pó (CA da Panreac) e os dois carvões da Norit são comercializados sobre a forma de granulado (CA da Norit).

Tabela 2. 4 - Principais características texturais e químicas dos carvões ativados

Carvão ativado	A_{BET} / $m^2\ g^{-1}$	$V_{0.95}$/ $cm^3\ g^{-1}$	V_0/ $cm^3\ g^{-1}$	L_0/ nm	pH_{PCZ}
GAC-1240X	975	0.5	0.23	1.04	9.73
GAC-1240W	971	0.48	0.22	1.11	10.49
PANREAC-AC	941	0.41	0.23	0.97	8.12

[Janeirinho, 2017]

Figura 2. 3 – Foto do carvão ativado da Panreac, sobre a forma de pó fino

Figura 2. 4 – Foto do carvão ativado sobre a forma de grânulos da Norit

2.2. Metodologia analítica

Para proceder à quantificação dos fármacos presentes em solução aquosa foram utilizadas as técnicas de espectrofotometria de absorção molecular na região do ultra violeta / visível (UV/Vis), utilizando um equipamento, Nicolet Evolution 300, da Thermo Electron Corporation, e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com deteção por UV-Vis utilizando um equipamento Agilent 1100 system (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com um detetor UV e um injetor manual Rheodyne 7725i, sendo o mesmo programado com recurso ao software HP Chemstation.

A quantificação dos fármacos, e em particular, do sulfametoxazol foi efetuada recorrendo a dois métodos diferentes, consoante o mesmo se encontrava isolado, ou em conjunto com outros fármacos em solução. Nos ensaios de adsorção em que o sulfametoxazol se encontrava isolado, a quantificação foi efetuada com recurso ao espectrofotómetro de UV-Vis. Nos ensaios de remoção do sulfametoxazol, nos microcosmos de LCM, foi utilizada uma solução com quatro fármacos, contendo em simultâneo o trimetoprim, furosemida, sulfametoxazol e o diclofenac. Nesta situação, a quantificação do sulfametoxazol foi efetuada recorrendo à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de modo a permitir a separação e identificação efetiva de cada composto. É de referir que, antes de dar início aos ensaios de remoção dos produtos farmacêuticos, da fase líquida, foi necessário proceder à otimização e validação dos parâmetros que permitiram a respetiva identificação, separação e quantificação.

2.3. Otimização das condições de quantificação dos fármacos em fase aquosa

Como a parte final do trabalho, que consistiu na avaliação da remoção do sulfametoxazol, da fase líquida, com recurso aos microcosmos de LCM, foi efetuada a partir de uma solução que continha os quatro fármacos, a otimização das condições de trabalho, iniciou-se com a identificação do comprimento de onda (cdo) de absorvância máxima para cada composto. Foi dada particular atenção ao sulfametoxazol, e de acordo com a bibliografia consultada, este apresenta um máximo de absorvância aos 267 nm. No entanto, o mesmo foi confirmado através da obtenção de um espectro de absorção do composto, utilizando para tal uma solução de 10 mg L^{-1}, através de um varrimento, num intervalo de cdo entre 190 e 300 nm. O mesmo procedimento foi utilizado para a identificação do cdo de absorvância máxima dos outros 3 fármacos, sendo que esta etapa permitiu definir o cdo de trabalho a ser utilizado no HPLC.

2.3.1. Condições de quantificação dos fármacos por UV/VIS

A quantificação dos fármacos foi realizada pelo método do padrão externo. Para construir uma reta de calibração, prepararam-se uma série de padrões de sulfametoxazol cujas concentrações variaram entre 0.25 e 10.0 mg L^{-1}. As mesmas foram preparadas por diluição da solução padrão de stock de 10 mg L^{-1}, com água destilada. Prepararam-se 2 réplicas para cada solução padrão, e efetuaram-se três leituras das absorvâncias, no espectrofotometro de UV-VIS, ao cdo previamente definido. O mesmo procedimento foi utilizado na preparação das retas de calibração do diclofenac, trimetoprim e furosemida, possibilitando a quantificação dos quatro fármacos, por espectrofotometria de UV/VIS, sempre que necessário. Foram também preparadas retas de calibração, para o sulfametoxazol, em meios com diferentes valores de pH. Para o ajuste do pH do meio recorreu-se à adição de pequenas quantidades de HCl ou de NaOH, e o pH das diferentes soluções foi então registado.

2.3.2. Condições de quantificação dos fármacos por HPLC

Em todos os ensaios realizados com uma solução aquosa contendo quatro fármacos, a deteção e quantificação do sulfametoxazol foi efetuada por HPLC-UV. Pois apesar dos métodos cromatográficos serem mais morosos, dispendiosos (devido à pureza elevada dos reagentes utilizados) e poluentes (as fases móveis são, geralmente, solventes orgânicos) do que a espectrofotometria de absorção molecular, são métodos mais seletivos e sensíveis e fornecem resultados analíticos com boa precisão e exatidão.

Para o doseamento do sulfametoxazol, em conjunto com os outros três fármacos presentes em solução aquosa, por HPLC-UV, foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, Alemanha) com dimensões de 250 mm × 4.6 mm e com um tamanho das partículas de 5.0 µm. A fase móvel utilizada era um sistema binário de solventes composta por uma mistura de acetonitrilo (A) e água acidificada com 0.1% (v/v) de ácido fosfórico (H_3PO_4) (B). A eluição ocorreu de forma isocrática, tendo sido testadas diversas composições, ou seja, diferentes proporções de A e B de forma a que o tempo de retenção do analito fosse reduzido, mas que permitisse a separação efetiva dos quatro fármacos presentes na solução. Após otimização da composição do eluente, as proporções escolhidas foram de 55% de acetonitrilo e 45% de água acidificada. O perfil cromatográfico foi obtido ao cdo de 267 nm dado que corresponde ao máximo de absorvância do sulfametoxazol.

As análises decorreram à temperatura ambiente e volume de solução injetado foi de 20 µL. Para cada amostra foram realizadas três réplicas das injeções, que foram previamente filtradas com recurso a um filtro de 0.45 µm de membrana de nylon (Filtres Fioroni, França). Antes de se proceder à filtração das amostras, foi necessário otimizar o volume de amostra a filtrar para que a perda de composto em estudo, durante esta etapa fosse mínima, uma vez que se verificou que alguns fármacos (como é o caso da furosemida) ficam parcialmente retidos no filtro.

A quantificação do fármaco foi realizada pelo método do padrão externo. Assim, prepararam-se uma série de soluções padrão, com concentrações equimolares de cada fármaco. As concentrações das soluções preparadas variaram de 0.25; 0.5; 1; 1.5; 2; 3; 3.5 e 4.5 mg L^{-1} e foram obtidas por diluição da solução padrão de stock de 10 mg L^{-1}, usando água destilada. Prepararam-se 2 réplicas para cada solução padrão, as quais foram injetadas 3 vezes no equipamento de HPLC utilizando as condições de trabalho previamente otimizadas.

A solução padrão de stock de 10 mg L^{-1} foi preparada por pesagem de 0.1 g de cada um dos fármacos, os quais foram dissolvidos em 1 % de metanol, sendo posteriormente transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL, o qual foi aferido com água desionizada. Para reduzir a fotodegradação de alguns destes compostos, todas as soluções foram armazenadas na ausência de luz.

2.3.2.1. Otimização do volume de amostra a filtrar

Para otimizar o volume de solução a filtrar, de modo a obter a maior percentagem de recuperação do analito a quantificar por HPLC-UV, filtrou-se, com recurso a seringas de plástico de 10 mL (Ecoject, Portugal), diferentes volumes de uma solução com concentração de 2 mg L^{-1} (2.5 mg L^{-1} foi a concentração da solução utilizada posteriormente nos microcosmos de LCM) do composto através de filtros de membrana de nylon 0.45 µm (Ø = 25mm) (Filtres Fioroni, França).

Os volumes testados variaram desde os 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 até aos 60 mL, tendo-se recolhido sempre o último mililitro do filtrado para proceder à quantificação do composto. Foram feitas 3 réplicas das filtrações para cada volume testado. Testaram-se volumes crescentes de solução até que fossem obtidas percentagens de recuperação do composto de aproximadamente 100%.

2.3.2.2. Validação do método analítico

O método analítico utilizado foi validado recorrendo ao guia "ICH-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)" (ICH, 1994). No conjunto do trabalho realizado, foram avaliados, a exatidão, precisão, linearidade da curva de calibração e ainda os limites de deteção e de quantificação do aparelho.

A exatidão e a repetibilidade do aparelho foram avaliadas com recurso a 3 soluções de trabalho, cujas concentrações variaram entre 0.25 mg L^{-1} (concentração baixa) até aos 3.5 mg L^{-1} (concentração elevada)). Fizeram-se 3 injeções sucessivas de cada solução padrão, mantendo a composição da fase móvel e as condições de eluição. A exatidão, expressa em percentagem, foi calculada pela razão entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ICH,1994). A repetibilidade foi avaliada com base na dispersão ou no desvio padrão relativo (% DPR) das áreas dos picos referentes a cada analito (ICH,1994).

Para avaliar a reprodutibilidade do aparelho utilizou-se uma solução com uma concentração do fármaco de 2.5 mg L^{-1} e foram feitas 3 injeções da solução, em 5 dias diferentes. A reprodutibilidade foi avaliada com base na dispersão ou no desvio padrão relativo (% DPR) das áreas dos picos atribuídos aos analitos (ICH,1994).

Para a obtenção da curva de calibração utilizaram-se 8 soluções padrão com concentrações na gama de valores entre 0.25 e 4.5 mg L^{-1} (secção 2.3.2). A análise da correlação linear na gama de concentrações usadas foi feita aplicando-se o método dos mínimos quadrados (regressão linear) obtendo-se o valor do declive e o coeficiente de determinação (R2).

Os limites de deteção e quantificação do aparelho (LDI – Limite de Deteção Instrumental e LQI – Limite de Quantificação Instrumental) foram obtidos a partir da concentração do analito correspondente ao sinal do branco, mais 3.3 ou 10 vezes o desvio padrão, respetivamente (ICH,1994), sendo que estes valores foram obtidos por interpolação da reta de calibração.

2.4. Uso de carvões ativados na remoção do sulfametoxazol da fase líquida

2.4.1. Seleção dos carvões ativados

Os ensaios de adsorção do sulfametoxazol nos CAs potenciam uma forma de remoção rápida, do mesmo da fase líquida, tendo especial relevo, em situações de derrames, de incapacidade de remoção dos processos de tratamentos convencionais, ou em qualquer situação de emergência.

Assim foram realizados ensaios de remoção do sulfametoxazol a partir da fase líquida, com recurso a três carvões ativados. A escolha dos CAs teve por base as respetivas propriedades texturais. Como apresentado na tabela 2.4, os três CAs exibem propriedades texturais, ou sejam área superficial aparente, determinada pelo método de BET, volume poroso total e volume dos microporos, bastante semelhantes. No entanto, os mesmos exibem uma forma física diferenciada, visto que o CA da Panreac se encontra sob a forma de um pó de granulometria fina, mas os CAs da Norit são fornecidos sobre a forma de um granulado.

2.4.2. Estudo Cinético

Um parâmetro fundamental nos estudos de remoção de diferentes poluentes, a partir da fase líquida, é o tempo necessário para garantir que o processo atinge o equilíbrio, e que o material adsorvente se encontra saturando. Assim foram pesados de forma rigorosa, num Erlenmeyer de 50 ml, aproximadamente 10 mg de CA (Norit 1240 X, Norit 1240 W ou da Panreac), aos quais foram adicionados 25 mL da solução mais concentrada de sulfametoxazol, ou seja, com uma concentração de 10.10 mg L^{-1}. Os Erlenmeyers foram isolados, do contacto com o meio ambiente, e colocados em agitação continua (150 rotações por minuto), num banho termostatizado da marca Grant SS40-D6, a 25ºC.

A quantidade do fármaco presente em solução foi avaliada em intervalos de tempo regulares. Foram então recolhidas aliquotas do sobrenadante e foram realizadas as leituras das respetivas absorvâncias, no espectrómetro de UV-VIS, para definir o tempo de contacto necessário, para que o equilíbrio fosse atingido. O tempo de equilíbrio definido para a remoção do sulfametoxazol, nos diferentes CA a utilizar no decorrer deste trabalho, foi de 7 horas. Um procedimento semelhante foi realizado para a definição do tempo de equilíbrio para o diclofenac, trimetoprim e para a furosemida.

2.4.3. Influência da temperatura na remoção do sulfametoxazol

A temperatura é um dos parâmetros que pode influenciar a velocidade de adsorção e a quantidade de fármacos removida pelos diferentes adsorventes. A influência da mesma na adsorção do sulfametoxazol foi avaliada através do seguimento do processo a diferentes temperaturas. O estudo da cinética de adsorção do sulfametoxazol foi realizado a duas temperaturas diferentes, com recurso ao CA da Panreac e ao da Norit 1240 W. Foram pesadas de forma rigorosa, cerca de 10 mg de CA, num Erlenmeyer de 100 mL. A cada Erlenmeyer foi adicionado 50.0 mL da solução mãe de sulfametoxazol, sendo seguidamente colocados em agitação contínua, a 150 rotações por minuto, em dois banhos termostatizados. Um banho foi mantido a 22ºC e o outro a 30ºC.

Em intervalos de tempo regulares, que variaram entre 15 e 480 min., foram retiradas pequenas quantidades de sobrenadante das diferentes suspensões, que foram filtradas e a absorvância foi então registada, ao cdo de absorvância máxima do sulfametoxazol.

2.4.4. Influência do pH do meio na remoção do sulfametoxazol

O processo de adsorção é influenciado por vários fatores, entre eles se destaca o pH do meio. Para avaliar a influência do pH do meio realizaram-se estudos cinéticos, a três valores diferentes de pH do meio, usando para o efeito o CA da Panreac. As suspensões contendo os CA na solução foram preparadas de forma semelhante ao referido no ponto anterior, mas nestes ensaios, o pH das soluções contendo o sulfametoxazol foi ajustado a 2.2, 6.5 e 11.2 pela adição de HCl ou NaOH. Os ensaios foram realizados a 20ºC, e as absorvâncias foram lidas ao comprimento de onda de absorvância máxima em intervalos de tempo que variaram entre 60 e 1200 minutos.

2.4.5. Isotérmicas de adsorção do sulfametoxazol pelos CA

Para os ensaios de remoção do sulfametoxazol da fase líquida, foram colocados 25 mL das várias soluções padrão, descritas anteriormente, num Erlenmeyer contendo 10 mg de CA, da Panreac ou da Norit, pesadas rigorosamente, num banho termostatizado, sob agitação contínua, durante 7 h, como ilustrado na figura 2.5. Após atingir o tempo de equilíbrio, as suspensões foram filtradas, seguindo o procedimento descrito no ponto 2.3.2.1, e colocadas em eppendorfs para posterior análise por UV-Vis, ou por HPLC, seguindo as condições de trabalho descritas anteriormente. Alguns ensaios de remoção do trimetoprim, diclofenac e furosemida foram também efetuados, utilizando as condições de trabalho experimental, pré-definidas.

Figura 2. 5 – Fotos da preparação das suspensões de CAs nas soluções com sulfametoxazol

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

2.5.1. Descrição dos microcosmos de LCMs

Utilizaram-se diferentes microcosmos de LCM em recipientes de PVC (0.25 m de largura × 0.30 m de comprimento × 0.30 m de profundidade), usando como matriz de suporte uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite 2 (1:1, v:v) e plantados com *Typha* spp. A escolha da matriz foi baseada em estudos anteriores, onde a mesma apresentou elevadas eficiências na remoção de poluentes orgânicos xenobióticos presentes em águas, incluindo também alguns fármacos (Dordio et al., 2017).

Estes leitos foram plantados em novembro de 2016 com plantas jovens, provenientes de rebentos de *Typha* spp. (densidade de plantas = 40 plantas por metro quadrado). No início de maio de 2019, altura em que foram realizados os ensaios aqui referidos, as plantas apresentavam uma altura média de 85 cm e uma densidade média nos leitos de 55 plantas por metro quadrado.

No primeiro leito plantado (ensaio I) colocou-se 2.5 L de água dopada com aproximadamente 2.5 mg L^{-1} (pesados de forma rigorosa) de cada um dos 4 fármacos (trimetoprim, furosemida, sulfametoxazol e diclofenac), o qual foi utilizado com o objetivo de avaliar a capacidade dos LCMs para remover os compostos e analisar alguns possíveis efeitos fitotóxicos resultantes da exposição das plantas aos fármacos.

O segundo leito plantado (ensaio II) continha apenas água sem fármacos, com o objetivo de servir de controlo na avaliação de possíveis efeitos fitotóxicos dos fármacos sobre as plantas.

Utilizaram-se também dois leitos não plantados (ensaios III) com a mesma composição de matriz de suporte, ou seja, composta apenas pela LECA e pela vermiculite, contendo água dopada, para avaliar a capacidade de remoção da matriz de suporte face aos fármacos em estudo.

Em todos os leitos, o nível da água ou solução foi mantido, durante todo o ensaio, ligeiramente abaixo da superfície da matriz, mas de modo a que a matriz ficasse praticamente inundada a 100%.

Paralelamente, foi também utilizado um recipiente sem enchimento (ensaio IV), contendo apenas água dopada com os fármacos, com o objetivo de avaliar a remoção destes compostos por fotodegradação, hidrólise ou adsorção às paredes dos recipientes, permitindo avaliar a contribuição de outros processos de remoção que não sejam os devidos às plantas, microrganismos ou à matriz. Os ensaios foram realizados durante o mês de maio, de 2019, e na figura 2.6 encontra-se ilustrado um esquema dos diferentes leitos utilizados.

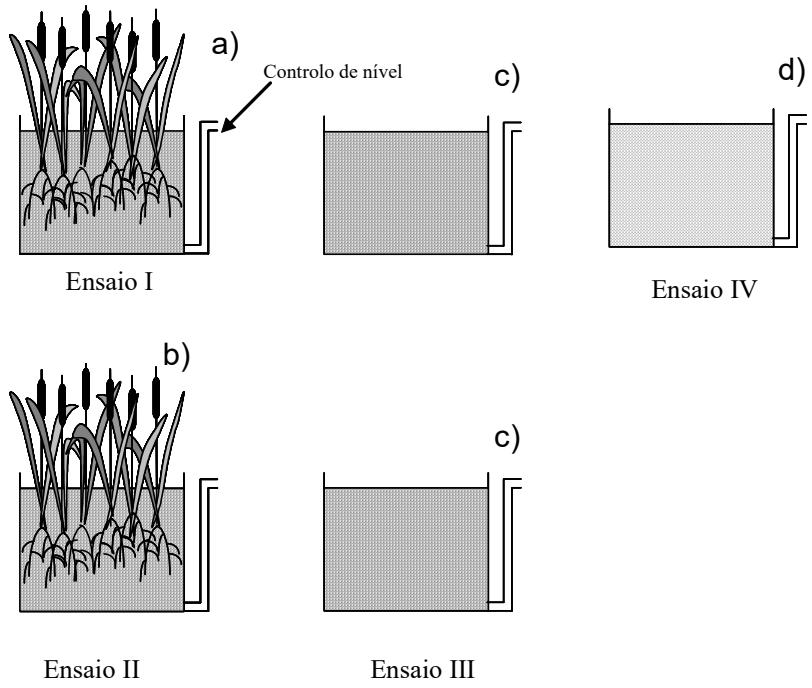


Figura 2. 6 - Representação esquemática dos ensaios realizados durante a experiência

a) Ensaio I: leito plantado com *Typha* spp. usando LECA + Vermiculite como matriz de suporte e uma solução contendo os 4 os fármacos;

b) Ensaio II: leito plantado com *Typha* spp. usando LECA + Vermiculite como matriz de suporte e contendo apenas água sem fármacos;

c) Ensaio III: leitos não plantados usando LECA + Vermiculite como matriz de suporte e uma solução contendo os 4 fármacos

d) Ensaio IV: recipiente contendo apenas água dopada com fármacos e sem conter plantas ou material de suporte.

2.5.2. Condições de operação dos LCMs e recolha de amostras

Para a realização dos ensaios utilizou-se água dopada com 4 fármacos (trimetoprim, furosemida, sulfametoxazol e diclofenac) com uma concentração individual de aproximadamente 2.5 mg L^{-1}. O valor do pH da solução contendo os quatro fármacos era de 6.02. Utilizou-se uma solução com 4 fármacos para ter uma matriz mais complexa e para simular as condições reais em que os fármacos se encontram presentes nos diferentes efluentes. No entanto, apenas o sulfametoxazol foi objeto de estudo no decorrer deste trabalho, os dados referentes aos outros fármacos foram estudados por outros colegas e serviram de base comparativa a estudos realizados com matrizes de microcosmos modificadas.

Todas as experiências foram conduzidas em modo descontínuo, mantendo-se o volume inicial de solução e sem alimentação com qualquer outro tipo de solução durante a realização da experiência. O nível de líquido manteve-se apenas ligeiramente abaixo da superfície da matriz como referido no ponto anterior.

A experiência teve uma duração total de 120 horas, tendo-se recolhido amostras no primeiro dia, no início da experiência (t = 0), ao fim de 30 minutos, às 1.5h; 2.5h; 3.5h; 4.5h; 6h; 7.5h e 24h após o início da experiência e, no restante tempo, a cada 24 horas. No momento de cada recolha efetuada, alguns cuidados foram considerados por forma a obter uma amostra composta e representativa de todo o sistema em estudo. Assim, durante as recolhas, as alíquotas foram retiradas, aproximadamente, a meia altura da profundidade dos recipientes, e em pontos aleatórios das superfícies dos leitos. Depois as alíquotas foram filtradas, seguindo o procedimento descrito anteriormente, e guardadas no escuro até ao momento da sua análise. A quantificação do sulfametoxazol foi efetuada por HPLC-UV como descrito anteriormente.

A transpiração e/ou evaporação foram controladas diariamente nos diferentes recipientes e o nível de líquido, sempre que necessário, foi ajustado com água destilada antes da recolha das amostras, de forma a reduzir o erro na determinação da concentração dos fármacos.

O pH dos diferentes meios foi registado, durante o período de realização dos ensaios, para tal recolheram-se alíquotas de todos os recipientes, para os tempos de contacto de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h e o pH foi registado.

2.5.3. Analise estatística dos resultados

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

III. Apresentação e Discussão dos Resultados

3. Apresentação e Discussão dos Resultados

O trabalho apresentado nesta dissertação consistia no estudo da eficiência de remoção do sulfametoxazol, de um tratamento que era constituído por um LCM seguido de um processo de adsorção em diferentes carvões ativados. Esta avaliação da remoção do sulfametoxazol foi realizada a partir de uma solução que continha mais três fármacos, em simultâneo, o que obrigou a que o processo de quantificação do mesmo, nestas circunstâncias, fosse realizado com recurso à técnica de HPLC.

A necessidade de otimizar as condições que favorecem a remoção deste fármaco, presente em solução, mas também de ajudar a definir as quantidades destes CAs que seriam utilizados na construção de LCM, com matriz de composição variável (trabalho que foi realizado em simultâneo por outros colegas de curso), obrigaram a que os ensaios de adsorção nos CAs fossem realizados previamente em relação ao processo de tratamento por LCM e que as conclusões fossem posteriormente extrapoladas.

Os primeiros ensaios de adsorção permitiram definir o tempo de contacto entre os CAs e o sulfametoxazol, diclofenac, furosemida e trimetoprim até que o tempo de equilíbrio fosse atingido. Para esse fim, foram utilizados três CAs comerciais, com características físico químicas relativamente semelhantes, conforme os dados apresentados na tabela 2.4, ou sejam dois CAs da Norit e um da Panreac. Os dois CAs da Norit encontravam-se sobre a forma granular enquanto que o CA da Panreac se apresentava sobre a forma de um pó fino, figuras 2.3 e 2.4.

As quantidades máximas de adsorção dos CAs face aos fármacos foram previamente determinadas a partir de soluções contendo apenas um fármaco. Nesta primeira fase, a quantificação de cada fármaco foi realizada com recurso à técnica de espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível. O recurso a esta técnica permitiu a identificação do comprimento de onda de absorvância máximo a ser utilizado no doseamento dos vários fármacos por espectrofotometria de UV-VIS, mas permitiu também a definição do valor do comprimento de onda de absorvância máximo a ser utilizado posteriormente no HPLC, aquando da quantificação dos vários fármacos em simultâneo.

3.1 Otimização da metodologia analítica para a quantificação do sulfametoxazol

3.1.1. Espectrofotometria de Ultravioleta/Visível

A primeira parte do trabalho consistiu na obtenção dos espectros de absorção molecular por espectrofotometria, na região do ultravioleta. Ao analisar os espetros de UV-Vis apresentados na figura 3.1 foi possível verificar que o sulfametoxazol apresenta um pico de absorvância máxima por volta dos 267 nm. Foram também obtidos os espectros de absorção do trimetoprim, furosemida e diclofenac, o que permitiu definir os cdo a utilizar posteriormente durante as respetivas quantificações por HPLC.

Da observação do espectro de absorção, figura 3.1, verifica-se que o sulfametoxazol apresenta um máximo de absorvância ao cdo de 267 nm, o diclofenac a 278 nm, o trimetoprim a 204 e 271 nm e a furosemida a 275 nm. Estes valores são consistentes com os valores encontrados na literatura, sendo estes os cdo normalmente utilizados para o doseamento destes compostos em solução aquosa (Alatas e Wulansari, 2008 e Yilmaz et al., 2011).

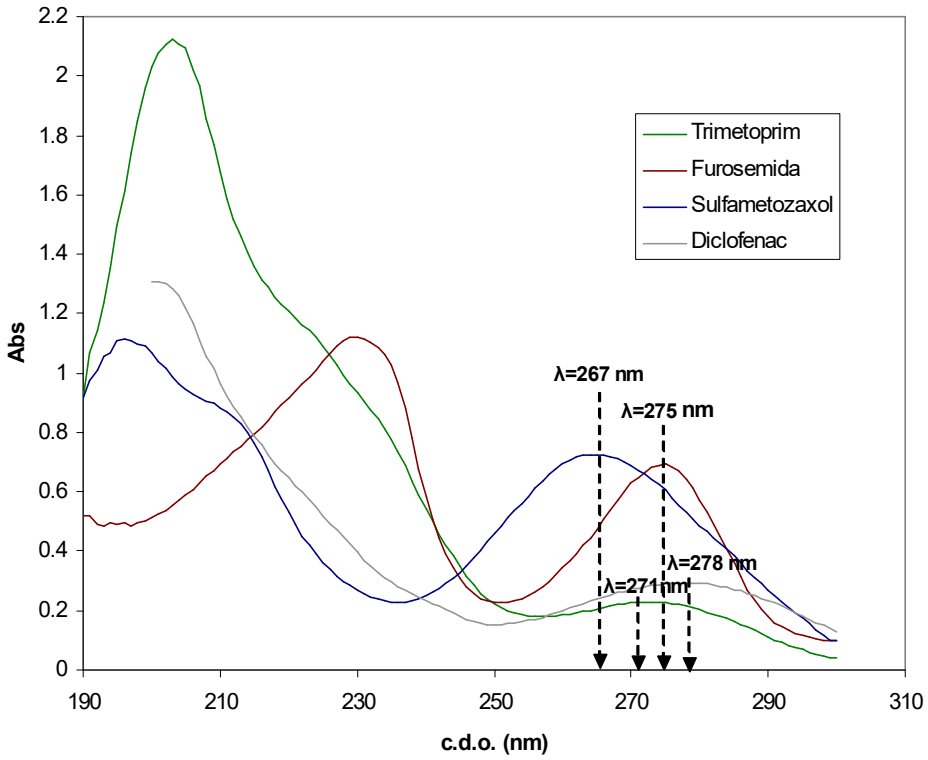


Figura 3. 1 - Espectro de absorção molecular obtido por UV-Vis para o trimetoprim, furosemida, diclofenac e sulfametoxazol

3.1.2. Curvas de Calibração dos diferentes fármacos obtidas por espectrofotometria de UV/VIS

Numa fase inicial foram obtidas as curvas de calibração para os todos os compostos utilizados, de forma a permitir uma posterior quantificação dos mesmos em solução aquosa. Nas figuras 3.2 a 3.5 estão representadas as retas de calibração do trimetoprim, diclofenac, furosemida e sulfametoxazol, respetivamente. As mesmas foram determinadas no espectrofotómetro de UV-Vis utilizando o cdo correspondente ao máximo da absorvância de cada fármaco. Foram também preparadas retas de calibração para os vários fármacos, com recurso ao HPLC, sendo apresentada posteriormente a reta de calibração referente ao sulfametoxazol, visto ser este o fármaco com maior destaque no nosso trabalho.

As leituras de absorvância, para as várias soluções padrão foram registadas a um comprimento de onda de 204 e 271 nm para o trimetoprim, 278 nm para o diclofenac, 275 nm para a furosemida e 267 nm para o sulfametoxazol. Para os quatro fármacos obtiveram-se boas retas de calibração, uma vez que os coeficientes de correlação (R2) foram superiores a 0.998.

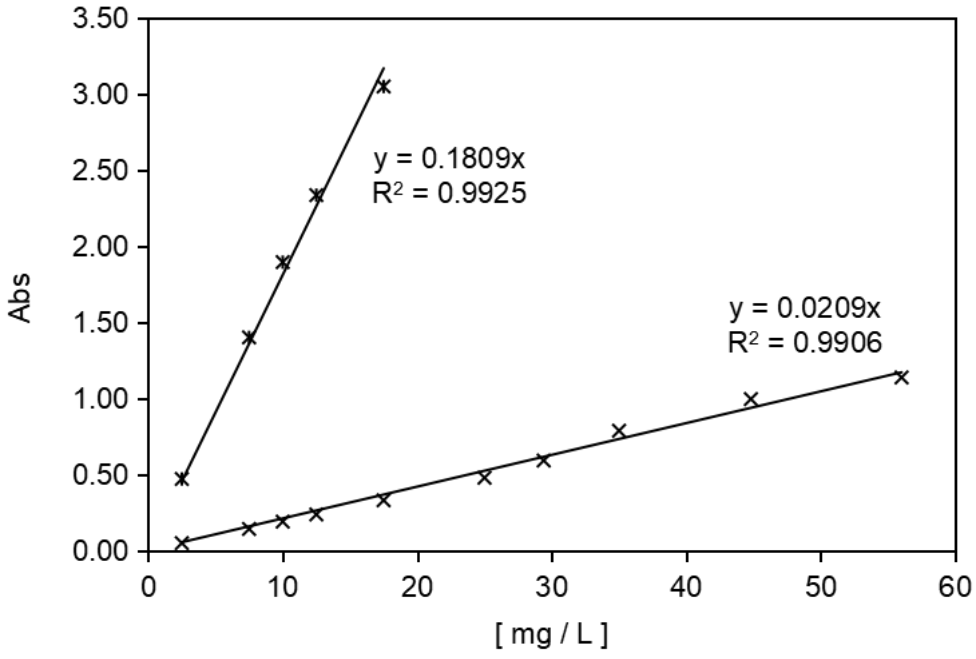


Figura 3. 2 - Retas de calibração do trimetoprim, obtidas por espetrofotometria de UV-VIS, a 204 e 271 nm.

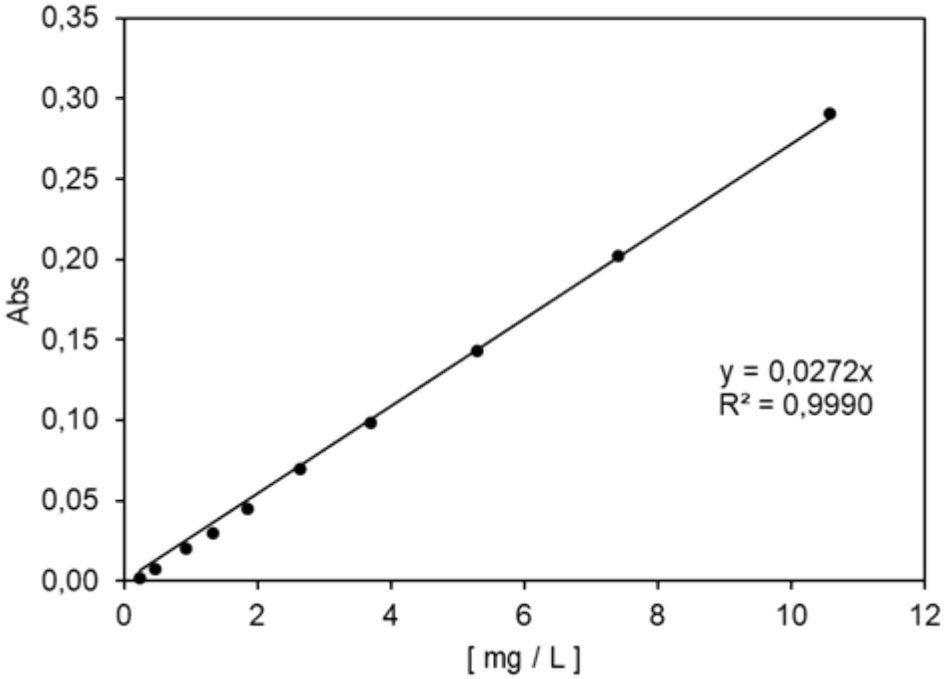


Figura 3. 3 - Reta de calibração do diclofenac, obtida por espectrofotometria de UV-VIS, a 275 nm.

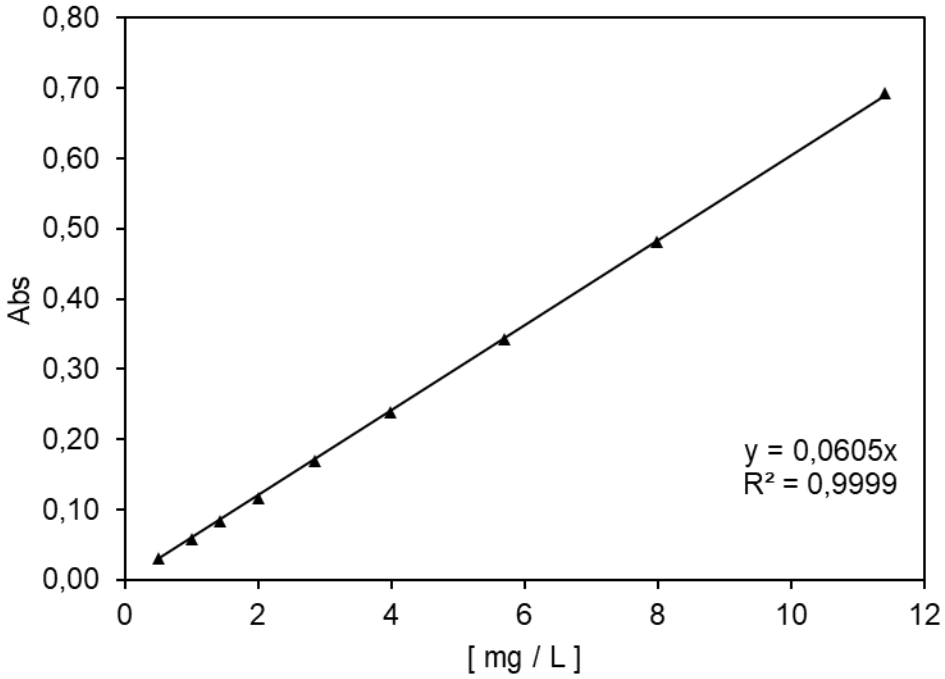


Figura 3. 4 - Reta de calibração da furosemida, obtida por espetrofotometria de UV-VIS, a 278 nm.

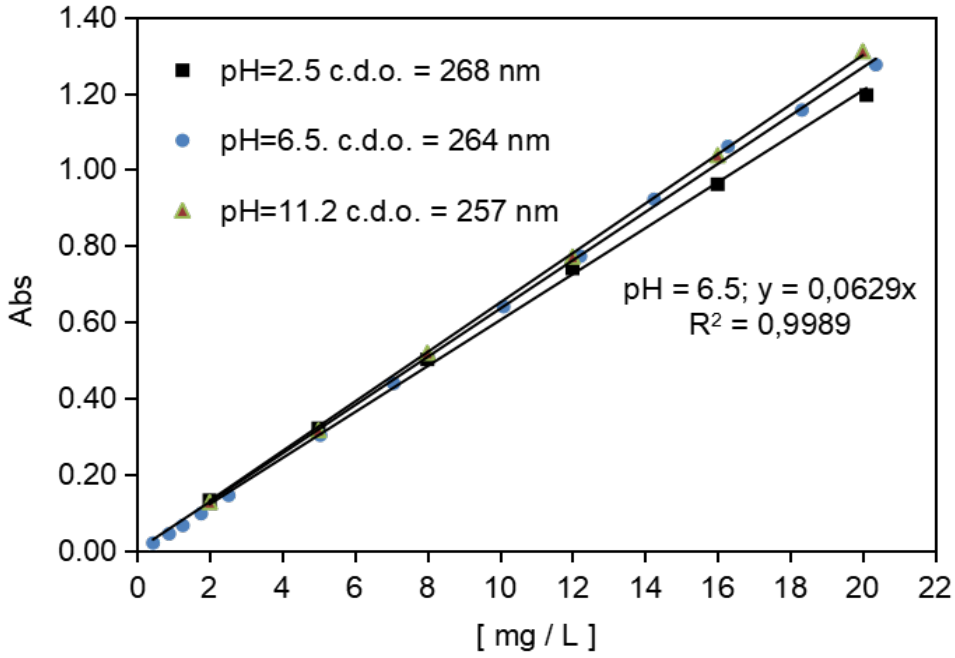


Figura 3. 5 - Retas de calibração do sulfametoxazol, obtidas por espetrofotometria de UV-VIS, em meios com diferentes valores de pH.

A influência do pH do meio nos processos de remoção de sulfametoxazol foi também avaliada. Para que a quantificação do mesmo fosse possível, procedeu-se à preparação de retas de calibração para o sulfametoxazol em meios com diferentes valores de pH, ou seja 2.5, 6.5 e 11.2. Verificou-se, figura 3.5, que à medida que o pH do meio aumentava, o cdo de absorvância máxima se deslocou para valores ligeiramente mais baixos e que o declive das retas de calibração também sofreu pequenas alterações.

3.1.3. Estudo Cinético

Um parâmetro fundamental nos estudos de adsorção, de qualquer poluente, a partir da fase líquida é o tempo necessário para garantir que este processo atinge o equilíbrio e que a capacidade máxima de adsorção do adsorvente foi alcançada. O processo de seleção dos CAs a utilizar, posteriormente, (por outros colegas na preparação de LCM com matrizes compostas), passou pela realização de estudos da cinética da remoção da furosemida, diclofenac e sulfametoxazol, em três CAs, e os vários resultados obtidos estão apresentados nas figuras 3.6 a 3.8. Com o CA da Panreac, foi possível verificar que para a gama de concentrações utilizadas, o equilíbrio foi atingido após um tempo de contacto de 2 h. No entanto, com os dois CA da Norit, após 10 h de contacto, o equilíbrio ainda não tinha sido atingido completamente, pois a quantidade de sulfametoxazol adsorvida continuava a aumentar. Um comportamento semelhante foi observado nas cinéticas de remoção do diclofenac e da furosemida, figuras 3.7 e 3.8.

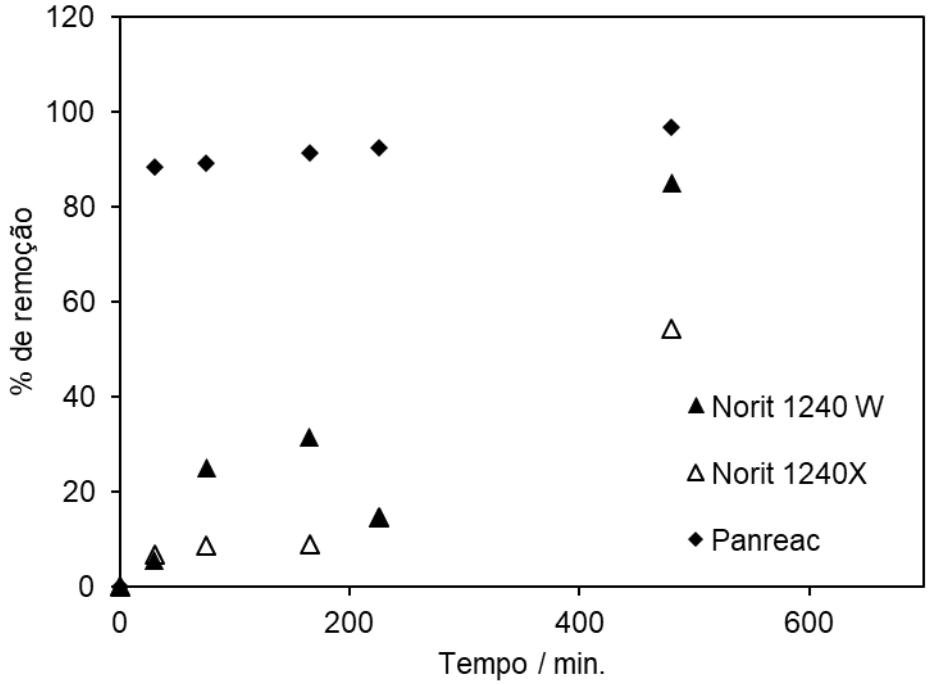


Figura 3. 6 - Percentagem de remoção do sulfametoxazol em função do tempo de contacto, com o CA da Panreac e os dois CA da Norit

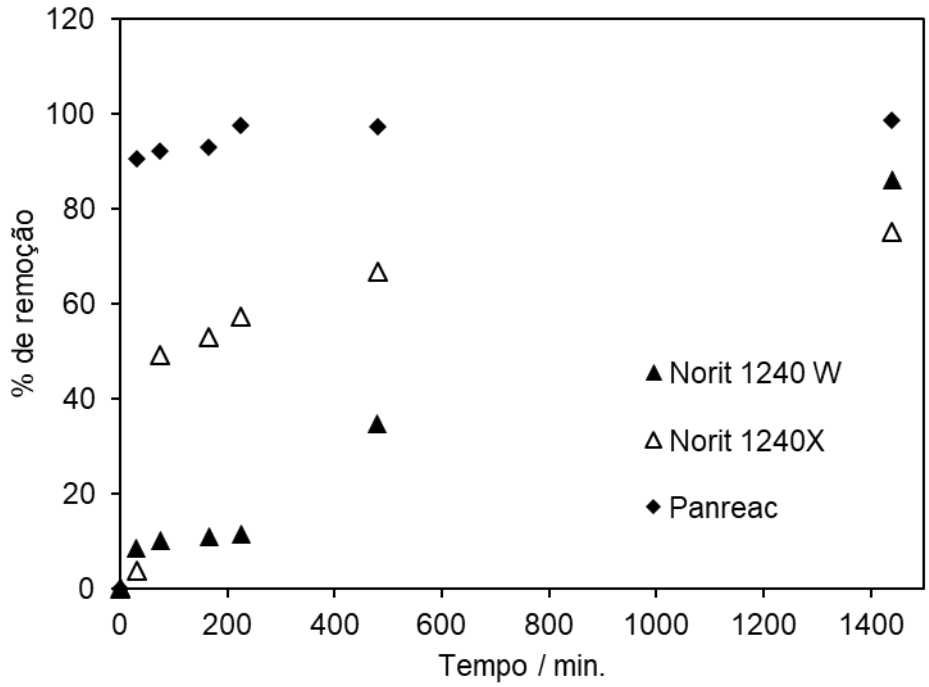


Figura 3. 7 - Percentagem de remoção da furosemida em função do tempo de contacto, em 3 carvões ativados.

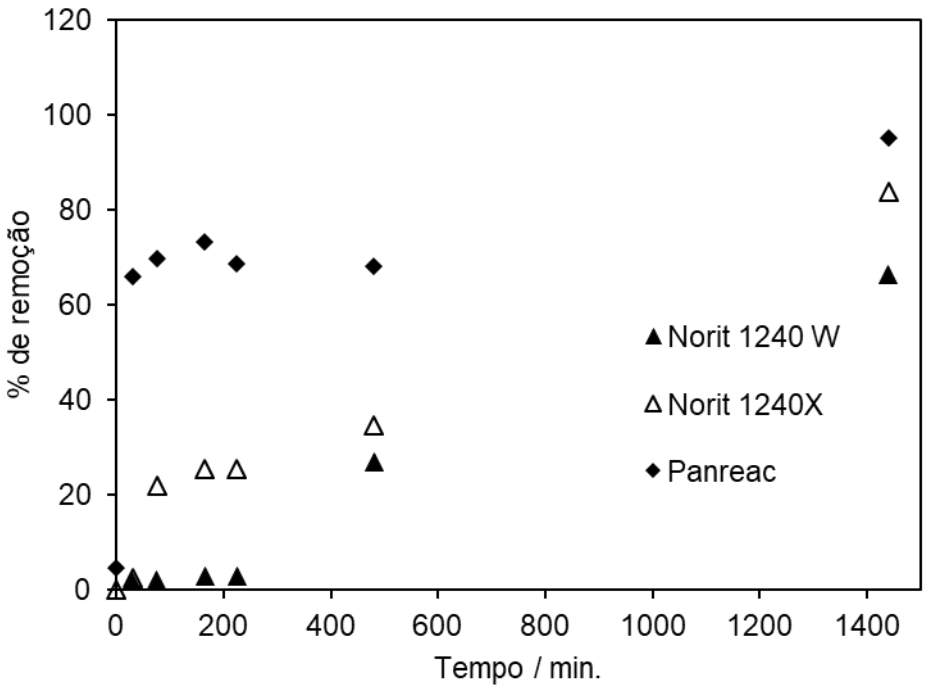


Figura 3. 8 - Percentagem de remoção do diclofenac em função do tempo de contacto, em 3 carvões ativados.

Para o processo de adsorção podem contribuir vários fatores, tais como a difusão das moléculas do adsortivo, do meio da solução até à superfície externa do adsorvente, a difusão intra-partícula, ou seja, a difusão das moléculas de adsortivo através dos poros do adsorvente até aos centros ativos de adsorção.

No caso da adsorção nos carvões ativados sob a forma granular, a difusão no seio da solução parece ser a etapa limitante deste processo. Como é possível verificar, figuras 3.6 a 3.8, as cinéticas de remoção do sulfametoxazol, furosemida e diclofenac pelo CA da Panreac são muito rápidas, pois ao fim de 1 h, a quantidade removida de cada fármaco situava-se acima dos 80% da remoção total. Assim para uma situação de emergência, este CA apresenta-se como uma boa solução para a remediação imediata e resolução eficaz do caso. Por outro lado, os CA da Norit exibem uma capacidade máxima de remoção face aos três fármacos que é significativamente inferior à capacidade máxima de adsorção do CA da Panreac. Mas mais relevante é que a cinética de adsorção dos três fármacos nos CA da Norit é muito mais lenta quando comparada com a cinética de adsorção do CA da Panreac.

Nas gamas das concentrações utilizadas, os três CAs testados apresentaram capacidades de remoção seguindo a ordem: furosemida > sulfametoxazol > diclofenac. O carvão ativado da Panreac foi o que apresentou maiores capacidades de remoção face aos três fármacos, como é possível perceber pela comparação apresentada na figura 3.9.

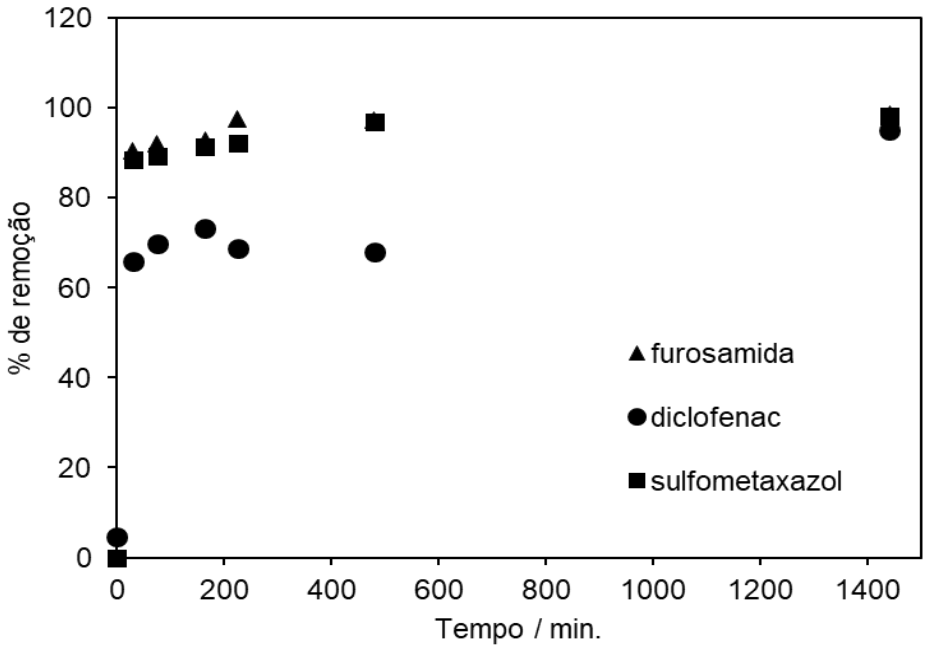


Figura 3. 9 - Percentagem de remoção dos três fármacos no CA da Panreac, em função do tempo de contacto.

Refira-se ainda que, a percentagem de remoção alcançada nos diferentes ensaios depende das concentrações iniciais do fármaco utilizado. Assim, quando os fármacos estão presentes em concentrações baixas, as percentagens de remoção são mais elevadas, mas à medida que a superfície dos CAs vai ficando saturada a percentagem de remoção relativa dos mesmos vai diminuindo.

3.1.4. Influência da temperatura na adsorção de sulfametoxazol

A influência da temperatura no processo de remoção do sulfametoxazol, nos diferentes CA, foi avaliada através do seguimento da cinética do processo, a diferentes temperaturas. Pretendeu-se perceber de que forma a temperatura influencia a capacidade de remoção do sulfametoxazol, em dois CA, um da Norit 1240 W e outro da Panreac, e os resultados obtidos estão apresentados na figura 3.10.

No CA da Norit 1240 W, os resultados mostram que o aumento da temperatura teve uma contribuição favorável na adsorção do sulfametoxazol. No CA da Panreac o efeito da temperatura é menos percetível. O carvão da Norit 1240 W foi utilizado sobre a forma granular, e é visível a presença de uma cinética de adsorção mais lenta, quando comparada com a cinética de adsorção no CA da Panreac. Neste caso, o aumento da capacidade de adsorção de sulfametoxazol, com a temperatura, pode ser atribuído ao aumento da difusão do soluto, do meio da solução, até à superfície externa do CA.

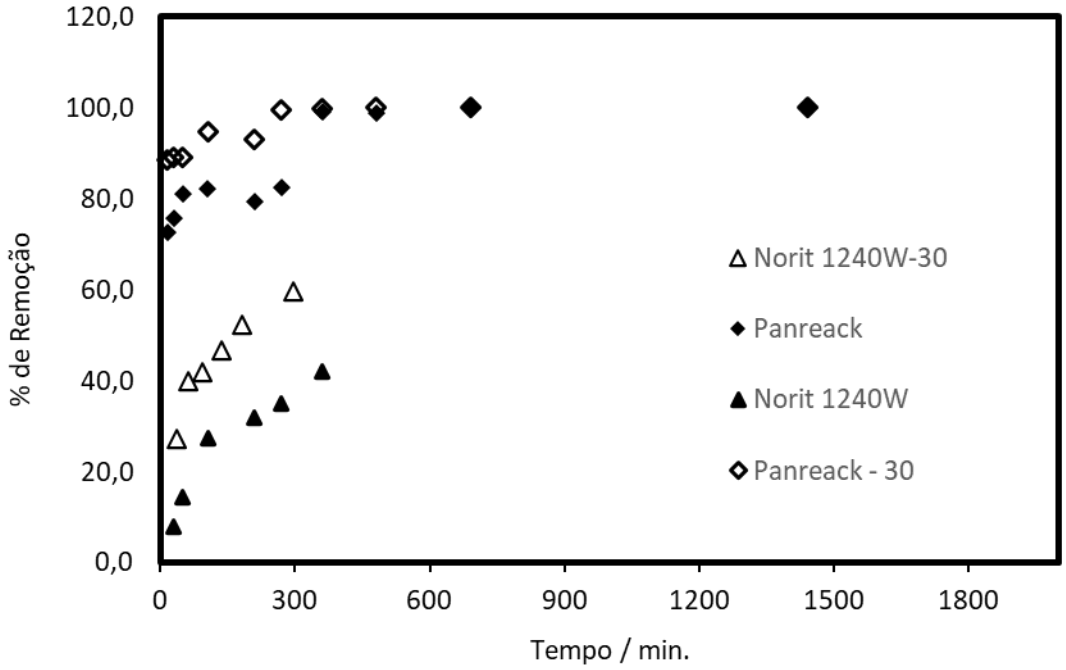


Figura 3. 10 - Influência da temperatura na remoção do sulfametoxazol nos diferentes CAs

3.1.5. Influência do pH do meio na adsorção de sulfametoxazol

A influência do pH do meio, na remoção do sulfametoxazol, entre valores que variaram de 2.5 até aos 11.6 foi também avaliada. Verificou-se que o aumento da acidez do meio favorece a adsorção do sulfametoxazol. A quantidade máxima de sulfametoxazol removida por grama de carvão ativado foi obtida com o CA da Panreac, a partir de um meio com um pH de 2.5, e foi de 101,3 mg/g, mas a capacidade máxima do mesmo ainda não tinha sido alcançada. No entanto, as isotérmicas de adsorção foram realizadas num meio com pH igual a 6.5, por forma a simular a acidez dos vários efluentes líquidos que são tratados nas ETARs.

Considerando os efeitos da temperatura e da acidez do meio na remoção do sulfametoxazol, torna-se então relevante determinar a capacidade máxima de adsorção de cada CA.

3.1.6. Isotérmicas

Por uma questão de agilização dos trabalhos práticos realizados em laboratório e de forma a contemplar a possibilidade de utilizar os CA da Norit, caso no decorrer dos trabalhos futuros (ou no trabalho que estava a ser realizado em paralelo por outros colegas) esta possibilidade se mostrasse vantajosa, optamos por trabalhar com um tempo de equilíbrio de 7 h. Procedemos

então à obtenção de isotérmicas de adsorção do sulfametoxazol no CA da Panreac e nos CAs da Norit, e as representações gráficas estão ilustradas na figuras 3.11 e 3.12.

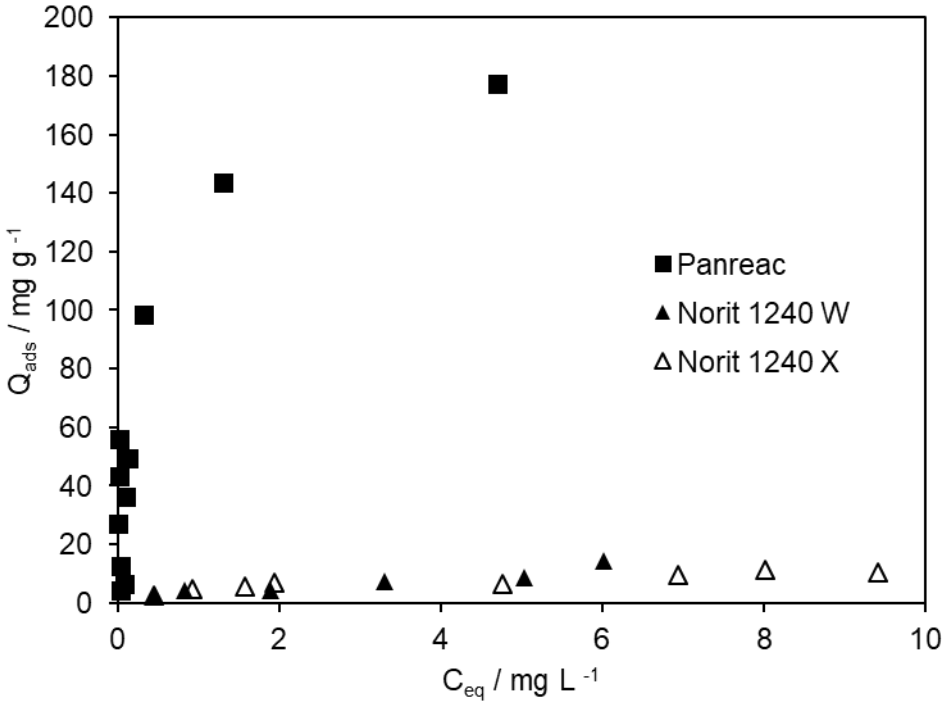


Figura 3. 11 - Isotérmicas de adsorção do sulfametoxazol, obtidas nos três carvões ativados, a 25ºC.

Os CA avaliados exibiram diferentes comportamentos, nomeadamente no que se refere à quantidade máxima de fármaco adsorvida. O CA da Panreac exibiu uma subida acentuada, que terminou com um patamar bem definido, e cujos valores máximos de remoção de sulfametoxazol atingiram os 177 mg g $^{-1}$. Observando de forma atenta a figura 3.11, podemos verificar que a isotérmica de adsorção do sulfametoxazol ainda não se encontra em pleno patamar, sendo possível verificar que a capacidade máxima de adsorção do CA ainda não foi completamente atingida. No entanto, os CAs da Norit exibiram isotérmicas pouco definidas, com um degrau mal definido, indicador de uma adsorção continuada e lenta. A capacidade máxima de adsorção dos CAs da Norit face ao sulfametoxazol foi na ordem dos 15 mg g $^{-1}$, ficando muito aquém do valor alcançado pelo CA da Panreac.

O carvão ativado da Norit foi ainda utilizado na remoção do diclofenac e furosemida e as isotérmicas obtidas estão apresentadas na figura 3.12. Uma observação cuidadosa permite verificar que as isotérmicas dos três fármacos são quase sobreponíveis na gama das concentrações utilizadas. Esta observação permite confirmar que o fator limitante durante o processo de adsorção dos fármacos nos CAs da Norit é a difusão dos mesmos no seio da solução.

No caso do CA da Panreac, como o mesmo se apresentava na forma de um pó fino, durante o tempo de equilíbrio, o contacto entre os fármacos e a superfície do CA era mais rápido e a cinética da reação mais rápida. Nesta situação, o fator limitante na remoção dos fármacos estará

mais intimamente ligado à disponibilidade dos centros ativos na superfície do CA e à afinidade entre o adsorvente (CA) e o adsortivo (fármaco).

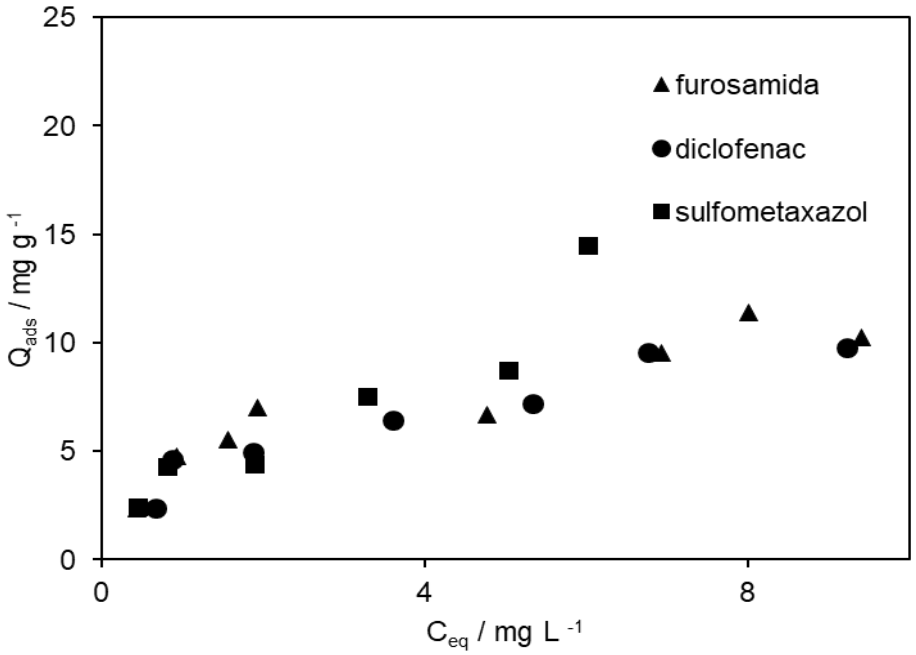


Figura 3. 12 - Isotérmicas de adsorção do sulfametoxazol, diclofenac e furosemida, obtidas no Norit 1240 W, a 25ºC.

Os resultados obtidos permitem confirmar que o CA da Panreac exibe uma maior capacidade de remoção do sulfametoxazol do que os CAs da Norit, possibilitando a recomendação do uso do mesmo na construção de leitos de macrófitas modificados (trabalho que estava a ser realizado por outros colegas de mestrado). A elevada capacidade de remoção exibida, na ordem dos 177 mg g^{-1}, permite calcular a proporção de CA que deve ser adiciona na construção dos LCM e a avaliar o tempo necessário para que os mesmos fiquem saturados, tendo em conta a concentração dos fármacos utilizados.

3.2. Quantificação do sulfametoxazol em solução aquosa por HPLC

Uma parte importante do trabalho aqui apresentado consistiu na avaliação da remoção do sulfametoxazol com recurso aos LCM, quando o mesmo se encontrava em solução aquosa na presença de outros fármacos, por forma a simular a composição de um efluente real. Nestes ensaios, a quantificação do sulfametoxazol foi feita recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência, com um detetor UV-Vis, de acordo com as condições descritas na secção 2.3.2, e o perfil cromatográfico traçado a 267 nm está apresentado na figura 3.13.

Após a otimização das várias condições de trabalho (composição do eluente, pressão), a atribuição dos picos de cada um dos quatro compostos foi feita por comparação com os tempos de retenção obtidos dos cromatogramas das soluções padrão de cada composto isolado. O tempo de

retenção do sulfametoxazol foi de 2.9 minutos e a quantificação do mesmo foi feita com recurso à reta de calibração, apresentada na figura 3.14.

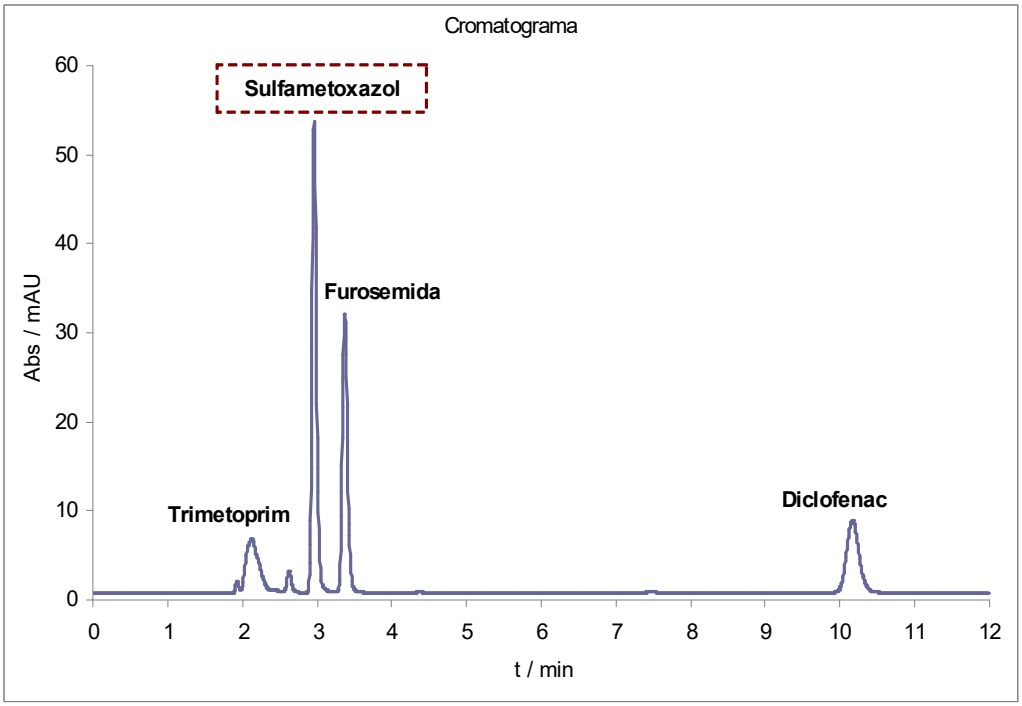


Figura 3.13 - Cromatograma obtido por HPLC-UV para uma solução com os quatro fármacos (trimetoprim, sulfametoxazol, furosemida e diclofenac).

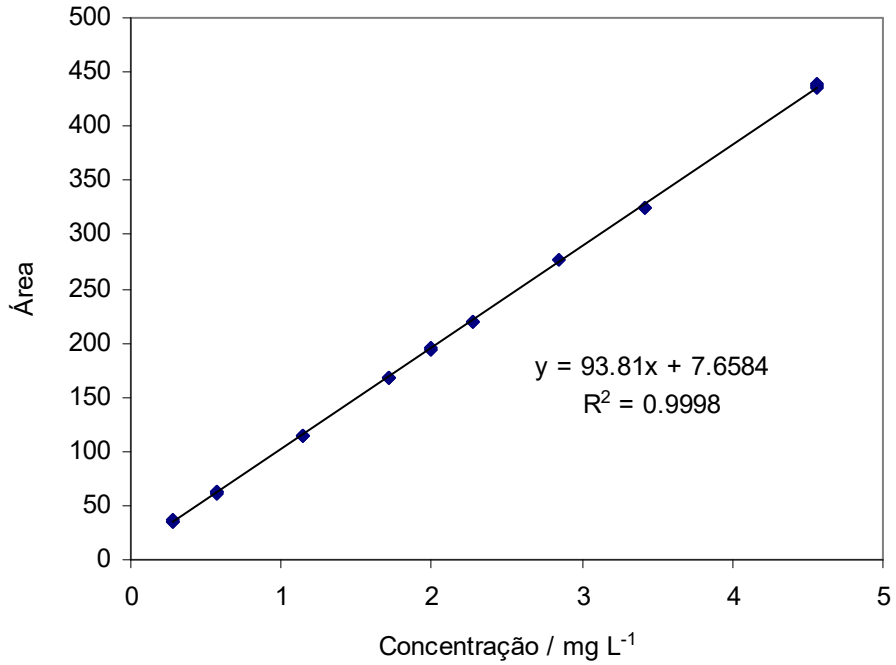


Figura 3.14 - Reta de calibração para o sulfametoxazol, obtida por HPLC-UV

De forma semelhante, a quantificação de cada fármaco foi efetuada recorrendo à injeção das várias soluções padrão, contendo os quatro fármacos, o que permitiu a obtenção das respetivas retas de calibração. Para o sulfametoxazol, obteve-se uma boa reta de calibração, com um coeficiente de determinação (R2) de 0,9998 sugerindo que, os valores de concentração obtidos, a partir da reta de regressão linear, são fiáveis na gama de valores considerada.

3.3. Validação do método analítico

A metodologia analítica utilizada depois de ser otimizada para a quantificação do sulfametoxazol por HPLC-UV apresentou uma boa exatidão (98.9-102.5%), reprodutibilidade (DPR < 2.9 %) e repetibilidade (DPR < 2.5%), na gama das concentrações utilizadas (0.25 – 3.5 mg L^{-1}), sendo que estes parâmetros foram determinados por outros elementos do grupo de trabalho. No entanto, verificou-se também que a repetibilidade é mais elevada para as soluções com as concentrações mais altas (3.5 mg L^{-1}, DPR = 0.2 %) do que para as concentrações mais baixas (0.25 mg L^{-1}, DPR = 2.5 %) o que está interligado com a sensibilidade do equipamento.

Foram ainda determinados os valores do limite de deteção instrumental (LDI) e do limite de quantificação instrumental (LQI), para a técnica de HPLC-UV, sendo os mesmos de 0,02 mg L^{-1} e 0.07 mg $L^{-1,}$ respetivamente.

3.4. Otimização do volume a filtrar

Para otimizar o volume de solução a filtrar nos filtros de nylon de 0,45 µm para posterior análise em HPLC-UV, minimizando a perda de analito no filtro, foram testados volumes crescentes de uma solução do sulfametoxazol com uma concentração de 2 mg L^{-1}. As percentagens de recuperação obtidas nos vários testes estão apresentadas na figura 3.15.

Dos resultados obtidos, pode-se concluir que a retenção do sulfametoxazol na membrana de nylon do filtro é relativamente baixa pois filtrando apenas 5 mL de solução (figura 3.15) com uma concentração de 2 mg L^{-1}, a percentagem de recuperação do composto foi próxima de 100% (98.1 ± 0.7). Aumentando o volume filtrado verifica-se um ligeiro acréscimo da percentagem de recuperação de analito, atingindo uma percentagem de recuperação do sulfametoxazol de 100% para um volume filtrado de 10 mL. Um aumento do volume de solução filtrada até aos 60 mL, não permitiu verificar diferenças significativas nas percentagens de recuperação do composto, tal como se pode comprovar pelos resultados apresentados na figura 3.15.

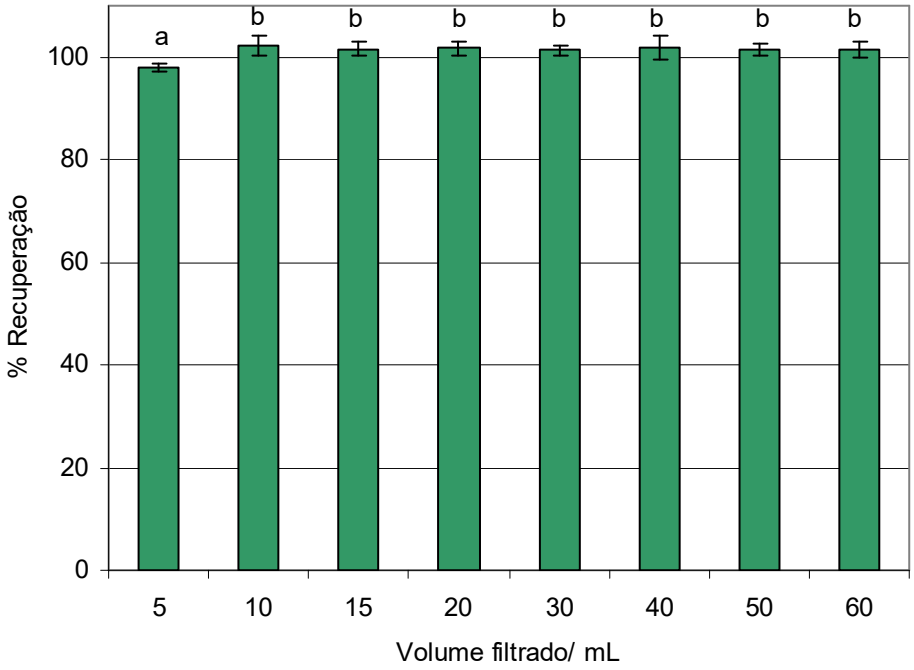


Figura 3.15 - Percentagem de recuperação do sulfametoxazol filtrado em filtros de nylon 0,45 µm para a concentração de 2 mg L^{-1} (média ± DP; n=9). Diferentes letras significam valores significativamente diferentes para $P < 0.05$.

Considerando os resultados obtidos nestes testes, e para garantir uma elevada percentagem de recuperação do composto antes da utilização de cada filtro pela primeira vez, filtraram-se 10 mL de solução contendo o composto numa concentração de 2,0 mg L^{-1}. Nas utilizações seguintes, o volume filtrado foi sempre de 10 mL e recolheu-se o último mL para análise. Cada filtro foi utilizado no máximo 6 vezes, o que corresponde a um volume total filtrado de 60 mL, que foi o volume máximo utilizado durante os testes de recuperação.

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

Dadas as boas eficiências obtidas em estudos anteriores na remoção de outros fármacos (Dordio et al., 2017), utilizando sistemas de LCMs plantados com *Typha* spp., foi estudada a eficiência destes sistemas para a remoção do sulfametoxazol da água dopada com quatro fármacos (trimetoprim, furosemida, sulfametoxazol e diclofenac), numa concentração de ≈ 2,5 mg L^{-1} para cada fármaco.

Como já foi referido anteriormente, a matriz selecionada para a realização destes ensaios foi a mistura composta por 2 materiais argilosos, a LECA 2/4 e a vermiculite 2, numa razão de por

(1:1; v:v), pois tanto a LECA como a vermiculite já tinham demonstrado elevadas eficiências na remoção de poluentes orgânicos e xenobióticos presentes em águas, incluindo fármacos (Dordio et al., 2017, Dordio e Carvalho, 2013).

Em estudos anteriores, realizados com outros fármacos, verificou-se que a vermiculite apresentou uma maior capacidade de adsorção desses fármacos por massa de adsorvente, mas que a LECA removeu uma maior quantidade total dos fármacos para o mesmo volume de material (Dordio et al., 2017). Estes resultados devem-se ao facto de a vermiculite apresentar uma densidade aparente mais baixa e, assim ao mesmo volume de material testado corresponde a uma massa inferior. Nos mesmos estudos, a vermiculite apresentou uma cinética de adsorção mais rápida do que a LECA, o que pode estar relacionado com a sua maior porosidade e, em particular, com a sua estrutura laminar que disponibiliza uma maior área superficial mais facilmente acessível aos fármacos (Dordio et al., 2017).

Com base nos resultados obtidos anteriormente por elementos do grupo, pareceu-nos pertinente experimentar a utilização de uma mistura destes dois materiais, que permitisse beneficiar das vantagens de cada um deles. Os critérios de seleção destes materiais assentaram na sua capacidade tampão de pH e numa adequada condutividade hidráulica, aliados a um baixo custo de aquisição. A mistura de LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 2 na proporção de 1:1 (v:v) mostra um carácter ligeiramente básico, com um pH ≈ 8.67, uma porosidade de 54% e uma densidade aparente de 391 (kg m^{-3}). A mistura destes dois materiais argilosos apresenta uma elevada porosidade, isso disponibiliza maiores áreas de contacto com as soluções e com os fármacos a remover, e permite ainda um maior arejamento da matriz, favorecendo o surgimento de condições aeróbias.

Por ocasião da realização dos ensaios, no início de maio, as plantas dos microcosmos de LCMs encontravam-se já numa fase avançada do crescimento, apresentando uma altura média de 85 cm, sendo que a folha menor apresentava um tamanho de cerca de 48 cm e a folha maior 122 cm e uma densidade média nos leitos de 55 plantas por metro quadrado.

Como o pH do meio é um fator que afeta a capacidade de adsorção nos materiais argilosos, bem como o desenvolvimento da vegetação e da população microbiana nos LCMs, mediram-se os valores de pH da solução durante o período de realização dos ensaios. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na figura 3.16.

Da análise dos dados, verificou-se que os valores de pH da solução do Ensaio IV (sem plantas nem matriz) foram aqueles que apresentaram menores variações ao longo do tempo, variando apenas entre 6.02 – 6.19. Ou seja, os mesmos mantiveram valores de pH ligeiramente ácidos devido às características ácidas dos fármacos presentes em solução e também em resultado da exposição da solução ao ar.

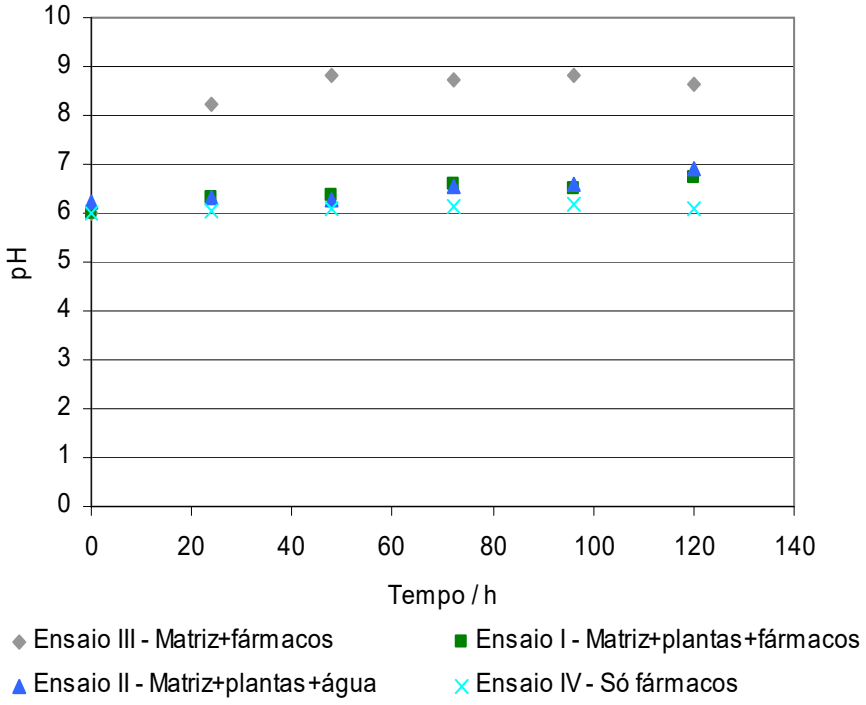


Figura 3.16 - Valores do pH do meio, dos diferentes ensaios ao longo da experiência

Por outro lado, nos leitos do Ensaio III (composto exclusivamente pela matriz e pela solução com os fármacos) verificou-se um aumento dos valores de pH nos primeiros instantes de contacto da solução com a matriz, mantendo-se depois aproximadamente constantes ao longo de toda a experiência (~8.7).

Os valores de pH atingidos são os característicos da presença da matriz em água (tabela 2.3). A LECA tinha sido caraterizada quimicamente em estudos anteriores (Dordio et al., 2017) e comprovou-se a existência, na sua composição, de alguns constituintes como certos óxidos e carbonatos, que permitem explicar este carácter alcalino do material.

Em ambos os leitos plantados (Ensaios I e II) os valores de pH foram muito semelhantes, situando-se em valores intermédios e próximos da neutralidade, ou seja, entre 6 e 7. Estes resultados demonstram que as plantas têm um efeito moderador da alcalinidade da matriz, podendo tal capacidade resultar da libertação pelas plantas de exsudados, os quais contêm normalmente ácidos orgânicos de baixo peso molecular, tais como o ácido oxálico, málico, fórmico, acético, que contribuem para a diminuição do pH do meio contendo a matriz e as plantas (Wu et al., 2012).

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

De facto, nas condições de ensaio (valores de pH de 6 - 7 nos leitos plantados e 8 - 9 nos leitos não plantados) o sulfametoxazol (pKa ≈ 5.7) está desprotonado (pH do meio > pKa), encontrando-se assim numa forma aniónica, enquanto que a superfície dos materiais da matriz de suporte, em particular a LECA (pHPCZ ≈ 9.67) (Dordio et al., 2017) está carregada positivamente (pH do meio < pH_{PCZ}). Tais condições permitem, em especial com a LECA, que a adsorção seja favorecida por interações eletrostáticas.

É ainda importante salientar que durante o período que decorreu a experiência, as plantas expostas aos fármacos não apresentavam quaisquer sinais visíveis, que denunciassem a presença de toxicidade, tais como o aparecimento de cloroses (amarelecimento das folhas), folhas murchas ou secas na parte superior. Também não se verificaram diferenças no desenvolvimento vegetativo entre as plantas expostas à solução contendo os fármacos, e as plantas que estiveram apenas em contacto com a água.

3.6. Remoção dos fármacos pelos microcosmos de LCMs

Foram realizados quatro ensaios, tal como descrito na secção 2.5.1. O principal objetivo da experiência prendia-se com a avaliação da cinética e da capacidade de remoção do sulfametoxazol, utilizando um microcosmos de leitos construídos de macrófitas plantado com *Typha* spp. e com uma matriz constituída por uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite 2 (1:1, v:v) (Ensaio I). Adicionalmente, pretendeu-se avaliar o efeito fitotóxico dos fármacos (Ensaio II) nas plantas, avaliar a contribuição da matriz (LECA + vermiculite) na remoção do fármaco (Ensaio III), e determinar se existe alguma contribuição para a remoção do sulfametoxazol por outras vias, nomeadamente fotodegradação, hidrólise ou adsorção às paredes dos recipientes (Ensaio IV).

Nos ensaios utilizou-se uma solução aquosa contendo 2,5 mg L^{-1} de sulfametoxazol e a duração máxima dos mesmos foi de 120 h. As percentagens de remoção de sulfametoxazol obtidas nos vários ensaios estão apresentadas na seguinte figura 3.17.

No que refere ao ensaio IV, verifica-se que a concentração do fármaco em solução se manteve aproximadamente constante ao longo de todo o período em que decorreu a experiência, sendo a sua remoção global próxima de zero. Estes resultados permitem depreender que, os efeitos de fotodecomposição, hidrólise ou adsorção às paredes dos recipientes de PVC são desprezáveis.

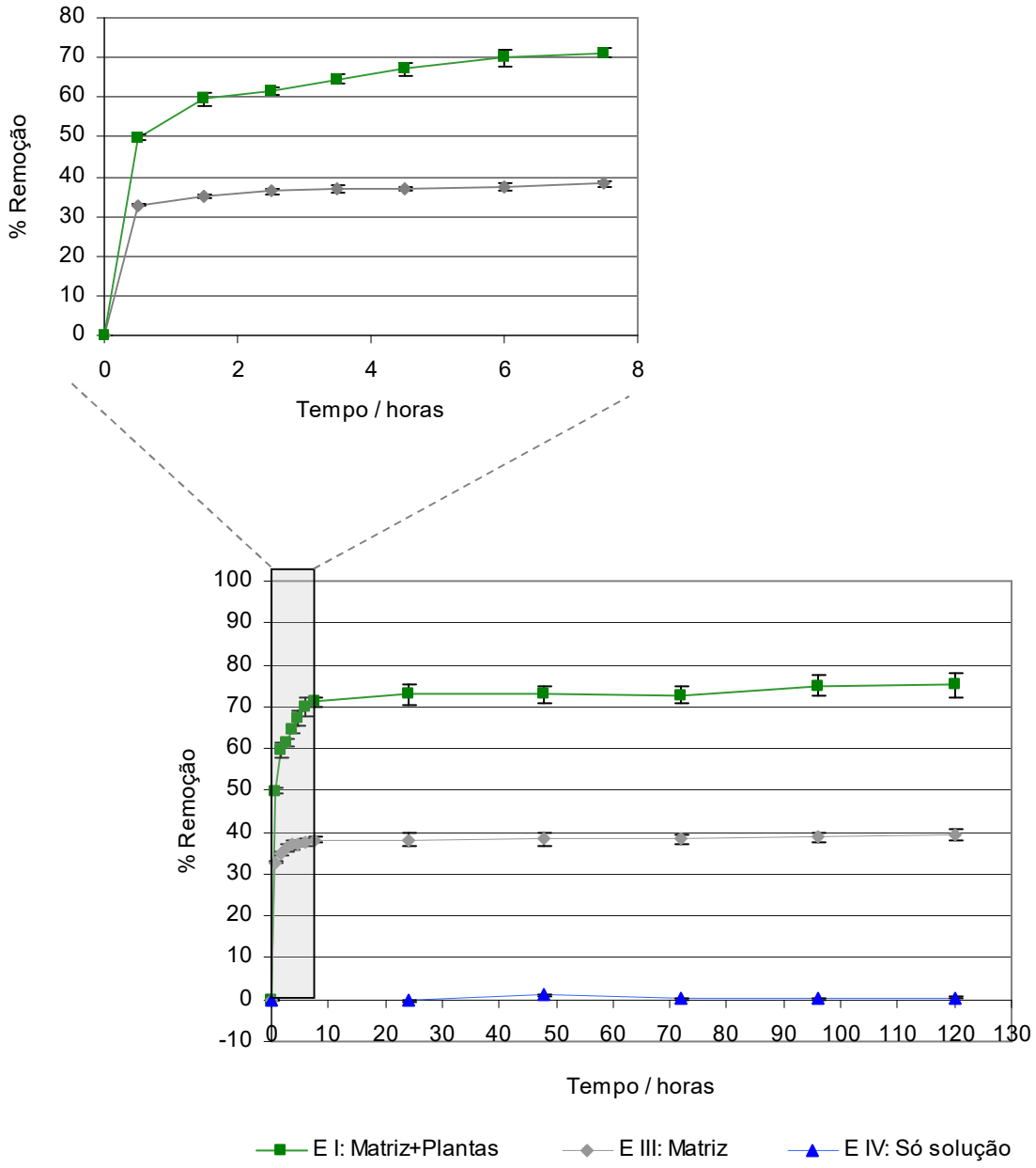


Figura 3.17- Percentagem de remoção do sulfametoxazol nos ensaios I, III e IV em função do tempo de contacto. Valores médios ± desvio padrão

s

Da análise da figura 3.17 verifica-se que tanto no microcosmos de LCMs plantado (Ensaio I) como nos microcosmos não plantados (Ensaio III) a cinética de remoção do sulfametoxazol caracterizara-se por um passo inicial rápido (primeiras horas), provavelmente devido à adsorção do fármaco na superfície da matriz mais facilmente acessível, embora nos leitos plantados deva, também, ter ocorrido alguma adsorção às raízes das plantas. Neste primeiro passo, a maior quantidade de sulfametoxazol removida (83> % e 66 > % nos leitos plantados e não plantados, respetivamente) ocorre durante a primeira meia hora de contacto, como ilustrado na figura 3.17.

O facto de neste primeiro passo a remoção ocorrer muito rapidamente pode estar relacionado com a elevada porosidade da matriz, em particular da vermiculite, que devido à sua estrutura laminar, disponibiliza uma grande área superficial facilmente acessível para a adsorção do sulfametoxazol. Sendo também de salientar a adsorção rápida (mas menos extensa) à superfície exterior dos grânulos de LECA. No caso do leito plantado (Ensaio I) deve-se também considerar a adsorção do sulfametoxazol às raízes das plantas, que na altura da realização dos ensaios apresentavam um sistema radicular muito desenvolvido. Este processo deverá ser o principal responsável pela diferença observada na percentagem de remoção do sulfametoxazol, na primeira meia hora de contato, entre os leitos não plantados (32.9%) e o leito plantado (49.9%), que corresponde a 17% da remoção.

Posteriormente, tanto no Ensaio I como no III verificou-se uma fase mais lenta de remoção do sulfametoxazol pois, a adsorção mais extensa à superfície interna dos poros microscópicos, principalmente da LECA, implica um processo de difusão, mais lento, para o seu interior. Adicionalmente, pode ter ocorrido a biodegradação do composto pelos microrganismos e/ou absorção pelas plantas, mas ambos os processos são relativamente lentos.

Provavelmente porque os processos de remoção bióticos são mais lentos verificou-se que no do leito plantado (Ensaio I) a remoção do sulfametoxazol ainda apresentava um ligeiro acréscimo quando se deram os ensaios por terminados. Estes dados permitem confirmar que, ao fim de 120 horas ainda não tinha sido atingido o equilíbrio para os processos de remoção do fármaco no leito plantado. Enquanto nos leitos não plantados (Ensaio III) atingiu-se o equilíbrio entre as 6 e 7.5 horas, pois após este tempo de contacto não se verificaram aumentos significativos na percentagem de remoção do composto.

Da observação da figura 3.17, constata-se que no final dos ensaios, ou seja, ao fim de 120 h de contacto, a matriz foi responsável, através de processos de adsorção, por uma percentagem de remoção de aproximadamente 39.4% do sulfametoxazol presente em solução, enquanto que no leito plantado, a percentagem de remoção de sulfametoxazol atingiu os 75.3%. Verifica-se, portanto que a presença de plantas no leito contribui para uma remoção adicional de 36% de sulfametoxazol. A maior eficiência de remoção obtida no leito plantado poderá resultar da contribuição de vários processos que, direta ou indiretamente, são resultantes da presença das plantas no sistema, com destaque para:

I. a adsorção do fármaco nas raízes;

II. a biodegradação na rizosfera – melhorada nos leitos plantados devido à estimulação do desenvolvimento dos microrganismos pela libertação de exsudados das plantas, ou pela catálise da degradação dos compostos por enzimas presentes nesses exsudados; e ainda

III. a absorção e possível translocação do fármaco para a parte aérea da planta, acompanhada de uma eventual metabolização ou sequestração em compartimentos celulares adequados

Os compostos orgânicos xenobióticos não possuem transportadores específicos nas membranas celulares, sendo por isso, por simples difusão que entram na planta e se movem dentro dos tecidos vegetais (Pilon-Smits, 2005). A mobilidade do composto está, no entanto, dependente das suas propriedades físico-químicas, especialmente, a sua hidrofobicidade (Dietz e Schnoor, 2001; Pilon-Smits, 2005). Os compostos moderadamente hidrofóbicos (geralmente assim considerados se log Kow for entre 0.5 e 3.5) são suficientemente lipofílicos para conseguirem atravessar a camada fosfolipídica das membranas celulares e suficientemente solúveis em água para poderem ser transportados em conjunto com os fluídos celulares (Pilon-Smits, 2005). Compostos com log Kow > 3.5 são considerados demasiado hidrofóbicos e, em geral, deverão ser fortemente adsorvidos às paredes celulares e à camada lipofílica da raiz, com consequente redução na sua entrada e translocação no interior da planta. Por outro lado, compostos bastante solúveis em água (log Kow < 0.5) não são, em geral, suficientemente adsorvidos às raízes nem efetivamente transportados através da bicamada lipídica das membranas celulares.

O sulfametoxazol com um log Kow = 0.89, pode ser considerado moderadamente hidrofóbico e, portanto, com características boas para ser absorvido pelas plantas, translocado e atravessar as membranas celulares para o interior das suas células. Entretanto, alguns estudos indicam que o valor de log Kow pode não ser o único fator determinante para propiciar a sua absorção pelas plantas. De facto, há alguns casos de compostos capazes de atravessar membranas de plantas, apesar de possuírem um baixo log Kow (Renner, 2002). O potencial para um composto ser removido por uma dada planta pode depender de outros fatores, tais como a sua concentração inicial, a anatomia e o sistema radicular da planta, etc. (Chaudhry, et.al, 2005).

Apesar de, em geral, os processos bióticos (plantas e população microbiana) permitirem uma remoção mais definitiva dos poluentes orgânicos, como os fármacos, por degradação /transformação, estes são processos mais lentos e mais dependentes das condições ambientais (principalmente da temperatura, da humidade e da presença de compostos tóxicos) do que os processos de adsorção. Estes últimos permitirem apenas a retenção (temporária ou permanente) dos poluentes, mas são em geral processos mais rápidos, principalmente quando o material adsorvente apresenta uma elevada área superficial. Assim, a utilização de vários processos de remoção em simultâneo no mesmo sistema ou sequencialmente permite tirar partido das vantagens de cada um dos processos de remoção aumentando a eficiência global do sistema de tratamento.

Após tudo o que foi referido, o trabalho aqui apresentado revela-se bastante promissor. A possibilidade de combinar a remoção de fármacos num microcosmo de LCM com um processo de adsorção dos fármacos em CA pode ser a solução ideal principalmente em situações excecionais. Na realidade, os ensaios de remoção do sulfametoxazol pelos LCM plantados com - spp, exibiram capacidades de remoção próximas dos 80%, logo após um tempo de contacto reduzido, ou seja,

cerca de 30 minutos. Os resultados são ainda mais significativos, se considerarmos que a remoção do sulfametoxazol ocorreu em simultâneo com a remoção de outros três fármacos que se encontravam presentes na mesma solução em todos os ensaios realizados.

A presença em solução de um único fármaco iria em princípio permitir a obtenção de percentagens de remoção ainda superiores, às referidas anteriormente. No dia-a-dia, a utilização de uma diversidade de medicamentos favorece a ocorrência simultânea dos mesmos em diferentes efluentes domésticos ou hospitalares, daí a relevância do trabalho apresentado.

No entanto, numa situação de derrames acidentais, ou da ocorrência de grandes quantidades de fármacos em solução, ou ainda numa época menos produtiva, os microcosmos de LCM demoram um certo tempo a responder ao problema e podem não ser a melhor solução.

Com base nos resultados obtidos na primeira parte do trabalho, figuras 3.6 a 3.10 verificamos que ao fim de 1h, a percentagem de remoção do sulfametoxazol, pelos CAs poderia atingir já os 80%. Os CA utilizados apresentaram excelentes capacidades de remoção de sulfametoxazol, podendo atingir valores máximos na ordem dos 180 mg g^{-1}, como apresentado na figura 3.11. As excelentes capacidades de remoção do sulfametoxazol exibidas pelos três CAs, mas principalmente pelo carvão ativado da Panreac permitem-nos recomendar a sua utilização em situações de derrames acidentais, ou mesmo para aplicação após um tratamento por LCM, mas em que os efluentes tratados ainda apresentem quantidades de fármacos relativamente elevadas.

IV Conclusões e Perspetivas Futuras

4.Conclusões e Perspetivas Futuras

Os fármacos são compostos utilizados em grande escala e de forma crescente, a nível global, refletindo os avanços da indústria farmacêutica e dos cuidados de saúde. No entanto, as ETARs foram concebidas para a remoção dos poluentes convencionais (i.e., matéria orgânica facilmente biodegradável, sólidos em suspensão, microrganismos, nutrientes, etc.) dos afluentes a tratar, apresentando-se deficientes e ineficazes, na remoção de compostos medicamentosos, promovendo assim, efeitos adversos nos organismos do compartimento aquático. A eficácia do tratamento vai depender do composto a eliminar, do coeficiente de partição-octanol-água, da altura do ano (relacionado com a temperatura) e do tipo de instalação da ETAR.

Na presente dissertação, estudou-se a remoção de um composto farmacêutico, o sulfametoxazol, em solução aquosa, com base num tratamento que era constituído por um microcosmo de leitos construídos de macrófitas, utilizando uma mistura de LECA 2/4 e Vermiculite Esfoliada 2 (1:1, v:v) como matriz de suporte e plantado com *Typha* spp., com a possibilidade de ser ultimado por um processo de adsorção, utilizando-se como material adsorvente um carvão ativado.

Obtiveram-se elevadas percentagens de remoção do sulfametoxazol, logo após um tempo de contacto curto com os LCM, ou seja, 30 minutos. É de referir, que após 120 horas, as quantidades de sulfametoxazol removidas continuavam a aumentar suavemente, atingindo valores próximos dos 80%.

Para aumentar percentagem de remoção dos fármacos, principalmente em situações de derrames acidentais, os CA apresentam-se como uma solução mais rápida, imediata e eficaz, visto que com base nos resultados apresentados, os mesmos podem remover quantidades de sulfametoxazol que atingem os 180 mg por grama de CA. Em caso de derrame, um aumento imediato da quantidade de CA a utilizar, apresenta-se como uma forma rápida de aprisionar as quantidades de fármacos presentes nesse efluente, impedindo assim a contaminação de outros ecossistemas aquáticos.

Numa perspetiva de trabalho futuro seria importante estudar a remoção destes fármacos num meio mais complexo, como por exemplo num efluente real, para tentar perceber o efeito da matriz na capacidade de adsorção destes poluentes. Como é notório, estes sistemas demonstraram uma grande capacidade na remoção do sulfametoxazol do meio aquoso, seria interessante a continuação dos estudos nesta área e ter a possibilidade de promover estudos comparativos de remoção com outros fármacos.

V Referências Bibliográficas

5.Referências Bibliográfica

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

Ahmed, M.B., Zhou, J.L, Ngo, H.H, Guo, W. (2015). Adsorptive removal of antibiotics from water and wastewater: Progress and challenges. Science of the Total Environment, **532:** 112-126.

Baker-Austin C., Wright, M.S., Stepanauskas R., McArthur J.V. (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. Trends in Microbiology, Cell Press 14 (4), 176-182.

Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the united states - i) groundwater. Science of The Total Environment, 402, 192-200.

Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.-E., Park, H.-S. (2011). Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Science of The Total Environment*, 409, 4351-4360.

Belo, C.R., Cansado, I.P.P., Mourão, P.A.M. (2017). Synthetic polymers blend used in the production of high activated carbon for pesticides removals from liquid phase, Environmental Technology, 38:3, 285–296.

Cansado, I.P.P., Ramiro, C.R., Mourão, P.A.M. (2019) Pesticides abatement using activated carbon produced from a mixture of synthetic polymers by chemical activation with KOH and K_2CO_3. Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 12, 100261-100268.

Cansado, I.P.P. (2003) Caraterização estrutural de materiais de carbono com recurso a vários adsortivos (2003). Tese de doutoramento, Universidade de Évora.

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

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

Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, R., Zuccato, E. (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. Journal of Chromatography A, 1092, 206-215.

Carvalho, I.T., Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. Environment International, 94**,** 736-757.

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

Comissão de Farmácia e Terapêutica (2016). Monitorização do consumo de antibióticos no ambulatório ARSN, no ano de 2013-2015.

Danner M.C., Robertson A., Behrends V., Reiss J. (2019). Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. Science of the Total Environment, 664**:**793-804.

Dias, M. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios (2010) Cadernos Otorrinolaringologia. Clínica, investigação e inovação, 16 dez: 1-11.

Dietz, A.C., Schnoor, J.L. (2001). Advances in phytoremediation. Environmental Health Perspectives, 109, 163-168.

Diretiva 2000/60/CE do parlamento europeu e do conselho, de 23 de Outubro de 2000. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. L 327/1 – L 327/72.

Dong, Michael W. (2013) The essence of Modern HPLC: Advantages, limitation, fundamentals, and opportunities, LCGC North America, 6, 472-479.

Dordio, A. V; Carvalho, A. J. P. (2014). Applications of clay materials for the removal of organic xenobiotics from contaminated waters. In Clays and Clay Minerals: Geological origin, mechanical properties and industrial applications, ed. Liam R. Wesley. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers, 115 - 144.

Dordio, A., 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.

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, 886-892.

Dordio, A., Miranda, S, Ramalho, J., Carvalho, A. (2017). Mechanisms of removal of three widespread pharmaceuticals by two clay materials. Journal of Hazardous Materials, 575–583.

Dordio, A.V., Carvalho, A.J.P., Pinto, A.P. (2008). "Wetlands: Water living filters?". Russo, Raymundo E., Wetlands: Ecology, conservation and restoration. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, 15-72.

Drug Bank, D., (2019). Open data drug & drug target database. Http://www.Drugbank.Ca/drugs/db00788 (último acesso 20-11-2019).

EPA (2010). Environmental protection agency - treating contaminants of emerging concern - a literature review database. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T) Engineering and Analysis Division, EPA-820-R-10-002.

Evgenidou, E. N., Konstantinou, I. K., & Lambropoulou, D. A. (2015). Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. Science of The Total Environment, 505, 905–926.

Fent, K., Weston, A. Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology, 76 (2), 122-159.

Ferreira da Silva M., Tiago I., Veríssimo A., Boaventura R.A.R., Nunes O.C., Manaia C.M. (2006) Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. FEMS Microbiology Ecology 55, 322-329.

Gagnon, C., Turcotte, P., Trepanier, S., Gagne, F., & Cejka, P. J. (2014). Impacts of municipal wastewater oxidative treatments: changes in metal physical speciation and bioavailability. Chemosphere, 97, 86-91.

Gomes, S. F. R. (2011). Análise da viabilidade económica da reutilização de águas residuais tratadas - O caso da ETAR do Ave. Universidade do Minho-Escola de Engenharia.

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

Gracia-Lor, E., Sancho, J. V., Serrano, R. e Hernández, F. (2012). Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. Chemosphere, 87 (5), 453–462.

ICH - International Conference on Harmonisation (1994), Validation of analytical procedures: Text and methodology, Harmonised tripartite guideline.

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (2010) - www.insa.pt.

Janeirinho, J., (2017) Remoção de compostos fenólicos problemáticos na área vinícola por adsorventes comerciais. Relatório de Estágio de fim de Curso de Licenciatura em Bioquímica.

Jelic, A., Gros, M., Petrovic, M., Ginebreda, A. e Barceló, D. (2012). Occurrence and elimination of pharmaceuticals during conventional wastewater treatment. Handbook of environmental chemistry, 19, 1-24.

Jury K.L., Vancov T., Stuetz R.M., Khan S.J. (2010) Antibiotic resistance dissemination and sewage treatment plants. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology - A. Méndez-Vilas Ed. Formatex, 509-519.

Knapp C.W., McCluskey S.M., Singh B.K., Campbell C.D., Hudson G., Graham D.W. (2011) Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. PLoS ONE, 6 (11) 27300.

Kümmerer K. (2009) Antibiotics in the aquatic environment – A review, Part I. Chemosphere 75, 417–434.

Kupiec, T. (2004) Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. International Journal of Pharmaceutical Compounding, 8, (3), 223-227.

Lin, A.Y.-C., Tsai, Y.-T. (2009). Occurrence of pharmaceuticals in taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. Science of The Total Environment, 407, 3793-3802.

Lin, A.Y.-C., Yu, T.-H., Lin, C.-F., (2008). Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan. Chemosphere, 74, 131-141.

Liu, J., Zhang, Z., Yu, Z., Liang, Y., Li, X., Ren, L. (2017) The structure and flexural properties of *Typha* leaves. Applied Bionics and Biomechanics, 1249870.

Ludwig, H. (2010), Validation of analytical methods, Agilent Technologies, Publication Number 5990-5140EN.

Madureira, T.V., Barreiro, J.C., Rocha, M.J., Rocha, E., Cass, Q.B., Tiritan, M.E. (2010). Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro river estuary (Portugal). Science of The Total Environment, 408, 5513-5520.

Maneerung, T., Liew, J., Dai, Y., Kawi, S., Chong, C. e Wang, C.-H. (2016). Activated carbon derived from carbon residue from biomass gasification and its application for dye adsorption: Kinetics, isotherms and thermodynamic studies. Bioresource Technology, 200, 350–359.

Melo, S. A. S.; Trovó, A. G.; Bautitz, I. R.; Nogueira, R. F. P. (2009) Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. Química Nova. 32, (1), 188 – 197.

Miranda, S.I.M. (2014) Remoção de fármacos de águas contaminadas. Avaliação de vários substratos. Dissertação apresentada na Universidade de Évora para obtenção do grau de Mestre em Análises Químicas Ambientais.

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

Moura, S. (2004), Operação e Optimização de reator biológico para tratamento de compostos orgânicos voláteis. Tese de mestrado em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Engenharia do Porto.

Novo A., Manaia C. (2010) Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. Appl Microbiol Biotechnol 87, 1157-1166.

Oliveira, A. (2012). Avaliação do estado funcionamento geral da ETAR do Febros (Vila Nova de Gaia), Tese de Mestrado em Ciências e Tecnologia do Ambiente, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

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

Science of The Total Environment, 408, 6062-6069.

Pal, R., Megharaj, M., Kirkbride, K. P. & Naidu, R. (2013). Illicit drugs and the environment — A review. Science of The Total Environment, 463-464, 1079–1092.

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

Pombinho de Matos, M.J.C.P. (2015) Novos métodos cromatográficos para análise e separação de novos produtos naturais antimicrobianos. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa.

Ram, V. R., Dave, P. N., Joshi, H. S. (2012). Development and validation of a stability-indicating HPLC - Assay method for simultaneous determination of spironolactone and furosemide in tablet formulation. Journal of Chromatographic Science, 50, (8), 721–726.

Ratola, N., Cincinelli, A., Alves, A., Katsoyiannis, A. (2012). Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. Journal of Hazardous Materials, 239-240, 1-18.

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

Richard, J., Boergers, A., Von Eyser, C., Bester, K., Tuerk, J. (2013). Toxicity of the micropollutants Bisphenol A, Ciprofloxacin, Metoprolol and Sulfamethoxazole in water samples before and after the oxidative treatment. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 217, (4), 506 - 514.

Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. (2010). Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. Water Research, 44, 578-588.

Rouquerol J., Avnir D., Fairbridge C.W., Everet D.H, Haynes J.H., Pernicone N., Ramsay J., Sing K.S., Unger K.K. (1994) Recommendations for the characterization of porous solids. Pure and Applied Chemistry, 66(8), 1739- 1758.

Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I. (2001). Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in baden-württemberg, germany. Journal of Chromatography A, 938, 199-210.

Santos, L.H.M.L.M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., Montenegro, M.C.B.S.M. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. Science of The Total Environment, 461-462, 302-316.

Silva, F.L., Estudo da degradação do trimetoprim e do sulfametoxazol utilizando peróxido de Hidrogénio. Eletrogerado por eletrodos de difusão gasosa (2012). Mestrado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Skoog D.A., Stanley R., Crouch e F. James H. (2009) Princípios de Análise Instrumental (6ª Edição), Bookman.

Smith, Claire, (2019). Disadvantages and Advantages of an HPLC, Sciencing. Disponível em https://sciencing.com/disadvantages-advantages-hplc-5911530.html (consultado em 12 de dezembro de 2019).

Thiebault, T. (2020). Sulfamethoxazole/Trimethoprim ratio as a new marker in raw wastewaters: A critical review. Science of the Total Environment, **715:** 136916.

Togola, A., Budzinski, H. (2008). Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. Journal of Chromatography A, 1177, 150-158.

Verlicchi, P., Al Aukidy, M. & Zambello, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-a review. Science of Total Environment, 429, 123-55.

Vieno, N.M., Tuhkanen, T., Kronberg, L. (2006). Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. Journal of Chromatography A, 1134, 101-111.

Wu, F.Y., Chung, A.K.C., Tam, N.F.Y., Wong, M.H. (2012). Root exudates of wetland plants influenced by nutrient status and types of plant cultivation. International Journal of Phytoremediation 14, 543-553.

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

Yilmaz, B., Asci, A., & Palabiyik, S. S. (2011). HPLC Method for determination of diclofenac in human plasma and its application to a pharmacokinetic study in Turkey. Journal of Chromatographic Science, 49(6), 422–427.

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