

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

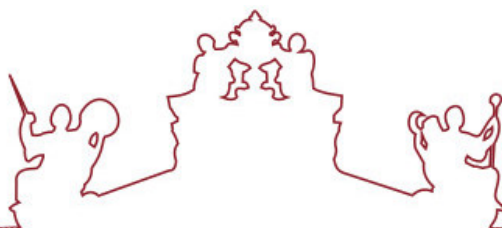
Dissertação

**Novas Estratégias de Remoção de Anti-inflamatórios em
Leitos Construídos de Macrófitas. Naproxeno e Diclofenac,
Dois Casos de Estudo**

Ana Luísa Abreu Andrade

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

Évora 2025



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

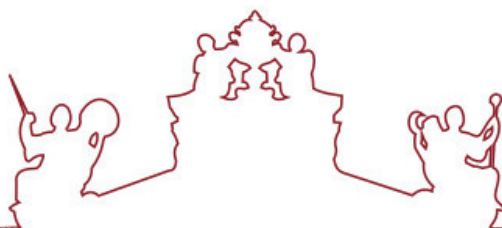
Dissertação

**Novas Estratégias de Remoção de Anti-inflamatórios em
Leitos Construídos de Macrófitas. Naproxeno e Diclofenac,
Dois Casos de Estudo**

Ana Luísa Abreu Andrade

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

Évora 2025



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

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

Vogais | Ana Paula Pinto (Universidade de Évora) (Orientador)
Ana Rodrigues Costa (Universidade de Évora) (Arguente)

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Vitória Dordio, ao Professor Doutor Alfredo Palace Carvalho e à Professora Doutora Ana Paula Pinto que tornaram possível a realização deste trabalho, pela sua disponibilidade, orientação, dedicação, incentivo, apoio, compreensão e transmissão de conhecimento científico durante todo este projeto.

À Cátia Carvalho e ao Miguel Santos pela companhia e sabedoria partilhada dentro e fora do laboratório.

Aos meus pais e irmãos por todo o apoio, compreensão e incentivo que me transmitiram durante este tempo.

A todos os amigos e colegas que me acompanharam durante este percurso e que fizeram desta experiência algo ainda mais especial.

A todos os professores que me acompanharam durante a minha formação académica por todo o conhecimento transmitido, tonando possível a realização deste projeto.

À Universidade de Évora por me ter acompanhado nos últimos 5 anos e por me proporcionado, não só uma excelente educação, como também novas experiências de vida e de aprendizagem às quais serei para sempre grata.

E, por último, à Mui Nobre e Sempre Leal Cidade de Évora, por me ter acolhido durante 5 anos, e que foi casa durante toda a minha formação superior.

Resumo

A presença de fármacos no ambiente representa uma crescente preocupação, impulsionando o desenvolvimento e aperfeiçoamento de tecnologias sustentáveis para a sua remoção. Entre estas, os leitos construídos de macrófitas (LCMs) têm-se destacado, combinando eficiência na remoção de poluentes emergentes com viabilidade económica. Todavia, a sua performance pode ser melhorada. Neste trabalho, estudaram-se novos materiais (cortiça) para matriz de suporte e microrganismos (*Bacillus subtilis*) para otimizar o desempenho de LCMs na remoção de fármacos, como diclofenaco e naproxeno, de águas contaminadas.

Os granulados de cortiça estudados apresentam capacidade de adsorção de diclofenaco e naproxeno, mas quando adicionados à matriz vermiculite+LECA, estudada anteriormente, não contribuem com um aumento significativo da sua performance.

A capacidade do *Bacillus subtilis* em remover os fármacos de um meio em que estão presentes está fortemente associada com a taxa de crescimento do microrganismo, sendo a adição de glucose o principal fator de estímulo do crescimento.

Palavras chave: *Bacillus subtilis*; cortiça; fármacos; LCMs; LECA+vermiculite;

New strategies for the removal of anti-inflammatory drugs in Constructed Wetlands Systems. Naproxen and Diclofenac, two study cases.

Abstract

The presence of pharmaceuticals in the environment is of increasing concern, driving the development and refinement of sustainable technologies for their removal. Among these, Constructed Wetlands Systems (CWSs) have gained prominence by combining efficiency in removing emerging pollutants with economic feasibility. However, their performance can still be enhanced. In this study, novel materials (cork granules) were investigated as support matrix components, along with microorganisms (*Bacillus subtilis*), to optimize the performance of CWSs for the removal of pharmaceuticals such as diclofenac and naproxen from contaminated waters.

Cork granules exhibited adsorption capacity for diclofenac and naproxen. However, when incorporated into a previously studied matrix composed of LECA+vermiculite, they did not result in a significant improvement in overall performance. The ability of *Bacillus subtilis* to remove pharmaceuticals from the growth medium was found to be closely linked to its growth rate, with addition of glucose emerging as the key factor stimulating microbial growth.

Keywords: *Bacillus subtilis*; cork; CWSs; LECA+vermiculite; pharmaceuticals;

Índice

Agradecimentos	1
Resumo	2
Abstract.....	3
Índice de figuras	7
Índice de tabelas	10
Lista de abreviações.....	11
1 Introdução.....	12
1.1 Objetivos.....	13
2 Revisão bibliográfica.....	15
2.1 Poluentes emergentes.....	15
2.2 Entrada, destino e impacto dos fármacos no ambiente	16
2.2.1 Presença de fármacos nas águas em Portugal.....	18
2.2.2 Métodos analíticos utilizados na quantificação de fármaco em amostras ambientais.....	24
2.2.3 Características físico-químicas do diclofenaco e do naproxeno.....	24
2.3 Remoção dos fármacos nas ETARs convencionais	26
2.4 Leitos Construídos de Macrófitas	28
2.4.1 Papel dos componentes dos LCM na remoção dos fármacos.....	30
3 Metodologia Experimental	36
3.1 Materiais e Reagentes	36
3.2 Metodologia analítica	39
3.2.1 Otimização das condições de quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis	39
3.3 Otimização da composição da matriz a utilizar no microcosmo de LCMs	
44	
3.3.1 Preparação dos materiais	44

3.3.2	Seleção da classe granulométrica de cortiça a utilizar na composição da matriz	45
3.3.3	Seleção da estratificação dos materiais a usar na composição da matriz de suporte	47
3.4	Estudo da capacidade de degradação do naproxeno e do diclofenaco pelo <i>Bacillus subtilis</i>	48
3.4.1	Microrganismos	48
3.4.2	Meio de cultura e condições de crescimento	48
3.4.3	Preparação do inóculo	49
3.4.4	Estudo do crescimento de culturas líquidas de <i>B. subtilis</i> em ensaios em descontínuo	50
3.4.5	Estudo da capacidade de degradação/remoção do naproxeno e do diclofenaco pelo <i>B. subtilis</i> em meio líquido	51
3.5	Análise estatística dos resultados.....	54
4	Resultados e Discussão.....	55
4.1	Otimização e validação da metodologia analítica.....	55
4.1.1	Condições de quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis	55
4.1.2	Validação do método analítico	57
4.1.3	Seleção dos filtros e otimização do volume de solução a filtrar	58
4.2	Seleção da classe granulométrica de cortiça a utilizar na composição da matriz	61
4.3	Seleção da estratificação da matriz	69
4.4	Caracterização da curva de crescimento do <i>B. subtilis</i>	73
4.4.1	Determinação dos parâmetros cinéticos do crescimento do <i>B. subtilis</i>	78
4.5	Estudo da capacidade de degradação do naproxeno e do diclofenaco pelo <i>B. subtilis</i>	83
4.5.1	Avaliação dos efeitos da exposição aos fármacos no crescimento da cultura de <i>B. subtilis</i>	83

4.5.2	Avaliação da capacidade de degradação/remoção do naproxeno e do diclofenaco pelo <i>B. subtilis</i>	97
5	Conclusões e perspectivas futuras.....	105
6	Referências bibliográficas	109

Índice de figuras

Figura 2.1 Ocorrência e destino dos fármacos no ambiente	17
Figura 2.2 Esquema de funcionamento de uma ETAR convencional	27
Figura 2.3 LCMs e os fatores que afetam a sua performance	29
Figura 2.4 Papel dos componentes dos LCMs e principais processos envolvidos na remoção de fármacos	30
Figura 2.5 Mecanismos principais envolvidos na fitorremediação	32
Figura 2.6 Mapa da distribuição da <i>Typha</i> spp. em Portugal (Botânico UTAD, n.d.).....	33
Figura 3.1 Mistura de LECA 2/4 e vermiculite 2 (1:1, v/v)	38
Figura 3.2 Cortiça 3/5 (à esquerda) e cortiça 0.5/3 (à direita)	38
Figura 3.3 Esquema de cada ensaio para uma dada granulometria de cortiça e uma dada concentração cada fármaco. F1, F2 e F3 correspondem às replicas dos ensaios e C1, C2 e C3 correspondem às replicas dos controlos	46
Figura 3.4 Esquema de montagem dos ensaios das estratificações	47
Figura 3.5 Esquema de preparação dos inóculos de trabalho a partir da solução concentrada de <i>B. subtilis</i>	50
Figura 3.6 Esquema de montagem utilizado nos 3 ensaios (MC – Meio de Cultura)	52
Figura 4.3 Cromatograma obtido por HPLC/UV-Vis para a solução padrão contendo carbamazepina (2,5 mg L ⁻¹), naproxeno (2,5mg L ⁻¹), diclofenaco (2,5 mg L ⁻¹) e ibuprofeno (2,5 mg L ⁻¹)	55
Figura 4.4 Reta de calibração do naproxeno em solução aquosa	56
Figura 4.5 Reta de calibração do diclofenaco em solução aquosa.....	56
Figura 4.1 Percentagem de Recuperação (%R) do naproxeno filtrado usando 2 membranas filtrantes de 0,45 µm para as concentrações de 2,5 mg L ⁻¹ e 10 mg L ⁻¹ (média ± DP; n = 3).	59
Figura 4.2 Percentagem de Recuperação (%R) do diclofenaco filtrado usando 2 membranas filtrantes de 0,45 µm para as concentrações de 2,5 mg L ⁻¹ e 10,0 mg L ⁻¹ (média± DP; n=3).	60
Figura 4.6 Remoção ao longo do tempo do naproxeno, pela cortiça 3/5	62
Figura 4.7 Remoção ao longo do tempo do diclofenaco, pela cortiça 3/5.....	63
Figura 4.8 Remoção ao longo do tempo do naproxeno, pela cortiça 0,5/3	65

Figura 4.9 Remoção ao longo do tempo do diclofenaco, pela cortiça 0,5/3.....	65
Figura 4.10 Comparação da remoção do naproxeno das soluções de 2,5 e 5,0 mg L ⁻¹ pelas cortiças 0,5/3 e 3/5.....	67
Figura 4.11 Comparação da remoção do diclofenaco das soluções de 2,5 e 5,0 mg L ⁻¹ pelas cortiças 0,5/3 e 3/5.....	67
Figura 4.12 Comparação da remoção do naproxeno e do diclofenaco, pelas cortiças 0,5/3 e 3/5 ao fim das 216 h de ensaio	68
Figura 4.13 Cinética de remoção do naproxeno e do diclofenaco para as estratificações 1:1:1; 5:3:4 e 5:2:5 para a solução de 2,5 mL ⁻¹ (com ampliação da região entre 0h e 10h).....	71
Figura 4.14 Curva de crescimento celular do <i>Bacillus subtilis</i> em meio líquido na ausência de glucose	75
Figura 4.15 Curva de crescimento celular do <i>Bacillus subtilis</i> em meio líquido na presença de glucose	76
Figura 4.16 Aspeto visual dos meios de cultura do <i>Bacillus subtilis</i> na ausência (à esquerda) e na presença (à direita) de glucose para o mesmo período de incubação.....	78
Figura 4.17 Representação gráfica da fase log das curvas de crescimento obtidas no meio sem glucose	79
Figura 4.18 Representação gráfica da fase log das curvas de crescimento obtidas no meio com glucose	80
Figura 4.19 Curvas de crescimento do <i>B. subtilis</i> na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 2 mg L ⁻¹ de naproxeno.....	84
Figura 4.20 Curvas de crescimento do <i>B. subtilis</i> na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 20 mg L ⁻¹ de naproxeno.....	86
Figura 4.21 Curvas de crescimento do <i>B. subtilis</i> na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 2 mg L ⁻¹ de diclofenaco	88
Figura 4.22 Curvas de crescimento do <i>B. subtilis</i> na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 20 mg L ⁻¹ de diclofenaco	90
Figura 4.23 Curvas de crescimento do <i>B. subtilis</i> obtidas com as soluções de 2 mg L ⁻¹ de cada fármaco numa mistura de 4 fármacos (NAP, DCF, IBU, CBZ).....	92
Figura 4.24 Curvas de crescimento do <i>B. subtilis</i> obtidas com as soluções de 5 mg L ⁻¹ de cada fármaco numa mistura de 4 fármacos (NAP, DCF, IBU, CBZ).....	95
Figura 4.25 Remoções do naproxeno, na ausência e presença de glucose, isoladamente a 2 e 20 mg L ⁻¹ e em mistura a 2 e 5 mg L ⁻¹	98

Figura 4.26 Concentração de naproxeno removida ao longo do tempo, nas várias condições testadas para a concentração de 2 mg L ⁻¹	99
Figura 4.27 Remoções do diclofenaco, na ausência e presença de glucose, isoladamente a 2 e 20 mg L ⁻¹ e em mistura a 2 e 5 mg L ⁻¹	101
Figura 4.28 Concentração de diclofenaco removida ao longo do tempo, nas várias condições testadas para a concentração de 2 mg L ⁻¹	102

Índice de tabelas

Tabela 2.1 Fármacos detetados em águas em Portugal	19
Tabela 2.2 Principais características físico-químicas do diclofenaco e do naproxeno	25
Tabela 2.3 Características da <i>Typha</i> spp. (Azevedo, 2022; Botânico UTAD, n.d.)	34
Tabela 3.1 Principais características das substâncias químicas utilizadas	36
Tabela 3.2 Características físico-químicas da vermiculite, da LECA e da mistura dos dois materiais	37
Tabela 3.3 Características e fabricantes dos filtros usados.....	42
Tabela 3.4 Composição do meio de cultura usado para o crescimento do <i>B. subtilis</i> (adaptado de Greń et al., 2010; Marchlewicz et al., 2016b).....	49
Tabela 4.1 Parâmetros cinéticos de crescimento do <i>Bacillus subtilis</i> sem glucose	80
Tabela 4.2 Parâmetros cinéticos de crescimento do <i>Bacillus subtilis</i> com glucose	81
Tabela 4.3 Parâmetros cinéticos do <i>B. subtilis</i> obtidos dos ensaios e da bibliografia	82
Tabela 4.4 Parâmetros cinéticos de crescimento do <i>B. subtilis</i> na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 2 mg L ⁻¹ de naproxeno	85
Tabela 4.5 Parâmetros cinéticos de crescimento do <i>B. subtilis</i> na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 20 mg L ⁻¹ de naproxeno	87
Tabela 4.6 Parâmetros cinéticos de crescimento do <i>B. subtilis</i> na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 2 mg L ⁻¹ de diclofenaco.....	89
Tabela 4.7 Parâmetros cinéticos de crescimento do <i>B. subtilis</i> na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 20 mg L ⁻¹ de diclofenaco	91
Tabela 4.8 Parâmetros cinéticos de crescimento do <i>B. subtilis</i> na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 2 mg L ⁻¹ de cada fármaco (NAP, DCF, IBU, CBZ).....	94
Tabela 4.9 Parâmetros cinéticos de crescimento do <i>B. subtilis</i> na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 5 mg L ⁻¹ de cada fármaco (NAP, DCF, IBU, CBZ).....	96

Lista de abreviações

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

c.d.o. – Comprimento de onda

CBZ – Carbamazepina

CECs – Contaminantes de Preocupação Emergente (do inglês *Contaminants of Emerging Concern*)

DCF – Diclofenaco

DO_{600nm} – Densidade ótica a 600 nm

DPR – Desvio Padrão Relativo

EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês *Environmental Protection Agency*)

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

g – Tempo de geração

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

IBU – Ibuprofeno

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

LDI – Limite de Detecção Instrumental

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

LMCs – Leitos Construídos de Macrófitas

LQI – Limite de Quantificação Instrumental

MC – Meio de cultura

n – Número de gerações

NAP – Naproxeno

UV/Vis – Ultravioleta/visível

1 Introdução

Nas últimas décadas, tem sido detetada a presença contínua de fármacos e respetivos metabolitos, na ordem dos ng L^{-1} aos $\mu\text{g L}^{-1}$, em águas residuais tratadas, lençóis de água, rios, lagos, oceanos e até em água potável (Y. Li et al., 2019; Quesada et al., 2019; Soares et al., 2022). A presença destes fármacos no ambiente tem gerado preocupação a nível mundial devido aos seus possíveis efeitos tóxicos para os humanos, animais, ecossistemas aquáticos e ambiente no geral (Dey et al., 2019a; Kanakaraju et al., 2018a; Khan et al., 2020; Y. Li et al., 2019).

As Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) recebem diariamente descargas urbanas, hospitalares, veterinárias e industriais, totalizando volumes enormes de águas residuais para tratamento. No entanto, as ETARs não foram desenhadas para a remoção de poluentes complexos, pseudo-persistentes, pouco biodegradáveis e presentes em baixas concentrações, como é o caso dos fármacos, não sendo por isso eficientes para a sua remoção, o que as torna na principal porta de entrada destes compostos no ambiente (Kanakaraju et al., 2018a; Khan et al., 2020). Assim, torna-se evidente que é necessário implementar processos de tratamento alternativos ou complementares aos atualmente existentes nas ETARs convencionais.

Os Leitos Construídos de Macrófitas (LCMs) são zonas húmidas artificiais ou seminaturais que visam a remoção de poluentes de águas. Para tal, estes sistemas utilizam a combinação de processos físicos, químicos, biológicos e bioquímicos por ação dos três componentes principais: matriz de suporte, plantas (macrófitas) e microrganismos (Abbassi & Yadav, 2020; Omondi & Navalía, 2020). São sistemas robustos e relativamente baratos, uma vez que são autoajustáveis, fáceis de operar e manter, apresentando uma elevada eficiência na remoção de muitos poluentes incluindo alguns fármacos (Abbassi & Yadav, 2020; Dordio et al., 2018, 2021; Omondi & Navalía, 2020).

Nas últimas décadas, os LCMs têm sido utilizados para o tratamento de águas residuais, podendo ser utilizados individualmente ou inseridos nas fases de tratamento secundárias e terciárias das ETARs. Estes sistemas têm revelado alguma eficácia na remoção de muitos tipos de micropoluentes, incluindo fármacos e respetivos metabolitos (Carrajola, 2021; Dordio et al., 2018).

Atualmente, os LCMs continuam a ser alvo de estudos, focando a otimização dos vários componentes (matriz, plantas e microrganismos) de forma a acelerar a cinética e aumentar a eficiência de remoção dos fármacos por estes sistemas (Dordio et al., 2018; Vymazal et al., 2021).

A população microbiana existente nos LCMs varia com a composição da matriz, o clima e o tipo de plantas, desempenhando um papel muito importante na remoção de poluentes, quer diretamente através dos processos de biodegradação ou sorpção, quer indiretamente ajudando no desenvolvimento vegetativo das plantas. Alguns estudos referem que a inoculação de microrganismos nestes sistemas podem aumentar significativamente a sua performance (Varma et al., 2021; Vymazal et al., 2021).

A vegetação desempenha também um papel fundamental na retenção ou transformação/degradação dos poluentes, sendo responsável por processos como a adsorção dos compostos na raiz, absorção, metabolização e translocação, libertação de exsudados e oxigenação da rizosfera, que favorecem os processos aeróbicos de degradação microbiana (Dordio et al., 2018; Varma et al., 2021; Vymazal et al., 2021).

Relativamente à matriz de suporte, alguns estudos já efetuados com materiais argilosos demonstraram que os agregados de argila expandida (LECA) e a vermiculite esfoliada apresentam uma boa capacidade de adsorção de alguns fármacos em solução aquosa (Carrajola, 2021; Dordio et al., 2017; Dordio & Carvalho, 2013), sendo agora necessário apostar em novos materiais de forma a tornar o processo mais rápido e eficiente (Mateus & Pinho, 2020a; Varma et al., 2021; Vymazal et al., 2021).

1.1 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é contribuir para melhorar a eficiência dos microcosmos de LCMs (compostos por uma matriz de suporte feita de uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 2 (1:1, v/v) e plantados com a espécie de planta *Typha* spp.) para a remoção de naproxeno e diclofenaco de uma solução aquosa contendo quatro fármacos (carbamazepina, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno).

Adicionalmente, e de modo a alcançar o objetivo principal, é também necessário considerar alguns objetivos específicos tais como:

- Otimizar e validar o método analítico para a quantificação dos fármacos presentes na solução aquosa, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com um detetor de UV-Vis;
- Estudar outros materiais, nomeadamente granulados de cortiça expandida, com o objetivo de melhorar a capacidade da componente matriz de suporte dos LCMs, constituída por LECA 2/4 e vermiculite 2, para remover o naproxeno e o diclofenaco, e caracterizar os processos responsáveis pela remoção dos fármacos;
- Otimizar a composição da matriz de suporte e quantificar a capacidade de adsorção da matriz relativamente aos fármacos em estudo;
- Otimizar as condições de crescimento da bactéria do género *Bacillus* em meio de cultura líquido;
- Caracterizar a curva de crescimento em descontínuo da bactéria e determinar os parâmetros cinéticos de crescimento;
- Avaliar a capacidade da bactéria de biodegradar/remover os fármacos em estudo (diclofenaco e naproxeno). Distinguir adsorção e metabolização;
- Avaliar os possíveis efeitos na curva de crescimento da bactéria e nos parâmetros cinéticos provocados pela sua exposição aos fármacos;
- Avaliar a suscetibilidade do diclofenaco e do naproxeno para sofrer outro tipo de processos abióticos que possam contribuir para a sua remoção, como a fotodegradação.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Poluentes emergentes

Os poluentes emergentes são um grupo de químicos e dos seus produtos de transformação, que ocorrem no ambiente e que têm o potencial de causar danos ambientais, afetando de forma negativa os ecossistemas e a saúde humana (Dey et al., 2019b). A libertação destes compostos no ambiente tem ocorrido de forma contínua há várias décadas, no entanto, a sua deteção e monitorização só se tornou possível recentemente, com o desenvolvimento de novos métodos analíticos, sendo detetados atualmente em concentrações que variam entre a ordem dos micro e os nanogramas por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$, ng L^{-1}) (Dey et al., 2019b).

A União Europeia e a Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos elaboraram uma lista de 129 poluentes prioritários, que representam um risco significativo para o meio ambiente e para a saúde humana, com base na sua frequência de deteção, estabilidade, estrutura, composição e risco ambiental (Dey et al., 2019b; Ellis, 2006). Em 2005, a Comissão Europeia iniciou o projeto NORMAN, de forma a estabelecer uma rede de laboratórios e centros de pesquisa de referência, que conta com a participação de 70 membros e de mais de 20 países, mantendo um dos maiores registos de poluentes emergentes no ambiente (Dey et al., 2019b; Mohammed Taha et al., 2022; NORMAN, 2014). Os compostos farmacêuticos são considerados uma das principais categorias de poluentes emergente presentes nos ambientes aquáticos, sendo adicionados regularmente novos compostos a esta lista (Dey et al., 2019b; Papagiannaki et al., 2022a).

Nas últimas décadas a presença de micropoluentes, tais como reguladores lipídicos, antidepressivos, agentes quimio-terapêuticos, contraceptivos, aditivos industriais, pesticidas, nanopartículas e disruptores endócrinos, nos ambientes aquáticos tem vindo a aumentar e representa um novo obstáculo global à qualidade da água, levantando preocupações sobre a sua toxicidade para os organismos aquáticos e sobre os seus efeitos na saúde humana (Mirzaei et al., 2017; Oliveira et al., 2020; Palma et al., 2020a).

A EPA define estes compostos como contaminantes de preocupação emergente (CECs), não sendo ainda claro como estes podem afetar o ambiente e a saúde, sendo

necessário continuar a realizar estudos com o objetivo de avaliar os seus impactos na saúde humana e nos ecossistemas (Oliveira et al., 2020; Schröder et al., 2016).

A industrialização, a agricultura e o desenvolvimento urbano são alguns dos fatores que têm contribuído para a ocorrência de fármacos e outros xenobióticos no ambiente. No entanto, a principal fonte destes contaminantes no ambiente são as Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs), uma vez que estas foram desenvolvidas para a remoção de poluentes biodegradáveis e os fármacos são substâncias pseudo-persistentes e pouco biodegradáveis (Awfa et al., 2018; Oliveira et al., 2020).

2.2 Entrada, destino e impacto dos fármacos no ambiente

Micropoluentes como os fármacos são introduzidos no ambiente diariamente através de efluentes domésticos, hospitalares e industriais. Isto acontece, pois os processos convencionais de tratamento das águas residuais baseiam-se em biotransformação e biodegradação, não sendo capazes de remover fármacos de forma eficiente, uma vez que muitos destes compostos são pouco biodegradáveis e pseudo-persistentes (Awfa et al., 2018; Gomes et al., 2017; Kanakaraju et al., 2018b; Madikizela et al., 2017; Maycock & Watts, 2011).

As ETARs são consideradas as principais fontes de contaminação das águas. Os fármacos apresentam estruturas e propriedades físico-químicas muito diversas, exigindo a aplicação de uma certa variedade de processos de remoção. Isto faz com que a eficiência do tratamento das águas residuais nas ETARs convencionais seja variável, causando de um modo geral, ao fracassar a sua remoção, um aumento da presença de fármacos e dos seus metabolitos nas águas superficiais (rios, lagos, oceanos) e subterrâneas (Awfa et al., 2018; Kanakaraju et al., 2018b; Palma et al., 2020a). Além das ETARs, outras atividades humanas, como a pecuária, agricultura e aquacultura, bem como a deposição inadequada de medicamentos com o prazo de validade expirado fora dos pontos de coleta apropriados, também representam fontes de contaminação (Kanakaraju et al., 2018b; Palma et al., 2020b, 2020a).

Na figura 2-1 estão representadas de forma esquemática as principais fontes e os principais destinos dos fármacos no ambiente.

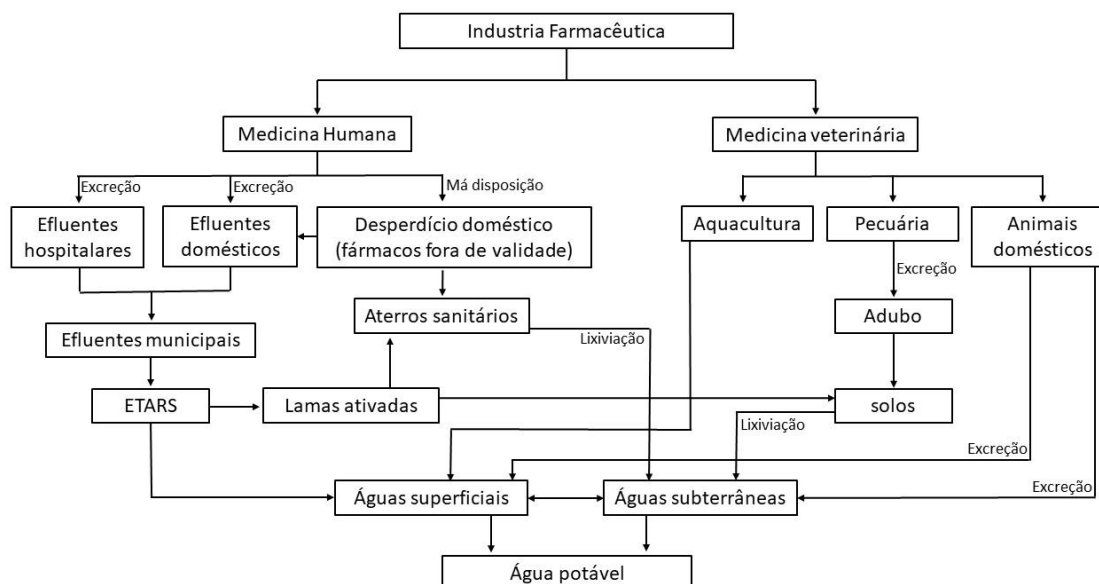


Figura 2.1 Ocorrência e destino dos fármacos no ambiente

Os fármacos são substâncias que foram desenvolvidas para induzir uma ação perturbadora nos sistemas biológicos (Gomes et al., 2017; Palma et al., 2020a). A existência destes compostos na água potável, embora em baixas concentrações (na ordem dos micro ou nanogramas por litro) gera preocupação em relação ao seu efeito para a saúde pública, que é agravada quando se consideram os potenciais efeitos sinérgicos resultantes de misturas complexas de fármacos (Oliveira et al., 2020; Palma et al., 2020a). De facto, é possível que diferentes fármacos, que tenham modos de ação semelhantes, possam ter efeitos cumulativos ou até mesmo sinérgicos, que vão além dos efeitos induzidos por cada um isoladamente. Além disso, considerando que muitos fármacos são poluentes persistentes, a exposição contínua a estes compostos pode, a longo prazo, resultar em efeitos crónicos. Alguns autores reportam que, dependendo do tempo de exposição, algumas dessas substâncias podem estar associadas ao desenvolvimento de cancro testicular, cancro da mama, cancro da próstata, síndrome dos ovários policísticos e redução da fertilidade (Oliveira et al., 2020; Palma et al., 2020a).

Adicionalmente, a presença constante de fármacos em águas potáveis levanta outras preocupações, nomeadamente o desenvolvimento de bactérias ou outros agentes patogénicos multirresistentes e de disrupções endócrinas nos organismos (Oliveira et al., 2020).

2.2.1 Presença de fármacos nas águas em Portugal

Vários estudos reportam a presença de fármacos em efluentes, águas naturais e águas potáveis em todo o mundo, sendo necessário um esforço mundial para a monitorização constante destas substâncias (Oliveira et al., 2020; Schröder et al., 2016).

Em Portugal, tem sido detetada a presença de fármacos em efluentes, estuários, rios, lagos e em outras águas superficiais (Fernandes et al., 2020; Reis-Santos et al., 2018; Sousa et al., 2020). Na tabela 2-1 são apresentados os principais fármacos detetados em Portugal, divididos por classe farmacoterapêutica, bem como a sua concentração em várias amostras ambientais.

Tabela 2.1 Fármacos detetados em águas em Portugal

Composto	Local	Concentração detetada min-máx (ng L ⁻¹)	Referências bibliográficas
Analgésicos e anti-inflamatórios não esteroides			
Paracetamol	Bacia do Guadiana	5.23-173	(Palma et al., 2020a)
	ETAR Beirolas (BEI-REC)	6.69-36.9	(Silva et al., 2021)
	ETAR Faro (FNW-RL)	3.45-21.5	
	Águas Superficiais	Nd- 30	(Papagiannaki et al., 2022b)
Diclofenaco	Bacia do Guadiana	18.09-1152.5	(Palma et al., 2020a)
	ETAR Beirolas (BEI-REC)	3.14-83.9	(Silva et al., 2021)
	ETAR Faro (FNW-RL)	2.49-76.0	
	Rios	3200	(Soares et al., 2022)
	Oceano Atlântico	241	
	ETARS	6200	
	Foz do Tejo	1.60-51.80	(Reis-Santos et al., 2018)
	Águas Superficiais	Nd-12	(Papagiannaki et al., 2022b)
	Estuários	Nd-346	(Sousa et al., 2020)
Ibuprofeno	Bacia do Guadiana	72.14-1020.46	(Palma et al., 2020a)
	ETAR Beirolas (BEI-REC)	3.69-58.1	(Silva et al., 2021)

Composto	Local	Concentração detetada min-máx (ng L ⁻¹)	Referências bibliográficas
	ETAR Faro (FNW-RL)	5.09-28.8	
Idometacina	Bacia do Guadiana	5.38-43.21	(Palma et al., 2020a)
Cetoprofeno	Bacia do Guadiana	12.88-98.92	(Palma et al., 2020a)
Naproxeno	Bacia do Guadiana	9.09-978.77	(Palma et al., 2020a)
	ETAR Beirolos (BEI-REC)	2.14-11.0	(Silva et al., 2021)
	ETAR Faro (FNW-RL)	2.79-8.48	
Paracetamol	Foz do Tejo	0.12-10.60	(Reis-Santos et al., 2018)
Propifenazona	Bacia do Guadiana	Nd-10	(Palma et al., 2020a)
Antibióticos			
Claritromicina	Bacia do Guadiana	4.05-57.62	(Palma et al., 2020a)
	Leça (Wsl.1)	269	(Fernandes et al., 2020)
Eritromicina	ETAR Beirolos (BEI-REC)	2.16-20.0	(Silva et al., 2021)
	ETAR Faro (FNW-RL)	3.0-18.5	
	Águas Superficiais	Nd-32	(Papagiannaki et al., 2022b)
	Estuários	Nd-184	
Ofloxacina	Bacia do Guadiana	27.87-31.70	(Palma et al., 2020a)
	Leça (Wsl.1)	120	(Fernandes et al., 2020)
	Estuários	Nd-9.45	(Sousa et al., 2020)

Composto	Local	Concentração detetada min-máx (ng L ⁻¹)	Referências bibliográficas
	Mar	Nd-98.6	
Sulfadiazina	Bacia do Guadiana	Nd-75.24	(Palma et al., 2020a)
	ETAR Beirolos (BEI-REC)	3.30	(Silva et al., 2021)
	ETAR Faro (FNW-RL)	2.69-21.7	
Sulfadimidina	Bacia do Guadiana	1.62-59.58	(Palma et al., 2020a)
Sulfametoxazol	Bacia do Guadiana	1.70-105.65	(Palma et al., 2020a)
	ETAR Beirolos (BEI-REC)	2.17-17.3	(Silva et al., 2021)
	ETAR Faro (FNW-RL)	3.24-10.2	
	Rios	43	(Soares et al., 2022)
	ETARS	600	
Trimethoprima	Bacia do Guadiana	3.06-21.89	(Palma et al., 2020a)
Medicamentos psicotrópicos			
Carbamazepina	Bacia do Guadiana	6.90-689.65	(Palma et al., 2020a)
	ETAR Beirolos (BEI-REC)	9.42-55.1	(Silva et al., 2021)
	ETAR Faro (FNW-RL)	10.3-45.3	
	Leça (Wsl.1)	354	(Fernandes et al., 2020)
	Estuários	Nd-257	(Sousa et al., 2020)
	Mar	Nd-475	

Composto	Local	Concentração detetada min-máx (ng L ⁻¹)	Referências bibliográficas
	Águas Superficiais	Nd-19	(Papagiannaki et al., 2022b)
Diazepam	Bacia do Guadiana	0.78-4.70	(Palma et al., 2020a)
Lorazepam	Bacia do Guadiana	27.08-76.78	(Palma et al., 2020a)
Paroxetina	Bacia do Guadiana	Nd-60.65	(Palma et al., 2020a)
Reguladores lipídicos			
Bezafibrato	Bacia do Guadiana	Nd-328.02	(Palma et al., 2020a)
	ETAR Beirolas (BEI-REC)	2.10-4.80	(Silva et al., 2021)
	ETAR Faro (FNW-RL)	3.36-3.77	
	Foz do Tejo	1.89	(Reis-Santos et al., 2018)
	Estuários	Nd-41.3	(Sousa et al., 2020)
Fenofibrato	Bacia do Guadiana	1.91-16.21	(Palma et al., 2020a)
Genfibrozila	Bacia do Guadiana	Nd-69.74	(Palma et al., 2020a)
	Foz do Tejo	11.50-77.00	(Reis-Santos et al., 2018)
Bloqueadores beta			
Atenolol	Bacia do Guadiana	Nd-130.08	(Palma et al., 2020a)
	ETAR Beirolas (BEI-REC)	3.46-9.33	(Silva et al., 2021)
	ETAR Faro (FNW-RL)	2.20-5.32	
	Foz do Tejo	0.49	(Reis-Santos et al., 2018)

Composto	Local	Concentração detetada min-máx (ng L ⁻¹)	Referências bibliográficas
	Águas Superficiais	Nd-4	(Papagiannaki et al., 2022b)
Metoprolol	Bacia do Guadiana	1.65-115.08	(Palma et al., 2020a)
	ETAR Beirolas (BEI-REC)	2.01-57.2	(Silva et al., 2021)
	ETAR Faro (FNW-RL)	3.63-14.7	
	Estuários	Nd-161	(Sousa et al., 2020)
Propranolol	Bacia do Guadiana	Nd-46.71	(Palma et al., 2020a)
	Foz do Tejo	0.02-1.89	(Reis-Santos et al., 2018)
	Estuários	Nd-285	(Sousa et al., 2020)
Sotalol	Bacia do Guadiana	Nd-240.03	(Palma et al., 2020a)
Diuréticos			
Furosemida	Bacia do Guadiana	5.49-886.79	(Palma et al., 2020a)
Hidroclorotiazida	Bacia do Guadiana	49.96-1057.53	(Palma et al., 2020a)
Losartan	Foz do Tejo	1.52-64.70	(Reis-Santos et al., 2018)
Opioides			
Codeína	Bacia do Guadiana	Nd-131.96	(Palma et al., 2020a)

Nd- não detetado

2.2.2 Métodos analíticos utilizados na quantificação de fármaco em amostras ambientais

A detecção de fármacos em amostras ambientais tornou-se possível nos finais do séc. XX com o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e robustos, capazes de detetar, quantificar e identificar poluentes em quantidades vestigiais (ng L^{-1} – $\mu\text{g L}^{-1}$) (Paíga et al., 2019; Papagiannaki et al., 2022b).

Existem várias técnicas utilizadas na quantificação de fármacos em amostras ambientais. Essas técnicas incluem a espectrofluorimetria, espectrofotometria de absorção molecular, eletroforese capilar e alguns métodos voltamétricos (Carrajola, 2021). No entanto, a técnica mais amplamente utilizada é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) isolada ou acoplada à espectrometria de massa (LC-MS ou LC-MS/MS), devido à sua capacidade de detecção e identificação simultânea de diferentes compostos, com alta resolução em um curto período. Além disso, é uma técnica seletiva e sensível, que oferece uma boa precisão (Carrajola, 2021; Paíga et al., 2019; Papagiannaki et al., 2022b).

2.2.3 Características físico-químicas do diclofenaco e do naproxeno

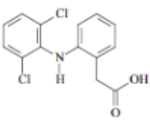
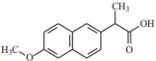
Os grupos de fármacos que geram maior preocupação ambiental incluem anti-inflamatórios não esteroides, antibióticos, β bloqueadores, antiepiléticos, antidepressivos, hormonas e anti-histamínicos (Awfa et al., 2018; Kanakaraju et al., 2018b).

Assim, para selecionar os fármacos a estudar neste trabalho foram usados os seguintes critérios:

- Consumo anual em Portugal e em outros países;
- Frequência de detecção em amostras ambientais;
- Comportamento e remoção em ETARs convencionais;
- Biodegradabilidade;
- Classes farmacoterapêuticas e propriedades físico-químicas (características ácido-base, $\log K_{ow}$, solubilidade em água, etc)

Com base nos critérios mencionados anteriormente, foram selecionados para este estudo os fármacos naproxeno e diclofenaco. A tabela 2.2 apresenta as respectivas características físico-químicas para cada um dos fármacos.

Tabela 2.2 Principais características físico-químicas do diclofenaco e do naproxeno

Nome comum	Nome IUPAC	Formula molecular e estrutura	Massa molecular (g/mol)	pKa	Solubilidade (mg L ⁻¹) 25°C	log Kow
Diclofenaco a,b	2-[(2,6-dichlorophenyl) amino]benzene acetic acid		296,1	4,15	2,37	4,51
Naproxeno a,c	(S)-6-methoxy- α -methyl-2-naphthaleneacetic acid		230,26	4,15	15,9	3,18

a-(Madikizela & Chimuka, 2017); b-(Castellari & Ottani, 1997); c-(King et al., 2011)

O naproxeno é um ácido orgânico fraco e polar que pertence ao grupo dos anti-inflamatórios não esteroides. Possui propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. É comumente utilizado no tratamento de artrite, febre e dores intensas, quando administrado em doses elevadas. A sua disponibilidade sem receita médica contribuiu para a sua popularidade significativa no mercado farmacêutico, o que resulta na sua consequente presença no ambiente (Guzik, 2020; Madikizela & Chimuka, 2017; Reza & Ahmaruzzaman, 2016). A presença de naproxeno na água gera grande preocupação pois a sua bioacumulação pode levar à suspensão da atividade metabólica de alguns enzimas (Guzik, 2020). Para além disso, a sua fotodegradação pode levar à formação de outros compostos mais tóxicos e persistentes (Guzik, 2020).

Nas ETARs, a remoção e degradação do naproxeno varia entre os 40% e a sua eliminação quase total (Guzik, 2020). Devido à decomposição incompleta do naproxeno, este é detetado, em Portugal e no resto do mundo, em águas subterrâneas e em todos os tipos de águas superficiais como rios, lagos e até mesmo em água potável, sendo que a

sua concentração nos mesmos e nas ETARs é superior à concentração recomendada pela agência europeia de medicamentos (Guzik, 2020).

O diclofenaco, assim como o naproxeno, é um medicamento pertencente ao grupo dos anti-inflamatórios não esteroides, que possui propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. Pode ser administrado por via oral, cutânea, oftálmica, retal, injeção intramuscular e perfusão endovenosa (Castellari & Ottani, 1997; Gan, 2010; NSH, 2021). É utilizado no tratamento da dor, da inflamação e de edemas pós-traumáticos, sendo indicado para artrites, inflamações dentárias, estados inflamatórios em ginecologia, síndromes dolorosas da coluna vertebral, reumatismos não articulares, crises de enxaquecas, etc. (Castellari & Ottani, 1997; INDICE, 2023; NSH, 2021).

2.3 Remoção dos fármacos nas ETARs convencionais

Como anteriormente mencionado, as ETARs são a principal fonte de contaminação do ambiente aquático, uma vez que é majoritariamente a partir destas que os fármacos, respetivos metabolitos e produtos de transformação são lançados para o ambiente (Awfa et al., 2018; Kanakaraju et al., 2018b).

As ETARs recebem águas residuais provenientes de diversas fontes, como atividades domésticas, urbanas, industriais, agrícolas e hospitalares, resultando em efluentes com diferentes propriedades físicas, químicas e microbiológicas (Santos et al., 2022). Além disso, as ETARs não foram projetadas para remover fármacos persistentes e resistentes aos métodos químicos e biológicos convencionais, o que as torna ineficientes na remoção dessas substâncias (Kanakaraju et al., 2018b).

Em geral, a eficiência de remoção de fármacos por processos biológicos depende dos processos de tratamento, das propriedades físico-químicas dos fármacos, da população microbiana presente e dos parâmetros de operação, tais como pH, temperatura, tempo de retenção nas lamas, concentração da biomassa e tempo de retenção hidráulica. Portanto, a percentagem de remoção pode variar de uma ETAR para outra (Kanakaraju et al., 2018b).

O tratamento convencional numa ETAR segue 4 etapas antes de devolver as águas à natureza. As etapas de tratamento preliminar e tratamento primário têm como objetivo

a remoção de sólidos por processos físicos, como gradagem, desarenamento e sedimentação, além da remoção de substâncias como gorduras, óleos e outros materiais flutuantes (Águas do Vale do Tejo & EpaL, 2021; Gaffney et al., 2017; Jasim, 2020). Nessas duas etapas, há uma remoção limitada de micropoluentes orgânicos, incluindo fármacos. Devido à baixa atividade microbiológica nessas etapas, qualquer remoção de fármacos e respetivos metabolitos deve-se à sua adsorção às partículas dos sólidos suspensos que são removidas nos sedimentadores (Dordio & Carvalho, 2015).

O tratamento secundário é um tratamento biológico levado a cabo por microrganismos como bactérias e fungos e tem como objetivo a remoção da matéria orgânica solúvel facilmente biodegradável e alguns compostos inorgânicos como nitratos e fósforo (Dordio & Carvalho, 2015). É também nesta fase que se inicia a remoção dos fármacos. No entanto, este tratamento apresenta uma capacidade de remoção limitada para muitos fármacos uma vez que muitos deles são poucos biodegradáveis (Dordio & Carvalho, 2015; Jasim, 2020).

Finalmente, no tratamento terciário, a água é submetida a processos de desinfecção, como radiação ultravioleta ou adição de hipoclorito de sódio, entre outros. Esta última etapa assegura uma higienização da água tratada e também a remoção de alguns compostos específicos, incluindo fármacos e respetivos metabolitos. No entanto, é importante destacar que este último tratamento não é implementado em todas as ETARs (Águas do Vale do Tejo & EpaL, 2021; Dordio & Carvalho, 2015).

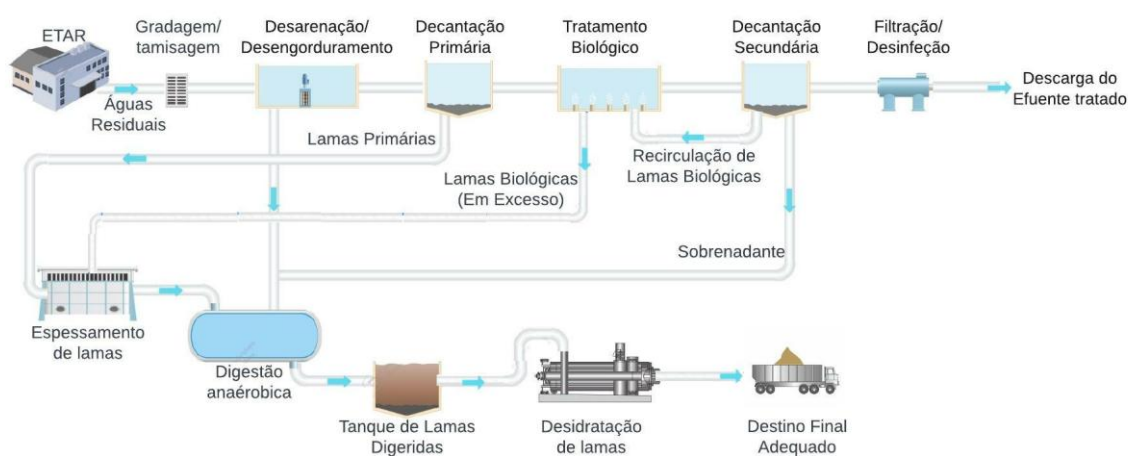


Figura 2.2 Esquema de funcionamento de uma ETAR convencional

2.4 Leitos Construídos de Macrófitas

Os leitos construídos de macrófitas (LCMs) são zonas húmidas artificiais ou seminaturais que visam a remoção de poluentes de águas residuais industriais, urbanas ou agrícolas. Estes sistemas usam a combinação de processos físicos, químicos, biológicos e bioquímicos por ação dos 4 componentes principais, água, matriz de suporte, plantas (macrófitas) e microrganismos, para a remoção de poluentes, simulando os processos que ocorrem nas zonas húmidas naturais (Abbassi & Yadav, 2020; Dires et al., 2019; global wetland technology, 2021 Omondi & Navalía, 2020; Scholz, 2016). A remoção dos poluentes nos LCMs pode ser feita por degradação microbiana, absorção, armazenamento e/ou metabolização pelas plantas, bem como por oxidação-redução, fotodegradação, adsorção e filtração física através da matriz (Dordio & Carvalho, 2018, 2013; Omondi & Navalía, 2020).

Os LCMs podem ser utilizados individualmente ou inseridos nas fases de tratamento secundário e terciário das ETARs para o tratamento das águas residuais (Abbassi & Yadav, 2020; Dordio & Carvalho, 2018; Omondi & Navalía, 2020). Por outro lado, a utilização de LCMs também apresenta alguns desafios uma vez que a sua eficiência pode apresentar alguma sazonalidade devido a variações de temperatura e diferentes períodos de exposição solar. Estes fatores afetam de forma direta a fisiologia da planta e de forma indireta o metabolismo dos microrganismos, uma vez que as baixas temperaturas tendem a desacelerar o metabolismo dos mesmos, resultando numa eficiência de remoção inferior. Para além disto, os LCMs requerem uma grande área para a sua instalação quando comparados com as ETARs convencionais, limitando a sua utilização a aglomerados populacionais pequenos (Dordio & Carvalho, 2018; Omondi & Navalía, 2020; M. Wang et al., 2017).

A eficiência dos LCMs na remoção dos fármacos depende do tipo, manutenção e interação entre os seus componentes. Desta forma a seleção dos componentes é extremamente importante de forma a maximizar o desempenho de cada um deles, e do seu conjunto, na remoção dos poluentes. Adicionalmente, os LCMs também constituem o habitat de vários organismos e podem ser construídos de forma harmoniosa com o ambiente circundante, apresentando não só vantagens ecológicas e económicas como também vantagens estéticas (Omondi & Navalía, 2020). A figura 2.3 apresenta os

principais processos que ocorrem num LCMs, bem como os principais fatores que afetam a sua performance.

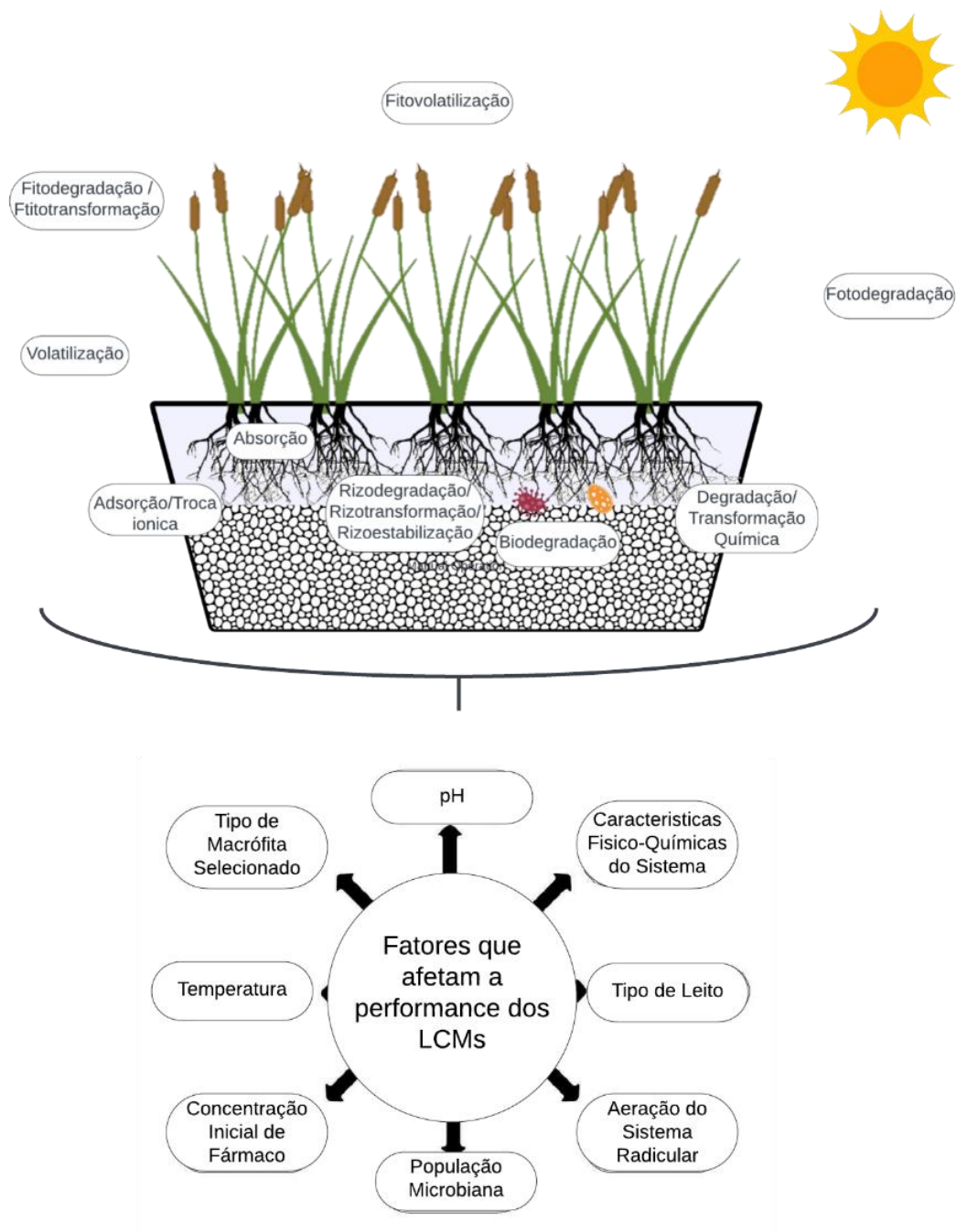


Figura 2.3 LCMs e os fatores que afetam a sua performance

2.4.1 Papel dos componentes dos LCM na remoção dos fármacos

Nos LCMs, os três componentes (a matriz de suporte, as plantas e os microrganismos) atuam de forma integrada na remoção de fármacos, por meio de uma grande variedade de processos físicos, químicos e biológicos, tal como se apresenta na figura 2.4.

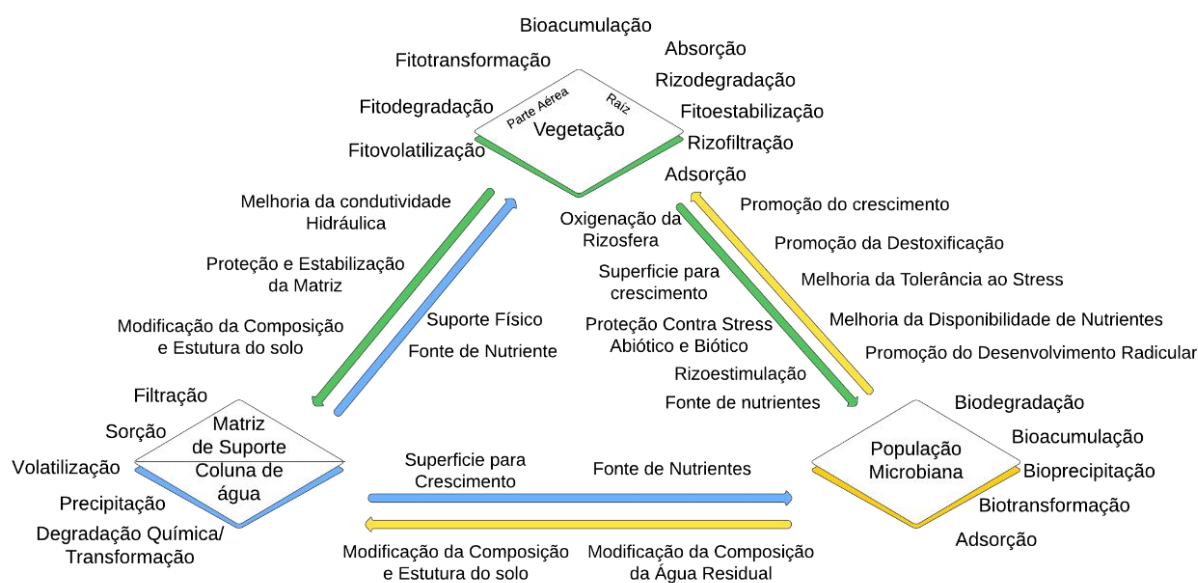


Figura 2.4 Papel dos componentes dos LCMs e principais processos envolvidos na remoção de fármacos

2.4.1.1 Matriz de suporte

A matriz é um dos componentes principais dos LCMs e desempenha várias funções. A matriz pode filtrar as águas poluídas, retendo alguns poluentes. Serve também como suporte para as raízes das plantas e constitui um ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos que têm um papel crucial na transformação e remoção dos poluentes (Omondi & Navalía, 2020; J. Wang et al., 2021).

A matriz pode ser constituída por diversos materiais naturais ou artificiais. No entanto, existem alguns parâmetros a ter em consideração na seleção da mesma. Na seleção da matriz deve ter-se em consideração a resistência mecânica e química dos

materiais que a compõem, bem como a toxicidade para o ambiente, plantas e microrganismos, porosidade e capacidade de sorção dos poluentes (Dordio et al., 2017).

Os agregados de argila expandida (LECA) têm sido amplamente utilizados como um dos componentes da matriz, devido às suas diversas capacidades. Entre elas destacam-se a eficiente remoção de fosfatos, elevada resistência mecânica, ótima condutividade hidráulica e estrutura favorável, que possibilita o enraizamento das plantas e o desenvolvimento de biofilmes (Mlih et al., 2020). Para além da LECA, a vermiculite é um dos materiais mais utilizados na composição da matriz de suporte, uma vez que apresenta uma elevada capacidade de remoção de nutrientes como o azoto e o fósforo (Abdelhakeem et al., 2016; C. J. Li et al., 2011).

A cortiça tem uma elevada importância económica para Portugal, uma vez que é um dos principais setores de exportação do país. Além do seu valor económico, a cortiça também possui uma importante valorização ambiental devido às suas características sustentáveis e biodegradáveis (Branco & Lopes, 2018; Mestre et al., 2014). A indústria corticeira tem procurado cada vez mais alternativas para aproveitar os resíduos gerados durante o processo de produção, e uma das possibilidades promissoras é utilizá-los como componentes com elevada capacidade de sorção em matrizes de LCMs para o tratamento de águas residuais (Mallek et al., 2018). Essa abordagem inovadora permite, não apenas reduzir o impacto ambiental dos resíduos, mas também contribuir para a eficiência dos sistemas de tratamento de águas, promovendo um ciclo mais sustentável e equilibrado para a indústria corticeira e para o meio ambiente (Lei et al., 2021; Mateus & Pinho, 2020b).

2.4.1.2 Vegetação

A componente vegetal utilizada em LCMs deve preencher alguns requisitos, nomeadamente (Scholz, 2016):

- Adaptabilidade ecológica;
- Resistência a doenças, pragas e variações climáticas;
- Elevada tolerância aos poluentes a tratar;
- Fácil propagação, colheita e crescimento rápido;

- Elevada capacidade de remoção de poluentes por assimilação direta, indireta ou processos microbianos

Normalmente, nos LCMs, as plantas mais utilizadas são as macrófitas uma vez que estas se desenvolvem em solos húmidos ou inundados e, portanto, estão adaptadas a ambientes alagados tais como os que se têm para tratamento de águas residuais. Uma outra característica interessante das macrófitas é que promovem uma elevada oxigenação junto às suas raízes, o que cria condições aeróbicas favoráveis para processos microbianos mais eficientes na biodegradação de compostos orgânicos como os fármacos (Dordio & Carvalho, 2018; Kataki et al., 2021). A espécie de macrófita utilizada varia com a região. No entanto, existem algumas macrófitas que são mais comuns a todos os climas temperados tais como a *Phragmites* spp., a *Typha* spp. ou a *Scirpus* spp.

As macrófitas são responsáveis pelo processo de fitorremediação que ocorre nos LCMs e desempenham um papel importante na remoção de alguns fármacos através de processos de adsorção, absorção, bioacumulação e metabolização (figura 2.5) (X. Li et al., 2021). Para além disto, atraem uma grande quantidade de “vida” como aves e formam ambientes propícios para protozoários, zooplâncton, fitoplâncton que participam na remoção de poluentes e ajudam na integração visual dos LCMs (Dordio & Carvalho, 2018; Omondi & Navalía, 2020).

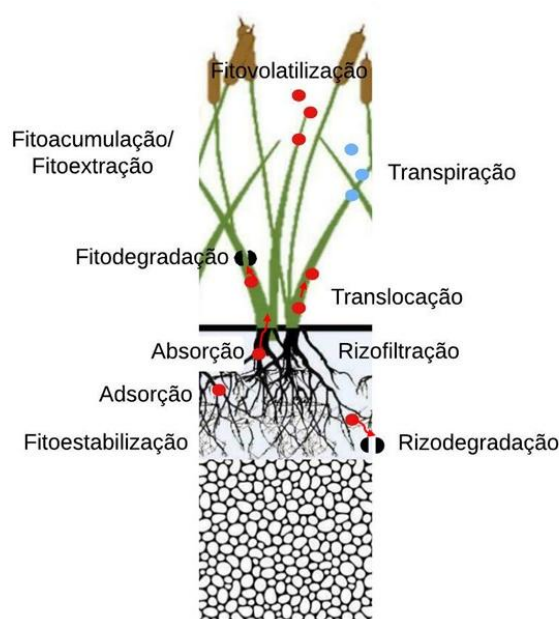


Figura 2.5 Mecanismos principais envolvidos na fitorremediação

Tendo em conta os critérios referidos anteriormente, alguns estudos sugerem que a *Typha* spp. é a melhor opção de macrófita para os LCMs uma vez que apresenta elevada tolerância a compostos farmacêuticos, contribuindo para a sua remoção das águas contaminadas (Dordio et al., 2010, 2017, 2009, 2011; Nocetti et al., 2020).

A *Typha* spp. é uma macrófita com ampla distribuição geográfica e relevância ecológica numa grande variedade de ecossistemas e de fácil cultivo (figura 2.6). Para além disto, apresenta uma elevada resistência a pragas e doenças, sendo também resistente a diversos poluentes ambientais como fármacos e pesticidas (H. B. Sharma et al., 2019). É uma planta natural da região alentejana, o que a torna menos suscetível a variações que possam ocorrer no seu habitat. As características da *Typha* spp. encontram-se registadas na tabela 2.4.



Figura 2.6 Mapa da distribuição da *Typha* spp. em Portugal (Botânico UTAD, n.d.)

Tabela 2.3 Características da *Typha* spp. (Azevedo, 2022; Botânico UTAD, n.d.)

Gênero	<i>Typha</i>
Família	<i>Typhaceae</i>
Nome comum	Foguete, Tábua-estreita
Ocorrência	Ambientes húmidos, arenosos e pantanosos
Distribuição geral	Cosmopolita
Porte	1-3 m de altura
Época de floração	Junho-Novembro
Reprodução	Sementes
Indicador ecológico	Solos arenosos

2.4.1.3 População microbiana

As condições geradas pelas macrófitas utilizadas nos LCMs tornam favorável o desenvolvimento de microrganismos e a formação de biofilmes que auxiliam na remoção dos fármacos por mecanismos como biossorção, bioprecipitação, bioacumulação e bioimobilização (Davis, 1995; Kataki et al., 2021; Varma et al., 2021). Os biofilmes possuem uma elevada capacidade de absorção de nutrientes sendo capaz de reter fosfatos e nitratos, transformando-os em formas biodisponíveis, regulando, desta forma, a biodisponibilidade de nutrientes. Adicionalmente, a população presente nos LCMs estimula o desenvolvimento e crescimento das raízes das macrófitas e fornece proteção às mesmas contra agentes patogénicos e stresses abióticos (Davis, 1995; Kataki et al., 2021; Omondi & Navalía, 2020; Varma et al., 2021).

A acumulação e espessamento excessivo do biofilme pode causar a diminuição da porosidade da matriz, diminuir a absorção de CO₂ e O₂, e limitar a eficiência de remoção de nitratos, afetando de forma negativa o sistema (Kataki et al., 2021).

A biodiversidade da população microbiana é dependente de vários fatores nomeadamente do tipo de macrófitas, substrato e composição do efluente. Outros fatores como o pH, a temperatura, a salinidade, a eventual presença de compostos tóxicos e a

quantidade de nutrientes disponível também afetam a composição e atividade da população microbiana (Kataki et al., 2021; Vymazal et al., 2021).

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria GRAS, Gram-Positiva, esporulada, aeróbia facultativa em forma de bastão que habita no solo, nas raízes das plantas e em ambientes aquáticos (Errington & van der Aa, 2020; Mohsin et al., 2021). É cultivada em meios de cultura simples, contendo apenas sais essenciais e fontes de carbono, nitrogênio, e fósforo, a temperaturas entre os 10 e os 55°C, sendo a temperatura de crescimento ótima entre os 30° e 37°C (Errington & van der Aa, 2020; Martinez, 2013; Piggot, 2009). É uma bactéria amplamente estudada pois é de fácil manipulação genética e tem uma elevada relevância econômica, uma vez que é utilizada na produção de enzimas como proteases e amilases, na indústria alimentar para a produção de produtos fermentados e na indústria farmacêutica para a produção de antibióticos, vitaminas e vacinas (Martinez, 2013; Piggot, 2009; Su et al., 2020). Adicionalmente, é também utilizada na biorremediação de águas (Mohsin et al., 2021) .

Na natureza, o *B. subtilis* é comumente encontrada nos solos, associada a raízes de plantas, o que melhora significativamente a qualidade dos solos, o conteúdo de carbono e promove o crescimento das plantas (Su et al., 2020). A formação de biofilmes impede o crescimento de bactérias patogênicas, aumenta a assimilação de nutrientes, oferece proteção para organismos contra condições desfavoráveis e propicia a resistência a antibióticos (Martinez, 2013; Su et al., 2020).

A capacidade do *B. subtilis* para formar esporos e produzir inúmeras enzimas que degradam uma variedade de substâncias, torna-a resistente a alterações ambientais como temperatura e pH, sendo capaz de se adaptar a ambientes com elevados níveis de oxigênio e com elevados stresses osmóticos (Su et al., 2020; Weinstock, 2001).

Alguns estudos referem que bactérias do gênero *Bacillus*, nomeadamente o *B. subtilis*, podem ser utilizadas como uma ferramenta de biorremediação de baixo custo para o tratamento de efluentes municipais e industriais, em particular para a remoção de substâncias como fármacos, pesticidas e metais pesados (Marchlewicz et al., 2016a; Mohsin et al., 2021; Wróbel et al., 2023).

3 Metodologia Experimental

3.1 Materiais e Reagentes

Para a realização do trabalho experimental, foram utilizadas soluções aquosas preparadas a partir de quatro compostos farmacêuticos puros: a carbamazepina, o diclofenaco, o ibuprofeno e o naproxeno. Na tabela 3.1 apresentam-se as principais características das substâncias utilizadas e os respectivos fornecedores .

Tabela 3.1 Principais características das substâncias químicas utilizadas

Substância química	Formula química	Riscos e segurança	Massa molar (g/mol)	Grau de pureza (%)	Fornecedor
Acetonitrilo	C_2H_3N	Tóxico; inflamável	41,05	> 99,9	Merck
Ácido fosfórico	H_3PO_4	Corrosivo	98,00	85,0	JMGS
Água para HPLC	H_2O	-	18,02	-	Fisher Chemical
Carbamazepina	$C_{15}H_{12}N_2O$	Nocivo; Cancerígeno	236,269	98,8	Acofarma
Cloreto de amônio	NH_4Cl	Tóxico; Nocivo	53,49	$\geq 99,5$	ACS reagent
Diclofenaco	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	Tóxico	296,148	99,4	Acofarma
Fosfato de potássio monobásico	KH_2PO_4	Tóxico	136,09	$\geq 99,0$	Sigma Aldrich
Glucose	$C_{16}H_{12}O_6$	-	180,16	$\geq 99,0$	Himedia
Hidrogenofosfato de sódio di-hidratado	$NaHPO_4 \cdot 2H_2O$	-	177,99		Sigma Aldrich
Ibuprofeno	$C_{13}H_{18}O_2$	Tóxico	206,28	$\geq 98,0$	Biosynth
Metanol	CH_3OH	Tóxico; Inflamável	32,4	99,8	Fisher Chemical
Naproxeno	$C_{14}H_{13}NaO_3$	Nocivo	252,24	98-102	Sigma
Sulfato de magnésio hexa-hidratado	$MgSO_4 \cdot 6H_2O$	-	228,46	$\geq 99,0$	Riëdel-de Haën

A matriz de suporte a otimizar nos ensaios era composta por dois materiais argilosos processados industrialmente, a vermiculite esfoliada (Aguiar & Mello, Lda, Portugal) com granulometria 2 e agregados de argila expandida (LECA) com granulometria 2/4 (MaxitGroup, Portugal). Estes dois materiais foram misturados uniformemente numa proporção de 1:1 (v:v). Esta mistura dos dois matérias nestas proporções já tinha sido utilizada em estudos anteriores como matriz de suporte de microcosmos de LCMs para a remoção de alguns fármacos (Carrajola, 2021). Adicionalmente, foram testados granulados de cortiça expandida de granulometrias 0,5/3 e 3/5 mm (Amorim Cork Insulation S.A.), com o objetivo de incorporar na composição da matriz de suporte os granulados de cortiça com a granulometria que apresentar melhores resultados em função dos objetivos do trabalho.

Na tabela 3.2 apresentam-se 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.

Tabela 3.2 Características físico-químicas da vermiculite, da LECA e da mistura dos dois materiais

Material	LECA ^a	Vermiculite ^a	Mistura LECA/Vermiculite (1:1 v/v) ^b
Granulometria (mm)	2-6.3	0.8-5	-
Porosidade (%)	66 ± 1	49± 1	54 ± 2
Densidade aparente (kg m⁻³)	88 ± 2	394 ± 10	291 ± 14
pH (H₂O)	7,44 ± 0.06	9,04±0.08	8,67 ± 0.05

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

Nas figuras seguintes são apresentadas, respetivamente, a mistura dos dois materiais argilosos (figura 3.1) e os dois tipos de cortiça avaliadas (figura 3.2), materiais a usar na composição da matriz de suporte dos microcosmos de LCMs.



Figura 3.1 Mistura de LECA 2/4 e vermiculite 2 (1:1, v/v)



Figura 3.2 Cortiça 3/5 (à esquerda) e cortiça 0.5/3 (à direita)

3.2 Metodologia analítica

A quantificação do naproxeno e do diclofenaco em solução aquosa foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV-Vis, com recurso a um equipamento VWR HITACHI com uma bomba L-2130 (Elite Lachrom), equipado com um autosampler VWR HITACHI L 2200 (Elite Lachrom) e com um detetor UV L-2400 (Elite Lachrom).

A cromatografia líquida é uma técnica muito seletiva e sensível que oferece uma boa precisão e exatidão nos resultados. Assim, optou-se pela utilização desta técnica analítica uma vez que as soluções utilizadas no trabalho experimental continham uma mistura de quatro fármacos (carbamazepina, diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno), sendo assim necessário efetuar a separação completa e a quantificação seletiva de cada um deles. A necessidade de quantificar todos os quatro fármacos apesar de apenas dois deles serem o alvo deste estudo justifica-se pela circunstância de que o trabalho experimental foi realizado em conjunto com outra colega de mestrado, que estudou os outros dois fármacos, o naproxeno e o diclofenaco. Assim, havia a necessidade de que o método analítico utilizado permitisse a quantificação de todos estes quatro compostos em simultâneo.

Antes de quantificar os fármacos em solução aquosa utilizando esta técnica analítica, foram realizados procedimentos de otimização das condições de análise e validação do método analítico.

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

3.2.1.1 Determinação do comprimento de onda de quantificação

Na quantificação dos compostos por HPLC foi utilizado um detetor de UV-Vis de comprimento de onda (c.d.o.) único variável. Os detetores UV-Vis estão entre os mais amplamente empregados em HPLC, devido ao seu custo relativamente baixo e à sua baixa sensibilidade a variações pequenas no fluxo e na temperatura. Existem várias configurações de detetores UV-Vis, sendo o de c.d.o. único variável uma das mais comuns, principalmente por ser uma das alternativas mais económicas. Contudo, esse tipo de detetor limita a análise a um único c.d.o. durante o processo cromatográfico, embora

esse c.d.o. possa ser escolhido arbitrariamente e ajustado de acordo com a análise realizada.

Com o intuito de otimizar a quantificação dos compostos em estudo, e considerando as limitações do detetor utilizado, que não permite a detecção simultânea a múltiplos c.d.o. (ou seja, a cada máximo de absorvência de cada fármaco em simultâneo), foi necessário selecionar um c.d.o. que representasse um valor de compromisso. Este c.d.o. foi escolhido de modo a maximizar a absorvência de todos os fármacos presentes, permitindo, assim, a sua quantificação simultânea.

Dado que os ensaios foram realizados utilizando uma solução contendo quatro fármacos (carbamazepina, diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno), como já foi referido anteriormente, foi necessário otimizar as condições de análise de modo a conseguir quantificar cada composto na solução.

Inicialmente, foram determinados os c.d.o. em que a absorvência é máxima para cada um dos compostos. Neste trabalho, uma atenção especial foi dada aos fármacos aqui estudados, i.e. naproxeno e diclofenaco, os quais, de acordo com a literatura consultada (Naveed & Qamar, 2014; Primrose et al., 2019), apresentam máxima absorvência a 230 nm e 276 nm, respetivamente. Esses valores foram confirmados por meio da obtenção do espectro de absorção molecular de uma solução de 10 mg L⁻¹ no intervalo de c.d.o. entre 190 e 340 nm (Anexo A). O mesmo procedimento foi utilizado para determinar o c.d.o. correspondente à absorvência máxima dos outros dois fármacos das misturas (carbamazepina e ibuprofeno). Foi selecionado o c.d.o. de 220 nm para a quantificação de todos os compostos nas análises por HPLC/UV-Vis, uma vez que este c.d.o., não sendo o máximo de absorvência de nenhum dos compostos em solução, corresponde ao c.d.o. em que todos os compostos apresentam absorvência elevada, sendo possível detetar e quantificar os 4 fármacos em solução, em simultâneo.

3.2.1.2 Condições de quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis

Para o doseamento dos fármacos em solução aquosa, por HPLC/UV-Vis utilizou-se uma coluna analítica de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, Alemanha) com dimensões de 250 mm x 4,6 mm e com um tamanho de partículas de 5,0 µm e, como fase móvel, recorreu-se a um sistema binário de eluentes: A- acetonitrilo,

B- água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fosfórico (H_3PO_4). A eluição foi realizada de forma isocrática, tendo sido testadas diferentes proporções de A e B para obter uma composição de fase móvel que permitisse uma boa separação entre os quatro fármacos presentes na solução e a realização dessa separação no menor tempo possível. A proporção de eluentes que apresentou os melhores resultados foi de 60% de eluente A e 40% de eluente B.

As análises foram realizadas à temperatura ambiente, o volume de amostra injetado foi de 20 μL e o caudal da fase móvel foi de 1 mL min^{-1} . Foram realizadas no mínimo três réplicas das injeções de cada amostra, as quais foram previamente filtradas usando filtros de 0,45 μm com membrana de PTFE da Labfil, selecionados anteriormente (ver seção 3.2.1.3).

Para a quantificação dos fármacos utilizou-se o método do padrão externo. Para isso, uma série de soluções padrão foram preparadas com concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,5 e 5,0 mg L^{-1} , para cada um dos fármacos. Estas soluções foram obtidas a partir de uma solução padrão stock de 10 mg L^{-1} de cada um dos quatro fármacos.

Cada solução padrão foi injetada pelo menos três vezes no equipamento de HPLC/UV-Vis, utilizando as condições de trabalho previamente otimizadas.

A solução padrão *stock* de 10 mg L^{-1} foi preparada com água ultrapura, tendo sido adicionado um pequeno volume ($< 0,5\%$) de metanol para melhorar a solubilidade em água dos fármacos menos solúveis. Para minimizar a possível fotodegradação dos compostos mais fotossensíveis, nomeadamente o naproxeno e o diclofenaco, todas as soluções foram armazenadas no escuro até à sua utilização.

3.2.1.3 Seleção dos filtros e otimização do volume de amostra a filtrar

Em análises realizadas por HPLC, a filtração das amostras por meio de membranas filtrantes é um procedimento essencial para prevenir a obstrução dos capilares ou da coluna cromatográfica. Geralmente, essa filtração é realizada através de membranas de baixa porosidade, as quais devem remover partículas pequenas presentes na amostra sem, no entanto, reter o analito ou libertar substâncias interferentes. No entanto, estudos publicados na literatura e pesquisas conduzidas por membros da equipa de investigação revelaram que alguns tipos de membranas filtrantes, feitas de certos materiais e

produzidas por certas marcas comerciais, podem apresentar uma retenção significativa de determinados fármacos, dependendo do volume da amostra filtrada e da concentração dos analitos (Carrajola, 2021).

Para selecionar o tipo de filtro a utilizar e otimizar a preparação do filtro, foram testados dois tipos de filtros diferentes, um com membrana de nylon com uma porosidade de 0,45 μm da marca Labfil e um filtro com membrana de PTFE com uma porosidade de 0,45 μm , também da marca Labfil.

Para a realização deste estudo procedeu-se à injeção de soluções com 2,5 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} de cada fármaco (carbamazepina, diclofenaco, naproxeno e ibuprofeno), antes e após serem filtradas utilizando cada um dos filtros, com recurso a seringas de plástico de 10 mL (Ecojet, Portugal). Foram testados volumes de 5, 10, 15, 20 e 25 mL, sendo que para cada um destes volumes apenas o último 1 mL de filtrado foi recolhido e injetado no HPLC. Cada ensaio foi repetido em triplicado para cada uma das membranas filtrantes estudadas. Para cada uma das concentrações testaram-se os vários volumes até se verificar qual era o menor volume de filtrado que permitia obter a maior percentagem de recuperação do composto (idealmente, próxima de 100%). Na tabela 3.3 apresentam-se as principais características e fabricantes dos filtros utilizados.

Tabela 3.3 Características e fabricantes dos filtros usados

Filtro	PTFE	Nylon
Tamanho dos poros da membrana (μm)	0,45	0,45
Diâmetro (mm)	25	25
Fabricante	Labfil	Labfil
Código	C0000609	C0000605

3.2.1.4 Validação do método analítico

O método analítico foi validado através da determinação da exatidão, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), linearidade da reta de calibração e dos limites de deteção e de quantificação, de acordo com os procedimentos descritos no guia “ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)” (ICH, 1994).

Para a avaliação da exatidão e da repetibilidade do aparelho foram utilizadas três soluções com concentrações dentro da gama de valores das concentrações dos fármacos utilizadas nos ensaios: baixa ($\sim 0,5 \text{ mg L}^{-1}$), média ($\sim 2,5 \text{ mg L}^{-1}$) e alta ($\sim 5 \text{ mg L}^{-1}$). Foram efetuadas, pelo mesmo analista, 3 injeções sucessivas da mesma solução padrão e utilizando a mesma composição da fase móvel de forma a que as condições de eluição se mantivessem inalteradas. A exatidão, expressa em percentagem, foi calculada através da razão entre a média das concentrações determinadas experimentalmente e a concentração teórica, previamente conhecida (ICH, 1994). A repetibilidade foi avaliada com base na dispersão dos resultados das medições, ou seja, com o desvio padrão relativo (% DPR) das áreas dos picos correspondentes a cada analito (ICH, 1994).

A reprodutibilidade do aparelho foi avaliada por 3 injeções sucessivas das mesmas soluções em três dias diferentes. Foi avaliada ainda com base na dispersão ou desvio padrão relativo (% DPR) das áreas dos picos atribuídos ao analito (ICH, 1994).

As retas de calibração foram obtidas através da representação gráfica das áreas resultantes das 3 injeções das soluções padrão em função das respetivas concentrações (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,5 e 5,0 mg L^{-1}). Foi utilizado o método dos mínimos quadrados (regressão linear) para a análise da correlação linear na gama de concentrações usadas, possibilitando a obtenção do declive e do coeficiente de determinação R^2 .

O limite de deteção instrumental (LDI) é uma medida estatística que indica a menor quantidade de analito que pode ser detetada com confiabilidade acima do ruído de fundo num determinado instrumento analítico e é calculado como a concentração do analito correspondente ao sinal do branco mais um múltiplo do desvio padrão do sinal do branco (ICH, 1994). Este múltiplo é geralmente estabelecido como 3,3 vezes o desvio padrão, sendo este valor escolhido tendo por base critérios estatísticos que visam garantir que exista uma elevada probabilidade de que o sinal seja realmente devido à presença do analito em vez de se dever meramente a flutuações aleatórias (ICH, 1994). O LDI é expresso na mesma unidade de medida do doseamento do analito (por exemplo, mg L^{-1} , ppm, etc.) e permite determinar o limite de aplicabilidade de um método analítico.

O limite de quantificação instrumental (LQI) é uma medida mais rigorosa do que o LDI e é utilizado para avaliar a menor quantidade ou concentração de uma substância que pode ser quantificada com precisão e confiabilidade num instrumento analítico. É calculado como a concentração do analito correspondente ao sinal do branco mais um

múltiplo do desvio padrão do sinal do branco. Esse múltiplo é geralmente maior do que o utilizado para o cálculo do LDI, podendo ser, por exemplo, 10 vezes o desvio padrão (ICH, 1994). É expresso na mesma unidade de medida do doseamento do analito e é útil para estabelecer os limites de aplicabilidade de um método analítico não apenas para identificação qualitativa mas, sobretudo, para quantificação rigorosa dos analitos.

Determinou-se ainda a percentagem de recuperação de cada fármaco pela membrana filtrante, com base na razão entre a concentração dos compostos na solução filtrada e a concentração dos mesmos na solução não filtrada."

3.3 Otimização da composição da matriz a utilizar no microcosmo de LCMs

Em estudos previamente conduzidos pela equipa de investigação, foi avaliada a eficiência de uma matriz de suporte composta por uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 3, na proporção 1:1 (v/v), na remoção e retenção de diversos fármacos. Os resultados obtidos revelaram-se, de modo geral, promissores (Carrajola, 2021; A. Dordio, Miranda, et al., 2017).

Com o objetivo de melhorar a eficiência de remoção de fármacos pela matriz de suporte previamente testada, foi avaliada a capacidade de adsorção de um novo material, granulados de cortiça expandida, para a sua potencial incorporação na composição da matriz composta pela mistura de LECA e vermiculite. Nesse contexto, foram investigadas duas granulometrias distintas da cortiça, como já foi referido na secção 3.1.

3.3.1 Preparação dos materiais

A LECA, a vermiculite esfoliada e os granulados de cortiça expandida foram previamente lavados sucessivamente com água ultra-pura (Fisher Chemical), de modo a remover as partículas e os sólidos em suspensão que estes materiais pudessem apresentar devido ao desgaste mecânico. Posteriormente, foram colocados numa estufa a uma temperatura de 105°C, durante 24 horas, de forma a secarem. Esta etapa é, também, essencial para a redução da população microbiana, naturalmente presente no material.

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

3.3.2 Seleção da classe granulométrica de cortiça a utilizar na composição da matriz

Foram conduzidos ensaios utilizando duas granulometrias distintas de cortiça, com o objetivo de avaliar como o tamanho dos grânulos de cortiça influencia a remoção de fármacos presentes em solução: carbamazepina (CBZ), naproxeno (NAP), diclofenaco (DCF) e ibuprofeno (IBU). Nestes ensaios foram utilizados granulados de cortiça com granulometrias de 0,5/3 e 3/5 mm, os quais foram colocados em contacto com soluções aquosas contendo várias concentrações diferentes de cada fármaco (1; 2,5; 5 e 10 mg L⁻¹), durante um período de 216 horas. Os ensaios foram realizados em descontínuo, à escala laboratorial, em triplicado e à temperatura ambiente.

A razão entre o volume de solução e a massa do material foi ajustada cuidadosamente, para cada granulometria, de forma a garantir uma taxa de inundação correspondente a 100%. A taxa de inundação a 100% significa que o volume de solução utilizado é suficiente para cobrir totalmente o material de cortiça, assegurando que não haja espaços vazios, o que permite um contato mais eficiente entre as soluções e os meios filtrantes, replicando a situação encontrada em contextos práticos de aplicação, como em uma estação de tratamento. Para além disso, foram usadas nos ensaios massas de cortiça de tal modo que em todos os sistemas a cortiça, tanto a da granulometria menor como a da maior, ocupasse volumes aproximadamente idênticos (~200 mL).

Todos os ensaios foram realizados no escuro, de forma a evitar a fotodegradação dos fármacos em solução, e sem agitação de modo a simular o comportamento hidráulico de um LCMs de fluxo sub-superficial, onde as velocidades de escoamento do efluente são, normalmente, baixas.

A montagem de cada ensaio, para cada granulometria e cada concentração de fármacos testada, seguiram o esquema geral ilustrado na figura 3.3.

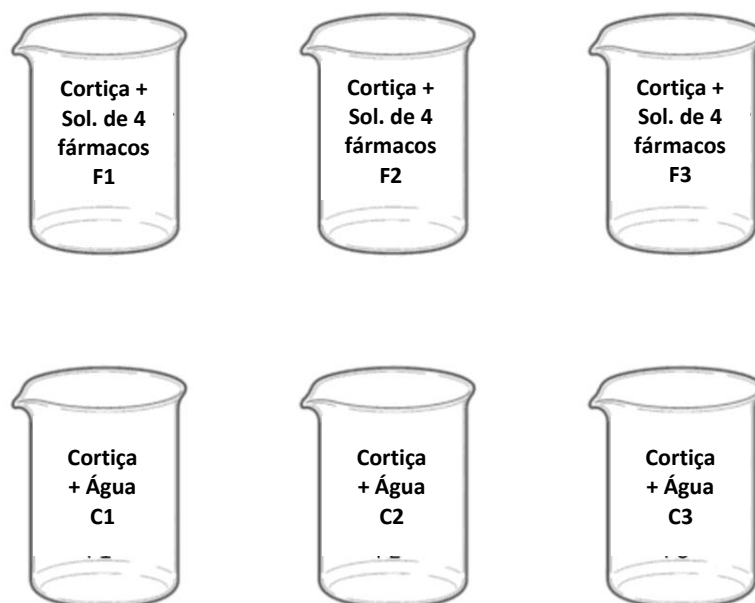


Figura 3.3 Esquema de cada ensaio para uma dada granulometria de cortiça e uma dada concentração cada fármaco. F1, F2 e F3 correspondem às réplicas dos ensaios e C1, C2 e C3 correspondem às réplicas dos controles

Assim, em cada ensaio foram realizadas 3 réplicas de sistemas contendo a solução da mistura de fármacos em contacto com a cortiça de uma dada granulometria, e 3 réplicas de sistemas contendo apenas água em contacto com a cortiça da mesma granulometria, sendo a função deste últimos sistema servir como controle.

Foram realizados no total 6 ensaios diferentes:

- 2 ensaios com cortiça de granulometria 0,5/3 mm, em contacto com soluções de fármacos de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ e 5 mg L^{-1} ;
- 4 ensaios com cortiça de granulometria 3/5 mm, em contacto com soluções de fármacos de 1 mg L^{-1} , $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, 5 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} .

Todos os ensaios tiveram a duração de 216 horas, período durante o qual foram recolhidas amostras a cada 24 horas até ao fim do ensaio.

Nestes ensaios, além de se estudar a capacidade de remoção de fármacos por duas granulometrias de cortiça, também foram investigadas as influências de determinadas condições experimentais. Essas condições incluíram o tempo de contato entre os grânulos de cortiça e as soluções aquosas, bem como as diversas concentrações iniciais dos fármacos.

Dessa forma, os ensaios abrangeram a análise dos efeitos desses fatores nas eficiências de remoção dos fármacos e forneceram informações detalhadas sobre o comportamento dos meios filtrantes de cortiça em relação à remoção de substâncias farmacêuticas presentes na solução.

3.3.3 Seleção da estratificação dos materiais a usar na composição da matriz de suporte

Para a seleção da estratificação a utilizar na composição da matriz suporte para a montagem de um microcosmos de LCMs foram testadas três estratificações distintas utilizando a mistura de materiais argilosos já referida anteriormente e os granulados de cortiça expandida: 1:1:1; 5:3:4 e 5:2:5 (materiais argilosos:cortiça:materiais argilosos). Pretendeu-se com este estudo avaliar como a proporção dos materiais utilizada em cada estratificação influencia a remoção dos fármacos presentes em solução (CBZ, NAP, DCF, IBU). Nestes ensaios foram utilizados granulados de cortiça 3/5 mm e a mistura de LECA 2/4 com vermiculite esfoliada 3 na proporção de 1:1, os quais foram colocados em contacto com uma solução aquosas contendo 2,5 mg L⁻¹ de cada fármaco durante um período de 168 horas. Os ensaios foram realizados em descontinuo, à escala laboratorial, em triplicado e à temperatura ambiente.

A razão entre o volume de solução e os volumes dos materiais foi ajustada cuidadosamente para cada estratificação de forma a garantir uma taxa de inundação correspondente a 100%, pelas mesmas razões referidas na secção 3.3.2. Todos os ensaios foram conduzidos sob as mesmas condições experimentais previamente descritas na secção 3.3.2. A figura 3.4 ilustra a montagem dos ensaios com as estratificações testadas.

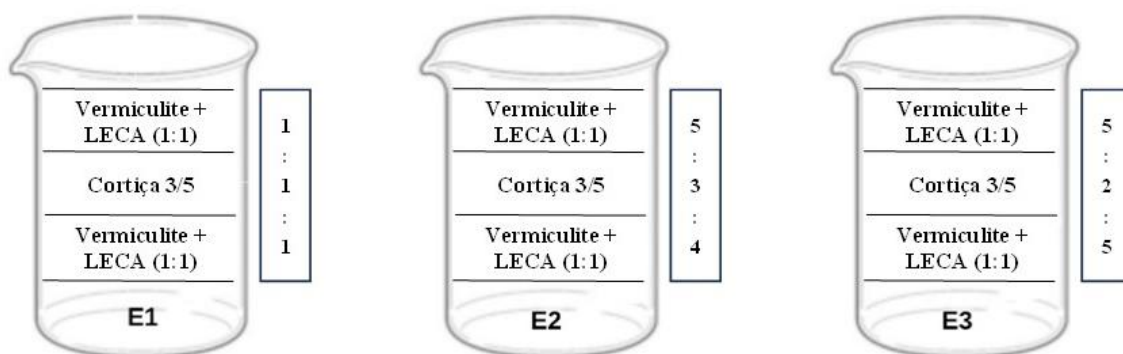


Figura 3.4 Esquema de montagem dos ensaios das estratificações

No total foram realizados 3 ensaios distintos, destinados a avaliar a remoção dos fármacos de uma solução aquosa contendo $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cada fármaco, bem como determinar algumas propriedades físico-químicas (densidade aparente, porosidade, pH) da matriz. Todos os ensaios foram compostos por 6 copos, 3 contendo solução aquosa dos fármacos e os 3 restantes contendo apenas água, com a função de controles. As 3 estratificações testadas nestes 3 ensaios foram:

- E1.** Estratificação 1:1:1, contendo 200 mL da mistura LECA + Vermiculite (1:1), 200 mL de cortiça 3/5, 200 mL da mistura LECA + Vermiculite (1:1) e a 250 mL de solução aquosa contendo $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cada fármaco;
- E2.** Estratificação 5:3:4, contendo 200 mL da mistura LECA + Vermiculite (1:1), 150 mL de cortiça 3/5, 250 mL da mistura LECA + Vermiculite (1:1) e a 250 mL de solução aquosa contendo $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cada fármaco;
- E3.** Estratificação 5:2:5, contendo 250 mL da mistura LECA + Vermiculite (1:1), 100 mL de cortiça 3/5, 250 mL da mistura LECA + Vermiculite (1:1) e a 250 mL de solução aquosa contendo $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cada fármaco.

3.4 Estudo da capacidade de degradação do naproxeno e do diclofenaco pelo *Bacillus subtilis*

3.4.1 Microrganismos

Para este estudo a bactéria selecionada foi o *B. subtilis* QST 713 que foi isolada a partir de um pré-inóculo de uma suspensão concentrada (SC) com $14,1 \text{ g L}^{-1}$ de *Bacillus subtilis* QST 713 (mínimo $1 \times 10^9 \text{ UFC/g}$). A bactéria utilizada nesta suspensão comercial foi mais recentemente identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* QST 713.

3.4.2 Meio de cultura e condições de crescimento

Microrganismos diferentes possuem condições de crescimento, como nutrientes, pH e temperatura diferentes e, por isso, o meio de cultura utilizado deve ser

cuidadosamente selecionado de forma a que este satisfaça as necessidades dos microrganismos em crescimento.

O crescimento do *B. subtilis* foi realizado em meio líquido, e para tal procurou-se selecionar um meio de cultura que incorporasse os macro e micronutrientes necessários para o seu crescimento, os quais podem naturalmente ser disponibilizados pelos materiais que constituem a matriz de suporte (LECA, vermiculite e cortiça) dos microcosmos de LCMs, onde, mais tarde, serão inoculadas as bactérias. Na tabela 3.4 encontra-se a composição do meio de cultura utilizado. O seu pH foi ajustado inicialmente a um valor próximo da neutralidade (7,1). Quando necessário, uma fonte de carbono como a glucose ($C_6H_{12}O_6$) foi adicionada ao meio de cultura antes da inoculação.

Tabela 3.4 Composição do meio de cultura usado para o crescimento do *B. subtilis* (adaptado de Greń et al., 2010; Marchlewicz et al., 2016b)

Reagente	Concentração (g L ⁻¹)
NH ₄ Cl	5,0
KH ₂ PO ₄	0.185
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1.879
MgSO ₄ ·6H ₂ O	0.5
Quando necessário	
C ₆ H ₁₂ O ₆	1,0

De modo a otimizar as condições de crescimento do *B. subtilis*, a cultura foi incubada numa orbital OHAUS, modelo ISLD04HDG, a uma temperatura constante de 30° C. Foram testadas três velocidades de agitação 150 rpm, 160 rpm e 200 rpm, tendo sido selecionada a velocidade de 200 rpm para a realização dos ensaios, dado ter sido a que conduziu a melhores resultados.

3.4.3 Preparação do inóculo

Para preparar os inóculos (figura 3.5), inicialmente foram preparados pré-inóculos em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 200 mL de meio de cultura com glucose e um volume da suspensão concentrada de *B. subtilis*, de forma a atingir uma densidade ótica

inicial de aproximadamente 0,8 medida a 600 nm (DO_{600nm}). A cultura foi incubada a 30° C e agitada a 200 rpm durante 24 horas, para garantir um elevado crescimento celular.

Após as 24 h de incubação, prepararam-se os inóculos de trabalho num Erlenmeyer de 250 mL contendo 200mL de meio de cultura com glucose (1 g L^{-1}) e um volume de pré-inóculo de forma que a DO_{600nm} inicial apresentasse um valor próximo de 0,03. A cultura foi, posteriormente, incubada a 30° C e agitada a 200 rpm durante 24 h. Estes inóculos foram utilizados para a realização dos estudos de crescimento microbiano e para os estudos de biodegradação do naproxeno e do diclofenaco pelo *B. subtilis*.

Na figura 3.5 encontra-se a representação esquemática da preparação do pré-inóculo e do inóculo de trabalho a partir da suspensão concentrada de *B. subtilis*.

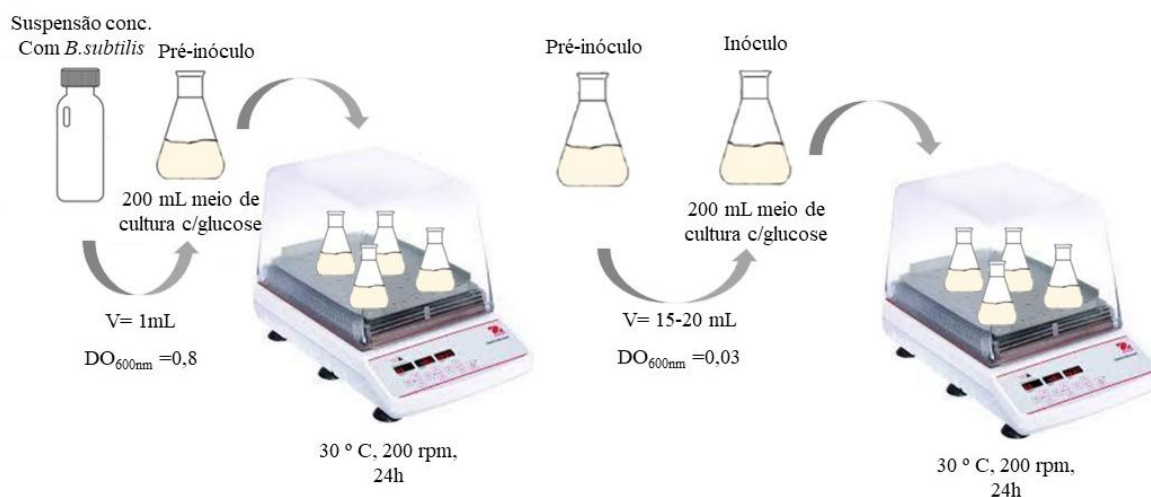


Figura 3.5 Esquema de preparação dos inóculos de trabalho a partir da solução concentrada de *B. subtilis*

3.4.4 Estudo do crescimento de culturas líquidas de *B. subtilis* em ensaios em descontínuo

O crescimento de *B. subtilis* foi estudado em regime descontínuo (*Batch*) em meio líquido, com agitação orbital a 200 rpm e temperatura constante de 30° C. Utilizou-se o método de turbidimetria para obter a curva de crescimento da bactéria, com base na determinação das densidades óticas a 600 nm (DO_{600nm}) das amostras recolhidas ao longo do tempo.

A preparação do inóculo para o estudo do crescimento da bactéria foi realizada de acordo com o descrito na secção anterior (secção 3.4.3).

Para obtenção da curva de crescimento da bactéria inoculou-se um volume adequado da cultura do inóculo, de modo que a DO_{600nm} da cultura bacteriana no início da experiência fosse próximo de 0,03. As culturas foram incubadas a 30° C e mantidas em agitação (200 rpm), e o crescimento da população foi acompanhado pela recolha de amostras em intervalos de 2 h, nas primeiras 12 h, tendo ainda sido recolhidas amostras às 24h, 28h, 33h e 48h e determinados os valores da DO_{600nm} . O estudo do crescimento do *B. subtilis* foi, também, realizado na ausência de glucose no meio de cultura e seguiu o procedimento anteriormente descrito.

3.4.5 Estudo da capacidade de degradação/remoção do naproxeno e do diclofenaco pelo *B. subtilis* em meio líquido

Para avaliar a capacidade do *B. subtilis* na biodegradação dos fármacos naproxeno e diclofenaco durante o seu crescimento na presença desses compostos, foram realizados quatro ensaios. Nos dois primeiros ensaios, utilizou-se o meio de cultura previamente descrito, dopado com naproxeno ou diclofenaco em concentrações iniciais de 2 mg L⁻¹ ou 20 mg L⁻¹.

Com o objetivo de avaliar a capacidade do *B. subtilis* se desenvolver e degradar os fármacos em estudo (naproxeno e diclofenaco) numa mistura mais complexa de fármacos, foi realizado um terceiro ensaio, no qual o meio de cultura foi dopado com uma mistura de quatros fármacos (carbamazepina, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno), com uma concentração inicial de 2 mg L⁻¹ ou 5 mg L⁻¹ de cada fármaco. Todos os ensaios foram realizados em meio líquido e em modo descontínuo, com agitação constante a 200 rpm e incubados a 30°C. Os ensaios seguiram o sistema de montagem ilustrado na figura 3.6.

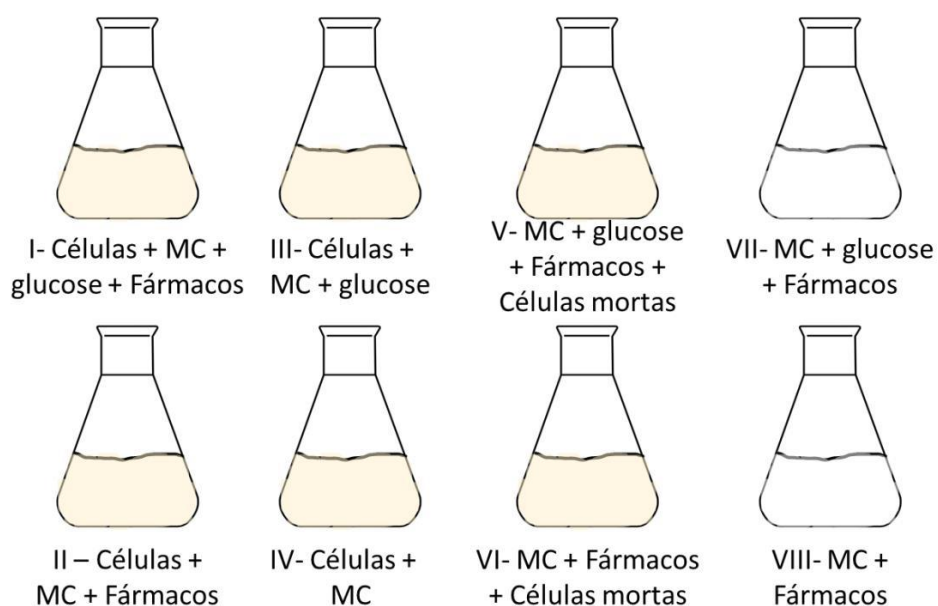


Figura 3.6 Esquema de montagem utilizado nos 3 ensaios (MC – Meio de Cultura)

- I. Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura, com glucose, inoculado com um volume de *B. subtilis* correspondente a uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,03, dopado com o(s) fármaco(s).

Objetivo: avaliar a capacidade do *B. subtilis* para biodegradar o(s) fármaco(s) em solução, bem como avaliar os possíveis efeitos destes no desenvolvimento da cultura bacteriana, na presença da glucose no meio.

- II. Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura, sem glucose, inoculado com um volume de *B. subtilis* correspondente a uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,03, dopado com o(s) fármaco(s).

Objetivo: avaliar a capacidade do *B. subtilis* para biodegradar o(s) fármaco(s) em solução, e avaliar os possíveis efeitos destes, no desenvolvimento da cultura bacteriana.

- III. Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura, com glucose, inoculado com um volume de *B. subtilis* correspondente a uma densidade ótica de aproximadamente 0,03.

Objetivo: estudar a curva de crescimento do *B. subtilis* na presença de glucose no meio. Controlo para avaliar os efeitos da presença dos fármacos no desenvolvimento da cultura de bactérias, num meio contendo glucose, por comparação ao Erlenmeyer I.

- IV. Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura, sem glucose, inoculado com um volume de *B. subtilis* correspondente a uma densidade ótica de aproximadamente 0,03.
- Objetivo: estudar a curva de crescimento do *B. subtilis* na ausência de glucose no meio. Controlo para avaliar os efeitos da presença dos fármacos no desenvolvimento da cultura de bactérias, na ausência de glucose, por comparação ao Erlenmeyer II.
- V. Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura, com glucose, inoculado com um volume de células mortas de *B. subtilis* correspondente a uma densidade ótica de aproximadamente 0,02, dopado com o(s) fármaco(s).
- Objetivo: avaliar o efeito da adsorção à biomassa, na remoção dos fármacos estudados.
- VI. Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura, sem glucose, inoculado com um volume de células mortas de *B. subtilis* correspondente a uma densidade ótica de aproximadamente 0,02, dopado com o(s) fármaco(s).
- Objetivo: avaliar o efeito da adsorção à biomassa, na remoção dos fármacos estudados.
- VII. Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura, com glucose, dopado com o(s) fármaco(s).
- Objetivo: estudar o efeito da fotodegração na remoção do(s) composto(s).
- VIII. Erlenmeyer contendo 200 mL de meio de cultura, sem glucose, dopado com o(s) fármaco(s).
- Objetivo: estudar o efeito da fotodegração na remoção do(s) composto(s).

As amostras foram recolhidas em intervalos de 2 h, durante as primeiras 13 h de estudo, sendo ainda recolhidas amostras às 24 h de ensaio. Foi determinado o valor da densidade ótica, a um c.d.o. de 600 nm, para todas as amostras recolhidas, e a concentração dos fármacos em solução por HPLC/UV-Vis (de acordo com a metodologia descrita na secção 3.2) nas amostras recolhidas dos Erlenmeyers contendo fármacos.

3.5 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos de várias medições ou réplicas foram apresentados como a média e um intervalo de incerteza de mais ou menos um desvio padrão. Entretanto, na comparação de alguns resultados recorreu-se a testes de análise de variância (ANOVA fator único). Neste trabalho, os testes de ANOVA foram sempre realizados para um grau de significância de 95% ($P = 0,05$).

O tratamento estatístico de todos os resultados foi feito com recurso ao software Microsoft EXCEL.

4 Resultados e Discussão

4.1 Otimização e validação da metodologia analítica

4.1.1 Condições de quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis

A quantificação do naproxeno e do diclofenaco foi feita com recurso a HPLC/UV-Vis, utilizando as condições experimentais otimizadas, segundo o procedimento descrito na secção 3.2.1.2 da metodologia experimental.

O perfil cromatográfico, que permitiu identificar os quatro fármacos presentes na solução, foi obtido a um comprimento de onda de 220 nm.

A identificação dos picos correspondentes aos quatro fármacos presentes na solução (figura 4.3) foi realizada comparando os tempos de retenção obtidos nos cromatogramas das soluções padrão de cada composto isolado. Com base nas condições analíticas estabelecidas, os seguintes tempos de retenção foram identificados: 3,3 min para a carbamazepina, 4,2 min para o naproxeno, 6,1 min para o diclofenaco e 6,9 min para o ibuprofeno.

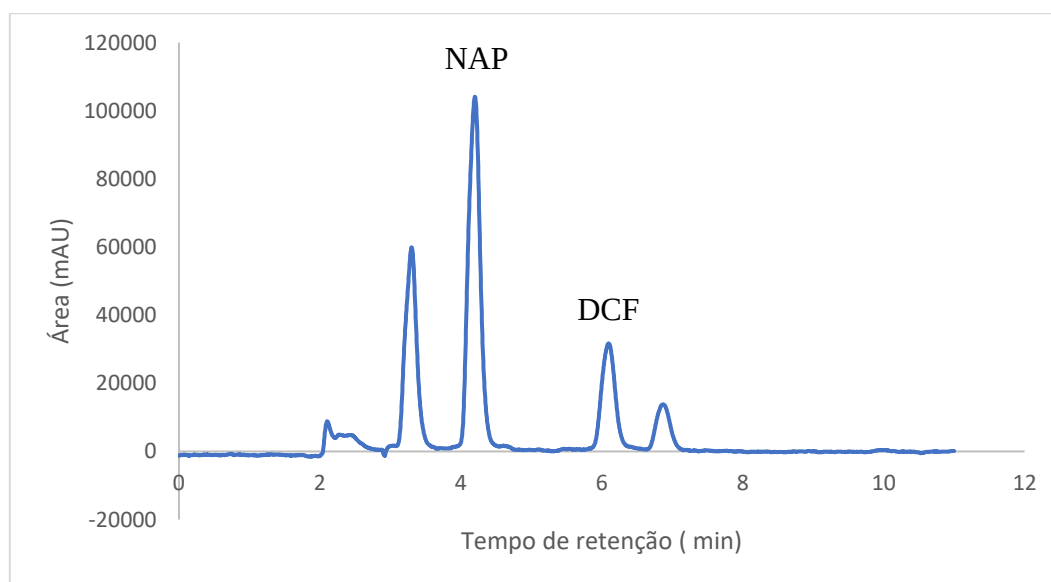


Figura 4.1 Cromatograma obtido por HPLC/UV-Vis para a solução padrão contendo carbamazepina ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$), naproxeno ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$), diclofenaco ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) e ibuprofeno ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$)

De forma a quantificar o naproxeno e diclofenaco presentes na solução de trabalho (água ultrapura dopada com 4 fármacos) pelo método padrão externo, construíram-se retas de calibração utilizando 6 soluções padrão, cujas concentrações variaram entre 0,25 e 5,0 mg L⁻¹ (secção 3.2.1.2). As retas de calibração do naproxeno e do diclofenaco encontram-se apresentadas abaixo, nas figuras 4.4 e 4.5, respetivamente.

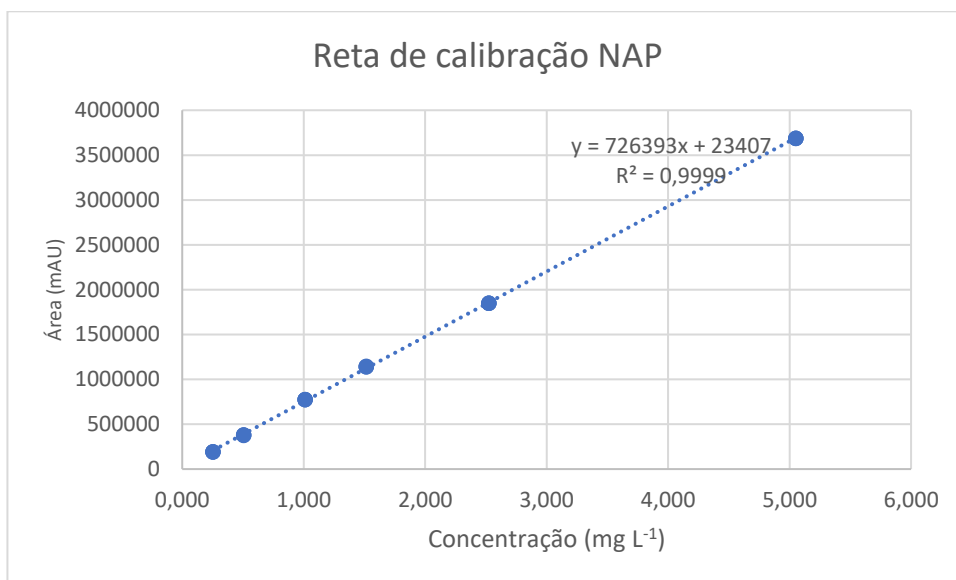


Figura 4.2 Reta de calibração do naproxeno em solução aquosa

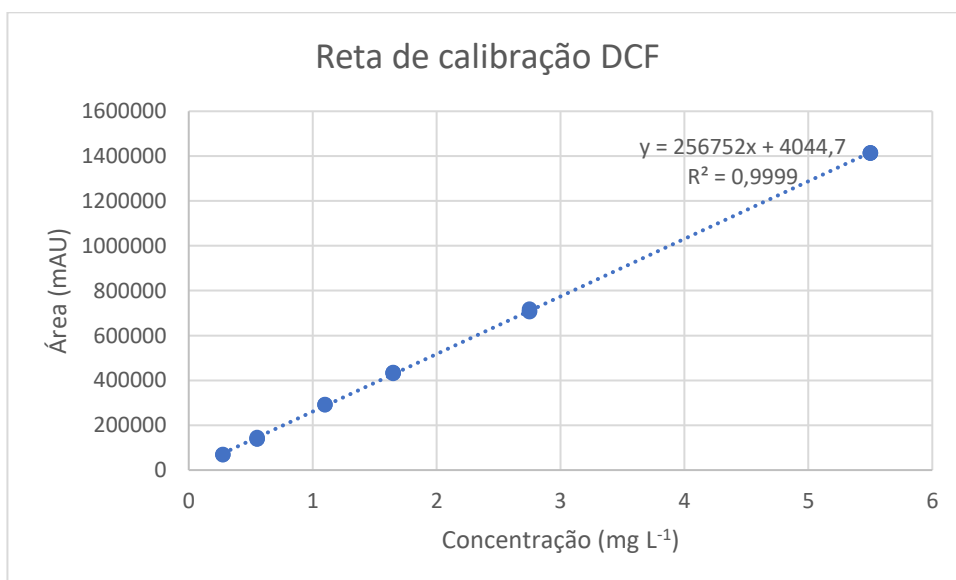


Figura 4.3 Reta de calibração do diclofenaco em solução aquosa

As retas de calibração para ambos os fármacos (naproxeno e diclofenaco) apresentaram coeficientes de determinação (R^2) de 0,9999, o que permite assegurar que os valores de concentração determinados, por regressão linear, utilizando estas retas são fiáveis dentro da gama de concentração de valores em que foi construída.

4.1.2 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada de acordo com o guia “ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 1994”, tendo sido avaliados os parâmetros de exatidão, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e os limites de deteção e quantificação instrumental (secção 3.2.1.4).

Os valores do limite de deteção instrumental (LDI) e do limite de quantificação instrumental (LQI) correspondem à concentração do analito cujo sinal é igual ao branco adicionado de 3,3 e 10 vezes o desvio padrão, respetivamente (ICH, 1994). Para o naproxeno o valor do LDI foi de $0,022 \text{ mg L}^{-1}$ e o valor do LQI foi de $0,069 \text{ mg L}^{-1}$ e para o diclofenaco os valores do LDI e do LQI foram de $0,027 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,081 \text{ mg L}^{-1}$, respetivamente. É possível observar que, embora os valores do LDI de ambos os fármacos sejam muito próximos, o LQI do naproxeno é inferior ao LQI do diclofenaco. De qualquer modo, em ambos os casos os limites de quantificação são adequados aos valores de concentração medidos nos ensaios realizados com os dois fármacos neste trabalho.

Para a avaliação da repetibilidade e da reprodutibilidade, foram utilizadas soluções com três concentrações diferentes, dentro da gama de concentrações utilizadas nos ensaios: $0,5$; $2,5$ e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ (secção 3.2.1.4).

A metodologia analítica desenvolvida e otimizada para a quantificação do naproxeno e do diclofenaco por HPLC/UV-Vis apresentou uma repetibilidade elevada para ambos os fármacos ($\text{DPR}_{\text{NAP}} = 0,36 \%$; $\text{DPR}_{\text{DCF}} = 0,43 \%$, para uma concentração de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$), sendo que a repetibilidade para o naproxeno tem variações muito pequenas entre as concentrações ($\text{DPR}_{\text{NAP}} = 0,59 \%$ para as concentrações de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$). No entanto, para o diclofenaco esta é menor para as concentrações mais baixas ($\text{DPR}_{\text{DCF}} = 1,89 \%$ para uma concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e mais elevada para concentrações mais altas ($\text{DPR}_{\text{DCF}} = 0,53 \%$ para uma concentração de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$), como seria de esperar, uma vez que as incertezas nas medições têm maior peso relativo quanto

menor for o valor medido, originando uma maior dispersão dos valores obtidos nestas condições.

O método analítico utilizado apresentou também uma boa reprodutibilidade ($DPR_{NAP} = 0,25 \%$; $DPR_{DCF} = 068 \%$ para uma concentração de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$) e uma elevada exatidão, tanto para o naproxeno ($96,1 - 100\%$) como para o diclofenaco ($95,9 - 100 \%$) para o intervalo de concentrações testadas ($0,5 - 5,0 \text{ mg L}^{-1}$).

4.1.3 Seleção dos filtros e otimização do volume de solução a filtrar

Estudos publicados referem que alguns tipos de membranas filtrantes, em particular as de nylon, podem reter alguns compostos orgânicos, incluindo certos fármacos (Carlson & Thompson, 2000; Machado et al., 2019; Pillai et al., 2016). Adicionalmente, a retenção de alguns fármacos em filtros de nylon tinha também já sido verificada em estudos efetuados por elementos deste grupo de investigação, o que demonstra que a utilização deste tipo de filtros requer algum cuidado. De facto, o nylon contém grupos funcionais amina, ácido carboxílico e ligações amida os quais podem estabelecer interações eletrostáticas ou por pontes de hidrogénio com analitos ácidos ou básicos, o que favorece a retenção deste tipo de moléculas pelos polímeros do filtro. Assim, a retenção dos fármacos por membranas filtrantes depende de diversos fatores como o tipo de polímero constituinte da membrana, da concentração dos compostos em solução e das suas características, tais como polaridade, grau de ionização e capacidade para estabelecer pontes de hidrogénio.

Deste modo, dado que a filtração das amostras é um procedimento obrigatório para a utilização da técnica de HPLC, é necessário realizar alguns estudos prévios que tenham em vista a minimização das perdas de analito durante este passo preparativo das amostras.

Neste trabalho foram testados dois tipos de filtros diferentes, um de membrana de nylon e outro de membrana de PTFE, ambos da marca Labfil, com o objetivo de avaliar qual deles apresenta maior percentagem de recuperação dos fármacos em estudo (naproxeno e diclofenaco), para que possam ser usados para filtrar as amostras a quantificar por HPLC/UV-Vis. Como a retenção dos fármacos nas membranas está dependente da quantidade de composto em contacto com a membrana, procurou-se também otimizar o volume de solução a filtrar previamente de modo a saturar a membrana

com o analito, com o objetivo de minimizar a sua perda posterior por retenção no filtro. Para tal foram testados, para cada tipo de membrana, vários volumes de duas soluções de naproxeno com concentrações de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ e de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$. Na figura 4.1 compararam-se as percentagens de recuperação (%R) do naproxeno para as concentrações de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ e 10 mg L^{-1} , nos dois tipos de filtros testados, entre os diversos volumes de solução filtrada.

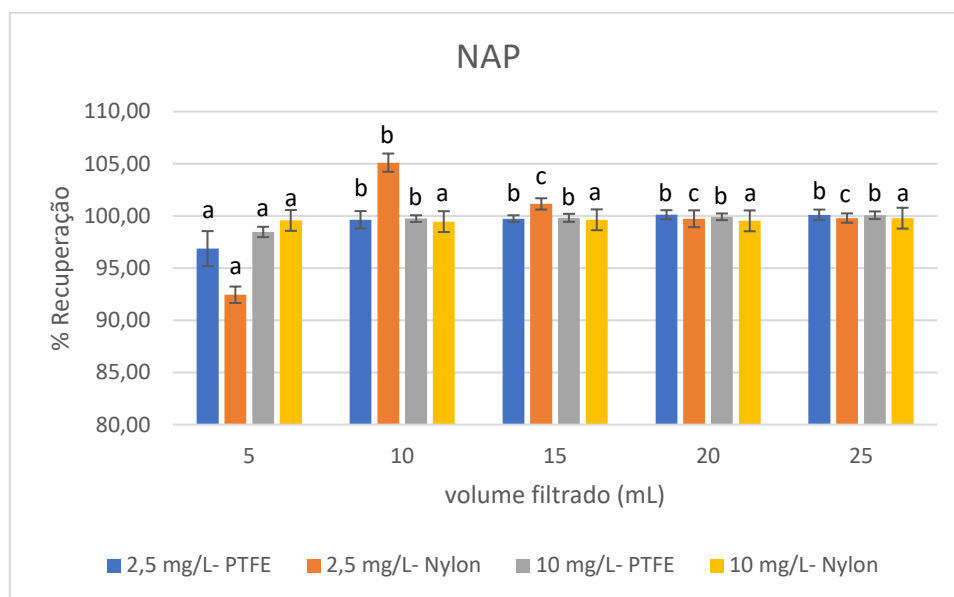


Figura 4.4 Percentagem de Recuperação (%R) do naproxeno filtrado usando 2 membranas filtrantes de $0,45 \mu\text{m}$ para as concentrações de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ e 10 mg L^{-1} (média $\pm$ DP; $n = 3$).

As letras diferentes significam que, na comparação entre %R para diferentes volumes com a mesma membrana e a mesma concentração de fármaco, os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Como pode ser observado na figura 4.1, para a solução de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ e um volume filtrado de 5 mL, ambos os filtros apresentam uma percentagem de recuperação (%R) superior a 90%, sendo no entanto para o menor volume testado a %R com o filtro de PTFE ligeiramente superior à do filtro de Nylon. Já para a solução de 10 mg L^{-1} , a percentagem de recuperação é de aproximadamente 100% em ambos os filtros.

Da comparação entre as %R obtidas para os vários volumes observou-se que a partir dos 10 mL não se verificam diferenças significativas entre as %R obtidas, com exceção do caso da membrana de Nylon e a solução de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ em que %R obtida (105%) foi anormalmente elevada, baixando para $\sim 100\%$ e tornando-se insensível ao

volume filtrado apenas para volumes a partir dos 15 mL. Assim, supondo que a %R do Nylon ao volume de 10 mL se deveu a algum problema circunstancial, uma filtração prévia com 10 mL da solução de naproxeno parece ser suficiente para assegurar uma recuperação praticamente total do analito.

Na figura 4.2 compararam-se as percentagens de recuperação (%R) do diclofenaco para as concentrações de 2,5 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹, nos dois tipos de filtros testados, entre os diversos volumes de solução filtrada.

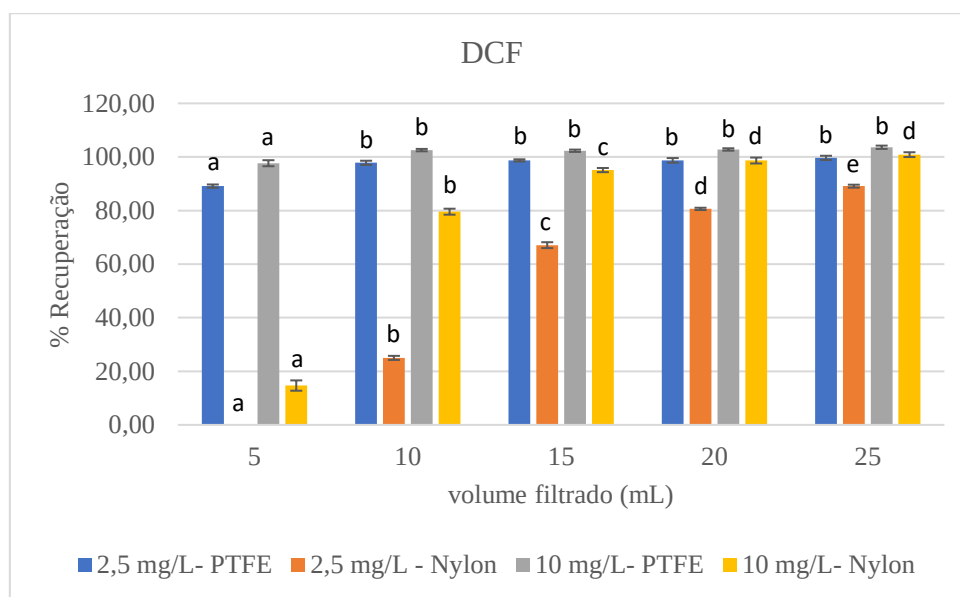


Figura 4.5 Percentagem de Recuperação (%R) do diclofenaco filtrado usando 2 membranas filtrantes de 0,45 μ m para as concentrações de 2,5 mg L⁻¹ e 10,0 mg L⁻¹ (média $\pm$ DP; n=3).

As letras diferentes significam que, na comparação entre %R para diferentes volumes com a mesma membrana e a mesma concentração de fármaco, os valores apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Dos resultados obtidos para o diclofenaco (figura 4.2) observou-se que, para a solução de 2,5 mg L⁻¹ e o volume filtrado de 5 mL, o filtro de PTFE apresenta uma elevada percentagem de remoção, sendo esta de ~90%. Já o filtro de Nylon retém completamente o fármaco em estudo. Para os volumes filtrados de 10, 15, 20 e 25 mL, obtêm-se com o filtro de PTFE valores %R do diclofenaco de aproximadamente 100% em todos os casos e que não diferem significativamente entre eles. Em contraste, no filtro de Nylon obtêm-se %R que vão aumentando gradualmente à medida que aumenta o volume filtrado de

solução, atingindo cerca de 90% após se filtrarem 25 mL da solução com uma concentração de 2,5 mg L⁻¹.

Para a solução de 10,0 mg L⁻¹, utilizando o filtro de PTFE, atingem-se %R de ~100% para todos os volumes testados (5, 10, 15, 20 e 25 mL), não havendo diferenças significativas entre %R a partir do volume de 10 mL. Entretanto, para a mesma solução, com o filtro de Nylon obtém-se inicialmente uma %R de ~15% com 5mL de solução filtrados e, também para esta concentração, aumentando a %R com o filtro de Nylon à medida que aumenta o volume filtrado, gradualmente, até atingir uma %R de ~100% ao fim de 20 mL filtrados (não havendo diferenças significativas em %R obtido com 20 mL e com 25 mL de volume filtrado).

Tendo em conta os resultados obtidos para ambos os fármacos, principalmente os referentes à concentração de 2,5 mg L⁻¹ (uma vez que os ensaios posteriores serão realizados com soluções dentro desta ordem de concentrações), o filtro de PTFE da Labfil foi o que apresentou os melhores resultados. Desta forma, o filtro selecionado para os restantes ensaios foi o filtro de PTFE, com a passagem prévia de 10 mL de solução, sendo o último mililitro recolhido para ser utilizados na quantificação dos fármacos por HPLC/UV-Vis.

4.2 Seleção da classe granulométrica de cortiça a utilizar na composição da matriz

A cortiça é um produto natural, de origem vegetal que, em estudos anteriores, apresentou algum potencial para a remoção de poluentes como fármacos e nitratos (Aguilar et al., 2019; Bessadok et al., 2023; Machado et al., 2017). Neste estudo foram utilizados granulados de cortiça expandida com duas granulometrias diferentes, nomeadamente, de 3 a 5 mm (cortiça 3/5) e de 0,5 a 3 mm (cortiça 0,5/3), com o objetivo de avaliar a sua capacidade para a remoção dos fármacos naproxeno e diclofenaco. Procurou-se também avaliar como a concentração inicial de fármacos e o tempo de contacto podem influenciar a eficiência de remoção dos fármacos.

Conforme descrito na secção 3.3.2, foram realizados 6 ensaios, com o objetivo de caracterizar o perfil cinético dos processos de remoção do naproxeno e do diclofenaco pela cortiça para diferentes concentrações iniciais. O estudo foi efetuado em modo

descontínuo, apesar de muitos sistemas reais operarem de facto em modo contínuo, pois este é o modo que mais facilmente permite a determinação de parâmetros operacionais, tais como, por exemplo, o tempo de retenção hidráulica.

Na figura 4.6 estão apresentadas as cinéticas de remoção do naproxeno, a diferentes concentrações, pela cortiça 3/5, durante 216 h.

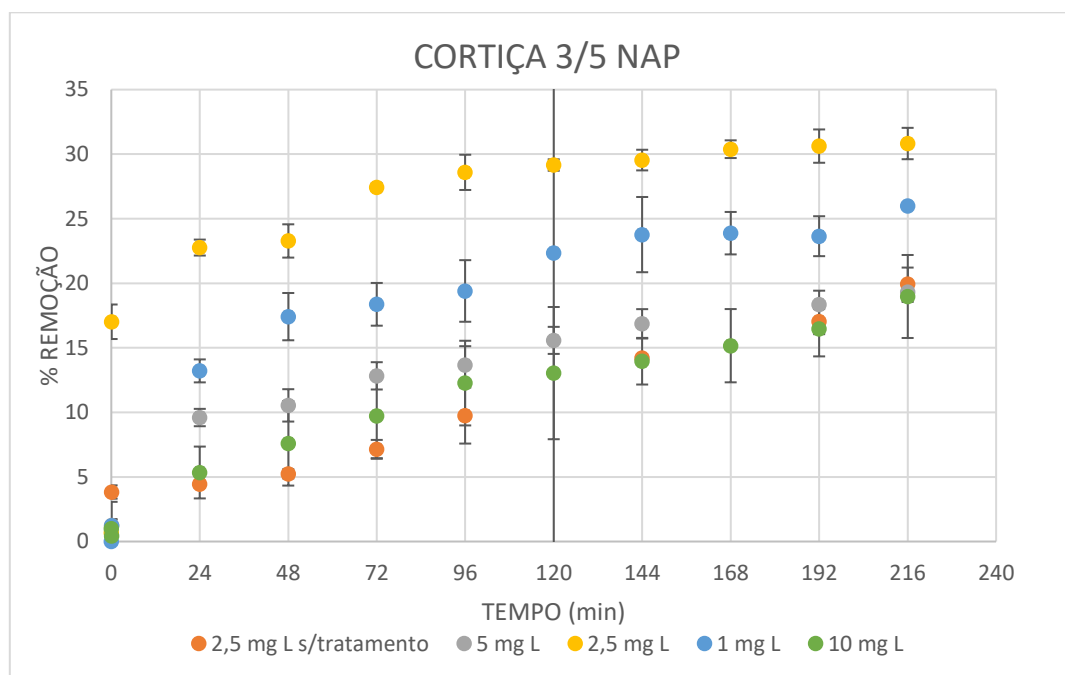


Figura 4.6 Remoção ao longo do tempo do naproxeno, pela cortiça 3/5

Na figura 4.7 estão apresentadas as cinéticas de remoção do diclofenaco, a diferentes concentrações, pela cortiça 3/5, durante 216 h.

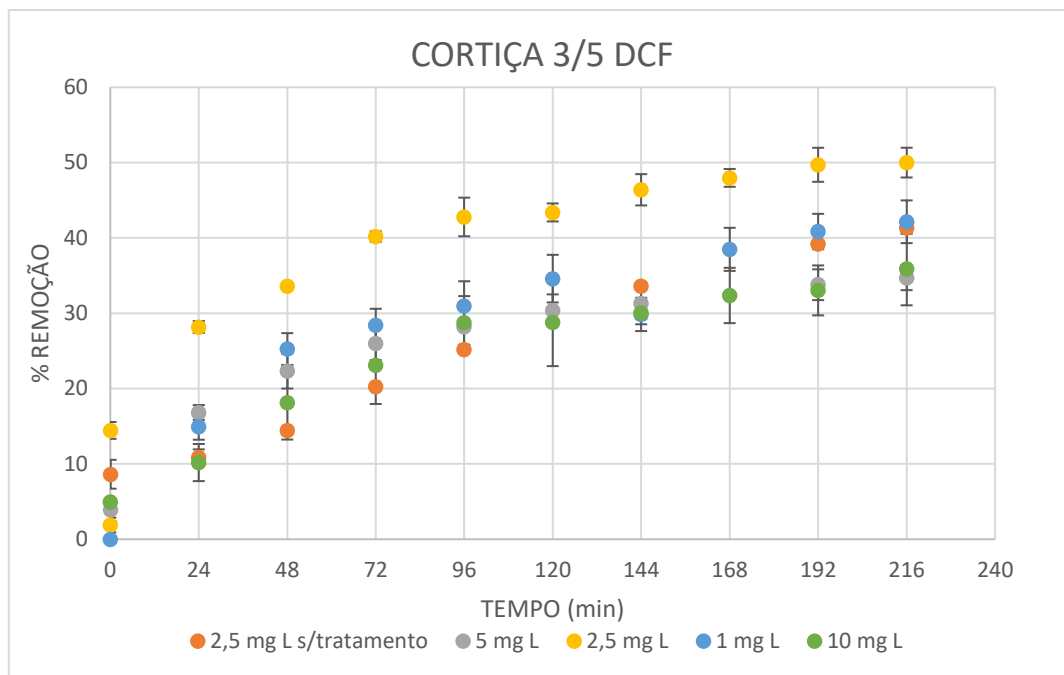


Figura 4.7 Remoção ao longo do tempo do diclofenaco, pela cortiça 3/5

Como se pode observar nas figuras 4.6 e 4.7, o naproxeno e o diclofenaco apresentaram comportamentos de remoção semelhantes, ocorrendo uma remoção bastante rápida nos primeiros instantes de contacto das soluções com a cortiça e decorrendo uma remoção mais gradual até cerca das 96 h, estabilizando após este período. Em alguns casos, é possível notar ainda um ligeiro segundo aumento na remoção, no período final do ensaio (192 h – 216 h), que, em geral, parece pouco significativo, mas que poderá também sugerir a ocorrência de um outro processo de remoção mais lento. O diclofenaco apresentou remoções pela cortiça superiores às do naproxeno, sendo que, em ambos os casos, a eficiência de remoção (quantidade removida em relação à quantidade inicial, em %) do fármaco aumentou com a diminuição da concentração das soluções.

O naproxeno apresentou a maior eficiência de remoção no fim do ensaio realizado com a solução de 2,5 mg L⁻¹ com a cortiça previamente tratada (submersa em água ultrapura durante 24 h e seca posteriormente), atingindo uma eficiência de remoção de ~30% ao fim das 216 h de contacto, seguindo-se o ensaio realizado com a solução de 1,0 mg L⁻¹, que apresentou uma eficiência de remoção de ~25% em igual período. Os ensaios realizados com as soluções de 5,0 mg L⁻¹ e 10,0 mg L⁻¹ apresentaram remoções de ~20%, ao fim das 216 h de ensaio. No entanto, é possível observar que nas primeiras 168 h, o ensaio realizado com a solução de 5 mg L⁻¹ apresentou remoções superiores às

do ensaio realizado com a solução de 10 mg L⁻¹. O ensaio que apresentou uma menor remoção inicial foi o realizado com a solução de 2,5 mg L⁻¹ em contacto com a cortiça sem tratamento prévio, atingindo posteriormente eficiências de remoção semelhantes aos ensaios realizados com 5,0 mg L⁻¹ e 10,0 mg L⁻¹. Comparando os dois ensaios realizados com as soluções de 2,5 mg L⁻¹, podemos observar que o ensaio em que a cortiça não sofreu tratamento prévio apresentou remoções cerca de 10% inferiores ao ensaio realizado com a cortiça com tratamento prévio, indicando que o pré-tratamento da cortiça com água ultrapura, ajuda a uma maior remoção do naproxeno.

Nos estudos realizados com o diclofenaco observou-se que o ensaio que obteve maior remoção foi o ensaio realizado com a solução de 2,5 mg L⁻¹ com a cortiça previamente tratada, apresentando uma remoção de ~50% ao fim das 216 h de ensaio. Seguiram-se os ensaios realizados com a solução de 1,0 mg L⁻¹ e com a solução 2,5 mg L⁻¹ com a cortiça sem tratamento prévio, que apresentaram remoções de ~40% ao fim das 216 h de ensaio. No entanto, o ensaio realizado com a solução de 1,0 mg L⁻¹ apresentou eficiências de remoção superiores ao longo das primeiras horas de ensaios, em comparação com o ensaio realizado com a solução de 2,5 mg L⁻¹ com a cortiça sem tratamento prévio.

Os ensaios realizados com as soluções de 5,0 mg L⁻¹ e 10,0 mg L⁻¹ apresentaram remoções de ~35% ao fim das 216 h de ensaio. No entanto, à semelhança do que foi observado nos ensaios realizados com o naproxeno, é possível observar que nas primeiras 168 h, o ensaio realizado com a solução de 5 mg L⁻¹ apresentou remoções superiores às do ensaio realizado com a solução de 10 mg L⁻¹.

Nos estudos realizados com ambos os fármacos para a cortiça 3/5 (figuras 4.6 e 4.7) foi possível observar que os ensaios realizados sem o tratamento prévio da cortiça apresentam remoções mais baixas que os ensaios realizados com o tratamento, para a mesma concentração, indicando que o tratamento prévio da cortiça (submersão da cortiça em água ultrapura durante 24h) contribuiu para uma maior remoção dos fármacos em solução. Adicionalmente, foi possível observar que para ambos os fármacos obtiveram-se remoções superiores para soluções de concentração mais baixa (1,0 e 2,5 mg L⁻¹), indicando que a concentração dos fármacos em solução influencia a percentagem de fármaco removida.

Na figura 4.8 estão apresentadas as cinéticas de remoção do naproxeno, a diferentes concentrações, pela cortiça 0,5/3, durante 216 h.

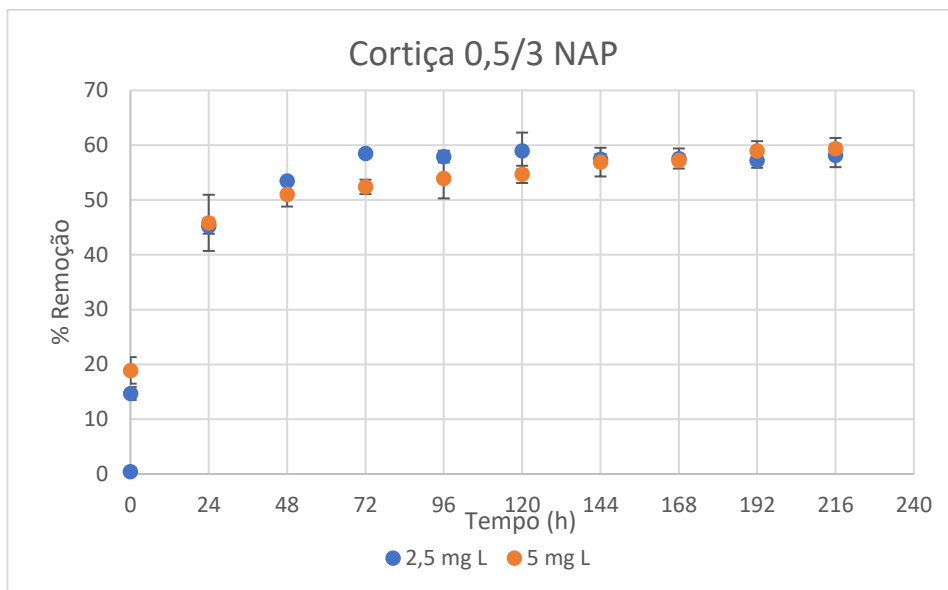


Figura 4.8 Remoção ao longo do tempo do naproxeno, pela cortiça 0,5/3

Na figura 4.9 estão apresentadas as cinéticas de remoção do diclofenaco, a diferentes concentrações, pela cortiça 0,5/3, durante 216 h.

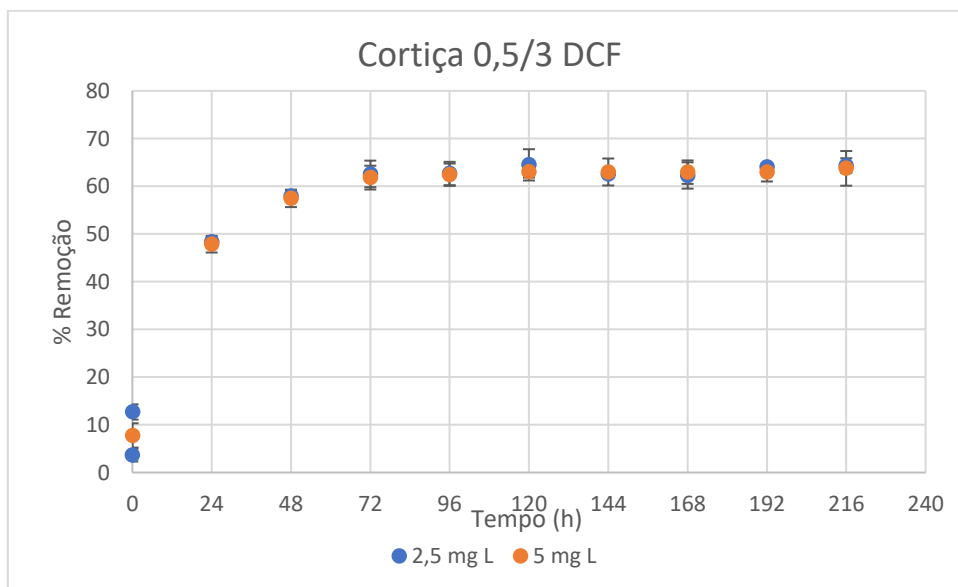


Figura 4.9 Remoção ao longo do tempo do diclofenaco, pela cortiça 0,5/3

À semelhança do que foi observado nos estudos realizados com a cortiça 3/5 (figuras 4.6 e 4.7), os estudos realizados com a cortiça 0,5/3 (figuras 4.8 e 4.9) demonstraram que ambos os fármacos apresentaram comportamentos de remoção semelhantes, sendo que ocorre neste caso também uma remoção bastante rápida nos primeiros instantes de contacto entre as soluções dos fármacos e a cortiça e, de seguida, a remoção continua a aumentar, mais lentamente, ao longo das primeiras 72 h de ensaio, começando a estabilizar após esse período. Adicionalmente, os ensaios realizados com o diclofenaco apresentam eficiências de remoção superiores aos ensaios realizados com o naproxeno. No entanto, esta diferença é menos notória, sendo que para o diclofenaco foram obtidas eficiências de remoção máximas de ~65%, enquanto para o naproxeno atingiram-se eficiências de remoção máximas de ~60%.

O efeito da concentração inicial dos fármacos na sua remoção pela cortiça é bem menos evidente nos estudos com esta granulometria menor (figuras 4.8 e 4.9) em comparação com os realizados com a cortiça 3/5 (figuras 4.6 e 4.7). Não foram observadas diferenças significativas nas eficiências de remoção para as diferentes concentrações nos ensaios com diclofenaco, onde as soluções de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ apresentaram comportamentos muito semelhantes, com eficiências de remoção próximas ao longo de todo o estudo, atingindo cerca de 65% de remoção após 216 horas.

No caso do naproxeno, foi observado que a solução de menor concentração, 2,5 mg L⁻¹, apresentou eficiências de remoção ligeiramente superiores em comparação com a solução de 5,0 mg L⁻¹ entre as 48 h e as 120 horas. No entanto, após esse período, a diferença entre as soluções deixou de ser significativa e, ao final de 216 horas, em ambas as soluções foi alcançada uma eficiência de remoção de ~60%.

Na figura 4.10 estão apresentadas as cinéticas de remoção do naproxeno (concentrações iniciais de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) pelas duas granulometrias (0,5/3 e 3/5) dos granulados de cortiça expandida estudados, durante 216 h, de modo a comparar as eficiências obtidas pelos dois tipos de material e, eventualmente, seleccionar o que parecer mais adequado para os estudos seguintes de avaliação de uma nova composição de matriz, em combinação com uma mistura de materiais argilosos.

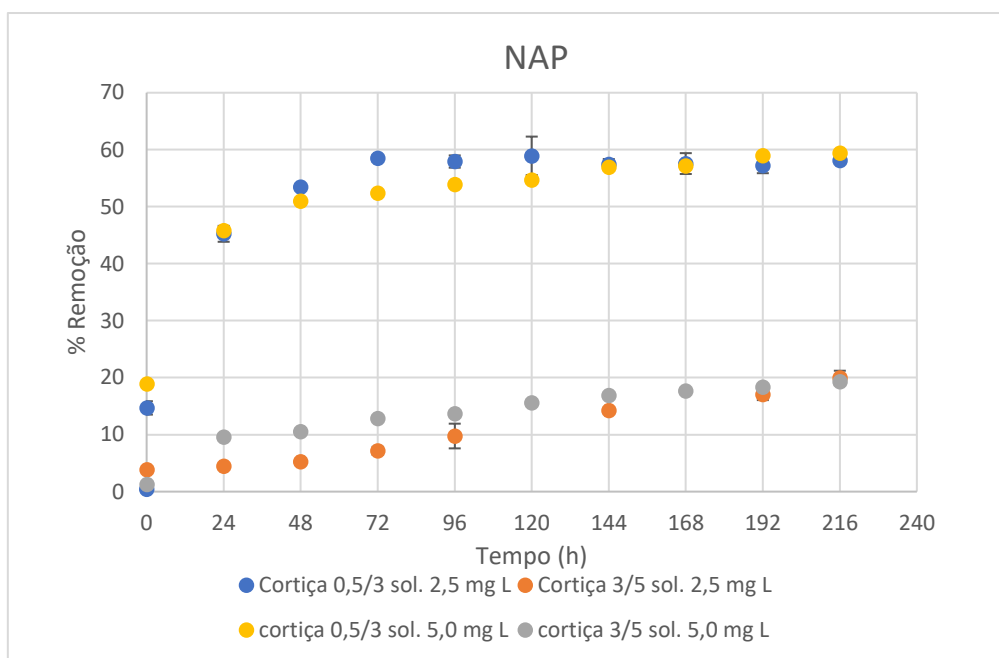


Figura 4.10 Comparação da remoção do naproxeno das soluções de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ pelas cortiças 0,5/3 e 3/5

Na figura 4.11 estão apresentadas as cinéticas de remoção do naproxeno (concentrações iniciais de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) pelas duas granulometrias (0,5/3 e 3/5) dos granulados de cortiça expandida estudados, durante 216 h

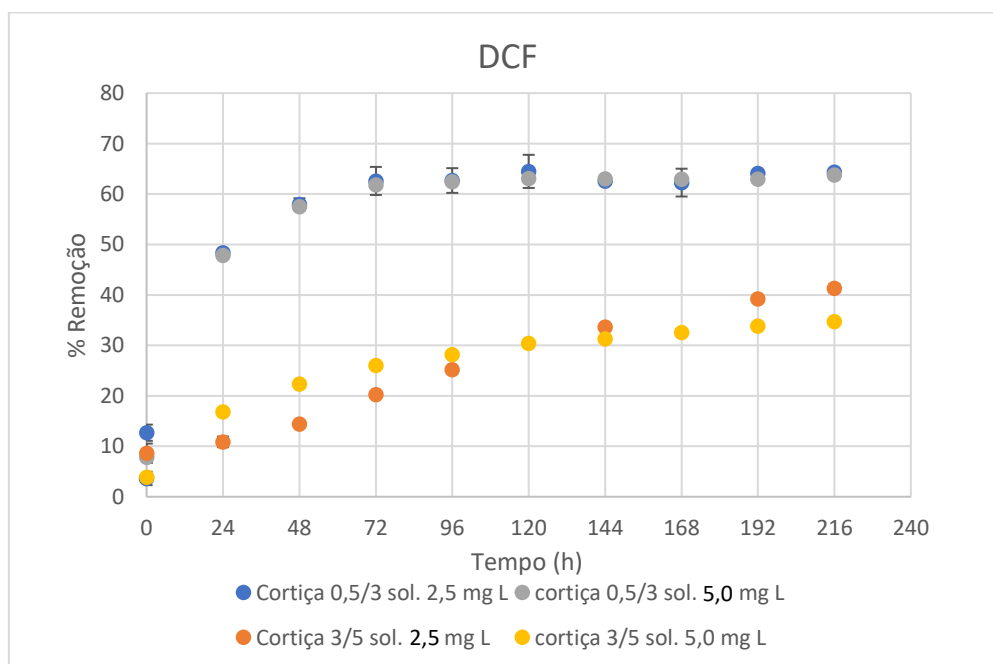


Figura 4.11 Comparação da remoção do diclofenaco das soluções de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ pelas cortiças 0,5/3 e 3/5

A análise das figuras 4.10 e 4.11 revela que a cortiça 0,5/3 apresenta uma cinética de remoção de ambos os fármacos mais rápida. Durante a primeira etapa do ensaio (primeiras 72 horas) a remoção ocorre com maior velocidade com a cortiça de granulometria mais pequena, começando a estabilizar após esse período e, eventualmente, atingindo o equilíbrio. Por outro lado, a cortiça 3/5 apresenta uma cinética lenta, mas mais prolongada, uma vez que a remoção aumenta de uma forma menos acentuada ao longo das 216 h de ensaio, sem atingir um patamar, indicando que em ensaios mais longos poderiam ser atingidas eficiências de remoção superiores.

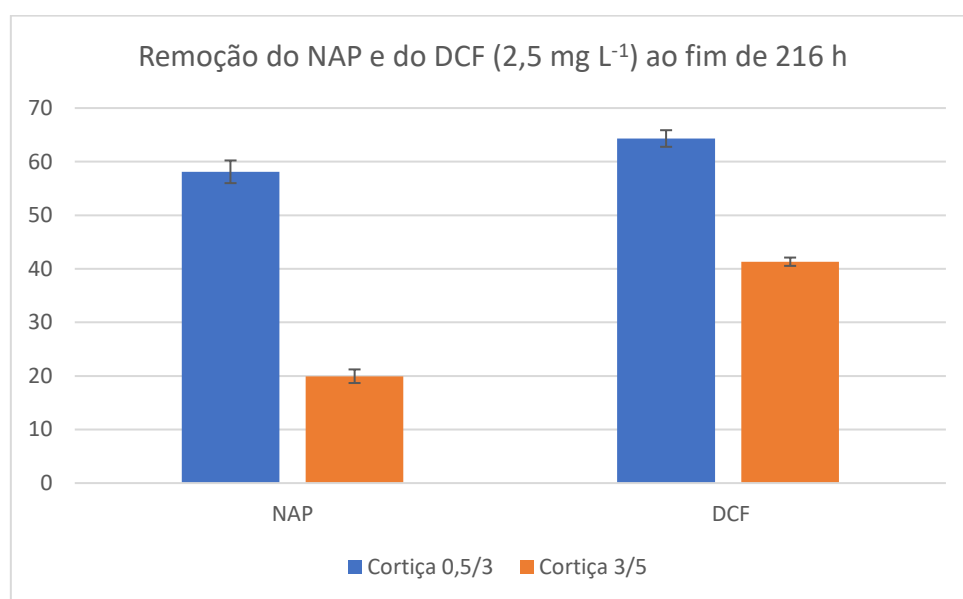


Figura 4.12 Comparação da remoção do naproxeno e do diclofenaco, pelas cortiças 0,5/3 e 3/5 ao fim das 216 h de ensaio

Analisando a figura 4.12 é notório que, de uma forma geral, a cortiça 0,5/3 apresentou eficiências de remoção superiores à cortiça 3/5 ao fim das 216 h de ensaio. Tal poderá dever-se a uma maior área superficial do material mais fino, o que permite uma maior capacidade de adsorção e um acesso mais rápido a essa maior área.

Neste intervalo de tempo de 216 h, a cortiça 0,5/3 apresentou uma eficiência de remoção de ~60% do naproxeno e de ~65% do diclofenaco, enquanto a cortiça 3/5 apresentou uma eficiência de remoção de apenas ~20% do naproxeno e ~40% do diclofenaco (figura 4.12). No entanto, note-se que enquanto no caso da cortiça 0,5/3 as eficiências de remoção referidas são os valores máximos atingíveis nestas condições,

dado que o equilíbrio já terá sido atingido ao fim deste período, no caso da cortiça 3/5 a remoção continua a crescer ao fim do mesmo tempo. Assim, é possível que, realizando os ensaios num período de tempo maior, se pudesse continuar a observar um aumento das eficiências de remoção pela cortiça 3/5 até estas se aproximarem das eficiências de remoção da cortiça 0,5/3 ou até as ultrapassarem. No entanto, em termos práticos, numa aplicação real, adotar tempos de tratamento tão longos seria uma enorme desvantagem que inviabilizaria esta solução.

Adicionalmente, da comparação entre as remoções dos dois fármacos estudados para as mesmas concentrações iniciais nos vários ensaios, observou-se que o diclofenaco foi sempre mais eficientemente removido pela cortiça do que o naproxeno, o que parece evidenciar uma maior afinidade da cortiça por aquele fármaco.

Embora a cortiça 0,5/3 apresente, num período de tempo curto, eficiências de remoção superiores para ambos os fármacos em comparação com a cortiça 3/5, optou-se por utilizar a cortiça de granulometria maior, ou seja, a cortiça 3/5, para prosseguir com o estudo. Esta decisão foi baseada em vários fatores práticos. A cortiça 0,5/3, além de ser mais difícil de manusear e confinar, dificulta a filtração das amostras e pode levar mais rapidamente à colmatagem dos filtros. Por outro lado, a cortiça 3/5, com partículas maiores, é mais fácil de trabalhar, oferece uma maior estabilidade operacional, facilitando a implementação na matriz e mantendo a eficiência ao longo do tempo.

4.3 Seleção da estratificação da matriz

Conforme descrito na secção 3.3.3, foram realizados 3 ensaios com o objetivo de selecionar a melhor composição de uma matriz de suporte, composta de cortiça e uma mistura de materiais argilosos já estudada em trabalhos anteriores, a utilizar numa futura montagem de microcosmos de LCMs para a remoção de fármacos. Cada um dos ensaios teve como objetivo estudar uma de três diferentes estratificações em que se dispôs em camadas diferentes proporções de uma mistura de LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 3 (1:1;v:v) (já utilizada em estudos anteriores), colocada nas camadas superior e inferior, e granulados de cortiça expandida 3/5 mm, colocados na camada central, conforme esquematizado na figura 3.4. Assim, tal como se pode ver no esquema, foram estudadas

as três diferentes estratificações, correspondendo às proporções de 1:1:1; 5:3:4 e 5:2:5 dos tamanhos das três camadas referidas.

Pretendeu-se então com este estudo avaliar e comparar a eficiência de cada uma das estratificações na remoção dos fármacos naproxeno e diclofenaco e escolher a estratificação mais adequada para a referida otimização dos LCMs. Os resultados das cinéticas de remoção para cada fármaco e estratificação testada estão apresentados na figura 4.13.

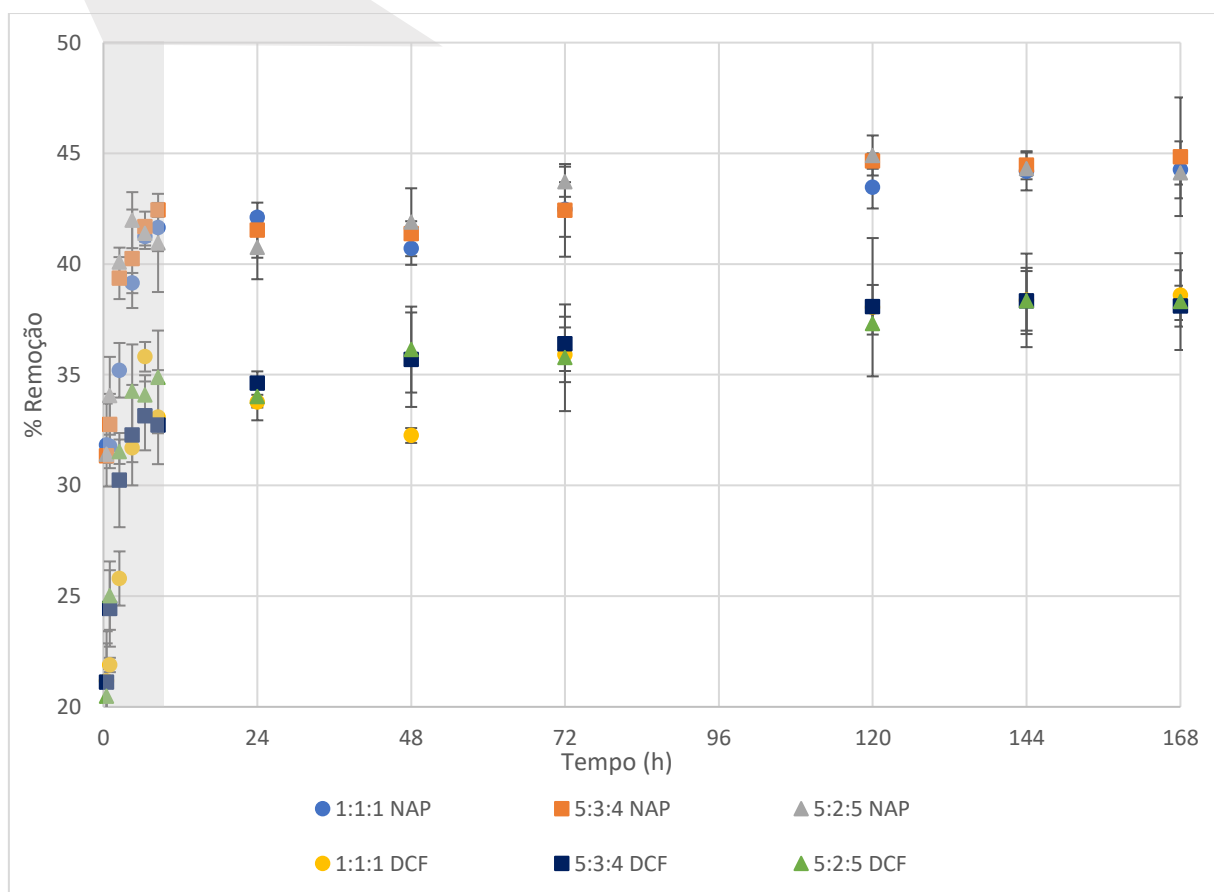
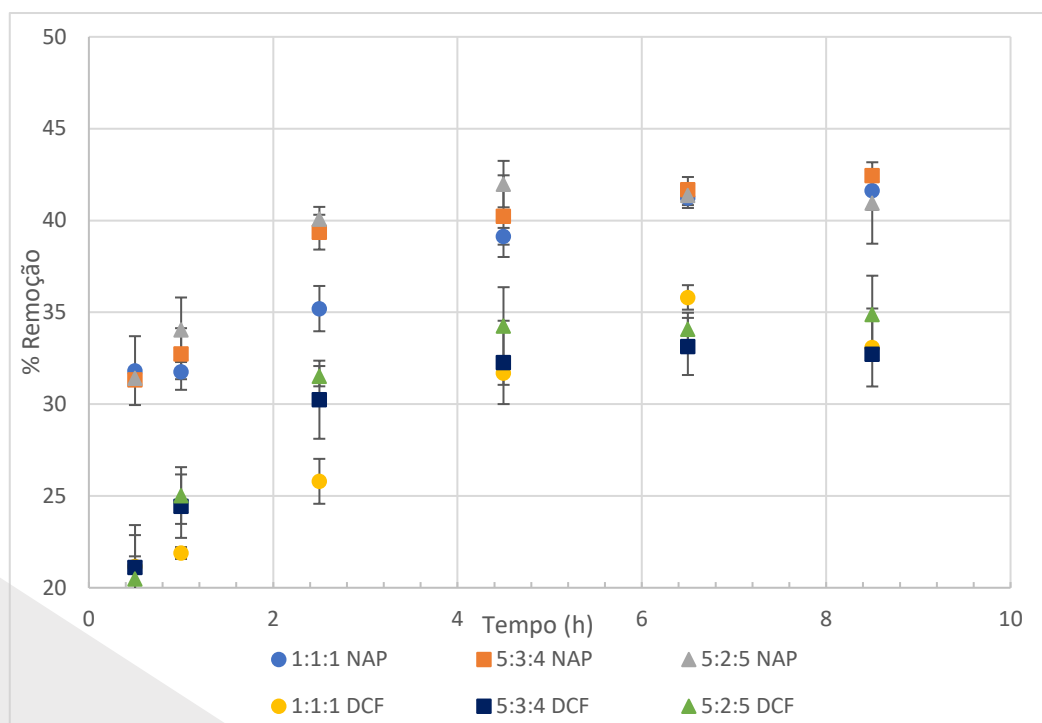


Figura 4.13 Cinética de remoção do naproxeno e do diclofenaco para as estratificações 1:1:1; 5:3:4 e 5:2:5 para a solução de $2,5 \text{ mL}^{-1}$ (com ampliação da região entre 0h e 10h)

Da análise da figura 4.13, é possível observar que as três estratificações testadas apresentam cinéticas semelhantes, caracterizadas por uma fase inicial (primeiras 10h de contacto) em que a remoção do naproxeno e do diclofenaco é rápida, seguida de uma fase em que a remoção do naproxeno e do diclofenaco é mais lenta. A remoção observada na fase inicial deveu-se, principalmente, à adsorção dos fármacos à superfície da matriz, nomeadamente à LECA e à vermiculite, que apresentam cinéticas mais rápidas (Dordio et al., 2017; Manthiram Karthik & Philip, 2021) do que a cortiça 3/5 (ver secção 4.2, figuras 4.6 e 4.7). Por outro lado, a remoção do naproxeno e do diclofenaco na fase mais lenta da cinética deve-se principalmente à cortiça, que apresenta uma cinética mais lenta, sendo notório que, ao fim de 192 h de ensaio, não tinha ainda sido atingido o equilíbrio (secção 4.2, figuras 4.6 e 4.7) continuando, portanto, a matriz ainda com capacidade de remoção dos fármacos ao fim desse tempo.

Com a combinação dos materiais argilosos (LECA + vermiculite) com a cortiça, observou-se que o naproxeno apresentou percentagens de remoção superiores ao diclofenaco, o que contrasta com o que foi anteriormente observado na secção 4.2, nos ensaios realizados apenas com a cortiça.

No caso do naproxeno, as estratificações 1:1:1, 5:3:4 e 5:2:5 apresentam comportamentos e percentagens de remoção muito semelhantes. Embora a estratificação 1:1:1 apresente remoções ligeiramente inferiores nas primeiras 4,5 h de ensaio, ao fim de 10 h de ensaio essa diferença já não é notória, sendo atingidas percentagens de remoção de ~42%. Ao fim de 168 h de ensaio, não são observadas diferenças entre estratificações, obtendo-se percentagens de remoção de ~45% para as 3 estratificações.

No caso do diclofenaco, à semelhança do que foi observado para o naproxeno, as três estratificações apresentaram comportamentos e percentagens de remoção muito semelhantes, sendo que a estratificação 1:1:1 apresentou percentagens de remoção ligeiramente inferiores às restantes estratificações nas primeiras 4,5 h de ensaio. Contudo, ao fim das 168 h de ensaio todas as estratificações testadas apresentaram percentagens de remoção de ~37%, não sendo observadas diferenças entre as estratificações.

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre as estratificações testadas, supõe-se que as diferentes disposições e proporções dos materiais deverão originar diferentes comportamentos da matriz, mas que neste estudo não se conseguiu detetar por alguma deficiência do planeamento ou execução experimental. Um

dos pontos mais delicados e que mais provavelmente poderá não ter recebido toda a atenção necessária terá sido a amostragem. Dada a óbvia heterogeneidade da matriz, especial cuidado deve ser tido em relação aos pontos de recolha das amostras de líquido para doseamento dos fármacos em solução, de modo a que as amostras sejam representativas de todo o sistema, considerando as diferentes composições dos materiais nas diferentes locais. Assim, a hipótese que se pode colocar é de que o modo como foram feitas as recolhas das amostras não tenha conseguido capturar a necessária diversidade dos locais nos sistemas a analisar. No futuro será importante repetir este estudo dando uma especial atenção a este aspeto de como realiza a melhor amostragem destes sistemas heterogéneos.

4.4 Caracterização da curva de crescimento do *B. subtilis*

O estudo da curva de crescimento do *B. subtilis* QST 713, isolado a partir de uma suspensão comercial, foi realizado conforme descrito na secção 3.4.4 deste trabalho. As curvas de crescimento da bactéria, na ausência e na presença de glucose, foram obtidas utilizando o método da turbidimetria, tendo como parâmetro de medida a densidade ótica, a um c.d.o. de 600 nm, ao longo de 48 horas.

A bactéria *Bacillus subtilis* segue um crescimento microbiano típico, sendo possível observar na sua curva de crescimento quatro fases, a fase *lag* ou de latência, a fase log ou exponencial, a fase estacionária e a fase de declínio ou morte (Sahoo et al., 2016; Steinberg et al., 2016).

A fase *lag*, ou fase de latência, corresponde ao início do crescimento microbiano e possui uma duração variável, dependendo do microrganismo, das condições iniciais da cultura, do meio em que se encontra e da disponibilidade de nutrientes. Durante esta fase, ocorre a adaptação metabólica do microrganismo ao meio de cultura, sendo caracterizada por um crescimento microbiano muito lento (Nicolau, 2014). No gráfico de crescimento, esta fase é representada por um patamar ou um declive suave no início da curva.

A fase log, ou exponencial, é caracterizada pelo crescimento acelerado da população microbiana, durante o qual a divisão celular ocorre a uma taxa máxima e constante (taxa específica de crescimento, μ), resultando em um tempo de geração (g)

igualmente constante. A taxa de divisão celular de uma determinada população microbiana depende das condições ideais para o seu crescimento, sendo tanto mais elevada quanto mais próximos das condições ótimas estiverem parâmetros como pH, temperatura e composição do meio (Nicolau, 2014). Graficamente, esta fase é caracterizada por um aumento acentuado (comportamento exponencial) da curva de crescimento, sendo o período de maior aumento ao longo da curva.

A fase estacionária corresponde a uma diminuição da taxa de crescimento e é caracterizada por uma taxa de crescimento celular igual à taxa de morte celular, isto é, o número de células resultantes da multiplicação é igual ao número de células que morre (Nicolau, 2014). Na curva de crescimento, esta fase é identificada por uma diminuição do declive, correspondente ao abrandamento da taxa de crescimento.

Por fim, a fase de declínio, ou fase de morte, caracteriza-se por um aumento no número de células mortas em relação ao número total de células viáveis (Nicolau, 2014). Graficamente, nesta fase a curva tende para uma estabilização num patamar, indicando que nesse limite o número de células totais deixa de variar, dado que deixa de haver multiplicação celular e, conseqüentemente, a formação de novas células.

Para a caracterização da curva de crescimento do *B. subtilis* foram realizados três ensaios para cada uma das condições experimentais testadas, tendo-se assim obtido três curvas de crescimento independentes em cada caso. Na figura 4.14, está representada a curva de crescimento média do *B. subtilis* obtida a partir dos três ensaios realizados em descontinuo na ausência de glucose.

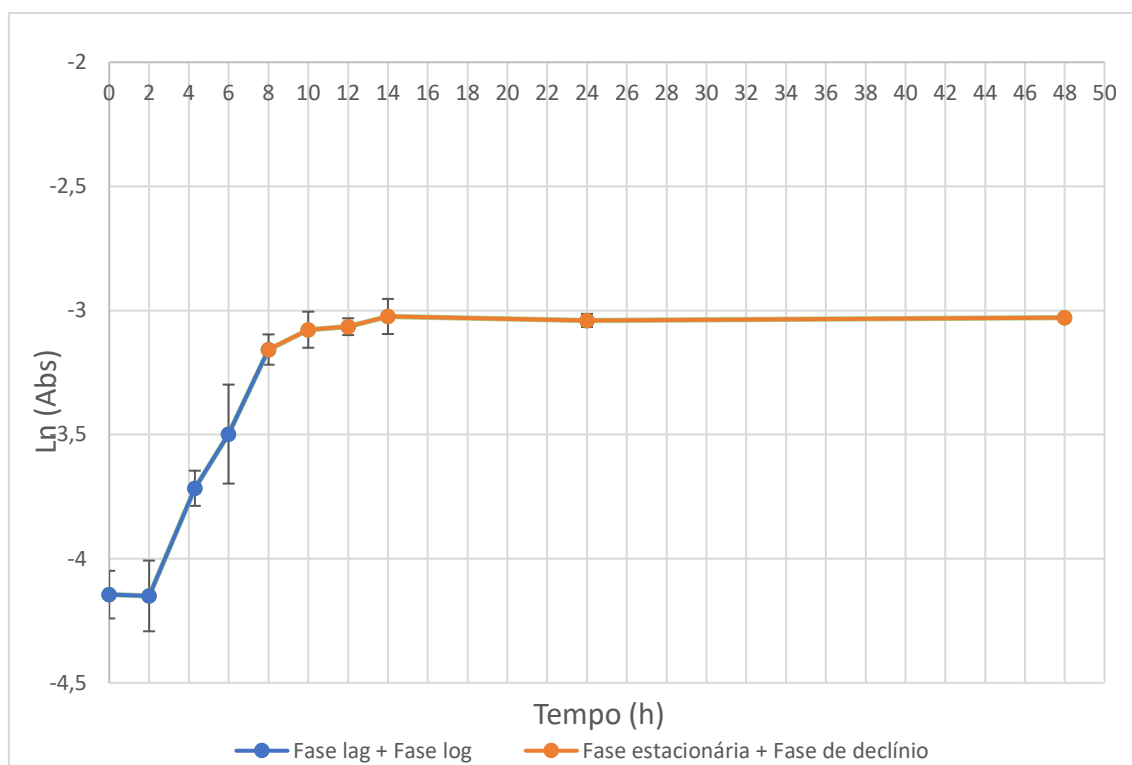


Figura 4.14 Curva de crescimento celular do *Bacillus subtilis* em meio líquido na ausência de glucose

A curva de crescimento obtida para o *B. subtilis* na ausência de glucose apresentou uma fase *lag* de aproximadamente 2 h, indicando que o *B. subtilis* necessitou deste intervalo de tempo para se adaptar às novas condições ambientais, nomeadamente, ao meio de cultura, pH, temperatura, etc.. Durante este período, as bactérias sintetizam várias macromoléculas como ribossomas, proteínas e enzimas que são necessárias à divisão celular, de forma a preparar um crescimento exponencial da população.

A fase log teve início imediatamente após o fim da fase *lag*, ou seja, por volta das 2 h e terminou por volta das 8 h aproximadamente, tendo assim uma duração de cerca de 6 h. Esta fase é identificada por um declive acentuado, que representa o crescimento exponencial da população e encontra-se representada a azul na figura 4.14, juntamente com a fase *lag*.

A cultura de *B. subtilis* entrou na fase estacionária por volta das 8 h. Esta fase teve uma duração de aproximadamente 6 h, terminando com o início da fase de declínio ou morte por volta das 14 h. Na fase estacionária existe uma diminuição de células resultantes da multiplicação, o que, no método de turbidimetria, resulta num aumento da

densidade ótica mais lento, sendo possível identificar a passagem da fase log para a fase estacionária pela diminuição do declive da curva de crescimento. Após este período as bactérias terão entrado numa fase de declínio ou morte. As fases estacionária e de declínio encontram-se representadas na figura 4.14 em cor de laranja.

Na figura 4.15, está representada a curva de crescimento média do *B. subtilis* obtida a partir dos três ensaios realizados em descontínuo na presença de glucose.

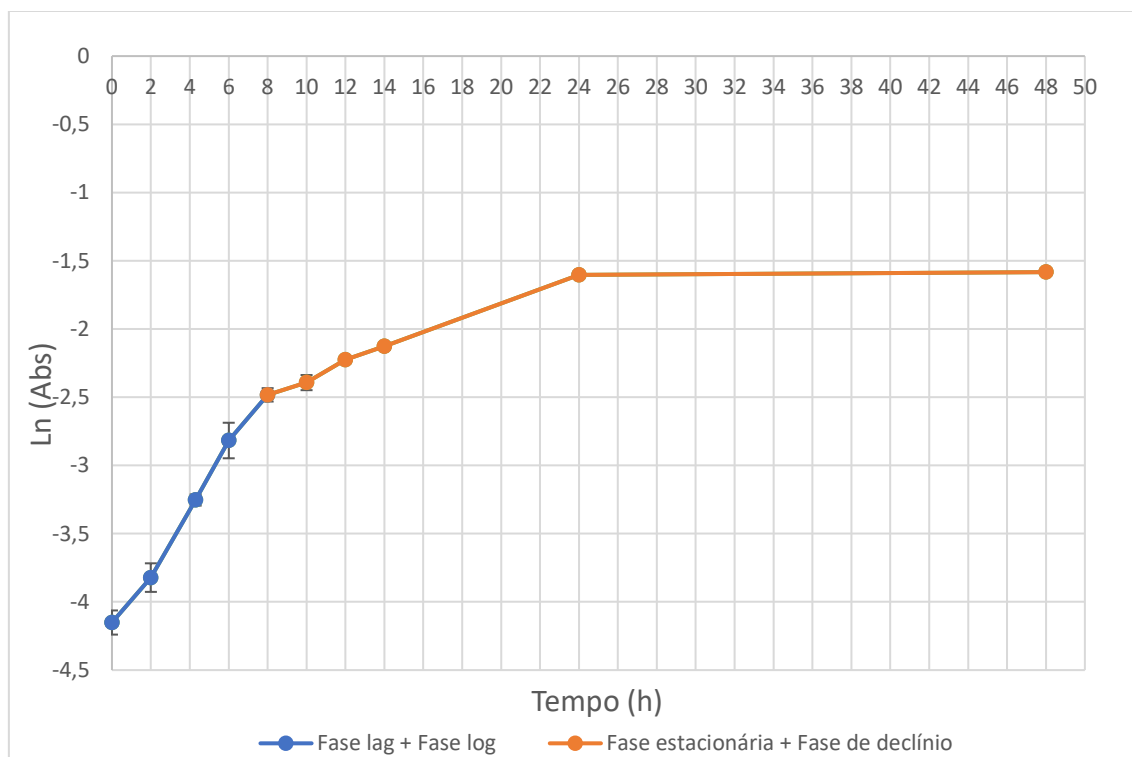


Figura 4.15 Curva de crescimento celular do *Bacillus subtilis* em meio líquido na presença de glucose

Na curva de crescimento do *B. subtilis* obtida em modo descontínuo em meio de cultura líquido contendo glucose (figura 4.15) foi observado que o período de adaptação (fase *lag*) da cultura foi muito curto. Isso pode ser explicado pelo facto de o inóculo utilizado ter crescido nas mesmas condições experimentais que depois foram utilizadas na determinação das curvas de crescimento, estando assim já bem adaptado a estas condições. Devido ao facto de as medições da $DO_{600\text{ nm}}$ terem sido realizadas em intervalos de 2 horas, o que se pode afirmar é que a fase *lag* teve uma duração inferior a esse intervalo de tempo. Portanto, não foi possível determinar com precisão a duração exata desta fase.

A fase log iniciou-se logo após a fase *lag* e teve uma duração de aproximadamente 8 h, tendo terminado com o início da fase estacionária, que, de acordo com os dados experimentais disponíveis, terá terminado por volta das 24 h. No entanto, não foi possível precisar a duração desta fase, uma vez que não foram realizadas medições entre as 14 e as 24 horas. Após as 24 h a cultura entrou na fase de declínio ou morte.

Ao comparar a curva de crescimento obtida para o *B. subtilis* na presença de glucose (figura 4.15) com a curva de crescimento do *B. subtilis* na ausência de glucose (figura 4.14), observou-se que, embora ambas apresentem as quatro fases, a duração das mesmas difere, demonstrando que a disponibilidade de nutrientes, em particular de uma fonte fácil de carbono, pode afetar consideravelmente o crescimento do *B. subtilis*. Na curva de crescimento com glucose, o *B. subtilis* apresentou uma fase *lag* quase nula, enquanto na ausência de glucose, esta fase teve uma duração de aproximadamente 2 h, indicando que o *B. subtilis* tem uma adaptação mais rápida na presença de glucose. Observou-se ainda que, na curva de crescimento obtida na presença de glucose, tanto a fase log quanto a fase estacionária tiveram uma duração superior em comparação com a curva de crescimento obtida na ausência de glucose. Como já foi referido, este resultado pode provavelmente ser atribuído à disponibilidade de uma fonte fácil de carbono como a glucose, que favorece não apenas um crescimento mais rápido do *B. subtilis*, mas também uma extensão da duração das fases de crescimento.

Adicionalmente, observou-se que o *B. subtilis* apresentou um maior crescimento na presença de glucose, tendo-se obtido valores de $DO_{600\text{ nm}}$ superiores durante a fase log. Isto também foi possível observar-se pelo aspeto dos meios de cultura, uma vez que, na ausência de glucose, estes apresentavam um aspeto mais límpido do que os meios de cultura contendo glucose (figura 4.16).

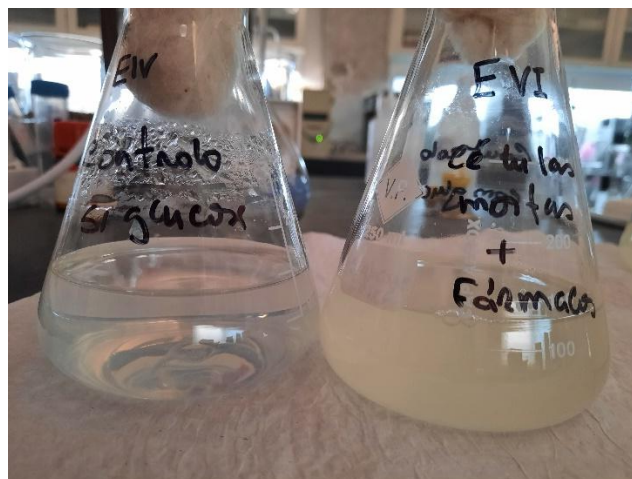


Figura 4.16 Aspeto visual dos meios de cultura do *Bacillus subtilis* na ausência (à esquerda) e na presença (à direita) de glucose para o mesmo período de incubação

4.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos do crescimento do *B. subtilis*

A etapa inicial no estudo do crescimento microbiano consiste na análise e caracterização da curva de crescimento do microrganismo, a partir da qual é possível determinar os parâmetros cinéticos que descrevem o crescimento de uma população microbiana (K ovárová- et al., 1998; Stojanović et al., 2020).

A curva de crescimento e os parâmetros cinéticos de crescimento de um microrganismo dependem de fatores como pH, temperatura, velocidade de agitação, disponibilidade de nutrientes e concentração de oxigênio no meio. Assim, a determinação de parâmetros como a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$), o tempo de geração (g) e o número de gerações (n) são essenciais para avaliar o impacto de diferentes condições ambientais no crescimento dos microrganismos (Stojanović et al., 2020).

A velocidade específica de crescimento é máxima e constante durante a fase de crescimento exponencial de uma população microbiana e corresponde ao declive da reta obtida por regressão linear que melhor se ajusta ao gráfico $\ln(\text{DO}_{600 \text{ nm}})$ vs tempo (figura 4.17 e figura 4.18). A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada utilizando a expressão [1], onde x é a $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ no tempo t e x_i é a $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ no tempo t_i .

$$\ln x = \ln x_i + \mu (t - t_i) \quad [1]$$

O tempo de geração (g) corresponde ao tempo que uma população microbiana demora para se duplicar e pode ser determinado através da expressão [2]. O número de gerações (n) é a razão entre o tempo de duração da fase log e o tempo de geração [3] e permite obter informações sobre a taxa de crescimento microbiana que reflete o comportamento e a dinâmica da população microbiana em estudo (Kaiser, 2024).

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad [2]$$

$$n = \frac{\text{tempo (fase log)}}{g} \quad [3]$$

Na figura 4.17, estão representadas as fases log das três curvas de crescimento do *B. subtilis* obtidas nos três ensaios realizados em descontinuo na ausência de glucose.

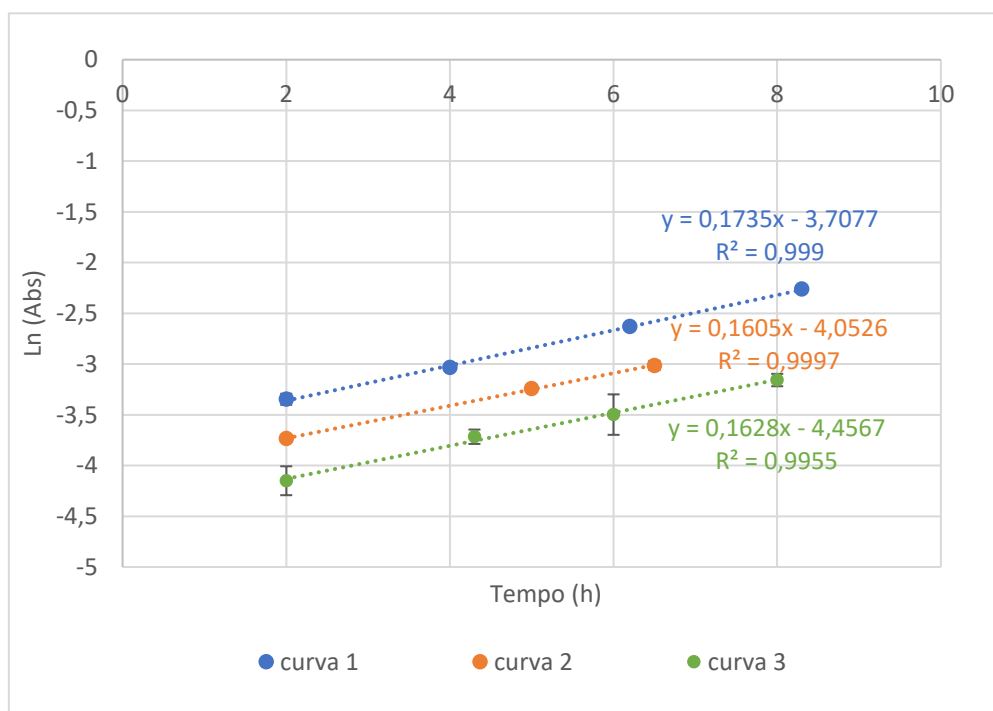


Figura 4.17 Representação gráfica da fase log das curvas de crescimento obtidas no meio sem glucose

Na tabela 4.1 são apresentados os parâmetros cinéticos obtidos das curvas de crescimento da cultura de *Bacillus*, bem como os seus valores médios e desvios padrão.

Tabela 4.1 Parâmetros cinéticos de crescimento do *Bacillus subtilis* sem glucose

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP
Fase exponencial (h)	2 – 8	2 – 6,5	2 – 8		
Equação da reta	$y = 0,1735 x - 3,7077$	$y = 0,1605 x - 4,0526$	$y = 0,1628 x - 4,4567$		
R²	0,999	1,000	0,996		
$\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹)	0,1735	0,1605	0,1628	0,1656	0,0012
Tempo de geração (h)	3,995	4,318	4,257	4,190	0,033
Número de gerações	1,50	1,04	1,41	1,32	0,21

A partir dos declives das fases log das curvas de crescimento retiraram-se os valores da velocidade específica máxima de crescimento, obtendo-se um valor médio de 0,1656 h⁻¹ para a velocidade específica máxima de crescimento do *B. subtilis* num meio sem glucose, bem como um tempo médio de geração e um número médio de gerações de 4,190 h e 1,32, respetivamente.

Na figura 4.18, estão representadas as fases log das três curvas de crescimento do *B. subtilis* obtidas nos três ensaios realizados em descontinuo na presença de glucose.

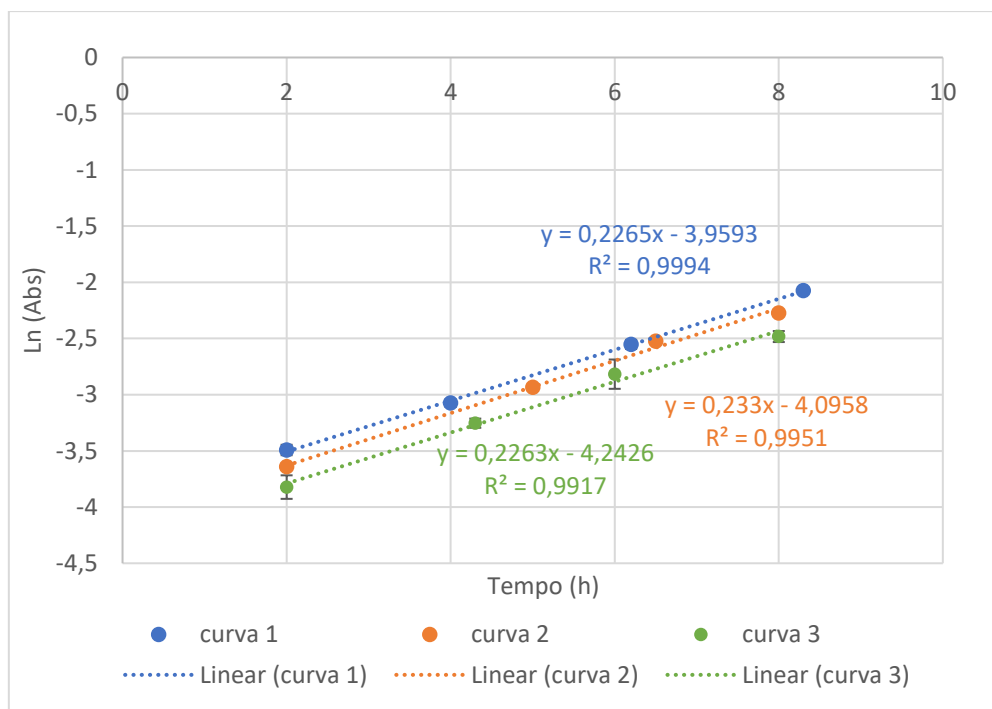


Figura 4.18 Representação gráfica da fase log das curvas de crescimento obtidas no meio com glucose

Os parâmetros cinéticos para a cultura de *B. subtilis*, na presença de glucose foram obtidos da mesma forma que os valores obtidos para as culturas na ausência de glucose, e encontram-se apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 Parâmetros cinéticos de crescimento do *Bacillus subtilis* com glucose

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP
Fase exponencial (h)	2 – 8	2 – 8	2 – 8		
Equação da reta	$y = 0,2265 x - 3,9593$	$y = 0,2330 x - 4,0958$	$y = 0,2263 x - 4,2426$		
R²	0,9994	0,9951	0,9917		
$\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹)	0,2265	0,2330	0,2263	0,2286	0,0046
Tempo de geração (h)	3,061	2,975	3,062	3,033	0,061
Número de gerações	1,960	2,017	1,959	1,979	0,040

Da análise das três curvas resulta que o valor médio da velocidade específica máxima de crescimento foi de 0,2286 h⁻¹, enquanto o tempo médio de geração foi de 3,033 h e o número médio de gerações foi de 1,979.

Ao comparar os parâmetros cinéticos obtidos para as curvas de crescimento do *B. subtilis* na ausência (tabela 4.1) e na presença de glucose (tabela 4.2), observou-se que tanto o valor médio da velocidade específica máxima de crescimento como do número de gerações foi superior para as culturas que cresceram na presença de glucose (0,2286 h⁻¹ e 1,979, respetivamente) em comparação com as culturas que cresceram na ausência da mesma (0,1614 h⁻¹ e 1,28, respetivamente). Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que o crescimento microbiano, na maior parte dos casos, tende a ser mais rápido quando existe uma maior disponibilidade de fontes fáceis de carbono, em particular na presença de glucose (Stojanović et al., 2020). Adicionalmente, o tempo de geração para as culturas na presença de glucose (3,033 h) foi inferior ao tempo de geração para as culturas na ausência de glucose (4,295 h). Os resultados obtidos para os parâmetros cinéticos, na ausência e na presença de glucose, indicam que a glucose aumenta o crescimento do *B. subtilis*, estando em concordância com estudos realizados anteriormente, que indicam que a glucose é uma fonte de carbono eficiente, favorecendo um crescimento rápido e robusto. Isso ocorre porque a glucose é um açúcar simples que pode ser facilmente metabolizado através da via glicolítica, fornecendo energia e

precursores biossintéticos essenciais para o crescimento bacteriano (Mageshwaran et al., 2014; Stojanović et al., 2020).

De forma a se obter um melhor entendimento do efeito da glucose no crescimento do *B. subtilis*, recorreu-se a estudos anteriormente publicados (Kovárová- et al., 1998; Mageshwaran et al., 2014). Na tabela 4.3 encontram-se os valores dos parâmetros cinéticos do *B. subtilis* obtidos neste estudo, bem como alguns valores relatados na bibliografia, em ensaios realizados sob condições semelhantes.

Tabela 4.3 Parâmetros cinéticos do *B. subtilis* obtidos dos ensaios e da bibliografia

Meio nutritivo	Ensaio		Bibliografia (Stojanović et al., 2020)		
	s/glucose	c/glucose (1 g L ⁻¹)	s/glucose	c/glucose (5 g L ⁻¹)	c/glucose (10 g L ⁻¹)
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,1614	0,2286	0,26	0,329	0,282
Tempo de geração (h)	4,295	3,033	2,67	2,1	2,46
Número de gerações	1,28	1,979	–	–	–

Primeiramente, é importante lembrar que os ensaios deste trabalho foram realizados utilizando meios com uma concentração de glucose de 1 g L⁻¹, enquanto os valores referidos na bibliografia foram obtidos para concentrações de glucose de 5 e 10 g L⁻¹. Adicionalmente, é relevante referir que, embora os resultados apresentados na bibliografia tenham sido obtidos sob condições de ensaio semelhantes aos utilizados ao longo deste estudo, a concentração dos sais minerais utilizados no meio de cultura não é exatamente a mesma, facto que pode contribuir para as pequenas diferenças observadas.

O valor obtido para a taxa específica de crescimento na ausência de glucose referido na bibliografia (0,26 h⁻¹) é ligeiramente superior ao obtido neste estudo (0,1614 h⁻¹). No entanto, ambos os valores têm a mesma ordem de grandeza. De forma análoga, o valor da taxa específica de crescimento na presença de glucose referido na bibliografia é superior ao obtido neste estudo, ainda que se encontrem também na mesma ordem de grandeza.

4.5 Estudo da capacidade de degradação do naproxeno e do diclofenaco pelo *B. subtilis*

De forma a avaliar a capacidade da cultura de *B. subtilis* para degradar o naproxeno e o diclofenaco foram realizados três ensaios de acordo com o procedimento experimental descrito na secção 3.4.5. Foram testadas duas concentrações (2 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹) para cada um dos dois fármacos estudados e duas concentrações (2 mg L⁻¹ e 5 mg L⁻¹ de cada fármaco) de uma mistura com quatro fármacos, incluindo os dois estudados.

Cada ensaio foi conduzido com vários Erlenmeyers, em meio líquido e num regime descontínuo, sob agitação orbital a 200 rpm e temperatura constante de 30 °C, conforme ilustrado no esquema da secção 3.4.5.

4.5.1 Avaliação dos efeitos da exposição aos fármacos no crescimento da cultura de *B. subtilis*

Na figura 4.19 e na tabela 4.4 estão apresentadas as curvas de crescimento do *B. subtilis* e os parâmetros cinéticos de crescimento do mesmo, para as soluções contendo 2 mg L⁻¹ de naproxeno, na presença (I) e na ausência (II) de glucose. São ainda apresentadas as curvas relativas aos Erlenmeyers de controlo (III e IV), que foram obtidas na ausência de naproxeno, bem como os parâmetros cinéticos referentes a cada uma das curvas.

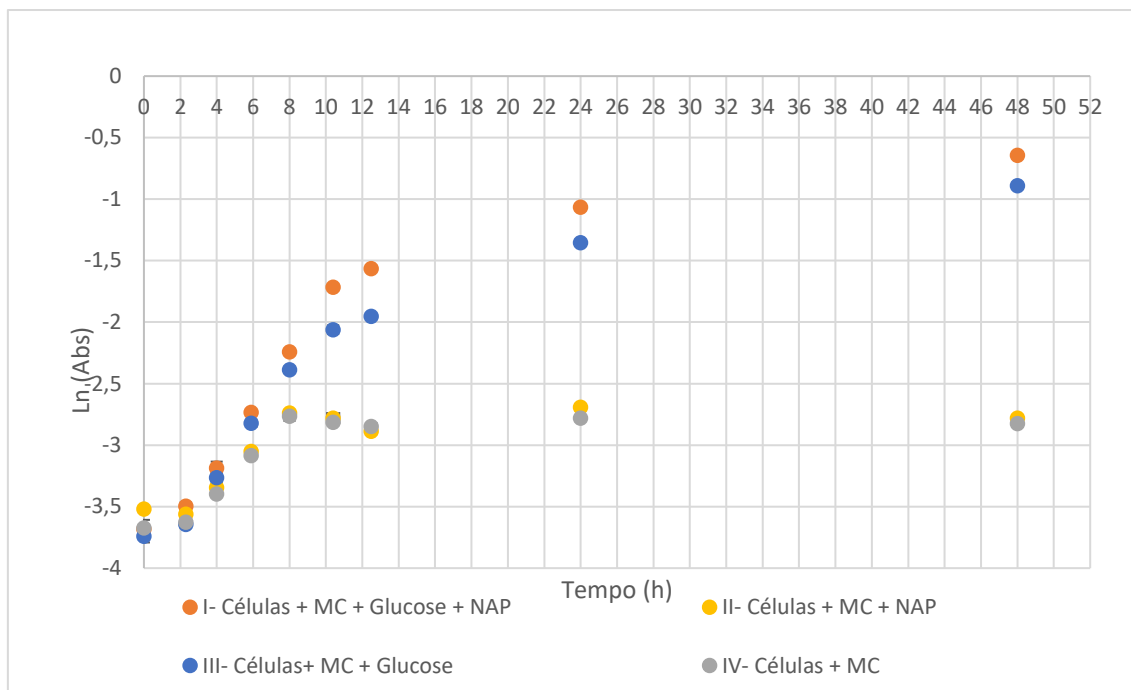


Figura 4.19 Curvas de crescimento do *B. subtilis* na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 2 mg L^{-1} de naproxeno

Da análise da figura 4.19 observa-se que a duração quer da fase *lag* quer da fase log em todas as curvas de crescimento das culturas estudadas em todos os Erlenmeyers não apresentaram diferenças, sendo a duração da fase *lag* de aproximadamente 2 h e a duração da fase log de aproximadamente 6 h em todos os casos. Estes tempos são também parecidos com os obtidos no estudo da caracterização da curva de crescimento da bactéria na ausência de fármacos, conforme foi descrito na secção anterior. Assim, a presença de naproxeno numa concentração de 2 mg L^{-1} , não parece ter afetado a duração das diversas fases da curva de crescimento do *B. subtilis*.

Nas curvas II e IV, foi ainda observada uma diminuição do valor da $DO_{600 \text{ nm}}$ entre as 8 h e as 12 h de ensaio, durante a fase estacionária. Esta diminuição deveu-se provavelmente à aglomeração das células de *B. subtilis* em colónias e sua consequente sedimentação, resultando assim numa solução clarificada, o que introduziu um enviesamento na amostragem com uma representação incorretamente baixa de células.

Na tabela 4.4 são apresentados os parâmetros cinéticos de crescimento obtidos das curvas de crescimentos representadas na figura 4. 19, os quais foram obtidos conforme descrito na secção 4.4.1.

Tabela 4.4 Parâmetros cinéticos de crescimento do *B. subtilis* na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 2 mg L⁻¹ de naproxeno

	I	II	III	IV
Fase exponencial (h)	2,3 – 8	2,3 – 8	2,3 – 8	2,3 – 8
Equação da reta	$y = 0,2228 x - 4,0382$	$y = 0,1460 x - 3,9102$	$y = 0,2214 x - 4,1473$	$y = 0,1525 x - 3,9877$
R²	0,997	0,9986	0,9994	0,9987
μ_{máx} (h⁻¹)	0,2228	0,1460	0,2214	0,1525
Tempo de geração (h)	3,1116	4,7483	3,1303	4,5444
Número de gerações	1,8318	1,2004	1,8209	1,2543

Ao analisar a tabela 4.4, verifica-se que, à semelhança do observado na secção 4.4, as culturas de *B. subtilis* na presença de glucose (I e III) apresentam taxas específicas de crescimento superiores às culturas na ausência de glucose (II e IV), tanto no meio contendo naproxeno, como no meio sem naproxeno. O que parece indicar que é a presença glucose, como fonte de carbono e energia para as células, o principal fator que influencia o crescimento do *B. subtilis*.

Adicionalmente, ao analisar os parâmetros de crescimento referentes às curvas I e III (na presença de glucose), observou-se que a cultura na presença de naproxeno 2 mg L⁻¹ (I) apresentou uma velocidade específica máxima de crescimento (0,2228 h⁻¹) ligeiramente superior ao controlo (III, μ_{máx} = 0,2214 h⁻¹), no entanto dentro da mesma ordem de grandeza. Por sua vez, o tempo de geração para a curva I foi inferior, resultando num número de gerações superior.

Por outro lado, em relação às curvas II e IV (na ausência de glucose), a cultura crescida na ausência de naproxeno (IV) apresentou uma velocidade específica máxima de crescimento ligeiramente superior à cultura na presença de naproxeno, mas dentro da mesma ordem de grandeza, tendo também apresentado um tempo de geração inferior e um maior número de gerações.

Assim, a presença de naproxeno numa concentração de 2 mg L⁻¹ não aparenta causar qualquer efeito de toxicidade ao *B. subtilis*, quer na presença quer na ausência de glucose, uma vez que não foram observadas alterações significativas nos parâmetros cinéticos de crescimento da bactéria.

Na figura 4.20 e na tabela 4.5 estão apresentadas as curvas de crescimento do *B. subtilis* e os parâmetros cinéticos de crescimento do mesmo, para as soluções contendo 20 mg L⁻¹ de naproxeno, na presença (I) e na ausência (II) de glucose. São ainda apresentadas as curvas relativas aos Erlenmeyers de controlo (III e IV), que foram obtidas na ausência de naproxeno, bem como os parâmetros cinéticos referentes a cada uma das curvas.

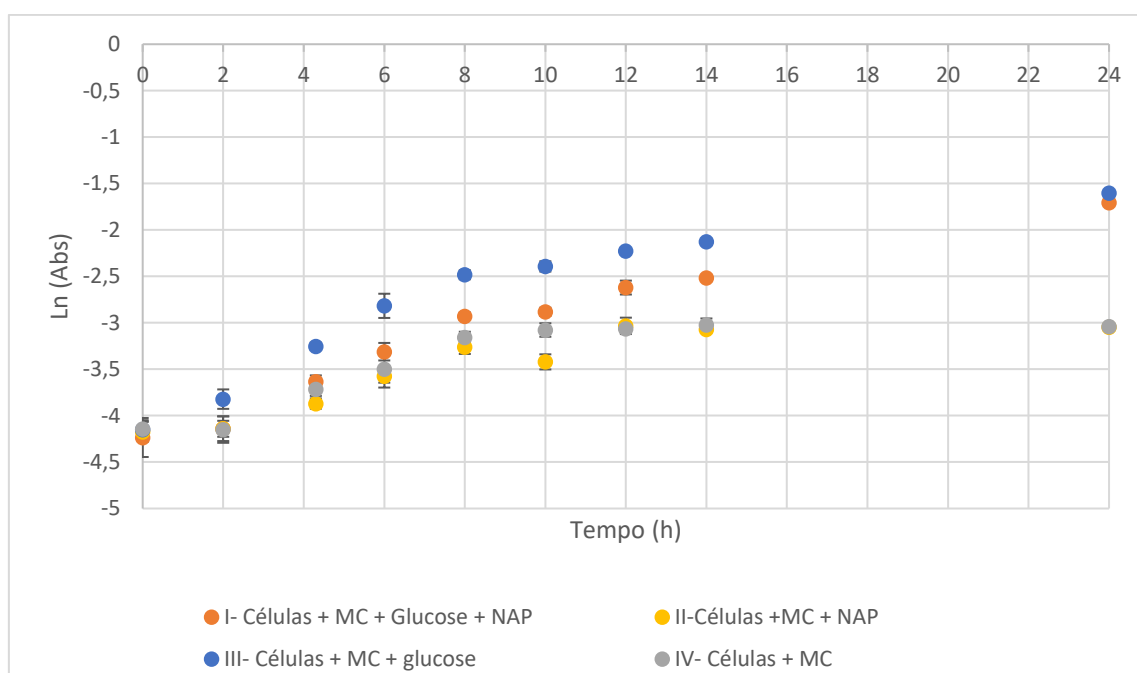


Figura 4.20 Curvas de crescimento do *B. subtilis* na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 20 mg L⁻¹ de naproxeno

Para a concentração de 20 mg L⁻¹ de naproxeno, tal como se verificou no estudo anterior (respeitante à concentração de 2 mg L⁻¹ de naproxeno), em nenhuma das várias condições avaliadas (com ou sem fármaco, bem como na presença ou na ausência da glucose no meio de cultura) se observaram alterações das durações das fases *lag* e *log* das curvas de crescimento. Assim, é reafirmada, a esta concentração mais elevada do fármaco, a observação de que a presença do naproxeno no meio de cultura não parece ter um efeito negativo sobre a duração das fases de crescimento desta bactéria.

Na tabela 4.5 são apresentados os parâmetros cinéticos de crescimento obtidos das curvas de crescimentos representadas na figura 4. 20.

Tabela 4.5 Parâmetros cinéticos de crescimento do *B. subtilis* na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 20 mg L⁻¹ de naproxeno

	I	II	III	IV
Fase exponencial (h)	2 – 8	2 – 8	2 – 8	2 – 8
Equação da reta	$y = 0,2016 x - 4,5268$	$y = 0,1483 x - 4,4641$	$y = 0,2263 x - 4,2426$	$y = 0,1628 x - 4,4567$
R²	0,9985	0,9932	0,9999	0,9955
μ_{máx} (h⁻¹)	0,2016	0,1483	0,2263	0,1628
Tempo de geração (h)	3,4387	4,6724	3,0623	4,2571
Número de gerações	1,7449	1,2841	1,9593	1,4094

Ao contrário do que foi observado e extraído das curvas da figura 4.19 relativamente aos efeitos no crescimento do *B. subtilis* associados com a exposição ao naproxeno na concentração de 2 mg L⁻¹, a cultura desta bactéria na presença do fármaco a 20 mg L⁻¹, quer num meio contendo glucose (I) quer na ausência desta (II), apresentou uma velocidade específica máxima de crescimento (de 0,2016 h⁻¹ em I, c/ glucose; e de 0,1483 h⁻¹ em II, s/ glucose) ligeiramente inferior à cultura correspondente desenvolvida na ausência do naproxeno (0,2263 h⁻¹ em III, c/ glucose; e 0,1628 h⁻¹ em IV, s/ glucose), apresentando também tempos de geração superiores e números de geração inferiores. Parece assim poder notar-se um ligeiro efeito negativo no crescimento do *B. subtilis* associado com a presença no meio do naproxeno a estas concentrações mais elevadas. No entanto, o fator que parece ter maior influência na velocidade específica de crescimento do *B. subtilis* é a presença ou ausência de glucose no meio de cultura.

Da comparação dos parâmetros cinéticos apresentados nas tabelas 4.4 e 4.5 pode-se considerar que o efeito no crescimento do *B. subtilis* das concentrações de naproxeno testadas não é muito significativo uma vez que os valores da velocidade específica máxima de crescimento para as duas concentrações são relativamente próximos, tanto na presença quanto na ausência de glucose no meio.

Na figura 4.21 e na tabela 4.6 estão apresentadas as curvas de crescimento do *B. subtilis* e os parâmetros cinéticos de crescimento do mesmo, para as soluções contendo 2 mg L⁻¹ de diclofenaco, na presença (I) e na ausência de glucose (II). São ainda apresentadas as curvas relativas aos Erlenmeyers de controlo (III e IV), que foram obtidas na ausência de diclofenaco, bem como os parâmetros cinéticos referentes a cada uma das curvas.

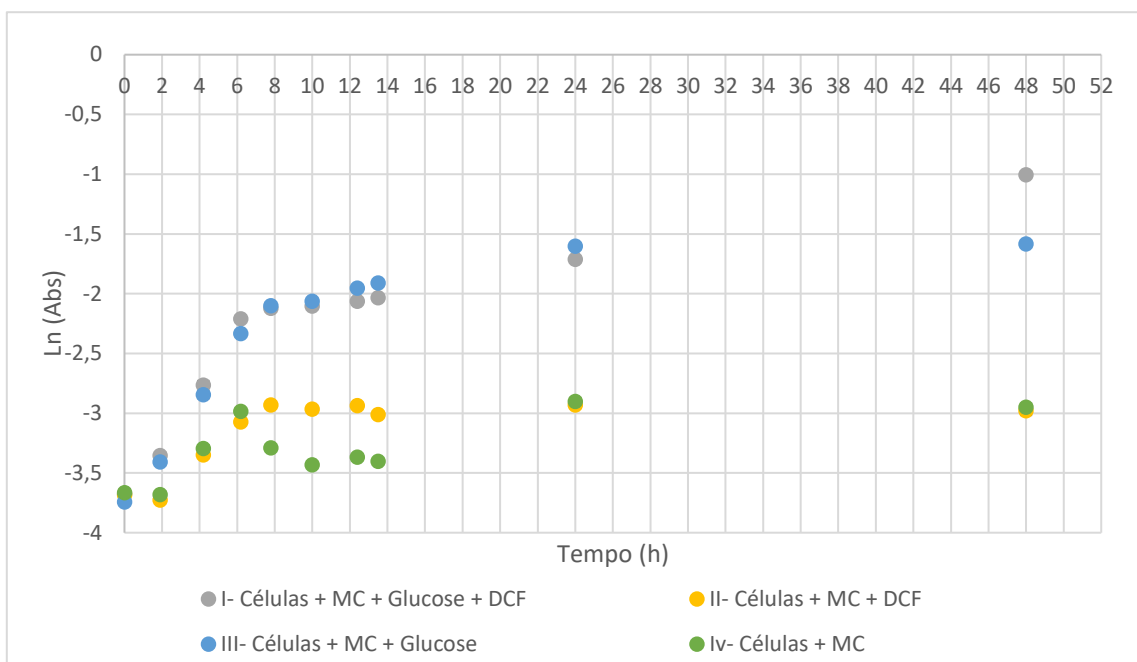


Figura 4.21 Curvas de crescimento do *B. subtilis* na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 2 mg L⁻¹ de diclofenaco

Da análise da figura 4.21 nota-se que todas as curvas de crescimento, correspondendo às diversas condições testadas, apresentam idênticas durações das fases *lag* e *log*, de onde se pode deduzir que, tal como no caso do naproxeno, também a presença de diclofenaco à concentração de 2 mg L⁻¹ no meio de cultura não causou uma perturbação significativa nas durações das fases de crescimento do *B. subtilis*.

Entretanto, é possível observar uma diminuição dos valores da DO_{600 nm} entre as 6 h e as 12 h na curva de crescimento referente ao Erlenmeyer IV, tal como se tinha já observado em alguns Erlenmeyers do estudo referente à solução de naproxeno à concentração de 2 mg L⁻¹ (figura 4.19). Supõe-se que também neste caso esta diminuição se terá devido à aglomeração das células de *B. subtilis* em colónias e consequente sedimentação, resultando assim na diminuição da densidade ótica destas soluções.

Na tabela 4.6 são apresentados os parâmetros cinéticos de crescimento obtidos das curvas de crescimento representadas na figura 4. 21.

Tabela 4.6 Parâmetros cinéticos de crescimento do *B. subtilis* na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 2 mg L⁻¹ de diclofenaco

	I	II	III	IV
Fase exponencial (h)	2 – 7,8	2 – 6,4	2 – 7,8	2 – 6,4
Equação da reta	$y = 0,2188 x - 3,7129$	$y = 0,1523 x - 4,0084$	$y = 0,2265 x - 3,8103$	$y = 0,1625 x - 3,9875$
R²	0,9602	0,9972	0,9907	0,9995
μ_{máx} (h⁻¹)	0,2188	0,1523	0,2265	0,1625
Tempo de geração (h)	3,1673	4,5509	3,0601	4,2657
Número de gerações	1,8628	0,9449	1,9281	1,0080

Ao analisar os parâmetros cinéticos de crescimento referentes a cada curva obtida em cada um dos Erlenmeyers, apresentados na tabela 4.6, observa-se que nos meios contendo glucose (I e III) as velocidades específicas de crescimento são muito próximas (0,2188 h⁻¹ e 0,2265 h⁻¹, respetivamente) e superiores às velocidades específicas de crescimento obtidas nos meios sem glucose (II: 0,1523 h⁻¹; e IV: 0,1625 h⁻¹), o que mais uma vez demonstra que a presença de glucose tem uma influência mais determinante no crescimento da bactéria do que a presença do diclofenaco na concentração de 2 mg L⁻¹. No entanto, na presença do fármaco parece ocorrer uma ligeira diminuição dos valores da velocidades específicas de crescimento quer na presença quer na ausência de glucose, o que poderá indiciar uma ligeira inibição do crescimento da bateria na presença deste fármaco.

Na figura 4.22 e na tabela 4.7 são apresentadas, respetivamente, as curvas de crescimento do *B. subtilis* e os parâmetros cinéticos de crescimento do mesmo daí extraídos, para as soluções contendo 20 mg L⁻¹ de diclofenaco, na presença (I) e na ausência de glucose (II). São ainda apresentadas as curvas relativas aos Erlenmeyers de controlo (III e IV), que foram obtidas na ausência de diclofenaco, bem como os parâmetros cinéticos referentes a cada uma das curvas.

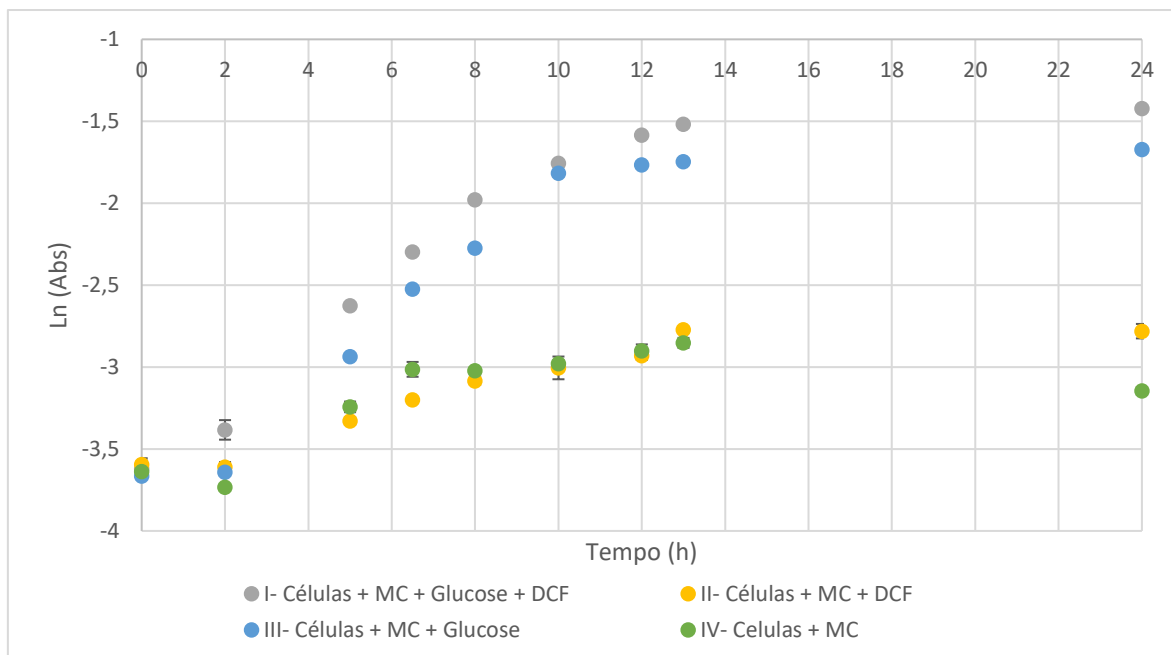


Figura 4.22 Curvas de crescimento do *B. subtilis* na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 20 mg L⁻¹ de diclofenaco

Nas curvas de crescimento I e III (meio de cultura com glucose, na presença e ausência de diclofenaco, respetivamente), apresentadas na figura 4.22, observou-se que ambas as curvas apresentaram um comportamento semelhante, com a mesma duração das fases de crescimento, nomeadamente a fase *lag* e a fase *log*.

Comparando as curvas de crescimento II e IV (meio de cultura sem glucose, na presença e ausência de diclofenaco, respetivamente) observou-se que no geral ambas as curvas apresentaram também um comportamento semelhante, com uma duração idêntica da fase *lag*. Contudo, em relação à curva II notou-se que a fase *log* teve neste caso uma duração ligeiramente menor.

Na tabela 4.7 são apresentados os parâmetros cinéticos de crescimento obtidos a partir de cada uma das curvas de crescimento obtidas para os quatro Erlenmeyers deste ensaio e que estão representadas na figura 4. 22 acima.

Tabela 4.7 Parâmetros cinéticos de crescimento do *B. subtilis* na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 20 mg L⁻¹ de diclofenaco

	I	II	III	IV
Fase exponencial (h)	2 – 8	2 – 6	2 – 8	2 – 8
Equação da reta	$y = 0,2350 x - 3,8339$	$y = 0,0917 x - 3,7919$	$y = 0,2330 x - 4,0958$	$y = 0,1605 x - 4,0526$
R²	0,998	0,9996	0,9951	0,9997
μ_{máx.} (h⁻¹)	0,2350	0,0917	0,2330	0,1605
Tempo de geração (h)	2,9499	7,5609	2,9752	4,3182
Número de gerações (n)	2,0340	0,7936	2,0167	1,3895

Ao analisar os parâmetros cinéticos de crescimento referentes a cada curva obtida em cada um dos Erlenmeyers, apresentados na tabela 4.7, observa-se que nos meios contendo glucose (I e III) as velocidades específicas de crescimento são muito próximas (0,2350 h⁻¹ e 0,2330 h⁻¹, respetivamente) e superiores às velocidades específicas de crescimento obtidas nos meios sem glucose (II: 0,0917 h⁻¹; e IV: 0,1605 h⁻¹). Nos meios de cultura com glucose a presença do diclofenaco na concentração de 20 mg L⁻¹ não parece ter tido um efeito negativo no crescimento do *B. subtilis*. No entanto, nos meios de cultura sem glucose, a presença do diclofenaco na concentração de 20 mg L⁻¹ parece ter causado alguma toxicidade ao *B. subtilis* já que a velocidade de crescimento foi nitidamente afetada nestas condições. Tal facto demonstra que a presença de glucose tem uma influência determinante no crescimento da bactéria e resistência a condições adversas como a exposição a compostos eventualmente tóxicos.

Da comparação dos parâmetros cinéticos apresentados nas tabelas 4.6 e 4.7 pode-se observar que um aumento na concentração de diclofenaco não afeta de forma significativa o crescimento do *B. subtilis*, em meios contendo glucose, uma vez que a velocidade específica máxima de crescimento entre as concentrações de 2 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ são muito próximas (0,2188 h⁻¹ e 0,2350 h⁻¹, respetivamente). No entanto, na ausência de glucose, observou-se que o aumento da concentração de diclofenaco afetou de um modo significativo o crescimento do *B. subtilis*, resultando numa velocidade específica de crescimento inferior para culturas expostas à concentração de 20 mg L⁻¹ (0,1523 h⁻¹ para a solução de diclofenaco com 2 mg L⁻¹ e 0,0917 h⁻¹ para a de 20 mg L⁻¹).

Com o objetivo de introduzir algum realismo na composição das soluções de fármacos estudadas, realizou-se um ensaio em que se misturou numa mesma solução aquosa os dois fármacos deste estudo junto com outros dois fármacos (carbamazepina e

ibuprofeno) os quais estavam a ser objeto de estudo no mesmo grupo de trabalho por uma colega do Mestrado. O ensaio foi conduzido de acordo com o procedimento experimental descrito na secção 3.4.5.

A figura 4.23 mostra as curvas de crescimento do *B. subtilis* num meio contendo uma mistura de quatro fármacos (naproxeno, diclofenaco, carbamazepina e ibuprofeno) na concentração de 2 mg L⁻¹ de cada fármaco. Essas curvas foram obtidas tanto na presença (I) quanto na ausência de glucose (II). Adicionalmente são apresentadas as curvas de crescimento dos Erlenmeyers de controlo (na ausência de fármacos), na presença (III) e na ausência de glucose (IV). Na figura está ainda apresentada a curva de crescimento referente ao Erlenmeyer contendo células inativadas (V), num meio de cultura com a mistura dos 4 fármacos e na ausência de glucose.

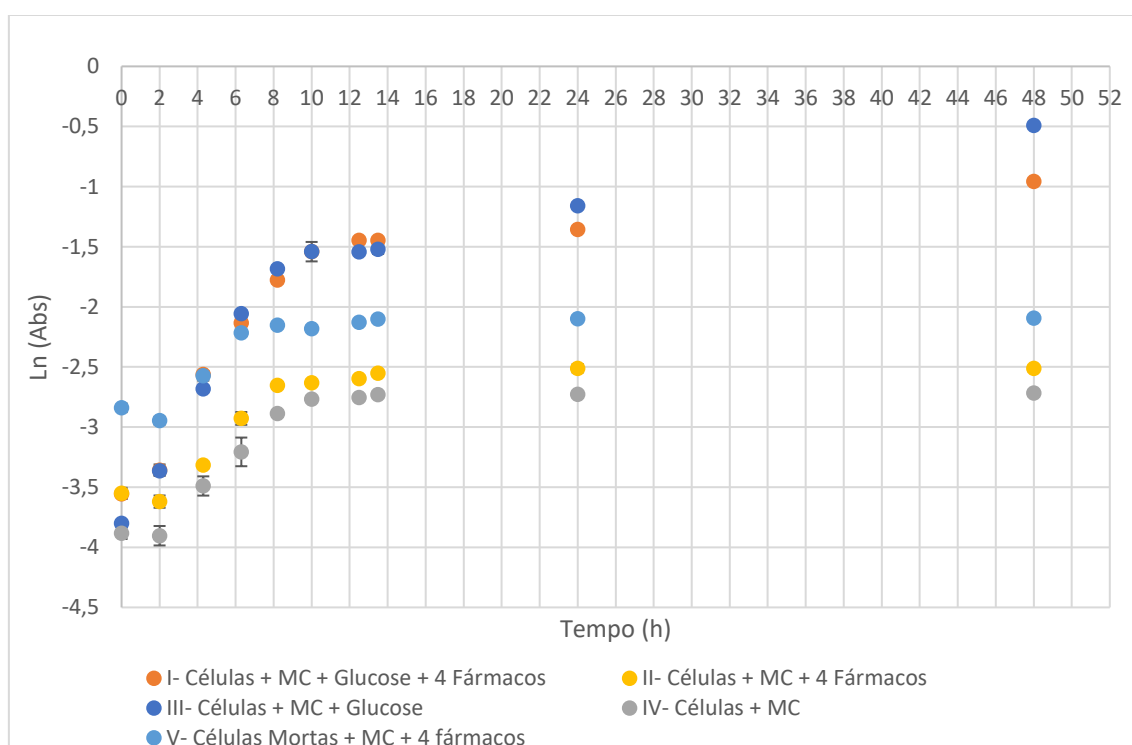


Figura 4.23 Curvas de crescimento do *B. subtilis* obtidas com as soluções de 2 mg L⁻¹ de cada fármaco numa mistura de 4 fármacos (NAP, DCF, IBU, CBZ)

Na figura 4.23 pode-se observar que as curvas de crescimento I e III (meio de cultura com glucose, na presença e na ausência da mistura de fármacos) apresentaram um comportamento semelhante, sendo que, em ambos os casos, a fase log teve uma duração

de aproximadamente 8 h, iniciando-se 2 h após o início do estudo e terminando ao fim de 10 h, com o início da fase estacionária. Adicionalmente, não foi observada a fase de declínio em nenhuma destas duas curvas até ao final do estudo, uma vez que durante este período continuou a verificar-se um aumento dos valores de DO_{600nm} .

Relativamente às curvas de crescimento II e IV (meio de cultura sem glucose, na presença e na ausência da mistura de fármacos, respetivamente) observou-se que estas apresentam comportamentos muito semelhantes. Em ambas as curvas a fase log decorre entre as 2 h e as 8 h, seguida da fase estacionária que termina por volta das 14 h com o início da fase de declínio.

A curva de crescimento V, apresentada na figura 4.23, corresponde ao estudo da cultura de células inativadas (previamente expostas a um banho de ultrassons) num meio de cultura contendo uma concentração de 2 mg L^{-1} de cada fármaco, na ausência de glucose. O objetivo do estudo deste Erlenmeyer foi verificar se as células inativadas contribuiriam para a remoção dos fármacos, o que permitiria sugerir a adsorção à biomassa das células como mecanismo de remoção. Assim, esperava-se (e pretendia-se) que neste caso não ocorresse crescimento celular, o que comprovaria a eficácia do processo de inativação usado. No entanto, verificou-se que houve crescimento celular neste Erlenmeyer semelhante ao observado nas outras duas curvas obtidas num meio sem glucose (II e IV), sendo possível identificar a fase log entre as 2 h e as 6 h, seguida de uma fase estacionária muito curta (2 h) e, posteriormente, da fase de declínio que teve início às 8 h. Este crescimento foi inesperado, e deveu-se, muito provavelmente, ao facto de o banho de ultrassons não ter sido eficiente na inativação das células, ou a uma possível contaminação da cultura durante o período da realização do estudo. Assim, dado o insucesso do processo de inativação usado neste trabalho, será importante realizar no futuro uma pesquisa mais aprofundada de várias possibilidades de inativação celular e avaliar quais serão mais eficientes para as condições do estudo, uma vez que a avaliação que se pretendia fazer com este Erlenmeyer é importante para perceber qual é a contribuição do mecanismo de adsorção à biomassa para a remoção dos fármacos pelas bactérias.

Na tabela 4.8 estão apresentados os parâmetros cinéticos referentes às curvas de crescimento apresentadas na figura 4.23.

Tabela 4.8 Parâmetros cinéticos de crescimento do *B. subtilis* na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 2 mg L⁻¹ de cada fármaco (NAP, DCF, IBU, CBZ)

	I	II	III	IV
Fase exponencial (h)	2 – 8	2 – 8	2 – 8	2 – 8
Equação da reta	$y = 0,2528 x - 3,7722$	$y = 0,1594 x - 3,9584$	$y = 0,2760 x - 3,8824$	$y = 0,1618 x - 4,2137$
R²	0,9772	0,9945	0,9922	0,998
μ_{máx} (h⁻¹)	0,2528	0,1594	0,2760	0,1618
Tempo de geração (h)	2,7422	4,3491	2,5112	4,2829
Número de gerações	2,1881	1,3796	2,3892	1,4009

Ao analisar os parâmetros cinéticos apresentados na tabela 4.8, referentes às curvas obtidas no meio com glucose contendo a mistura dos 4 fármacos (I) e sem fármacos (III) pode-se observar que a curva III apresentou uma taxa de crescimento específica máxima ligeiramente superior à curva I (0,2760 h⁻¹ e 0,2528 h⁻¹, respetivamente), indicando um ligeiro efeito inibidor do crescimento relacionado com a exposição dos microrganismos aos fármacos.

Ao analisar os parâmetros cinéticos das curvas obtidas no meio sem glucose contendo a mistura dos 4 fármacos (II) e sem fármacos (IV) observou-se que a taxa específica de crescimento da curva II (0,1594 h⁻¹) é muito próxima da obtida para a curva IV (0,1618 h⁻¹).

Da análise da figura 4.23 e da tabela 4.8 é possível deduzir que a presença da mistura dos fármacos naproxeno, diclofenaco, carbamazepina e ibuprofeno numa concentração de 2 mg L⁻¹ de cada fármaco, parecer ser de baixa toxicidade para a cultura de *B. subtilis*, uma vez que não foram observadas diferenças apreciáveis nos parâmetros cinéticos de crescimento das culturas expostas a estes compostos, nesta concentração.

A figura 4.24 mostra as curvas de crescimento do *B. subtilis* num meio contendo uma mistura de quatro fármacos (naproxeno, diclofenaco, carbamazepina e ibuprofeno) na concentração de 5 mg L⁻¹ de cada fármaco. Essas curvas foram obtidas tanto na presença (I) quanto na ausência de glucose (II). Adicionalmente são apresentadas as curvas de crescimento dos Erlenmeyers de controlo (na ausência de fármacos), na presença (III) e na ausência de glucose (IV). Na figura está ainda apresentada a curva de crescimento referente ao Erlenmeyer contendo células inativadas (V), num meio de cultura com a mistura dos 4 fármacos e na ausência de glucose.

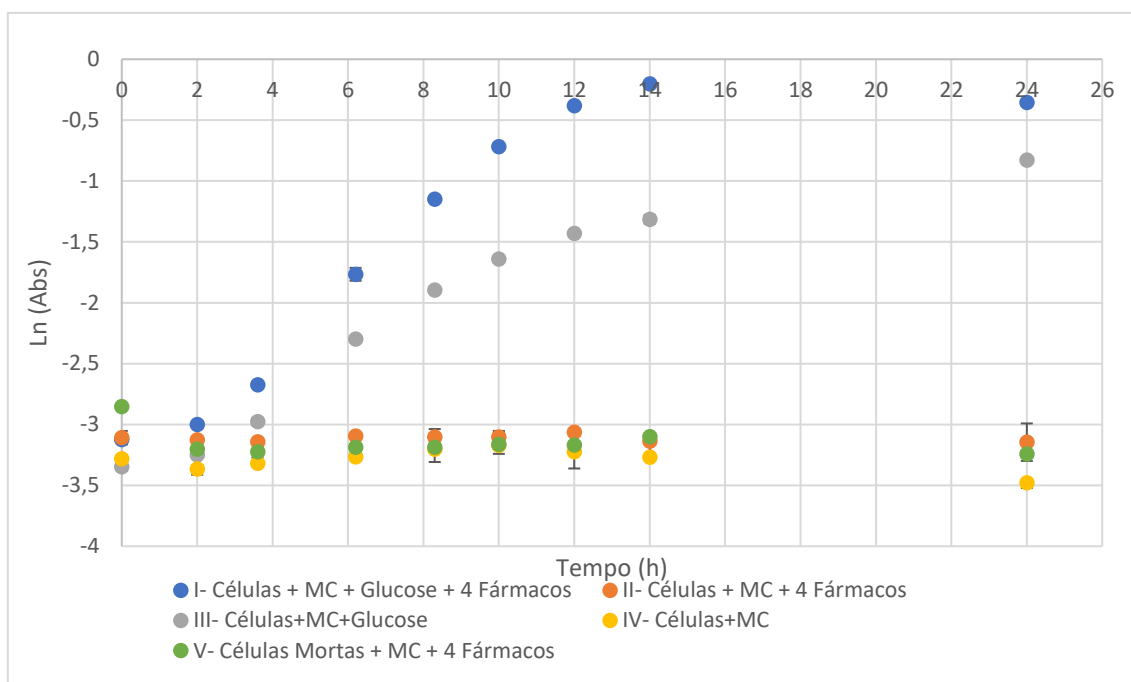


Figura 4.24 Curvas de crescimento do *B. subtilis* obtidas com as soluções de 5 mg L^{-1} de cada fármaco numa mistura de 4 fármacos (NAP, DCF, IBU, CBZ)

Analisando as curvas de crescimento I e III (meio de cultura com glucose, na presença e na ausência da mistura de fármacos, respetivamente), observou-se que a curva I apresenta um crescimento ligeiramente superior à curva III. Ambas as curvas apresentam uma fase log de igual duração (8 h) e durante o mesmo período (2 h a 10 h).

Nas curvas de crescimento II e IV (meio de cultura sem glucose, na presença e na ausência da mistura de fármacos, respetivamente) observou-se um aumento muito pequeno da $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ao longo da duração do estudo, o que indica que o crescimento bacteriano nestas condições foi muito reduzido. Estes resultados contrastam com o que foi observado nos ensaios anteriormente realizados ao longo deste estudo, uma vez que em todos os casos anteriores foi observado crescimento bacteriano em todas as culturas de *B. subtilis* na ausência de glucose, independentemente da presença de fármacos no meio de cultura. Se para o caso do meio contendo os 4 fármacos à concentração de 5 mg L^{-1} esta observação poderia hipoteticamente ser explicada por uma maior toxicidade apresentada por esta mistura, no caso do Erlenmeyer IV, em que o meio não continha os fármacos, este crescimento tão baixo é surpreendente por não estar de acordo com o observado nos meios análogos dos estudos anteriores.

A curva de crescimento V apresentada na figura 4.23, corresponde a uma cultura de células inativadas (exposta a um banho de ultrassom) num meio de cultura contendo uma concentração de 5 mg L^{-1} de cada fármaco, na ausência de glucose. A partir da análise desta curva é possível observar que o crescimento bacteriano foi praticamente nulo. No entanto, dado o comportamento observado nos Erlenmeyers II e IV, fica a dúvida se o baixo crescimento observado em V se deve a uma maior eficácia do processo de inativação neste caso, ou se o Erlenmeyer V terá sido afetado pelas mesmas causas que provocaram os comportamentos anormais observados em II e IV.

Na tabela 4.9 estão apresentados os parâmetros cinéticos referentes às curvas de crescimento apresentadas na figura 4.24.

Tabela 4.9 Parâmetros cinéticos de crescimento do *B. subtilis* na presença e na ausência de glucose, num meio contendo 5 mg L^{-1} de cada fármaco (NAP, DCF, IBU, CBZ)

	I	II	III	IV
Fase exponencial (h)	2 – 8,3	2 – 8,3	2 – 8,3	2 – 10
Equação da reta	$y = 0,3027 x - 3,6682$	$y = 0,0062 x - 3,1479$	$y = 0,2218 x - 3,7196$	$y = 0,0243 x - 3,411$
R²	0,9937	0,5751	0,9947	0,9944
$\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹)	0,3027	0,0062	0,2218	0,0243
Tempo de geração (h)	2,2902	112,4497	3,1245	28,5186
Número de gerações	2,6199	0,0534	1,9203	0,2104

Da análise dos parâmetros cinéticos referentes às curvas representadas na figura 4.24, a curva I (meio com glucose contendo a mistura dos fármacos) apresenta uma taxa específica de crescimento de $0,3027 \text{ h}^{-1}$ bastante superior à taxa específica de crescimento da curva III (meio com glucose sem fármacos) de $0,2218 \text{ h}^{-1}$. Desta comparação parecer poder deduzir-se que não só a presença da mistura dos fármacos naproxeno, diclofenaco, carbamazepina e ibuprofeno na concentração de 5 mg L^{-1} não causa toxicidade à cultura de *B. subtilis* mas, pelo contrário, parece até estimular o crescimento bacteriano.

Da análise das figuras 4.23 e 4.24 e das tabelas 4.8 e 4.9 podemos constatar uma relação um pouco complexa com as concentrações dos fármacos: enquanto na concentração mais baixa no meio com glucose parece ter ocorrido uma ligeira inibição do crescimento no Erlenmeyer contendo a mistura de fármacos quando comparado com o Erlenmeyer de controlo, para a concentração mais elevada, pelo contrário, observou-se no Erlenmeyer análogo uma taxa específica de crescimento mais elevada, sugerindo um aparente estímulo ao crescimento. Para esclarecer melhor o efeito da concentração dos

fármacos quando se tem esta mistura seria importante realizar mais estudos com uma maior variedade de concentrações.

4.5.2 Avaliação da capacidade de degradação/remoção do naproxeno e do diclofenaco pelo *B. subtilis*

Com o objetivo de avaliar a capacidade de degradação/remoção do naproxeno e do diclofenaco pelo *B. subtilis*, assim como de caracterizar a cinética de remoção de cada um dos fármacos, foram conduzidos vários ensaios distintos, conforme descrito na secção 3.4.5 da metodologia experimental, tendo-se procurado avaliar também os efeitos:

- da presença de glucose no meio,
- da concentração dos fármacos,
- da presença de outros fármacos numa mistura,
- da ocorrência de outros processos, abióticos, que também contribuam para a remoção dos fármacos, nomeadamente a fotodegradação.

Na figura 4.25 estão representadas as percentagens de remoção do naproxeno pela cultura de *B. subtilis* ao longo de um período de 48 h, para as soluções contendo naproxeno a uma concentração de 2 e 20 mg L⁻¹ e para as soluções contendo a mistura de naproxeno, diclofenaco, carbamazepina e ibuprofeno às concentrações de 2 e 5 mg L⁻¹ de cada fármaco, na presença e na ausência de glucose no meio.

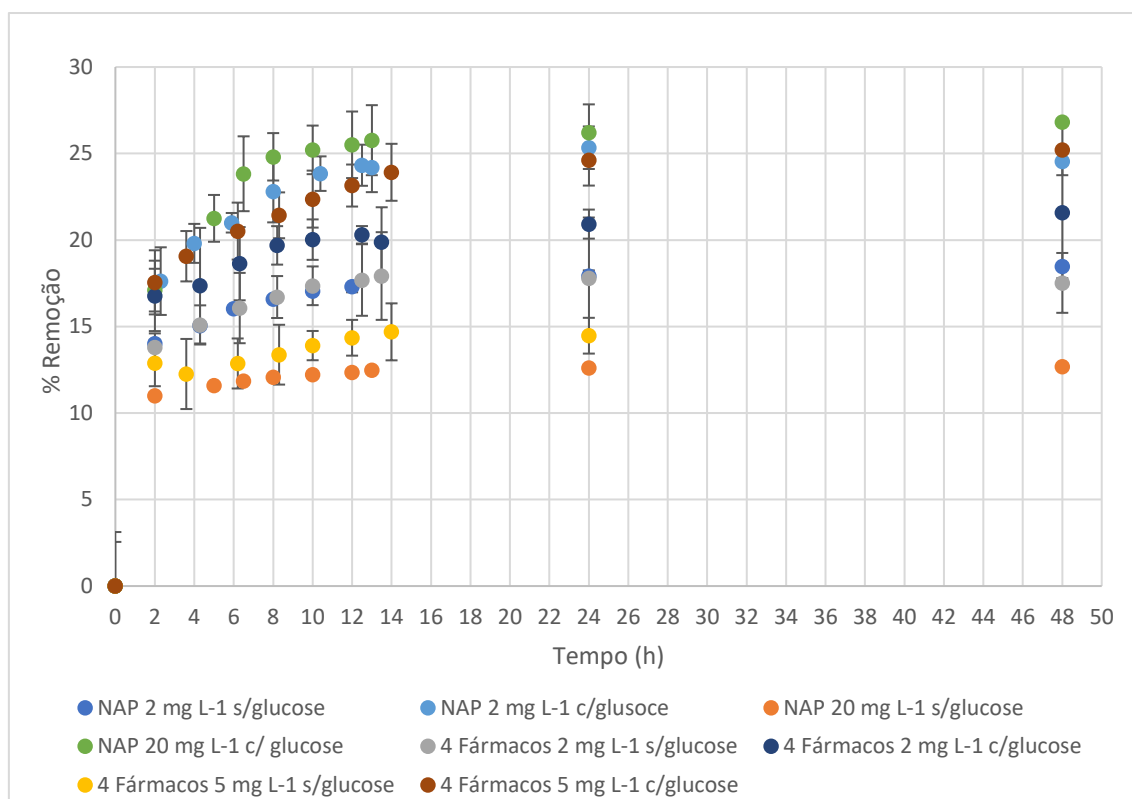


Figura 4.25 Remoções do naproxeno, na ausência e presença de glucose, isoladamente a 2 e 20 mg L⁻¹ e em mistura a 2 e 5 mg L⁻¹

Da observação da figura 4.25 verificou-se que nas culturas de *B. subtilis* contendo glucose foram alcançadas percentagens de remoção para o naproxeno superiores às obtidas na culturas crescidas na ausência de glucose, para ambas as concentrações estudadas. Observou-se também que, nos meios contendo glucose, as culturas expostas às soluções de naproxeno a 2 e 20 mg L⁻¹ apresentaram, em geral, percentagens de remoção do fármaco superiores às culturas expostas às soluções com a mistura de fármacos, cada um a 2 e 5 mg L⁻¹. No entanto, em ambas as situações verificou-se maior remoção do fármaco nas soluções de maior concentração. Assim, os meios de cultura onde ocorreu maior remoção de naproxeno, na presença de glucose, por ordem decrescente de remoção, foram: 20 mg L⁻¹ de naproxeno (~27%), 2 mg L⁻¹ de naproxeno (~25%), 5 mg L⁻¹ de cada fármaco (~25%) e 2 mg L⁻¹ de cada fármaco (~23%).

Nas culturas de *B. subtilis* crescidas na ausência de glucose, verificou-se que naquelas que estiveram expostas às menores concentrações de naproxeno (2 mg L⁻¹ do composto isolado ou 2 mg L⁻¹ na mistura) ocorreram as maiores percentagens de remoção do naproxeno (~18% e ~17%, respetivamente), seguidas pela cultura crescida em meio

contendo a mistura de fármacos a 5 mg L^{-1} de cada fármaco ($\sim 15\%$) e, por fim, pela cultura com meio contendo 20 mg L^{-1} de naproxeno ($\sim 13\%$).

Na figura 4.26 estão representadas as cinéticas de remoção do naproxeno nas várias condições testadas, durante um período de 48 h, comparadas com as curvas de crescimento da bactéria no mesmo período.

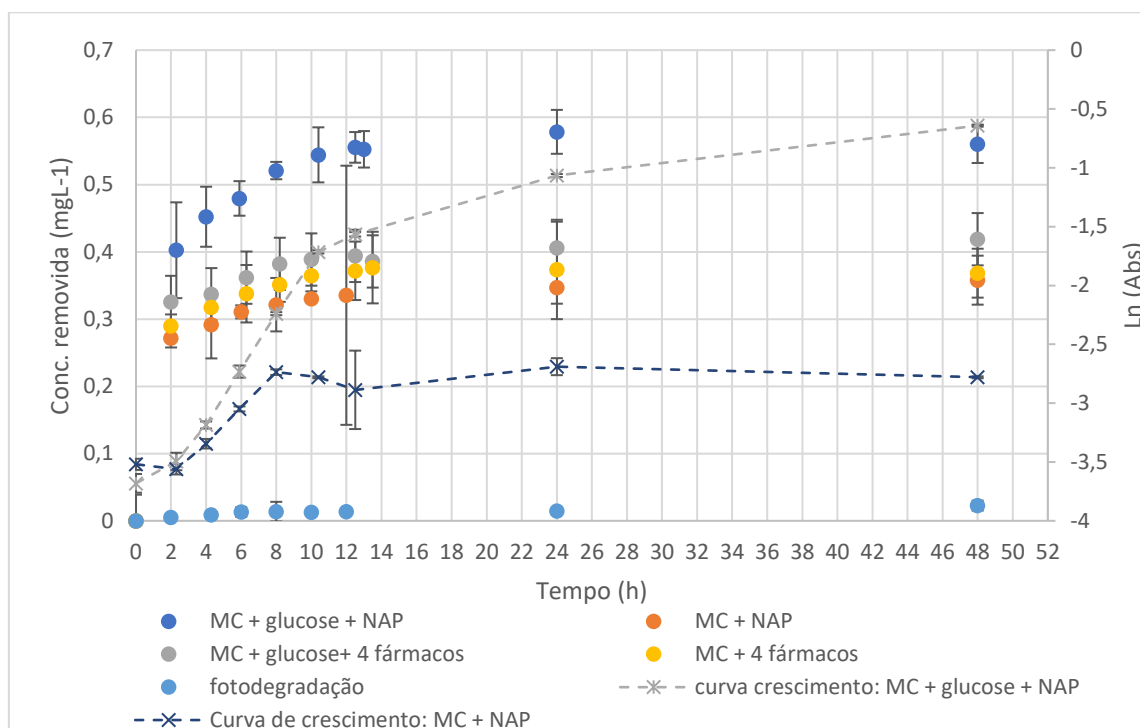


Figura 4.26 Concentração de naproxeno removida ao longo do tempo, nas várias condições testadas para a concentração de 2 mg L^{-1}

Da análise das figuras 4.25 e 4.26 verificou-se que a cinética de remoção do naproxeno apresenta uma fase inicial (0 – 8 h) em que a remoção é mais rápida, seguida de uma fase em que a remoção é mais lenta (8 – 16 h). Após este período, a remoção do naproxeno começa a estabilizar, parecendo estar o equilíbrio atingido, em geral, a partir das 24 h. Verificou-se ainda que a primeira etapa da cinética, onde a remoção é mais rápida conclui-se dentro do período correspondente às fases *lag* e *log* da curva de crescimento do *B. subtilis* (figura 4.26). De facto, mais de metade da quantidade removida do fármaco, em todas as condições estudadas, é removida no primeiro período de 2 h, o que corresponde ainda à fase *lag* do crescimento. Assim, esta elevada remoção inicial não

deverá dever-se à metabolização pelo *B. subtilis*, mas poderá ser devida à adsorção à biomassa do inóculo. Posteriormente, a remoção adicional do naproxeno neste período de cinética mais rápida ocorre já durante o processo de divisão celular e o abrandamento da cinética de remoção do naproxeno observa-se durante o período que corresponde à fase estacionária da curva de crescimento. No entanto, através dos ensaios realizados, não foi possível comprovar quais os principais processos responsáveis pela remoção do naproxeno, nomeadamente a conjectura sobre a ocorrência da sua adsorção à biomassa nem sobre a metabolização do composto pela bactéria. Em especial, a clarificação sobre a ocorrência de adsorção do naproxeno à biomassa foi planeada com um estudo realizado com células inativadas do *B. subtilis*, conforme descrito na secção 3.4.5. No entanto, tal como também já foi referido, o método utilizada para a inativação das células não foi eficaz e, assim, os resultados deste estudo acabaram por ser inconclusivos.

Adicionalmente, observou-se que as culturas na presença de glucose apresentaram cinéticas de remoção mais rápidas e remoções finais superiores, quando comparadas com as culturas na ausência de glucose, o que deverá estar relacionado com o facto das cinéticas de crescimento do *B. subtilis* também serem superiores na presença de glucose no meio, tal como foi discutido na secção 4.5.1.

Adicionalmente, verificou-se que, entre as culturas crescidas na presença de glucose, aquela que continha apenas naproxeno apresentou uma concentração de remoção do fármaco ($\sim 0.6 \text{ mg L}^{-1}$) superior à cultura que continha a mistura dos 4 fármacos ($\sim 0,4 \text{ mg L}^{-1}$). No entanto, nas culturas crescidas na ausência de glucose ocorreu o oposto, sendo que a cultura exposta à mistura dos 4 fármacos apresentou uma concentração de remoção de naproxeno ligeiramente superior à cultura que esteve em contacto apenas com naproxeno.

Foi ainda realizado o estudo de fotodegradação do naproxeno, no qual uma solução aquosa simples de 2 mg L^{-1} de naproxeno foi colocada nas mesmas condições dos restantes ensaios. No final deste estudo foi observado que as concentrações de naproxeno removidas foram muito próximas de zero, indicando que a fotodegradação, nestas condições, não teve uma contribuição significativa para a remoção do naproxeno. No entanto, é necessário referir que em estudos realizados anteriormente, nomeadamente estudo realizados por este grupo, demonstraram que o naproxeno em exposição direta à luz solar sofreu uma extensiva fotodegradação. É de notar ainda que na literatura é reportado que os produtos resultantes da fotodegradação do naproxeno são compostos de

toxicidade mais elevada do que o composto original (Isidori et al., 2005; Tu et al., 2019). A baixa remoção por fotodegradação do naproxeno observada neste estudo deve-se, provavelmente, ao facto de o laboratório no qual o estudo foi realizado ser um ambiente relativamente escuro e com pouca luz natural direta.

Na figura 4.27 estão representadas as percentagens de remoção do diclofenaco na cultura de *B. subtilis*, durante um período de 48 h, para as soluções contendo diclofenaco a uma concentração de 2 e 20 mg L⁻¹ e para as soluções contendo a mistura de naproxeno, diclofenaco, carbamazepina e ibuprofeno a uma concentração de 2 e 5 mg L⁻¹ de cada fármaco, na presença e na ausência de glucose no meio.

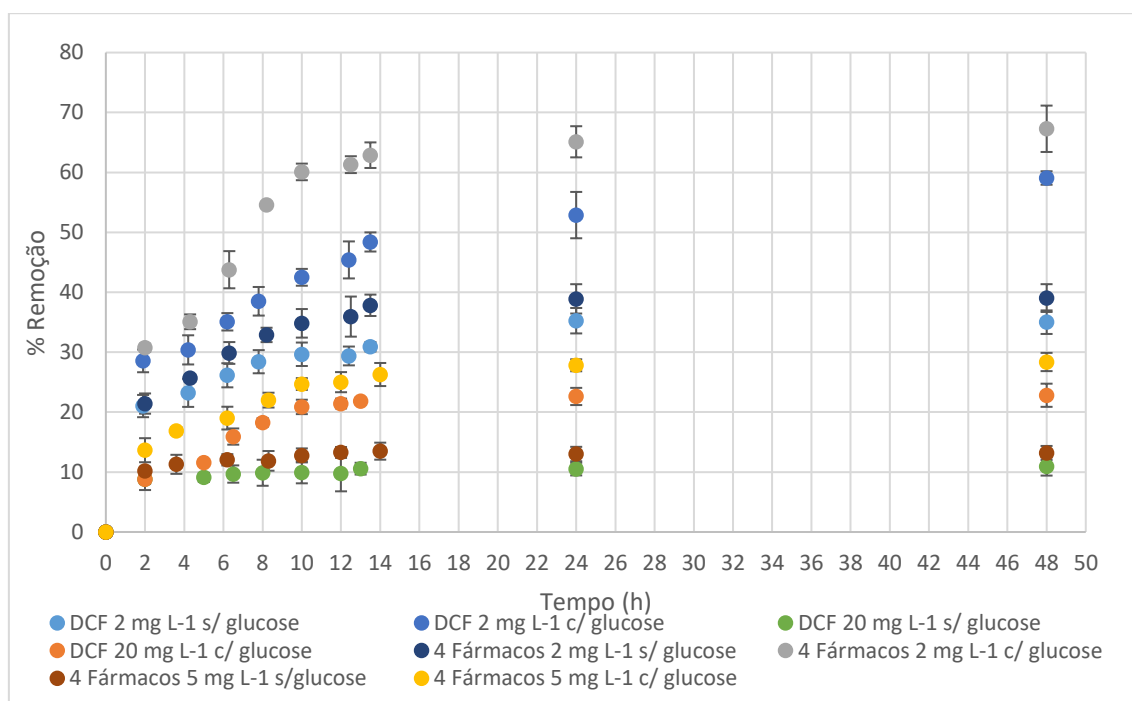


Figura 4.27 Remoções do diclofenaco, na ausência e presença de glucose, isoladamente a 2 e 20 mg L⁻¹ e em mistura a 2 e 5 mg L⁻¹

Da análise da figura 4.27 observou-se que as percentagens de remoção mais elevadas foram obtidas para as culturas expostas às soluções de menores concentrações (2 mg L⁻¹ de cada fármaco e 2 mg L⁻¹ de diclofenaco, na presença e na ausência de glucose), sendo que as culturas expostas às soluções na presença de glucose apresentaram percentagens de remoção de diclofenaco (~68 % e ~60 %, respetivamente) superiores às culturas expostas a soluções na ausência de glucose (~40 % e ~35 %, respetivamente).

Além disso, tanto nas culturas com glucose quanto nas sem glucose, a remoção de diclofenaco foi maior na solução com a mistura dos quatro fármacos em comparação com a solução contendo apenas naproxeno.

Nas culturas expostas a maiores concentrações, observou-se a mesma tendência mencionada anteriormente. i.e., as culturas com glucose mostraram percentuais de remoção de diclofenaco superiores às culturas sem glucose.

Na figura 4.28 estão representadas as cinéticas de remoção do diclofenaco nas várias condições testadas, durante um período de 48 h, comparadas com as curvas de crescimento da bactéria no mesmo período.

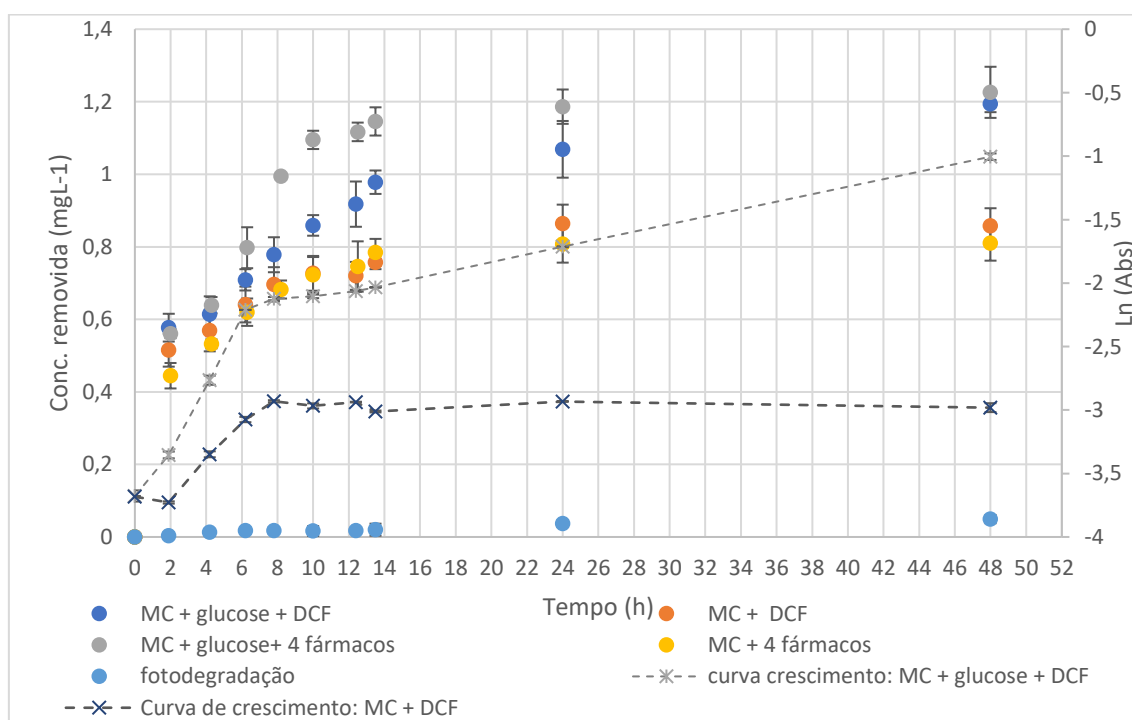


Figura 4.28 Concentração de diclofenaco removida ao longo do tempo, nas várias condições testadas para a concentração de 2 mg L⁻¹

Da análise das figuras 4.27 e 4.28 verificou-se que a cinética de remoção do diclofenaco apresenta uma fase inicial (0 – 10 h) em que a remoção é mais rápida, seguida de uma fase em que a remoção é mais lenta (10 – 24 h). Após este período, a remoção do diclofenaco começa a estabilizar, parecendo estar o equilíbrio atingido, em geral, a partir

das 24 h (com exceção da cultura crescida num meio contendo diclofenaco e glucose, na qual a remoção do fármaco continua a ocorrer até ao final do ensaio).

Tal como no caso do naproxeno, uma grande parte da quantidade removida do fármaco, em todas as condições estudadas, é removida no primeiro período de 2 h, o que corresponde ainda à fase *lag* do crescimento, supondo-se que esta remoção seja devida a adsorção à biomassa do inóculo do *B. subtilis*. Entretanto, após estes instantes iniciais, verificou-se que, de um modo diferente do observado na cinética de remoção do naproxeno, as fases da cinética de remoção do diclofenaco não correspondem exatamente às fases de crescimento do *B. subtilis*, sendo que a primeira fase da cinética de remoção, onde esta ocorre de forma mais rápida, continua após a fase log de crescimento da bactéria terminar, indicando que embora a adsorção à biomassa possa ter contribuído para a remoção do diclofenaco, existirão outros processos que podem também estar envolvidos na sua remoção. Este comportamento é comum em estudos de biorremediação, onde as bactérias podem continuar a remover contaminantes mesmo após o término da fase logarítmica de crescimento, indicando que processos intracelulares ou extracelulares (como a produção de enzimas ou metabolismo secundário) podem estar em ação. A dificuldade em determinar com precisão os mecanismos de remoção envolvidos é frequente, visto que são necessários métodos analíticos mais específicos para identificar todos os processos envolvidos.

Observou-se ainda que as culturas em meio sem glucose e uma concentração de 20 mg L⁻¹ de diclofenaco e 5 mg L⁻¹ de cada fármaco, apresentaram cinéticas de remoção significativamente mais lentas, sendo que a maior parte da remoção ocorre nas primeiras 2 h, provavelmente devido à adsorção à biomassa do inóculo inicial, estabilizando após este período. Estas reduzidas e lentas remoções do diclofenaco nestas culturas, após o período inicial de 2 h, deverá estar relacionado com os baixos valores das taxas específicas de crescimento da bactéria nas mesmas culturas (tabelas 4.7 e 4.9), o que reforça a hipótese de a adsorção à biomassa do inóculo ser uma das contribuições importantes na remoção dos fármacos estudados, especialmente nos períodos iniciais.

Na figura 4.28, observou-se que as culturas na presença de glucose foram aquelas em que se verificou maior concentração de diclofenaco removida. Verificou-se ainda que, embora nas primeiras 24 h, a cultura exposta à solução contendo os 4 fármacos tenha apresentado uma remoção de diclofenaco ligeiramente superior àquela exposta apenas ao diclofenaco, no final do ensaio, ou seja após 48 horas, ambas as soluções atingiram uma

remoção de diclofenaco em torno de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$. No caso das culturas sem glucose, ambas mostraram concentrações de diclofenaco removidas muito semelhantes ao longo de todo o ensaio, removendo aproximadamente $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de diclofenaco ao fim das 48 horas.

Foi ainda realizado o estudo de fotodegradação do diclofenaco, no qual uma solução aquosa simples de 2 mg L^{-1} de diclofenaco foi colocada nas mesmas condições dos restantes ensaios. Os resultados deste estudo demonstraram concentrações de remoção do diclofenaco muito próximas de zero, indicando que a fotodegradação, nestas condições, não contribuiu para a remoção do diclofenaco. No entanto, é necessário referir que estudos realizados anteriormente demonstraram que o diclofenaco é um composto muito fotodegradável quando exposto à luz solar (radiação UV) (Ivino et al., 2017; Zhang et al., 2011). A baixa fotodegradação do diclofenaco obtida neste estudo deve-se, provavelmente, ao facto do laboratório no qual o estudo foi realizado ser um ambiente relativamente escuro e com pouca luz natural.

Da análise das figuras 4.25 e 4.26, referentes ao naproxeno, em comparação com as figuras 4.27 e 4.28 para o diclofenaco, conclui-se que as culturas do *Bacillus subtilis* nas condições estudadas possuem uma maior capacidade de remover o diclofenaco do que o naproxeno.

5 Conclusões e perspectivas futuras

O trabalho aqui apresentado teve como principal objetivo estudar a remoção dos fármacos naproxeno e diclofenaco de soluções aquosas, avaliando, para este fim, o potencial apresentado pela bactéria *Bacillus subtilis* como um possível microrganismo para remover/biodegradar estes compostos e pela cortiça como um possível material adsorvente. A contaminação ambiental dos meios aquáticos com fármacos é hoje em dia um problema que preocupa seriamente a comunidade científica que trabalha na área ambiental bem como a população em geral. Assim, o objetivo último deste trabalho é, com base nos seus resultados, avaliar a possibilidade e a vantagem de incorporar o material e a bactéria estudados em sistemas de tratamento de águas residuais, nomeadamente em Leitos Construídos de Macrófitas (LCMs), os quais já têm sido estudados para a remoção de fármacos pelo grupo de investigação onde este trabalho foi realizado e têm mostrado resultados muito promissores. Neste âmbito, foi também estudada a incorporação da cortiça num tipo de matriz de suporte já estudado anteriormente (LECA + vermiculite) de modo a avaliar se a inclusão deste material introduz melhorias na eficiência já conhecida desta combinação de materiais.

A remoção dos fármacos foi estudada tanto em sistemas mais simples, nomeadamente em soluções dopadas com os fármacos isolados, quanto em sistemas um pouco mais complexos, como seja uma mistura de quatro fármacos diferentes: diclofenaco, naproxeno, carbamazepina e ibuprofeno.

Foram testadas 2 granulometrias de cortiça, uma de 3/5 mm e outra de 0,5/3 mm, de forma a avaliar a eficiência das mesmas para a remoção dos fármacos em estudo. A cortiça de granulometria 0,5/3 mm não só apresentou uma cinética de remoção mais rápida do que a cortiça com granulometria 3/5, como também apresentou percentagens de remoção superiores para ambos os fármacos, atingindo uma remoção de ~ 60 % para o naproxeno e de ~ 65 % para o diclofenaco para um período de contacto de 216 h, enquanto a cortiça de granulometria 3/5 mm apresentou percentagens de remoção de ~ 20 % para o naproxeno e de ~ 40 % para o diclofenaco, ambas em soluções contendo 2,5 mg L⁻¹ do fármaco em estudo para o mesmo tempo de contacto. No entanto, devido às dificuldades práticas associadas ao manuseamento da cortiça de granulometria 0,5/3 mm, optou-se por continuar o estudo com a cortiça de granulometria 3/5 mm.

Após a seleção da granulometria da cortiça a ser utilizada, estudou-se a melhor forma de incorporar este material numa matriz de suporte de LCMs já anteriormente estudada no grupo e a qual tem demonstrado elevada eficiência na remoção de fármacos: uma mistura dos materiais argilosos LECA 2/4 e vermiculite esfoliada 2 (1:1, v:v). Assim, a cortiça e os materiais argilosos foram misturados dispondo-os em três camadas (materiais argilosos: cortiça: materiais argilosos) e testaram-se três possíveis estratificações desta matriz nas seguintes proporções: 1:1:1; 5:3:4 e 5:2:5. Dos estudos das eficiências de remoção dos fármacos por estas matrizes de teste não foram observadas diferenças significativas entre elas. As cinéticas de remoção de todas as estratificações foram caracterizadas por um período inicial de 10 h, em que a remoção foi mais rápida, seguido de um período em que a remoção continuou de forma mais lenta, sendo que as três estratificações obtiveram percentagens de remoção finais de ~ 45 % para o naproxeno e de ~ 37 % para o diclofenaco.

Restringindo a avaliação do potencial para utilização da cortiça em LCMs apenas à eficiência de remoção dos fármacos por adsorção aos materiais, a sua incorporação na matriz de materiais argilosos não parece trazer vantagens assinaláveis aos resultados já obtidos anteriormente apenas com esses materiais (mas também sem qualquer prejuízo). No entanto, embora tal não tenha sido observado com os fármacos testados neste trabalho, noutros estudos a cortiça demonstrou alguma vantagem na remoção de outros fármacos bastante apolares como a carbamazepina. Por outro lado, sendo um material orgânico natural, a utilização da cortiça em matrizes de suporte de LCMs pode ter outras vantagens que vão além da sua capacidade de adsorção de poluentes, nomeadamente como suporte mais adequado para o desenvolvimento dos microrganismos e das plantas. Assim, teria muito interesse no futuro testar a sua utilização em sistemas de microcosmos de LCMs, o que permitiria avaliar uma maior variedade de efeitos benéficos que este material pode ter no funcionamento destes sistemas.

Nos ensaios com a bactéria *Bacillus subtilis*, inicialmente caracterizou-se a curva de crescimento da bactéria para estabelecer os tempos adequados de ensaio e amostragem, bem como os parâmetros cinéticos de crescimento. Subsequentemente, foram realizados estudos para avaliar a toxicidade dos fármacos sobre o *Bacillus subtilis* e a capacidade da bactéria para remover naproxeno e diclofenaco. Esses estudos são cruciais para avaliar a viabilidade da biorremediação e a eficiência do *Bacillus subtilis* na degradação dos contaminantes alvo.

Nos ensaios relativos à avaliação da toxicidade dos fármacos verificou-se o crescimento do *B. subtilis* nos meios contendo os fármacos em estudo, quer na concentração de 2 mg L⁻¹, quer na concentração de 20 mg L⁻¹, assim como o crescimento das culturas nos meios contendo a mistura dos quatro fármacos nas concentrações de 2 mg L⁻¹ e 5 mg L⁻¹ de cada fármaco, não tendo sido observados sinais evidentes de toxicidade. Nos ensaios relativos à determinação da capacidade de remoção dos fármacos observaram-se remoções entre os 15 % e os 27 % para o naproxeno, sendo que a remoção foi superior nas culturas em que o meio continha glucose e com apenas o naproxeno em solução. Para o diclofenaco foram observadas remoções entre os 10 % e os 68%, sendo que a remoção foi superior nas culturas expostas às soluções de concentração 2 mg L⁻¹ de diclofenaco e de 2 mg L⁻¹ de cada fármaco, na presença de glucose.

Neste estudo não foi possível caracterizar os mecanismos através dos quais os fármacos foram removidos. No entanto, devido ao facto de a maior parte da remoção ocorrer rapidamente durante a fase log do crescimento, a remoção por adsorção à biomassa parece ser o principal mecanismo de remoção. Contudo, é também plausível que ocorra alguma remoção por metabolização, principalmente para o diclofenaco, uma vez que a remoção continua após a fase log terminar. Em estudos futuros, seria interessante avaliar a contribuição da adsorção à biomassa na remoção destes fármacos, bem como as vias de metabolização que possam estar envolvidos na remoção dos fármacos.

É importante realçar que este estudo constituiu apenas uma abordagem inicial à utilização da cortiça como um possível material a implementar na matriz dos LCMs, bem como à hipótese de inoculação do *B. subtilis* nesses sistemas como formas de otimizar e aumentar a remoção do naproxeno e do diclofenaco pelos LCMs no tratamento de águas contaminadas com fármacos.

Seria interessante realizar estudos adicionais, com a inoculação do *B. subtilis* na matriz constituída apenas por materiais argilosos e na matriz contendo adicionalmente a cortiça, de forma a avaliar a eficiência destes sistemas. Também seria importante realizar testes num microcosmo de LCM plantado com *Typha* spp., utilizando a matriz contendo cortiça e inoculado com *B. subtilis*, de forma a se perceber se estas implementações seriam benéficas, não só para a otimização da remoção dos fármacos, mas também para a saúde e bem-estar das macrófitas.

Seria igualmente importante realizar estes estudos utilizando microcosmos de LCMs em condições mais próximas das reais no que diz respeito às condições ambientais (temperatura, humidade, etc) bem como no que diz respeito à composição da solução contendo os fármacos, de modo a torná-la mais próxima da composição de uma água residual.

6 Referências bibliográficas

Abbassi, R., & Yadav, A. K. (2020). Introduction to Microbial Fuel Cells: Challenges and Opportunities. In *Integrated Microbial Fuel Cells for Wastewater Treatment* (pp. 3–27). <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-12-817493-7.00001-1>

Abdelhakeem, S. G., Aboulroos, S. A., & Kamel, M. M. (2016). Performance of a vertical subsurface flow constructed wetland under different operational conditions. *Journal of Advanced Research*, 7(5), 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.12.002>

Águas do Vale do Tejo, & EpaL. (2021). *Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) de Évora*.

Aguilar, L., Gallegos, Á., Arias, C. A., Ferrera, I., Sánchez, O., Rubio, R., Saad, M. Ben, Missagia, B., Caro, P., Sahuquillo, S., Pérez, C., & Morató, J. (2019). Microbial nitrate removal efficiency in groundwater polluted from agricultural activities with hybrid cork treatment wetlands. *Science of the Total Environment*, 653, 723–734. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.426>

Awfa, D., Ateia, M., Fujii, M., Johnson, M. S., & Yoshimura, C. (2018). Photodegradation of pharmaceuticals and personal care products in water treatment using carbonaceous-TiO₂ composites: A critical review of recent literature. *Water Research*, 142, 26–45. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.036>

Azevedo, C. (2022, July 22). *O que procurar no Verão: a taboa ou tabúa - Wilder*. <https://www.wilder.pt/diversoes/o-que-procurar-no-verao-a-taboa-ou-tabua/>

Bessadok, S., Kraiem, K., Arous, F., Al Souki, K. S., Tabassi, D., El Toumi, S., & Jaouani, A. (2023). Efficient Wastewater Treatment and Removal of Bisphenol A and Diclofenac in Mesocosm Flow Constructed Wetlands Using Granulated Cork as Emerged Substrate. *Toxics*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/toxics11010081>

Botânico UTAD, J. (n.d.). *Ficha da espécie Typha angustifolia Dados do registo na Flora Digital de Portugal Imagem de capa*. <http://jb.utad.pt/termos.JardimBotânicoUTAD>:<http://jb.utad.pt>JBnoFacebook:<http://facebook.com/utadjb>

- Branco, A., & Lopes, J. C. (2018). Clúster y desempeño de las empresas: evidencia historica de la industria Portuguesa del corcho. *Investigaciones de Historia Economica*, 14(1), 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.ihe.2016.05.002>
- Carlson, M., & Thompson, R. D. (2000). Analyte loss due to membrane filter adsorption as determined by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 38(2), 77–83. <https://doi.org/10.1093/chromsci/38.2.77>
- Carrajola, J. (2021). *Papel da matriz composta por materiais argilosos e carvão ativado na remoção de fármacos em LCM*. Dissertação de Mestrado em Bioquímica apresentada na Universidade de Évora.
- Castellari, C., & Ottani, S. (1997). Two monoclinic forms of diclofenac acid. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 53(6), 794–797. <https://doi.org/10.1107/S0108270197002126>
- Davis, L. (1995). *A HANDBOOK OF CONSTRUCTED WETLANDS: General considerations* (Vol. 1).
- Dey, S., Bano, F., & Malik, A. (2019a). Pharmaceuticals and personal care product (PPCP) contamination-a global discharge inventory. In *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology Emerging Contaminants and Micro Pollutants* (pp. 1–26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816189-0.00001-9>
- Dey, S., Bano, F., & Malik, A. (2019b). Pharmaceuticals and personal care product (PPCP) contamination-a global discharge inventory. In *Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology Emerging Contaminants and Micro Pollutants* (pp. 1–26). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816189-0.00001-9>
- Dires, S., Birhanu, T., & Ambelu, A. (2019). Use of broken brick to enhance the removal of nutrients in subsurface flow constructed wetlands receiving hospital wastewater. *Water Science and Technology*, 79(1), 156–164. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.037>

Dordio, A., & Carvalho, A. J. P. (2018). Removal Processes of Pharmaceuticals in Constructed Wetlands. *Constructed Wetlands for Industrial Wastewater Treatment*, 343–403. <https://doi.org/10.1002/9781119268376.ch17>

Dordio, A., Carvalho, A. J. P., Hijosa-Valsero, M., & Becares, E. (2018). The role of macrophytes in the removal of organic micropollutants by constructed wetlands. In M. del Carmen Durán-Domínguez-de-Bazúa, A. E. Navarro-Frómata, & J. M. Bayona (Eds.), *Artificial or constructed wetlands: a suitable technology for sustainable water management* (pp. 286–325). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315184265-16>

Dordio, A., Carvalho, A. J. P., Teixeira, D. M., Dias, C. B., & Pinto, A. P. (2010). Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using *Typha* spp. and LECA. *Bioresource Technology*, 101(3), 886–892. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.001>

Dordio, A., Miranda, S., Ramalho, J. P. P., & Carvalho, A. J. P. (2017). Mechanisms of removal of three widespread pharmaceuticals by two clay materials. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 575–583. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.091>

Dordio, A. V., Belo, M., Martins Teixeira, D., Palace Carvalho, A. J., Dias, C. M. B., Picó, Y., & Pinto, A. P. (2011). Evaluation of carbamazepine uptake and metabolization by *Typha* spp., a plant with potential use in phytotreatment. *Bioresource Technology*, 102(17), 7827–7834. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.050>

Dordio, A. V., & Carvalho, A. J. P. (2013). Organic xenobiotics removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of the support matrix. *Journal of Hazardous Materials*, 252–253, 272–292. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.008>

Dordio, A. V., Carvalho, A. J. P., & Pinto, A. P. (2021). Assessment of Pharmaceuticals in Water Systems: Sustainable Phytoremediation Strategies. In R. Prasad (Ed.), *Phytoremediation for Environmental Sustainability* (pp. 273–324). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5621-7_11

Dordio, A. V., Duarte, C., Barreiros, M., Carvalho, A. J. P., Pinto, A. P., & Teixeira, C. (2009). Bioresource Technology Toxicity and removal efficiency of pharmaceutical metabolite clofibric acid by *Typha* spp. – Potential use for phytoremediation *Bioresource Technology*, 100(3), 1156–1161. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.034>

Ellis, J. B. (2006). Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environmental Pollution*, 144(1), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.018>

Errington, J., & van der Aa, L. T. (2020). Microbe profile: *Bacillus subtilis*: Model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology (United Kingdom)*, 166(5), 425–427. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000922>

Fernandes, M. J., Paíga, P., Silva, A., Llaguno, C. P., Carvalho, M., Vázquez, F. M., & Delerue-Matos, C. (2020). Antibiotics and antidepressants occurrence in surface waters and sediments collected in the north of Portugal. *Chemosphere*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124729>

Gan, T. J. (2010). Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion*, 26(7), 1715–1731. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301>

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

Greń, I., Wojcieszynska, D., Guzik, U., Perkosz, M., & Hupert-Kocurek, K. (2010). Enhanced biotransformation of mononitrophenols by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 in the presence of aromatic compounds of plant origin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 289–295. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0172-6>

Guzik, U. (2020). Naproxen in the environment: its occurrence, toxicity to nontarget organisms and biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1849–1857. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10343-x>

ICH. (1994). VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1) Current. *The Textbook of Pharmaceutical Medicine*, 447–460. <https://doi.org/10.1002/9781118532331.ch23>

INDICE. (2023). *Diclofenac - Informação Geral*. <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/diclofenac/informacao-geral>

- Iovino, P., Chianese, S., Canzano, S., Prisciandaro, M., & Musmarra, D. (2017). Photodegradation of diclofenac in wastewaters. *Desalination and Water Treatment*, 61, 293–297. <https://doi.org/10.5004/dwt.2016.11063>
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtera, L., & Rubino, M. (2005). Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of the Total Environment*, 348, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.068>
- Kaiser, G. (2024). Bacterial Growth. In *Microbiology* (pp. 17.1.1-17.1.3). <https://LibreTexts.org>
- Kanakaraju, D., Glass, B. D., & Oelgemöller, M. (2018a). Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review. *Journal of Environmental Management*, 219, 189–207. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.103>
- Kanakaraju, D., Glass, B. D., & Oelgemöller, M. (2018b). Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review. *Journal of Environmental Management*, 219, 189–207. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.103>
- Kataki, S., Chatterjee, S., Vairale, M. G., Dwivedi, S. K., & Gupta, D. K. (2021). Constructed wetland, an eco-technology for wastewater treatment: A review on types of wastewater treated and components of the technology (macrophyte, biofilm and substrate). *Journal of Environmental Management*, 283. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.111986>
- Khan, H. K., Rehman, M. Y. A., & Malik, R. N. (2020). Fate and toxicity of pharmaceuticals in water environment: An insight on their occurrence in South Asia. *Journal of Environmental Management*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111030>
- King, M. D., Buchanan, W. D., & Korter, T. M. (2011). Application of London-type dispersion corrections to the solid-state density functional theory simulation of the terahertz spectra of crystalline pharmaceuticals. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(10), 4250–4259. <https://doi.org/10.1039/c0cp01595d>
- Kovárová, K., Kova'rova, K., Kova'rova'-Kovar, K., & Egli, T. (1998). Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-

Substrate Kinetics. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 62(3), 646–666. <https://journals.asm.org/journal/mmbr>

Lei, Y., Langenhoff, A., Bruning, H., & Rijnaarts, H. (2021). Sorption of micropollutants on selected constructed wetland support matrices. *Chemosphere*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130050>

Li, C. J., Wan, M. H., Dong, Y., Men, Z. Y., Lin, Y., Wu, D. Y., & Kong, H. N. (2011). Treating surface water with low nutrients concentration by mixed substrates constructed wetlands. *Https://Doi.Org/10.1080/10934529.2011.571632*, 46(7), 771–776. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.571632>

Li, X., Hua, Z., Wu, J., & Gu, L. (2021). Removal of Perfluoroalkyl Acids (PFAAs) in Constructed Wetlands: Considerable Contributions of Submerged Macrophytes and the Microbial Community. *Water Research*, 0. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117080>

Li, Y., Sallach, J. B., Zhang, W., Boyd, S. A., & Li, H. (2019). Insight into the distribution of pharmaceuticals in soil-water-plant systems. *Water Research*, 152, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.039>

Machado, A. I., Dordio, A., Fragoso, R., Leitão, A. E., & Duarte, E. (2017). Furosemide removal in constructed wetlands: Comparative efficiency of LECA and Cork granulates as support matrix. *Journal of Environmental Management*, 203, 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.08.002>

Machado, A. I., Fragoso, R., Vitória, A., Neves, M., Dordio, B., & Duarte, E. (2019). Furosemide in water matrix : HPLC-UV method development and degradation studies Furosemida em matriz de água : desenvolvimento de um método HPLC-UV e estudos de degradação. *Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>

Madikizela, L. M., & Chimuka, L. (2017). Occurrence of naproxen , ibuprofen , and diclofenac residues in wastewater and river water of KwaZulu-Natal Province in South Africa. *Environ Monit Assess*. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6069-1>

Madikizela, L. M., Tavengwa, N. T., & Chimuka, L. (2017). Status of pharmaceuticals in African water bodies: Occurrence, removal and analytical methods. *Journal of*

Environmental Management, 193, 211–220.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.022>

Mageshwaran, V., Fiii, I., & Holmes, L. D. (2014). Growth kinetics of *Bacillus subtilis* in lignocellulosic carbon sources. *International Journal of Microbiology Research*, 6(2), 570–574. <http://www.bioinfopublication.org/jouarchive.php?opt=&jouid=BPJ0000234>

Mallek, M., Chtourou, M., Portillo, M., Monclús, H., Walha, K., Salah, A. ben, & Salvadó, V. (2018). Granulated cork as biosorbent for the removal of phenol derivatives and emerging contaminants. *Journal of Environmental Management*, 223, 576–585. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.06.069>

Manthiram Karthik, R., & Philip, L. (2021). Sorption of pharmaceutical compounds and nutrients by various porous low cost adsorbents. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104916>

Marchlewicz, A., Domaradzka, D., Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2016a). *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a Gram-Positive Bacteria Able to Degrade Naproxen and Ibuprofen. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(6). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2893-0>

Marchlewicz, A., Domaradzka, D., Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2016b). *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) is a Gram-Positive Bacteria Able to Degrade Naproxen and Ibuprofen. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(6). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2893-0>

Martinez, R. M. (2013). *Bacillus subtilis*. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (pp. 246–248). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00125-X>

Mateus, D. M. R., & Pinho, H. J. O. (2020a). Evaluation of solid waste stratified mixtures as constructed wetland fillers under different operation modes. *Journal of Cleaner Production*, 253. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.119986>

Mateus, D. M. R., & Pinho, H. J. O. (2020b). Evaluation of solid waste stratified mixtures as constructed wetland fillers under different operation modes. *Journal of Cleaner Production*, 253. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.119986>

Maycock, D. S., & Watts, C. D. (2011). Pharmaceuticals in Drinking Water. *Encyclopedia of Environmental Health*, 472–484. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00457-8>

Mestre, A. S., Pires, R. A., Aroso, I., Fernandes, E. M., Pinto, M. L., Reis, R. L., Andrade, M. A., Pires, J., Silva, S. P., & Carvalho, A. P. (2014). Activated carbons prepared from industrial pre-treated cork: Sustainable adsorbents for pharmaceutical compounds removal. *Chemical Engineering Journal*, 253, 408–417. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.051>

Mirzaei, A., Chen, Z., Haghighat, F., & Yerushalmi, L. (2017). Removal of pharmaceuticals from water by homo/heterogenous Fenton-type processes – A review. *Chemosphere*, 174, 665–688. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.019>

Mohammed Taha, H., Aalizadeh, R., Alygizakis, N., Antignac, J. P., Arp, H. P. H., Bade, R., Baker, N., Belova, L., Bijlsma, L., Bolton, E. E., Brack, W., Celma, A., Chen, W. L., Cheng, T., Chirsir, P., Čirka, L., D'Agostino, L. A., Djoumbou Feunang, Y., Dulio, V., ... Schymanski, E. L. (2022). The NORMAN Suspect List Exchange (NORMAN-SLE): facilitating European and worldwide collaboration on suspect screening in high resolution mass spectrometry. *Environmental Sciences Europe* 2022 34:1, 34(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/S12302-022-00680-6>

Mohsin, M. Z., Omer, R., Huang, J., Mohsin, A., Guo, M., Qian, J., & Zhuang, Y. (2021). Advances in engineered *Bacillus subtilis* biofilms and spores, and their applications in bioremediation, biocatalysis, and biomaterials. In *Synthetic and Systems Biotechnology* (Vol. 6, Issue 3, pp. 180–191). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.07.002>

Nicolau, P. B. (2014). *MICROORGANISMOS E CRESCIMENTO MICROBIANO*.

Nocetti, E., Maine, M. A., Hadad, H. R., Mufarrege, M. de las M., Di Luca, G. A., & Sánchez, G. C. (2020). Selection of macrophytes and substrates to be used in horizontal subsurface flow wetlands for the treatment of a cheese factory wastewater. *Science of the Total Environment*, 745, 141100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141100>

NORMAN. (2014). *NORMAN List of Emerging Substances*. <https://www.norman-network.net/?q=node/81#sub23>

NSH. (2021). *Diclofenac*. <https://www.nhs.uk/medicines/diclofenac/>

Oliveira, M., Frihling, B. E. F., Velasques, J., Filho, F. J. C. M., Cavalheri, P. S., & Migliolo, L. (2020). Pharmaceuticals residues and xenobiotics contaminants: Occurrence, analytical techniques and sustainable alternatives for wastewater treatment. In *Science of the Total Environment* (Vol. 705). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135568>

Omondi, D. O., & Navalía, A. C. (2020). Constructed Wetlands in Wastewater Treatment and Challenges of Emerging Resistant Genes Filtration and Reloading. In *Inland Waters - Dynamics and Ecology*. <https://doi.org/DOI:10.5772/intechopen.93293>

Paíga, P., Correia, M., Fernandes, M. J., Silva, A., Carvalho, M., Vieira, J., Jorge, S., Silva, J. G., Freire, C., & Delerue-Matos, C. (2019). Assessment of 83 pharmaceuticals in WWTP influent and effluent samples by UHPLC-MS/MS: Hourly variation. *Science of the Total Environment*, 648, 582–600. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.129>

Palma, P., Fialho, S., Lima, A., Novais, M. H., Costa, M. J., Montemurro, N., Pérez, S., & de Alda, M. L. (2020a). Pharmaceuticals in a Mediterranean Basin: The influence of temporal and hydrological patterns in environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 709. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136205>

Palma, P., Fialho, S., Lima, A., Novais, M. H., Costa, M. J., Montemurro, N., Pérez, S., & de Alda, M. L. (2020b). Pharmaceuticals in a Mediterranean Basin: The influence of temporal and hydrological patterns in environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 709. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136205>

Papagiannaki, D., Belay, M. H., Gonçalves, N. P. F., Robotti, E., Bianco-Prevot, A., Binetti, R., & Calza, P. (2022a). From monitoring to treatment, how to improve water quality: The pharmaceuticals case. In *Chemical Engineering Journal Advances* (Vol. 10). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.100245>

Papagiannaki, D., Belay, M. H., Gonçalves, N. P. F., Robotti, E., Bianco-Prevot, A., Binetti, R., & Calza, P. (2022b). From monitoring to treatment, how to improve water quality: The pharmaceuticals case. *Chemical Engineering Journal Advances*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.100245>

Piggot, P. J. (2009). *Bacillus Subtilis*. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (Third Edition, pp. 45–56). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00036-5>

Pillai, S. A., Chobisa, D., Urimi, D., & Ravindra, N. (2016). Filters and Filtration : A Review of Mechanisms That Impact Cost , Product Quality and Patient Safety. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(5), 271–278.

Quesada, H. B., Baptista, A. T. A., Cusioli, L. F., Seibert, D., de Oliveira Bezerra, C., & Bergamasco, R. (2019). Surface water pollution by pharmaceuticals and an alternative of removal by low-cost adsorbents: A review. *Chemosphere*, 222, 766–780. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.009>

Reis-Santos, P., Pais, M., Duarte, B., Caçador, I., Freitas, A., Vila Pouca, A. S., Barbosa, J., Leston, S., Rosa, J., Ramos, F., Cabral, H. N., Gillanders, B. M., & Fonseca, V. F. (2018). Screening of human and veterinary pharmaceuticals in estuarine waters: A baseline assessment for the Tejo estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 1079–1084. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.08.036>

Reza, R. A., & Ahmaruzzaman, M. (2016). Removal of naproxen from aqueous environment using porous sugarcane bagasse : impact of ionic strength , hardness and surfactant. *Research on Chemical Intermediates*, 42(2), 1451–1473. <https://doi.org/10.1007/s11164-015-2097-z>

Sahoo, K. K., Arakha, M., Sarkar, P., Robin, D. P., & Jha, S. (2016). Enhancement of properties of recycled coarse aggregate concrete using bacteria. *International Journal of Smart and Nano Materials*, 7(1), 22–38. <https://doi.org/10.1080/19475411.2016.1152322>

Scholz, M. (2016). *Wetlands for Water Pollution Control Second Edition* (2nd ed.). <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-444-63607-2.00001-0>

Schröder, P., Helmreich, B., Škrbić, B., Carballa, M., Papa, M., Pastore, C., Emre, Z., Oehmen, A., Langenhoff, A., Molinos, M., Dvarioniene, J., Huber, C., Tsagarakis, K. P., Martinez-Lopez, E., Pagano, S. M., Vogelsang, C., & Mascolo, G. (2016). Status of hormones and painkillers in wastewater effluents across several European states—considerations for the EU watch list concerning estradiols and diclofenac. *Environmental*

Science and Pollution Research, 23(13), 12835–12866. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6503-x>

Sharma, H. B., Panigrahi, S., Sarmah, A. K., & Dubey, B. K. (2019). Journal of *Science of the Total Environment*, 135907. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117105>

Silva, S., Rodrigues, J. A., Coelho, M. R., Martins, A., Cardoso, E., Cardoso, V. V., Benoliel, M. J., & Almeida, C. M. M. (2021). Occurrence of pharmaceutical active compounds in sewage sludge from two urban wastewater treatment plants and their potential behaviour in agricultural soils. *Environmental Science: Water Research and Technology*, 7(5), 969–982. <https://doi.org/10.1039/d1ew00132a>

Soares, C., Correia-Sá, L., Paíga, P., Barbosa, C., Remor, P., Freitas, O. M., Moreira, M. M., Nouws, H. P. A., Correia, M., Ghanbari, A., Rodrigues, A. J., Oliveira, C. M., Figueiredo, S. A., & Delerue-Matos, C. (2022). Removal of diclofenac and sulfamethoxazole from aqueous solutions and wastewaters using a three-dimensional electrochemical process. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(5). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108419>

Sousa, J. C. G., Barbosa, M. O., Ribeiro, A. R. L., Ratola, N., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2020). Distribution of micropollutants in estuarine and sea water along the Portuguese coast. *Marine Pollution Bulletin*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111120>

Steinberg, D., Gockel, J., Wagner, N., & Ostmann, K. (2016). *How to Bacillus subtilis*.

Stojanović, S. S., Karabegović, I., Beškoski, V., Nikolić, N., & Lazić, M. (2020). BACILLUS SUBTILIS NCIM2063 BATCH CULTIVATION: THE INFLUENCE OF THE SUBSTRATE CONCENTRATION AND OXYGEN TRANSFER RATE ON THE BIOMASS YIELD. *Advanced Technologies*, 44–49.

Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>

- Tu, N., Liu, Y., Li, R., Lv, W., Liu, G., & Ma, D. (2019). Experimental and theoretical investigation on photodegradation mechanisms of naproxen and its photoproducts. *Chemosphere*, 227, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.055>
- Varma, M., Gupta, A. K., Ghosal, P. S., & Majumder, A. (2021). A review on performance of constructed wetlands in tropical and cold climate: Insights of mechanism, role of influencing factors, and system modification in low temperature. *Science of the Total Environment*, 755. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142540>
- Vymazal, J., Zhao, Y., & Mander, Ü. (2021). Recent research challenges in constructed wetlands for wastewater treatment: A review. *Ecological Engineering*, 169. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2021.106318>
- Wang, J., Wang, W., Xiong, J., Li, L., Zhao, B., Sohail, I., & He, Z. (2021). A constructed wetland system with aquatic macrophytes for cleaning contaminated runoff/storm water from urban area in Florida. *Journal of Environmental Management*, 280(December 2020), 111794. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111794>
- Wang, M., Zhang, D. Q., Dong, J. W., & Tan, S. K. (2017). Constructed wetlands for wastewater treatment in cold climate — A review. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 57, 293–311. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.12.019>
- Weinstock, G. M. (2001). BAC (Bacterial Artificial Chromosome). In *Encyclopedia of Genetics* (p. 135). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0098>
- Wróbel, M., Śliwakowski, W., Kowalczyk, P., Kramkowski, K., & Dobrzyński, J. (2023). Bioremediation of Heavy Metals by the Genus *Bacillus*. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 20, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph20064964>
- Zhang, N., Liu, G., Liu, H., Wang, Y., He, Z., & Wang, G. (2011). Diclofenac photodegradation under simulated sunlight: Effect of different forms of nitrogen and Kinetics. *Journal of Hazardous Materials*, 192(1), 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.05.038>

