



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária

Mestrado em Engenharia do Ambiente

**Estudo da capacidade de remoção de cafeína em zonas
húmidas artificiais com escoamento subsuperficial vertical**

Larissa Karolliny Arantes de Freitas Fernandes

BEJA, PORTUGAL

2023

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA

Escola Superior Agrária

Mestrado em Engenharia do Ambiente

**Estudo da capacidade de remoção de cafeína em zonas
húmidas artificiais com escoamento subsuperficial vertical**

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente pela
Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja**

Elaborado por:

Larissa Karolliny Arantes de Freitas Fernandes

Orientado por:

Professora Doutora Maria Adelaide Araújo Almeida

Professora Doutora Flávia Matias Oliveira da Silva

BEJA - PORTUGAL

2023

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela proteção e pelas oportunidades que me concedeu ao longo da vida.

Aos meus amados pais por acreditarem nos meus sonhos, pelo apoio, ajuda, compreensão, encorajamento, confiança e amor que me transmitiram durante este tempo.

À minha irmã Karem pelo apoio incondicional, companheirismo, amizade e por todas as palavras de incentivo.

Gostaria de também agradecer às minhas orientadoras, a Doutora Maria Adelaide Araújo Almeida e a Doutora Flávia Matias Oliveira da Silva, pela paciência demonstrada, pelo apoio, orientação e amizade ao longo de todo o trabalho.

Aos restantes familiares e amigos um enorme obrigado por toda a força, incentivo, confiança e ajuda prestados durante esta jornada.

Obrigada!!!

Resumo

O presente estudo utilizou três leitos, com escoamento em modo subsuperficial vertical contínuo, plantados com *Vetiveria zizanioides* enraizadas em agregados leves de argila expandida Leca® (NR10/20), para avaliar a possibilidade de remoção de cafeína em águas residuais. Os leitos foram alimentados com meio mineral, nutrientes e cafeína de concentrações crescente. As concentrações de cafeína foram 0,5; 1,0; 1,5 (leito 1) 2,0; 2,5 e 3,0 (leito 2) $mg \cdot L^{-1}$. O leito 3, foi utilizado como branco. A carga hidráulica aplicada aos leitos foi mantida constante e de $203 \pm 10 L \cdot m^{-2} \cdot dia^{-1}$. A eficiência de remoção de cafeína nos leitos, foi determinada por cromatografia líquido de alta pressão (HPLC). Os resultados obtidos mostram eficiências médias de remoção de cafeína acima $70 \pm 1\%$ e $93 \pm 1\%$, para os leitos 1 e 2 respectivamente. A caracterização da planta foi realizada para determinar os teores de magnésio, clorofila a, clorofila b e total. Os resultados obtidos mostram que a presença da cafeína no efluente não interferiu com o teor em magnésionas folhas da *Vetiveria zizanioides*. Através dos resultados clorofila a, clorofila b e total, podemos concluir que em nenhum dos leitos se notaram efeitos de senescência das plantas. O estudo demonstrou que a fitorremediação pode ser utilizada como uma tecnologia de baixo custo e aplicável ao tratamento de águas residuais contaminadas com elevados teores de cafeína.

Palavras-chave: Cafeína, zonas húmidas artificiais, fitorremediação, compostos emergentes, *Vetiveria zizanioides*.

Abstract

This study used three beds, with continuous vertical subsurface flow, planted with *Vetiveria zizanioides* rooted in light aggregates of Leca® expanded clay (NR10/20), to evaluate the possibility of removing caffeine from wastewater. The beds were fed with mineral medium, nutrients and caffeine of increasing concentrations. The caffeine concentrations were 0.5; 1.0; 1.5 (bed 1) 2.0; 2.5 and 3.0 (bed 2) mg-L⁻¹. Bed 3 was used as a blank. The hydraulic load applied to the beds was kept constant at 203 ± 10 L. m⁻². day⁻¹. The caffeine removal efficiency of the beds was determined by high-pressure liquid chromatography (HPLC). The results obtained show average caffeine removal efficiencies of over 70 ± 1% and 93 ± 1%, for beds 1 and 2 respectively. Plant characterization was carried out to determine magnesium, chlorophyll a, chlorophyll b and total contents. The results show that the presence of caffeine in the effluent did not interfere with the magnesium content in the leaves of *Vetiveria zizanioides*. Through the chlorophyll a, chlorophyll b and total results, we can conclude that in none of the beds were there any effects of plant senescence. The study showed that phytoremediation can be used as a low-cost and applicable technology for treating wastewater contaminated with high levels of caffeine.

Keywords: Caffeine, Artificial wetlands, Phytoremediation, Emerging compounds, *Vetiveria zizanioides*.

Sumário

Agradecimentos	III
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice de Tabelas.....	x
Abreviação e Siglas	xi
1. Introdução.....	12
1.1 Objetivo	13
2. Fundamentação Teórica.....	14
2.1. Fármacos no ambiente	15
2.1.1. Cafeína.....	16
2.2 Zonas Húmidas Artificiais (ZHA).....	19
2.2.1. Classificação das ZHAs.....	20
2.2.2. Componentes das ZHAs	22
2.2.2.1. Matriz de suporte	22
2.2.2.2. Vegetação	23
2.2.2.3. Nutrientes	25
2.2.2.4. Microrganismos	25
2.3. Processos de remoção da cafeína	26
2.4. Estudo aplicado ao tema de remoção de cafeína por ZHA.....	28
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1. Instalação piloto	31
3.2. Ensaio experimental	31
3.3. Monitorização geral do sistema.....	32
3.4 Monitorização e amostragem	33
3.5 Análise e tratamento de dados.....	35
4. Resultados e Discussão	36
4.1 Caraterização e composição da biomassa foliar.....	36
4.1.2. Teor de clorofilas a, b e total.....	37

4.2. Caracterização físico-química das amostras de efluente e afluente dos leitos	39
4.2.1. pH.....	40
4.2.2. Condutividade elétrica.....	41
4.2.3. Oxigênio dissolvido	43
4.2.4. Potencial redox.....	44
4.3. Cafeína	46
5. Conclusão	48
6. Referência Bibliográficas	49

Índice de Figuras

FIGURA 1: ESTRUTURA QUÍMICA DA CAFEÍNA.....	17
FIGURA 2 : ZHA PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS: A) COM FLUXO SUPERFICIAL, B) COM FLUXO SUB SUPERFICIAL HORIZONTAL, C) COM FLUXO SUB SUPERFICIAL VERTICAL....	21
FIGURA 3 : MECANISMOS DE REMOÇÃO DE CONTAMINANTES DAS PLANTAS (OVERTON ET AL., 2023).....	23
FIGURA 4 : <i>VETIVERIA ZIZANIOIDES</i>	24
FIGURA 5 : : <i>ESQUEMA DA INSTALAÇÃO PILOTO, COM O EFLUENTE DE ENTRADA E SAÍDA (LEITOS 1 E 2 ALIMENTADOS COM CAFEÍNA E O 3 COMO BRANCO)</i>	31
FIGURA 6 : EQUIPAMENTO PARA EXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA	35
FIGURA 7 : PROCESSO ILUSTRATIVO DA AMOSTRA DO EFLUENTE TRATADA NO SPE E ANALISADA NO HPLC/MS	35
FIGURA 8 : CONCENTRAÇÃO DE MAGNÉSIO NA PLANTA NOS LEITOS 1, 2 E 3	37
FIGURA 9 : CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA A NA PLANTA NOS LEITOS 1, 2 E 3.....	38
FIGURA 8: CONCENTRAÇÃO CLOROFILA B NA PLANTA NOS LEITOS 1, 2 E 3	38
FIGURA 11: CONCENTRAÇÃO TOTAL DA CLOROFILA NA PLANTA NOS LEITOS 1, 2 E 3	39
FIGURA 12: VALORES DE PH DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA O SAÍDA (S) DO RESPECTIVO LEITOS LEITO 1 (CAFEÍNA)	40
FIGURA 13: VALORES DE PH DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA O SAÍDA (S) DO RESPECTIVO LEITO 2 (CAFEÍNA)	41
FIGURA 14: VALORES DE PH DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA O SAÍDA (S) DO RESPECTIVO LEITO 3 (BRANCO).....	41
FIGURAS 15: VALORES DE CONDUTIVIDADE ELETRICA DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA O SAÍDA (S) DO RESPECTIVO LEITO 1 (CAFEÍNA).....	42
FIGURAS 16: VALORES DE CONDUTIVIDADE ELETRICA DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA O SAÍDA (S) DO RESPECTIVO LEITO 2 (CAFEÍNA).....	42

FIGURAS 17: VALORES DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA A SAÍDA (S) DO RESPETIVO LEITO 3 (BRANCO).....	43
FIGURAS 18: VALORES DE OXIGÉNIO DISSOLVIDO DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA A SAÍDA (S) DO RESPETIVO LEITO 1 (CAFÉINA).....	44
FIGURAS 19: VALORES DE OXIGÉNIO DISSOLVIDO DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA A SAÍDA (S) DO RESPETIVO LEITO 2 (CAFÉINA).....	44
FIGURAS 20: VALORES DE OXIGÉNIO DISSOLVIDO DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA A SAÍDA (S) DO RESPETIVO LEITO 3 (BRANCO).....	44
FIGURAS 21: VALORES DE POTENCIAL REDOX DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA A SAÍDA (S) DO RESPETIVO LEITO 1 (CAFÉINA).....	45
FIGURAS 22: VALORES DE POTENCIAL REDOX DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA A SAÍDA (S) DO RESPETIVO LEITO 2 (CAFÉINA).....	45
FIGURAS 23: VALORES DE POTENCIAL REDOX DA ÁGUA, PARA A ENTRADA (E) E PARA A SAÍDA (S) DO RESPETIVO LEITO 3 (BRANCO).....	46
FIGURA 24: ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE CAFÉINA DO LEITO 1 e Leito 2 EM CADA ENSAIO COM CONCENTRAÇÕES DE 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0; 2,5; 2,0 mg/l.....	47

Índice de Tabelas

TABELA 1 : REMOÇÃO DE FÁRMACOS EM ÁREAS HÚMIDAS ARTIFICIAIS COM OS DIFERENTES SISTEMAS OPERACIONAIS CONFORME RELATADO NA LITERATURA PUBLICADA	30
TABELA 2: DESENHO EXPERIMENTAL PARA ALIMENTAÇÃO DOS LEITOS COM CAFEÍNA	33
TABELA 3 : PARÂMETROS E MÉTODOS DE ANÁLISE DA ÁGUA	33

Lista de Siglas e Acrónimos

DQA - Diretiva-Quadro da Água

Eh - Potencial redox

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

EU - União Europeia

FS - Fluxo Superficial

FSS - Fluxo Subsuperficial

FSSH- Fluxo Subsuperficial Horizontal

FSSV- Fluxo Subsuperficial Vertical

LECA- Lightweight Expanded Clay Aggregates

TRH - Tempo de Retenção Hidráulica

UV - Ultravioleta

ZHAs - Zonas Húmidas Artificiais

1. Introdução

A presença de compostos farmacêuticos no meio aquático, assim como o seu comportamento e destino, constitui um dos problemas dos poluentes emergentes, que ainda são pouco caracterizados e habitualmente liberados nos ecossistemas, sendo que parte destes poluentes, como fármacos, produtos de uso pessoal, pesticidas e químicos industriais, não são totalmente removidos das estações de tratamento de águas residuais (ETAR). Embora alguns desses fármacos e seus metabolitos possam ser parcialmente removidos por meio da adsorção e degradação biótica ou abiótica no meio ambiente, muitos destes compostos são recalcitrantes o que aumenta os riscos de contaminação (Munoz et al., 2006)

O aumento exponencial da concentração de produtos farmacêuticos e dos seus metabolitos receberam especial atenção, especialmente como micropoluentes aquáticos emergentes (Bedoya-Rios et al., 2018). Devido às inúmeras atividades humanas pouco sustentáveis, a sustentabilidade dos ecossistemas está em perigo.

Os fármacos são constituídos por moléculas extremamente ativas biologicamente, fato que associado à sua produção em grande escala e ao aumento exponencial do consumo por ano, tem suscitado interesse, sobre como a presença destes resíduos afeta o meio onde é descarregado, ou seja, as águas residuais. Os produtos farmacêuticos normalmente existem nas águas residuais, devido à atividade humana ou industrial. Geralmente apresentam tempo de vida elevado quando estas águas não são tratadas e descarregadas no meio hídrico (Bedoya-Rios et al., 2018). Podendo permanecer nas águas destinadas ao consumo humano e entrar no ciclo urbano da água e, portanto, na cadeia alimentar tornando-se problemáticos para a saúde humana.

As estações de tratamento de águas residuais (ETARs) são consideradas a principal fonte de entrada de fármacos no ambiente, uma vez que, reúnem os resíduos de medicamentos que entram nas redes de drenagem municipais e hospitalares. Os fármacos não são completamente removidos pelos processos de tratamento convencionais que são processos de lamas ativadas, leitos percoladores, lagoas de destabilização, entre outros das ETARs. A complexidade química de cada composto faz com que a taxa de remoção de fármacos varie, de composto para composto, apresentando em alguns casos uma maior resistência à degradação (Gracia-Flor et al., 2012).

Portanto, uma questão emergente é o desenvolvimento de processos que promovam a remoção efetiva dos compostos farmacêuticos, nomeadamente dos

efluentes, a fim de diminuir a sua concentração no meio ambiente, reduzindo a exposição ambiental dos seres vivos a este tipo de contaminantes. Neste contexto têm sido desenvolvidos vários processos para remoção destes contaminantes, como as zonas húmidas artificiais (ZHA) que envolve a utilização de plantas aquáticas para a remoção de contaminantes, são consideradas económicas em comparação com outros tipos de sistemas de tratamento de águas residuais.

1.1 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a eficiência de tratamento de efluentes sintéticos com concentrações de cafeína em águas residuais em Zonas Húmidas Artificiais (ZHA), plantadas com *Vetiveria zizanioides* e com escoamento subsuperficial vertical.

Como objetivos específicos o presente trabalho pretendeu:

- a. Avaliar o comportamento dos leitos através de diferentes parâmetros físico-químicos; como pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e potencial redox.
- b. Estudar o efeito das diferentes concentrações de cafeína na biomassa das plantas, como magnésio e clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total verificar se o aumento de concentração da cafeína interfere na remoção.

2. Fundamentação Teórica

A água é um dos recursos naturais mais imprescindíveis e importantes para o Homem, mas o acesso a água potável em países em desenvolvimento e a qualidade desta nos países industrializados têm atingido valores e proporções preocupantes. A poluição de efluentes domésticos, agrícolas e industriais é causada por uma variedade de fatores e práticas de origem humana que liberam poluentes orgânicos e inorgânicos no meio ambiente (Muñoz et al., 2006).

Vêm sendo utilizados novas formas de tratamentos terciário com maior eficiência de remoção de fármacos, mas alguns destes novos métodos envolvem altos custos de construção, manutenção e energia, como por exemplo processos de oxidação avançados que utilizam ultravioleta (UV), ultrafiltração ou peróxido de hidrogênio (He et al., 2016).

Apesar da eficácia de remoção de fármacos associada à aplicação de tratamentos terciários, o seu elevado custo de execução, em alguns países não seja tão frequente a sua utilização, mas no continente europeu, a maioria das ETARs compreende este tratamento (Papageorgiou et al., 2016).

Sendo as águas residuais um dos principais meios de transporte de fármacos para o meio ambiente, a eficiência e o bom funcionamento das ETARs diminuem a contaminação ambiental, reduzindo o risco de estes estarem presentes nas águas para consumo humano (Abdel-Raouf et al., 2012).

Com os avanços tecnológicos as pesquisas científicas tem conseguido alcançar resultados significativos que anteriormente não se era possível, um exemplo disto é a quantificação de micro poluentes em águas residuais, sabe-se que a quantidade de poluentes que não são totalmente removidos durante um processo de tratamento de águas residuais comum é significativa, porém o processo de remoção destes poluentes não são acessíveis muitas vezes por serem caros e demandar muito tempo (Nivala et. al., 2019).

Os medicamentos estão se tornando um hábito comum no cotidiano de quase todas as pessoas e são vitais para a saúde pública de todos os seres humanos. A expectativa média de vida seria mais baixa (Roser et al., 2013), no qual a taxa de mortalidade infantil era muito elevada e qualquer mínima patologia podia levar a um desfecho fatal. Desde

1900 que a expectativa de vida aumentou, muito devido aos avanços científicos nos diversos campos da medicina e à melhoria das condições de vida.

A utilização em massa de medicamentos leva a diversos distúrbios e impactos ambientais associados ao seu uso. É necessário realizar avaliações de risco bem estruturadas e completas sobre a presença e o impacto que estes podem ter no meio ambiente, de modo a conseguirmos cumprir a Diretiva-Quadro da Água da União Europeia (Robles- Molina et al., 2014).

Apesar da comunidade científica incidir cada vez mais o foco dos seus estudos nos efeitos ecotoxicológicos associados a compostos farmacêuticos ativos no meio ambiente pouco se sabe sobre seus efeitos a longo prazo nos ecossistemas aquáticos. Têm sido identificados, cada vez mais, diferentes tipos de substâncias ativas de fármacos no meio ambiente, devido ao desenvolvimento e aprofundamento das metodologias analíticas de deteção dos mesmos (Gonzalez-Rey et al., 2013).

Estima-se que haja um aumento exponencial do consumo de fármacos, ao longo dos próximos anos. Isto deve-se muito ao aumento da expectativa de vida, à diminuição do preço e aumento de oferta de fármacos, que levará a uma população cada vez mais idosa, que necessitará de regimes terapêuticos diários, que incluem muitas vezes cinco ou mais medicamentos (Kümmerer, 2018).

Com o crescimento constante das concentrações de produtos farmacêuticos em águas residuais, devem ser implementadas cada vez mais medidas e mudanças na legislação em vigor. A título de exemplo, não existe legislação que limite a quantidade de fármacos que, uma ETAR em Portugal, pode libertar para o meio ambiente, nem existem estipulados limites máximos permitidos de fármacos em águas superficiais, como rios e em lagoas (Papageorgiou et al., 2016).

2.1. Fármacos no ambiente

A poluição ambiental causada por produtos químicos produzidos para medicamentos humanos e veterinários geralmente não deriva do seu processo de fabrico, visto que as indústrias farmacêuticas, na maioria dos casos, apresentam maneiras eficazes para eliminar os seus resíduos. Deve-se, contudo, ao seu uso globalizado e contínuo ao longo de vários anos, à sua incorreta eliminação por parte dos utilizadores e às excreções biológicas dos seres vivos que os consomem (Jones et al., 2013).

Um dos principais meios de entrada de fármacos nos recursos hídricos é através das secreções humanas, em que a maioria das doses administradas de alguns medicamentos pode ser excretada totalmente inalterada. Além disso, os metabolitos podem ser reconvertidos nas substâncias por meio de ações bacterianas (Jones et al., 2013).

Existem vários tipos de águas residuais geradas pela sociedade e pelo modo de vida, tais como as águas residuais domésticas, águas provenientes de descartes industriais. E, as estações de tratamentos de água, acabam por gerar outros tipos de águas contaminadas que precisam de ser submetidas a tratamentos, como por exemplo as águas provenientes das lavagens de filtros e equipamentos (Henze et al., 2018).

Os micropoluentes que não são removidos nas Estações de Tratamento de Águas Residuais, no qual se inclui a cafeína, acabam então, por ser descarregados juntamente com os efluentes tratados, contaminando os meios receptores hídricos. Assim, as implicações resultantes da descarga dos compostos emergentes no ambiente aquático sugerem a imprescindível necessidade de encontrar processos complementares ou alternativos eficientes e economicamente viáveis (Dordio et al., 2017).

2.1.1. Cafeína

A cafeína é considerada um sinalizador de contaminação pois, junto com outros produtos farmacêuticos presentes nas águas residuais, é metabolizada e absorvida pelo organismo humano de modo parcial e é excretada nas fezes e na urina, tendo como destino o ambiente aquático (Daneshvar et al., 2012). Esses compostos liberados em pequenas e contínuas concentrações podem causar mudanças e efeitos crônicos no ecossistema, de acordo com (Daughton et al., 1999).

A cafeína é um composto químico largamente consumido em todo o mundo e pertence ao grupo dos compostos lipídicos solúveis denominados purinas, quimicamente conhecidos como 1,3,7, trimetilxantina (Figura 1). É classificado como um alcaloide e pode ser encontrado naturalmente associado a outros compostos do mesmo grupo: a paraxantina, a teofilina e a teobromina, diferenciados de acordo com a posição do grupo metilo (Gonçalves, 2008).

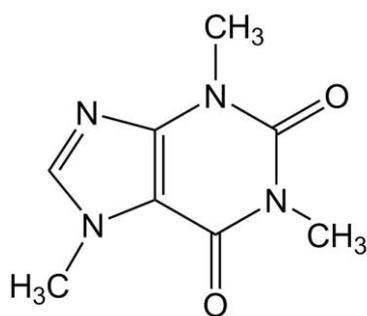


Figura 1: Estrutura química da cafeína.
Fonte : (Frei, 2006).

A cafeína tem várias características únicas importantes para um bom marcador químico de poluição. É altamente solúvel em água (13gL^{-1}), volatilidade insignificante e sua meia-vida é de cerca de 10 anos (Buerge et al. 2006 ; Froehner e Martins 2008 ; Chen et al. 2012). De acordo com Kurissery 2012 a concentração de cafeína não apresentou nenhuma correlação significativa com parâmetros hidrológicos, como temperatura superficial da água, pH ou oxigênio dissolvido, indicando sua estabilidade e lento ritmo de degradação.

Ela se encaixa no perfil de um bom marcador diretamente relacionado a influências antropogênicas sem fontes biogênicas potenciais sendo ainda biodegradável (Siegener e Chen, 2002).

A degradação da cafeína é mais favorável em condições aeróbias, ou seja, na presença de oxigênio. A maioria dos microrganismos e enzimas responsáveis pela degradação da cafeína são aeróbios e requerem oxigênio para realizar as reações bioquímicas envolvidas na quebra da molécula de cafeína. Em condições aeróbias, os microrganismos utilizam a cafeína como fonte de carbono e energia, convertendo-a em produtos de degradação mais simples. A cafeína é metabolizada através de uma série de etapas enzimáticas que levam à formação de compostos como xantina, teobromina e ácido úrico (Wilt et al., 2018).

Já em condições anaeróbias, na ausência de oxigênio, a degradação da cafeína pode ser mais limitada ou ocorrer em uma taxa mais lenta. Isso ocorre porque os microrganismos anaeróbios têm vias metabólicas diferentes e podem não possuir as enzimas necessárias para degradar completamente a cafeína. A presença de oxigênio favorece a atividade dos microrganismos aeróbios, que são mais eficientes na degradação

da cafeína. Portanto, condições aeróbias, com uma boa oxigenação do meio, são mais propícias para a degradação eficiente da cafeína (Wilt et al., 2018).

O pH da água pode ter um impacto na degradação da cafeína. A cafeína é uma substância ácida, e o pH da água pode influenciar a sua estabilidade e velocidade de degradação. Em condições alcalinas (pH elevado), a cafeína tende a ser mais estável e pode ter uma taxa de degradação mais lenta. Isso ocorre porque a cafeína é menos propensa a reagir ou interagir com outras substâncias em um ambiente alcalino (Al Bratty et al., 2018).

Já em condições ácidas (pH baixo), a cafeína pode ser mais propensa a degradação. Em um ambiente ácido, as moléculas de cafeína podem ser mais facilmente quebradas ou reagir com outras substâncias presentes na água, a degradação da cafeína não depende exclusivamente do pH da água. Outros fatores, como a presença de microrganismos degradadores, a temperatura e a concentração de cafeína, também desempenham papéis importantes na velocidade e eficiência da degradação (Al Bratty et al., 2018).

A cafeína, é originada de produtos utilizados no dia a dia, que possuem basicamente a mesma rota e vias de transporte no meio ambiente, é encontrada em várias espécies de plantas, alimentos, bebidas e faz parte da composição de medicamentos. Devido ao consumo quase exclusivo por humanos, tem sido utilizada como marcador químico da contaminação de águas superficiais por efluentes domésticos (Buerge et al., 2003).

Estudos realizados por Chen (2008) demonstraram que, a cafeína, quando presente nas águas em níveis elevados (300 mg.L^{-1}), podem causar a morte de peixes embriões como o peixe flâmula ou paulistinha, enquanto em exposições a 150 mg.L^{-1} foram observadas má formações, afetando o desenvolvimento e diminuição da capacidade de locomoção. Além disso, Rosa (2018) observaram que o peixe-zebra exposto a altas concentrações de cafeína (200 mg.L^{-1}), também pode apresentar comportamento anormal caracterizado por uma natação estranha na superfície da água, diminuição da atividade vertical e perda de postura, mobilizando-se com natação anômala para o fundo do tanque.

Santos-Silva (2018) avaliaram os efeitos na espécie *Prochilodus lineatus*, onde se concluiu que exposições de cafeína podem interferir no mecanismo de biotransformação da espécie após 168 horas de exposição. Devido à seu alto consumo pela população em geral, sua alta solubilidade em água, sendo adotada em vários estudos (Buerge et al., 2003; Sodre et al., 2010; Kurissery et al., 2012; Canela et al., 2014; Gonçalves et al, 2017).

Na fitorremediação, a cafeína pode ser absorvida e metabolizada pelas plantas que são usadas para remover poluentes do ambiente. A cafeína é uma molécula orgânica que contém nitrogênio, carbono, hidrogênio e oxigênio, e algumas plantas têm a capacidade de degradar e utilizar compostos orgânicos como fonte de nutrientes.

As plantas absorvem a cafeína da água contaminada, elas podem realizar uma série de processos metabólicos para decompor a molécula. A cafeína pode ser quebrada em seus componentes básicos, como xantina, teobromina e ácido úrico, por enzimas presentes nas plantas. Esses produtos de degradação podem ser posteriormente utilizados como fonte de carbono e nitrogênio pelas plantas (Summers et al., 2014).

O processo de fitorremediação para remoção da cafeína é um processo complexo que pode variar dependendo da espécie de planta e das condições ambientais. Algumas plantas têm maior capacidade de metabolizar a cafeína do que outras. Além disso, fatores como a concentração de cafeína na água e a presença de outras substâncias podem influenciar. As plantas usadas podem ajudar a reduzir a concentração de cafeína no ambiente através de processos de absorção, metabolismo e degradação da molécula (Mocek-Plociciak et al., 2023).

2.2 Zonas Húmidas Artificiais (ZHA)

As zonas húmidas artificiais (ZHA) também conhecidas como “Constructed Wetlands” são sistemas artificiais de tratamento de águas que consistem em bacias com pouca profundidade ou canais nos quais são inseridas plantas aquáticas (macrófitas), estas zonas com índices de humidade elevados são habitadas por plantas com a capacidade de crescerem em solos saturados e de lhes alterarem as propriedades, devido à ocorrência de um conjunto de operações físicas, processos químicos e biológicos (Kadlec e Wallace, 2008). Segundo Almeida (2011) o primeiro sistema à escala real iniciou o seu funcionamento na década 1960s, desde então, esta tecnologia tem sido amplamente utilizada com sucesso, como na Europa, nos Estados Unidos e na Austrália. Estes sistemas são dimensionados e construídos com o objetivo de utilizar os processos naturais que envolvem as plantas, o solo e a sua interação com a comunidade microbiana presente,

para desta forma proceder ao tratamento de efluentes de um modo controlado (Almeida, 2011).

2.2.1. Classificação das ZHAs

Estes sistemas, podem ser classificados segundo o tipo de meio em que vivem as plantas dominantes que as povoam. As macrófitas como estas plantas são chamadas podem ser classificadas em três categorias: emergentes, flutuantes (enraizadas ou não) e submersas. Em termos operativos, podem ser classificadas pela forma como o efluente as percorre, dividindo-se em sistemas de fluxo superficial (FS) e fluxo subsuperficial (FSS) que poderá ser em movimento vertical ou horizontal ou como combinação de ambos (híbrido) (Mavioso, 2010).

Nas ZHA de FS, os fluxos de águas residuais passam através de uma bacia superficial plantada com macrófitas emergentes e submersas (Figura 2 a). A aplicação mais comum para os sistemas em FS é no tratamento avançado de efluentes urbanos, agrícolas e industriais, após processos de tratamento secundário ou terciário. As ZHA em FS têm uma elevada capacidade de suportar grandes variações de caudal, alimentação pulsada e flutuações do nível superficial de água. Entretanto podem ter uma desvantagem, seus sistemas em superfície livre são muito idênticos às zonas húmidas naturais, por isso são atraídos por uma grande variedade de vida selvagem, ou seja, moluscos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos.

Já no FSS as plantas crescem enraizadas no enchimento, que é preenchido com cascalho, areia, ou substratos similares. Esta última categoria pode ser subdividida com base na direção do fluxo de água, ou seja, fluxo horizontal ou vertical (Kadlec e Wallace, 2008; Almeida, 2011). Numa ZHA com FSS o efluente é mantido abaixo da superfície do solo, percorre lentamente o sistema através dos poros do substrato, até a saída. Durante este percurso o líquido contacta com diversas zonas, com estados de oxidação diferentes, zonas aeróbias, anóxicas e anaeróbias (Vymazal, 2007). Dado que o efluente não está em contacto com a atmosfera, nestes sistemas é menor a probabilidade de surgirem odores e insetos e de ocorrer contato entre pessoas e a água residual (Kadlec e Wallace, 2008).

A Figura 2 apresenta as ZHA com (a) fluxo superficial (FS), (b) fluxo sub superficial horizontal (FSSH) e (c) fluxo subsuperficial vertical (FSSV).

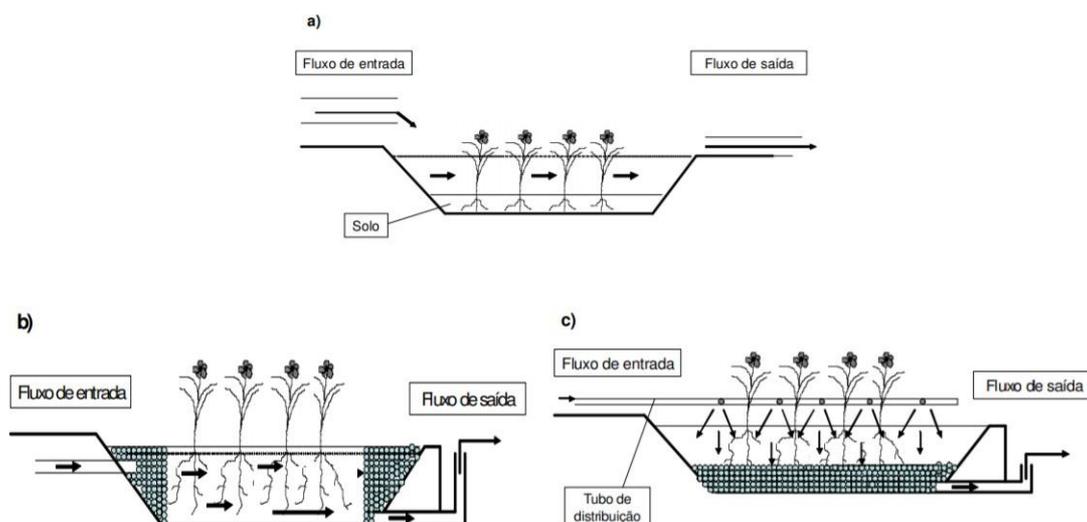


Figura 2 : ZHA para tratamento de águas residuais: a) com Fluxo Superficial, b) com Fluxo Subsuperficial Horizontal, c) com Fluxo Subsuperficial Vertical

Fonte (Vymazal, 2007)

Em sistemas FSSH o afluyente entra próximo a superfície e percola na horizontal, atravessando a matriz de enchimento e as raízes das plantas. A capacidade de transporte de oxigénio é insuficiente para garantir a decomposição aeróbia na rizosfera pelo que os processos anóxicos e anaeróbios desempenham um papel importante nas ZHA com escoamento horizontal (Vymaza et al., 2017).

Por outro lado, as ZHA com FSSV a água residual a tratar é distribuída à superfície e percola na vertical, infiltrando-se rapidamente, até ser recolhida inferiormente junto à base do leito, podendo estar em sistemas paralelos de leitos ou em série. Isso explica por que é preferível em climas mais quentes e regiões áridas usar sistemas com menor tempo de retenção hidráulica (TRH), como os sistemas de fluxo vertical, assim diminuindo as perdas de água devido à evapotranspiração, ou a perda de água devido à evaporação do aquoso na superfície e a transpiração da planta, que são maiores neste tipo de clima, o aquoso pode se tornar extremamente salino (Stottmeister et al., 2003).

Fundamentalmente, as ZHA são preenchidas com substrato ou matriz de suporte, por onde passam as águas residuais. Utiliza-se os atributos das macrófitas para transferir oxigénio do ambiente para os substratos que causam o crescimento microbiano ao redor das raízes, formando biofilme que, por sua vez, promovem a quebra dos contaminantes presentes nas águas residuais (Almeida et al., 2011).

2.2.2. Componentes das ZHAs

Os componentes essenciais das ZHA Subsuperficiais são a matriz de suporte, a vegetação e os microrganismos, que em conjunto são os responsáveis pelos processos de remoção de poluentes do sistema (Dordio et al., 2017).

2.2.2.1. Matriz de suporte

A vegetação dos leitos é suportada pela matriz de suporte, onde são fixados os microrganismos, e está ainda associada aos mecanismos físicos e químicos de tratamento.

Normalmente a escolha do substrato é feita com base em critérios económicos, tipo de fluxo hidráulico e exigências de tratamento.

O material de enchimento pode ser natural como argila ou solo arável, areia, mistura de solos, cascalho, calcário lavado resíduo mineral vegetal e outras combinações. O meio de enchimento pode ser constituído por camadas de material, com várias porosidades e granulometrias e deve apresentar uniformidade e porosidade e condutividade hidráulica adequadas, pois estas características podem afetar o escoamento e o desempenho do sistema, dado que ocorrem no interior do leito processos físico-químicos e microbiológicos através dos quais a remoção de poluentes presentes na água residual é promovida (Almeida, 2011).

A escolha do material da matriz de suporte é extremamente importante para leitos verticais escoamento de fluxo subsuperficial vertical, subterrâneo porque afeta a carga hidráulica aplicada e modula a taxa de transferência de oxigênio para o leito. As características do material de enchimento e a natureza do efluente a ser tratado podem interferir no entupimento do leito. Portanto, é necessário escolher materiais que não sejam propensos a entupimentos. Agregados leves de argila expandida apresentam grande porosidade e condutividade hidráulica. Nestes materiais, a alta porosidade associada à área superficial específica permite-melhor desenvolvimento e imobilização de biofilmes microbianos (Metcalf e Eddy, 2003; Lekang e Kleppe, 2000).

2.2.2.2. Vegetação

As plantas são uma componente essencial das ZHA e contribuem diretamente para a remoção/degradação de diversos tipos de poluentes presentes nos efluentes, nomeadamente os xenobióticos orgânicos, através de processos (Figura 3) como a adsorção, absorção, acumulação, metabolização, volatilização, e exsudação de enzimas que ajudam na degradação de poluentes na rizosfera (Macek et al., 2000).

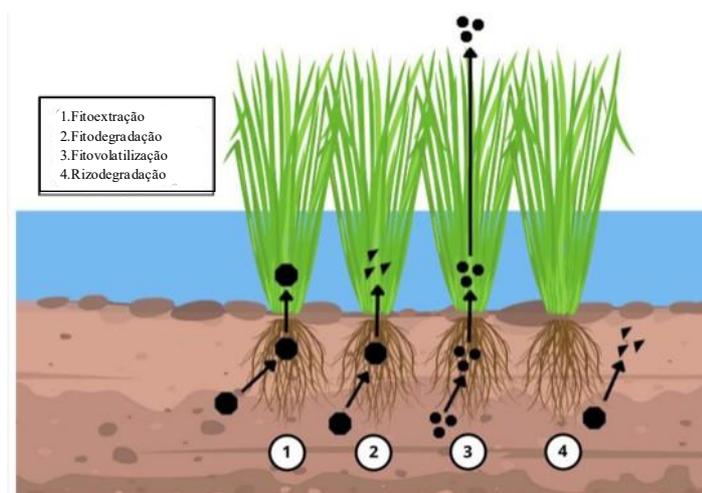


Figura 3 : Mecanismos de remoção de contaminantes das plantas
Fonte: (Overton et al., 2023).

Uma macrófita que vem sendo muito utilizada por (Almeida et al., 2022), é a *Vetiveria Zizanioides* no domínio do tratamento de águas residuais, por ter uma densa rigidez, o caule pode reduzir a velocidade do fluxo de água, aumentando o tempo de retenção, aumentando a deposição de sedimentos e sedimentos vinculados a contaminantes (por exemplo, metais pesados e alguns pesticidas).

A *Vetiveria Zizanioides* (Figura 4), possui características específicas como: grande resistência a variações de pH (de 3 e 10,5), e de temperatura (-10 e 60°C), que do solo e a concentrações elevadas de metais pesados (Truong et al., 2001) Outras atributos que influenciam a sua utilização são o seu método de propagação vegetativa e o seu longo sistema radicular. Estas plantas têm sistemas radiculares densos e finamente estruturados que aumentam a estabilidade do canteiro, a absorção de nutrientes e fornecem um ambiente que estimula os processos microbiológicos da rizosfera (Cull, et al., 2000) e (Trung et al., 2001)). É altamente tolerante não só às condições climáticas (Trung et al., 2001), mas também à água contaminada com metais pesados (Xia, et al., 2000).

É uma planta perene pertencente à família Poaceae (gramneas), nativa da Índia, cultivado em áreas tropicais e subtropicais. Quando cultivada, tem a finalidade de extrair das suas raízes um valioso óleo essencial de consagrado uso na indústria da perfumaria (Mucciarelli, Berteza, Cozzo, Scannerini, & Gallino, 1998). Também pode ser usada na alimentação de animais herbívoros, contudo por causa do alto conteúdo em sílica nas suas folhas, ela não é considerada interessante nessa área (Mucciarelli et al., 1998).



Figura 4 : Vetiveria Zizanioides
Fonte: (Wong, 2005).

Porém é perfeitamente adequada para a utilização como vegetação tampão que habitam as margens dos rios e servem como um filtro ecológico entre os campos agrícolas e os cursos de água e também como uma das espécies de plantas usadas nas ZHA (Cull et al., 2000). A sua utilização no tratamento de efluentes é um método eficiente e de baixo custo (Trung et al., 2001). Como ela cresce rapidamente e tem uma grande biomassa (Chiu et al., 2005) produz normalmente 20-40 toneladas/ha/ano de peso seco (Vieritz et al., 2003), suas folhas devem ser aparadas 2 a 3 vezes por ano, de maneira a continuar a remover de maneira sustentável os poluentes dos lixiviados (Xia et al., 2000). Em regiões temperadas não produz sementes o potencial para se tornar uma infestante é reduzido (Mucciarelli et al., 1998).

A sua atividade depende de numerosos fatores, entre eles a temperatura, o valor de pH da água, as condições de oxigenação, macro e micronutrientes.

2.2.2.3. Nutrientes

Os nutrientes são adquiridos na pelas raízes através de absorção. Este processo é ainda auxiliado por bactérias fixadoras de azoto e por fungos micorrizas, que absorvem nutrientes e água do solo transferindo-os para as raízes. Designam-se de macronutrientes os nutrientes que são necessários ao crescimento e desenvolvimento das plantas em quantidades elevadas e de micronutrientes os que, sendo também essenciais, são necessários, mas em pequenas quantidades podendo, inclusivamente, causar problemas de toxicidade (Santos et al., 2010), (Velooso et al., 2022).

Para além do carbono, hidrogênio e oxigênio, existem seis elementos considerados macronutrientes - nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre em que as plantas requerem quantidades relativamente elevadas para crescerem e desenvolverem. Já os micronutrientes por serem necessários às plantas em pequenas quantidades, e ainda assim essenciais a uma nutrição adequada, neles inserem-se - ferro, manganês, cobre, zinco, boro, molibdénio (Velooso et al., 2022).

2.2.2.4. Microrganismos

A comunidade microbiana, é constituída principalmente por bactérias e fungos e é responsável pela remoção da maior parte dos contaminantes presentes na água. Os contaminantes que passam pelo leito são removidos ou transformados por microrganismos associados ao filtro e às raízes das plantas. (Brix et al., 2009). Nas raízes e rizomas das plantas ou em materiais de enchimento, desenvolvem-se em biofilmes de diversas formas, pois a presença das plantas permite a presença de gradientes de oxigênio e a alternância de microzonas com diferentes estados de oxigenação (Kadlec et al., 2008).

Os processos microbianos que ocorrem na ZHA incluem uma série de reações de hidrólise enzimática ou a síntese de compostos orgânicos que convertem moléculas orgânicas grandes em moléculas menores e facilmente degradáveis (Kadlec et al., 1996), algumas das quais são produzidas por enzimas presentes na ZHA produzidas por microrganismos. Esses componentes enzimáticos são catalisadores poderosos, capazes de alterar amplamente as propriedades estruturais e toxicológicas dos poluentes ou mineralizar completamente as moléculas orgânicas em produtos inorgânicos inofensivos.

(Gianfreda et al., 2004). Os contaminantes que passam pelo leito são removidos ou transformados por microrganismos associados ao filtro e às raízes das plantas (Brix et al., 1990).

Condições ambientais favoráveis (como sombra ou umidade) favorecem o crescimento de microrganismos que iniciam a degradação de poluentes; também é favorecido pela presença de matéria vegetal em decomposição, que é fonte de matéria orgânica e nutrientes; e por fim, as plantas neste processo. As raízes fornecem nutrientes aos microrganismos, tornando-se um ecossistema favorável ao seu desenvolvimento, sendo os microrganismos responsáveis por converter matéria orgânica complexa em nutrientes disponíveis para assimilação pelas plantas. Durante este processo, vários compostos e substâncias complexas degradam-se em componentes simples com toxicidade reduzida ou nula (Gianfreda et al., 2004).

2.3. Processos de remoção da cafeína

Nos últimos anos, a tecnologia de plasma DBD tem sido utilizada como um sistema eficaz para a remoção de contaminantes farmacêuticos nas ETARs (Magureanu et al., 2015). Na tecnologia de plasma DBD, são utilizadas placas de eletrodos de descarga separadas por uma barreira dielétrica, geralmente feita de quartzo (Reddy et al., 2014a). A descarga na água produzirá radiação ultravioleta, campos elétricos elevados e ondas de choque de sobrepressão, e produzirá substâncias ativas como radicais hidroxila, ozônio, oxigênio atômico, peróxido de hidrogênio e os radicais hidroperóxido causam degradação oxidativa de poluentes orgânicos na água (Al-Rajab et al., 2018); (Lin et al., 2010); (Reddy et al., 2014); (Wang et al., 2017).

Bulger et al. (2003) relataram que 81-99,9% da cafeína foi removida de águas residuais contendo baixas concentrações de cafeína (7-73 µg/L) em estações de tratamento de águas residuais suíças, e analisaram a cafeína como aplicabilidade de marcadores químicos de contaminação.

Sui et al. (2010) estudaram a remoção de 13 produtos farmacêuticos (incluindo cafeína) de águas residuais de quatro diferentes estações de tratamento de águas residuais em Pequim, China, e relataram taxas de remoção de micro poluentes de aproximadamente 12% a 100% usando ozonização e microfiltração/osmose reversa.

Em outra publicação, foi relatado que o uso da tecnologia de tratamento com plasma DBD combinado com catálise remove 94% da cafeína de uma solução aquosa (50 mg/L) em um tempo de tratamento de 24 min (Wang et al., 2017). Além disso, foram descritos vários métodos para biodegradar a cafeína com base em diferentes bactérias e fúngicas (Edwards et al. 2015; Gokulakrishnan et al. 2005).

No entanto, a maioria dos métodos existentes para remover a cafeína das águas residuais sofre de uma ou mais desvantagens, nomeadamente caro, demorado, baixa taxa de remoção de cafeína, degradação incompleta, elevado consumo de energia, utilização de catalisadores, gases e solventes orgânicos caros, processos tóxicos e complexos. Exemplos incluem extração com solvente e fluidos supercríticos. Portanto, ainda é necessária uma abordagem técnica e economicamente equilibrada para remover potenciais poluentes orgânicos dos recursos hídricos e, assim, melhorar a qualidade de vida. No presente trabalho, utilizamos a ZHA como técnica descontaminação.

A ZHA já é uma técnica de descontaminação em que se utilizam plantas para remover poluentes do ambiente ou transformá-los em formas menos perigosas para os seres vivos. O impacto ambiental e os custos de implementação são inferiores àqueles dos métodos físicos e químicos, além de ser uma técnica de fácil implementação (Almeida et al., 2011).

De acordo com Negrão (2022), os mecanismos da fitorremediação podem atuar de forma direta na redução e/ou remoção de contaminantes através da absorção, acumulação ou metabolização nos tecidos da planta e pela mineralização. Ou, podem atuar de forma indireta através da extração ou através da atividade microbiana propiciada pela presença das plantas.

Processos para a remoção da cafeína

- a) Adsorção: A cafeína pode ser adsorvida nas superfícies da vegetação das zonas húmidas, tais como raízes, caules e folhas. Os tecidos vegetais fornecem um meio para a cafeína aderir, removendo-a efetivamente da água. (Quintero-Jaramillo et al., 2021).

- b) Filtragem: Os sistemas de raízes densas das plantas das zonas húmidas atuam como filtros naturais, retendo as partículas em suspensão, incluindo as moléculas de cafeína, à medida que a água passa através delas. Este processo de filtração ajuda a remover a cafeína da coluna de água (Nazim Uddin et al., 2017).
- c) Degradação microbiana: As zonas húmidas abrigam diversas comunidades microbianas, incluindo bactérias e fungos, que podem decompor a cafeína através de processos de degradação biológica. Os microrganismos no solo e na água das zonas húmidas metabolizam a cafeína, convertendo-a em compostos mais simples que são menos nocivos (Baptista et al., 2018).
- d) Diluição e sedimentação: A medida que a água se move através da zona húmida, as concentrações de cafeína podem ser diluídas pela entrada de água mais limpa ou pela mistura com outras fontes de água. Além disso, as moléculas de cafeína podem assentar e acumular-se nos sedimentos das zonas húmidas ao longo do tempo, removendo-as efetivamente da coluna de água (O'Geen et al., 2020).

2.4. Estudo aplicado ao tema de remoção de cafeína por ZHA

Os micropoluentes que não são removidos nas ETARs convencionais, no qual se inclui a cafeína, acabam então por ser descarregados juntamente com os efluentes tratados, contaminando os meios recetores hídricos (Roque et al., 2009) e (Gromicho, et al., 2016).

Assim, as implicações resultantes da descarga dos compostos emergentes no ambiente aquático sugerem a imprescindível necessidade de encontrar processos complementares ou alternativos eficientes e economicamente viáveis (Araújo et al., 2018).

Anteriormente (Zhang et. al., 2012), relataram a eficiência promissora das remoções de fármaco como a cafeína, como se pode observar na Tabela 1. As pesquisas relatadas abaixo tiveram em consideração o tipo de tratamento utilizado, a espécie de planta utilizada a matriz de suporte e a taxa de remoção, para cada poluente, obtida.

As taxas de remoção encontradas neste estudo foram sempre acima dos 90%. Zhang (2016), em sistemas plantados com *Heliconia Rostrata*, obtiveram eficiências superiores a que obteve 97% de remoção para cafeína concluiu que a utilização de ZHA de Fluxo vertical teve uma remoção maior do que a ZHA de Fluxo horizontal pois os sistemas horizontais são conhecidos por possuírem teores limitados de oxigénio e os verticais,

maiores condições de oxigenação (Cooper et. al., 2001), sendo assim os sistemas verticais são mais utilizados.

Almeida et. al. (2022), num estudo sobre remoção de cafeína de efluentes através de leito de macrófita de FSSV plantado com *Vetiveria zizanioides*, e tem uma diminuição do teor em clorofila a e total pela exposição das plantas à cafeína, mas, sem sinais de amarelamento nas folhas, conseguindo uma percentagem de remoção do fármaco de 93% aproximadamente.

Matamoros et. al. (2007) estudaram a remoção de 13 contaminantes emergentes, em ZHA de FSSV e compararam os resultados utilizando de areia como matriz de enchimento onde a ZHA de fluxo vertical de utilizando brita grossa como matriz de enchimento foi mais eficiente em termos de eficiência de remoção para a maioria dos compostos estudados, em comparação com outras ZHA a partir de outras configurações (ou seja, fluxo horizontal subsuperficial) de areia, atingindo cerca de 99% de remoção para cafeína.

Araújo et. al. (2018) realizaram pesquisas tratando águas residuais de um campus universitário com ZHA de FSSV, onde o efluente era proveniente de fossa séptica. O efluente apresentou compostos de cafeína e ibuprofeno e a remoção foi de 86 e 83% para cafeína e ibuprofeno, respetivamente.

Melo et. al. (2022) verificou em sua pesquisa altas eficiências de remoção, variando de 87 a 99% em FSSH, plantados com *Phragmites Australise* obteve uma boa remoção apesar das condições anaeróbias do ambiente.

Tabela 1: Remoção de cafeína em ZHA com os diferentes sistemas operacionais conforme relatado na literatura publicada.

Tipo de ZHA	TRH	Matriz de enchimento	Planta utilizada	Contaminante	Taxa de remoção	Referência
FSSH	1 dia.	Cascalho	<i>Typha angustifolia</i>	Cafeína	93%	Zhang et al., (2012)
FSSV	1 dia.	Areia	<i>Scirpus validus</i>	Cafeína	93%	Zhang et al., (2018)
FSSV	5 e 28 dias	Cascalho/ brita	<i>Heliconia rostrata</i>	Cafeína	97%	Oliveira et al., (2019)
FSSV	6 a 23h	Leca® NR10/20	<i>Vetiveria zizanioides</i>	Cafeína	93%	Almeida et al., (2022)
FSSV	7 dias.	Brita e areia	<i>Eichhornia crassipes</i>	Cafeína	90%	Oliveira et al., (2019)
FSSV	7 dias.	Brita e areia	<i>Phragmites australis</i>	Cafeína	99%	Matamoras et al., (2007)
FSSV	1 dia.	Brita	<i>Heliconia psittacorum</i> e <i>Canna ssp</i>	Cafeína	86%	Araújo et. al., (2018)
FSSH	1.36 dia.	Brita	<i>Pennisetum setaceum</i>	Cafeína	99%	Melo et. al., (2022)

3. Materiais e Métodos

3.1. Instalação piloto

Para a realização deste trabalho foram utilizados três leitos com escoamento em fluxo subsuperficial vertical plantados com *Vetiveria zizanioides*, sendo a matriz de suporte, aglomerados leves de argila expandida (Leca[®]NR 10/20), com área superficial de 0,24m², e denominados Leito 1, Leito 2 e Leito 3. (Figura 5).

A alimentação foi efetuada com fluxo contínuo a partir de um reservatório de 125 L, a distribuição do efluente foi à superfície, com dispersores equidistantes, com o auxílio de uma bomba Eheim-1250 (Deizisan, Alemanha) percolando verticalmente, o efluente final foi recolhido a partir de uma torneira adaptada a cada leito.



Figura 5 : Esquema da instalação piloto, com o efluente de entrada e saída (leitos 1 e 2 alimentados com cafeína e o 3 como branco).

3.2. Ensaio experimental

Os reagentes utilizados no estudo estão descritos a seguir, estes foram utilizados para nutrição das plantas e análises físico-químicas durante o trabalho.

Os leitos foram alimentados com uma solução de meio mineral ($28 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ CaCl_2 , $52 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $12 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ KH_2PO_4 , $11,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ K_2SO_4 , $0,8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,18 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0,08 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ZnCl_2 , $1,7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), e procedeu-se a adição de uma fonte de azoto tendo sido utilizado sulfato de amónio e cloreto de amónio ($\sim 130 \text{ mg/L}$ de N-NH_4^+). Foram

adicionadas as concentrações de cafeína crescentes de 0,5; 1,0; 1,5 no leito 1 e 2,0; 2,5; 3,0 no leito 2.

3.3. Monitorização geral do sistema

A alimentação dos leitos foi dividida em três ensaios diferentes ao longo de um período de 6 semanas. A concentração de cafeína foi aumentada em 0,5 mg/L a cada fase. Na Tabela 2 é apresentada uma visão geral do processo. Todas as segundas, quartas e sextas-feiras, as águas residuais sintéticas nos reservatórios de alimentação foram renovadas com uma nova solução com a mesma concentração para essa fase da experiência.

Tabela 2: Desenho experimental para alimentação dos leitos com cafeína.

<i>Ensaio</i>		<i>Concentração de Cafeína (mg·L⁻¹)</i>	<i>Carga Hidráulica (L·m⁻²·d⁻¹)</i>	<i>Concentrações de N-NH₄⁺ mg/L</i>
<i>Leito 1</i>	ensaio 1	0,5	202 ± 1	-130
	ensaio 2	1	213 ± 3	
	ensaio 3	1,5	203 ± 4	
<i>Leito 2</i>	ensaio 1	2	171 ± 3	
	ensaio 2	2,5	182 ± 3	
	ensaio 3	3	205 ± 3	
<i>Leito 3</i>	ensaio 1	0	187 ± 4	
	ensaio 2	0	207 ± 4	
	ensaio 3	0	212 ± 2	

(Média ± Desvio-padrão)

Os parâmetros estudados e os equipamentos utilizados estão apresentados abaixo na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros e métodos de análise da água.

Parâmetros	Método de análise/ equipamento
pH	Sonda multiparamétrica (HI9829 HANNA)
Oxigénio dissolvido	
Condutividade eléctrica	
Potencial Redox	

3.4. Monitorização e Amostragem

O sistema foi monitorizado através da observação do crescimento e desenvolvimento das plantas.

A temperatura média do ar foi 27,7 °C medida com um termómetro colocado numa parede junto às ZHAs. No início de cada ensaio era medido o caudal de alimentação e de saída dos leitos. As medições de caudal, foram efetuadas manualmente, com proveta graduada numa torneira colocada à entrada de cada ZHA e no sifão de saída dos líquidos, com auxílio de um cronómetro.

As amostras foram recolhidas na entrada e saída de cada um dos leitos. Estas amostras foram transportadas para o laboratório e analisadas imediatamente pela sonda multiparamétrica (HI9829 HANNA) para determinação de pH, condutividade eléctrica, potencial redox, oxigénio dissolvido.

Para quantificação da cafeína, quando não foi possível analisá-las de imediato, foram armazenadas as alíquotas e conservadas a -4°C.

O teor de clorofila *a*, clorofila *b* e *total* nas folhas, foi analisado de acordo com a metodologia de Lichtenthaler (1987). As amostras das plantas que foram recolhidas ao longo da experiência foram cortadas cerca de 20 cm acima do nível do solo e divididas em 4 partes, posteriormente colocadas em sacos plásticos e depois armazenadas a -80 °C até a realização das análises.

As amostras foram tratadas para análise em HPLC/MS. Utilizou-se 200 ml da amostra que foram ajustados para um pH de 2 com ácido clorídrico de acordo

com Paíga P. et. al. (2015). Os cartuchos foram acondicionados com 10 ml de Hexano com auxílio de uma bomba a vácuo (Fig. 6), em seguida foram adicionados 7,5 ml de metanol e 7,5 ml de água ultrapura. Deixou-se em repouso 1 hora, para que o cartucho secasse, e procedeu-se à eluição do analito com 5 ml de solvente (acetonitrilo) e em seguida levou-se à secura com azoto líquido.

Transferiu-se a solução de acetonitrilo com cafeína para um vial (2ml), com auxílio de uma seringa que passa primeiro por um filtro de PTFE de 0,2 micro e analisado no HPLC. Foram utilizados 0,2 µl de analítico em cada corrida de HPLC, na Figura 7 está apresentado o esquema ilustrativo.



Figura 6 : Equipamento para extração por fase sólida.

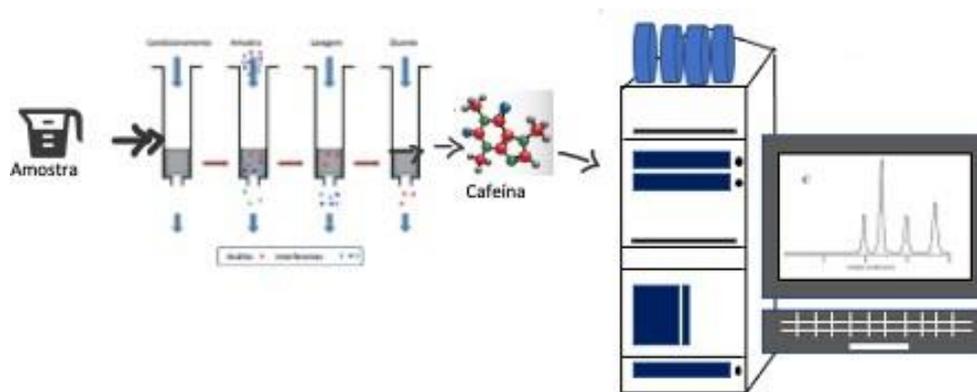


Figura 7: Processo ilustrativo da amostra do efluente tratada no SPE e analisada no HPLC/MS.

As concentrações de cafeína foram determinadas com um HPLC acoplado a cromatógrafo de massa LCQ Fleet.

As amostras preparadas foram injetadas utilizando um método adequado para este estudo. Com 0,25 µl de amostra em modo isocrático como fase móvel utilizou-se acetonitrilo: água MilliQ na razão 40:60. A determinação foi efetuada sob comprimentos de onda UV de 272 nm, com coluna cromatográfica do tipo C18 fase reversa (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) uma vazão de 0,100 mL.min⁻¹, com tempo de corrida de 20 minutos e temperatura do forno da coluna à 25°C.

3.5 Análise e tratamento de dados

Os resultados obtidos durante a pesquisa foram tratados e analisados no programa no Microsoft Excel 2013. Em todas as figuras foram utilizados os respectivos valores médios e desvio padrão (média ± σ).

4 Resultados e Discussão

4.1. Caracterização e composição da biomassa foliar

O estudo da biomassa vegetal nos leitos teve como objetivo efetuar determinações como: Magnésio; Clorofila a, b e totais. Tendo como objetivo observar se a planta sofreu alterações com a influência da cafeína.

Os resultados obtidos encontram-se descritos nos próximos subtítulos.

4.1.2 Concentração de Magnésio (Mg)

O magnésio é um macronutriente secundário utilizado pelas plantas, sendo crucial para a formação da clorofila, a substância responsável pela absorção de luz e transferência de energia na fotossíntese. Sem o magnésio, as plantas teriam dificuldade para produzir seu próprio alimento e crescer adequadamente. Sendo primordial para o sistema radicular das plantas, auxiliando na formação de raízes que ajudam no aumento da produtividade (Veloso et al., 2022)

Segundo Yousaf et al., (2021), o ciclo do magnésio nas zonas húmidas artificiais está intimamente ligado à dinâmica dos nutrientes e à produtividade global do ecossistema. A disponibilidade de magnésio pode influenciar o crescimento e o desenvolvimento da vegetação das zonas húmidas. O magnésio faz parte da estrutura da molécula de clorofila, para além de desempenhar outras funções essenciais ao crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais. Tal como outros macronutrientes, é móvel no interior da planta, pelo que os sintomas de deficiência geralmente surgem, em

primeiro lugar, nas folhas mais velhas (Veloso et al., 2022).

A Fig. 8, demonstra a concentração de magnésio na planta que o leito 2 e 3 apresentam comportamentos semelhantes, já no leito 1 verifica-se uma alteração maior em relação aos outros leitos. Podendo concluir que a cafeína não teve influência no magnésio.

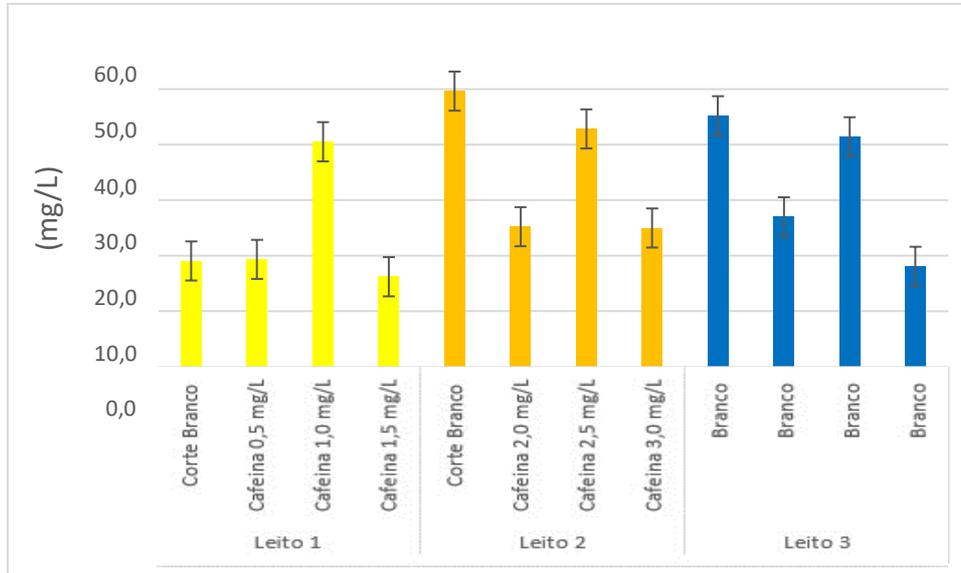


Figura 8 : Concentração de magnésio na planta nos leitos 1, 2 e 3,

Segundo Veloso et al., (2022) o magnésio está diretamente ligada a clorofila, este dado pode ser comprovado pelas Figuras 9, 10 e 11 apesar destes valores , não foram identificados sinais de amarelamento nas folhas das plantas,, que podem identificar toxicidade.

4.1.3 Teor de clorofilas *a*, *b* e *total*.

As clorofilas *a* e *b* são essenciais para a fotossíntese, uma vez que captam a energia da luz e iniciam a conversão de dióxido de carbono e água em glucose e oxigênio. Assim, a presença e abundância de clorofilas nas zonas húmidas artificiais são indicativas da atividade fotossintética e da produtividade global das plantas Yousaf et al., (2021),

Segundo Mamun et al., (2021), estratégias como a gestão de nutrientes, controlo do fluxo de água e gestão de plantas (por exemplo, colheita ou remoção de biomassa vegetal excessiva) podem ser implementadas para regular os níveis de clorofila e prevenir efeitos indesejáveis como o crescimento excessivo de algas.

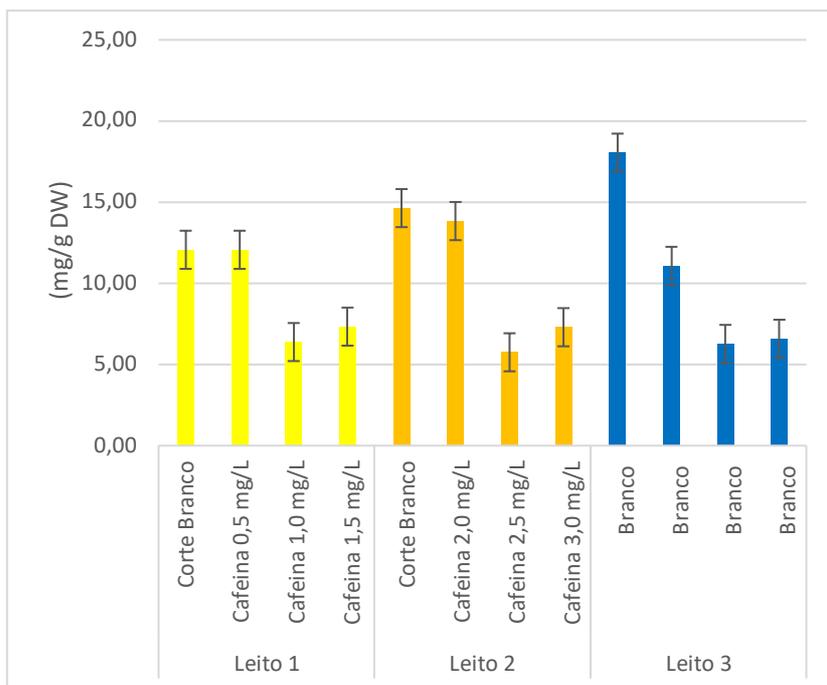


Figura 9 : Concentração de clorofila a na planta nos leitos 1, 2 e 3, em função da concentração de cafeína aplicada.

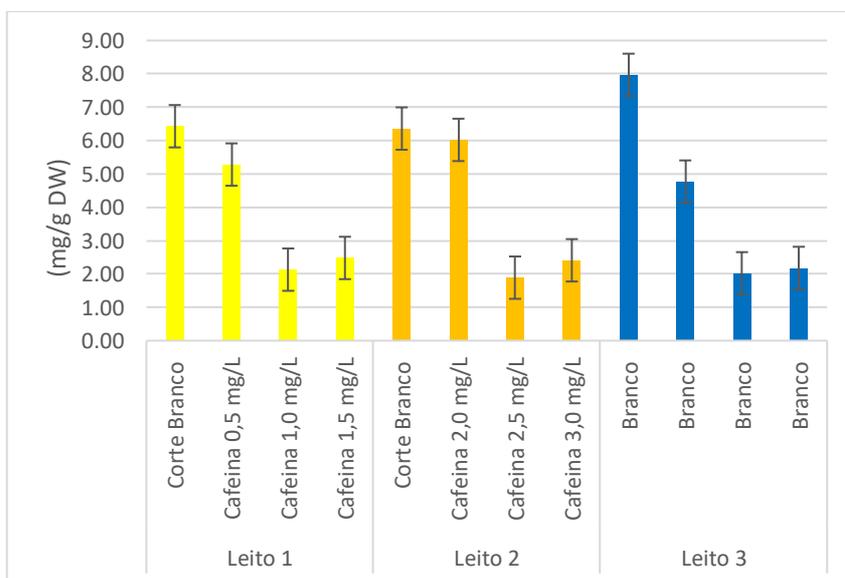


Figura 10: Concentração clorofila b na planta. planta nos leitos 1, 2 e 3, em função da concentração de cafeína aplicada.

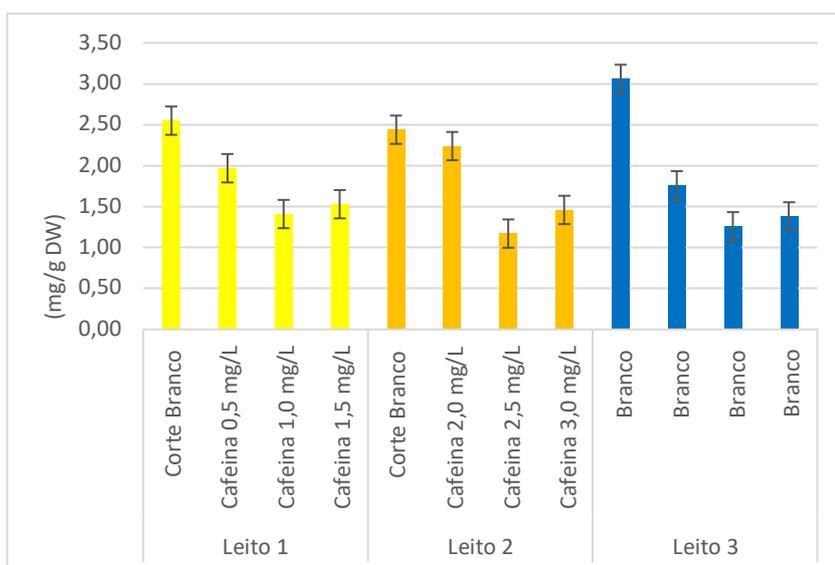


Figura 11: Concentração de clorofila total na planta nos leitos 1, 2 e 3, em função da concentração de cafeína aplicada.

Pode ser observada uma tendência de diminuição dos valores de clorofila *a*, *b* e *total* para todos os leitos, observa-se que na primeira concentração com 0,5 mg/L no leito 1 e 2,0 mg /l no leito 2 de cafeína aplicada os valores de clorofila mantém próximo ao inicial sem a aplicação da cafeína. Após este período e com o aumento da concentração de cafeína no leito os resultados de clorofila diminuem. Este comportamento foi observado em todos os leitos inclusive no branco, o que se leva a concluir que a medida que o tempo vai se passando as plantas vão diminuindo a concentração de clorofila naturalmente por adaptação ao meio ou outro fator ambiental, podendo este fator não estar ligado a contaminação do leito pelo fármaco.

Outro fator é um indicador do processo de envelhecimento, estresse e danos à planta e ao aparelho fotossintético, que é expresso pela quebra mais rápida de Clorofila. As folhas tornam-se mais verde-amareladas e exibem valores mesmo tão baixos quanto 2,5 a 3,0 à medida que a processo de envelhecimento progride. Esta análise é feita segundo Lichtenthaler H.K. (1987).

4.2. Caracterização físico-química das amostras de efluente e afluente dos leitos

Foi medido o caudal de alimentação dos leitos de entrada e saída de cada um dos leitos, através de uma proveta graduada e com o auxílio de um cronômetro todos os dias em que os ensaios decorreram.

4.2.1. pH

O pH é um dos parâmetros que deve ser monitorizado em ZHA pois afeta a capacidade de adsorção dos materiais utilizados como matriz e também interfere no desenvolvimento dos microrganismos e plantas presentes no leito, devido aos processos que ocorrem no interior do leito (Kadlec et al., 2009); (Wu et al., 2015).

Os pH em ZHA são cruciais para manter as funções ecológicas desejadas. A monitorização regular do pH, juntamente com outros parâmetros de qualidade da água.

As Figuras 12, 13 e 14 apresentam os resultados de pH obtidos para os leitos 1, 2 e 3.

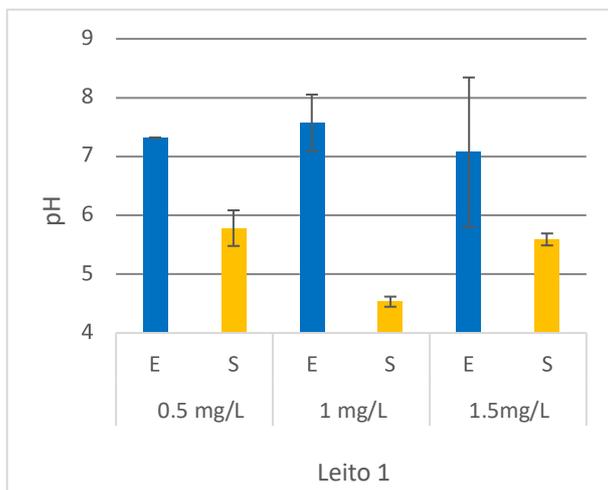


Figura 12: Valores de pH da água, para a entrada (E) e para a saída (S) dos respectivos leitos (leito 1 cafeína).

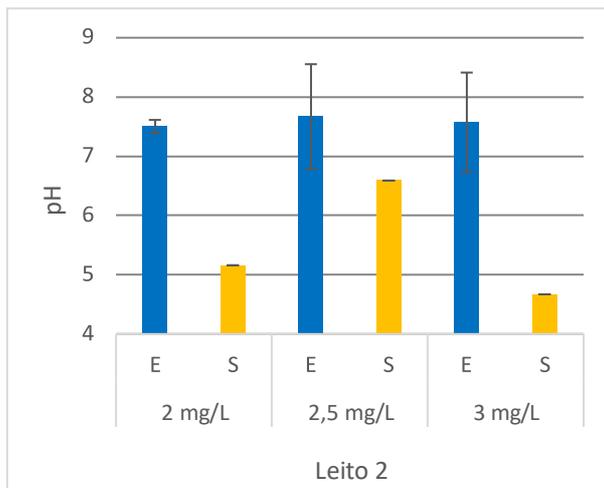


Figura 13: Valores de pH da água, para a entrada (E) e para a saída (S) dos respectivos leitos (leito 2 cafeína).

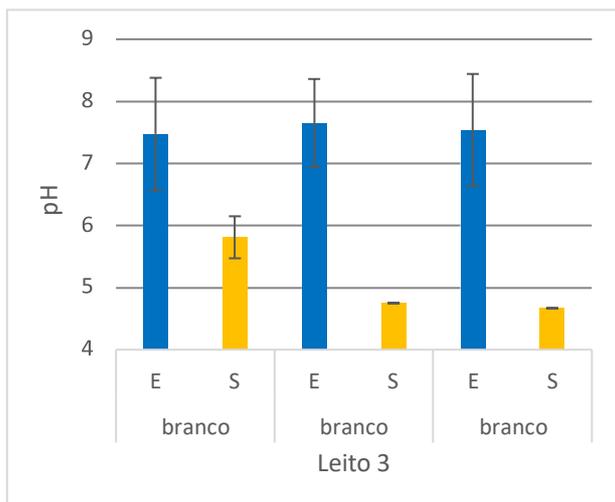


Figura 14: Valores de pH da água, para a entrada (E) e para a saída (S) dos respectivos leitos (leito 3 branco)

Pode observar-se das figuras, 12, 13 e 14 que pH apresentou um decréscimo à saída de cada um dos leitos, em todos os ensaios 1, 2 e 3.

4.2.2. Condutividade elétrica

As Figuras 15, 16 e 17 apresentam os resultados médios obtidos na condutividade elétrica (CE) medidos no efluente e afluente de cada um dos leitos.

A CE pode indicar indiretamente a presença de nutrientes dissolvidos, que são essenciais para o crescimento das plantas e para a produtividade do ecossistema. A monitorização dos níveis de CE pode ajudar a avaliar a disponibilidade de nutrientes e potenciais desequilíbrios que podem afetar o crescimento das plantas e a qualidade da água.

Para todas as amostras a condutividade elétrica quando comparado a entrada (E) e a saída (S) observando o desvio padrão os valores de cafeína em cada ensaio, não apresenta uma grande variação.

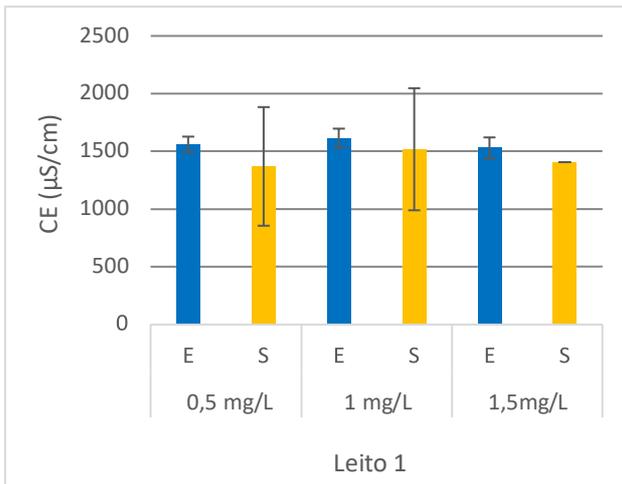


Figura 15: Valores de condutividade da água para a entrada (E) e para a saída (S) leito 1 cafeína.

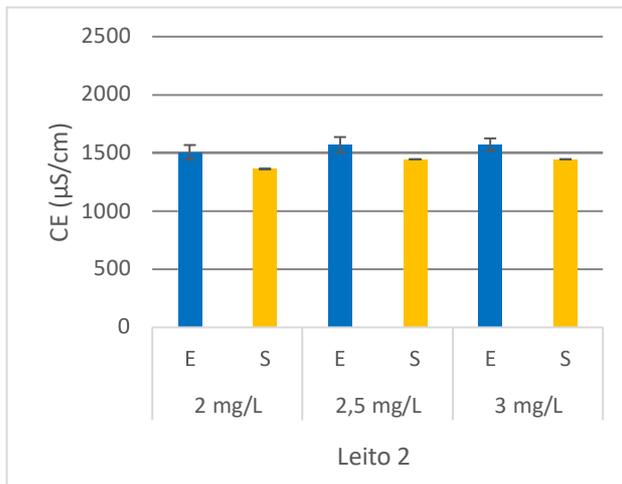


Figura 16: Valores de condutividade da água para a entrada (E) e para a saída (S) do leito 2 cafeína.

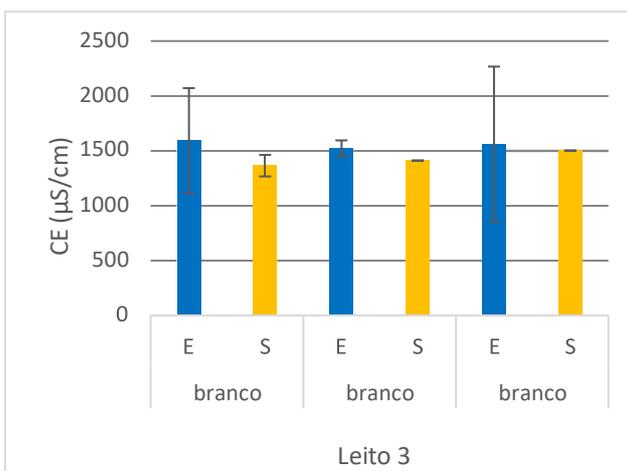


Figura 17: Valores de condutividade da água para a entrada (E) e para a saída (S) do leito 3 branco.

4.2.3. Oxigénio dissolvido

O oxigénio dissolvido (OD) é definido como o oxigénio presente numa determinada amostra de água. As ZHA recebem oxigénio de duas fontes primárias: a difusão do oxigénio atmosférico através das plantas e no caso dos sistemas verticais, devido ao escoamento do efluente e ao espaçamento da matriz de suporte, e a produção fotossintética de oxigénio. A taxa de consumo nas zonas húmidas é determinada por fatores como a atividade microbiana, a decomposição de matéria orgânica e a respiração de plantas. O equilíbrio entre as fontes e as necessidades de oxigénio afetam os níveis de OD na zona húmida(Gizińska-Górna et al., 2020).

Pode-se observar nas Fig. 18, 19 e 20 que na primeira etapa onde as concentrações de cafeína foram de 0,5 e 2,0 do experimento a diminuição de OD foi um pouco maior, este resultado pode estar relacionado com a adaptação dos microrganismos e sua interação nos leitos.

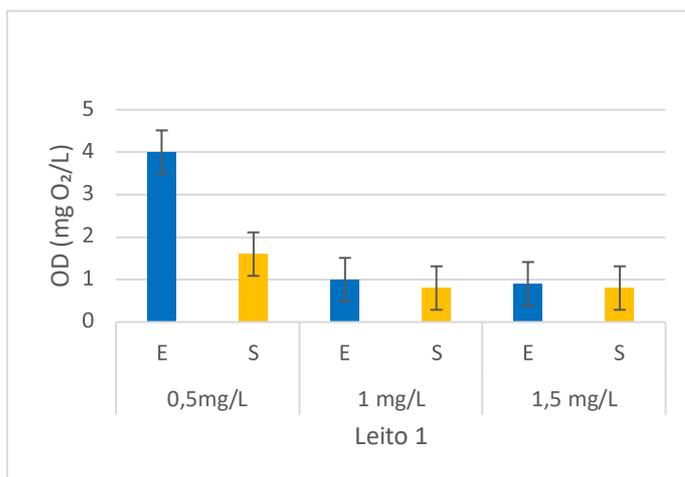


Figura 18: Valores de oxigénio dissolvido da água para a entrada (E) e para a saída (S) ds leito 1 cafeína.

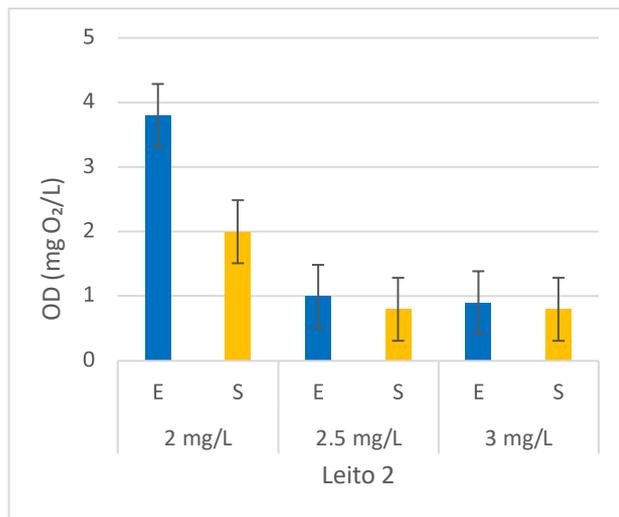


Figura 19: Valores de oxigénio dissolvido da água para a entrada (E) e para a saída (S) do leito 2 caféina.

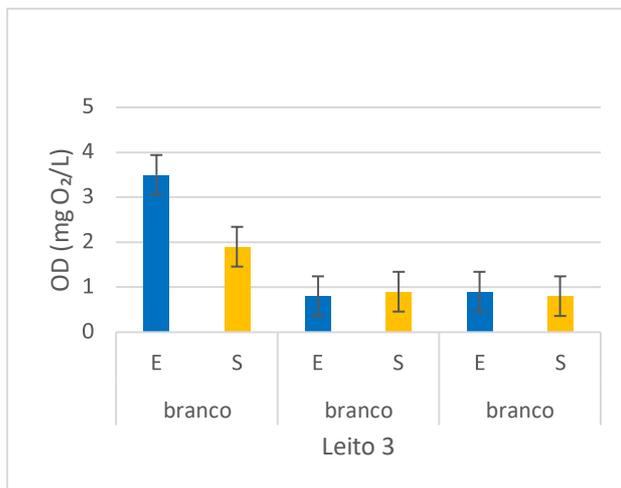


Figura 20: Valores de oxigénio dissolvido da água para a entrada (E) e para a saída (S) leito 3 branco.

4.2.4. Potencial redox

O potencial redox (Eh) é um parâmetro utilizado para definir o tipo de ambiente existente, no que respeita às condições de oxidação: valores de potencial redox superior a 300 mV são indicativos de condições aeróbias, enquanto valores inferiores a -100 mV correspondem a condições anaeróbias (Behum et al., 2011). Foram avaliados o Eh das águas na entrada e saída as Figuras 21, 22 e 23 apresentam os resultados.

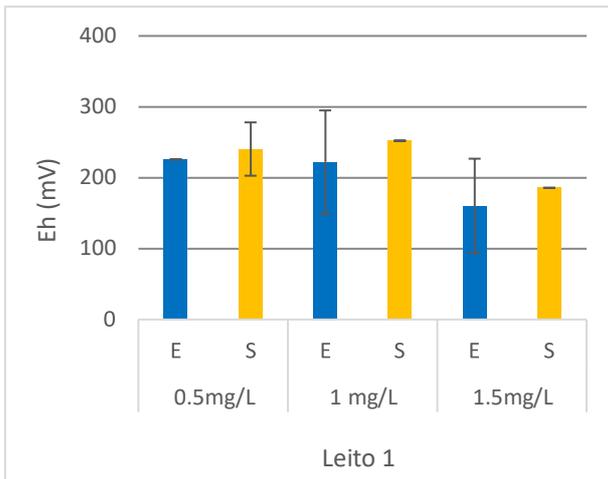


Figura 21: Valores de potencial redox da água para a entrada (E) e para a saída (S) do leito 1 cafeína.

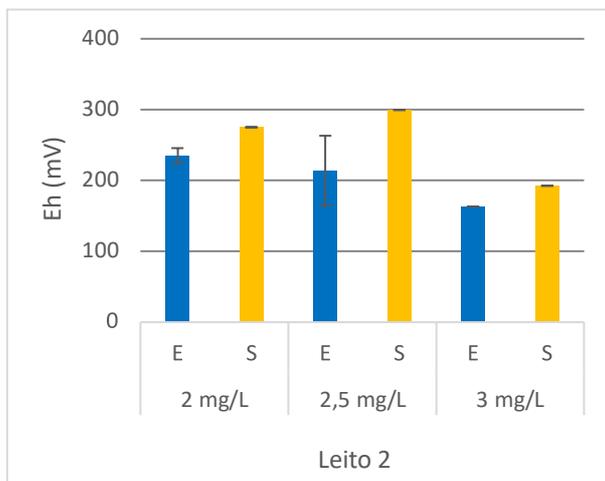


Figura 22: Valores de potencial redox da água para a entrada (E) e para a saída (S) do leito 2 cafeína.

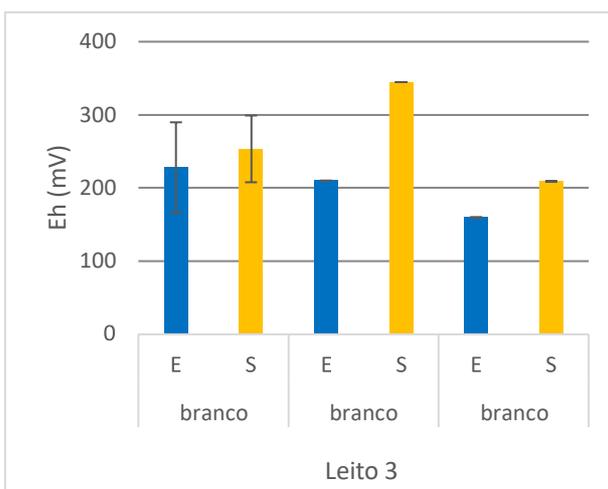


Figura 23: Valores de potencial redox da água para a entrada (E) e para a saída (S) do leito 3 branco,

Pode-se observar pelos gráficos que as condições dos leitos são aeróbias, mas sem muitas alterações nas entradas e saídas.

A ausência de alterações significativas no potencial redox pode ser relacionada com a remoção da cafeína da água que pode não resultar em alterações significativas, contribuindo ainda mais para a estabilidade do potencial redox.

4.3. Cafeína

Os resultados encontrados a partir da quantificação da cafeína, estão apresentados na Figura 24.

A cafeína por ser altamente solúvel em água, geralmente é encontrada em maiores concentrações em matrizes aquáticas. Supondo que seja removido por degradação microbiana ou processos realizados pelas plantas, tende a ser eliminada mais rapidamente no verão do que no inverno (Zhang et al., 2018), que é o caso da região em estudo com temperatura média de 27,7 °C.

Como anteriormente referido foram alimentados os leitos com concentrações de cafeínas crescentes por um período de 6 semanas. A cafeína foi quantificada e analisada no afluente e no efluente.

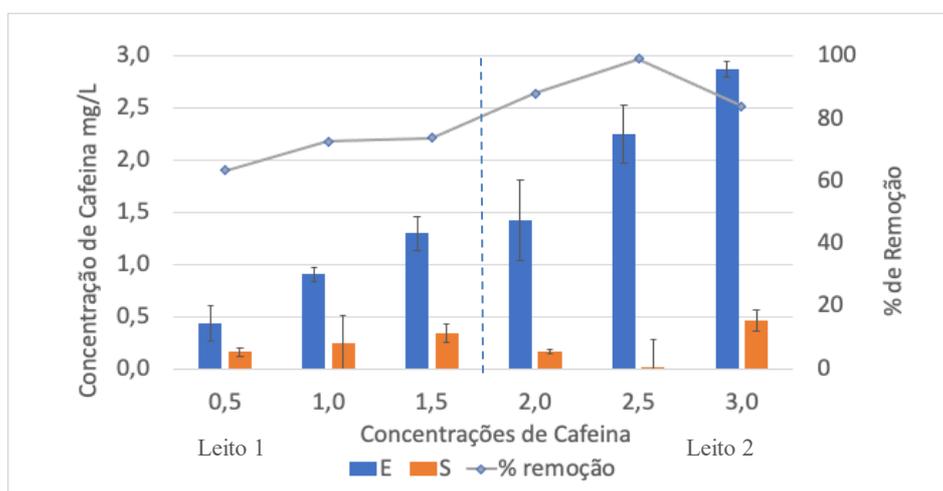


Figura 24 : Análise de concentração de cafeína do leito 1 e leito 2 em cada ensaio com concentrações de 0,5;1,0; 1,5 e 2,0; 2,5 e 3,0 mg/L

A eficiência de remoção média para o Leito 1 foi de $70\pm 1\%$ e para o Leito 2 foi de $93\pm 1\%$. Estes valores são inferiores aos apresentados na literatura por alguns autores como Zhang et al. (2018), Hijosa-Valsero et al. (2010) e Matamoros et al. (2009), com médias que variaram entre 95 % a 99 % para leitos do mesmo tipo aos utilizados neste trabalho. Tais diferenças de eficiência de remoção média de cafeína podem ser relacionadas ao número das plantas que foram utilizadas nos experimentos e principalmente ao tempo de retenção hidráulico, uma vez que, tanto Hijosa-Valsero et al. (2010) e Matamoros et al. (2009), utilizaram maior número de plantas e obtiveram tempos de retenção hidráulicos superiores aos utilizados neste trabalho.

Jalowski et al, (2021) obtiveram eficiências de remoção de $69 \pm 2 \%$, valor inferior aos encontrados nos estudos, sua justificativa foi que a cafeína pode ter sido removida através da assimilação pela biomassa vegetal, nomeadamente as raízes e a parte aérea. No entanto, apenas se determinou a cafeína presente nas folhas das plantas, sem avaliação das raízes ou matriz de suporte.

Quando analisamos estudos por comparação observamos que Zhang et al., (2017), comparou os sistemas de fluxo vertical e fluxo horizontal para remoção de cafeína e conclui que o sistema de fluxo vertical usado na pesquisa é melhor pois contém melhores condições de oxigenação do leito o que facilita a remoção da cafeína Os resultados apresentados nas Figuras 19, 20 e 21, demonstram uma diminuição do OD validando a hipótese que a cafeína interage com oxigênio nos leitos para sua remoção.

Matamoros et al (2007) conseguiu uma remoção a cerca de 99% para cafeína utilizando brita grossa como matriz de suporte em comparação com os aglomerados leves de argila expandida (Leca[®]NR 10/20). Em comparação com o trabalho apresentado pode-se dizer que os dois métodos de enchimento conseguem atingir altos níveis de remoção de cafeína sendo eficazes.

Oliveira et al (2019) utilizou *Heliconia Rostrata* como macrófita em comparação aos estudos realizados nessa pesquisa onde foram utilizadas a *Vetiveria Zizanioides* como macrófitas, observou-se nos dois estudos uma remoção acima de 90% de cafeína.

5. Conclusão

Os resultados obtidos nos leitos mostraram uma eficiência de remoção de:

- 70% quando as concentrações de cafeína foram de 0,5 a 1,5 mg/L
- 93% quando as concentrações de cafeína foram de 2,0 a 3,0 mg/L

Verificou-se que o aumento da concentração de cafeína nos leitos 1 e 2 não interferiu nos resultados físico-químicos estudados como: pH, condutividade elétrica, oxigénio dissolvido e potencial redox, devido aos resultados semelhantes obtidos no leito 3 branco.

As variações ocorridas nestes parâmetros foram eventualmente causadas pela presença de azoto amoniacal aproximadamente de 130 mg/L na alimentação de todos os leitos.

Por outro lado, a presença de azoto em concentrações elevadas parece não interferir nas remoções de cafeína uma vez que se alcançou altas eficiências de remoção.

Não se verificou situações de estresse na biomassa comprovadas pelos cálculos da razão entre a clorofila a e b e totais.

Sugere-se para trabalhos futuros uma maior abordagem no estudo das plantas, com análises aplicadas a morfologia, seu comportamento e seu desenvolvimento com concentrações elevadas de cafeína, e que possam fornecer dados sobre os valores de cafeína nas folhas das plantas.

6. Referência Bibliográfica

Abdel-Raouf, N., AL-Homaidan, A. A.; Ibraheem, I. B. M. - Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19:3 (2012) 257-275.

Al Bratty, M., Al-Rajab, AJ, Rehman, Z. et al. Remoção rápida e eficiente de cafeína da água usando descarga de barreira dielétrica. *Appl Water Sci* 11, 97 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13201-021-01413-5>.

Almeida, A. Remoção de Compostos de Azoto em Efluentes de Suinicultura por Recurso à Fitorremediação. Dissertação para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia do Ambiente, pp. 7 - 40 (2011).

Almeida, A., Mello, M., Durão, A., Carvalho, F., & Ribeiro, C. Remoção de matéria orgânica e compostos de azoto em efluentes de suinicultura por fitorremediação. Comunicação submetida ao 18.º ENASB/18.º SILUBESA. Porto (10-12 de Outubro de 2018).

Almeida, H. E. Preparação e caracterização de dispersões sólidas e micropartículas lipídicas contendo Ibuprofeno (Dissertação). Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto., Porto (2009).

Almeida, A., Oliveira, J., Matias, F., Ribeiro, C., Silveira, D., & Tavares, J. Removal of Emergent Pollutants by a Vertical Flow Constructed Wetland with *Vetiveria Zizanioides*: A Case Study for Caffeine. *KnE Materials Science*, 7(1), 184–192 (2022).

Arnoud de Wilt, Yujie He, Nora Sutton, Alette Langenhoff, Huub Rijnaarts, Sorption and biodegradation of six pharmaceutically active compounds under four different redox conditions, *Chemosphere*, Volume 193, Pages 811-819, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.084> (2018).

Barros, J. F. C. (2020). Fertilidade do solo e Nutrição das plantas. ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA. <https://dspace.uevora.pt/rdpc/bitstream/10174/28120/1/P.%20Pedag%C3%B3gica%20-%20Fertiliza%C3%A7%C3%A3o%20das%20culturas.pdf> eurofins (2023). Agro testing Portugal. Eurofins Scientific.

Bedoya-Ríos, D. F., Lara-Borrero, J. A., Duque-Pardo, V., Madera-Parra, C. A., Jimenez, E. M., & Toro, A. F. Study of the occurrence and ecosystem danger of selected endocrine disruptors in the urban water cycle of the city of Bogotá, Colombia. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 53(4), 317-325 (2018).

Buerge, I. J.; Poiger, T.; Müller, M. D.; Buser, H. R. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environmental Science & Technology*, v. 37, p. 691–700, (2003).

Canela, M. C.; Jardim, W. F.; Sodr , F. F.; Grassi, M. T. Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil. 1st ed. São Carlos: Cubo, c(2014). 12-18 p.

Carballa, M., Omil, F., Lema J.M., Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. *Water Research* 39, 4790-4796 (2007).

Chen, Y. H.; Huang, Y. H.; Wen, C. C.; Wang, Y. H.; Chen, W. L.; Chen, L. C.; Tsay, H. J. Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 30, p. 440-447, (2008).

Chiu, K., Y, Z., & Wong, M. Enhanced uptake of As, Zn, and Cu by *Vetiveria zizanioides* and *Zea mays* using chelating agents. (60), pp. 1365-1375 (2005).

Cooper, P. Nitrification and denitrification in hybrid constructed wetlands systems. In V. J., *Transformations of Nutrients in Natural and Constructed Wetlands* (pp.257-270). Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers (2001).

Cull, R., Hunter, H., Hunter, M., & Truong, P. N. Application of Vetiver Grass Technology in off-site pollution control. II. Tolerance of vetiver grass towards high levels of herbicides under wetland conditions. *Vetiver Conf., Proc. Second Intern.*, Thailand (2000).

Daneshvar, A., Aboulfadl, K., Viglino, L., Broséus, R., Sauvé, S., Madoux-Humery, A. S., ... & Prévost, M. Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region. *Chemosphere*, 88(1), 131-139 (2012).

Daughton, C.G., Ternes T.A., *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?* *Environment Health Perspective* 107, 907-938 (1999).

Dias, A.F.J., *Tratamento de Efluentes da Indústria Farmacêutica por Processos Avançados de Oxidação. Relatório Final do Trabalho de Dissertação. Escola Superior de Tecnologia e Gestão Instituto Politécnico de Bragança. Bragança* (2011).

Dietz, A. C., & Schnoor, J. L. Advances in phytoremediation. *Environmental health perspectives*, 109(suppl 1), 163-168 (2001).

Dordio, A.V., Miranda, S., Ramalho, J.P.P., Carvalho, A.J.P., *Mechanisms of removal of three widespread pharmaceuticals by twoclay materials. Journal of Hazardous Materials* 323, 575–583 (2017).

Du, X. et al. - Dissolved oxygen control in activated sludge process using a neuralnetwork-based adaptive PID algorithm. *Applied Sciences*. 8:2 (2018) 261.

Fernández-Escobar, R.; García-Novelo, J.M.; Molina-Soria,C.;Parra, M. A. An approach to nitrogen balance in olive orchards. *Science Horticulture*,v. 135, p.219–226, (2012).

Froehner, S., & Martins, R. F. Evaluation of the chemical composition of sediments from the Barigüi River in Curitiba, Brazil. *Química Nova*, 31, 2020-2026 (2008).

Gracia-Flor, Emma, et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia (2012).

Gianfreda, L., & Rao, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and microbial technology*, 35(4), 339-354 (2004).

Gizińska-Górna, M.; Józwiakowski, K.; Marzec, M. Confiabilidade e Eficiência da Remoção de Poluentes em Zona Húmida Construída em Quatro Estágios do Tipo SSVF-SSHF-SSHF-SSVF. *Água* (2020), 12, 3153. <https://doi.org/10.3390/w12113153>

Gokulakrishnan S, Chandraraj K, Gummadi SN Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enz Micro Technol* 37(2):225–232 (2005).

Gonçalves, E. S.; Rodrigues, S. V; da Silva-filho, E. V. The use of caffeine as a chemical marker of domestic wastewater contamination in surface waters: seasonal and spatial variations in Teresópolis, Brazil. *Ambiente & Agua - an Interdisciplinary Journal Applied Science*, v. 12, n.2, p. 192-202, (2017).

Gonzalez-Rey, M.; Bebianno, M. J. - Does selective serotonin reuptake inhibitor (ISRS) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environmental Pollution*. 173 (2013) 200-209.

Greenwood, D. The effect of oxygen concentration on the decomposition of organic materials in soil. *Plant Soil*, 14 (4), 360-376 (1961).

He, Y., et al. - Degradation of pharmaceuticals in wastewater using immobilized TiO₂ photocatalysis under simulated solar irradiation. *Applied Catalysis B Environmental*. 182 (2016) 132-141.

Henze, M.; Comeau, Y. - Wastewater characterization. *Biological wastewater treatment: Principles modelling and design*. (2008) 33-52.

Herbert, ER, P. Boon, AJ Burgin, SC Neubauer, RB Franklin, M. Ardón, KN Hopfensperger, LPM Lamers e P. Gell. Uma perspectiva global sobre a salinização de zonas úmidas: consequências ecológicas de uma ameaça crescente às zonas úmidas de água doce (2015).

Jalowski, B. J., Junkes, B. d., Borralho, T., & Almeida, A. Remoção de cafeína de efluentes através de leito de macrófita de fluxo subsuperficial vertical plantado com *Vetiveria zizanioides* Autores. Obtido em Abril de 2023, de Portal de Periódicos do IFSC: (2020). <https://periodicos.ifsc.edu.br/index.php/rtc/article/view/2855>

Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Petrovic, M., Barcelo, D., Emerging and Priority Pollutants in Rivers. *Hdb Environment Chemistry* 4, 1–24 (2012).

Jones, O. A.; Voulvoulis, N.; Lester, J. N. - Potential impact of pharmaceuticals on environmental health. *Bulletin of the World Health Organization*. 81:10 (2003) 768-76. ISSN 0042-9686.

Kadlec, R. H.; Wallace, S. *Treatment Wetlands*, Second Edition. ISBN 1566705266 (2009).

Kurissery, S.; Kanavillil, N.; Verenitch, S.; Mazumder, A. Caffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from Lake Simcoe watershed. *Ecological Indicators*, v. 23, p. 501-508, (2012).

Kümmerer, K. - *Pharmaceuticals in the Environment. Sources Fate, Effects and Risks*. 3ª Edição. Springer, (2018). ISBN: 978-3-540-74663-8

Kyzas, G. Z., Fu, J., Lazaridis, N. K., Bikiaris, D. N Matis, K. A., New approaches on the removal of pharmaceuticals from wastewaters with adsorbent materials. *Journal of Molecular Liquids* 209, 87–93 (2015).

Lantzke, I., Heritage, A., Pistillo, G., & Mitchell, D. Phosphorus removal rates in bucket size planted wetlands with a vertical hydraulic flow. *Water Res.*, pp. 1280-1286 (1998).

Lekang, O. I., & Kleppe, H. Efficiency of nitrification in trickling filters using different filter media. *Aquacultural engineering*, 21(3), 181-199 (2000).

Lichtenthaler, H. K. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology* (Vol. 148, pp. 350-382). Academic Press (1987).

Lin AY, Lin CA, Tung HH, Chary NS Potential for biodegradation and sorption of acetaminophen, caffeine, propranolol and acebutolol in lab-scale aqueous environments. *J Hazard Mater* 183:242–250 (2010).

Liu, G., Du, Q. & Li, J. Interactive effects of nitrate-ammonium ratios and temperatures on growth, photosynthesis, and nitrogen metabolism of tomato seedlings. *Scientia Horticulturae*, 241, 41-50 (2017).

Luo, Y. et al. - A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment*. 473-474 (2014) 619-641.

Macek, T., Macková, M., & Káš, J. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology advances*, 18(1), 23-34 (2000).

Masi, F., & Martinuzzi, N. Constructed wetlands for the Mediterranean countries: Desalination, 215 (2007).

Matamoros, V., Arias, C., Brix, H., & Bayona, J. M. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from urban wastewater in a pilot vertical flow constructed wetland and a sand filter. *Environmental science & technology*, 41(23), 8171-8177 (2007).

Mavioso, J. Tratamento de águas através de leitos de macrófitas – A influência da vegetação. *Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente*, Instituto Superior Técnico de Lisboa, Lisboa (2010).

Melo, A.F.S.R., Oliveira, J.F., Fia, F.R.L. et al. Microcontaminants Removal in Constructed Wetlands with Different Baffle Arrangements and Cultivated with *Pennisetum setaceum*. *Water Air Soil Pollut* 233, 322 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05822-3>

Metcalf, & Eddy. *Wastewater engineering treatment disposal and reuse*. (4^o ed.). New York: McGraw-Hill Higher Education (2003).

Mocek-Plóciniak, A.; Mencil, J.; Zakrzewski, W.; Roszkowski, S. Fitorremediação como um remédio eficaz para remover oligoelementos de ecossistemas. *Plants* (2023) , 12 ,1653. <https://doi.org/10.3390/plants12081653>

Monte, M. H. et al. - Tratamento de Águas Residuais – Operações e Processos de Tratamento Físico e Químico. Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Universidade da Beira Interior, (2017). ISBN 978-989-8360-32-8

Mota, P.R.D.; Boas, R.L.V.; Sousa, V.F.; Ribeiro, V.Q. Desenvolvimento de plantas de crisântemo cultivadas em vaso em resposta a níveis de condutividade elétrica. Engenharia Agrícola, v.27, p.164-171, (2007).

Mucciarelli, M., Bertea, C. M., Cozzo, M., Scannerini, S., & Gallino, M. Vetiveria zizanioides as a tool for environmental engineering. Acta Horti, pp. 261-270 (1998).

Munoz, R.; Guieysse, B. - Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. Water Research. 40:15 (2006) 2799-2815.

Nivala, J., Kahl, S., Boog, J., van Afferden, M., Reemtsma, T., & Müller, R. A. Dynamics of emerging organic contaminant removal in conventional and intensified subsurface flow treatment wetlands. Science of the Total Environment, 649, 1144-1156 (2019).

Kadlec, R. The inadequacy of first-order treatment wetland models. Ecological Engineering, 15 (1-2), pp. 105-119 (2000).

Oliveira, J. Diagnostico e optimização do tratamento de águas residuais em leitos de macrófitas. Dissertação de Mestrado em Tratamento em Águas e Águas Residuais (pp.4 - 62). Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (2019).

Overton, O.C.; Olson, L.H.; Majumder, S.D.; Shwiyat, H.; Foltz, M.E.; Nairn, R.W. Wetland Removal Mechanisms for Emerging Contaminants. Land (2023), 12, 472. <https://doi.org/10.3390/land12020472>

Paíga P, Lolić A, Hellebuyck F, Santos LH, Correia M, Delerue-Matos C. Development of a SPE-UHPLC-MS/MS methodology for the determination of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawater. J Pharm Biomed Anal. (2015) Mar 15; 106:61-70. doi: 10.1016/j.jpba.2014.06.017.

Papageorgiou, M.; Kosma, C.; Lambropoulou, D. - Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. Science of The Total Environment. 543 (2016) 547–569.

Pescod, M. B. - Wastewater treatment and use in agriculture. Irrigation and Drainage. 47 (1992).

Pezeshki, S. R. Wetland plant responses to soil flooding. Environmental and Experimental Botany, 46 (3), 299 - 312. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. Lin, AY, Yu, TH e Lateef, SK. 2009, Journal of hazardous materials, pp. ISSN 1873-3336. 167:1-3 (2009) 1163–9 (1994).

Reddy PMK, Krushnamurty K, Mahammadunnisa SK, Dayamani A, Subrahmanyam C Preparation of activated carbons from bio-waste: effect of surface functional groups on methylene blue adsorption. *Int J Environ Sci Technol* 12:1363–1372 (2014).

Reddy PMK, Mahammadunnisa S, Subrahmanyam C Catalytic non-thermal plasma reactor for mineralization of endosulfan in aqueous medium: a green approach for the treatment of pesticide contaminated water. *Chem Eng J* 238:157–163 (2014)

Robles-Molina, J. et al. - Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1350 (2018) 30-43.

Rosa, L. V.; Ardais, A. P.; Costa, F. V.; Fontana, B. D.; Quadros, V. A.; Porciúncula, L. O.; Rosemberg, D. B. Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 165, p. 1-8, (2018).

Roser, M.; Ortiz-Ospina, E.; Ritchie, H. - Life expectancy. *Our World in Data*. (2013).

Rousseau, D. P., Story, A., Vanrolleghem, P., & Pauw, N. Constructed wetlands for water reclamation. *Desalination*, 218 (2008).

Saldanha, C. B., Emrich, E. B., Negrão, E. N. M., & Castioni, G. A. F. *Ciência do Solo: Fertilidade do Solo e Nutrição Mineral de Plantas*. http://cm-kl-content.s3.amazonaws.com/201602/INTERATIVAS_2_0/CIENCIA_DO_SOLO_FERTILIDADE_DO_SOLO_E_NUTRICA_O_MINERAL_DE_PLANTAS/UI/LIVRO_UNICO.pdf (2016).

Santos-Silva, T. G.; Montagner, C. C.; Martinez, C. B. R. Evaluation of caffeine effects on biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 58, p. 237-242, (2018).

Siegener, R., & Chen, R. F. Caffeine in Boston harbor seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 44(5), 383-387 (2002).

Sodré, F. F.; Locatelli, M. A. F.; Jardim, W. F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water Air and Soil Pollution*, v. 206, p. 57-67, (2010).

Sonune, A.; Ghate, R. - Developments in wastewater treatment methods. *Desalination*. 167 (2004) 55-63.

Stottmeister, U., Wießner, A., Kusch, P., Kappelmeyer, U., & Kästner, M. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*. 22 (2003).

Sui Q, Huang J, Deng S, Yu G, Fan Q Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. *Water Res* 44(2):417–426 (2010).

Summers, Ryan, Gopishetty, Sridhar, Mohanty, Sujit and Subramanian, Mani. "New genetic insights to consider coffee waste as feedstock for fuel, feed, and chemicals" *Open*

Chemistry, vol. 12, no. 12, (2014), pp. 1271-1279. <https://doi.org/10.2478/s11532-014-0550-2>

Tanner, C. Crescimento e dinâmica de nutrientes de junco de tronco macio em zonas úmidas construídas tratando águas residuais ricas em nutrientes. *Ecologia e Gestão de Zonas Húmidas* 9 , 49–73 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1008454901954>

Trung, P., & Hart, B. Vetiver System for Wastewater Treatment. Technical. Technical Bulletin nº 2001/2 (2001).

Truong, P., & Baker, D. Vetiver Grass System for Environmental Protection. (O. Board, Ed.) Technical Bulletin nº 1998/1 (2001).

Veloso, A., Sempiterno, C., Calouro, F., Rebelo, F., Pedra, F., Castro, Isabel V., Gonçalves, M. da C., Marcelo, M. da E., Pereira, P., Fareleira, P., Jordão, P., Mano, R., & Fernandes, R. Manual de fertilização das culturas (: Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.-INIAV) (2022).

Verhoeven, J. T., & Meuleman, A. Wetlands for wastewater treatment: Opportunities and limitations. *Ecological Engineering*. 12 (1999).

Vieritz, A., Truong, P., Gardner, T., & Smeal, C. Modelling Vetiver growth and nutrient uptake for effluent irrigation schemes. Guangzhou, China (2003).

Vymazal, J. Remoção de nutrientes em vários tipos de zonas húmidas construídas. *Em Science of the Total Environment* (pp. 48-65). 380 (2007).

Vymazal, J. Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: A review. *Ecological engineering*, 73, 724-751 (2014).

Vymaza, J., Dvorakova Brezinova, T., Kozeluh, M., Kule, L. “Ocorrência e remoção de fármacos em quatro zonas húmidas construídas em escala real na República Checa - o primeiro ano de fiscalização,” *Ecol. Eng.*, vol. 98, pp. 354–364, (2017), doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.08.010.

Wang J, Sun Y, Jiang H, Feng J Removal of caffeine from water by combining dielectric barrier discharge (DBD) plasma with goethite. *J Saudi Chem Soc* 21(5):545– 557 (2017).

de Wilt, A., van Gijn, K., Verhoek, T., Vergnes, A., Hoek, M., Rijnaarts, H., & Langenhoff, A. Enhanced pharmaceutical removal from water in a three step bio-ozonation process. *Water research*, 138, 97-105 (2018).

Wollmann, F. et al.-Microalgae wastewater treatment: biological and technological approaches. *Engineering in Life Sciences*. 19:12 (2019) 860-871.

Wu, H., Zhang, J., Ngo, H. H., Guo, W., Hu, Z. & Liang, S. A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation. *Bioresource Technology*, 175, 594-601 (2015).

Xia, H. P., Liu, & Ao, H. Study on Purification and Uptake of Vetiver Grass to Garbage Leachate Proc. Second Intern. Vetiver Conf. (January de 2000).

Yu JG et al Aqueous adsorption and removal of organic contaminants by carbon nanotubes. *Sci Total Environ* 482–483:241–251(2014).

Yousaf, A.; Khalid, N.; Aqeel, M.; Noman, A.; Naeem, N.; Sarfraz, W.; Ejaz, U.; Qaiser, Z.; Khalid, A. Nitrogen Dynamics em Wetland Systems e seu impacto na biodiversidade. *Nitrogen* (2021) , 2 , 196-217. <https://doi.org/10.3390/nitrogen2020013>

Zhang, D., Luo, J., Lee, ZMP et al. Caracterização de comunidades microbianas em mesocosmos de zonas úmidas recebendo águas residuais enriquecidas com cafeína. *Environ Sci Pollut Res* 23 , 14526–14539 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6586-4>

Zhang, C., Liu, W. & Wang, J. Effects of plant diversity and hydraulic residence time on pollutant removals in vertical flow constructed wetland mesocosms. *Ecological Engineering*, 244-248 (2012).

Zhang, S. et al. Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere*, v. 66, n. 6, p. 1057-1069, Jan (2018). ISSN 0045-6535.