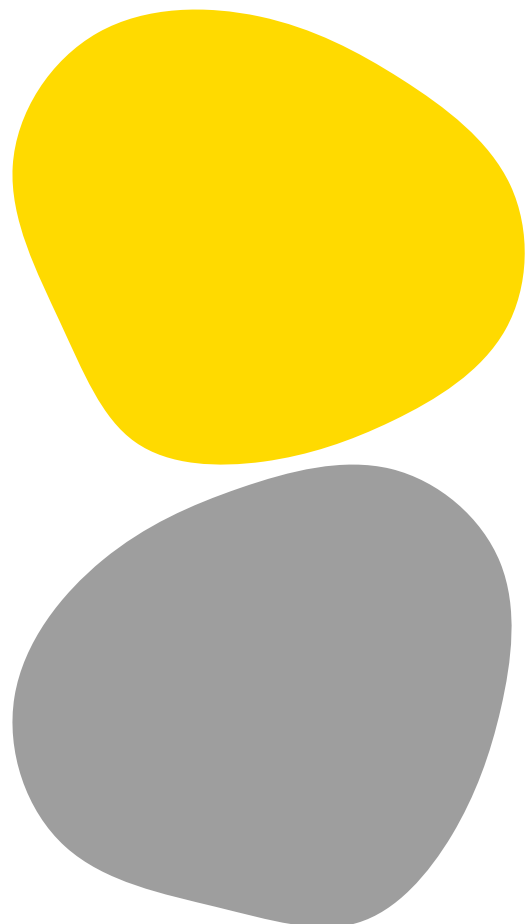




Ecotoxicidade de Albendazol, Metronidazol e Ibuprofeno: avaliação nas espécies *Triticum aestivum*, *Lactuca sativae* e *Chlorella vulgaris*

Vítor Emanuel Teixeira Faria





**Ecotoxicidade de Albendazol, Metronidazol e Ibuprofeno: avaliação nas espécies *Triticum aestivum*,
Lactuca sativa e *Chlorella vulgaris***

Autor

Vítor Emanuel Teixeira Faria

Orientadores

Doutora Piedade Aurora Gonçalves de Barros, Escola Superior de Saúde – P.Porto

Doutor Agostinho Luís da Silva Cruz, Escola Superior de Saúde – P.Porto

*Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em **Farmácia** – Ramo/Área de
Especialização em **Tecnologia do Medicamento e Produtos de saúde**
pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à **presidência da Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto** pela disponibilização das suas instalações e equipamentos, para o desenvolvimento do trabalho experimental.

Agradecer aos meus orientadores de dissertação, **Prof^a Doutora Piedade Barros** e ao **Prof. Doutor Agostinho Cruz**, por toda atenção, carinho e dedicação dispensada ao longo de todo o meu trabalho. Agradecer também pelas sugestões e comentários valiosos que fizeram em todo este percurso.

Aos meus pais e familiares, agradecer pelo apoio incondicional e pelo sacrifício que sempre fizeram para que pudesse alcançar os meus objetivos.

A todos os meus amigos, mas em especial ao **Sr. Alberto Costa**, ao **Pe. Mário Ribeiro**, ao **Ruah** e ao **Nuno Vilaça**, pelo companheirismo, pela solidariedade e apoio motivacional.

E por fim, mas não menos importante, agradecer a **J.N.R.J** pela sua presença constante nos momentos de maior dificuldade.



Resumo

O aumento do consumo global de fármacos, aliado à sua persistência ambiental, tem originado preocupação crescente sobre os seus efeitos ecotoxicológicos. Entre os compostos mais detetados em solos e águas estão o albendazol (ABZ), o metronidazol (MTZ) e o ibuprofeno (IBU), cujos efeitos em organismos não-alvo permanecem pouco esclarecidos. Esta dissertação integra uma revisão sistemática sobre os efeitos do MTZ em plantas e um estudo experimental com três organismos com relevância ecológica e agrícola: *Chlorella vulgaris*, *Lactuca sativa* e *Triticum aestivum*. O objetivo principal foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos de ABZ, MTZ e IBU isolados e em misturas (ABZ+IBU; MTZ+IBU). Nos ensaios com *C. vulgaris* avaliou-se a taxa de crescimento e determinou-se a EC_{50} , enquanto nos ensaios com *L. sativa* e *T. aestivum* foram analisados a germinação, o crescimento radicular e do epicótilo, procurando ainda identificar fenómenos de sinergismo ou antagonismo nos testes com as misturas. Os resultados mostraram que *C. vulgaris* apresentou elevada sensibilidade ao ABZ, enquanto MTZ e IBU induziram efeitos menos pronunciados. As misturas evidenciaram interações complexas, incluindo antagonismo na associação ABZ+IBU. Em *L. sativa*, ABZ e IBU inibiram a germinação e o crescimento radicular, embora algumas misturas tenham estimulado o desenvolvimento, sugerindo neutralização parcial dos efeitos tóxicos, enquanto MTZ+IBU provocou inibição precoce da germinação. Em *T. aestivum*, verificou-se maior sensibilidade às misturas, com inibição significativa da germinação e do crescimento radicular. Estes resultados confirmam que os efeitos das misturas não são previsíveis a partir dos compostos isolados, reforçando a necessidade de considerar interações químicas na avaliação de risco ambiental. Em conclusão, o presente estudo demonstrou que ABZ, MTZ e IBU afetam significativamente organismos vegetais aquáticos e terrestres, sendo o ABZ o composto mais tóxico. As misturas apresentaram efeitos não aditivos, destacando a complexidade da avaliação de risco. Estes dados contribuem para a compreensão do impacto ambiental de fármacos e sublinham a importância de estudos futuros sobre misturas de contaminantes nos ecossistemas.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; Albendazol; Metronidazol; Ibuprofeno; *Chlorella vulgaris*; *Lactuca sativa*; *Triticum aestivum*.

Abstract

The increase in global consumption of pharmaceuticals, combined with their environmental persistence, has led to growing concern about their ecotoxicological effects. Among the compounds most frequently detected in soil and water are albendazole (ABZ), metronidazole (MTZ), and ibuprofen (IBU), whose impacts on non-target organisms remain insufficiently understood. This dissertation includes a systematic review of the effects of MTZ on plants and an experimental study on three organisms of ecological and agricultural relevance: *Chlorella vulgaris*, *Lactuca sativa*, and *Triticum aestivum*. The main objective was to evaluate the ecotoxicological effects of ABZ, MTZ, and IBU alone and in mixtures (ABZ+IBU; MTZ+IBU). In the tests with *C. vulgaris*, the growth rate was evaluated and the EC₅₀ was determined, while in the tests with *L. sativa* and *T. aestivum*, germination, root growth, and epicotyl growth were analyzed, seeking to identify synergistic or antagonistic phenomena. The results showed that *C. vulgaris* was highly sensitive to ABZ, while MTZ and IBU induced less pronounced effects. The mixtures showed complex interactions, including antagonism in the ABZ+IBU combination. In *L. sativa*, ABZ and IBU inhibited germination and root growth, although some combinations stimulated development, suggesting partial neutralization of the toxic effects, while MTZ+IBU caused early inhibition of germination. In *T. aestivum*, there was greater sensitivity to mixtures, with significant inhibition of germination and root growth, especially in balanced proportions. These results confirm that the effects of mixtures are not predictable from isolated compounds, reinforcing the need to consider chemical interactions in environmental risk assessment. In conclusion, the present study demonstrated that ABZ, MTZ, and IBU significantly affect aquatic and terrestrial organisms, with ABZ being the most toxic compound. The mixtures showed non-additive effects, highlighting the complexity of risk assessment. These data contribute to the understanding of the environmental impact of drugs and underscore the importance of future studies on mixtures of contaminants in real ecosystems.

Keywords: Ecotoxicology; Albendazole; Metronidazole; Ibuprofen; *Chlorella vulgaris*; *Lactuca sativa*; *Triticum aestivum*.

Siglas e Acrónimos

ABZ	Albendazol
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CAT	Catalase
CISA-ESS.P.PORTO	Centro de Investigação em Saúde e Ambiente, Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto
DP	Desvio Padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
ETAR'S	Estações de Tratamento de Águas Residuais
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBU	Ibuprofeno
IBI	Joanna Briggs Institute
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
MTZ	Metronidazol
NOEC	Non Observed Effect Concentration
PICO	Population – Intervention – Comparison – Outcome
PRISMA	Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
SOD	Superóxido Dismutase
TC	Tetraciclina
WHO	World Health Organization



Índice

Capítulo I – Enquadramento Teórico.....	1
1. Introdução.....	1
1.1. Visão Geral do Trabalho.....	3
1.1.1. Estrutura do Trabalho.....	3
1.2. Objetivos	4
Capítulo II – Efeitos da exposição das plantas ao Metronidazol – Revisão Sistemática	5
1. Introdução.....	5
2. Metodologia	6
2.1. Questão de Investigação.....	6
2.2. Estratégia de Pesquisa	7
2.2.1. Pesquisa científica em bases de dados	7
2.2.2. Critérios de Seleção.....	8
2.3. Seleção dos artigos científicos	8
2.4. Avaliação da qualidade	8
2.5. Tratamento de dados.....	9
3. Resultados.....	9
3.1. Resultados da avaliação da qualidade dos artigos.....	11
3.2. Caracterização dos estudos incluídos.....	11
4. Discussão de resultados.....	17
5. Conclusão.....	20
Capítulo III – Avaliação dos efeitos de albendazol, metronidazol e ibuprofeno em <i>Chlorella vulgaris</i>	21
1. Visão geral do ensaio <i>C. vulgaris</i>	21
2. Métodos.....	21
2.1. Soluções de teste	22



2.2.	Procedimento do ensaio.....	23
2.3.	Análise Estatística.....	23
3.	Resultados.....	24
3.1.	Exposição de <i>C.vulgaris</i> ao Albendazol.....	25
3.2.	Exposição de <i>C.vulgaris</i> ao Metronidazol.....	27
3.3.	Exposição de <i>C.vulgaris</i> ao Ibuprofeno	29
3.4.	Exposição de <i>C.vulgaris</i> à mistura Albendazol + Ibuprofeno	31
3.5.	Exposição de <i>C.vulgaris</i> à mistura Metronidazol + Ibuprofeno	33
4.	Discussão e conclusão	35
Capítulo IV – Avaliação dos efeitos de albendazol, metronidazol e ibuprofeno em <i>Lactuca sativa</i>		37
1.	Visão geral do ensaio <i>L.sativa</i>	37
2.	Materiais e Métodos	38
2.1.	Seleção e lavagem das sementes	38
2.2.	Soluções de teste	38
2.3.	Procedimento do ensaio.....	39
2.4.	Avaliação da germinação	39
2.5.	Avaliação do comprimento da raiz e epicótilo	39
2.6.	Análise de resultados e estatística.....	40
3.	Resultados.....	41
3.1.	Exposição de <i>L.sativa</i> ao Albendazol.....	41
3.2.	Exposição de <i>L.sativa</i> ao Metronidazol.....	44
3.3.	Exposição de <i>L.sativa</i> ao Ibuprofeno	46
3.4.	Exposição de <i>L.sativa</i> à mistura de Albendazol + Ibuprofeno	47
3.5.	Exposição de <i>L.sativa</i> à mistura de Metronidazol + Ibuprofeno	49
4.	Discussão e Conclusão.....	50



Capítulo V – Avaliação dos efeitos de albendazol, metronidazol e ibuprofeno em <i>Triticum aestivum</i>	53
1. Visão geral do ensaio <i>Triticum aestivum</i>	53
2. Materiais e Métodos.....	53
2.1. Seleção e lavagem das sementes	54
2.2. Soluções Teste	54
2.3. Procedimento do ensaio.....	55
2.4. Avaliação da germinação	55
2.5. Avaliação do comprimento da raiz e epicótilo	55
2.6. Análise de resultados e estatística.....	56
3. Resultados.....	57
3.1. Exposição de <i>T. aestivum</i> ao Albendazol	57
3.2. Exposição de <i>T. aestivum</i> ao Metronidazol.....	59
3.3. Exposição de <i>T. aestivum</i> ao Ibuprofeno	61
3.4. Exposição de <i>T. aestivum</i> à mistura de Albendazol + Ibuprofeno	62
3.5. Exposição de <i>T. aestivum</i> à mistura de Metronidazol + Ibuprofeno	64
4. Discussão e conclusão	65
Capítulo VI – Discussão Geral	68
Capítulo VII – Conclusão.....	70
Referências Bibliográficas	71
Apêndices	80
Apêndice I – Meio de Cultura Z8	80

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Anagrama PICO.....	6
Tabela 2 – Equação de pesquisa e filtros aplicados.....	7
Tabela 3 – Questões utilizadas como critérios de avaliação da qualidade dos artigos.....	9
Tabela 4 – Síntese geral das condições experimentais, são apresentadas as espécies estudadas, as condições de cultivo, concentrações avaliadas e o tempo de exposição.....	13
Tabela 5 – Síntese geral dos efeitos do MTZ observados. São apresentados a espécie estudada, a absorção, efeitos sob o crescimento e germinação e indicadores de stress reportados	15
Tabela 6 – Informações sobre Princípios-ativos utilizados nos ensaios.....	22
Tabela 7 – Concentrações utilizadas nos testes com <i>C.vulgaris</i> com ABZ, MTZ E IBU isolados	22
Tabela 8 – Concentrações utilizadas nos testes com misturas de princípios-ativos.....	23
Tabela 9 – Concentrações utilizadas nos testes com ABZ, MTZ e IBU isolados	38
Tabela 10 – Concentrações utilizadas nos testes com mistura de princípios-ativos	38



Índice de Figuras

Figura 1 – Fluxograma PRISMA 2020	10
Figura 2 – Avaliação da qualidade dos artigos incluídos, considerando as questões formuladas na tabela 3	11
Figura 3 – Concentração de <i>C. vulgaris</i> (cel/mL) ao longo de 120 horas de exposição ao ABZ. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão.....	25
Figura 4 – Taxa de Crescimento após 72h, 96h e 120h de exposição ao ABZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão	26
Figura 5 – Taxa de Inibição após 72h, 96h e 120h de exposição ao ABZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão	26
Figura 6 – Concentração de <i>C. vulgaris</i> (cel/mL) ao longo de 120 horas após exposição ao MTZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão.....	27
Figura 7 – Taxa de Crescimento de <i>C. vulgaris</i> 72h, 96h e 120h após exposição ao MTZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão	28
Figura 8 – Taxa de Inibição após 72h, 96h e 120h de exposição ao MTZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão	29
Figura 9 – Concentração de <i>C. vulgaris</i> (cel/mL) ao longo de 120 horas após exposição ao IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão.....	30
Figura 10 – Taxa de Crescimento de <i>C. vulgaris</i> 72h, 96h e 120h após exposição ao IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão	30
Figura 11 – Taxa de Inibição após 72h, 96h e 120h de exposição ao IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão	31
Figura 12 – Concentração de <i>C. vulgaris</i> (cel/mL) ao longo de 120 horas após exposição às misturas de ABZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão.....	32
Figura 13 – Taxa de Crescimento de <i>C. vulgaris</i> 72h, 96h e 120h após exposição à mistura ABZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão	32
Figura 14 – Taxa de Inibição após 72h, 96h e 120h de exposição à mistura ABZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão	33
Figura 15 – Concentração de <i>C. vulgaris</i> (cel/mL) ao longo de 120 horas após exposição às misturas de MTZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão.....	33
Figura 16 – Taxa de Crescimento de <i>C. vulgaris</i> 72h, 96h e 120h após exposição à mistura MTZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão	34

Figura 17 – Taxa de Inibição após 72h, 96h e 120h de exposição à mistura MTZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão	34
Figura 18 – Exemplificação de como identificar e medir a raiz e o epicótilo das sementes de <i>L.sativa</i> . Fonte: http://ei.cornell.edu/toxicology/bioassays/lettuce/data.html	39
Figura 19 – Percentagem de germinação de <i>L.sativa</i> após exposição ao ABZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão	42
Figura 20 – Taxa de inibição da germinação de <i>L. sativa</i> após exposição ao ABZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão	42
Figura 21 – Comprimento da raiz de <i>L.sativa</i> após exposição ao ABZ. As barras de erro, representam o desvio padrão.....	43
Figura 22 – Comprimento do epicótilo de <i>L.sativa</i> após exposição ao ABZ. As barras de erro, representam o desvio padrão.....	43
Figura 23 – Percentagem de germinação de <i>L.sativa</i> após exposição ao MTZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão	44
Figura 24 – Comprimento do epicótilo de <i>L.sativa</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	45
Figura 25 – Comprimento da raiz de <i>L.sativa</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	45
Figura 26 – Percentagem de germinação de <i>L.sativa</i> após exposição ao IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão	46
Figura 27 – Comprimento da raiz de <i>L.sativa</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	47
Figura 28 – Comprimento do epicótilo de <i>L.sativa</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	47
Figura 29 – Percentagem de germinação de <i>L.sativa</i> após exposição à mistura de ABZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão.....	48
Figura 30 – Comprimento da raiz de <i>L.sativa</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	48
Figura 31 – Comprimento do epicótilo de <i>L.sativa</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	49
Figura 32 – Percentagem de germinação de <i>L.sativa</i> após exposição à mistura de MTZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão	49

Figura 33 – Comprimento da raiz de <i>L.sativa</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	50
Figura 34 – Comprimento do epicótilo de <i>L.sativa</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	50
Figura 35 – Zonas definidas para identificar e medir a raiz e o epicótilo das sementes de <i>T. aestivum</i> . Fonte: https://elevagro.com/processo-de-germinacao-de-cereais-de-inverno/	56
Figura 36 – Percentagem de germinação de <i>T.aestivum</i> após ao ABZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão	58
Figura 37 – Comprimento da raiz de <i>T. aestivum</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	58
Figura 38 – Comprimento do epicótilo de <i>T. aestivum</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão.....	59
Figura 39 – Percentagem de germinação de <i>T. aestivum</i> após exposição ao MTZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão	60
Figura 40 – Comprimento da raiz de <i>T. aestivum</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	60
Figura 41 – Comprimento do epicótilo de <i>T. aestivum</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão.....	61
Figura 42 – Percentagem de germinação de <i>T. aestivum</i> após exposição ao IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão	61
Figura 43 – Comprimento da raiz de <i>T. aestivum</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	62
Figura 44 – Comprimento do epicótilo de <i>T. aestivum</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão.....	62
Figura 45 – Percentagem de germinação de <i>T. aestivum</i> após exposição à mistura ABZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão.....	63
Figura 46 – Comprimento da raiz de <i>T. aestivum</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	63
Figura 47 – Comprimento do epicótilo de <i>T. aestivum</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão.....	64
Figura 48 – Percentagem de germinação de <i>T. aestivum</i> após exposição à mistura MTZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão.....	64

Figura 49 – Comprimento da raiz de <i>T. aestivum</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão	65
Figura 50 – Comprimento do epicótilo de <i>T. aestivum</i> nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão.....	65

Capítulo I – Enquadramento Teórico

1. Introdução

Os medicamentos desempenham um papel fundamental na sociedade contemporânea, sendo amplamente utilizados na prevenção e tratamento de doenças. Atualmente, mais de 3.000 substâncias ativas são administradas em todo o mundo, integrando medicamentos sujeitos a receita médica, medicamentos de venda livre e fármacos de uso veterinário. As suas substâncias ativas constituem uma grande variedade de produtos sintéticos produzidos por indústrias farmacêuticas, com níveis de produção que atingem as 100.000 toneladas por ano (Beek *et al.*, 2016). Entre os grupos farmacoterapêuticos mais frequentemente utilizados destacam-se os antibióticos, anti-helmínticos, analgésicos e anti-inflamatórios (Gottschall *et al.*, 2012).

Embora os medicamentos sejam rigorosamente regulamentados quanto à sua eficácia e segurança para o utente, o mesmo não se aplica para a ecotoxicidade (Miettinen & Khan, 2022). A inadequada utilização dos medicamentos e a sua posterior inutilização, são alvo de grande preocupação, uma vez que são encontrados frequentemente, resíduos destes em amostras ambientais (Karki & Philip, 2024). Assim, a ecotoxicologia, responsável por investigar os efeitos nocivos de poluentes e compostos químicos no meio ambiente desempenha um papel fundamental na deteção, controlo e monitorização da presença de poluentes no meio ambiente (Walker *et al.*, 2012). Além disso, os conhecimentos obtidos por estudos ecotoxicológicos são essenciais para a elaboração de regulamentação ambiental e para o desenvolvimento de diretrizes.

As principais vias de contaminação ambiental por medicamentos incluem a reutilização de águas provenientes de Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR's), a atividade agropecuária e os resíduos produzidos pelas indústrias farmacêuticas. Ao contrário do que se esperava, existem estudos que revelam a existência de indústrias farmacêuticas, que procedem ao despejo de elevadas quantidades de resíduos resultantes do processo de produção, diretamente para o ambiente (Yakubu, 2017).

A procura crescente dos recursos hídricos e a intensificação de condições meteorológicas severas, exercem sobre as reservas de água doce uma grande pressão (Santos *et al.*, 2021). Toda a região da Península Ibérica é vulnerável aos impactos causados pelas alterações climáticas e em algumas regiões de Portugal, já se verifica uma enorme pressão sobre as reservas de água doce, o que tendencialmente irá piorar com as alterações climáticas futuras. A reutilização de água proveniente de ETAR's é uma alternativa à escassez de água e permite garantir o normal abastecimento (Rebelo *et al.*, 2020).

No entanto, a presença de contaminantes químicos nas águas recuperadas de ETAR's pode ser um ponto crítico, uma vez que esses produtos químicos podem ser absorvidos pelas culturas agrícolas irrigadas e eventualmente podem ser ingeridos durante o consumo de alimentos (Delli Compagni *et al*, 2020).

A atividade agropecuária constitui outra via principal de contaminação ambiental, amplamente documentada na literatura como uma das principais fontes de poluição. Nessa atividade, os medicamentos veterinários são extensivamente utilizados tanto na produção de alimentos como nos cuidados de saúde do animal, podendo levar à contaminação do solo, da água e até dos próprios alimentos (Langhansová *et al*, 2021; Ramírez-Morales *et al*, 2024; Richter *et al*, 2016; Stuchlíková *et al*, 2018; Stuchlíková Raisová *et al*, 2017).

Os anti-helmínticos, como o caso do Albendazol (ABZ) e os antibióticos como é o caso do Metronidazol (MTZ), são das classes de fármacos mais utilizados pela pecuária, uma vez que estes mostraram ser altamente eficazes para o tratamento não só de Nemátodes e de Cestodes (Stuchlíková *et al*, 2018). Estes fármacos são igualmente utilizados na profilaxia de parasitas, fazendo com que o seu uso seja bastante frequente (Podlipná *et al*, 2013).

Os animais não metabolizam totalmente estes medicamentos, o que faz com que parte seja excretada na forma inicial inalterada e outra na forma de metabolitos, através da urina e das fezes (Langhansová *et al*, 2021; Raisová Stuchlíková *et al*, 2020), os compostos ativos podem atingir ambientes aquáticos através de estações de tratamento de águas adjacentes às áreas de exploração, bem como chegar até aos solos pela utilização das fezes e urina como fertilizante (Ramírez-Morales *et al*, 2024). Uma vez no meio ambiente, estes compostos ativos podem afetar espécies não-alvo, como por exemplo as culturas agrícolas (Raisová Stuchlíková *et al*, 2020).

O trigo, *Triticum aestivum*, é a terceira cultura agrícola mais relevante em termos de produção global, dada a sua elevada importância económica e o seu contributo para a dieta humana e do gado (Levy & Feldman, 2022; Shewry & Hey, 2015). Para além de ser uma importante fonte de amido e energia, o trigo desempenha um papel fundamental no fornecimento de vários componentes benéficos para a saúde tais como: proteínas, vitaminas do complexo B e fibras alimentares (Shewry & Hey, 2015). De igual forma, a alface, *Lactuca sativa*, é uma hortaliça fresca de elevada importância económica, cultivada em climas amenos por todo o mundo. A alface fresca é um produto bastante desejável, cuja aceitação pelo consumidor é influenciada pela ocorrência de manchas externas que afetam a sua aparência geral. Estas

manchas decorrem de diversos fatores, desde processos pós-colheita, degradação da clorofila, níveis elevados de CO₂, composição do solo, exposição a agentes tóxicos, entre outros (Peng & Simko, 2023).

Até ao momento, foram conduzidos alguns ensaios que estudaram a fitotoxicidade do ABZ e MTZ em plantas e microalgas, contudo a informação existente é ainda escassa. Raisová Stuchlíková *et al.* (2020) num estudo realizado com o objetivo de avaliar a fitotoxicidade do ABZ em *Medicago sativa* concluiu que este composto não inibe a germinação das sementes, contudo causa stress oxidativo e efeitos tóxicos para esta espécie. Por outro lado, Langhansová *et al.* (2021) afirmam que ABZ não é tóxico para a espécie *Trifolium pratense*, uma vez que não foram observadas alterações nos indicadores de stress oxidativo. Relatam ainda, que o ABZ foi absorvido por *T. pratense*, metabolizado e transladado para as folhas constituindo assim, um maior risco para herbívoros invertebrados. Yabuku (2017) num estudo da toxicidade do MTZ em *Glycine max* concluiu que o MTZ é tóxico para a espécie e provoca atraso do crescimento, amarelecimento das folhas e queda de folhas. Na microalgas, poucos estudos foram realizados no sentido de avaliar os efeitos de ABZ e MTZ. Li *et al.* (2023) avaliou os efeitos tóxicos da Tetraciclina (TC) e MTZ em *Chlorella pyrenoidosa* e verificou que estes compostos afetavam o seu crescimento bem como a sua atividade antioxidante. Concluiu ainda, que numa exposição de *C. pyrenoidosa* a uma mistura combinada de TC e MTZ na razão de 1:1 os efeitos tóxicos eram potencializados.

O Ibuprofeno (IBU) é um anti-inflamatório não-esteróide amplamente utilizado para o alívio de dores ligeiras a moderadas, febre e inibição de processos inflamatórios, dado que o seu perfil de segurança é bastante favorável (Elkamshoushi *et al.*, 2022).

Devido ao seu elevado consumo e baixa taxa de degradação ambiental, o IBU é considerado como um poluente ambiental emergente (Jan-Roblero & Cruz-Maya, 2023). A sua presença em ambientes aquáticos e terrestres pode afetar negativamente os organismos desses ecossistemas, provocando-lhes stress oxidativo, danos citotóxicos e alterações no seu crescimento e reprodução (Jan-Roblero & Cruz-Maya, 2023).

1.1. Visão Geral do Trabalho

1.1.1. Estrutura do Trabalho

A presente Dissertação é composta por sete capítulos, organizados de acordo com as regras gerais de organização de trabalhos da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Iniciando-se com o presente capítulo que descreve o estado de arte, a estrutura do trabalho e os objetivos (Capítulo I).

O **Capítulo II** é dedicado a uma revisão sistemática da literatura sobre os efeitos do MTZ nas plantas. Esta revisão revelou uma escassez de estudos específicos nesta área, evidenciando uma lacuna de conhecimento relevante que justificou a necessidade de um estudo experimental que contribuísse para o aumento de conhecimento nesta área. Os **capítulos III, IV e V** descrevem o trabalho experimental que foi desenvolvido com *C.vulgaris*, *L. sativa* e *T. aestivum*, respetivamente. Cada um desses três capítulos inclui uma visão geral do organismo, apresentação dos resultados, discussão e conclusão do ensaio. Nos **capítulos VI e VII** são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos, posteriormente é apresentada a coletânea da bibliografia utilizada e a informação complementar.

A escolha desta organização permite, por um lado, contextualizar e justificar a relevância do estudo experimental com base no estado atual do conhecimento científico e, por outro, fornecer dados originais que contribuem para uma melhor compreensão dos riscos ambientais associados à presença destes fármacos no ambiente.

1.2. Objetivos

O principal objetivo deste estudo é avaliar os efeitos de ABZ, MTZ e IBU isoladamente e de ABZ e de MTZ em associação com IBU nas espécies *C.vulgaris*, *L. sativae* *T. aestivum*. No ensaio com *C.vulgaris* pretende-se avaliar o efeito no crescimento da microalga. Nos ensaios com sementes pretende-se avaliar os efeitos na germinação das sementes e no crescimento das raízes e do epicótilo.

Capítulo II – Efeitos da exposição das plantas ao Metronidazol – Revisão Sistemática

1. Introdução

Os antibióticos desempenham um papel crucial na medicina desde a sua introdução na década de 1940. Estes são extensamente utilizados para o tratamento de infeções graves relacionadas com a saúde do ser humano, bem como para o tratamento e prevenção de doenças no gado e noutros animais (Christou *et al.*, 2017).

O MTZ é um antibiótico, derivado 5-nitroimidazólico, com atividade antibacteriana e antiprotozoária. Apesar do seu uso frequente desde a sua introdução no mercado, continua a ser a escolha de primeira linha para o tratamento da maioria das infeções anaeróbicas, garantindo assim um lugar na lista de medicamentos essenciais definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Leitsch, 2019). O MTZ é utilizado preferencialmente como antibiótico profilático em procedimentos cirúrgicos, mas também pela sua atividade antiparasitária da tricomoniase, amebíase, e giardíase (Majidi *et al.*, 2024).

É importante salientar que o MTZ é um pro-fármaco e por isso isento de atividade até ser metabolizado pelo fígado. A sua ativação consiste em reações de metabolização, onde grupo 5-nitro é reduzido (Dingsdag & Hunter, 2018). Através das reações de metabolização são formados 2 metabolitos principais que são posteriormente eliminados pela urina, sendo eles: o metabolito hidróxido (1-(2-Hidroxietil)-2-hidroximetil-5-nitroimidazol) e o metabolito ácido (2-Metil-5-nitroimidazol-1-acido acético). Para além destes metabolitos, é também excretado pela urina MTZ na sua forma inalterada (Lamp *et al.*, 1999; Pendland *et al.*, 1994).

A presença de MTZ e seus metabolitos no meio ambiente é sustentada por diversas vias de libertação, das quais se destacam os efluentes domésticos e hospitalares, que não são devidamente tratados pelas ETAR's (Majidi *et al.*, 2024). Num estudo realizado por Rodriguez-Mozaz *et al.* (2020) que tinha como objetivo determinar a presença de antibióticos em 7 efluentes de ETAR's europeias, verificou a ocorrência de antibióticos em algumas das amostras analisadas.

Atualmente, o MTZ não está aprovado para utilização na pecuária pela Food and Drug Administration (FDA), no entanto existem diversos relatos do uso ilegal de MTZ na criação de animais para consumo (Dutta *et al.*, 2019). Para além dos produtos provenientes desses animais (carne, leite, entre outros.) apresentarem resíduos de MTZ (L. Zhang *et al.*, 2021), são também encontrados resíduos de MTZ nas fezes e na urina, que posteriormente são utilizadas como fertilizante dos solos (Langhansová *et al.*, 2021), constituindo assim uma outra via de libertação de MTZ para o meio ambiente.

O MTZ foi classificado como um potencial agente carcinogénico para o ser humano pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), uma vez que este apresenta efeitos mutagénicos e carcinogénicos que induzem danos no Ácido Desoxirribonucleico (ADN) através da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Kermani *et al.*, 2016).

Adicionalmente, os metabolitos ambientais de MTZ podem também ser mutagénicos e carcinogénicos devido à retenção do anel nitroimidazol original após a biodegradação, podendo afetar negativamente outras espécies não-alvo (Wagil *et al.*, 2015).

Desta forma, é de elevada importância perceber quais são os efeitos resultantes da exposição de MTZ e dos seus metabolitos nas plantas, não só pelo efeito nefasto que pode provocar, mas também pela possível transmissão via cadeia alimentar, ao ser humano e a outros animais.. O objetivo desta revisão sistemática é reunir e analisar dados científicos existentes, sobre os efeitos da exposição ao metronidazol de plantas, contribuindo para elucidar de forma precisa os riscos ambientais decorrentes do uso de metronidazol, especialmente no que diz respeito à sua presença em sistemas agrícolas e naturais.

2. Metodologia

2.1. Questão de Investigação

De forma a reunir a informação, existente até ao momento, acerca dos efeitos resultantes da exposição de Metronidazol nas plantas, foi elaborada uma revisão sistemática seguindo a metodologia Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA) (Page *et al.*, 2024).

A revisão sistemática iniciou-se pela elaboração de uma questão de investigação, que neste caso seguiu o anagrama PICO (Sousa *et al.*, 2018).

Tabela 1 – Anagrama PICO

Population	Plantas
Intervention	Exposição ao Metronidazol
Comparison	Grupo controlo
Outcome	Efeitos provocados

Considerando todos elementos que constituem o anagrama PICO, a questão de investigação foi formulada da seguinte forma: “**Quais são os efeitos resultantes da exposição das plantas ao Metronidazol ?**”

2.2. Estratégia de Pesquisa

2.2.1. Pesquisa científica em bases de dados

Com o objetivo de identificar artigos relevantes quanto aos efeitos da exposição ao metronidazol nas plantas, foram consultadas três bases de dados científicas, nomeadamente a Web of Science – Core Collection, a Medline via Pubmed e Science–Direct. A pesquisa foi realizada a 2 de dezembro de 2024, utilizando a equação de pesquisa, apresentada na Tabela 2, ajustada nas diferentes bases de dados, de forma a abranger o maior número de estudos que exploram os efeitos do metronidazol nas plantas.

Tabela 2 – Equação de pesquisa e filtros aplicados

Base de dados	Equação de Pesquisa	Filtros aplicados
PubMed	((“metronidazole”[MeSH Terms] OR “metronidazole”[All Fields] OR “metronidazoles”[All Fields] OR “nitroimidazoles”[MeSH Terms] OR “nitroimidazoles”[All Fields] OR “nitroimidazole”[All Fields] OR “nitroimidazolic”[All Fields])) AND (“plants”[All Fields] OR “planted”[All Fields] OR “planting”[All Fields] OR “plantings”[All Fields] OR “plants”[MeSH Terms] OR “plants”[All Fields] OR “plant”[All Fields]))	• Pubmed- Medline
Web of Science	(TS=(metronidazole OR nitroimidazole)) AND TS=(plants OR agriculture)	• Exclusão de Artigos de Revisão e Revisões Sistemáticas; • Web of Science – Core Collection
Science – Direct	(Metronidazole OR nitroimidazole) AND (plants OR agriculture)	• Exclusão de Artigos de Revisão e Revisões Sistemáticas

Durante a pesquisa das bases de dados, foram aplicados filtros de forma a refinar os resultados. O principal filtro aplicado foi “tipo de documento” excluindo da pesquisa, revisões sistemáticas e artigos de revisão. Além disso, não houve qualquer restrição temporal quanto à data de publicação, permitindo assim a inclusão de estudos de qualquer período.

De forma a facilitar a gestão da bibliografia obtida da pesquisa, foi utilizado o programa Zotero. Esta ferramenta permitiu organizar os artigos de forma eficiente promovendo a exclusão automática de artigos duplicados.

2.2.2. Critérios de Seleção

Foram incluídos artigos escritos em português, inglês ou espanhol, desde que mencionassem efeitos causados pela exposição de metronidazol nas plantas. Foram excluídos artigos de revisão ou de opinião. Também foram desconsiderados os artigos que abordavam efeitos causados por outras classes de fármacos sem informação relevante sobre o metronidazol.

Artigos que faziam referência a efeitos fitoterapêuticos de plantas, ou que avaliavam os efeitos da exposição de metronidazol noutras espécies foram excluídos. Da mesma forma, foram excluídos os artigos que abordavam métodos de deteção e quantificação do metronidazol ou que faziam referência a técnicas de remoção do metronidazol do meio ambiente.

2.3. Seleção dos artigos científicos

Numa primeira fase foram analisados todos os títulos e resumos dos artigos científicos obtidos, tendo sido considerados aqueles que abordam efeitos da exposição de metronidazol nas plantas. Após esta avaliação, os artigos elegíveis foram integralmente analisados.

2.4. Avaliação da qualidade

A qualidade dos estudos incluídos nesta revisão sistemática foi avaliada com base numa lista de verificação adaptada do instrumento de avaliação crítica do Joanna Briggs Institute (JBI) para quasi-experimental studies (Barker *et al.*, 2024). A avaliação consistiu na análise de oito critérios, apresentados sob a forma de questões (Tabela 3), utilizando uma escala binária com as opções “sim”, “não” ou “não aplicável/desconhecido”.

Tabela 3 – Questões utilizadas como critérios de avaliação da qualidade dos artigos

Questões
1. Houve um grupo controlo?
2. Fica claro no estudo qual é a “causa” e “qual é o efeito”?
3. Os participantes incluídos em quaisquer comparações eram semelhantes?
4. Os participantes incluídos em quaisquer comparações receberam tratamento/cuidados semelhantes, além da exposição ou intervenção de interesse?
5. Houve várias medições do resultado, tanto antes como depois da exposição?
6. Os resultados em quaisquer comparações foram medidos da mesma forma?
7. Os resultados foram medidos de forma fiável?
8. Foi utilizada uma análise estatística adequada?

2.5. Tratamento de dados

Os artigos foram analisados quanto a variáveis suscetíveis de influenciar os potenciais efeitos da exposição nas plantas (tipo de substrato de cultivo, tempo de exposição, concentração do fármaco) e à espécie de planta utilizada.

Adicionalmente, foram consideradas as variáveis associadas aos efeitos observáveis nas plantas expostas ao metronidazol (absorção/distribuição do fármaco nos tecidos vegetais, inibição do crescimento/germinação e presença de indicadores de stress).

3. Resultados

Após a aplicação da metodologia PRISMA Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (Page *et al.*, 2024), foram considerados 8 artigos na presente revisão (Figura 1). Os dados extraídos são apresentados na tabela 4 e tabela 5, consoante a variável a que se aplicavam.

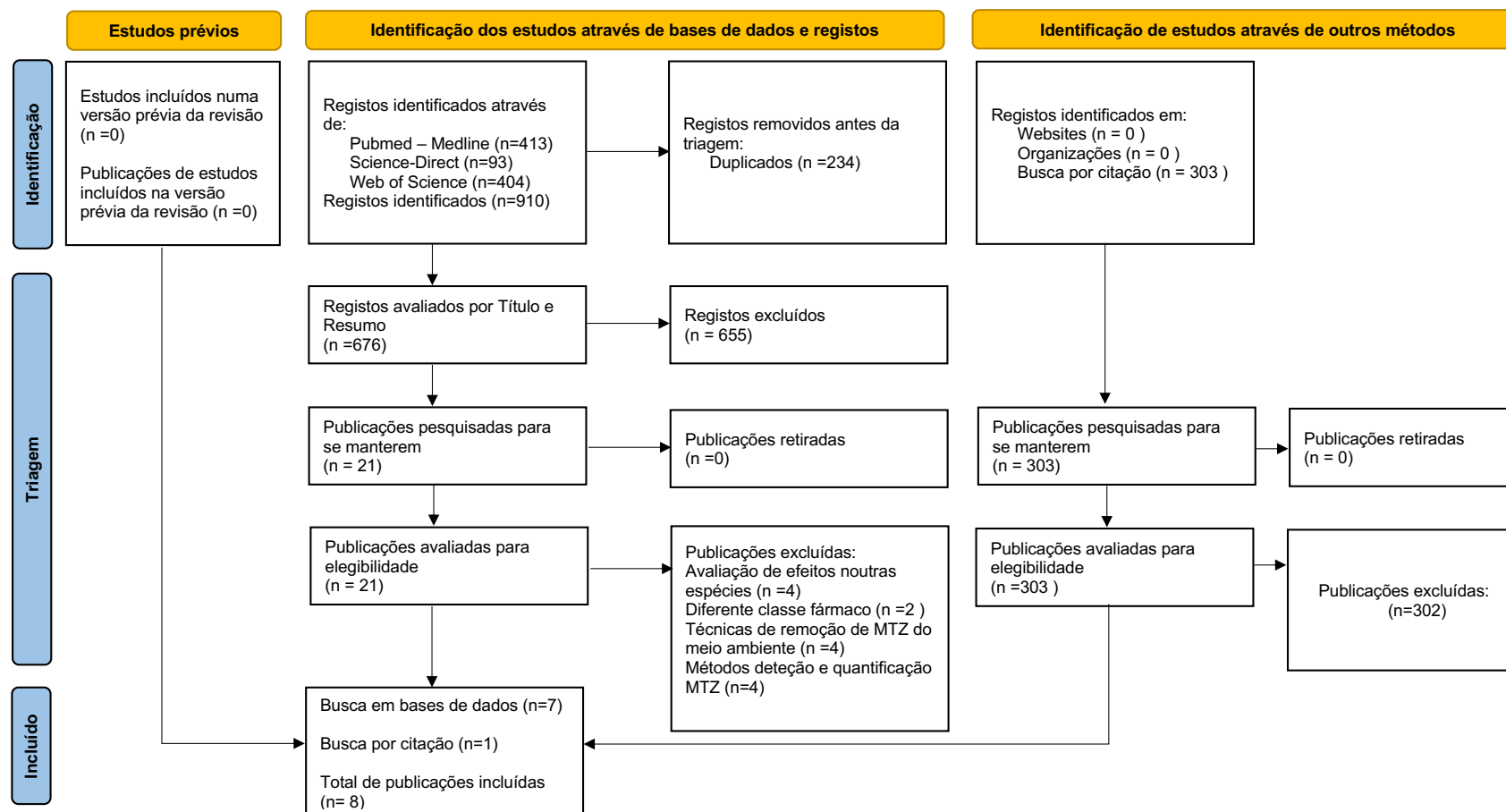


Figura 1 – Fluxograma PRISMA 2020

3.1. Resultados da avaliação da qualidade dos artigos

De forma a minimizar o risco de viés, foi realizada uma avaliação da qualidade dos artigos incluídos, através de uma lista de verificação de oito perguntas. Os estudos incluídos na revisão ($n = 8$) foram avaliados com base na lista de verificação acima descrita. Com base no número de critérios atendidos os estudos foram classificados em categorias de qualidade.

Artigo	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8
De Oliveira & Viccini, 2004	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓
Iatrou et al, 2017	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Jjemba, 2002	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓
Jones et al, 1981	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Karki & Philip, 2024	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
N. Andrioli et al, 2012	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓
N. B. Andrioli et al, 2006	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓
Yakubu, 2017	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Figura 2 – Avaliação da qualidade dos artigos incluídos, considerando as questões formuladas na tabela 3

3.2. Caracterização dos estudos incluídos

Os estudos incluídos avaliaram a exposição de sete espécies vegetais ao metronidazol, nomeadamente *Chrysopogon zizanioides*, *Colocasia esculenta*, *Lemna minor*, *Zea mays L.*, *Glycine max*, *Allium cepae* *Pisum sativum*. As condições experimentais de cultivo variaram entre meios hidropónicos, solo, soluções aquosas e meios de cultura.

Foram descritos ensaios em hidroponia com meio nutritivo adaptado(Karki & Philip, 2024), em solo (Jjemba, 2002; Yakubu, 2017), em meio Swedish Standard(Iatrou *et al.*, 2017), em solução aquosa (Andrioli *et al.*, 2012; Andrioli *et al.*, 2006) ou água destilada(De Oliveira & Viccini, 2004), sob luminosidade natural(Karki & Philip, 2024), iluminação contínua(Iatrou *et al.*, 2017) e ausência de iluminação(De Oliveira & Viccini, 2004).

As temperaturas de cultivo reportadas oscilaram entre os 15°C e 30°C, enquanto o pH dos substratos, quando informados, variou entre 6,6 e 7,7 $\pm$ 0,4. As concentrações aplicadas abrangeram uma

gama muito ampla, desde valores muito baixos, na ordem de $5,84 \times 10^{-5}$ mM (Iatrou *et al.*, 2017), até concentrações mais elevadas na ordem de $2,92 \times 10^3$ mM (Andrioli *et al.*, 2006).

Os tempos de exposição variaram entre um dia e várias semanas, com exposições curtas de um a três dias (Andrioli *et al.*, 2012; Andrioli *et al.*, 2006; De Oliveira & Viccini, 2004; Jones *et al.*, 1981), exposições intermédias de, sete a treze dias (Iatrou *et al.*, 2017; Jjemba, 2002; Yakubu, 2017) e exposições longas, de vinte e oito dias (Karki & Philip, 2024).



Tabela 4 – Síntese geral das condições experimentais, são apresentadas as espécies estudadas, as condições de cultivo, concentrações avaliadas e o tempo de exposição

Espécie em estudo	Condições de Cultivo	Concentração do fármaco * (mM)	Tempo de exposição ** (dias)	Referência bibliográfica
<i>Chrysopogon zizanioides</i>	Substrato: As plantas foram expostas ao princípio-ativo em condições hidropónicas com meio nutritivo adaptado de Ramprasad & Philip (2018) por Karki & Philip (2024) Temperatura: n.a	0,03; 0,06	28	(Karki & Philip, 2024)
<i>Colocasia esculenta</i>	pH: $7,7 \pm 0,4$ Luminosidade: luz natural com uma intensidade média de 350 ± 30 a 810 ± 42 lx			
<i>Lemna minor</i>	Substrato: Swedish Standard Sterile growth medium (Medium SIS) Temperatura: $24 \pm 0,5$ °C pH: n.a Luminosidade: iluminação contínua por 7 dias	$5,84 \times 10^{-5}$; $5,84 \times 10^{-4}$; $5,84 \times 10^{-3}$; $5,84 \times 10^{-2}$	7	(Iatrou <i>et al.</i> , 2017)
<i>Zea mays L.</i>	Substrato: As sementes foram germinadas em placas de Petri com água destilada Temperatura: 30°C pH: n.a Luminosidade: escuro	87,60; 116,80; 146,00; 174,00	1	(De Oliveira & Viccini, 2004)
<i>Glycine max</i>	Substrato: Solo Temperatura: 22–26°C pH: 6,6 Luminosidade: 12 horas ($34 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2/\text{s}$)	2,92; 5,83; 11,67; 23,33	13	(Jjemba, 2002)



<i>Glycine max</i>	Substrato: Solo Temperatura: 30°C pH: 7,0 Luminosidade: n.a	0,29; 0,58	10	(Yakubu, 2017)
<i>Allium cepa</i>	Substrato: Os bolbos foram colocados em estufas, contendo solução aquosa MTZ Temperatura: 22°C pH: 7,0 Luminosidade: escuro	1,46x10 ³	1,25	(Andrioli <i>et al.</i> , 2012)
		58,44; 2,92x10 ² ; 1,46x10 ³ ; 2,92x10 ³	3	(Andrioli <i>et al.</i> , 2006)
<i>Pisum sativum</i>	Substrato: As sementes germinadas foram incubadas durante 6 horas numa solução de MTZ e um isótopo radioativo e posteriormente 18 horas numa solução sem o isótopo. Temperatura: 15°C pH: n.a Luminosidade: n.a	5,00; 20,00	1	(Jones <i>et al.</i> , 1981)

*Concentrações convertidas para mM para permitir a análise comparativa entre os trabalho de diferentes autores

**Tempo de exposição convertidos para dias para permitir análise comparativa entre trabalhos de diferentes autores, possibilitando distinção entre exposição crónica e aguda.



Tabela 5 – Síntese geral dos efeitos do MTZ observados. São apresentados a espécie estudada, a absorção, efeitos sob o crescimento e germinação e indicadores de stress reportados

Espécie em estudo	Absorção/Distribuição do fármaco na planta	Inibição de crescimento/Germinação	Indicadores de stress	Referência bibliográfica
<i>Chrysopogon zizanioides</i> <i>Colocasia esculenta</i>	Sim, maioritariamente nas partes aéreas da planta	Crescimento: Sim, houve inibição de crescimento nas plantas expostas comparativamente com as plantas controlo Germinação: n.a	Stress Oxidativo: Aumento da concentração de espécies ROS Atividade Fotossintética: Redução Clorofila: Redução do teor	(Karki & Philip, 2024)
<i>Lemna minor</i>	Sim, a absorção contribuiu para a remoção de 96% de MTZ	Crescimento: Não foi observada inibição de crescimento da planta Germinação: n.a	Stress Oxidativo: Sem evidências para as concentrações estudadas. Atividade Fotossintética: n.a Clorofila: Folhas continuaram verdes, sem efeitos de clorose	(Iatrou <i>et al.</i> , 2017)
<i>Zea mays L.</i>	Sim, houve absorção do fármaco	Crescimento: n.a Germinação: Não foram observadas diferenças no número de sementes germinadas entre as diferentes concentrações de MTZ	Stress Oxidativo: Não foram observados efeitos tóxicos Atividade Fotossintética: n.a Clorofila: n.a	(De Oliveira & Viccini, 2004)
<i>Glycine max</i>	Sim, houve absorção do fármaco	Crescimento: O crescimento das foi comprometido com sinais evidentes de atrofiamento nas concentrações mais baixas e morte nas concentrações mais altas Germinação: n.a	Stress Oxidativo: n.a Atividade fotossintética: n.a Clorofila: n.a	(Ijemba, 2002)
<i>Glycine max</i>	Sim, houve absorção do fármaco	Crescimento: Impacto negativo no crescimento das plantas. Na concentração mais elevada as plantas murcharam. Germinação: n.a	Stress Oxidativo: n.a Atividade fotossintética: n.a Clorofila: O amarelecimento e queda de folhas foram observados.	(Yakubu, 2017)



<i>Allium cepa</i>	Sim, houve absorção do fármaco	Crescimento: Inibição do crescimento das raízes numa exposição crónica de 30h Germinação: n.a	Stress Oxidativo: Aumento dos valores de peroxidação lipídica nas células da elongação da raiz; Aumento significativo das enzimas SOD e CAT e aumento da glutatona reduzida. Atividade fotossintética: n.a Clorofila: n.a	(Andrioli <i>et al</i> , 2012)
	Sim, houve absorção do fármaco	Crescimento: As concentrações de 1460,88 e 2921,77 mM afetaram significativamente o crescimento da raiz. Germinação: n.a	Stress Oxidativo: Não foram observadas diferenças no índice mitótico entre as diferentes concentrações. A análise das anáfases e telófases não indicou efeitos genotóxicos significativos em comparação com os controlos. Atividade fotossintética: n.a Clorofila: n.a	(Andrioli <i>et al</i> , 2006)
<i>Pisum sativum</i>	Sim, houve absorção do fármaco	n.a	Stress Oxidativo: A síntese de ácidos gordos em plantas foi afetada negativamente Atividade fotossintética: n.a Clorofila: n.a	(Jones <i>et al</i> , 1981)
<i>ROS – Espécies Reativas de Oxigénio</i> <i>SOD – Superóxido Dismutase</i> <i>CAT – Catalase</i>				

4. Discussão de resultados

A partir da análise dos resultados da tabela 4 e 5, observamos que a maior parte das espécies estudadas pelos autores, não só constam na dieta humana (*Pisum sativum*; *Zea mays*; *Glycine max*; *Colocasia esculenta* e *Allium cepa*) como também possuem outros fins comerciais, como produção de óleos, rações animais ingredientes industriais e até biocombustíveis. Por isso apresentam valor económico significativo e relevância acrescida. Estas plantas podem ser agrupadas em dois grandes grupos taxonómicos: Dicotiledóneas (*Colocasia esculenta*; *Pisum sativum*; *Glycine max*) e Monocotiledóneas (*Zea mays*; *Allium cepa*; *Lemna minor*; *Chrysopogon zizanioides*), o que confere diversidade fisiológica e morfológica ao conjunto das espécies avaliadas.

Em relação ao tempo de exposição ao fármaco, o tempo mínimo de exposição foi de apenas 1 dia, enquanto o tempo máximo foi de 28 dias. Essa variabilidade entre tempos de exposição levou à formação de dois grupos distintos de exposição: Exposição Aguda (quando a planta é exposta ao fármaco por um curto período de tempo, geralmente de 1 a 3 dias) e Exposição Crónica (quando a exposição ocorre por períodos mais longos, superiores a 7 dias). Tal variedade é particularmente relevante, pois a exposição prolongada tende a intensificar os efeitos tóxicos observados, como o aumento de indicadores de stress e a inibição do crescimento. A heterogeneidade nos tempos de exposição revela-se vantajosa, na medida em que possibilita uma compreensão mais aprofundada dos efeitos a curto e longo prazo do metronidazol nas plantas.

Para além dos tempos de exposição, também as concentrações do fármaco utilizadas variaram significativamente entre os estudos. A menor concentração de MTZ utilizada foi de $5,84 \times 10^{-5}$ mM enquanto a maior foi de $2,92 \times 10^3$ mM. Essa ampla diversidade de concentrações contribuiu para uma análise mais abrangente dos limiares de resposta fisiológica das plantas ao metronidazol. No entanto, a disparidade metodológica entre os estudos dificulta a comparação direta entre os resultados, representando uma limitação relevante.

A absorção do fármaco foi observada em todas as espécies estudadas, no entanto apenas Karki & Philip (2024) faz referência à distribuição do fármaco na planta. Karki & Philip (2024) detetou que o MTZ se distribuía maioritariamente nas partes aéreas da planta. Tal evidência sugere que o metronidazol tem boa mobilidade dentro das plantas, podendo movimentar-se do sistema radicular para os órgãos superiores. Apesar da absorção comum entre todas as espécies, os efeitos observados foram heterogéneos. Espécies como *Chrysopogon zizanioides*, *Colocasia esculenta*, *Allium cepa* e *Glycine max*

apresentaram inibição do crescimento, enquanto *Lemna minore* e *Zea mays* não evidenciaram alterações relevantes neste parâmetro. Estas diferenças podem dever-se a fatores intrínsecos de resistência, como mecanismos de desintoxicação, variações na permeabilidade das membranas ou ainda diferenças nas vias metabólicas envolvidas na resposta à exposição (Mattson, 2008).

Foram vários os indicadores fisiológicos e bioquímicos utilizados pelos autores para avaliar o stress na planta induzido pela exposição ao metronidazol. Entre os principais destacam-se a Concentração de espécies ROS, o Teor de Clorofila, a Atividade Fotossintética; os níveis de peroxidação lipídica, a atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Catálase (CAT), bem como a síntese de ácidos gordos.

A acumulação de espécies ROS é um dos marcadores mais frequentemente relatados como indicador de stress oxidativo (Barreiros *et al.*, 2006). Estudos como o de Karki & Philip (2024) e Andrioli *et al.* (2012) evidenciam que a exposição ao MTZ aumenta os níveis de stress da planta. Karki & Philip (2024) observaram que houve um aumento significativo na concentração de espécies ROS, enquanto que Andrioli *et al.* (2012) verificou um aumento dos níveis de peroxidação lipídica nas células da elongação da raiz, o que sugere a ocorrência de danos nas membranas celulares. Além disso, constatou um aumento da atividade das enzimas SOD e CAT, evidenciando uma resposta fisiológica da planta face ao stress oxidativo causado pelo MTZ.

O teor da clorofila revelou-se um parâmetro sensível à presença do fármaco. Em *Chrysopogon zizanioides* e *Colocasia esculenta*, Karki & Philip (2024) relataram uma redução nos níveis de clorofila, o que sugere comprometimento da capacidade fotossintética. Yakubu (2017) reporta uma situação semelhante com a observação de amarelecimento e queda de folhas em *Glycine max*, nomeadamente nas concentrações mais elevadas do fármaco.

Contrariamente ao relatado pelos anteriores autores, latrou *et al.* (2017) no seu estudo com *Lemna minor*, conclui que não houve qualquer impacto na coloração das folhas, tendo-se mantido verdes sem efeitos de clorose. Neste ensaio, para além de terem sido utilizadas concentrações mais baixas que De Oliveira & Viccini (2004); Jjemba (2002); Jones *et al.* (1981); Karki & Philip (2024) e Yakubu (2017), também o tempo de exposição foi menor que os restantes, o que pode justificar a ausência de quaisquer efeitos do metronidazol na planta.

A atividade fotossintética foi analisada em menos estudos, no entanto quando avaliada revelou-se afetada negativamente. Karki & Philip (2024) reportaram reduções significativas na atividade fotossintética, o que em conjunto com a queda dos níveis de clorofila, indica uma possível disfunção nos fotossistemas.

Outro indicador avaliado por Jones *et al.* (1981) foi a síntese de ácidos gordos em *Pisum sativum*. Os resultados indicaram que esta via metabólica foi afetada negativamente, o que pode refletir alterações estruturais e funcionais nas membranas celulares em resposta ao stress químico.

Em suma, os dados atualmente disponíveis, embora limitados, demonstram que a exposição ao metronidazol pode desencadear diversas respostas de stress em plantas, evidenciadas por alterações nos processos oxidativos, fotossintéticos e metabólicos. Tais respostas são dependentes da espécie vegetal, da concentração do fármaco e do tempo de exposição, o que reforça a complexidade da interação entre contaminantes emergentes e organismos vegetais. Importa sublinhar que esta revisão sistemática apenas incluiu 8 artigos, devido à escassez de literatura sobre o tema, o que limita a extrapolação dos resultados obtidos. Torna-se, portanto, evidente a necessidade de mais estudos com protocolos padronizados, que permitam uma avaliação mais consistente dos impactos ambientais do MTZ nas plantas

5. Conclusão

A presente revisão sistemática permitiu consolidar e analisar o conhecimento atual sobre os efeitos do MTZ nas plantas, reunindo evidências provenientes de estudos experimentais com diferentes espécies vegetais, concentrações de exposição e tempos de tratamento. Embora tenham sido incluídos apenas oito artigos nesta análise, reflexo da escassez de investigação disponível nesta área específica, os dados obtidos demonstram que o MTZ exerce impactos significativos a nível fisiológico, bioquímico e morfológico nas plantas, mesmo em concentrações reduzidas.

Foram observadas alterações em parâmetros fotossintéticos, na atividade antioxidante, no crescimento radicular e aéreo, bem como no conteúdo relativo de clorofila, indicando que o MTZ pode atuar como um agente de stresse oxidativo, comprometendo a homeostase celular. Estas alterações são, no entanto, moduladas por fatores intrínsecos (como a espécie vegetal) e extrínsecos (como a dose e a duração da exposição), o que reforça a importância de considerar a variabilidade biológica na avaliação dos riscos ecotoxicológicos deste composto.

De forma geral, os resultados aqui reunidos evidenciam a necessidade de um maior escrutínio sobre o destino ambiental e os efeitos não intencionais do MTZ, especialmente tendo em conta a sua persistência e possível acumulação em ecossistemas agrícolas e naturais. Esta revisão sistemática sublinha a lacuna existente no conhecimento sobre os mecanismos moleculares subjacentes às respostas das plantas ao MTZ e a escassez de estudos de longo prazo em condições realistas de exposição.

Neste contexto, é fundamental que investigações futuras se debrucem sobre o impacto do MTZ em culturas agrícolas de elevado interesse económico, sob condições que simulem o ambiente natural ou agrícola, incluindo solos com diferentes características físico-químicas e em interação com outros contaminantes.

Capítulo III – Avaliação dos efeitos de albendazol, metronidazol e ibuprofeno em *Chlorella vulgaris*

1. Visão geral do ensaio *C. vulgaris*

As microalgas são um grupo de organismos de elevada importância, que desempenham um papel importante no ecossistema aquático, uma vez que contribuem para a produção de oxigénio, e são um componente fundamental na cadeia alimentar (Le *et al.*, 2024). São frequentemente utilizadas na ecotoxicologia como bioindicadores de toxicidade em ecossistemas aquáticos. Por serem organismos que apresentam elevada sensibilidade a poluentes e a alterações ambientais, permitem a deteção de efeitos tóxicos provocados por concentrações relativamente baixas (Wu *et al.*, 2017). Além disso, o seu rápido crescimento e a facilidade de cultivo em condições laboratoriais controladas, tornam-nas organismos teste ideais em ensaios ecotoxicológicos (A. Silva *et al.*, 2009).

Entre as várias espécies de microalgas, *C. vulgaris* destaca-se como uma das mais utilizadas em ensaios ecotoxicológicos (OECD, 2006a). Trata-se de uma microalga verde, unicelular que cresce em ecossistemas de água doce (Safi *et al.*, 2014). Para além da sua utilização como organismo teste, *C. vulgaris* apresenta capacidade de remoção de alguns poluentes de águas residuais, tais como antibióticos (A. Silva *et al.*, 2009; Y. Zhang *et al.*, 2022).

2. Métodos

A metodologia utilizada neste teste foi adaptada da Norma 201 da OECD (OECD, 2006a). O objetivo deste teste é avaliar os efeitos que uma substância provoca no crescimento de microalgas em intervalos de 24h durante um período de aproximadamente 120h. As culturas de *C. vulgaris*, utilizadas para os diferentes testes, foram mantidas em ambiente estéril, com fotoperíodo de 14h luz:10h escuro e temperatura constante (21 ± 1 °C), em meio de cultura Z8 (Apêndice I) (Kotai, 1972). As células de *C. vulgaris* utilizadas nos testes foram obtidas de uma cultura em fase exponencial de crescimento.



2.1. Soluções de teste

Para a realização dos testes, foram adquiridos ABZ; MTZ e IBU em diferentes fornecedores. Na tabela 6, apresentam-se as características de cada princípio-ativo utilizado nos testes.

Tabela 6 – Informações sobre Princípios-ativos utilizados nos ensaios.

Princípio-ativo	Laboratório	Lote.	Formula Química	Cas.N
ABZ	Sigma	121K1209	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$	54965-21-8
MTZ	TCI	NMOII-FT	$C_6H_9N_3O_3$	443-48-1
IBU	TCI	R5Y86-DG	$C_{13}H_{18}O_2$	15687-27-1

As soluções utilizadas nos testes foram obtidas por diluições em série, a partir de uma solução stock inicial, utilizando o meio de cultura Z8 como solução de diluição. A solução inicial de ABZ e de IBU foi inicialmente dissolvida em DMSO. Foram utilizadas 6 concentrações diferentes, (Tabela 8), para além de um tratamento controlo constituído por meio Z8. No caso dos teste com ABZ foi feito também um controlo com meio Z8 (Apêndice 1) e DMSO.

De modo a determinar o intervalo de concentrações, a utilizar nos testes definitivos, foi realizada uma revisão da literatura existente acerca dos respetivos princípios-ativos e organismos teste. Após essa revisão realizaram-se testes preliminares, nas mesmas condições do teste definitivo.

Tabela 7 – Concentrações utilizadas nos testes com *C. vulgaris* com ABZ, MTZ E IBU isolados

Organismo teste	Princípio-ativo	Concentrações testadas
<i>C. vulgaris</i>	ABZ	1-5-10-50-100-500 ($\mu\text{g/L}$)
	MTZ	0,5-1-5-10-25-50 (mg/L)
	IBU	0,5-1-5-10-50-100 (mg/L)

Foram também testadas as misturas de MTZ + IBU e ABZ + IBU. Na tabela 9, apresentam-se as concentrações utilizadas de cada princípio-ativo bem como a sua proporção na solução final. As concentrações foram escolhidas tendo por base a percentagem de inibição de crescimento que apresentaram, ou seja, foram escolhidas as concentrações que apresentavam uma taxa de inibição de crescimento próxima dos 50%.

Tabela 8 – Concentrações utilizadas nos testes com misturas de princípios-ativos

Organismo teste	Associação	Concentrações	Proporção
<i>C. vulgaris</i>	ABZ +IBU	500µg/L + 100mg/L	25:75 ; 50:50 ; 75-25
	MTZ + IBU	50mg/L + 100mg/L	

2.2. Procedimento do ensaio

De forma a evitar qualquer contaminação, foram utilizadas técnicas assépticas no decorrer de todo o ensaio. Todo o material de vidro, ponteiros de micropipetas e água utilizados foram esterilizados no autoclave. A preparação da cultura e do ensaio foi realizada numa câmara de ar de fluxo laminar, Telstar PV-30/70.

O teste foi realizado em microplacas de 96 poços, onde cada poço foi preenchido com 180µL da solução a testar ou de meio Z8 caso se tratasse do grupo controlo, e 20µL de cultura de *C. vulgaris*, na fase de crescimento exponencial. Foram realizadas oito réplicas para cada solução teste e controlo. As microplacas foram incubadas por um período de 120 horas com fotoperíodo de 14h de luz : 10h de escuro, a uma temperatura constante ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e agitação constante (30 rpm) num agitador automático Heidolph Roramax 120.

A quantificação da biomassa foi realizada diariamente, por leitura da densidade ótica a 450nm, num leitor de microplacas, Biotek Synergy HT, no início do teste (0h) e a intervalos de 24h até ao final do teste (120h). O teste foi realizado três vezes.

2.3. Análise Estatística

A avaliação do crescimento foi realizada por leitura de densidade ótica, num leitor de microplacas às 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas e posteriormente convertida em número de células por mililitro, através da equação de regressão linear (1), previamente determinada e em uso no laboratório:

$$(1) \quad y = (40000000 \cdot DO) - 1000000 \quad (r^2 0,93)$$



A taxa de crescimento foi calculada através da equação (2):

$$(2) \quad \mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

μ_{i-j} corresponde ao crescimento médio entre o tempo i e j, $\ln X_i$ é a biomassa ao tempo i e $\ln X_j$ corresponde à biomassa no tempo j.

A taxa de inibição foi determinada pela equação (3):

$$(3) \quad \%I_r = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

%I representa a percentagem de inibição da taxa de crescimento, μ_c corresponde à taxa de crescimento do grupo controlo e μ_t representa a taxa de crescimento do grupo que foi exposto ao princípio ativo.

Os testes estatísticos utilizados para avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os diversos grupos e fazer comparações entre pares de grupo foram realizados através do software *IBM SPSS Statistics 25*, com um intervalo de confiança de 95% ($\alpha=0.005$).

O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os diversos grupos ($\alpha=0,005$) (Kruskal & Wallis, 1952). O teste de Mann-Whitney foi realizado para fazer comparações entre pares de grupos ($\alpha=0,005$) (Mann & Whitney, 1947).

O valor de EC_{50} foi calculado pelo método Probit (Finney, 1952)

3. Resultados

As curvas de crescimento refletem a variação da densidade celular ao longo do tempo, possibilitando a avaliação da progressão do desenvolvimento das microalgas sob influência dos compostos analisados. Os resultados apresentados nos gráficos correspondem à média obtida a partir das três experiências realizadas de forma independente, cada grupo contendo 8 réplicas. As barras de erro indicam o desvio padrão (DP), refletindo a dispersão dos valores experimentais.

3.1. Exposição de *C.vulgaris* ao Albendazol

A evolução da concentração da *C.vulgaris* foi influenciada tanto pelo tempo de exposição como pela concentração de albendazol. A figura 3 mostra a variação da concentração de *C.vulgaris* (cel/mL), observada nos diferentes grupos de tratamento ao longo das 120 horas de ensaio.

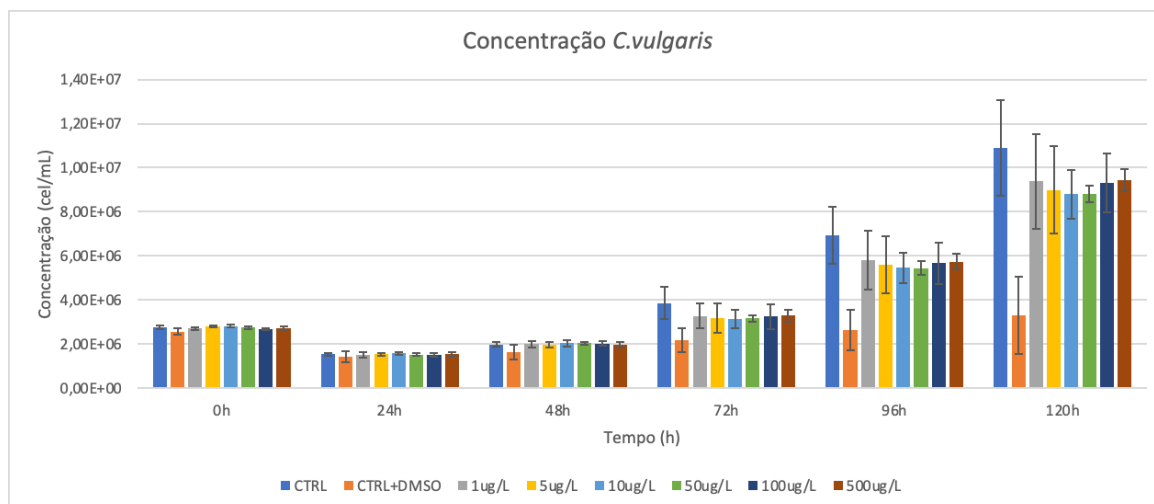


Figura 3 – Concentração de *C.vulgaris* (cel/mL) ao longo de 120 horas de exposição ao ABZ. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

Nas primeiras 48h horas registou-se uma diminuição na concentração de *C.vulgaris*, que pode ser explicado pela adaptação das microalgas ao novo meio de cultura. A partir das 72 horas verificou-se um aumento progressivo da concentração celular em todos os tratamentos, embora com diferentes amplitudes de crescimento.

Às 96h e, sobretudo, às 120h o grupo controlo apresentou concentrações significativamente superiores em comparação com os restantes grupos de tratamento. De acordo com a análise estatística realizada, estas diferenças foram significativas para todas as concentrações testadas, indicando que a exposição ao albendazol, independentemente da concentração, condicionou negativamente o crescimento da microalga. As concentrações de 10 e 50µg/L, foram as que apresentaram crescimento mais baixo. Contrariamente ao esperado, o grupo Controlo+DMSO apresentou concentrações significativamente inferiores face ao grupo controlo.

Conforme observado, apenas a partir das 72 horas ocorreu em todos os grupos um aumento mais acentuado do número de células resultante do aumento da taxa de crescimento, que se prolongou até às 120 h. A taxa de crescimento do grupo controlo permaneceu consistentemente superior à dos grupos submetidos ao ABZ (Figura 4).

A análise estatística, realizada através do teste de Kruskal-Wallis, evidenciou diferenças significativas entre as taxas de crescimento dos grupos tratados e as do grupo controlo ($p < 0,05$).

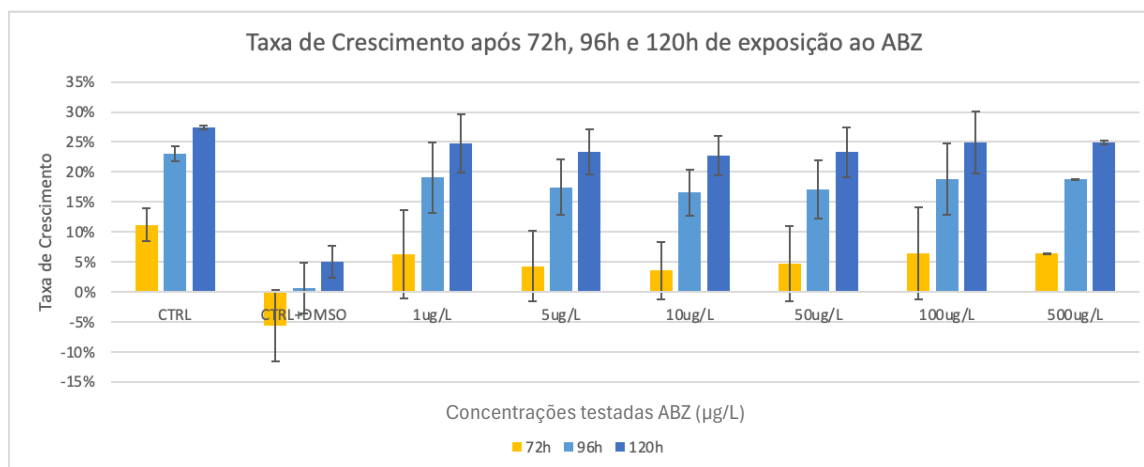


Figura 4 - Taxa de Crescimento após 72h, 96h e 120h de exposição ao ABZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão

Contrariamente ao esperado, foi o grupo Controlo+DMSO que apresentou maior inibição de crescimento. Seria expectável que os resultados do grupo Controlo+DMSO fossem semelhantes ao grupo Controlo só com meio Z8.

Às 72 horas, todas as concentrações testadas, com exceção das mais elevadas (100 e 500 µg/L), apresentaram taxas de inibição superiores aos 50%. As concentrações de 5 µg/L e 10 µg/L revelaram-se as mais tóxicas para *C. vulgaris*, apresentando taxas de inibição de 62% e 68%, respetivamente.

Paralelamente, observou-se que a taxa de inibição tende a diminuir a partir das 72 horas, o que poderá ser atribuído à degradação do composto em estudo.

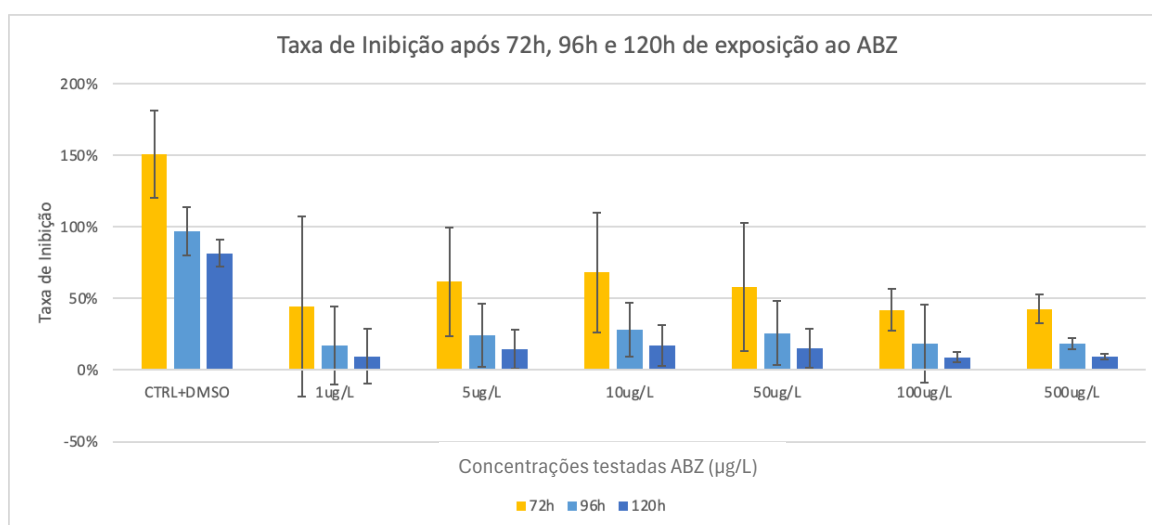


Figura 5 - Taxa de Inibição após 72h, 96h e 120h de exposição ao ABZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão

O valor de EC_{50} às 72 horas, determinado através da análise Probit, foi de $17,7\mu\text{g/L}$. Este resultado indica que as concentrações relativamente baixas de ABZ utilizadas no estudo são suficientes para inibir 50% do crescimento de *C.vulgaris*, evidenciando uma elevada sensibilidade desta microalga à substância.

3.2. Exposição de *C.vulgaris* ao Metronidazol

Durante o período experimental, verificou-se que a concentração de *C.vulgaris* foi influenciada em função do tempo e da concentração de MTZ testada. A Figura 6 ilustra a progressão da concentração nos distintos grupos de tratamento durante 120 horas.

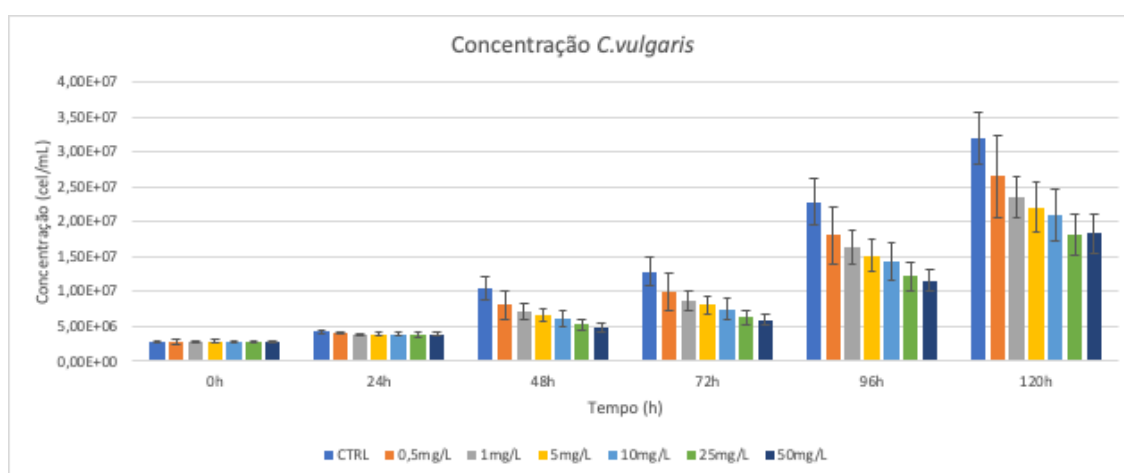


Figura 6 – Concentração de *C.vulgaris* (cel/mL) ao longo de 120 horas após exposição ao MTZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão

A análise da concentração de células de *C.vulgaris* sob diferentes concentrações de MTZ ao longo de 120 horas revelou diferenças claras em relação ao grupo controlo. No grupo controlo, a densidade celular aumentou progressivamente, atingindo cerca de $3,19 \times 10^7$ células/mL às 120 horas.

Nas concentrações mais baixas (0,5mg/L e 1mg/L), observou-se um crescimento semelhante ao do grupo controlo com valores progressivamente inferiores a partir das 48 horas. Nas concentrações mais elevadas, a inibição do crescimento foi mais pronunciada com reduções evidentes do crescimento em comparação com o grupo controlo, especialmente a partir das 72 horas.

A análise estatística confirmou estas observações. O teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas entre os grupos a partir das 48 horas ($p < 0,001$). Posteriormente o teste de Mann-Whitney permitiu identificar diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e todas as concentrações a partir de 1mg/L, diferenças essas já evidentes às 48 horas.

Por outro lado, na concentração de 0,5 mg/L não se registaram diferenças significativas na concentração de células relativamente ao controlo ao longo de todo o período experimental ($p = 0,175$), apesar de ter um valor médio inferior.

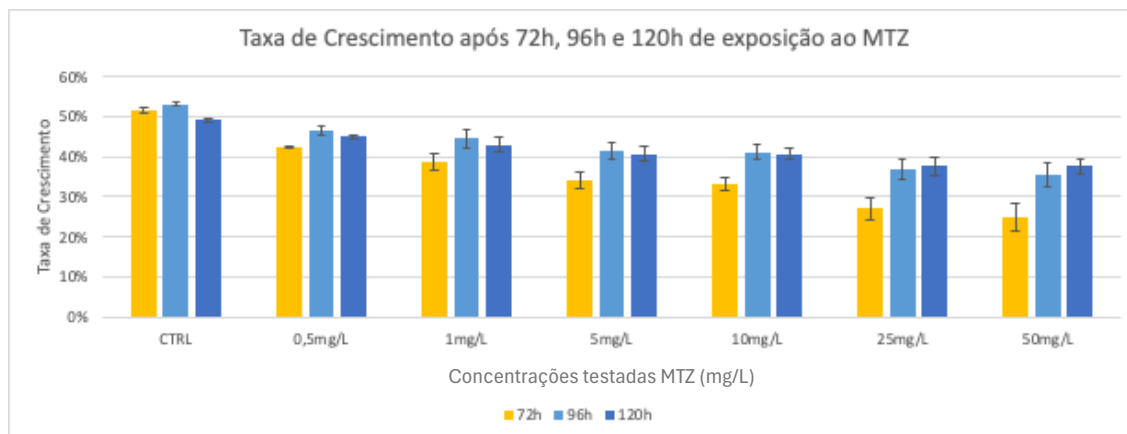


Figura 7 – Taxa de Crescimento de *C.vulgaris* 72h, 96h e 120h após exposição ao MTZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão

A exposição da microalga a diferentes concentrações de MTZ ao longo de 120 horas revelou um efeito dose-resposta: quanto maior a concentração, menor a taxa de crescimento (Figura 7). No grupo controlo, o crescimento manteve-se mais ou menos constante, enquanto as concentrações mais baixas provocaram apenas uma ligeira redução sem significância estatística. Nas concentrações mais elevadas, verificou-se uma menor taxa de crescimento às 72h, que posteriormente aumentou às 96h e diminuiu novamente às 120h.

A avaliação da inibição do crescimento demonstrou que as concentrações mais baixas de MTZ provocaram uma ligeira inibição face ao controlo, enquanto as concentrações mais elevadas resultaram na maior inibição, atingindo valores superiores a 50% às 72 horas (Figura 8).

Ao longo do tempo é perceptível a diminuição gradual da taxa de inibição, o que pode ser explicado pela degradação do MTZ no meio resultando assim, numa recuperação parcial da capacidade de divisão da microalga.

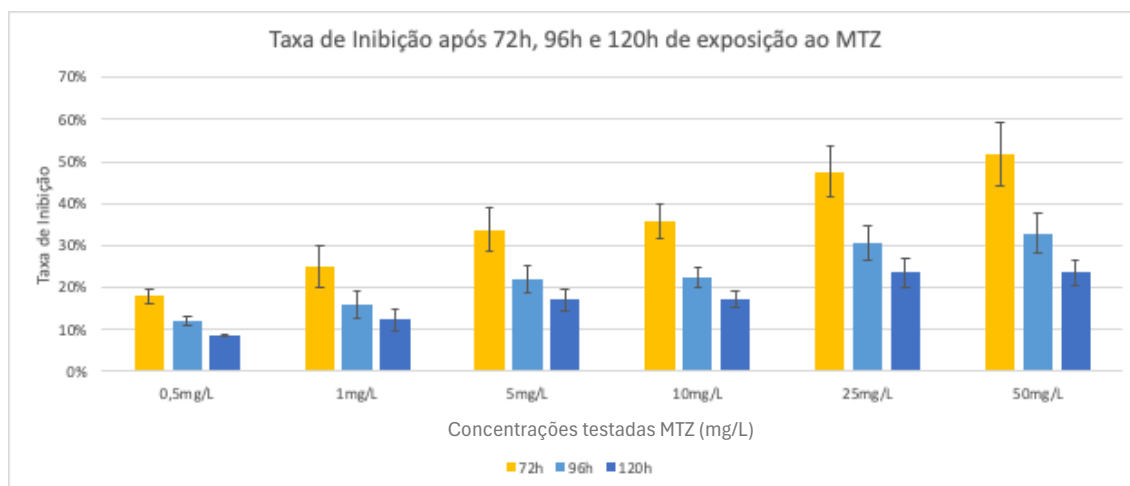


Figura 8 - Taxa de Inibição após 72h, 96h e 120h de exposição ao MTZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão

O valor de EC_{50} às 72 horas, determinado através da análise Probit, foi de 6,3mg/L. Com base nos resultados da análise estatística que foi realizada para verificar diferenças entre o controlo e os restantes grupos de tratamento podemos considerar que o NOEC (Non Observed Effect Concentration) corresponde à concentração de 0,5mg/L, na qual não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controlo até às 120 horas. O LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) corresponde, por sua vez, à concentração de 5mg/L na qual já se verificam diferenças significativas relativamente ao controlo, especialmente a partir das 48 horas de exposição.

3.3. Exposição de *C.vulgaris* ao Ibuprofeno

A exposição a diferentes concentrações de IBU ao longo de 120 horas revelou efeitos claramente dependentes da concentração testada (Figura 9). Nos controlos, verificou-se um aumento do número de células ao longo do tempo. Nas concentrações mais baixas de (0,5 mg/L, 1mg/L e 5mg/L) verificou-se um aumento da densidade de células, ligeiramente superior ao verificado no controlo, mais evidente a partir das 72h de exposição.

Por outro lado, as concentrações mais elevadas (50mg/L e 100mg/L) ocorreu diminuição da densidade de células, a partir das 72 horas de exposição até ao final do ensaio. A análise estatística, realizada com o teste de Kruskal-Wallis, revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,001$) a partir das 24 horas. Posteriormente o teste de Mann-Whitney revelou diferenças significativas entre o grupo controlo e os grupos tratados com as concentrações 1mg/L ($p = 0,028$); 5mg/L ($p < 0,001$); 50mg/L ($p = 0,021$) e 100mg/L ($p < 0,001$) às 120 horas.

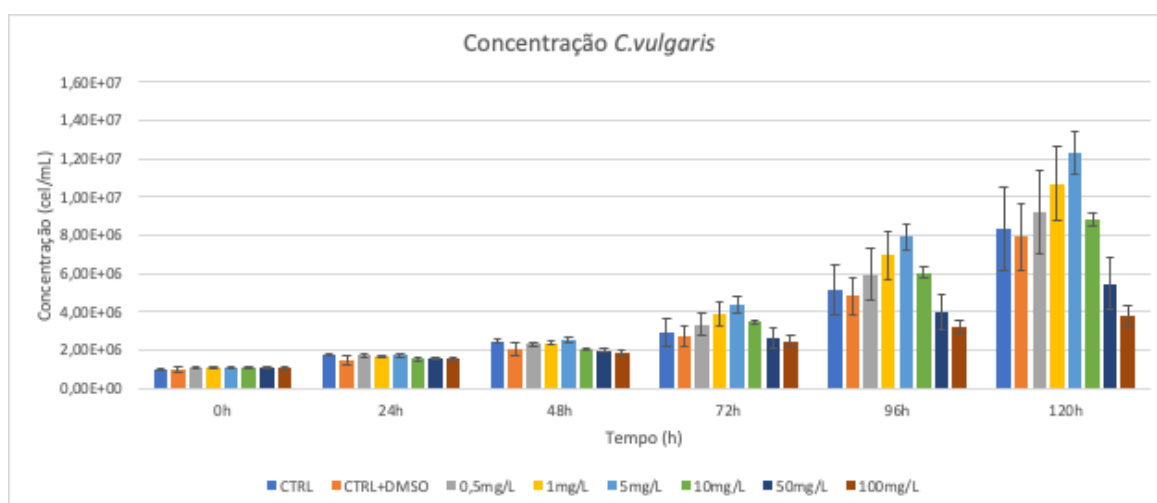


Figura 9 – Concentração de *C. vulgaris* (cel/mL) ao longo de 120 horas após exposição ao IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

As taxas de crescimento mostram que concentrações baixas e intermédias de IBU (1 e 5mg/L) estimulam o crescimento ao longo do tempo, com valores máximos às 96 horas.

Por outro lado, as concentrações elevadas reduzem progressivamente as taxas de crescimento atingindo valores os valores mais baixos às 120 horas. Os controlos apresentam a taxa de crescimento crescente entre as 72 e 120 horas e superior à verificada apenas nas concentrações mais elevadas de IBU, evidenciando que os efeitos observados são dependentes das concentrações de IBU.

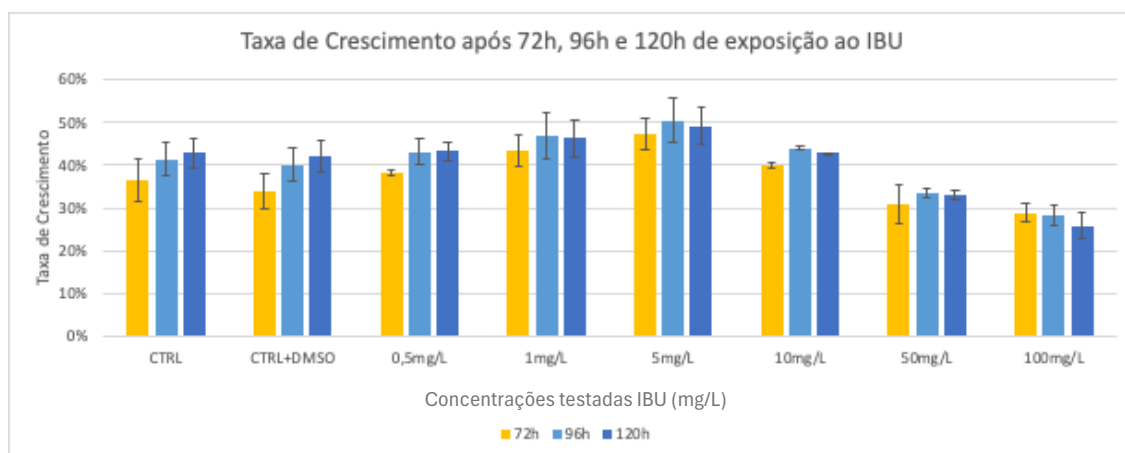


Figura 10 – Taxa de Crescimento de *C. vulgaris* 72h, 96h e 120h após exposição ao IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

Às 72 horas, as concentrações mais baixas de IBU (0,5, 1, 5 e 10mg/L) estimularam o crescimento da microalga até ao final do ensaio, apresentando taxas negativas de inibição, correspondentes a um aumento entre os 20–30%. Este efeito vai diminuindo progressivamente até ao final do ensaio.

Por outro lado, o efeito inibidor que se verifica nas concentrações mais altas de 50 e 100 mg/L, tende a aumentar ao longo do tempo, atingindo cerca de 40% de inibição às 120 horas.

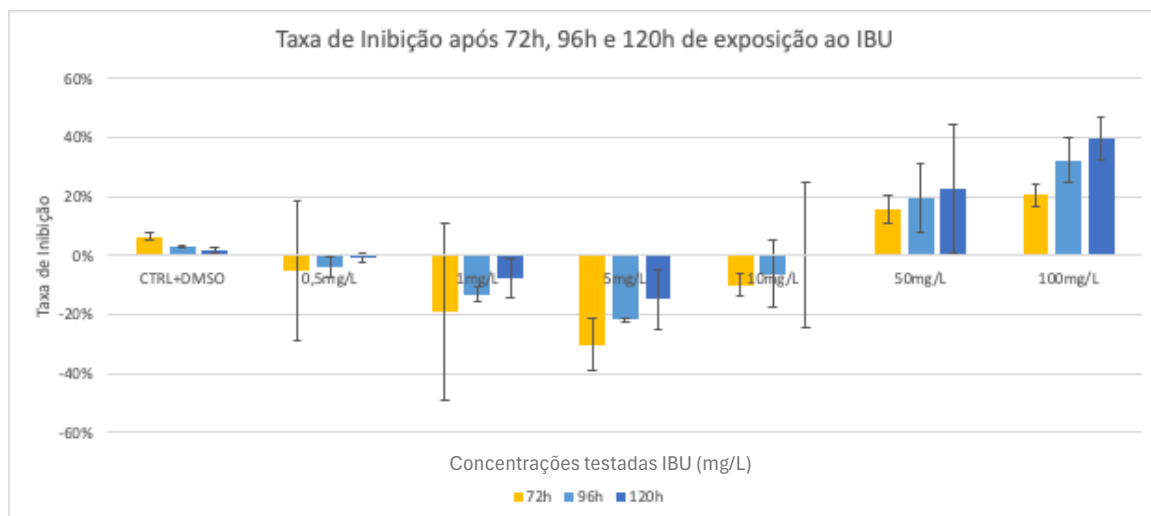


Figura 11- Taxa de Inibição após 72h, 96h e 120h de exposição ao IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

O valor de EC_{50} às 72 horas, calculado a partir da análise Probit, foi de 78,5 mg/L. De acordo com os resultados da análise estatística realizada para avaliar diferenças entre o controlo e os grupos de tratamento, podemos considerar que o NOEC corresponde à concentração de 0,5 mg/L, uma vez que não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo ao longo de todo o período experimental. O LOEC, por outro lado, corresponde à concentração de 1 mg/L, na qual já se verificaram diferenças significativas quando comparado com o grupo controlo, sobretudo a partir das 72 horas de exposição

3.4. Exposição de *C.vulgaris* à mistura Albendazol + Ibuprofeno

A concentração celular da microalga aumentou de forma contínua ao longo do tempo em todas as condições. Os grupos controlo apresentaram um crescimento mais acentuado, alcançando as $7,03 \times 10^6$ e $8,17 \times 10^6$ células/mL às 120 horas. Nos grupos de tratamento, também se verificou crescimento, embora com intensidade dependente da proporção dos compostos. A proporção 25 (ABZ):75 (IBU) exibiu o menor crescimento às 120 horas, indicando um efeito inibidor mais pronunciado quando o IBU se encontra em maior proporção. A proporção 50 (ABZ): 50 (IBU) apresentou uma concentração de células intermédia, enquanto a proporção 75 (ABZ) : 25 (IBU) apresentou valores superiores ao das outras misturas e não apresentou um valor muito diferente do registado no grupo controlo.

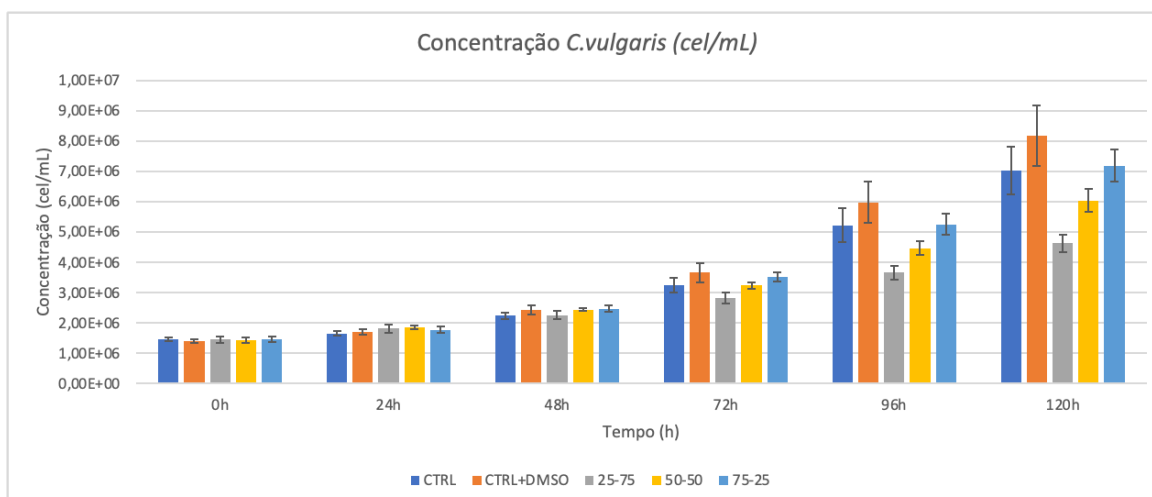


Figura 12 – Concentração de *C. vulgaris* (cel/mL) ao longo de 120 horas após exposição às misturas de ABZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

A análise estatística, realizada com o teste de Kruskal-Wallis, revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p=0,002$) a partir das 24 horas. Posteriormente o teste de Mann-Whitney revelou diferenças significativas entre o grupo controlo e os grupos tratados com as proporções 25-75 ($p<0,001$) e 50-50 ($p=0,007$) às 120 horas.

Observa-se o crescimento contínuo em todas as condições, com inibição mais acentuada nas misturas que apresentam maior proporção de IBU.

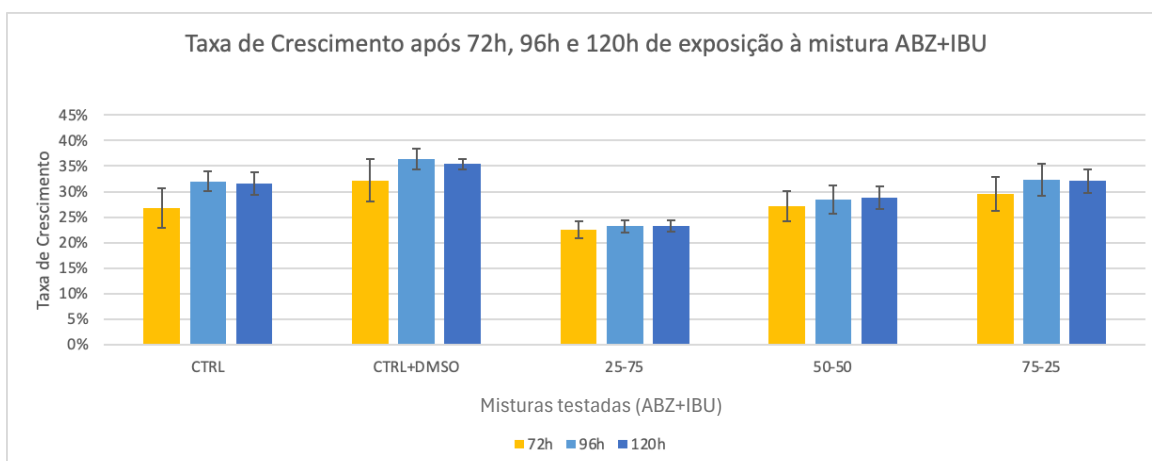


Figura 13 – Taxa de Crescimento de *C. vulgaris* 72h, 96h e 120h após exposição à mistura ABZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

A taxa de inibição na mistura 25-75 foi a mais elevada (16-27%) e a mistura 75-25 não apresentou inibição face ao grupo controlo (-10 e -2%). A taxa de inibição tende a aumentar ao longo do tempo nos grupos tratados com maior proporção de IBU (Figura 14).

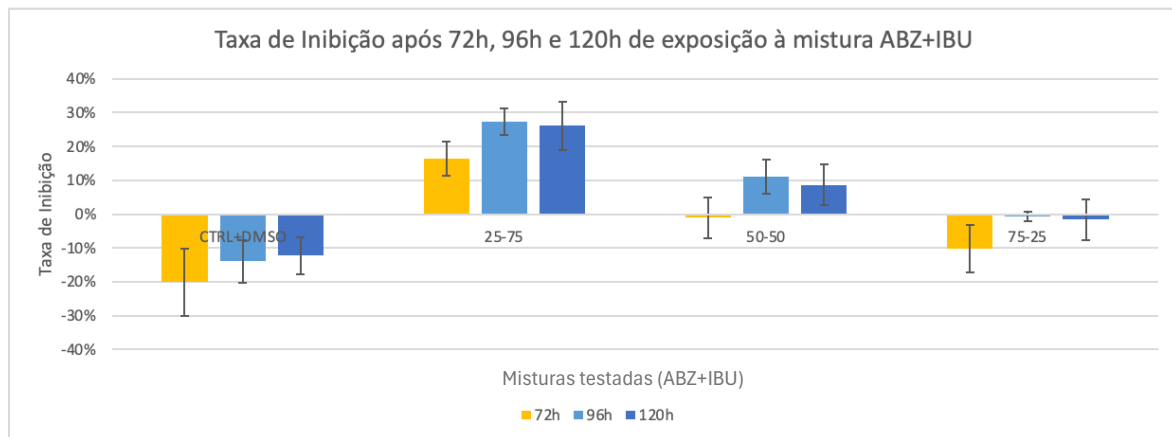


Figura 14 - Taxa de Inibição após 72h, 96h e 120h de exposição à mistura ABZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

3.5. Exposição de *C.vulgaris* à mistura Metronidazol + Ibuprofeno

A Figura 15 apresenta a evolução da concentração de *C.vulgaris*, sob condições de exposição a misturas com proporções variáveis de MTZ e IBU, ao longo das 120 horas de experiência.

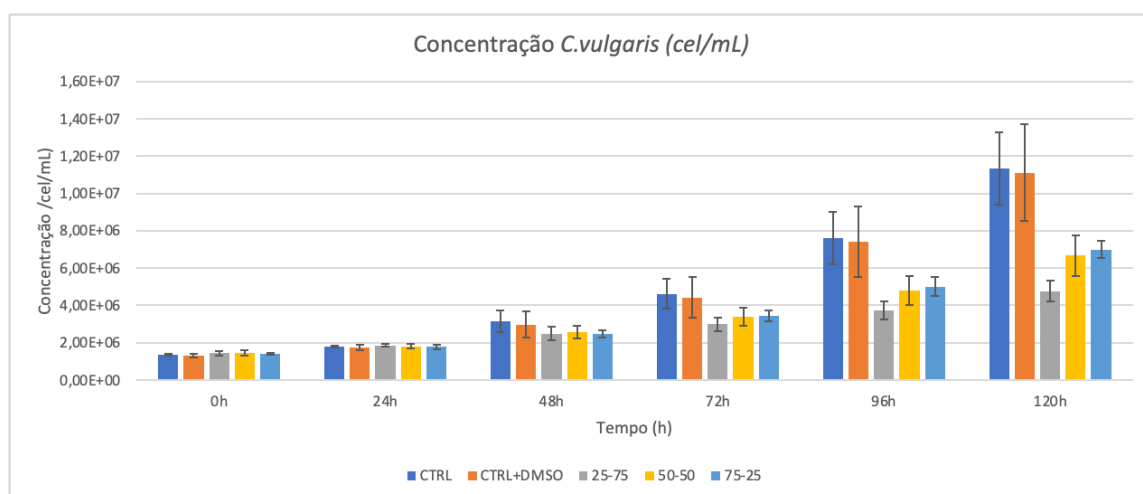


Figura 15 - Concentração de *C.vulgaris*(cel/mL) ao longo de 120 horas após exposição às misturas de MTZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

Nos controlos, observa-se um crescimento exponencial contínuo, sem diferenças significativas entre o grupo CTRL e CTRL+DMSO, o que valida o DMSO como solvente inóculo ($p=0,574$). Contudo, revelaram-se diferenças estatisticamente significativas entre a concentração de células do grupo controlo e a concentração registada em todos os grupos tratados ($p<0,001$).

Nos grupos com as misturas a taxa de crescimento é inferior na proporção 25(MTZ)-75(IBU), quer em relação à registada nos grupos controlo quer com valores registados nas outras duas misturas.

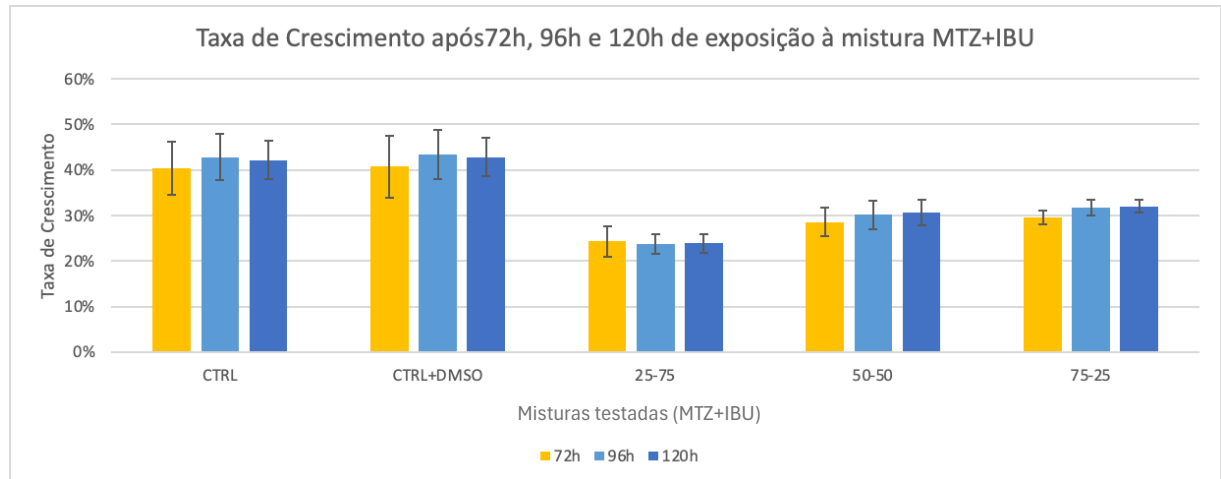


Figura 16 – Taxa de Crescimento de *C. vulgaris* 72h, 96h e 120h após exposição à mistura MTZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

Nos grupos tratados, a taxa de inibição relaciona-se com as concentrações de IBU e de MTZ da mistura e com o tempo de exposição: as misturas com maior proporção de IBU (25-75) exibem uma maior inibição do crescimento, quando comparadas com as misturas com maior proporção de MTZ (75-25).

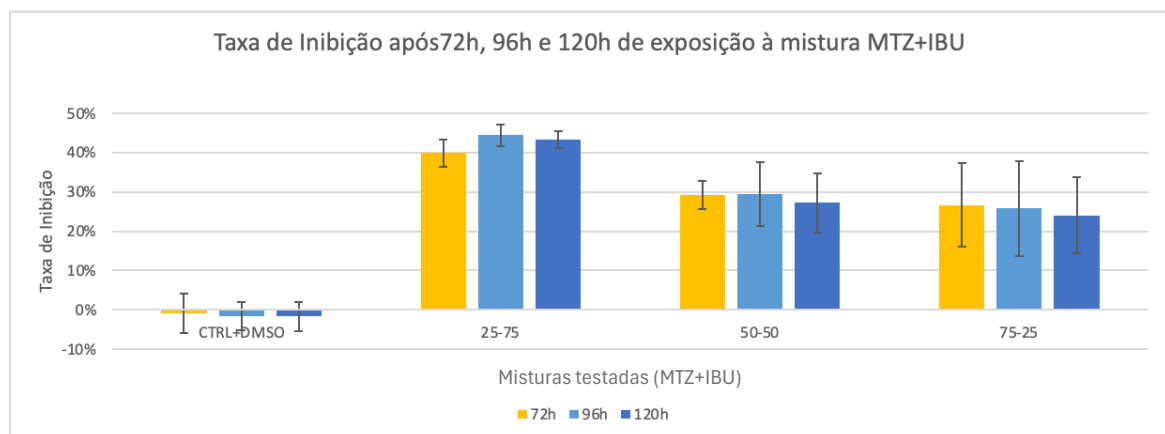


Figura 17 – Taxa de Inibição após 72h, 96h e 120h de exposição à mistura MTZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

4. Discussão e conclusão

A avaliação da toxicidade de ABZ, MTZ e IBU, isolados e em associações na *Chlorella vulgaris* revelou efeitos dependentes tanto da concentração do composto, como do tempo de exposição. No caso do ABZ, observou-se que todas as concentrações testadas condicionaram negativamente o crescimento da microalga, com taxas de inibição superiores a 60% às 72 horas de exposição para as concentrações de 5 e 10 µg/L e um EC₅₀ de 17,7 µg/L. Este resultado indica uma elevada sensibilidade da microalga ao ABZ, encontrando-se em concordância com estudos realizados com outras microalgas. Diniz *et al.* (2020) verificaram que o ABZ induz toxicidade em *Raphidocelis subcapitata*, reduzindo a taxa de crescimento e a biomassa máxima, ainda que a presença da cafeína tenha atenuado esse efeito inibidor. Do mesmo modo, Venancio *et al.* (2021) demonstraram que os derivados de ABZ resultantes da foto-oxidação apresentam toxicidade inferior à do composto original para *Raphidocelis subcapitata*, reforçando a hipótese de que, em misturas ou contextos ambientais, outros compostos podem neutralizar parcialmente os efeitos inibitórios do ABZ.

Relativamente ao MTZ, verificou-se uma evidente relação dose-resposta, com EC₅₀ de 6,3 mg/L às 72 horas, e identificação dos valores de NOEC de 0,5 mg/L e LOEC de 5 mg/L. Os resultados obtidos encontram-se em linha com os valores reportados na literatura. Um estudo realizado por Lanzky & Halting-Sørensen (1997) indicam que *Chlorella sp.* apresenta EC₅₀ de 12,5 mg/L às 72 horas quando exposta ao MTZ. Assim os valores mais baixos encontrados para *C. vulgaris* confirmam a elevada sensibilidade desta espécie ao MTZ, o que legitima a sua utilização como bioindicador em ensaios ecotoxicológicos.

No caso do IBU, verificou-se um efeito bifásico: concentrações mais baixas (1-5 mg/L) estimularam o crescimento de *C. vulgaris*, com taxas de inibição negativas (20-30%), enquanto concentrações elevadas (50-100 mg/L) exerceram um efeito inibidor progressivo, com cerca de 40% de inibição às 120 horas. O valor de EC₅₀ determinado foi de 78,5 mg/L às 72h, valor que se enquadra com o EC₅₀ < 100 mg/L reportado por Geiger *et al.*, (2016). Neste trabalho referem ainda que, em misturas, os compostos com maior efeito inibitório isolado, tendem a influenciar significativamente o efeito tóxico da mistura.

A análise das misturas permite observar fenómenos distintos que não são totalmente explicados pelos ensaios com compostos isolados. Na associação de ABZ+IBU, verificou-se que nas misturas com maior proporção de IBU (25:75) apresentaram maior inibição (16-27%), enquanto as misturas com maior proporção de ABZ (75:25) não induziram inibição significativa do crescimento. Este resultado é particularmente interessante porque contrasta com os efeitos observados nos efeitos isolados. O ABZ,

isoladamente, foi altamente tóxico, com taxas de inibição entre os 62%–68%. Assim, a ausência de inibição nas misturas dominadas por ABZ sugere que o IBU neutralizou, em parte, os efeitos tóxicos do ABZ. Um caso semelhante, foi também reportado por Diniz *et al.* (2020) que relatou que a cafeína reduziu a toxicidade do ABZ para a microalga. Este tipo de interação antagónica pode refletir processos bioquímicos de neutralização de stress oxidativo, justificando a ausência, inesperada, de toxicidade nas misturas dominadas por ABZ.

Na associação MTZ+IBU, observou-se que as misturas com maior proporção de IBU (25:75) induziram uma inibição significativa do crescimento de *C.vulgaris*, enquanto as misturas com maior proporção de MTZ (75:25) apresentaram efeitos de inibição menos pronunciados. O MTZ, isoladamente, apresentou taxas de inibição superiores a 50% e na mistura com maior proporção de MTZ a taxa de inibição não ultrapassou os 50%, o que indica que o IBU não potenciou a inibição do MTZ ou vice-versa.

No seu conjunto, os resultados obtidos reforçam a elevada sensibilidade de *C.vulgaris* a estes compostos, com valores de EC_{50} que se encontram de acordo com a literatura. Adicionalmente, evidenciam que, em misturas, os efeitos podem divergir substancialmente dos efeitos verificados com os compostos isolados, verificando-se fenómenos de antagonismos no caso da mistura ABZ+IBU

Capítulo IV – Avaliação dos efeitos de albendazol, metronidazol e ibuprofeno em *Lactuca sativa*

1. Visão geral do ensaio *L.sativa*

A presença de poluentes nos solos constitui uma preocupação crescente na ecotoxicologia, uma vez que diversas atividades antrópicas, como por exemplo o despejo de resíduos industriais ou até a agricultura intensiva, podem introduzir no solo metais pesados, pesticidas e outros poluentes (Bagur-González *et al.*, 2011). A presença destes contaminantes pode comprometer a qualidade do solo e representar potenciais riscos para a saúde humana e para os ecossistemas. Assim, a avaliação da fitotoxicidade constitui uma ferramenta essencial para estimar os efeitos resultantes da exposição a esses poluentes.

A *L.sativa*, vulgarmente conhecida como alface, é frequentemente utilizada como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos, uma vez que apresenta elevada sensibilidade a poluentes, simplicidade metodológica e baixo custo de aquisição. Os testes de germinação e crescimento de raízes e epicótilos são rápidos, de fácil execução e permitem avaliar a fitotoxicidade de diferentes amostras ambientais (Mañas & De las Heras, 2018).

Diversos estudos indicam que o crescimento da raiz constitui um parâmetro de avaliação particularmente sensível, detetando efeitos tóxicos em concentrações inferiores às necessárias para comprometer a germinação das sementes. Dessa forma, o comprimento da raiz é considerado um indicador mais precoce de toxicidade em comparação com a taxa de germinação (Campagna-Fernandes *et al.*, 2016). Ensaio realizados com extratos de solos provenientes de áreas agrícolas, evidenciam que o crescimento da raiz é o parâmetro mais sensível em condições de baixa contaminação, enquanto que para níveis de elevada contaminação, tanto a taxa de germinação como o crescimento da raiz, são bons indicadores de fitotoxicidade (Bagur-González *et al.*, 2011).

Lactuca sativa é um organismo teste sensível e os testes são facilmente reprodutíveis, com aplicação transversal a diferentes tipos de amostras ambientais.

2. Materiais e Métodos

A metodologia utilizada para este ensaio foi adaptada da Norma 208 OECD (OECD, 2006b). Este teste avalia os efeitos na germinação das sementes e no crescimento inicial da planta, nomeadamente no crescimento radicular e no crescimento do ápice, após a exposição aos princípios-ativos em estudo.

2.1. Seleção e lavagem das sementes

Antes do início do teste as sementes foram submetidas a um protocolo de lavagem e hidratação. As sementes foram lavadas em água corrente durante um minuto, e de seguida foram colocadas num recipiente com água destilada por um período de 1 minuto. Posteriormente, foram colocadas numa placa de Petri, e foram descartadas todas as sementes que numa inspeção visual apresentavam aspeto alterado indiciando não serem viáveis.

2.2. Soluções de teste

As soluções utilizadas nos testes foram obtidas por diluições em série, utilizando água destilada como solução de diluição. Foram utilizadas 6 concentrações diferentes, descritas na tabela 9, para além do tratamento controlo, constituído por água destilada e um controlo adicional com água destilada e DMSO, no caso das soluções de ABZ e IBU.

Tabela 9 – Concentrações utilizadas nos testes com ABZ, MTZ e IBU isolados

Organismo teste	Princípio-ativo	Concentrações testadas (mg/L)
<i>L.sativa</i>	ABZ	5; 10; 20; 40; 80; 160
	MTZ	
	IBU	

Tal como no ensaio com *C.vulgaris*, também foram testadas as misturas de MTZ + IBU e ABZ + IBU, nas sementes de *L.sativa*. Na tabela 10, estão descritas as concentrações utilizadas para cada princípio-ativo bem como a sua proporção na solução final.

Tabela 10 – Concentrações utilizadas nos testes com mistura de princípios-ativos

Organismo teste	Mistura	Concentrações (mg/L)	Proporção
<i>L.sativa</i>	ABZ + IBU	160 + 160	25:75 ; 50:50 ; 75-25
	MTZ + IBU		

2.3. Procedimento do ensaio

Os testes foram realizados em placas de Petri (9cm de diâmetro), contendo discos de papel de filtro embebidos em 3 ml de solução teste, ou água destilada no caso do grupo controlo. Em cada placa de Petri foram colocadas dez sementes de *L.sativa* (*Casa César Santos, Portugal*), cuidadosamente distribuídas, garantindo o espaçamento uniforme entre elas. As placas de Petri foram seladas com parafilme, de modo a evitar a evaporação e contaminação, e posteriormente incubadas no escuro a uma temperatura constante de $(21 \pm 1^\circ\text{C})$ por 120 horas. Foram realizados três testes independentes.

2.4. Avaliação da germinação

As sementes são consideradas germinadas quando a raiz apresenta um tamanho mínimo de 5mm. O número de sementes germinadas foi determinado, diariamente, desde o início do teste (0h) até ao seu final (120h).

A percentagem de germinação foi avaliada, conforme descrito pela equação (4).

$$(4) \quad G = \frac{GS}{TS}$$

Na equação, (G) corresponde à percentagem de germinação que é calculada pela divisão do número de sementes germinadas (GS) pelo número total de sementes (TS)

2.5. Avaliação do comprimento da raiz e epicótilo

Após as 120 horas de exposição ao princípio-ativo, foram medidas as raízes e os epicótilos de todas as sementes germinadas, utilizando o software *Image J – SmartRoot*. Para além do comprimento, o programa permite também a medição da área da raiz e do epicótilos. A figura 18, descreve como foi medida a raiz e o epicótilo, na semente germinada.

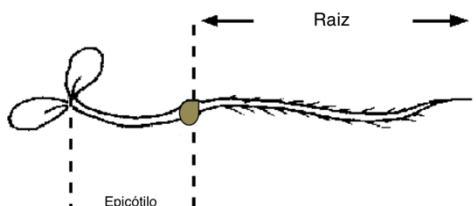


Figura 18 – Exemplificação de como identificar e medir a raiz e o epicótilo das sementes de *L.sativa*.
Fonte: <http://ei.cornell.edu/toxicology/bioassays/lettuce/data.html>

2.6. Análise de resultados e estatística

A taxa de germinação (GER), representada pela equação (5), foi calculada dividindo o número de sementes germinadas em cada solução teste (GST) pelo número de sementes germinadas no controlo com água destilada (GSC).

$$(5) \quad GER = \frac{GST}{GSC} \times 100$$

A Taxa de inibição da germinação (GERI), foi calculada através da equação (6):

$$(6) \quad GERI = 100 - \frac{GST}{GSC} \times 100$$

Onde GERI é a taxa de inibição de germinação, GST o número de sementes germinadas em cada tratamento e GSC o número de sementes germinadas no grupo controlo.

A Taxa de crescimento (GR) foi calculada através da equação (7)

$$(7) \quad GR = \frac{LT}{LC} \times 100$$

Onde GR corresponde à taxa de crescimento, LT o comprimento médio da raiz/epicótilo no tratamento e LC o comprimento médio da raiz/epicótilo do grupo controlo.

A taxa de Inibição de crescimento (GRI), foi calculada através da equação (8):

$$(8) \quad GRI = 100 - \frac{LT}{LC} \times 100$$

Onde GRI corresponde à taxa de inibição de crescimento, LT o comprimento médio da raiz/epicótilo no tratamento e LC o comprimento médio da raiz/epicótilo do grupo controlo. Para a determinação da GRI.

O teste de Kruskal-Wallis, para avaliar diferenças estatisticamente significativas entre os diversos grupos e o teste de Mann-Whitney para fazer comparações entre pares de grupo, foram realizados através do software *IBM SPSS Statistics 25*, com um intervalo de confiança de 95% ($\alpha=0.005$).

3. Resultados

Foi avaliada a vitalidade das sementes do grupo controlo pelas taxas de germinação, que foram >90% em todos os três testes realizados. Como não houve germinação nas primeiras 24 horas, apenas são apresentados os resultados após as primeiras 48 horas de exposição.

Os resultados apresentados nos gráficos correspondem à média obtida a partir das três experiências independentes, para cada grupo foram feitas 3 réplicas. As barras de erro indicam o desvio padrão.

3.1. Exposição de *L.satíva* ao Albendazol

No teste com ABZ, nos dois grupos controlos, e nas concentrações 10 mg/L e 80mg/L, a percentagem máxima de germinação foi atingida às 48 horas com um valor de 83% de germinação para os dois grupos controlos e 80mg/L e 60% de germinação para a concentração de 10mg/L.

Quando exposta ao ABZ, a germinação de *L.satíva* sofreu reduções estatisticamente significativas em comparação com o grupo controlo. O teste de Mann-Whitney revelou diferenças significativas entre o grupo controlo e os grupos tratados com as concentrações 5mg/L ($p=0,046$); 10mg/L ($p=0,034$); 20mg/L ($p=0,043$); 40mg/L ($p=0,046$) e 160mg/L ($p=0,046$) às 120 horas.

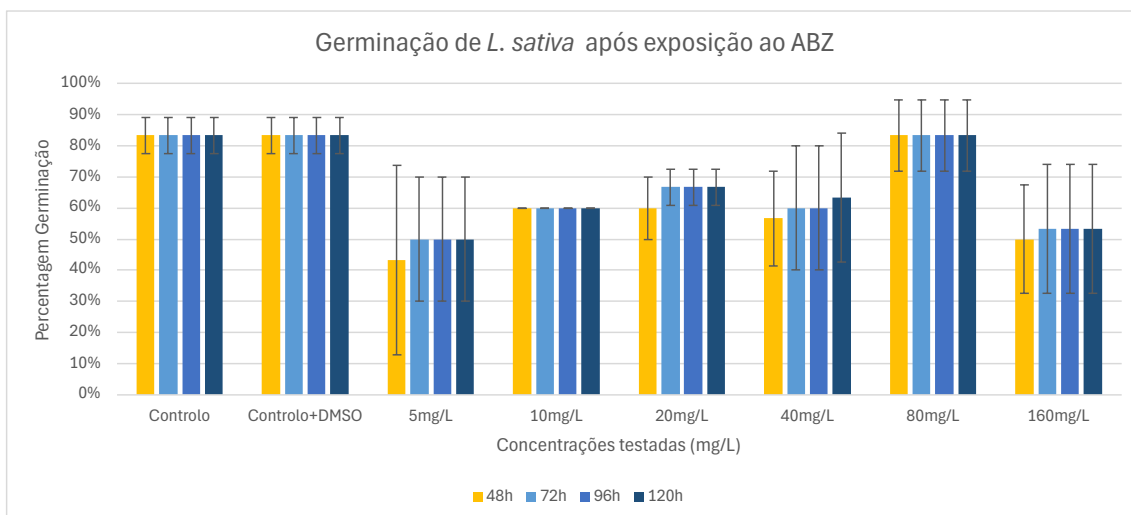


Figura 19 – Percentagem de germinação de *L. sativa* após exposição ao ABZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão

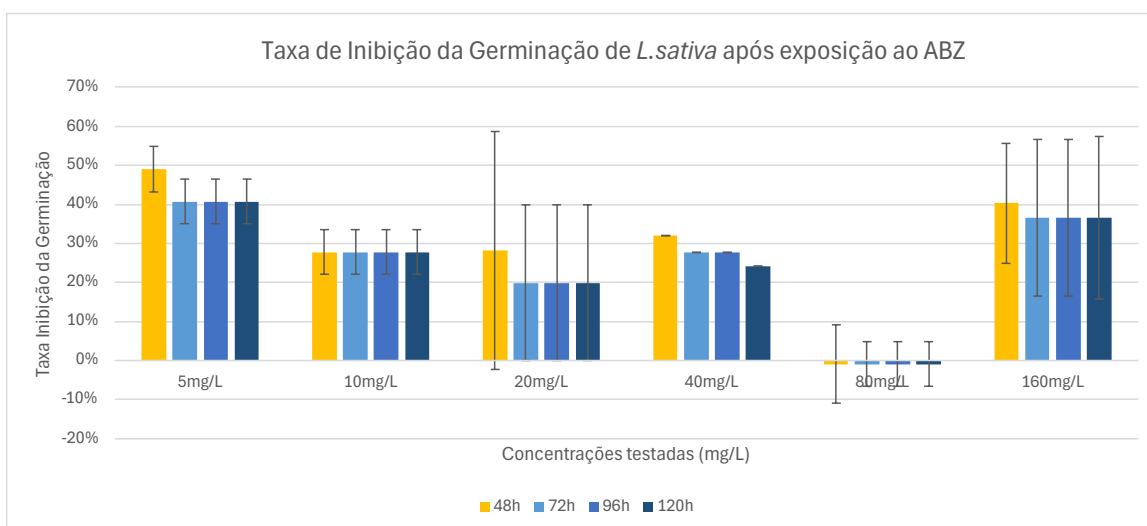


Figura 20 – Taxa de inibição da germinação de *L. sativa* após exposição ao ABZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão

Embora o modelo Probit estime um EC_{50} para a germinação de aproximadamente 21mg/L, os dados experimentais revelaram uma resposta diferente do esperado. A concentração intermédia de 80mg/L exibiu maior germinação do que na concentração 20mg/L, enquanto 160mg/L apresentou uma pequena redução de germinação face à concentração de 20mg/L. Este padrão de resposta indica que a relação dose-resposta pode ser mais complexa do que a hipótese de aumento linear da inibição com o aumento da concentração.

A partir da análise estatística realizada, podemos afirmar que o valor de LOEC para a germinação é de 5mg/L. No entanto a determinação do valor de NOEC não foi possível.

A análise estatística revelou ainda, efeitos significativos no crescimento da *L. sativa*, tanto ao nível do comprimento da raiz quanto do epicótilo, quando comparado os grupos com ABZ com o grupo controlo.

No que se refere ao comprimento da raiz, observou-se uma redução significativa relativamente ao grupo controlo nas concentrações de 10mg/L ($p=0,020$); 40mg/L ($p=0,027$); 80mg/L ($p=0,028$) e 160mg/L ($p=0,010$). A menor concentração testada (5mg/L) não demonstrou efeitos significativamente diferentes, assumindo, assim o valor de NOEC para a inibição do crescimento da raiz (Figura 21).

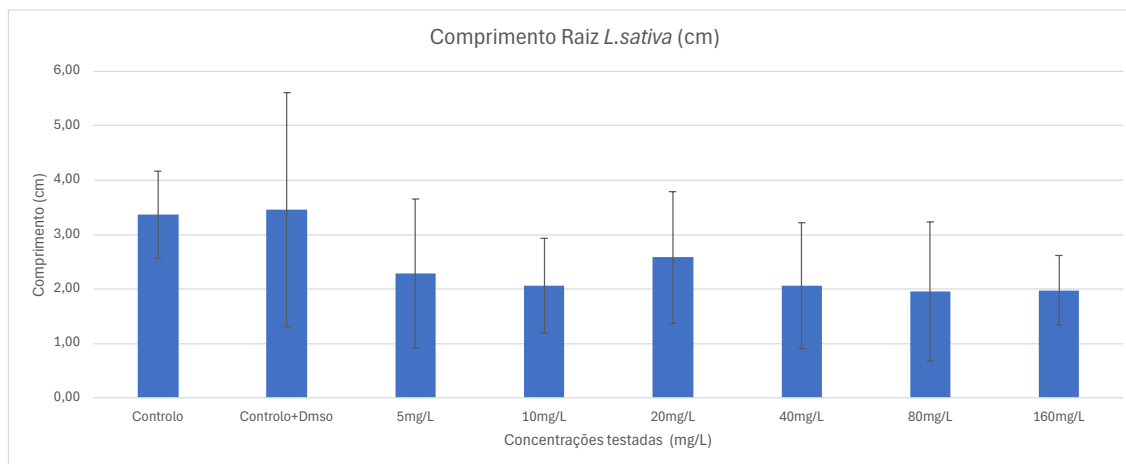


Figura 21 – Comprimento da raiz de *L. sativa* após exposição ao ABZ. As barras de erro, representam o desvio padrão

Relativamente ao comprimento do epicótilo (Figura 22), as diferenças significativas em relação ao grupo controlo, foram observadas apenas nas concentrações de 40 mg/L ($p=0,002$) e 80 mg/L ($p=0,005$).

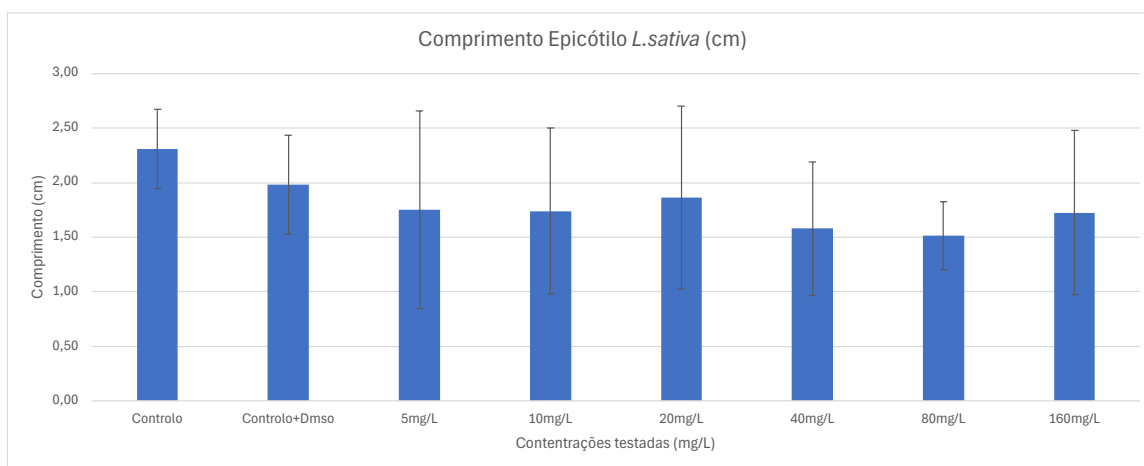


Figura 22 – Comprimento do epicótilo de *L. sativa* após exposição ao ABZ. As barras de erro, representam o desvio padrão

3.2. Exposição de *L.sativa* ao Metronidazol

A *L.sativa* foi exposta ao MTZ e os dados obtidos foram analisados utilizando os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os resultados revelaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e as concentrações de 20 mg/L ($p = 0,034$) e 160mg/L ($p = 0,037$), observadas logo às 48 horas de exposição.

A figura 23 apresenta a evolução temporal da germinação da *L.sativa*.

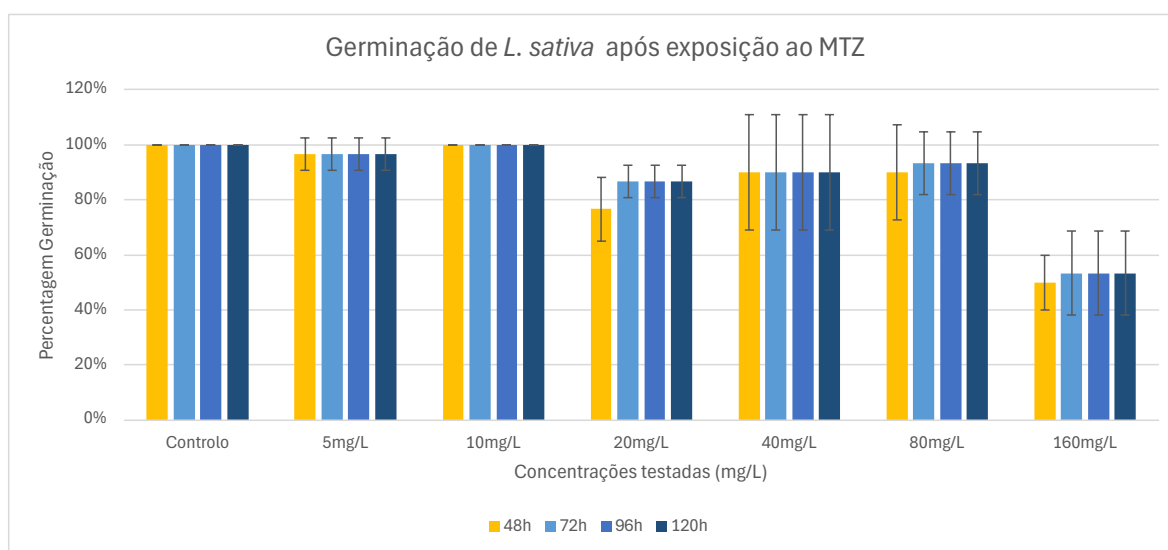


Figura 23 - Percentagem de germinação de *L.sativa* após exposição ao MTZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão

De uma forma geral, os resultados evidenciam um efeito dependente da concentração, em que concentrações intermédias (20 mg/L) reduzem a germinação de *L.sativa*, registando-se a maior inibição na concentração de 160 mg/L.

A determinação do valor de NOEC para a germinação é de 5mg/L e o LOEC de 20mg/L.

Apesar de ser notória uma pequena tendência de diminuição do comprimento do epicótilo com o aumento da concentração de MTZ, o teste de Kruskal-Wallis, revelou a não ocorrência de quaisquer diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,413$).

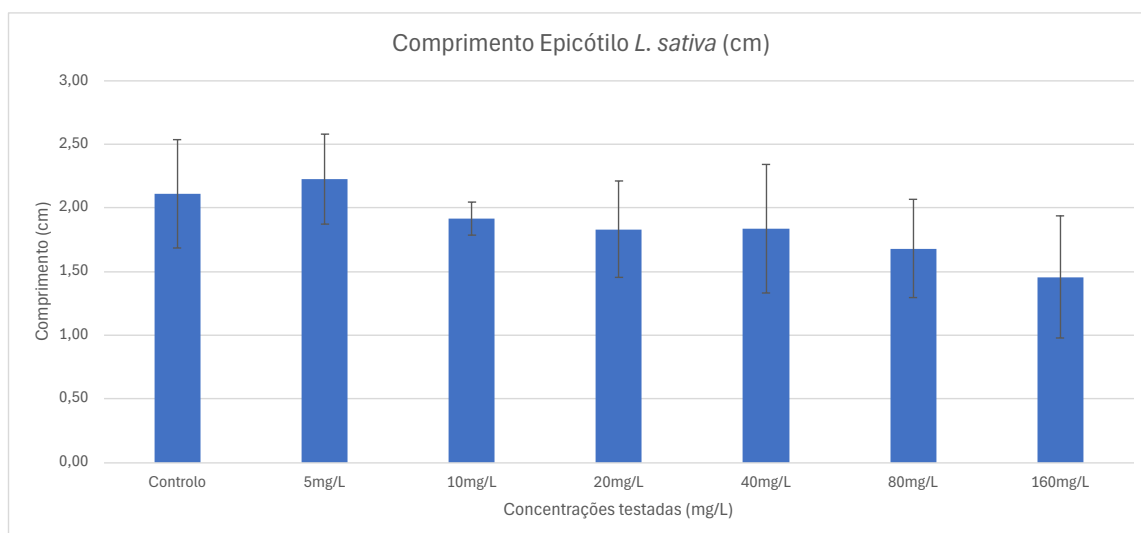


Figura 24 – Comprimento do epicótilo de *L.sativa* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

Foram encontradas diferenças significativas ao nível do comprimento da raiz da *L. sativa*, entre o grupo controlo e na concentração de 160mg/L ($p=0,003$). Podemos então indicar o valor de LOEC, para a inibição do crescimento da raiz, de 160mg/L (Figura 25).

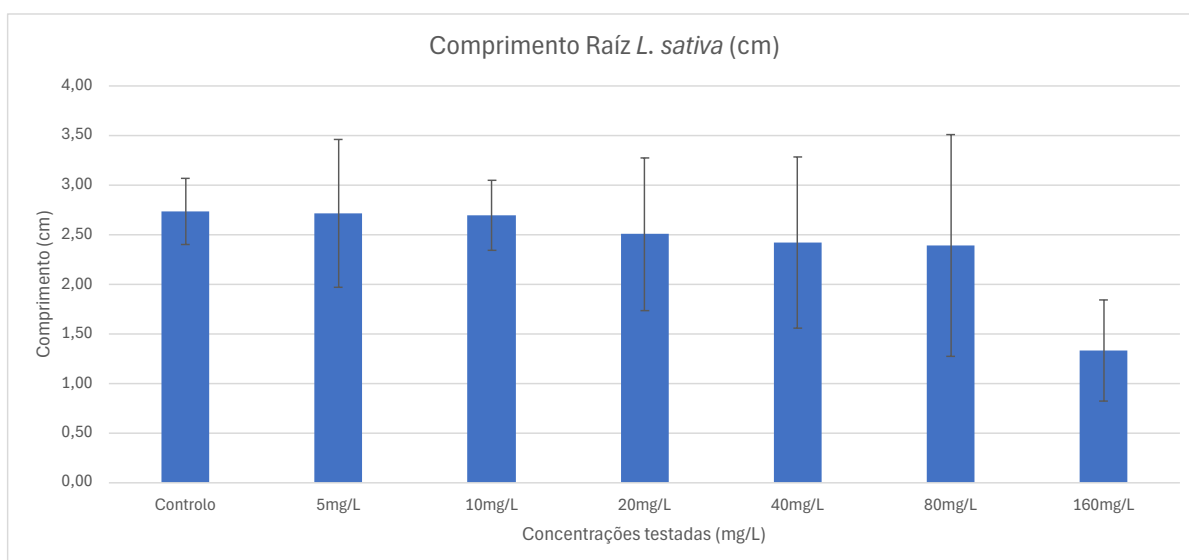


Figura 25 – Comprimento da raiz de *L.sativa* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

3.3. Exposição de *L.sativa* ao Ibuprofeno

A exposição de *L.sativa* ao IBU (Figura 26) revelou efeitos distintos em função da concentração testada, em todos os grupos com exceção do grupo 10mg/L, onde se registou uma redução da germinação. Foram apenas observadas diferenças significativas na germinação entre o controlo e a concentração de 160 mg/L ($p=0,034$), registando-se a maior inibição da germinação nesta concentração.

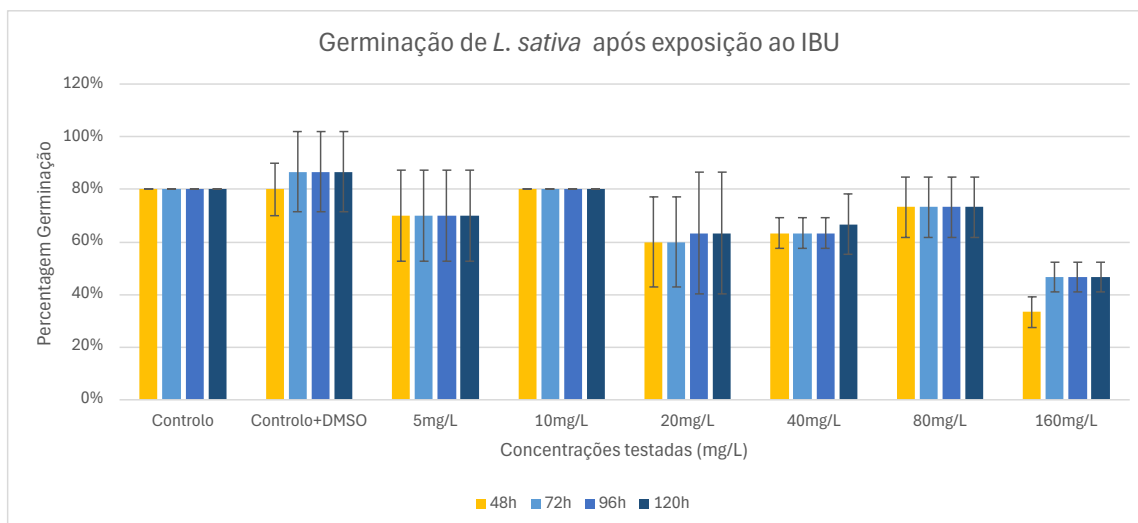


Figura 26 – Percentagem de germinação de *L.sativa* após exposição ao IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

O valor de EC_{50} , calculada por análise Probit, para a germinação às 72 horas foi de 15,4 mg/L, indicando que esta concentração corresponde ao ponto em que se prevê uma redução de 50% na germinação relativamente ao controlo. No entanto, a análise das concentrações imediatamente superiores a 20 mg/L não revelaram diferenças estatisticamente significativas face ao controlo. Esta aparente discrepância pode ser explicada pela variabilidade experimental, inerente a ensaios biológicos, que pode atenuar ou mascarar diferenças reais entre grupos.

No que diz respeito ao crescimento radicular (Figura 27), verificaram-se alterações evidentes no comprimento da raiz. Nas concentrações de 5 mg/L ($p<0,001$), 10 mg/L ($p=0,020$), 20 mg/L ($p=0,040$) e 40 mg/L ($p=0,039$) observou-se um aumento do comprimento da raiz em 83%, 71% e 68% e 28% respetivamente. Contrariamente, na concentração mais elevada (160 mg/L) foi detetada uma inibição acentuada do crescimento radicular, correspondente a 58% ($p=0,028$).

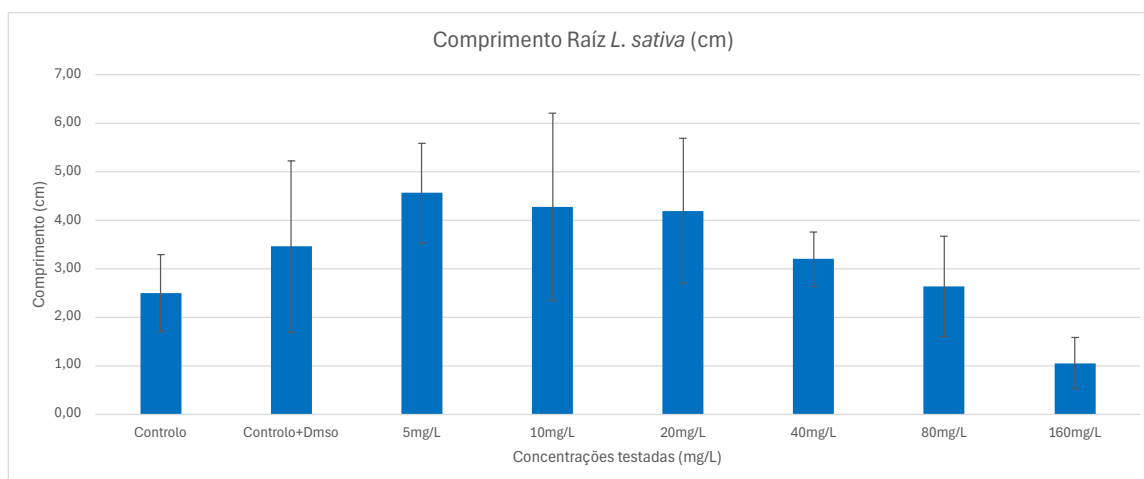


Figura 27 - Comprimento da raiz de *L. sativa* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

Relativamente ao epicótilo, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos expostos ao IBU e o grupo controlo ($p=0,138$).

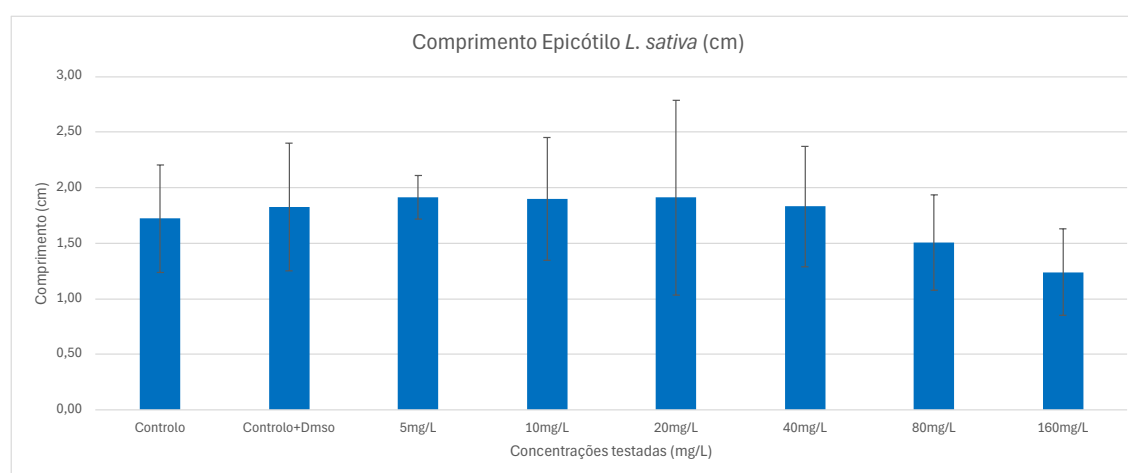


Figura 28 - Comprimento do epicótilo de *L. sativa* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

3.4. Exposição de *L. sativa* à mistura de Albendazol + Ibuprofeno

A exposição de *L. sativa* a misturas de ABZ+IBU evidenciou efeitos distintos na germinação e o crescimento inicial (Figura 29). A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas entre os grupos, confirmadas pelo teste de Mann-Whitney, que identificou reduções significativas na germinação em todas as misturas, quando comparadas com o grupo controlo ($p<0,001$).

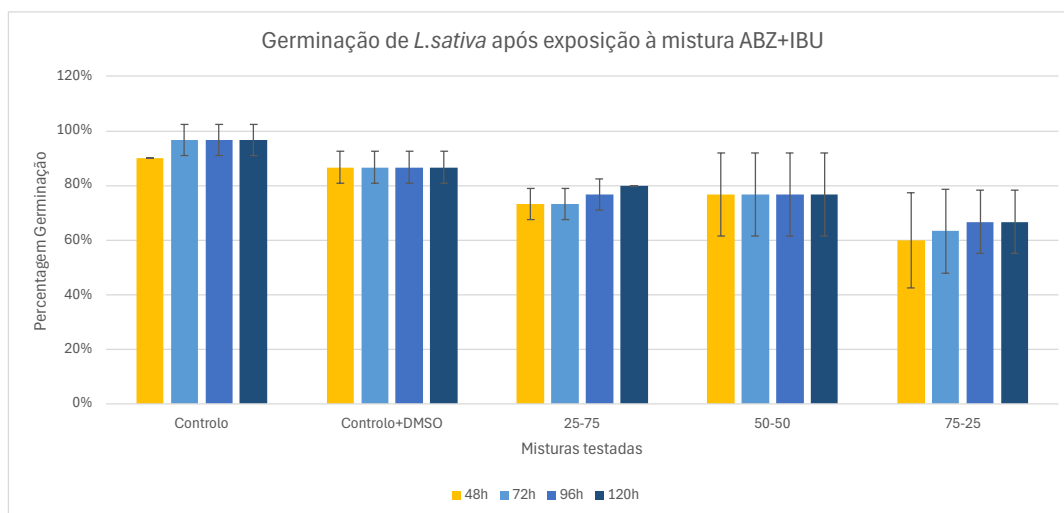


Figura 29 – Percentagem de germinação de *L.sativa* após exposição à mistura de ABZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

No que respeita ao crescimento da raiz (Figura 30), todas as combinações avaliadas provocaram aumento do comprimento da raiz. O efeito foi particularmente marcado no comprimento radicular, nas misturas 25:75 ($p=0,006$) e 50:50 ($p=0,011$) a promoverem um aumento próximo de 100% face ao controlo.

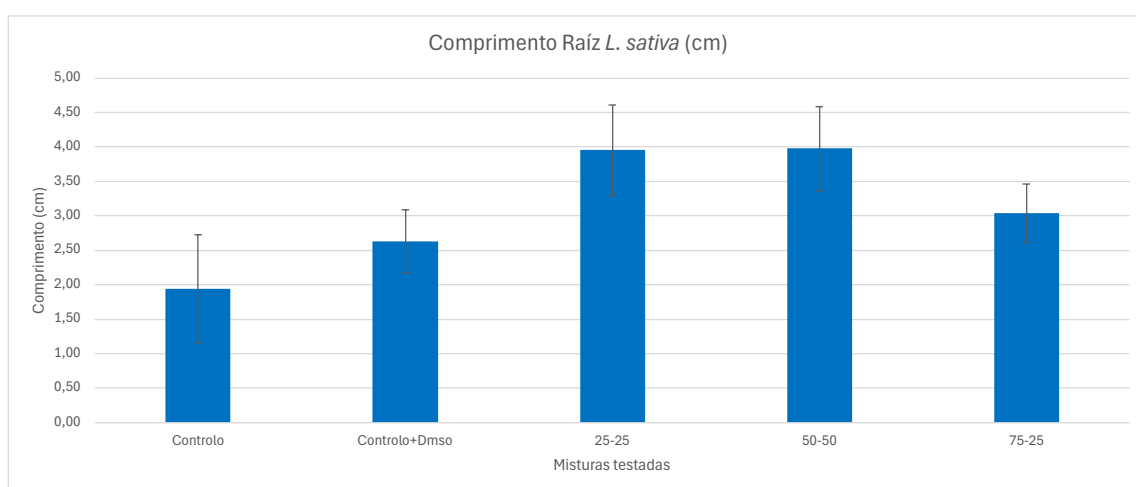


Figura 30 – Comprimento da raiz de *L.sativa* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

Quanto ao epicótilo, todas as misturas apresentaram diferenças significativas face ao grupo controlo ($p=0,009$; $p=0,0016$ e $p=0,009$) provocaram o aumento do comprimento do epicótilo face ao grupo controlo, com incrementos em torno dos 70% (Figura 31).

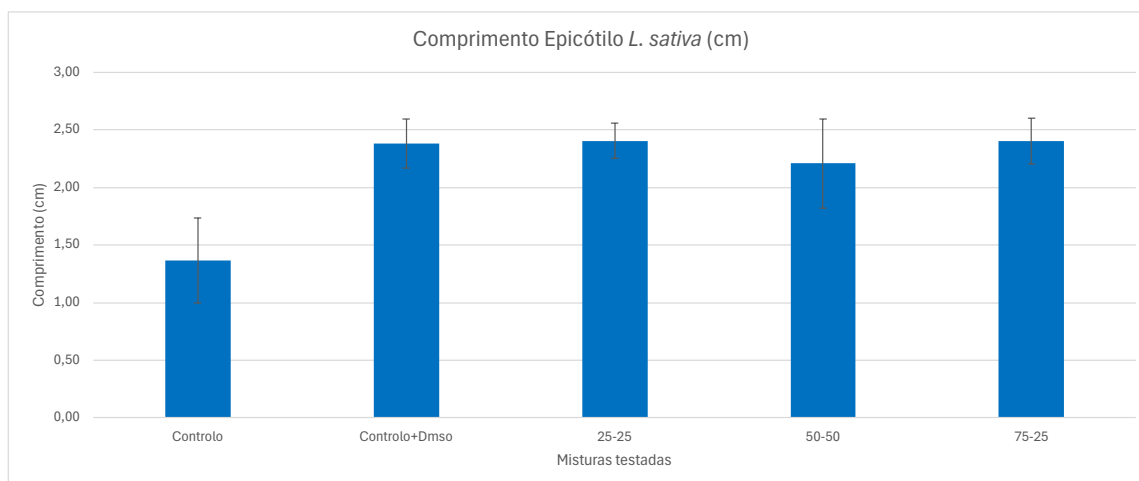


Figura 31 - Comprimento do epicótilo de *L.sativa* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

3.5. Exposição de *L.sativa* à mistura de Metronidazol + Ibuprofeno

A exposição à mistura de MTZ+IBU provocou a redução da germinação das sementes em qualquer dos grupos, relativamente ao registado no grupo controlo. Desde as primeiras 48 horas, todas as misturas inibiram significativamente a germinação em relação ao controlo ($p=0,046$; $p=0,046$ e $p=0,043$), evidenciando a sensibilidade precoce das sementes a esta combinação.

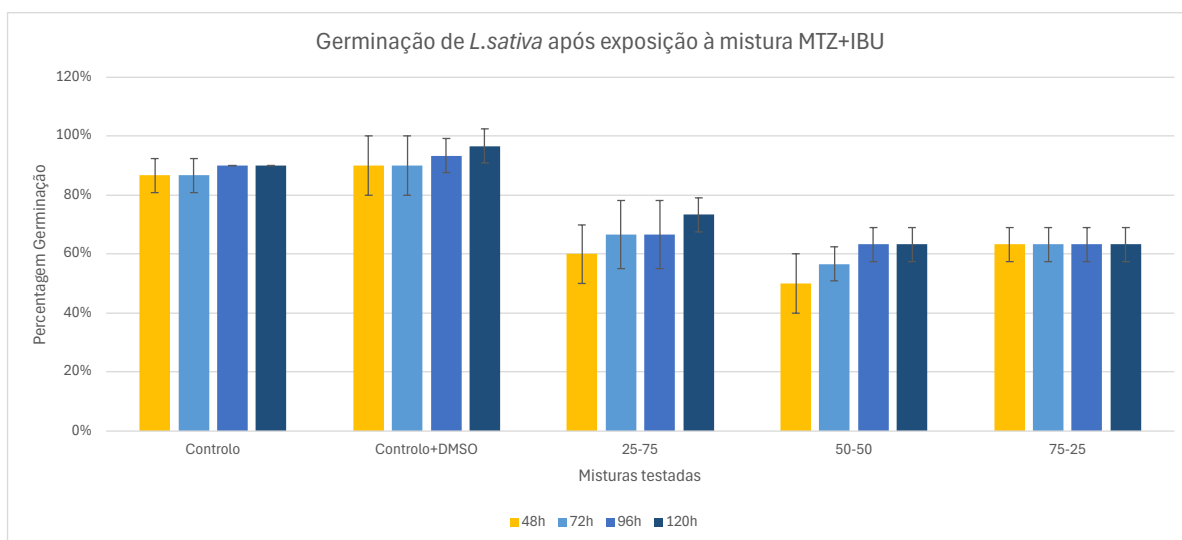


Figura 32 - Percentagem de germinação de *L.sativa* após exposição à mistura de MTZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

A análise do crescimento radicular mostrou que apenas a mistura 50:50 diferiu do grupo controlo ($p=0,028$), promovendo uma estimulação expressiva com um aumento de cerca de 57% no comprimento da raiz (Figura 33).

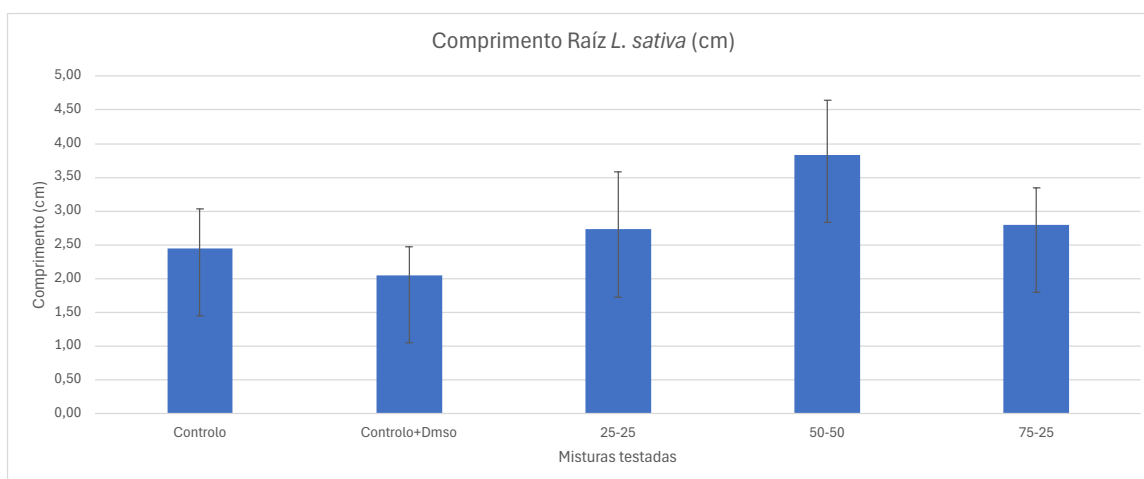


Figura 33 – Comprimento da raiz de *L.sativa* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

Por outro lado, a avaliação do comprimento do epicótilo apresentou uma tendência oposta. Todas as misturas reduziram o seu alongamento, sendo a proporção 50:50 a única com diferença estatisticamente significativa ($p=0,047$), apresentando uma taxa de inibição de 22%.

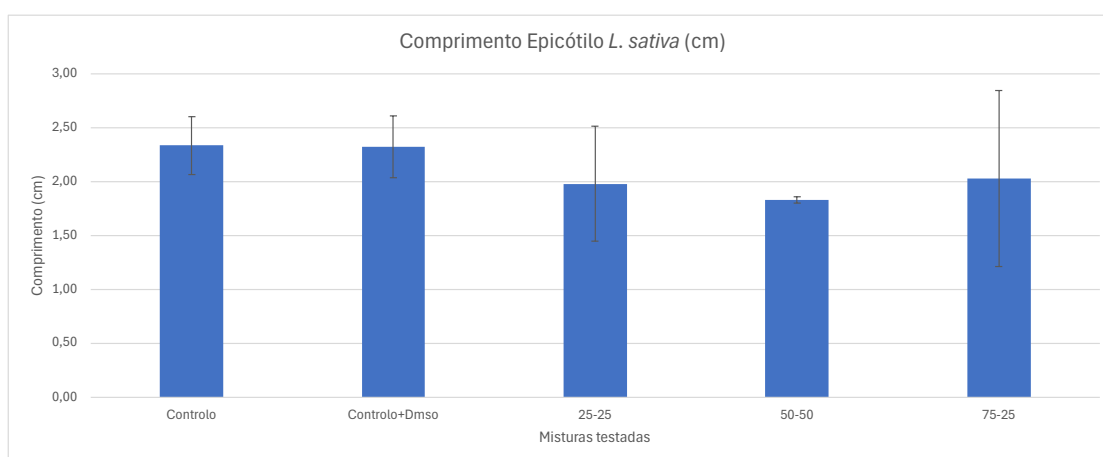


Figura 34 – Comprimento do epicótilo de *L.sativa* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

4. Discussão e Conclusão

A exposição de *Lactuca sativa* ao ABZ, MTZ e IBU, isoladamente ou em misturas, revelou efeitos complexos e dependentes da concentração, tanto na germinação quanto no crescimento inicial. A exposição ao ABZ revelou uma inibição significativa da germinação em todas as concentrações testada, com diferenças estatísticas em relação ao controlo desde 5mg/L até 160mg/L. O EC_{50} estimado por Probit foi de 21 mg/L, sugerindo que concentrações superiores a este valor podem resultar em efeitos

adversos significativos. No entanto, a resposta experimental revelou um padrão não linear, com a concentração intermédia de 80 mg/L a apresentar maior germinação que a concentração de 20mg/L. Este comportamento sugere que a relação dose-resposta não segue um modelo simples linear de inibição, podendo refletir mecanismos de hormese, que em doses baixas induzem respostas biológicas ligeiramente compensatória, tal como observado por Tsytlshvili, (2025), que identificaram padrões semelhantes na germinação de *L.sativa* exposta a fármacos.

Relativamente ao crescimento da planta, o ABZ inibiu significativamente o comprimento radicular a partir de 10 mg/L, enquanto o comprimento do epicótilo mostrou redução apenas a partir de 40 mg/L. Esta maior sensibilidade das raízes à toxicidade do ABZ está de acordo com Tsytlshvili (2025), que também verificaram efeitos significativos sobre o alongamento radicular de *L.sativa*, reforçando a consistência dos resultados obtidos.

A exposição ao MTZ revelou um efeito dependente da concentração sobre a germinação, com inibição significativa a 20mg/L e 160mg/L desde as primeiras 48 horas. O crescimento radicular apresentou uma redução significativa apenas na concentração mais elevada (160 mg/L), enquanto o comprimento do epicótilo não apresentou diferenças estatísticas significativas. A sensibilidade precoce da germinação sugere que o MTZ pode interferir nos primeiros processos metabólicos da semente, possivelmente afetando a mobilização de reservas e a divisão celular inicial.

A exposição ao IBU revelou uma resposta bifásica, com estimulação do crescimento radicular em concentrações baixas e intermédias (5–40 mg/L) e inibição acentuada do crescimento na concentração de 160 mg/L. A germinação foi significativamente afetada apenas na concentração mais elevada (160mg/L), enquanto o epicótilo não apresentou diferenças significativas. Este efeito de hormese é consistente com observações em microalgas, nas quais concentrações mais baixas podem induzir estimulação do crescimento, enquanto concentrações elevadas podem gerar inibição. Silva *et al.* (2023) num estudo semelhante, relatou que a concentração mais elevada testada (600mg/L) inibiu a germinação das sementes de *L.sativa*, e que nas concentrações mais baixas (0,02 e 0,20 mg/L) não ocorreu inibição da germinação, no entanto verificaram-se reduções significativas no crescimento da raiz e das partes aéreas da planta. Rede *et al.* (2019) relatam um aumento significativo no comprimento do caule da *L.sativa* em algumas concentrações baixas do IBU, indicando um efeito estimulador do crescimento em certos níveis.

As misturas ABZ+IBU demonstraram efeitos sinérgicos e antagónicos. Todas as combinações reduziram a germinação, mas promoveram estimulação significativa do crescimento radicular e do epicótilo, particularmente nas proporções 25:75 e 50:50. Este resultado sugere que, apesar da toxicidade

individual do ABZ, o IBU em determinadas proporções pode neutralizar parcialmente a inibição do crescimento. Rede , (2019) relata que a exposição a misturas com IBU resulta num aumento do comprimento de raízes e caule.

As misturas de MTZ+IBU inibiram significativamente a germinação desde as primeiras 48 horas, evidenciando a sensibilidade precoce das sementes. No crescimento radicular, apenas a mistura 50:50 estimulou o crescimento da raiz, enquanto o epicótilo apresentou uma redução significativa na mesma proporção. Estes resultados indicam a necessidade de considerar a composição das misturas na avaliação de risco ambiental.

Os dados corroboram dados encontrados na literatura sobre plantas, destacando a importância de considerar interações químicas em ecotoxicologia (Rede *et al*, 2019; Tsytlshvili, 2025).

Capítulo V – Avaliação dos efeitos de albendazol, metronidazol e ibuprofeno em *Triticum aestivum*

1. Visão geral do ensaio *Triticum aestivum*

A contaminação dos solos com metais pesados, pesticidas e outros compostos químicos persistentes é um dos principais problemas ambientais associados a atividades antrópicas. Uma vez no meio ambiente, estes compostos ativos podem afetar espécies não-alvo, como por exemplo culturas agrícolas (Rai *et al.*, 2019; Raisová Stuchlíková *et al.*, 2020).

O trigo, *Triticum aestivum* é a terceira cultura agrícola mais relevante em termos de produção global, dada a sua elevada importância económica e o seu contributo para a dieta humana e do gado (Levy & Feldman, 2022; Shewry & Hey, 2015). Para além de ser uma importante fonte de amido e energia, o trigo desempenha um papel fundamental no fornecimento de vários componentes benéficos para a saúde tais como: proteínas, vitaminas do complexo B e fibras alimentares (Shewry & Hey, 2015). *T.aestivum* apresenta elevada sensibilidade a diferentes classes de poluentes, permitindo avaliar a fitotoxicidade através de vários parâmetros como: percentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, crescimento radicular e crescimento do epicótilo (OECD, 2006b).

A utilização de *T. aestivum* em ensaios ecotoxicológicos apresenta ainda a vantagem dos resultados poderem ser extrapolados para situações de relevância agrícola, uma vez que é amplamente cultivado para consumo humano. Assim, os resultados obtidos não só fornecem informação sobre a ecotoxicidade dos contaminantes no ambiente, como também permitem avaliar potenciais riscos para a cadeia alimentar (Rai *et al.*, 2019).

Deste modo, o trigo constitui um organismo teste sensível e relevante para a avaliação de riscos ecotoxicológicos associados à presença de contaminantes no meio ambiente.

2. Materiais e Métodos

A metodologia utilizada para este ensaio foi adaptada da Norma 208 OECD (OECD, 2006b). Este teste avalia os efeitos na germinação das sementes e no crescimento inicial da planta, nomeadamente no crescimento radicular e no crescimento do ápice, após a exposição aos princípios-ativos em estudo.

2.1. Seleção e lavagem das sementes

Antes do início do teste as sementes seguiram um protocolo de lavagem e hidratação. As sementes foram lavadas em água corrente durante um minuto, e de seguida foram colocadas num recipiente com água destilada por um período de 1 minuto. Posteriormente, foram colocadas numa placa de Petri, e foram descartadas todas as sementes que numa inspeção visual apresentavam aspeto alterado indiciando não seriam viáveis.

2.2. Soluções Teste

As soluções utilizadas nos testes foram obtidas por diluições em série, utilizando água destilada como solução de diluição. Foram utilizadas 6 concentrações diferentes, descritas na tabela 12, para além do tratamento controlo.

Tabela 12 – Concentrações utilizadas nos testes com princípios-ativos isolados

Organismo teste	Princípio-ativo	Concentrações testadas (mg/L)
<i>T. aestivum</i>	ABZ	5; 10; 20; 40; 80; 160
	MTZ	
	IBU	

Tal como o ensaio da *L.sativa*, também foram testadas as misturas de MTZ + IBU e ABZ + IBU, nas sementes de *T.aestivum*. Na tabela 13 indicam-se as concentrações utilizadas de cada princípio-ativo nos testes com as misturas, bem como a sua proporção na solução final.

Tabela 13 – Concentrações utilizadas nos testes com mistura de princípios-ativos

Organismo teste	Associação	Concentrações (mg/L)	Proporção
<i>T. aestivum</i>	ABZ + IBU	160 + 160	25:75 ; 50:50 ; 75-25
	MTZ + IBU		



2.3. Procedimento do ensaio

Os testes foram realizados em placas de Petri, contendo discos de papel de filtro embebidos em 3 ml de solução teste, ou água destilada no caso do grupo controlo. Em cada placa de Petri foram colocadas dez sementes de *T. aestivum* (Bavicchi, Portugal), cuidadosamente distribuídas, garantindo o espaçamento uniforme entre elas. As placas de Petri foram seladas com parafilme, de modo a evitar a evaporação e contaminação, e posteriormente incubadas no escuro a uma temperatura constante de $(21 \pm 1^\circ \text{C})$ por 120 horas. Foram realizados três testes independentes.

2.4. Avaliação da germinação

As sementes são consideradas germinadas quando a raiz apresenta um tamanho mínimo de 5mm. O número de sementes germinadas foi determinado, diariamente, desde o início do teste (0h) até ao seu final (120h).

A percentagem de germinação foi avaliada, conforme descrito pela equação (9).

$$(9) \quad G = \frac{GS}{TS}$$

Na equação, (G) corresponde à percentagem de germinação que é calculada pela divisão do número de sementes germinadas (GS) pelo número total de sementes (TS)

2.5. Avaliação do comprimento da raiz e epicótilo

Após as 120 horas de exposição ao princípio-ativo, foram medidas as raízes e os epicótilos de todas as sementes germinadas, utilizando o software *Image J – SmartRoot*. Para além do comprimento, o programa permite também a medição da área das raízes e dos epicótilos. A figura, descreve onde deve ser medida a raiz e o epicótilo.

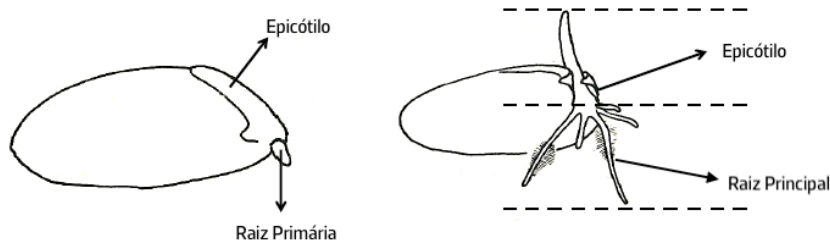


Figura 35 – Zonas definidas para identificar e medir a raiz e o epicótilo das sementes de *T. aestivum*. Fonte: <https://elevagro.com/processo-de-germinacao-de-cereais-de-inverno/>

2.6. Análise de resultados e estatística

A taxa de germinação (GER), representada pela equação (10), foi calculada dividindo o número de sementes germinadas em cada solução teste (GST) pelo número de sementes germinadas no controlo com água destilada (GSC).

$$(10) \quad GER = \frac{GST}{GSC} \times 100$$

A Taxa de inibição da germinação (GERI), foi calculada através da equação (11):

$$(11) \quad GERI = 100 - \frac{GST}{GSC} \times 100$$

Onde GERI é a taxa de inibição de germinação, GST o número de sementes germinadas em cada tratamento e GSC o número de sementes germinadas no grupo controlo. Para a determinação da GERI, considerou-se que houve 100% de germinação no grupo controlo.

A Taxa de crescimento (GR) foi calculada através da equação (12)

$$(12) \quad GR = \frac{LT}{LC} \times 100$$

Onde GR corresponde à taxa de crescimento, LT o comprimento médio da raiz/epicotilo no tratamento e LC o comprimento médio da raiz/epicotilo do grupo controlo.

A taxa de Inibição de crescimento (GRI), foi calculada através da equação (13):

$$(13) \quad GRI = 100 - \frac{LT}{LC} \times 100$$

Onde GRI corresponde à taxa de inibição de crescimento, LT o comprimento médio da raiz/epicótilo no tratamento e LC o comprimento médio da raiz/epicótilo do grupo controlo. Para a determinação da GRI, considerou-se que houve 100% de germinação no grupo controlo.

O teste de Kruskal-Wallis, para avaliar diferenças estatisticamente significativas entre os diversos grupos e o teste de Mann-Whitney para fazer comparações entre pares de grupo, foram realizados com o software *IBM SPSS Statistics 25*, com um intervalo de confiança de 95% ($\alpha=0.005$).

3. Resultados

Foi avaliada a vitalidade das sementes do grupo controlo pelas taxas de germinação, que foram >90% em todos os três testes realizados. Como não houve germinação nas primeiras 24 horas, apenas são apresentados os resultados após as primeiras 48 horas de exposição.

Os resultados apresentados nos gráficos correspondem à média obtida a partir dos três testes independentes, cada um contendo 3 réplicas. As barras de erro indicam o desvio padrão.

3.1. Exposição de *T. aestivum* ao Albendazol

A exposição de *Triticum aestivum* ao ABZ revelou a ocorrência de redução significativa na germinação das sementes. A análise estatística dos dados demonstrou diferenças entre o grupo controlo e algumas concentrações testadas, às 120 horas, nomeadamente nas concentrações: 5 mg/L ($p=0,034$); 40mg/L ($p = 0,034$) e 160 mg/L ($p=0,034$). À semelhança do que foi reportado no ensaio com *L.sativa*, a concentração de 80 mg/L também não evidenciou efeitos na germinação relativamente ao verificado no grupo controlo (Figura36).

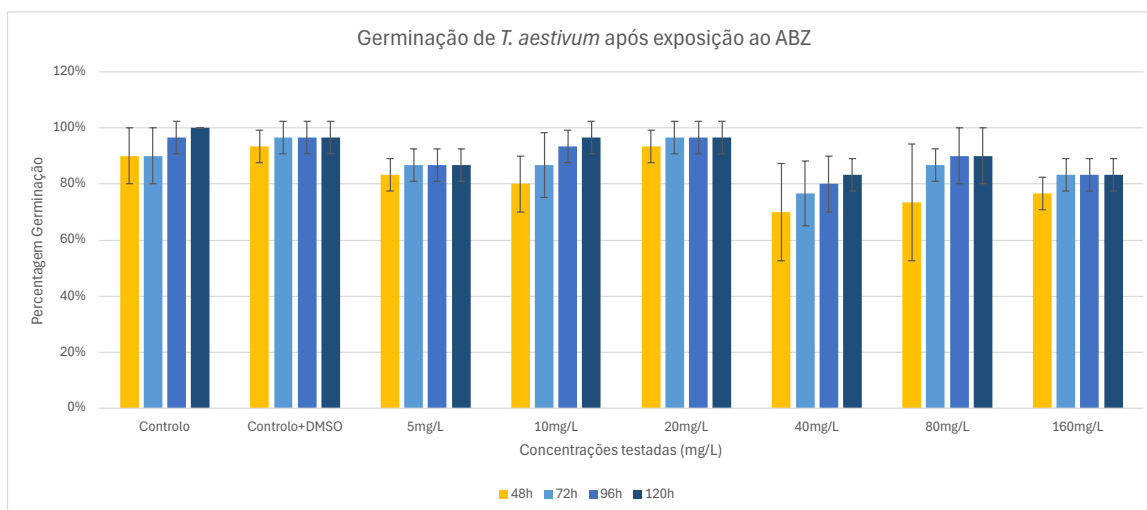


Figura 36 - Percentagem de germinação de *T.aestivum* após ao ABZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão

Na avaliação do crescimento inicial o comprimento radicular mostrou alterações relevantes quando comparado com o grupo controlo. Nem todas as concentrações exerceram inibição, verificando-se até um efeito estimulante em concentrações baixas. Assim, na concentração de 5 mg/L ($p=0,009$) e 10 mg/L ($p=0,028$) registou-se um aumento do crescimento radicular de 47% e 15%, respetivamente (Figura 37).

Pelo contrário, na concentração de 40 mg/L e 80mg/L observou-se uma inibição acentuada de 48% ($p=0,028$) e 43% respetivamente. Na concentração de 160 mg/L também se verificou inibição, com cerca de 46% de efeito ($p=0,009$).

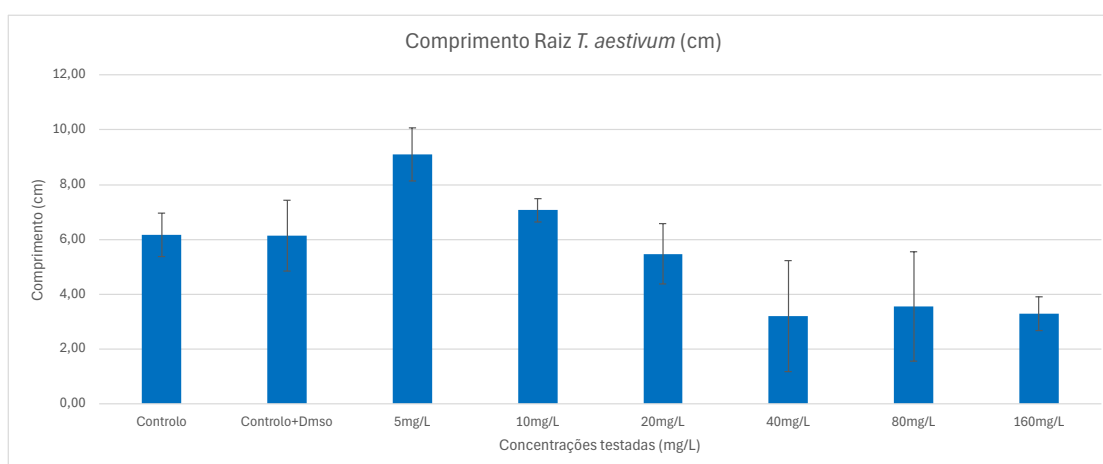


Figura 37 - Comprimento da raiz de *T. aestivum* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

No que respeita ao crescimento do epicótilo (Figura 38), observaram-se diferenças significativas no comprimento do epicótilo nas concentrações: 5mg/L ($p=0,047$), 40mg/L ($p=0,009$) e 160 mg/L ($p=0,009$). Todas estas concentrações apresentaram um efeito inibidor, sendo o valor mais elevado o registado na concentração a 160mg/L, com uma taxa de inibição próxima dos 40%.

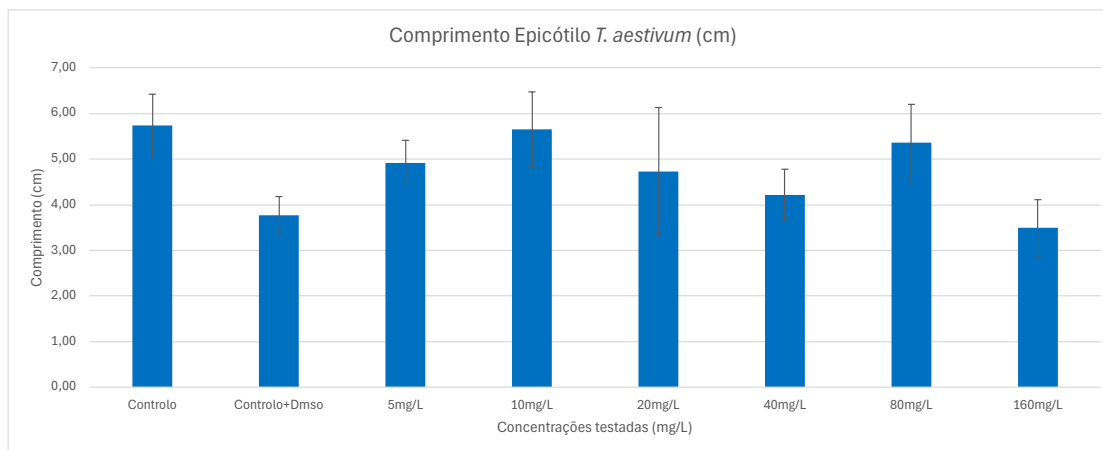


Figura 38 – Comprimento do epicótilo de *T. aestivum* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

3.2. Exposição de *T. aestivum* ao Metronidazol

A germinação das sementes de *T. aestivum* não apresentou diferenças significativas entre o grupo controlo e os grupos tratados com MTZ. O teste de Kruskal-Wallis confirmou a ausência de efeitos estatisticamente relevantes ($p=0,491$) (Figura 39).

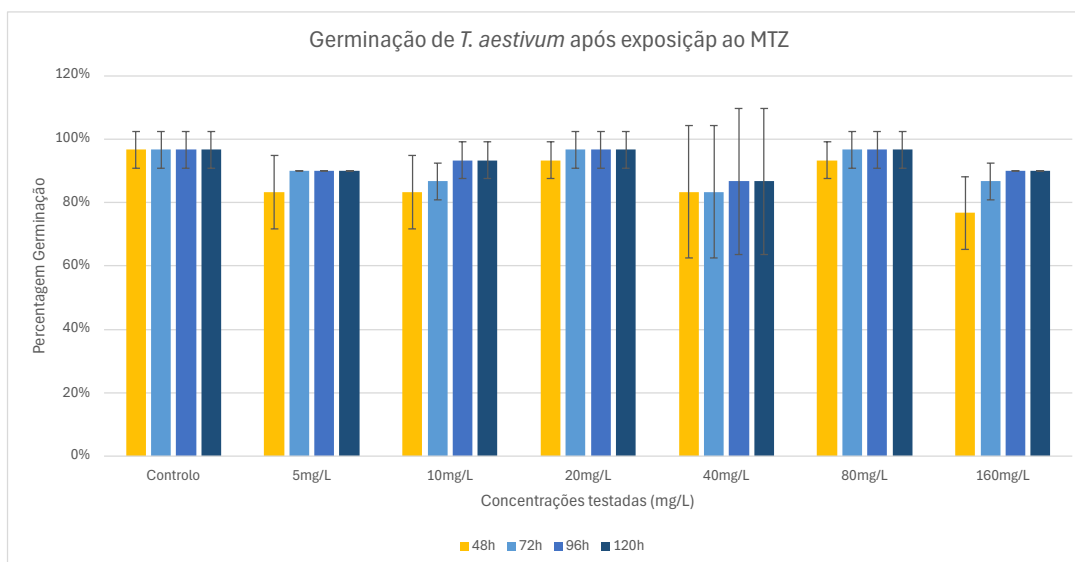


Figura 39 – Percentagem de germinação de *T. aestivum* após exposição ao MTZ. As barras de erro representam o Desvio Padrão

Contudo, o mesmo não se observou no crescimento radicular (Figura 40). Verificaram-se diferenças significativas entre o grupo controlo e todas as concentrações testadas, evidenciando uma relação dose-resposta. A inibição do crescimento radicular intensificou-se progressivamente com o aumento da concentração de MTZ, atingindo o seu valor máximo a 160 mg/L ($p=0,003$), com uma redução de 63%

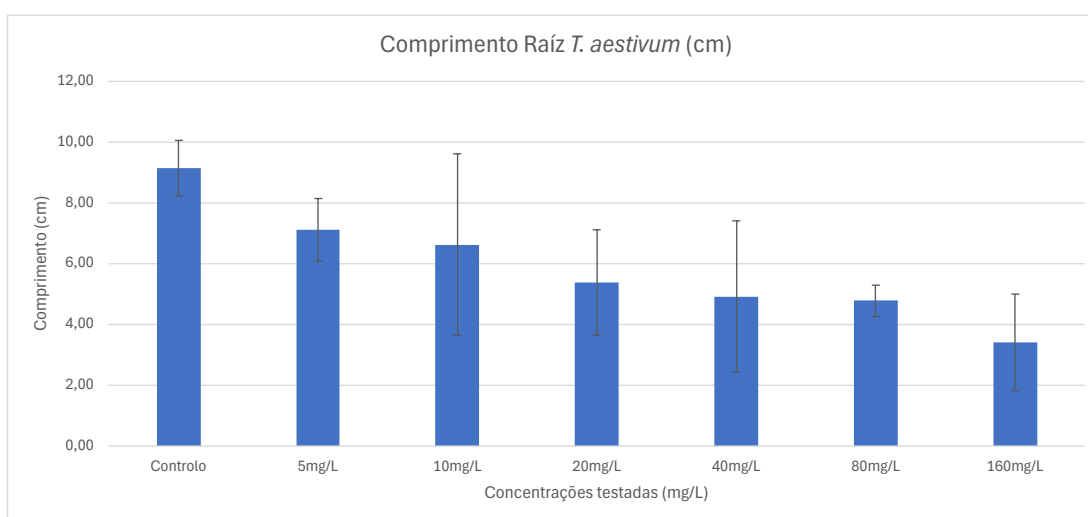


Figura 40 – Comprimento da raiz de *T. aestivum* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

Relativamente ao comprimento do epicótilo, os efeitos foram mais diferentes. O MTZ apenas exerceu inibição significativa do crescimento do epicótilo na concentração de 160 mg/L ($p=0,005$).

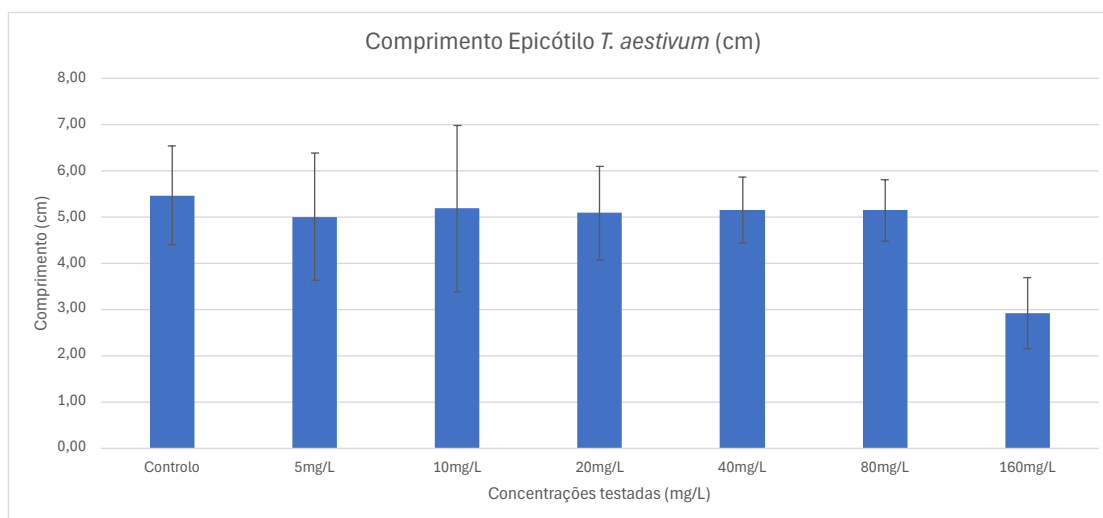


Figura 41 – Comprimento do epicótilo de *T. aestivum* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

3.3. Exposição de *T. aestivum* ao Ibuprofeno

A germinação das sementes de *Triticum aestivum* sofreu redução face ao grupo controlo. O teste de Mann-Whitney revelou diferenças significativas entre o grupo controlo e a concentração 160 mg/L ($p=0,046$), na germinação na presença de IBU (Figura 42).

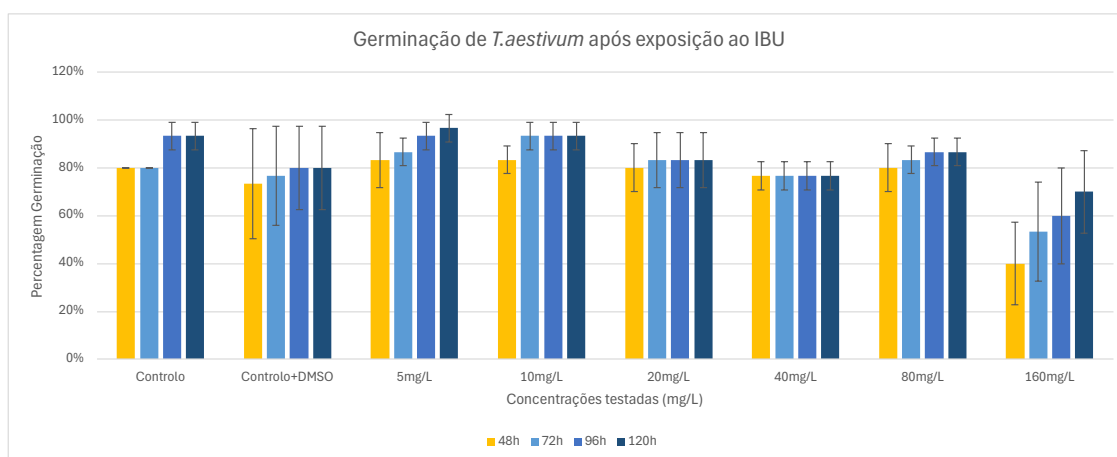


Figura 42 – Percentagem de germinação de *T. aestivum* após exposição ao IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

No crescimento radicular, o IBU induziu uma resposta bifásica, semelhante ao referido no ensaio com *Lactuca sativae* *C. vulgaris*. Na concentração de 5 mg/L ($p=0,047$) verificou-se uma estimulação de

aproximadamente 25%, enquanto a 80 mg/L ($p=0,047$) e 160 mg/L ($p=0,009$) foi evidente uma inibição, com reduções de 24% e 68%, respetivamente (Figura 43).

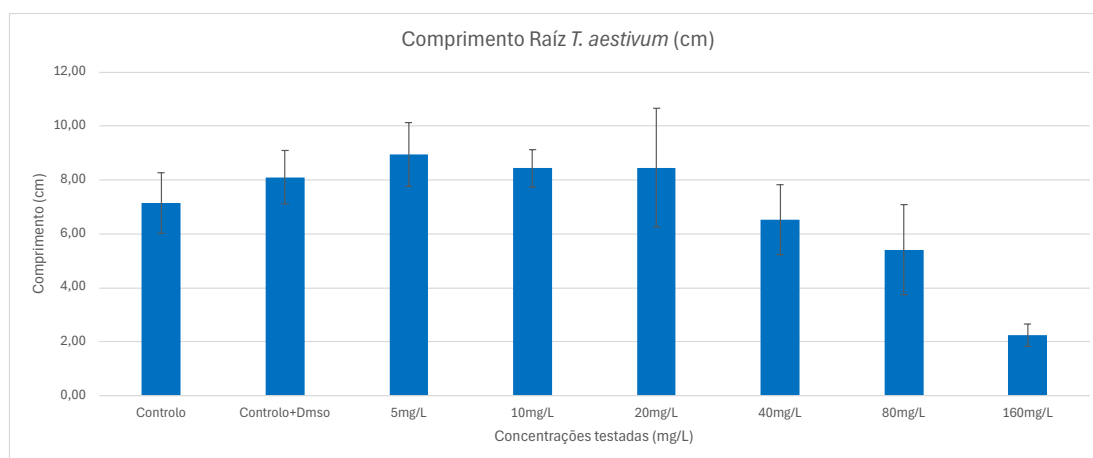


Figura 43 - Comprimento da raiz de *T. aestivum* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

Relativamente ao crescimento do epicótilo, apenas as concentrações de 80 mg/L ($p=0,050$) e 160mg/L ($p=0,006$) apresentaram redução do comprimento do epicótilo, em cerca de 25% e 50%, respetivamente (Figura 44).

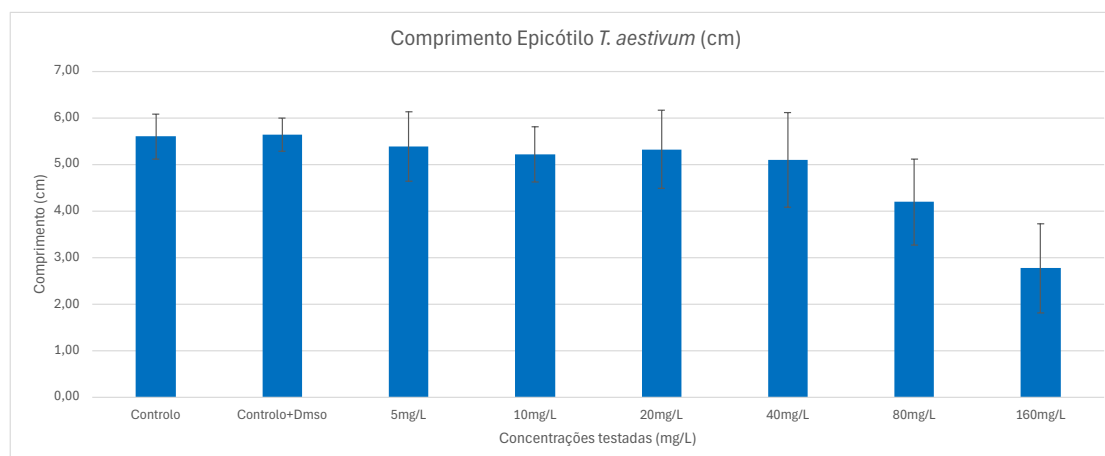


Figura 44 - Comprimento do epicótilo de *T. aestivum* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

3.4. Exposição de *T. aestivum* à mistura de Albendazol + Ibuprofeno

A germinação das sementes de *Triticum aestivum*, nos grupos das misturas, para além de ter sofrido uma redução, também ocorreu mais tarde do que nos grupos controlo (Figura 45). A germinação de *T. aestivum* foi afetada pela exposição à mistura de ABZ+IBU. O teste de Mann-Whitney revelou

diferenças significativas em duas das misturas 25 (ABZ):75 (IBU) ($p=0,043$) e 75 (ABZ):25 (IBU) ($p=0,046$), indicando uma redução da germinação face ao grupo controlo.

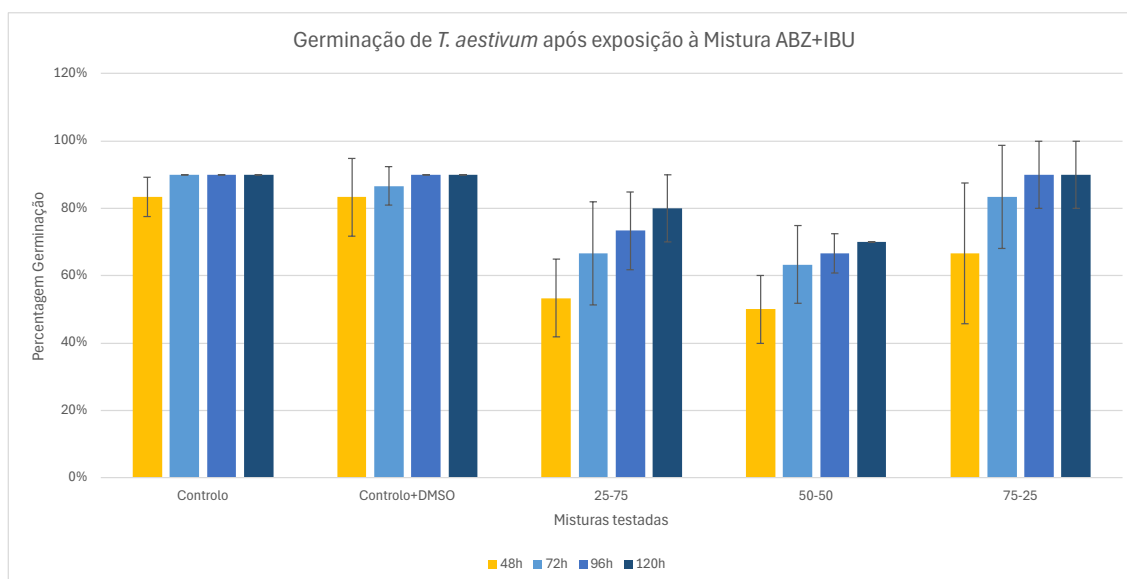


Figura 45 - Percentagem de germinação de *T. aestivum* após exposição à mistura ABZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

No crescimento radicular, observaram-se diferenças significativas apenas nas proporções 50 (ABZ):50 (IBU) ($p=0,009$) e 75 (ABZ):25 (IBU) ($p=0,047$). Nestes casos registou-se uma inibição do crescimento da raiz, com reduções de 55% e 19%, respetivamente (Figura 46).

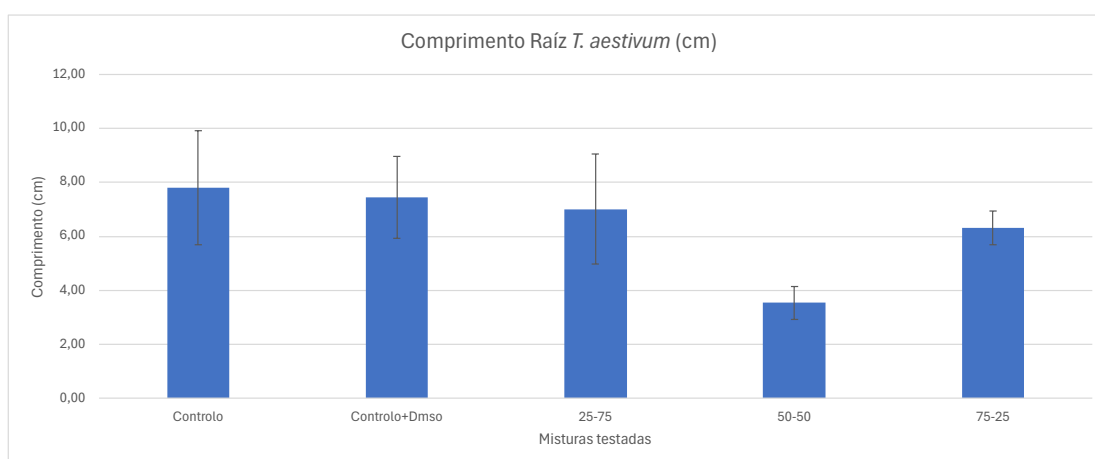


Figura 46 - Comprimento da raiz de *T. aestivum* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

Quanto ao crescimento do epicótilo, o teste de Kruskal-Wallis confirmou a ausência de efeitos significativos em todos os grupos testados ($p=0,602$).

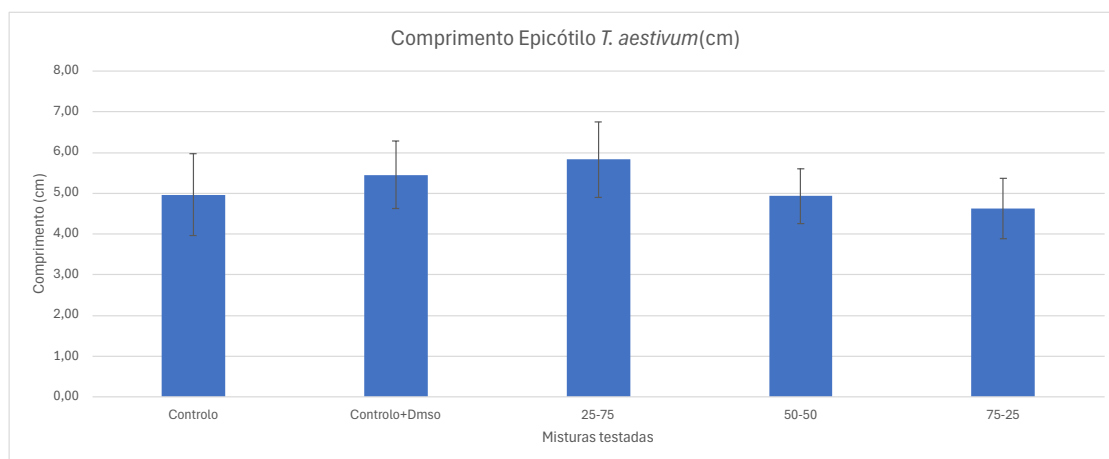


Figura 47 - Comprimento do epicótilo de *T. aestivum* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

3.5. Exposição de *T. aestivum* à mistura de Metronidazol + Ibuprofeno

A germinação de *T. aestivum* foi afetada pela exposição à mistura de MTZ+IBU nas primeiras 48 horas. O teste de Mann-Whitney revelou diferenças significativas entre o grupo controlo e as proporções 25 (MTZ):75 (IBU) ($p=0,034$), 50(MTZ):50(IBU) ($p=0,037$) e 75:(MTZ):25(IBU) ($p=0,034$). Às 120 horas de exposição, verificou-se uma reversão dos efeitos na maioria das misturas, sendo que apenas a proporção 75:25 manteve diferenças significativas face ao grupo controlo ($p=0,034$) (Figura 48).

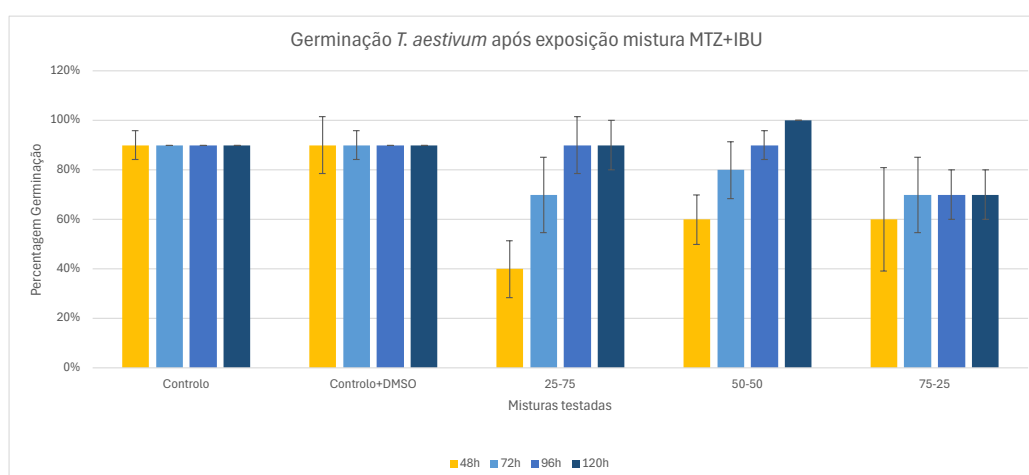


Figura 48 - Percentagem de germinação de *T. aestivum* após exposição à mistura MTZ+IBU. As barras de erro representam o Desvio Padrão

Quanto ao crescimento radicular ($p=0,522$) e ao crescimento do epicótilo ($p=0,336$), não se observaram diferenças significativas em comparação com o grupo controlo (Figura 49 e 50).

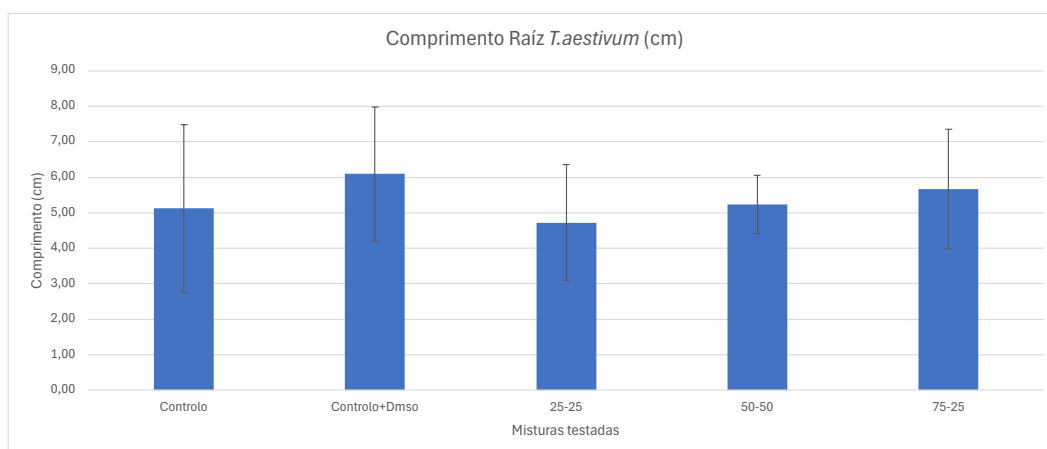


Figura 49 - Comprimento da raiz de *T. aestivum* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

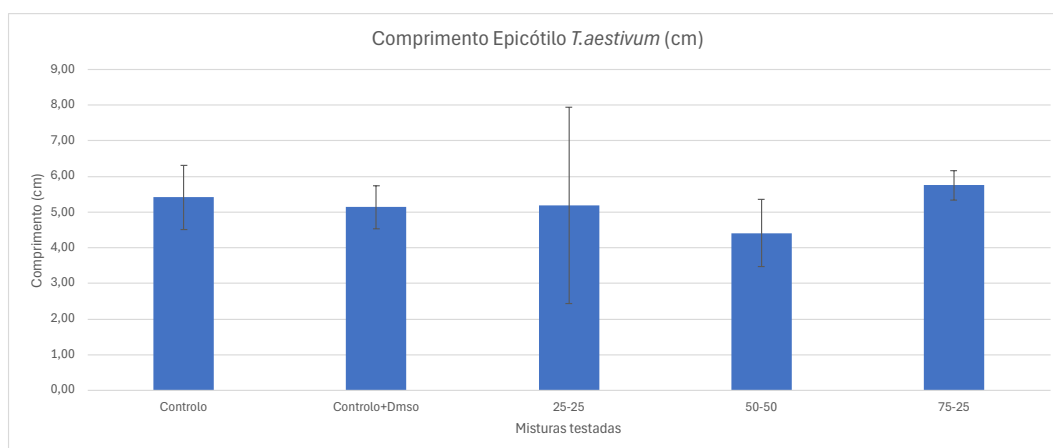


Figura 50 - Comprimento do epicótilo de *T. aestivum* nos diversos grupos de tratamento. As barras de erro correspondem ao Desvio Padrão

4. Discussão e conclusão

A exposição de *Triticum aestivum* ao ABZ, revelou impactos significativos na germinação das sementes, especialmente nas concentrações de 5, 40 e 160 mg/L, enquanto a concentração intermédia de 80 mg/L não apresentou efeitos adversos. Este padrão não linear sugere a ocorrência de fenómenos de hormese, em que doses intermédias podem induzir efeitos menos severos. Padrões semelhantes foram encontrados em *L.sativa*, onde a germinação também apresentou oscilações irregulares consoante a concentração de ABZ. No crescimento inicial, verificou-se estimulação radicular em concentrações baixas (5-10 mg/L), seguido de forte inibição nas concentrações mais altas (40-

160mg/L). Este comportamento pode estar associado ao fenómeno de hormese com estimulação a baixas concentrações e inibição a altas concentrações, já descrito noutros estudos. O epicótilo revelou-se mais sensível ao ABZ do que em *L.sativa*, com inibições significativas com concentrações mais baixas, sugerindo uma vulnerabilidade específica de *T. aestivum* no desenvolvimento aéreo inicial.

O MTZ não causou efeitos na germinação de *T.aestivum*, uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas face ao grupo controlo. De Oliveira & Viccini (2004), num estudo em que avaliaram a fitotoxicidade do MTZ em *Zea mays*, reportaram a inexistência de impactos causados na germinação das sementes. Contudo, o crescimento radicular foi fortemente afetado com uma inibição progressiva dependente da concentração, atingindo inibições de 63% na concentração mais alta. Estes resultados são suportados pelos relatos de Andrioli *et al.* (2006), onde foram observados impactos significativos no crescimento radicular de *Glycine max*.

A exposição ao IBU desencadeou uma resposta bifásica de hormese em *T. aestivum*, semelhante à registada em *L.sativa*. Em baixas concentrações (5mg/L) observou-se estimulação significativa do crescimento radicular (25%), enquanto concentrações mais elevadas (80 e 160 mg/L) induziram inibições de 24% e 68 %, respetivamente. Estes resultados estão de acordo com o encontrado na literatura, que descreve efeitos de hormese no IBU, sugerindo que concentrações baixas podem modular processos fisiológicos ligados à divisão celular, antes de atingirem níveis tóxicos (Rede *et al.*, 2019). Silva *et al.* (2023) relata que na concentração de 0,20mg/L foram observadas reduções do comprimento das plântulas de *Triticum aestivum*.

Quanto à germinação das sementes, apenas a concentração de 160 mg/L apresentou diferenças significativas. Silva *et al.* (2023) reporta uma redução significativa da germinação de *T.aestivum* apenas na concentração de 600mg/L.

No caso das misturas ABZ+IBU a germinação foi significativamente reduzida nas proporções 25:75 e 75:25, enquanto a inibição do crescimento radicular foi registada apenas nas proporções 50:50 e 75:25. Curiosamente, este resultado contrasta com *L.sativa*, onde as mesmas misturas promoveram estimulação radicular, sugerindo que a interação entre compostos pode variar entre espécies e até resultar em respostas antagónicas. O epicótilo de *T.aestivum* não apresentou quaisquer alterações relevantes, ao contrário do observado em *L.sativa*, onde se registaram incrementos do comprimento.

Já as misturas MTZ+IBU evidenciaram um efeito inicial inibidor sobre a germinação de *T.aestivum* nas primeiras 48 horas. No entanto, na maioria das combinações os efeitos reverteram para valores próximos ao controlo às 120 horas, exceto na proporção 75:25. Este padrão sugere efeitos transitórios, possivelmente relacionados com mecanismos de desintoxicação ou metabolização do composto ao



longo do tempo. O crescimento radicular e do epicótilo não sofreu alterações significativas, o que se aproxima dos resultados obtidos em *L.sativa*, onde a recuperação após inibição inicial também foi observada.

Os resultados confirmam que ABZ, MTZ e IBU afetam de forma distinta a germinação e o crescimento inicial de *T.aestivum*, replicando parcialmente os padrões registados em *L.sativa*. A análise das misturas revelou interações complexas, por vezes antagónicas entre espécies, refletindo a importância da composição e da proporção dos compostos na determinação da resposta final.

Capítulo VI – Discussão Geral

A comparação integrada dos ensaios com *Chlorella vulgaris*, *Lactuca sativa* e *Triticum aestivum* permitiu identificar padrões comuns de toxicidade de ABZ, MTZ e IBU, isolados ou em mistura, bem como diferenças específicas relacionadas com a fisiologia e ecologia de cada espécie. Esta abordagem revelou-se essencial para compreender a diversidade de respostas biológicas a contaminantes emergentes e reforçar a importância de considerar diferentes níveis de organização biológica e diferentes espécies na avaliação ecotoxicológica. De forma transversal, observou-se que a toxicidade dependeu da concentração e, em alguns casos, do tempo de exposição. Registaram-se também fenómenos de hormese, em que baixas doses induziram estimulação do crescimento, seguidas de inibição em concentrações mais elevadas (Calabrese & Baldwin, 2003).

O ABZ destacou-se como o composto mais tóxico, induzindo inibição significativa tanto em organismos unicelulares como em plantas superiores. Em *C. vulgaris*, mesmo baixas concentrações comprometeram o crescimento, sustentando a sensibilidade de *C. vulgaris* confirmada pelo baixo valor de EC_{50} , em consonância com estudos prévios em microalgas (Diniz *et al.*, 2020). Em *L. sativa* e *T. aestivum*, embora a germinação e o crescimento tenham sido afetados em concentrações mais elevadas, detetaram-se fenómenos de hormese em doses intermédias. Este comportamento não linear pode estar associado a respostas adaptativas, como ativação de mecanismos antioxidantes, alterações no balanço hormonal (auxinas e citoquininas) ou reconfiguração do metabolismo celular, que permitem uma compensação temporária do stress químico (Mattson, 2008).

Relativamente ao MTZ, a resposta foi mais homogénea entre espécies. Em *C. vulgaris*, observou-se uma resposta clara dose-dependente com valor de EC_{50} próximo dos reportados na literatura (Lanzky & Halting-Sørensen, 1997). Em *L. sativa*, a germinação revelou-se mais sensível do que o crescimento subsequente, o que sugere que o MTZ interfere nos processos iniciais de mobilização de reservas e divisão celular. Já em *T. aestivum*, a germinação não foi afetada, mas o crescimento radicular sofreu forte inibição, possivelmente pela acumulação do composto nas zonas merismáticas das raízes. Estes resultados indicam que o impacto do MTZ pode variar consoante a estrutura alvo em cada espécie, refletindo diferenças metabólicas e anatómicas entre dicotiledóneas e monocotiledóneas.

O IBU foi o composto que mais consistentemente revelou efeitos bifásicos, estimulando o crescimento em baixas concentrações e inibindo em concentrações elevadas. Em *C. vulgaris*, esta estimulação poderá estar relacionada com um aumento transitório na produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), que em níveis baixos funcionam como sinalizadores de crescimento, mas em níveis elevados conduzem a stress oxidativo e dano celular. Em *L. sativa* e *T. aestivum*, o efeito bifásico foi

particularmente evidente no crescimento radicular, confirmando que as raízes constituem o principal alvo da toxicidade. É plausível que em concentrações baixas o IBU module a síntese de fito hormonas, como as auxinas, promovendo alongamento radicular, enquanto em doses elevadas interfira na divisão celular e na integridade das membranas, resultando em inibição severa. Este padrão de hormese, comum às três espécies, confirma a necessidade de cautela na interpretação de efeitos positivos em baixas doses, dado que não representam ausência de toxicidade, mas antes uma resposta adaptativa temporária.

A análise das misturas revelou interações complexas e muitas vezes inesperadas, demonstrando que os efeitos combinados não podem ser inferidos de forma linear a partir da toxicidade dos compostos isolados. Em *C. vulgaris*, a mistura ABZ+IBU resultou em antagonismo, com neutralização parcial da toxicidade do ABZ, possivelmente pela ativação de mecanismos de defesa induzidos pelo IBU que reduziram o stress oxidativo provocado pelo ABZ. Por outro lado, em *L. sativa* a mesma mistura promoveu estimulação significativa do crescimento radicular e do epicótilo, sugerindo que a presença do IBU pode alterar a absorção ou metabolização do ABZ nas plantas. Já em *T. aestivum*, os efeitos foram distintos e em alguns casos antagónicos, evidenciando que as respostas às misturas são altamente específicas para a espécie em questão. Estes resultados reforçam que a avaliação de risco baseada apenas em compostos isolados subestima a complexidade real das interações químicas em ambientes naturais.

Nas misturas MTZ+IBU, observaram-se igualmente padrões divergentes. Em *C. vulgaris*, as misturas dominadas por IBU acentuaram a inibição, enquanto em *L. sativa* e *T. aestivum* ocorreram efeitos mais heterogéneos, incluindo estimulação pontual e recuperação ao longo do tempo. Este comportamento sugere a ocorrência de processos dinâmicos de metabolização, excreção ou adaptação fisiológica, que podem atenuar a toxicidade inicial. No caso das plantas, a presença de tecidos especializados podem explicar a maior capacidade de recuperação face ao observado nas microalgas.

De forma integrada, os resultados sugerem um gradiente de sensibilidade entre os organismos testados: *C. vulgaris* revelou-se o organismo-teste mais sensível e imediato, refletindo a sua simplicidade estrutural e metabolismo rápido; *L. sativa* apresentou respostas intermédias, com germinação sensível mas capacidade de compensação em fases posteriores; *T. aestivum* demonstrou maior tolerância relativa, embora com efeitos significativos em parâmetros específicos, como o crescimento do epicótilo.

A ocorrência de fenómenos de hormese em todos os organismos confirma que a relação dose-resposta não é linear.



Capítulo VII – Conclusão

O presente trabalho mostrou que ABZ, MTZ e IBU, isolados ou em misturas, exercem efeitos diferenciados sobre *Chlorella vulgaris*, *Lactuca sativa* e *Triticum aestivum*, com respostas dependentes da espécie, da concentração e do tempo de exposição. *C. vulgaris* revelou elevada sensibilidade, confirmando o seu potencial como bioindicador, enquanto *L. sativa* e *T. aestivum* exibiram padrões complexos de hormese e respostas específicas por órgão.

As misturas demonstraram interações aditivas ou antagónicas, variando entre espécies e proporções, destacando a importância de considerar a composição e a fisiologia do organismo na avaliação do risco ambiental.

Apesar de terem sido adotadas regras padronizadas da OECD, na definição da metodologia a usar nos testes, este estudo apresenta limitações que devem ser consideradas. Em primeiro lugar, os ensaios foram realizados em condições laboratoriais controladas, que não refletem totalmente a complexidade dos ecossistemas naturais. Fatores como a presença de matéria orgânica, variações de pH, interações com comunidades microbianas ou a fotodegradação podem alterar significativamente a biodisponibilidade e a toxicidade dos compostos. A utilização de endpoints adicionais, como biomarcadores moleculares e parâmetros fisiológicos, permitiria compreender os mecanismos subjacentes à toxicidade.

Estudos futuros são justificados pela necessidade de compreender os mecanismos subjacentes às respostas observadas, como hormese e efeitos de misturas, bem como para apoiar a definição de limites seguros e estratégias de mitigação ambiental mais eficazes.

Em suma, o presente trabalho evidencia que ABZ, MTZ e IBU podem afetar significativamente organismos vegetais aquáticos e terrestres, fornecendo informação essencial para a avaliação de risco ecológico e para o desenvolvimento de estratégias de proteção ambiental.



Referências Bibliográficas

- Andrioli, N. B., Wulff, A. F., & Mudry, Y. M. D. (2006). *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad de metronidazol. 15.
- Andrioli, N., Sabatini, S. E., Mudry, M. D., & Ríos De Molina, M. D. C. (2012). Oxidative damage and antioxidant response of *Allium cepa* meristematic and elongation cells exposed to metronidazole. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(5), 968–972. <https://doi.org/10.1002/etc.1799>
- Bagur-González, M. G., Estepa-Molina, C., Martín-Peinado, F., & Morales-Ruano, S. (2011). Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of Soils and Sediments*, 11(2), 281–289. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0285-4>
- Barker, T. H., Habibi, N., Aromataris, E., Stone, J. C., Leonardi-Bee, J., Sears, K., Hasanoff, S., Klugar, M., Tufanaru, C., Moola, S., & Munn, Z. (2024). The revised JBI critical appraisal tool for the assessment of risk of bias for quasi-experimental studies. *JBI Evidence Synthesis*, 22(3), 378–388. <https://doi.org/10.11124/JBIES-23-00268>
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29(1), 113–123. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>
- Beek, T. aus der, Weber, F.-A., & Bergmann, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment: Global occurrence and potential cooperative action under the Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM). *German Environment Agency*. <http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/>
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2003). Hormesis: The Dose-Response Revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(1), 175–197. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223>
- Campagna-Fernandes, A. F., Marin, E. B., & Penha, T. H. F. L. (2016). Application of Root Growth Endpoint in Toxicity Tests With Lettuce (*Lactuca sativa*). *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 11(1), 27–32. <https://doi.org/10.5132/eec.2016.01.05>



- Christou, A., Agüera, A., Bayona, J. M., Cytryn, E., Fotopoulos, V., Lambropoulou, D., Manaia, C. M., Michael, C., Revitt, M., Schröder, P., & Fatta-Kassinos, D. (2017). The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: The knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes – A review. *Water Research*, *123*, 448–467. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.004>
- De Oliveira, F., & Viccini, L. (2004). Induction of maize chromosome altered plants by seeds irradiation pre-soaked in metronidazole. *CARYOLOGIA*, *57*(1), 79–87.
- Delli Compagni, R., Gabrielli, M., Polesel, F., Turolla, A., Trapp, S., Vezzaro, L., & Antonelli, M. (2020). Risk assessment of contaminants of emerging concern in the context of wastewater reuse for irrigation: An integrated modelling approach. *Chemosphere*, *242*, 125185. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125185>
- Dingsdag, S. A., & Hunter, N. (2018). Metronidazole: An update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(2), 265–279. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx351>
- Diniz, V., Reyes, G. M., Rath, S., & Cunha, D. G. F. (2020b). Caffeine reduces the toxicity of albendazole and carbamazepine to the microalgae *Raphidocelis subcapitata* (Sphaeropleales, Chlorophyta). *International Review of Hydrobiology*, *105*(5–6), 151–161. <https://doi.org/10.1002/iroh.201902024>
- Dutta, T. K., Yadav, S. K., & Chatterjee, A. (2019). Antibiotics as feed additives for livestock: Human health concerns. *Indian Journal of Animal Health*, *58*(2-SPL), 121. <https://doi.org/10.36062/ijah.58.2SPL.2019.121-136>
- Elkamshoushi, A. A., Hassaan, P., Nabil, I., Ossama, H., & Omar, S. S. (2022). Regular use of ibuprofen reduces rat penile prostaglandins and induces cavernosal fibrosis. *Drug and Chemical Toxicology*, *45*(3), 1339–1344. <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1822859>
- Finney. (1952). Probit Analysis: A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve. *Annals of the Entomological Society of America*, *45*(4), 686–686. <https://doi.org/10.1093/aesa/45.4.686>
- Geiger, E., Hornek-Gausterer, R., & Saçan, M. T. (2016). Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *129*, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.032>



- Gottschall, N., Topp, E., Metcalfe, C., Edwards, M., Payne, M., Kleywegt, S., Russell, P., & Lapen, D. R. (2012). Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. *Chemosphere*, 87(2), 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.018>
- Iatrou, E. I., Gatidou, G., Damalas, D., Thomaidis, N. S., & Stasinakis, A. S. (2017). Fate of antimicrobials in duckweed *Lemna minor* wastewater treatment systems. *Journal of Hazardous Materials*, 330, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.005>
- Jan-Roblero, J., & Cruz-Maya, J. A. (2023). Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant. *Molecules*, 28(5), 2097. <https://doi.org/10.3390/molecules28052097>
- Jjemba, P. K. (2002). The effect of chloroquine, quinacrine, and metronidazole on both soybean plants and soil microbiota. *Chemosphere*, 46(7), 1019–1025. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(01\)00139-4](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(01)00139-4)
- Jones, A. V., Harwood, J. L., Stratford, M. R., & Stumpf, P. K. (1981). Inhibition of plant fatty acid synthesis by nitroimidazoles. *The Biochemical Journal*, 198(1), 193–198. <https://doi.org/10.1042/bj1980193>
- Karki, B. K., & Philip, L. (2024). Fate of pharmaceuticals and personal care products like metronidazole, naproxen, and methylparaben and their effect on the physiological characteristics of two wetland plants. *Chemical Engineering Journal*, 483, 149180. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.149180>
- Kermani, M., Bahrami Asl, F., Farzadkia, M., Esrafil, A., Salahshour Arian, S., Khazaei, M., Dadban Shahamat, Y., & Zeynalzadeh, D. (2016). Heterogeneous catalytic ozonation by Nano-MgO is better than sole ozonation for metronidazole degradation, toxicity reduction, and biodegradability improvement. *Desalination and Water Treatment*, 57(35), 16435–16444. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1081632>
- Kotai, J. (1972). Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. *NIVA*, 8(11), 69.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583–621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>

- Lamp, K. C., Freeman, C. D., Klutman, N. E., & Lacy, M. K. (1999). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Nitroimidazole Antimicrobials: *Clinical Pharmacokinetics*, 36(5), 353–373. <https://doi.org/10.2165/00003088-199936050-00004>
- Langhansová, L., Navrátilová, M., Skálová, L., Motčková, K., & Podlipná, R. (2021). The Effect of the Manure from Sheep Treated with Anthelmintics on Clover (*Trifolium pratense*). *Agronomy*, 11(9), 1892. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091892>
- Lanzky, P. F., & Halting-Sørensen, B. (1997). The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. *Chemosphere*, 35(11), 2553–2561. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00324-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00324-X)
- Le, V.-G., Nguyen, M.-K., Nguyen, H.-L., Thai, V.-A., Le, V.-R., Vu, Q. M., Asaithambi, P., Chang, S. W., & Nguyen, D. D. (2024). Ecotoxicological response of algae to contaminants in aquatic environments: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 22(2), 919–939. <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01680-5>
- Leitsch, D. (2019). A review on metronidazole: An old warhorse in antimicrobial chemotherapy. *Parasitology*, 146(9), 1167–1178. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002025>
- Levy, A. A., & Feldman, M. (2022). Evolution and origin of bread wheat. *The Plant Cell*, 34(7), 2549–2567. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac130>
- Li, J., Wang, Y., Fan, Z., Tang, P., Wu, M., Xiao, H., & Zeng, Z. (2023). Toxicity of Tetracycline and Metronidazole in *Chlorella pyrenoidosa*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(4), 3623. <https://doi.org/10.3390/ijerph20043623>
- Majidi, S., Pourzamani, H. R., & Ebrahimpour, K. (2024). Estimating release of the antibiotic metronidazole into the environment from hospital effluents and assessment of the associated ecological risk: A case study in Isfahan, Iran (2023). *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 30(7–8), 699–712. <https://doi.org/10.1080/10807039.2024.2399695>
- Mañas, P., & De las Heras, J. (2018). Phytotoxicity test applied to sewage sludge using *Lactuca sativa* L. and *Lepidium sativum* L. seeds. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(2), 273–280. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1386-z>

- Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics*, 18(1), 50–60. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177730491>
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
- Miettinen, M., & Khan, S. A. (2022). Pharmaceutical pollution: A weakly regulated global environmental risk. *Review of European, Comparative & International Environmental Law*, 31(1), 75–88. <https://doi.org/10.1111/reel.12422>
- OECD. (2006a). *Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264069923-en>
- OECD. (2006b). *Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test*. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264070066-en>
- Page, M., McKenzie, J., Bossuyt, P., Boutron, I., Hoffman, T., Mulrow, C., Shamseer, L., Tetzlaff, L., Akl, E., Brennan, S., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J., Hrobjartsson, A., Lalu, M., Li, T., Loder, E., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., ... Moher, D. (2024). *Declaração PRISMA 2020: Uma Diretriz Atualizada para Publicação de Revisões Sistemáticas*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.13271469>
- Pendland, S. L., Piscitelli, S. C., Schreckenberger, P. C., & Danziger, L. H. (1994). In vitro activities of metronidazole and its hydroxy metabolite against *Bacteroides* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9), 2106–2110. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.9.2106>
- Peng, H., & Simko, I. (2023). Extending lettuce shelf life through integrated technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, 81, 102951. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.102951>
- Podlipná, R., Skálová, L., Seidlová, H., Szotáková, B., Kubíček, V., Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vaněk, T., & Vokřál, I. (2013). Biotransformation of benzimidazole anthelmintics in reed (*Phragmites australis*) as a potential tool for their detoxification in environment. *Bioresource Technology*, 144, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.105>



Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., & Kim, K.-H. (2019). Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. *Environment International*, 125, 365–385. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.067>

Raisová Stuchlíková, L., Navrátilová, M., Langhansová, L., Mot'ková, K., Podlipná, R., Szotáková, B., & Skálová, L. (2020). The Identification of Metabolites and Effects of Albendazole in Alfalfa (*Medicago sativa*). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5943. <https://doi.org/10.3390/ijms21165943>

Ramírez-Morales, D., Masís-Mora, M., Montiel-Mora, J. R., Méndez-Rivera, M., Gutiérrez-Quirós, J. A., Brenes-Alfaro, L., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2024). Pharmaceuticals, hazard and ecotoxicity in surface and wastewater in a tropical dairy production area in Latin America. *Chemosphere*, 346, 140443. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140443>

Ramprasad, C., & Philip, L. (2018). Contributions of various processes to the removal of surfactants and personal care products in constructed wetland. *Chemical Engineering Journal*, 334, 322–333. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.106>

Rebelo, A., Quadrado, M., Franco, A., Lacasta, N., & Machado, P. (2020). Water reuse in Portugal: New legislation trends to support the definition of water quality standards based on risk characterization. *Water Cycle*, 1, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.watcyc.2020.05.006>

Rede, D., Santos, L. H. M. L. M., Ramos, S., Oliva-Teles, F., Antão, C., Sousa, S. R., & Delerue-Matos, C. (2019). Individual and mixture toxicity evaluation of three pharmaceuticals to the germination and growth of *Lactuca sativa* seeds. *Science of The Total Environment*, 673, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.432>

Richter, E., Berkner, S., Ebert, I., Förster, B., Graf, N., Herrchen, M., Kühnen, U., Römbke, J., & Simon, M. (2016). Results of extended plant tests using more realistic exposure scenarios for improving environmental risk assessment of veterinary pharmaceuticals. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0089-2>

Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Varela Della Giustina, S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., Berendonk, T. U., Michael-Kordatou, I., Fatta-Kassinos, D., Martinez, J. L., Elpers, C., Henriques, I., Jaeger, T., Schwartz, T., Paulshus, E., O'Sullivan, K., Pärnänen, K. M. M., Virta, M., Do, T. T., ... Manaia, C. M. (2020).

Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environment International*, 140, 105733. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105733>

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

Santos, E., Lisboa, I., & Eugénio, T. (2021). Economic Sustainability in Wastewater Treatment Companies: A Regional Analysis for the Iberian Peninsula. *Applied Sciences*, 11(21), 9876. <https://doi.org/10.3390/app11219876>

Shewry, P. R., & Hey, S. J. (2015). The contribution of wheat to human diet and health. *Food and Energy Security*, 4(3), 178–202. <https://doi.org/10.1002/fes3.64>

Silva, A., Figueiredo, S. A., Sales, M. G., & Delerue-Matos, C. (2009). Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris*—A useful tool in hazardous effluents management. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1–3), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.102>

Silva, L. M. D., Dutra, V. D. S. V., Nascimento, G. V. A., Paula, P. N. C. R. D., & Silva, F. J. D. (2023). Ibuprofeno induz toxicidade e mutagenicidade em diferentes organismos modelo expostos a concentrações ambientalmente relevantes e não relevante. *Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar*, 12, 245–258. <https://doi.org/10.24302/sma.v12.4813>

Silva, L. M. D., Silva, F. J. D., Cunha, L. A. D., & Galisa, N. R. (2023). Ecotoxicidade do ibuprofeno em concentrações ambientalmente relevantes e não relevantes sobre a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Acta Biológica Catarinense*, 10(3), 25–33. <https://doi.org/10.21726/abc.v10i3.1986>

Sousa, L., Marques, J., Firmino, C., Frade, M., Valentim, O., & Antunes, V. (2018). MODELOS DE FORMULAÇÃO DA QUESTÃO DE INVESTIGAÇÃO NA PRÁTICA BASEADA NA EVIDÊNCIA. *Revista Investigação Enfermagem*, 2.

Stuchlíková, L. R., Skálová, L., Szotáková, B., Syslová, E., Vokřál, I., Vaněk, T., & Podlipná, R. (2018). Biotransformation of flubendazole and fenbendazole and their effects in the ribwort plantain (*Plantago*

lanceolata). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **147**, 681–687.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.020>

Stuchlíková Raisová, L., Podlipná, R., Szotáková, B., Syslová, E., & Skálová, L. (2017). Evaluation of drug uptake and deactivation in plant: Fate of albendazole in ribwort plantain (*Plantago lanceolata*) cells and regenerants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **141**, 37–42.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.014>

Tsytlshvili, K. (2025). Performing acute phytotoxicity of widely used drugs on germination and root elongation of *Lactuca sativa* L. *Journal of Ecological Engineering*, **26**(6), 170–178.
<https://doi.org/10.12911/22998993/202348>

Venancio, W. A. L., Rodrigues-Silva, C., Spina, M., Diniz, V., & Guimarães, J. R. (2021). Degradation of benzimidazoles by photoperoxidation: Metabolites detection and ecotoxicity assessment using *Raphidocelis subcapitata* microalgae and *Vibrio fischeri*. *Environmental Science and Pollution Research*, **28**(19), 23742–23752. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11294-x>

Wagil, M., Maszkowska, J., Białk-Bielińska, A., Caban, M., Stepnowski, P., & Kumirska, J. (2015). Determination of metronidazole residues in water, sediment and fish tissue samples. *Chemosphere*, **119**, S28–S34. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.061>

Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkins, S. P., & Peakall, D. B. (2012). *Principles of ecotoxicology (4th edition)*. CRC Press Taylor & Francis Group.

Wu, N., Dong, X., Liu, Y., Wang, C., Baattrup-Pedersen, A., & Riis, T. (2017). Using river microalgae as indicators for freshwater biomonitoring: Review of published research and future directions. *Ecological Indicators*, **81**, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.05.066>

Yakubu, O. (2017). Pharmaceutical Wastewater Effluent—Source of Contaminants of Emerging Concern: Phytotoxicity of Metronidazole to Soybean (*Glycine max*). *Toxics*, **5**(2), 10. <https://doi.org/10.3390/toxics5020010>

Zhang, L., Shi, L., He, Q., & Li, Y. (2021). A rapid multiclass method for antibiotic residues in goat dairy products by UPLC–quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Journal of Analytical Science and Technology*, **12**(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00268-4>



Zhang, Y., Wan, J., Li, Z., Wu, Z., Dang, C., & Fu, J. (2022). Enhanced removal efficiency of sulfamethoxazole by acclimated microalgae: Tolerant mechanism, and transformation products and pathways. *Bioresource Technology*, 347, 126461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126461>



Apêndices

Apêndice I – Meio de Cultura Z8

A um litro de água esterilizada, adicionar 10 mL das soluções Stock A, B e EDTA e 1 ml da solução de micronutrientes.

Solução Stock A	g/L
NaNO ₃	46,7
Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	5,9
MgSO ₄ •7H ₂ O	2,5
Solução Stock B	g/L
K ₂ HPO ₄	3,1
NaCO ₃	2,1
Solução Stock EDTA	mL/L
FeCl ₃	10,0
EDTA-Na	9,5
Solução Stock Micronutrientes	mL/L
1 a 12*	10,0
13 a 14*	100,0

Soluções 1 a 14	mL/L	Soluções 1 a 14	mL/L
1- Na ₂ WO ₄ •2H ₂ O	0,33	8 - CuSO ₄ •5H ₂ O	1,25
2- (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4H ₂ O	0,88	9 - NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ •6H ₂ O	1,98
3- KBr	1,20	10- Cr(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0,41
4- KI	0,83	11 - V ₂ O ₅	0,089
5- ZnSO ₄ •7H ₂ O	2,87	12 - Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ •12H ₂ O	4,74
6- Cd(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	1,55	13 - MnSO ₄ •4H ₂ O	3,10
7- Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	1,46	14 - MnSO ₄ •4H ₂ O	2,23

P.PORTO

ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



M

MESTRADO
FARMÁCIA