



## Remoção de fármacos de águas residuais usando biomateriais

**JULIANA DA SILVA SOUSA**

outubro de 2021

# REMOÇÃO DE FÁRMACOS DE ÁGUAS RESIDUAIS USANDO BIOMATERIAIS

Juliana da Silva Sousa

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de  
mestre em Engenharia Química, ramo opcional Energia e Biorrefinaria

ORIENTADORAS: SÓNIA FIGUEIREDO

OLGA FREITAS

ANDREIA SILVA

Outubro 2021



## **AGRADECIMENTOS**

Esta dissertação assinala o final do meu percurso académico e por isso, além de todas as pessoas que contribuíram para a sua realização, tenho de agradecer aos que me acompanharam durante estes anos e os tornaram mais fáceis, mais felizes.

Às minhas orientadoras académicas, Eng.<sup>a</sup> Sónia Figueiredo e Eng.<sup>a</sup> Olga Freitas agradeço pela disponibilidade, compreensão, apoio e orientação ao longo deste trabalho.

À Eng.<sup>a</sup> Andreia Silva, pela paciência e dedicação, por tudo o que me ensinou, pela ajuda no laboratório e pela total disponibilidade desde o início até ao final.

Ao GRAQ, grupo de investigação do Instituto Superior de Engenharia do Porto, por me ter recebido e disponibilizado as condições para a realização deste trabalho.

À Dra Malin Hultberg, por gentilmente ceder o substrato colonizado, imprescindível para o trabalho laboratorial.

Tenho de agradecer também à minha família, em especial ao meu irmão e aos meus pais, pelo apoio nos dias mais difíceis, pela confiança e pela liberdade.

Aos meus amigos que estão presentes desde o início, por me ouvirem, aconselharem e partilharem a vida comigo. Aos amigos que fiz em Aveiro, que mesmo mais longe se mantiveram por perto.

Em especial à xou, por ter sempre resposta às minhas perguntas.

A todas as pessoas que de alguma maneira me ajudaram ou inspiraram, muito obrigada.



## RESUMO

Nos últimos anos, têm sido detetadas várias classes de fármacos em águas superficiais. Embora a sua concentração esteja na ordem dos ng/L e µg/L, a sua presença no ambiente é considerado um problema de carácter emergente. Isto deve-se principalmente ao facto de as estações de tratamento de águas residuais não terem sido projetadas para a remoção deste tipo de contaminantes, tornando-se necessário desenvolver tratamentos complementares que sejam sustentáveis e económicos.

A presente dissertação teve como objetivo o estudo da remoção de fluoxetina (FLX), um dos antidepressivos mais consumidos a nível mundial, utilizando um biomaterial – substrato colonizado com *Pleurotus ostreatus*.

Foram realizados ensaios em sistema fechado (50 g de substrato colonizado, concentração inicial de FLX 600 µg/L, pH 7, 20-25 °C) para estudar a contribuição dos vários mecanismos de remoção, nomeadamente, oxidação por enzimas extracelulares, degradação intracelular pelo citocromo P450 (CP450) e sorção. Concluiu-se que a participação do CP450 foi negligenciável e que a sorção foi responsável por 45% da remoção do fármaco. Além disso, verificou-se que a remoção abiótica foi cerca de 8%. A remoção total de FLX foi alcançada num ensaio utilizando substrato colonizado sem qualquer tratamento prévio, salientando a contribuição dos enzimas extracelulares e do mecanismo de sorção. Pelo contrário, nos ensaios com extratos enzimáticos, realizados em sistema fechado (concentração inicial de FLX 600 µg/L, pH 6 e 7, 24-25 °C) removeu-se apenas 22% do fármaco, sendo considerados pouco eficazes.

No ensaio em contínuo (coluna de leito fixo, 12 g de substrato colonizado, concentração inicial de FLX 600 µg/L, pH 7, 23-26 °C), verificou-se a remoção total durante os primeiros 20 min, sendo a remoção superior a 70% no tempo restante de experiência.

A utilização de substrato colonizado permitiu remover completamente a FLX em ambos os ensaios (sistema fechado e em contínuo), demonstrando o seu potencial na descontaminação de águas. Apesar de apresentar inúmeras vantagens, a sua implementação em larga escala enfrenta ainda muitos desafios.

**Palavras-chave:** Biorremediação, Fluoxetina, Lacase, *Pleurotus ostreatus*, Sorção



## ABSTRACT

In the last years, different classes of pharmaceuticals have been detected in surface waters. Even though they are found in the concentration of ng/L and ug/L, their presence in the environment is considered an emergent problem. It may be attributed to the fact that wastewater treatment plants have not been designed for the removal of this type of contaminant, becoming necessary to develop complementary treatments that should be sustainable and economical.

The present dissertation aim was to study the removal of fluoxetine (FLX), one of the most consumed antidepressants in the world, using a biomaterial – colonized substrate with *Pleurotus ostreatus*.

The batch assays (50 g of colonized substrate, initial concentration of FLX 600 µg/L, pH 7, 20-25 °C) were carried out to study the contribution of the different mechanisms of removal, namely, extracellular enzymes oxidation, intracellular degradation by cytochrome P450 (CP450) and sorption. It was concluded that the participation of CP450 was negligible, and the sorption was responsible for 45% of the pharmaceutical removal. Furthermore, the abiotic removal was about 8%. The complete removal of FLX was achieved in an experiment using colonized substrate without any previous treatment, highlighting the contribution of extracellular enzymes and the sorption mechanism. On the other hand, the crude enzyme assays carried out in batch system (initial concentration of FLX 600 µg/L, pH 6 e 7, 24-25 °C) removed only 22% of FLX, being considered less effective.

In the continuous assay (fixed-bed column, 12 g of colonized substrate, initial concentration of FLX 600 µg/L, pH 7, 23-26 °C), the total removal was achieved during the first 20 min, being higher than 70% in the remaining time of experience.

The use of colonized substrate allowed the complete removal of FLX in both assays (batch system and in continuous), demonstrating its potential in the decontamination of waters. Although it has many advantages, its large-scale implementation faces several challenges yet.

**Keywords:** Bioremediation, Fluoxetine, Laccase, *Pleurotus ostreatus*, Sorption



# ÍNDICE

Agradecimentos .....	III
Resumo .....	V
Abstract.....	VII
Índice de figuras .....	XI
Índice de tabelas .....	XIII
Lista de abreviaturas e siglas .....	XV
1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento.....	1
1.2 Objetivos do trabalho .....	3
1.3 Organização da dissertação .....	4
2. Estado de arte.....	5
2.1 O problema dos fármacos no ambiente .....	5
2.2 Tecnologias de remoção .....	8
2.3 Biorremediação.....	9
2.4 Micorremediação .....	10
2.5 Fungos da podridão branca.....	10
2.5.1 Mecanismos de remoção .....	12
2.5.2 Estudos realizados .....	13
2.5.3 <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	17
2.5.4 Lacase .....	19
3. Materiais e métodos.....	25
3.1 Reagentes.....	25
3.2 Biomaterial .....	25
3.3 Ensaio realizado em sistema fechado .....	26
3.4 Ensaio em coluna.....	30
3.5 Métodos analíticos.....	31
3.5.1 Determinação da humidade do substrato.....	31
3.5.2 Determinação da atividade enzimática da lacase .....	31
3.5.3 Quantificação da fluoxetina por HPLC .....	32
4. Resultados e discussão .....	35
4.1 Ensaio realizado em sistema fechado .....	35
4.1.1 Ensaio realizado com substrato colonizado.....	36

4.1.2 Ensaio com substrato colonizado autoclavado.....	38
4.1.3 Ensaio com substrato colonizado, com adição de 1-ABT .....	39
4.1.4 Comparação dos ensaios realizados com substrato colonizado.....	41
4.2 Ensaio com extratos enzimáticos .....	42
4.3 Comparação entre os ensaios com substrato colonizado e os extratos enzimáticos .....	45
4.4 Ensaio em coluna.....	47
5. Conclusões e sugestões para trabalho futuro .....	51
Referências bibliográficas .....	53
Anexos.....	63
Anexo A. Determinação da humidade do substrato .....	63
Anexo B. Resultados dos ensaios com substrato colonizado .....	65
Anexo C. Resultados dos ensaios com extratos enzimáticos .....	69
Anexo D. Ensaio em coluna .....	71
Anexo E. Remoção abiótica .....	73
Anexo F. Determinação da atividade enzimática .....	73
Anexo G. Cálculo da remoção de fluoxetina.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Vias de introdução de fármacos no ambiente (adaptado de [25]).....	5
<b>Figura 2.2</b> Estrutura química da fluoxetina [36]. .....	7
<b>Figura 2.3</b> Mecanismos de degradação de fármacos presentes numa célula de um FPB (adaptado de [58]).....	13
<b>Figura 2.4</b> Distribuição percentual dos maiores produtores de cogumelos no mundo (adaptado de [71]).....	17
<b>Figura 2.5</b> Representação da lacase produzida pelo fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> , isoforma POXC [79].....	19
<b>Figura 2.6</b> Ciclo catalítico da lacase [84]. .....	21
<b>Figura 2.7</b> Mecanismo catalítico da lacase com e sem mediador (adaptado de [85])... ..	22
<b>Figura 3.1</b> Ensaio com substrato colonizado.....	27
<b>Figura 3.2</b> Ensaio com substrato colonizado autoclavado. ....	28
<b>Figura 3.3</b> Extração enzimática a partir do substrato colonizado.....	29
<b>Figura 3.4</b> Ensaio com extratos enzimáticos.....	29
<b>Figura 3.5</b> Ensaio em coluna. ....	30
<b>Figura 4.1</b> Variação da atividade enzimática ao longo dos ensaios com substrato colonizado.....	36
<b>Figura 4.2</b> Concentração relativa de fluoxetina ao longo dos ensaios com substrato colonizado.....	37
<b>Figura 4.3</b> Concentração relativa de fluoxetina no ensaio com substrato colonizado e substrato colonizado autoclavado. ....	38
<b>Figura 4.4</b> Variação da atividade enzimática ao longo do ensaio com substrato colonizado com e sem a adição do inibidor 1-ABT. ....	40
<b>Figura 4.5</b> Concentração relativa de fluoxetina no ensaio com substrato colonizado e com adição de inibidor 1-ABT. ....	40
<b>Figura 4.6</b> Concentração relativa de fluoxetina no ensaio com substrato colonizado (ensaio 2), substrato colonizado autoclavado e ensaio com inibidor do citocromo P450. ....	41
<b>Figura 4.7</b> Variação da atividade enzimática nos ensaios com extratos enzimáticos. ..	43

<b>Figura 4.8</b> Concentração relativa de fluoxetina nos ensaios com extratos enzimáticos.	44
<b>Figura 4.9</b> Concentração relativa de fluoxetina no ensaio com substrato colonizado e extrato enzimático (pH 7).	46
<b>Figura 4.10</b> Concentração relativa de fluoxetina ao longo do ensaio em coluna, sendo C0 a concentração da solução alimentada à coluna.	48
<b>Figura 4. 11</b> Atividade enzimática (U/L) e remoção de fluoxetina (%) ao longo do ensaio em coluna.	49

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> Características dos principais enzimas lenholíticos produzidos pelos FPB [49]. .....	11
<b>Tabela 2.2</b> Remoção de diversos fármacos utilizando FPB, em condições experimentais diferentes [58]......	15
<b>Tabela 2.3</b> Características de várias isoformas da lacase produzidas pelo fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> [84]......	20
<b>Tabela 3.1</b> Características físico-químicas da fluoxetina (na forma de hidrocloreto) [92]. .....	25
<b>Tabela 3.2</b> Informação dos ensaios realizados com substrato colonizado.....	27
<b>Tabela 3.3</b> Características da coluna e condições experimentais do ensaio. ....	31
<b>Tabela 3.4</b> Informações das curvas de calibração da FLX para diferentes valores de pH. ....	33
<b>Tabela 4.1</b> Valores de pH e temperatura no início e no final de cada ensaio realizado em sistema fechado.....	35
<b>Tabela 4.2</b> Resumo dos resultados dos ensaios realizados em sistema fechado. ....	47
<b>Tabela A.1</b> Valores de peso e humidade do substrato colonizado. ....	63
<b>Tabela B.1</b> Resultados do ensaio com substrato colonizado (9/06/2021).....	65
<b>Tabela B.2</b> Resultados do ensaio com substrato colonizado (23/06/2021). ....	66
<b>Tabela B.3</b> Resultados do ensaio com substrato colonizado autoclavado.....	67
<b>Tabela B.4.</b> Resultados do ensaio com substrato colonizado, com adição de 1-ABT...	68
<b>Tabela C.1</b> Resultados do ensaio com extrato enzimático a pH 6.....	69
<b>Tabela C.2</b> Resultados do ensaio com extrato enzimático a pH 7. ....	70
<b>Tabela D.1</b> Resultados do ensaio em coluna.....	71
<b>Tabela E.1</b> Resultados do ensaio com solução tampão e fluoxetina.....	73



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1- ABT	1-aminobenzotriazol
2,6-DMP	Do inglês, <i>2,6-dimetoxiphenol</i>
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico)
CP450	Citocromo P450
EBRT	Tempo necessário para que o efluente preencha a coluna vazia
EC	Do inglês, <i>Enzyme Commission Number</i>
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
FPB	Fungos da Podridão Branca
FLX	Fluoxetina
HAP	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
HBT	1- hidroxibenzotriazol
HPLC-FLD	Do Inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection</i>
LiP	Do Inglês, <i>lignin peroxidase</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MnP	Do Inglês, <i>manganese peroxidase</i>
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
SMS	Do Inglês, <i>spent mushroom substrate</i>
VP	Do Inglês, <i>versatile peroxidase</i>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ENQUADRAMENTO

Os produtos farmacêuticos são utilizados para melhorar a qualidade de vida humana e dos animais, contribuindo para a saúde, bem-estar e aumentando a esperança média de vida [1]. No entanto, o seu elevado consumo e conseqüente excreção, na sua forma original ou como metabolitos, resulta na sua presença indesejada no meio ambiente, constituindo um problema ambiental e de saúde pública [2].

Devido à baixa biodegradabilidade de muitos fármacos, estes acabam por se acumular em níveis detetáveis e em quantidades biologicamente ativas em ambientes aquáticos. Desta forma, estes poluentes podem atuar como potenciais desreguladores endócrinos e causar alterações das funções fisiológicas em organismos aquáticos [3, 4, 5]. Há estudos que reportam, como alguns dos principais efeitos, a diminuição de população de fauna aquática devido à presença de anticoncepcionais e mudança de comportamento por ação de antidepressivos [6,7]. Da mesma forma, a presença de fármacos no meio ambiente tem conseqüências negativas para outros seres vivos, tornando-se fundamental o desenvolvimento de tecnologias de deteção e eliminação de compostos farmacêuticos em águas residuais.

As estações de tratamentos de águas residuais (ETARs) têm um papel determinante na qualidade das águas. No entanto, as ETARs convencionais não são completamente eficazes na remoção destes contaminantes [8]. Uma grande parte dos produtos farmacêuticos resiste aos processos de tratamento usados nas ETARs convencionais, uma vez que estas não foram projetadas para remover este tipo de micropoluentes [9]. Além disso, os compostos farmacêuticos polares e portanto solúveis em água, encontram-se sobretudo em ambientes aquáticos, tendo já sido detetados em águas superficiais [10, 11], águas subterrâneas [12] e até em água do mar [9, 13].

Apesar de existirem processos de tratamento avançados, a sua implementação apresenta limitações associadas ao elevado custo de operação e manutenção, no caso da filtração por membranas, e nos processos de oxidação devido à geração de subprodutos desconhecidos e potencialmente perigosos, assim como à utilização de grandes quantidades de oxidantes químicos [14, 15]. Desta forma, torna-se necessário desenvolver

processos de tratamento alternativos que sejam economicamente viáveis e amigos do ambiente.

Ao longo dos anos, os países membros da União Europeia têm-se focado em alcançar vários objetivos que têm em comum a preservação da água como um bem essencial, minimizando qualquer tendência para a persistência e aumento da concentração de poluentes [16].

Nesse contexto, a Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho definiu os princípios da qualidade da água e estabeleceu medidas de prevenção e eliminação da poluição relativamente ao ambiente aquático. Associado a essas medidas, foi definida uma estratégia que implicou a identificação das substâncias de caráter prioritário entre aquelas que constituem um risco significativo para o meio aquático [16]. A decisão nº 2455/2001/CE do Parlamento Europeu estabeleceu, assim, uma lista de 33 substâncias de monitorização prioritária no domínio da política da água [17].

A diretiva 2013/39/EU do Parlamento Europeu e do Conselho veio alterar as diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que diz respeito às substâncias prioritárias no domínio da política da água. A nova diretiva incluiu novas substâncias, perfazendo um total de 45. Esta lista inclui herbicidas, inseticidas, fármacos e outros poluentes. Esta diretiva considera ainda a poluição química das águas superficiais uma ameaça para o meio aquático e para a saúde humana, estimulando o desenvolvimento de tecnologias inovadoras do tratamento de águas, favorecendo uma relação equilibrada de custo e eficiência [17].

Em 2017, a comissão analisou os dados do primeiro ano de monitorização das substâncias prioritárias e concluiu que já havia dados de monitorização suficientes para algumas substâncias, incluindo oxadiazão, trialato e diclofenaco, e por isso deveriam ser removidas. Além disso, a comissão recolheu dados sobre outros compostos que poderiam ser incluídas na lista de vigilância, destacando-se os antibióticos amoxicilina e ciprofloxacina [18].

Os dados mais recentes remetem a 2020, ano em que a Comissão Europeia atualizou a lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível europeu, onde não devem ser incluídas substâncias que suscitem dúvidas quer em relação à sua toxicidade, quer em relação à sensibilidade, fiabilidade ou comparabilidade dos métodos de análise disponíveis. Desta forma, identificaram-se como substâncias a monitorizar quatro

fármacos (os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim, o antidepressivo venlafaxina e o seu metabolito O-desmetilvenlafaxina), um grupo de compostos farmacêuticos azólicos, sete pesticidas e ainda dois fungicidas. A inclusão dos vários produtos farmacêuticos está de acordo com a Abordagem Estratégica da União Europeia relativa aos Produtos Farmacêuticos no Ambiente [19].

A Abordagem Estratégica da União Europeia relativa aos Produtos Farmacêuticos no Ambiente propõe medidas a serem tomadas ao nível da União e/ou dos Estados-Membros de modo a minimizar eventuais impactos ambientais, de forma a reduzir as descargas, as emissões e as perdas de substâncias ativas para o ambiente aquático. Para serem eficazes, estas medidas devem considerar os pontos de emissão original, como produção e utilização, mas também incluir pontos de controlo terminal, como o tratamento de águas residuais [20].

Apesar de existirem medidas que abrangem a utilização, manuseamento e recolha de medicamentos, ainda não existe legislação relacionada com a concentração de fármacos em água residuais [21, 22].

## **1.2 OBJETIVOS DO TRABALHO**

O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial de aplicação de um tratamento terciário ecológico, economicamente viável e sustentável para a remoção de compostos farmacêuticos a partir de soluções aquosas. Apresentam-se de seguida os objetivos específicos.

- Estudo da remoção de fluoxetina, um dos antidepressivos mais frequentemente prescritos a nível mundial, utilizando um biomaterial – um substrato colonizado pelo fungo da podridão branca *Pleurotus ostreatus*, em sistema fechado e em contínuo.
- Estudo da contribuição dos mecanismos responsáveis pela remoção da fluoxetina, nomeadamente, a degradação por enzimas intra- e extracelulares, e a sorção ao substrato colonizado.
- Avaliação da remoção da fluoxetina por extratos enzimáticos *versus* substrato colonizado.
- Estudo da relação da eficiência de remoção da fluoxetina com a atividade do enzima lacase ao longo do tempo de reação.

- Estudo da influência do pH na atividade do enzima lacase e avaliação da sua influência na eficiência de remoção da fluoxetina.

### **1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO**

A presente tese é constituída por cinco capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma breve introdução ao tema, os objetivos do trabalho e a organização do documento.

O segundo capítulo inclui uma revisão bibliográfica, abordando os seguintes temas: o problema dos fármacos no ambiente, as tecnologias de remoção existentes, a biorremediação aplicada ao tratamento de águas residuais, os fungos da podridão branca e os seus mecanismos de remoção de contaminantes, os estudos recentes disponíveis na literatura, a caracterização do fungo da podridão branca *Pleurotus ostreatus* e do enzima lacase.

No terceiro capítulo descrevem-se os materiais e métodos utilizados no trabalho experimental.

No quarto capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos na remoção de fluoxetina utilizando substrato colonizado, em sistema fechado e em coluna.

Por último, no quinto capítulo são apresentadas as principais conclusões deste trabalho e algumas sugestões para trabalhos futuros.

## 2. ESTADO DE ARTE

### 2.1 O PROBLEMA DOS FÁRMACOS NO AMBIENTE

Todos os anos quantidades massivas de medicamentos são produzidas e utilizadas em ambiente doméstico e hospitalar [23]. Tendo em conta que nenhum requisito legal foi ainda definido para a descarga destas substâncias, a presença de compostos farmacêuticos (persistentes e biologicamente ativos) têm causado uma preocupação crescente nos últimos anos [24].

Se os produtos farmacêuticos e/ou os seus metabolitos não forem removidos durante o tratamento de águas residuais, podem acabar por entrar no ambiente aquático e, eventualmente, atingir as fontes de água potável [25]. Embora as concentrações de fármacos em águas superficiais e efluentes de ETARs estejam entre os ng/L e µg/L, são considerados um poluente de caráter emergente [25, 26]. Estes poluentes são continuamente introduzidos no ambiente por diversas vias de contaminação (Figura 2.1).

As principais origens são os efluentes de estações de tratamento de águas residuais domésticas e hospitalares, resíduos de produção e descargas inadequadas da indústria farmacêutica, lixiviados de aterros sanitários e de resíduos da criação de animais e agricultura [25, 27].

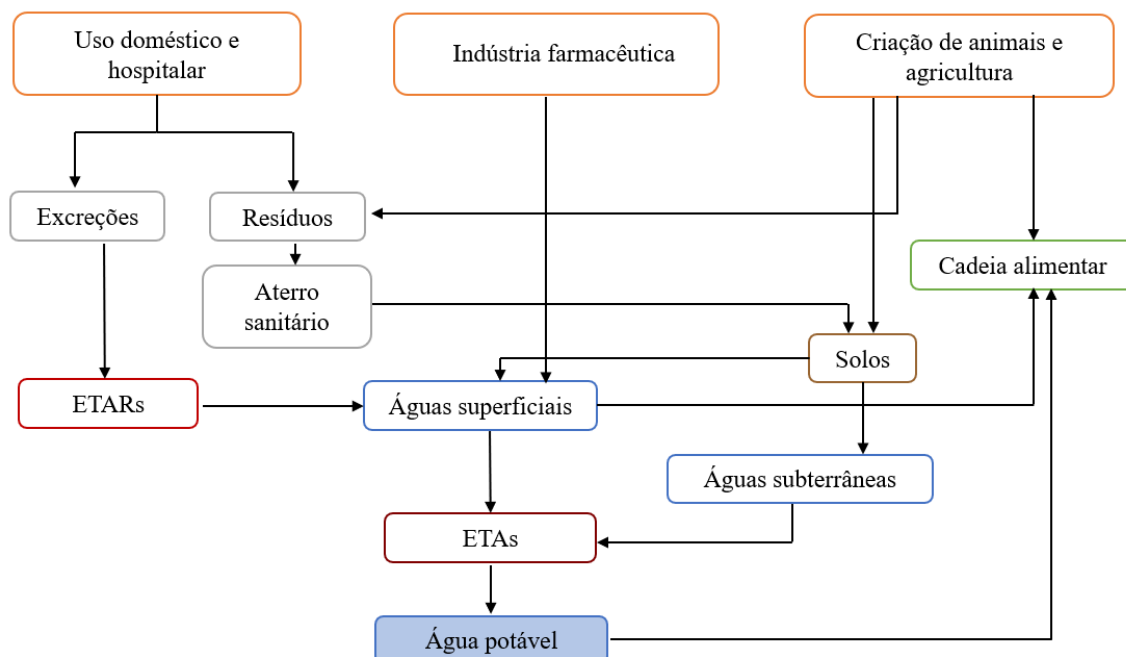


Figura 2.1 Vias de introdução de fármacos no ambiente (adaptado de [25]).

Tal como sugere a Figura 2.1, uma parte significativa dos fármacos é introduzida no ambiente através das ETARs que recebem águas contaminadas como consequência da sua utilização na medicina humana e veterinária. Isto deve-se ao facto de os processos de tratamento de águas residuais não serem adequados para a remoção de micropoluentes como fármacos, uma vez que o seu objetivo principal é remover compostos de carbono, nitrogénio e fósforo [24, 28].

O uso de medicamentos na criação de animais e na agricultura pode atingir o meio ambiente por três vias: proveniente da sua aplicação em aquacultura, deposição no solo diretamente através das excreções dos animais ou indiretamente através do uso de estrume como fertilizante. Destaca-se ainda a indústria farmacêutica como potencial via de contaminação através de descargas de efluentes industriais e lixiviação de resíduos resultantes da sua atividade [25]. Os efluentes das atividades descritas anteriormente acabam por atingir águas superficiais e subterrâneas, podendo contaminar as origens de água potável e desta forma introduzir-se na cadeia alimentar.

Diferentes classes de contaminantes emergentes, principalmente fármacos, demonstraram ter baixas taxas de eliminação e têm sido detetados em efluentes de ETARs e em águas superficiais, persistindo no meio ambiente [29]. O problema dos poluentes emergentes é que a sua ocorrência e avaliação de risco e toxicidade nem sempre são conhecidas, e é difícil prever o seu destino em ambiente aquático. As limitações associadas à sua monitorização estão associadas à escassez de métodos analíticos aptos para a sua determinação em níveis vestigiais, ao facto de serem amostras com uma matriz complexa e à diversidade das propriedades químicas desses compostos [30].

Os fármacos têm características que fazem com que se considere a sua presença no ambiente um risco e uma ameaça ambiental. Essas características incluem o facto de serem biologicamente ativos, altamente solúveis em água e pouco biodegradáveis [25].

Os compostos farmacêuticos podem ser metabolizados em várias extensões, originando metabolitos, que são excretados em conjunto com compostos originais, e que podem ser suscetíveis a modificações químicas, físicas ou biológicas tanto nas estações de tratamento como no meio hídrico recetor. Os fármacos apresentam uma ampla diversidade de propriedades físicas e químicas, como solubilidade, volatilidade,

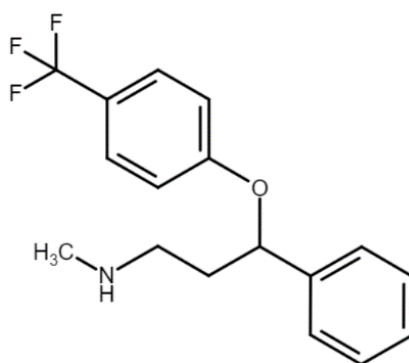
biodegradabilidade, polaridade e estabilidade, que influenciam e dificultam a eficiência de remoção dos processos de tratamento [24, 31].

Os fármacos encontrados em maior quantidade nos efluentes de ETARs são antibióticos, antiepiléticos, analgésicos e anti-inflamatórios, diuréticos, reguladores lipídicos e agentes de contraste usados em imagens médicas [29].

O uso de antidepressivos tem aumentado a nível global. Em 2019, entre vários países selecionados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), verificou-se que a Islândia, Portugal e Canadá eram os maiores consumidores de antidepressivos [32]. Destes, destaca-se a fluoxetina, que também é prescrita para o tratamento de transtornos alimentares e de personalidade [33].

A fluoxetina é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina que é comercializada na forma de hidrocloreto de fluoxetina, também reconhecida como Prozac [34]. É um dos antidepressivos mais consumido no mundo e tem sido detetado em águas superficiais e em efluentes de águas residuais em concentrações na ordem dos ng/L [35].

Entre vários compostos ativos da mesma classe, a fluoxetina (Figura 2.2) aparenta ser dos mais persistente em águas superficiais. Além disso, está associada a um elevado risco ambiental, comparativamente a outros fármacos, devido à sua toxicidade para alguns organismos aquáticos, incluindo peixes, crustáceos e algas [33].



**Figura 2.2** Estrutura química da fluoxetina [36].

## 2.2 TECNOLOGIAS DE REMOÇÃO

Os processos de tratamento de águas residuais incluem o pré-tratamento, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário. O pré-tratamento é feito com o objetivo de facilitar a aplicação dos processos de tratamento subsequentes. Esta etapa inclui processos de ajuste de pH, adição de nutrientes, remoção de substâncias tóxicas ou inibitórias, remoção de óleos e gorduras e remoção de sólidos por flutuação, sedimentação ou filtração [36].

O tratamento primário, também conhecido como sedimentação primária ou clarificação, tem como objetivo a remoção de sólidos orgânicos sedimentáveis através do processo de decantação [37].

O tratamento secundário é feito por um processo biológico, geralmente por lamas ativadas [36]. Nesta etapa, a matéria orgânica e os nutrientes das águas residuais são convertidos, por ação de diferentes tipos de microrganismos que constituem a biomassa, em dióxido de carbono e outros produtos da oxidação biológica (p.e. nitratos e fosfatos) [38].

O tratamento terciário é feito com o objetivo de remover os contaminantes que resistiram ao tratamento secundário. Estes contaminantes incluem compostos orgânicos tóxicos, fósforo, nitrogénio, metais pesados e agentes patogénicos. Nesta etapa, os processos mais utilizados são a precipitação, filtração, coagulação/floculação, permuta iónica e filtração por membranas. Alguns dos poluentes podem não ser eficientemente removidos devido às suas baixas concentrações relativamente a elevados caudais [36].

Por este motivo, e aliada à preocupação da presença de contaminantes como produtos farmacêuticos no meio ambiente, novas tecnologias de tratamento de águas residuais têm vindo a ser desenvolvidas. A oxidação avançada e a filtração por membranas demonstraram alcançar elevada eficiência na remoção de fármacos e de outros contaminantes emergentes [39, 40]. Contudo, como já se referiu, a sua implementação acarreta elevados custos de operação e manutenção e pode levar à formação de subprodutos desconhecidos e potencialmente perigosos, mostrando-se eficazes, mas pouco viáveis do ponto de vista económico e ambiental. Desta forma, surge a necessidade de desenvolver novas tecnologias de tratamento [14].

Nos últimos anos, os processos biológicos, nomeadamente a biorremediação, tem sido estudada como um complemento aos processos convencionais de tratamentos de águas residuais, uma vez que é considerada um processo económico e sustentável [41].

### **2.3 BIORREMEDIAÇÃO**

A biorremediação é um processo biológico que utiliza microrganismos como bactérias, algas, fungos ou enzimas para reduzir e/ou remover contaminantes do meio ambiente. Pode ser descrito como um processo de aceleração do metabolismo normal, uma vez que os microrganismos degradam e/ou transformam compostos tóxicos em formas menos tóxicas [42, 43].

A principal vantagem da biorremediação é a sua viabilidade ecológica e sustentabilidade, uma vez que utiliza a capacidade natural dos microrganismos para degradar compostos poluentes da água e dos solos. Além disso, requer menos energia e tem um custo de implementação inferior, comparativamente com outras tecnologias. Por outro lado, pode ser um processo lento e não é aplicável a todos os contaminantes orgânicos nem a compostos inorgânicos [43].

A biorremediação depende de vários fatores, nomeadamente, interação entre poluentes, presença de nutrientes, tipo de organismo e condições ambientais. Ou seja, determinados fatores como a toxicidade, concentração do contaminante, eficiência do microrganismo, condições de degradação (pH e temperatura), tempo de retenção e presença de outros compostos têm uma grande influência na eficácia do processo [43].

Os compostos xenobióticos, como corantes sintéticos, pesticidas, produtos farmacêuticos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) são alguns poluentes orgânicos comuns. Vários estudos reportados da literatura demonstram que as aplicações de técnicas de biorremediação são bem-sucedidas para a remoção de muitas destas substâncias em sistemas aquáticos [44].

## **2.4 MICORREMEDIAÇÃO**

A micorremediação é uma forma de biorremediação que consiste na utilização de fungos para degradar ou mitigar poluentes presentes em matrizes ambientais [42].

Os fungos são organismos eucarióticos uni ou pluricelulares pertencentes ao reino Fungi. Normalmente, crescem como filamentos (hifas) que se estendem apenas no seu extremo formando uma massa de ramificações denominada micélio. Os fungos são heterotróficos, o que significa que não são capazes de sintetizar o seu próprio alimento, precisando de absorver matéria orgânica através de uma fonte externa. Muitas vezes, esse processo é feito através da secreção de enzimas que permitem degradar polímeros complexos presentes no meio envolvente [43].

Além disso, os fungos são conhecidos por serem os principais agentes de decomposição na natureza, especialmente de polímeros como celulose, hemicelulose e lenhina [44, 45]. No entanto, além desses, conseguem degradar uma grande variedade de compostos.

A utilização de fungos como mecanismo de remediação apresenta vantagens em relação ao uso de bactérias. As bactérias têm a necessidade de serem expostas previamente ao poluente e apenas produzem alguns enzimas a partir de uma certa concentração de contaminante, o que limita a sua utilização [46].

A micorremediação pode ser aplicada na degradação de vários poluentes persistentes como HAP, metais pesados, pesticidas e herbicidas, tintas, detergentes e fármacos [47].

Vários estudos destacam a participação de enzimas lenholíticas e do citocromo P450 (CP450) como mecanismo de vários fungos da podridão branca na degradação de poluentes como HAP, fármacos e antibióticos [47].

## **2.5 FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA**

Os fungos da podridão branca (FPB) são fungos filamentosos decompositores da madeira, sendo que alguns degradam todos os seus componentes (celulose, hemicelulose e lenhina) e outros degradam apenas a lenhina. A maioria dos FPB pertence ao filo Basidiomycota (ordens Polyporales e Agaricales). O nome “podridão branca” deriva da

aparência esbranquiçada da madeira posteriormente ao ataque desses fungos, devido à remoção da lenhina, que tem cor escura [48].

A degradação da lenhina pelos FPB pode ser seletiva ou não seletiva. Existem espécies que degradam individualmente a lenhina, antes dos polissacarídeos, como é o caso de várias espécies do género *Pleurotus*. As espécies não seletivas, como *Trametes versicolor*, degradam todos os componentes poliméricos da madeira em simultâneo [48].

Os FPB têm sistemas lenholíticos oxidativos e extracelulares com baixa especificidade de substrato, o que lhes permite transformar ou degradar uma ampla variedade de micropoluentes, sendo vistos como potenciais agentes para a biorremediação de compostos xenobióticos [48]. Os principais enzimas extracelulares produzidos pelos FPB incluem a lenhina peroxidase (LiP, do inglês, *lignin peroxidase*), manganês peroxidase (MnP, do inglês, *manganese peroxidase*), peroxidase versátil (VP, do inglês, *versatile peroxidase*) e lacase (Lac) [49]. Na Tabela 2.1 encontram-se algumas características dos principais enzimas lenholíticos produzidos pelos FPB.

**Tabela 2.1** Características dos principais enzimas lenholíticos produzidos pelos FPB [49].

Enzima	Cofator	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico (pI)	Potencial redox (eV)	Local de atuação
Lacase (EC 1.10.3.2)	O <sub>2</sub>	54 - 80	3 - 4	0,4 - 0,8	Maioritariamente extracelular
Lenhina peroxidase (EC 1.11.1.4)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	35-48	3,1-4,7	1,2 (a pH 3,0)	Extracelular
Manganês peroxidase (EC 1.11.1.13)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	38 - 62,5	2,9 - 7,1	0,8 (a pH 4,5)	Extracelular
Peroxidase versátil (EC 1.11.1.16)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40 - 45	3,4 - 3,9	>1	Extracelular

A principal diferença entre a lacase e as peroxidases é o recetor de eletrões, respetivamente, oxigénio e peróxido de hidrogénio [48, 50].

Os complexos enzimáticos dos FPB incluem ainda enzimas “acessórias” que são maioritariamente desidrogenases e oxidases que, juntamente com peróxido de hidrogénio (produzido pelo fungo), produzem oxidantes químicos que completam o processo de degradação através da destabilização da lenhina ou de compostos xenobióticos [48, 51].

Alguns dos FPB mais conhecidos pela sua capacidade de degradar contaminantes são *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus pulmonarius*, *Lentinula edodes*, *Irpex lacteus* e *Agaricus bisporus* [42, 46].

### **2.5.1 MECANISMOS DE REMOÇÃO**

Os FPB são capazes de remover com eficácia uma ampla gama de compostos xenobióticos. Os mecanismos de remoção de poluentes envolvidos no tratamento com FPB podem ser divididos em: biodegradação por enzimas extracelulares, biodegradação por enzimas intracelulares ou enzimas ligadas ao micélio (p.e o CP450) e sorção na biomassa [52].

Tal como foi dito anteriormente, a oxidação extracelular é realizada por enzimas modificadores de lenhina como a LiP, MnP, VP e lacase. Estes enzimas normalmente são produzidos durante o metabolismo secundário dos FPB, quando existem limitações de nutrientes como nitrogénio, carbono e enxofre [51].

Tanto a lacase como as peroxidases são enzimas não específicas relativamente ao seu substrato, que catalisam a oxidação de compostos aromáticos, como fenóis, presentes na maioria dos fármacos [53].

A degradação intracelular é realizada por complexos enzimáticos envolvendo o sistema do citocromo P450 e tem sido estudada na biodegradação de vários compostos farmacêuticos ativos [54]. O citocromo P450 é uma superfamília de monooxigenases que pode ser encontrado em quase todos os seres vivos, incluindo fungos [55]. As monooxigenases do citocromo P450 conseguem catalisar várias reações enzimáticas de modo a transformar compostos xenobióticos em derivados mais polares e/ou menos tóxicos [56].

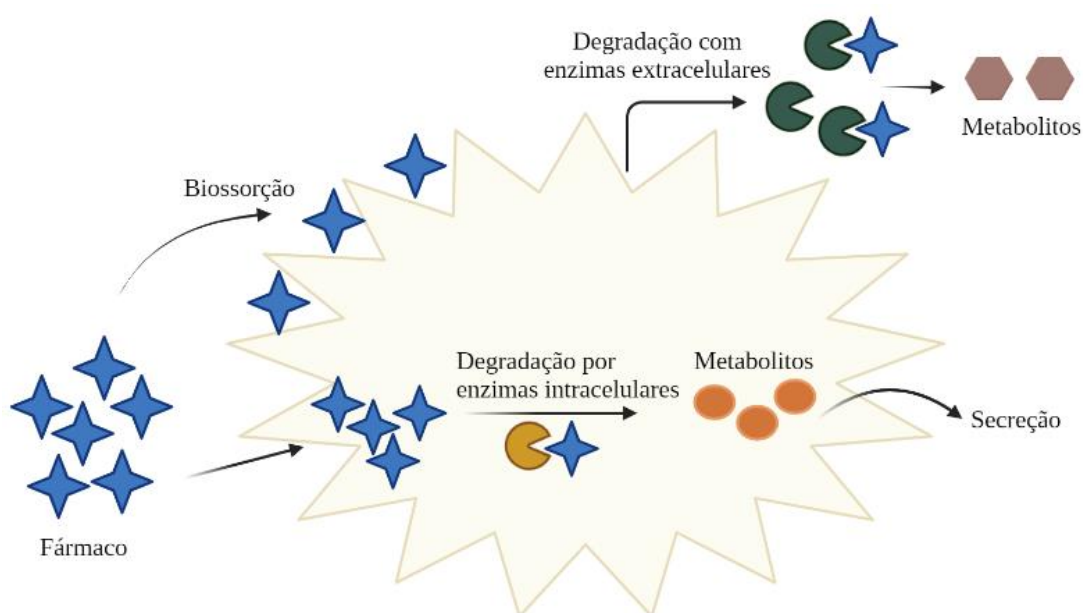
Há estudos que destacam a sua importância, mencionando que quando o CP450 é inativado, pode afetar a remoção até 30% [52]. Considera-se que este sistema pode ocorrer em simultâneo e acoplado ao sistema enzimático extracelular [53].

Além dos dois mecanismos descritos anteriormente, a biossorção também faz parte dos mecanismos de remediação. A biossorção pode ocorrer em biomassa viva ou morta. No entanto, quando se utilizam células vivas, os mecanismos de biossorção tornam-se mais complexos devido à interferência do metabolismo celular [57]. A parede celular dos

fungos é constituída por vários grupos funcionais como grupos carboxilo, hidroxilo, amina, sulfonato e fosfonato, que conferem excelentes propriedades de adsorção aos fungos [57].

A biossorção pode envolver fenómenos como: acumulação intracelular e extracelular, precipitação, complexação e sorção à superfície da célula (permuta iónica e/ou adsorção física) [57].

Na Figura 2.3 estão representados os vários mecanismos de remoção que ocorrem, a nível celular, nos fungos da podridão branca.



**Figura 2.3** Mecanismos de degradação de fármacos presentes numa célula de um FPB (adaptado de [58]).

O facto do mecanismo de degradação de lenhina não ser específico, não estereoseletivo e baseado em radicais livres, confere aos FPB a capacidade de degradar vários poluentes, sendo por isso apontados como uma solução para a descontaminação de águas e solos. Esta é mais uma das vantagens dos fungos em relação às bactérias, tendo em conta que os seus enzimas são altamente específicos. Além disso, os FPB conseguem degradar poluentes em baixas concentrações até níveis não detetáveis [45].

## 2.5.2 ESTUDOS REALIZADOS

Existem vários organismos capazes de remover poluentes da natureza, entre eles bactérias, algas e fungos. No entanto, os FPB têm tido um grande destaque como agentes

de biorremediação, tendo em conta o seu potencial de remoção de poluentes devido ao seu sistema de produção de enzimas lenholíticas [42].

Segundo a literatura, vários fungos mostraram ser capazes de remover diferentes compostos farmacêuticos, entre eles *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Dichomitus squalens* e *Pleurotus ostreatus* [58].

O fungo da podridão branca *Trametes versicolor* demonstrou ser eficaz na remoção de naproxeno, cetoprofeno, codeína, diazepam, carbamazepina e metoprolol, operando em biorreatores de leito fluidizado em contínuo e por partidas [47, 59, 60]. O fungo *Phanerochaete chrysosporium* foi capaz de realizar a degradação oxidativa de diferentes anti-inflamatórios, operando num reator por partidas perfeitamente agitado [47, 61]. Estes estudos destacam o papel dos enzimas extracelulares lenholíticos e dos sistemas intracelulares do citocromo P450 na degradação de vários fármacos [47].

Os fungos *Bjerkandera adusta* e *Phanerochaete chrysosporium* também mostraram ser eficientes na remoção de antidepressivos como citalopram e fluoxetina [62].

Além dos organismos mencionados anteriormente, a utilização de um conjunto de fungos incluindo *Aspergillus niger*, *Mucor circinelloides*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trametes polyzona* e *Rhizopus microsporus* mostrou ser eficaz na degradação de compostos farmacêuticos como carbamazepina, diclofenaco e ibuprofeno [62]

Além destes, vários estudos destacam que os FPB têm a capacidade de remover diversos compostos orgânicos, incluindo fármacos presentes em águas residuais [63, 64, 65]. Nesse sentido, foram reportados vários ensaios utilizando diferentes espécies de fungos para a remoção de diversos fármacos. Um resumo do levantamento bibliográfico realizado apresenta-se na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2** Remoção de diversos fármacos utilizando FPB, em condições experimentais diferentes [58].

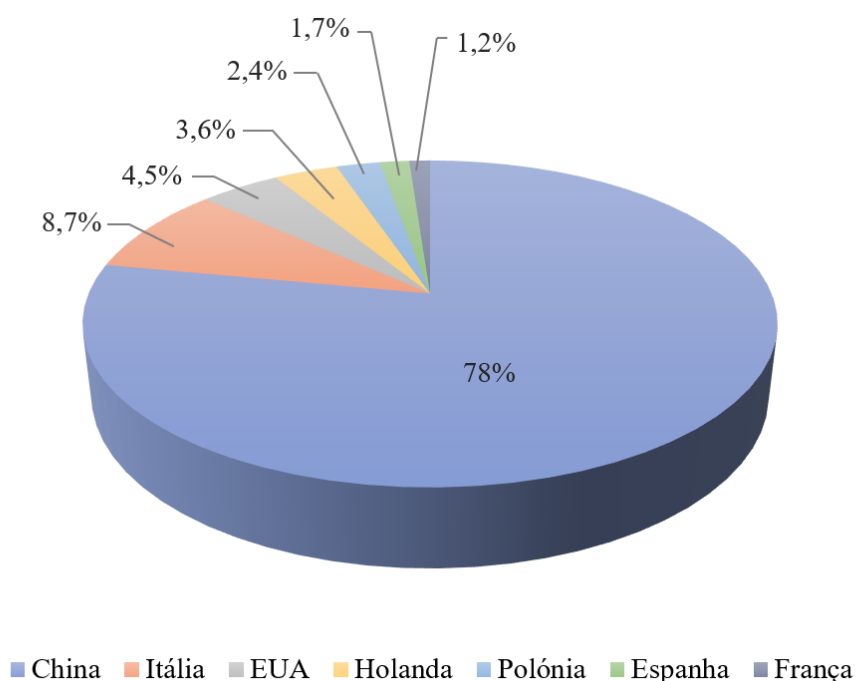
Fungo/Enzimas	Tipo de reator	Condições experimentais	Fármaco	Concentração inicial (mg/L)	Remoção (%)	Referência
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (LiP, MnP)	Reator agitado (por partidas)	Inóculo= 1,2 g/L Volume reator = 2 L Velocidade agitação = 200 rpm pH= 4,5 Temperatura = 30°C Tempo de operação = 30 dias Dador de eletrões: glucose	Diclofenaco	0,8	>99	[66]
			Ibuprofeno	0,8	75-99	
			Naproxeno	0,8	>99	
<i>Trametes versicolor</i> (Lacase, LiP, MnP)	Leito fluidizado (em contínuo)	Inóculo =1,4 g/L Volume reator = 10 L pH=4,5 Temperatura =25°C Dadores eletrões: glucose Tempo de operação = 8 dias Águas residuais hospitalares, condições não estéreis)	Cetoprofeno	2,17	95	[67]
			Codeína	0,606	100	
			Ofloxacina	3,34	98	
	Leito fluidizado (por partidas)	Inóculo =1,5 g/L Volume reator = 10 L pH= 4,5	Ibuprofeno	2,34	100	[68]

		Temperatura =25°C Dador de eletrões: glucose Tempo de operação = 8 dias Águas residuais hospitalares, em condições não estéreis	Paracetamol	1,56	100	
			Ciprofloxacina	84,71	35	
			Azitromicina	4,31	100	
			Propranolol	0,06	100	
			Cetoprofeno	0,08	100	
	Frasco de Erlenmeyer (por partidas)	Inóculo = 2-3 mg pH= 4,5 Temperatura =28°C Tempo de operação = 14 dias Dador de eletrões: glucose	Triclosan	10	98	[69]
			Etinilestradiol	10	94	
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Lacase, MnP)	Frasco de Erlenmeyer (por partidas)	Inóculo= 2-3 mg pH=4,5 Temperatura= 28°C Tempo de operação = 14 dias Dador de eletrões: glucose	Triclosan	10	98	[69]
			Etinilestradiol	10	62	

### 2.5.3 PLEUROTUS OSTREATUS

O consumo de cogumelos faz parte da cultura humana desde há muitos milhares de anos. O seu cultivo normalmente requer pouco espaço e o seu crescimento é relativamente curto (15-30 dias de frutificação). Os últimos dados estatísticos mostram que mais de 100 países no mundo aumentaram a sua produção de cogumelos, atingindo 10,8 milhões de toneladas em 2016, sendo a China o maior produtor com mais de 70% da produção total [70].

Na Figura 2.4 encontram-se representados os países responsáveis pela maior produção de cogumelos no mundo.



**Figura 2.4** Distribuição percentual dos maiores produtores de cogumelos no mundo (adaptado de [71]).

O fungo *Pleurotus ostreatus* (cogumelo ostra ou hiratake) é um fungo comestível que pertence ao grupo dos FPB. A sua produção foi descrita pela primeira vez no início do século XX e durante as últimas décadas tornou-se o segundo cogumelo comestível mais cultivado no mundo [72]. À escala industrial é cultivado em palha de cereais, principalmente em palha de trigo [73]. No entanto, é facilmente cultivado em vários tipos de substratos como palha de arroz, serragem, palha e espiga de milho, bagaço de cana-de-açúcar e talo de banana [74].

Os fungos cultivados fazem o ciclo natural da matéria orgânica e dos nutrientes, decompondo-os e produzindo cogumelos comestíveis. O resíduo orgânico em que os cogumelos são cultivados dá origem a um produto rico em carbono, denominado SMS, do inglês *spent mushroom substrate* [75]. O SMS é produzido em enormes quantidades no processo de produção de cogumelos. Estima-se que para produzir 1 kg de cogumelos, se gerem 5 kg de SMS [71].

Este substrato, se não for aproveitado para outras atividades, constitui um desperdício na produção de cogumelos. A sua aplicação tem-se demonstrado eficaz na remoção de micropoluentes no solo [71]. No entanto, apenas alguns estudos testaram a utilização direta de SMS no tratamento de águas contaminadas [15].

A sua utilização pode ser uma mais-valia em termos económicos e ambientais, uma vez que pode substituir a utilização de enzimas purificadas e permite o aproveitamento de um desperdício resultante da produção de cogumelos, integrando a lógica de economia circular [15].

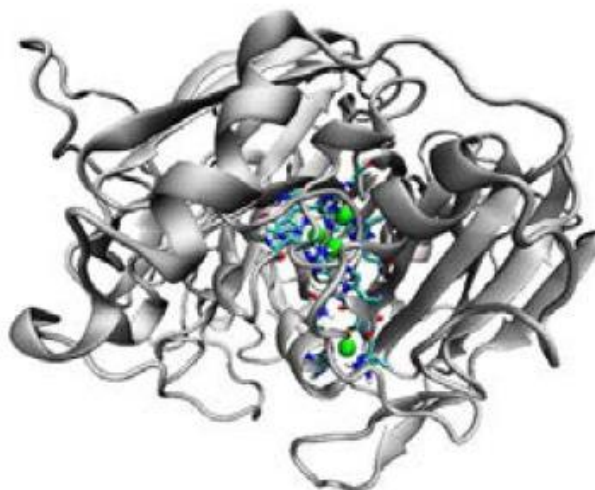
O fungo *P. ostreatus* é um decompositor natural da madeira e no seu processo de decomposição ocorrem reações de oxidação e hidrólise [72]. As hidrolases são responsáveis pela degradação dos polissacarídeos e os enzimas extracelulares oxidativos degradam a lenhina e compostos fenólicos [76].

Várias espécies (p.e. *Pleurotus* spp) produzem MnP, VP e lacase, mas não produzem LiP [50]. Em específico, *Pleurotus ostreatus* apresenta uma evidente predominância na produção de lacase, relativamente a outros enzimas lenhólíticos, quando é cultivado em substratos lenhocelulósicos [15].

Devido ao seu sistema enzimático não específico, *P. ostreatus* tem sido alvo de investigação e tem-se mostrado eficaz em vários processos biotecnológicos, em específico, na degradação de compostos xenobióticos como HAP, fármacos e corantes industriais [50]. Além disso, existem estudos que mostram que *P. ostreatus* é eficiente na biorremediação de águas residuais, em particular, na remoção de vários antidepressivos como sertralina, paroxetina e fluoxetina [77].

## 2.5.4 LACASE

As lacases (Figura 2.5) (benzenodiol: oxidorreduções de oxigénio, EC 1.10.3.2) são fenol oxidases, enzimas multicobre que pertencem ao grupo das oxidases de cobre azul [78].



**Figura 2.5** Representação da lacase produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus*, isoforma POXC [79].

As lacases são encontradas na natureza em plantas, fungos, bactérias e insetos, sendo os fungos os produtores que mais se destacam, em particular os Basidiomycetes e Ascomycetes [79, 80]. Além de estarem envolvidas na degradação da lenhina, participam também em diversas funções como pigmentação, patogenicidade, frutificação, esporulação e desintoxicação [81]. Os maiores produtores de lacase são os FPB, como *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Cerena maxima*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatus* [82].

A nível estrutural, a lacase consiste numa sequência de polipéptidos com cerca de 500 resíduos de aminoácidos ligados a sacarídeos [57]. Os sacarídeos representam entre 10-25% da sua constituição e incluem glucose, manose, galactose, fucose e arabinose [82]. A glicosilação da lacase é responsável por processos como retenção de cobre e estabilidade térmica. O seu peso molecular varia entre os 50-100 kDa e o seu pH ótimo está entre 3,0 e 5,7 [80, 81].

A presença de isoenzimas foi detetada em quase todos os FPB. O número de isoformas produzidas pelos fungos depende de cada espécie, e diferentes isoenzimas apresentam variações na estabilidade, condições ótimas de pH e temperatura e na afinidade com o substrato [80]. O fungo *P. ostreatus* produz, pelo menos, oito diferentes isoformas da lacase, POXC, POXA2, POXB1, POXB2, POXA1b, POXA1w, POXA3a e POXA3b, sendo a POXC a que é produzida em maior abundância [50, 83].

Na Tabela 2.3 apresentam-se as características de algumas isoformas da lacase.

**Tabela 2.3** Características de várias isoformas da lacase produzidas pelo fungo *Pleurotus ostreatus* [84].

Isoforma	Massa molecular (KDa)	pH ótimo <sup>1</sup>	Temperatura ótima (°C)
POXA1b	62	4,5	
POXA1w	61	3,0-5,0	45-65
POXA2	67	6,5	25-35
POXA3a	83-85	5,5	35
POXA3b	83-85	5,5	35
POXC	59	3,0-5,0	50-60

As lacases catalisam a redução de oxigénio a água, acompanhado pela oxidação de um substrato, tipicamente um fenol p-dihidroxil ou outro composto fenólico. [83]. A maioria das lacases são extracelulares, no entanto, as lacases dos FPB são também encontradas intracelularmente [83].

As lacases fúngicas são catalisadores “verdes” e ideais porque apenas precisam de ar como fonte de oxigénio e produzem água como subproduto. Além disso, apresentam um grande potencial biotecnológico devido à baixa especificidade de substrato, conseguindo degradar uma grande variedade de compostos orgânicos, fenólicos e não fenólicos. [80].

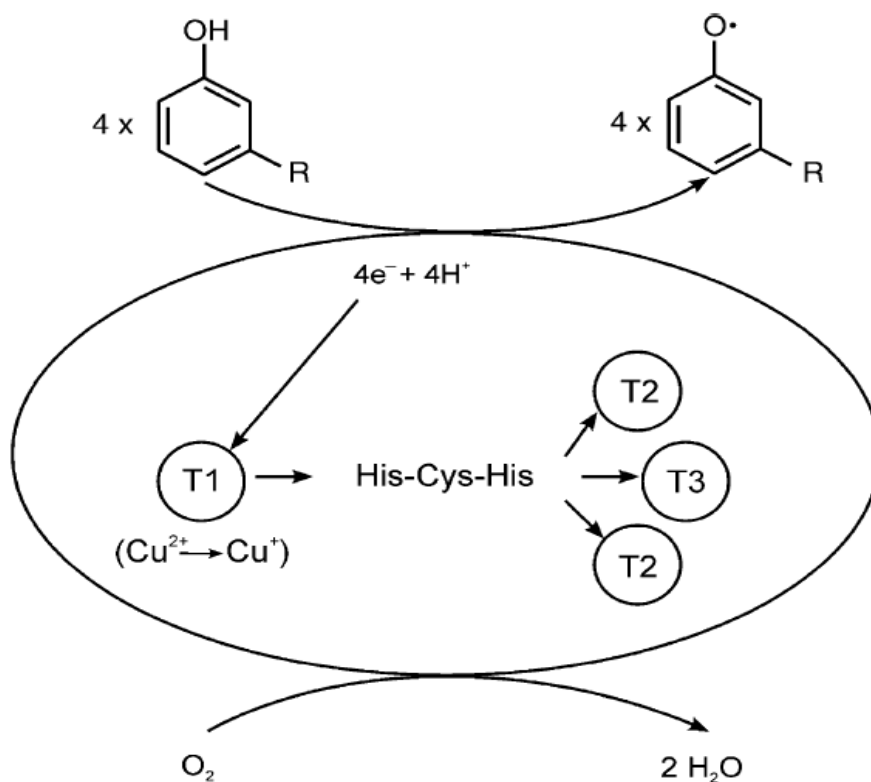
---

<sup>1</sup> Os valores ótimos de pH foram determinados através da oxidação de 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP).

### 2.5.4.1 Mecanismo catalítico da lacase (EC 1.10.3.2)

A oxidação de um substrato através da ação da lacase envolve, normalmente, a perda de um elétron e a formação de um radical livre. Uma vez que os radicais são instáveis, podem sofrer outra oxidação catalisada pela lacase ou passar por reações não enzimáticas [82].

As oxidases de cobre azul são caracterizadas pela existência de pelo menos um cobre tipo I (T1), juntamente com pelo menos três íons cobre adicionais: tipo II (T2) e tipo III (T3), arranjados num *cluster* trinuclear [83]. Na Figura 2.6 está representado o ciclo catalítico da lacase.



**Figura 2.6** Ciclo catalítico da lacase [84].

Tal como ilustra a Figura 2.6 a ação catalítica da lacase inicia-se com a oxidação do substrato pelo cobre T1. De seguida, os elétrons extraídos são transferidos para o cobre T2 e T3, onde ocorre a redução de oxigênio molecular a água [48, 82].

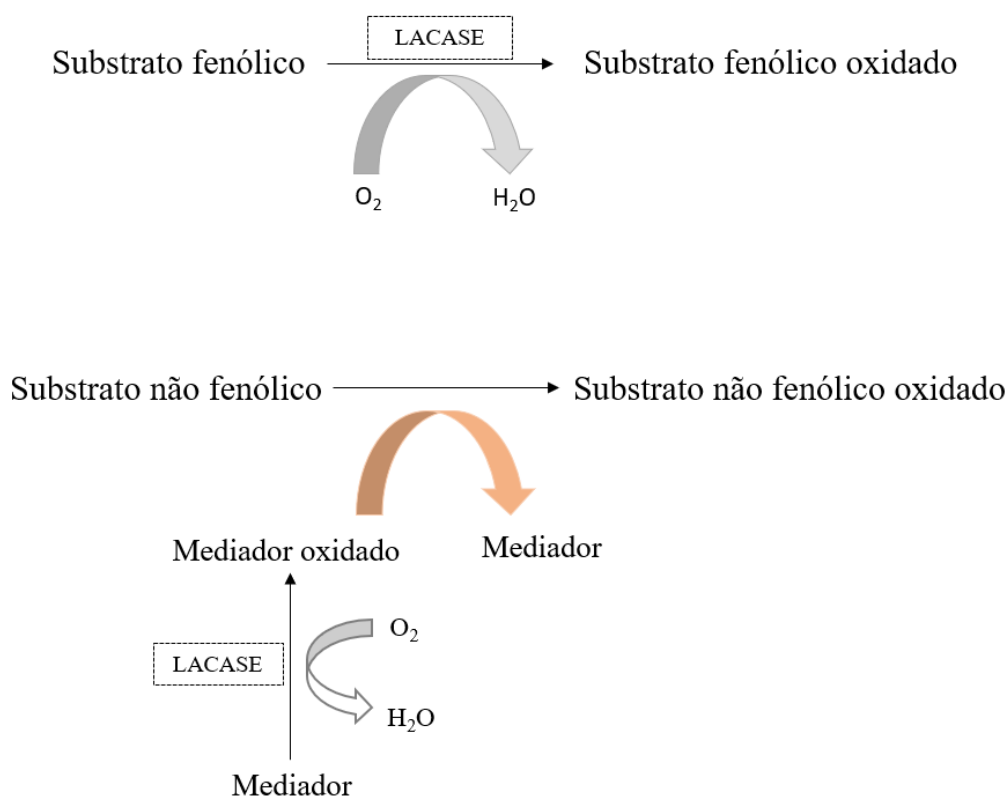
Normalmente, as lacases atuam em compostos fenólicos como difenóis, polifenóis, fenóis substituídos e ainda aminas aromáticas e tióis de benzeno [80].

### 2.5.4.2 Mediadores

As lacases não conseguem oxidar diretamente todo o tipo de substratos, quer seja pelo grande tamanho do substrato, que impossibilita a introdução no centro ativo, quer seja pelo seu potencial redox [48]. No entanto, são capazes de oxidar compostos não fenólicos quando se encontram na presença de compostos de baixo peso molecular, que atuam como mediadores [84].

Os mediadores da lacase são, geralmente, compostos de baixo peso molecular, solúveis em água e com alto potencial redox, que atuam como intermediário de elétrons entre o enzima e outros compostos [80].

As oxidases, em particular a lacase, conseguem oxidar pequenos compostos químicos, levando à formação de radicais. Os radicais, por sua vez, atuam como mediadores redox oxidando compostos que não seriam oxidados diretamente [57]. Na Figura 2.7 está ilustrada a oxidação resultante da ação catalítica da lacase, atuando no substrato direta e indiretamente (por via de mediadores).



**Figura 2.7** Mecanismo catalítico da lacase com e sem mediador (adaptado de [85]).

Tal como é possível observar na Figura 2.7, existem dois mecanismos de atuação da lacase. O enzima pode oxidar diretamente um substrato e neste caso, tal como foi dito anteriormente, o cobre presente no centro ativo do enzima transfere os elétrões do substrato para o oxigénio, resultando num produto oxidado e na redução do oxigénio, de oxigénio molecular a água [86].

Quando um mediador está presente, este pode ser oxidado pelo enzima, originando radicais livres que se conseguem difundir para sítios afastados do centro ativo e oxidar outros substratos presentes no ambiente, que podem ou não ser um substrato típico da lacase, alargando a atividade enzimática a poluentes menos comuns [80]. Desta forma, resulta um ou vários produtos oxidados e a regeneração do mediador [86].

Alguns mediadores naturais podem ser encontrados na madeira ou produzidos pelos FPB durante a sua degradação. Alguns exemplos de mediadores naturais da lacase são o ácido 4-hidroxibenzoico, vanilina, apocinina (acetovanilona), sirangaldeído, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido sinápico [80].

Além destes, existem mediadores sintéticos que incluem ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico (ABTS) e 1-hidroxibenzotriazol (HBT) [22]. Os mediadores naturais apresentam mais vantagens do ponto de vista económico e ambiental, comparativamente aos mediadores artificiais [87].

Idealmente, um mediador deve ser um composto de pequeno tamanho, capaz de gerar radicais que não inativem o enzima, e que sejam reutilizáveis sem se degenerarem [87]. Apesar de se verificar a sua eficácia, a adição de um mediador pode causar toxicidade e a inativação da lacase [22].

#### **2.5.4.3 Produção de lacase**

As lacases são altamente não específicas relativamente ao seu substrato. Por esse motivo, apresentam um grande potencial para serem aplicadas em vários processos industriais, sendo utilizadas na indústria alimentar, indústria de pasta e papel, indústria têxtil e, mais recentemente têm sido utilizadas no desenvolvimento de biossensores e processos de biorremediação [88].

Os FPB são os organismos que conseguem produzir lacase em maior quantidade. A otimização das condições de cultivo é essencial para uma produção eficiente, com o objetivo de obter grandes quantidades ao menor custo possível [89].

A produção de lacase em biorreator pode ser feita através da fermentação em estado sólido ou fermentação submersa. Os principais fatores que influenciam a produção de lacase são [85]:

- Concentração de inóculo,
- Composição do meio de cultura,
- Concentração e proporções relativas de carbono e nitrogénio,
- pH, temperatura, taxa de arejamento e agitação do meio,
- Presença de indutores,
- Ausência de inibidores.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

O 2,6-DMP (99%) e o inibidor 1-aminobenzotriazol (1-ABT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

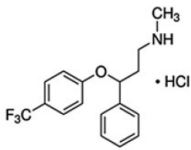
Utilizou-se o tampão universal de Britton-Robinson (pH de 2 a 12). Foi preparado utilizando ácido acético (0,1 M), ácido fosfórico (0,1 M) e ácido bórico (0,1 M). O pH final foi ajustado com a adição de hidróxido de sódio (0,5 M) [90].

O ácido fosfórico (85%, massa volúmica 1,70 kg/L) foi obtido a partir da Panreac Quimica (Barcelona, Espanha). O ácido bórico (100%) foi obtido da VWR Chemicals BDH Prolabo (Pa, EUA). O ácido acético glacial (99,5-100%, densidade (20 °C) = 1,0521) foi adquirido da Carlo Erba Reagents. O hidróxido de sódio (>99%) foi adquirido da labkem (Barcelona, Espanha).

O tampão acetato foi preparado com acetato de sódio anidro ( $\geq 99\%$ ) da Sigma-Aldrich (EUA) e ácido acético glacial ( $\geq 99,8\%$ ) da Carlo Erba (Espanha).

O hidrocloreto de fluoxetina (>98%) foi adquirida do Sigma-Aldrich (Alemanha) e as suas características estão especificadas na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** Características físico-químicas da fluoxetina (na forma de hidrocloreto) [91].

Fármaco	Estrutura	MM (g/mol)	Solubilidade em água (mg/L)	Log $K_{ow}$	pKa
Hidrocloreto de fluoxetina (C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO·HCl)		345,79	4000	4,17	9,8

MM: massa molar; Ka: contante de acidez/dissociação ácida;  $K_{ow}$ : coeficiente de partição de octanol-água

#### 3.2 BIOMATERIAL

O fungo utilizado neste trabalho foi a estirpe M2191 de *Pleurotus ostreatus* (Mycelia BVBA, Bélgica). O inóculo foi produzido em grãos de centeio e para o seu cultivo foi utilizado um substrato à base de serradura de amieiro (73% m/m, em base seca), farelo de trigo (25% m/m, em base seca) e sulfato de cálcio (2% m/m, em base seca), com um teor de humidade de 65%. Antes da inoculação, o substrato foi embalado

em sacos permeáveis (Sac O2, Nevele, Bélgica) e pasteurizado a 65 °C, durante 6 h. Após o arrefecimento, adicionou-se o inóculo numa concentração de 10% (m/m seco/peso seco). O conjunto do substrato mais inóculo foi incubado a 22 °C até serem densamente colonizados pelo micélio (14 dias). O substrato colonizado foi armazenado a 10 °C durante 11 dias e deixados à temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C), durante 1 dia, antes dos ensaios experimentais [92].

### **3.3 ENSAIOS REALIZADOS EM SISTEMA FECHADO**

Para os ensaios com o substrato colonizado e com os extratos enzimáticos foram utilizados matrizes de 250 mL. Os ensaios foram realizados em duplicado durante 1 h à temperatura ambiente, sob agitação a 100 rpm (MULTISTIRRER, Magnetic Stirrer, VELP científica). Registaram-se os valores de pH (Consort, C861, Bélgica) e temperatura no início e no final de cada ensaio. Os ensaios com substrato colonizado foram realizados a pH 7, tendo em conta a gama de pH esperado em águas residuais após tratamento secundário numa ETAR (6,5-7,5) [93]. Simultaneamente aos ensaios de biorremocção, realizou-se um branco contendo solução tampão e fluoxetina, de modo a subtrair a sua absorvância na determinação da atividade enzimática.

- **Ensaio com substrato colonizado**

Para avaliar a remoção global de fluoxetina (Figura 3.1), pesou-se 50 g de substrato colonizado (balança Mettler Toledo, NewClassic MF, MS 205DU, Suíça). De seguida, adicionou-se 140 mL de tampão Britton-Robinson a pH 7 e 10 mL de solução aquosa de fluoxetina (9000 µg/L). Retiraram-se amostras no instante 0 min e, posteriormente, de 10 em 10 min, até se completarem 60 min de reação, para a quantificação do fármaco e determinação da atividade enzimática.



**Figura 3.1** Ensaio com substrato colonizado.

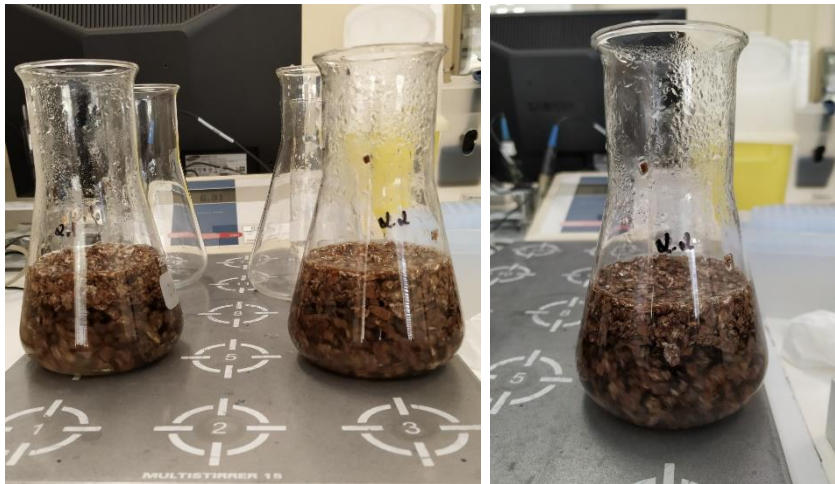
Foram realizados dois ensaios de remoção geral utilizando substrato colonizado. As diferenças entre os ensaios estão especificadas na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** Informação dos ensaios realizados com substrato colonizado.

	Data de realização	Tempo decorrido após chegada do substrato (dias)
Ensaio 1	9/06/2021	1
Ensaio 2	23/06/2021	15

- **Ensaio com o substrato colonizado autoclavado**

Neste ensaio pesou-se 50 g de substrato colonizado em cada matraz de 250 mL e fez-se a sua esterilização em autoclave durante 30 min a 120 °C (AJC, Uniclave 88, Portugal). Depois de arrefecer, adicionou-se a cada um 140 mL de solução tampão a pH 7 e 10 mL de solução aquosa de fluoxetina (9000 µg/L), tal como ilustrado na Figura 3.2. Retiraram-se amostras no instante 0 min e, posteriormente, de 10 em 10 min para quantificação de fluoxetina e determinação da atividade enzimática.



**Figura 3.2** Ensaio com substrato colonizado autoclavado.

- **Ensaio com o substrato colonizado, com adição de 1-ABT**

Inicialmente, preparou-se uma solução de 1-ABT (14 mM) em solução tampão a pH 7. De seguida, pesou-se 50 g de substrato colonizado em matrizes de 250 mL, adicionou-se 130 mL de solução tampão (pH 7) e 10 mL de solução de 1-ABT (1 mM) e deixou-se atuar durante, pelo menos, 30 min. Colocaram-se os dois matrizes sob agitação e iniciou-se o ensaio após a adição de 10 mL de solução aquosa de fluoxetina (9000 ppb). Retiraram-se amostras no instante 0 min e, posteriormente, de 10 em 10 min, até se completarem 60 min de reação, para a quantificação do fármaco e determinação da atividade enzimática.

- **Ensaio com extratos enzimáticos**

Os ensaios de remoção de fluoxetina com extratos enzimáticos foram realizados a pH 6 e 7, tendo em conta os valores da gama permitida para descarga de águas residuais tratadas (Decreto-Lei 236/98) [94] e o valor esperado após o tratamento secundário de águas residuais numa ETAR [93]. Para obtenção dos extratos enzimáticos, em matrizes de 500 mL, pesou-se 150 g de substrato colonizado e adicionou-se 450 mL de solução tampão (para cada um dos diferentes valores de pH). Os matrizes foram mantidos durante, pelo menos, 2 h a 5 °C, mediante agitação periódica (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Extração enzimática a partir do substrato colonizado.

De seguida, procedeu-se à centrifugação das soluções a 9000 x g durante 8 min. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram separados e usados como extratos enzimáticos.

Num matraz de 250 mL colocou-se 140 mL de cada extrato enzimático e adicionou-se 10 mL de solução aquosa de fluoxetina 9000  $\mu\text{g/L}$  (Figura 3.4). Retiraram-se amostras no instante 0 min e, posteriormente, de 10 em 10 min, até se completarem 60 min de reação, para a quantificação do fármaco e determinação da atividade enzimática.

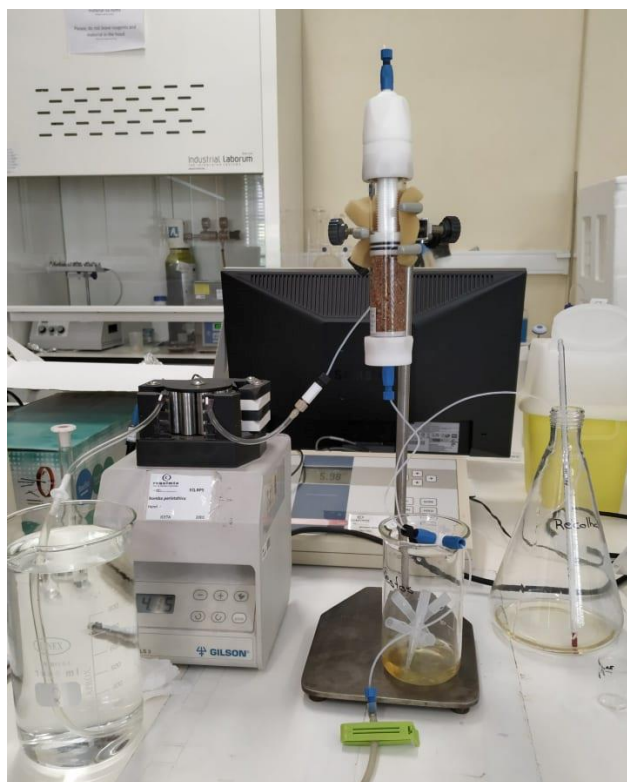


**Figura 3.4** Ensaio com extratos enzimáticos.

### 3.4 ENSAIO EM COLUNA

Para este ensaio, utilizou-se uma coluna de leito fixo (Omnifit), ilustrada na Figura 3.5. Preparou-se 1000 mL de uma solução de fluoxetina em tampão de pH 7 com a concentração final de 600  $\mu\text{g/L}$ . Tal como nos ensaios em matraz, o valor de pH foi escolhido tendo em conta a gama de valores esperados em águas residuais após tratamento secundário.

Previamente, ajustou-se o caudal da bomba peristáltica (Gilson, Minipuls 3) para 2 mL/min. De seguida, preencheu-se a coluna com substrato colonizado (12,10 g, humidade  $69,93 \pm 0,01\%$ ) e deu-se início ao ensaio experimental. O ensaio ocorreu durante 8 h, à temperatura ambiente, e recolheram-se amostras de 10 em 10, até completar 120 min de ensaio, e de 15 em 15 min, até ao final do ensaio, para quantificação da fluoxetina e determinação da atividade enzimática. Periodicamente, avaliou-se o caudal debitado pela bomba peristáltica.



**Figura 3.5** Ensaio em coluna.

Na Tabela 3.3 encontram-se as características da coluna utilizada e alguns parâmetros determinados a partir do ensaio.

**Tabela 3.3** Características da coluna e condições experimentais do ensaio.

Altura (cm)	15
Diâmetro (cm)	3
Área (m <sup>2</sup> )	7,07x10 <sup>-4</sup>
Massa substrato colonizado (g)	12,10
EBRT (min)	0,014
Caudal volúmico (mL/min)	2,98
Caudal hidráulico (m <sup>3</sup> /(min.m <sup>2</sup> ))	4,21x10 <sup>-3</sup>

### 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.5.1 DETERMINAÇÃO DA HUMIDADE DO SUBSTRATO

Para a determinação da humidade do substrato colonizado, começou-se por pesar 3 vidros de relógio secos na estufa (Selecta P, 2000208, Espanha) a 100 °C durante 24 h. De seguida, pesou-se 50 g de substrato colonizado em cada um dos vidros de relógio e colocou-se a secar na estufa a 100 °C durante 24 h. No final, foram colocados 2 h no exsiccador, registou-se o peso do conjunto vidro de relógio e substrato e determinou-se o seu peso seco e respetiva humidade (Anexo A).

#### 3.5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LACASE

A atividade enzimática da lacase foi determinada através da deteção do produto da oxidação do 2,6-DMP, tal como descrito por Parenti *et al.* A mistura reacional continha 450 µL de amostra contendo o enzima ou extrato enzimático e 500 µL de 2,6-DMP (10 mM) em tampão acetato (100 mM, pH 5). A absorvância foi lida e registada após 1 min de reação à temperatura ambiente utilizando um espectrofotómetro (JENWAY, 6405 UV/Vis) [95]. A atividade enzimática foi expressa em unidades de atividade enzimática (U), que corresponde à quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 µmol de 2,6-DMP por minuto (µmol/min), por 1 L de mistura reacional (U/L).

É de notar que em todos os ensaios, na recolha das amostras para quantificação de fluoxetina, adicionou-se previamente 40 µL de NaOH (2 M) a cada vial de modo a parar a atividade enzimática.

As atividades enzimáticas foram calculadas de acordo com a equação 3.1:

$$\textit{Atividade enzimática (U/L)} = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \cdot \frac{Vr}{\varepsilon \cdot l \cdot Vs} \cdot 10^6 \quad (3.1)$$

Em que  $\frac{\Delta Abs}{\Delta t}$  é a mudança na absorvância por minuto,  $Vr$  (µL) é o volume de mistura reacional,  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção molar do 2,6-DMP (49600 M/cm),  $l$  é o percurso ótico da cuvete (1 cm) e  $Vs$  (µL) é o volume de amostra que contém o enzima ou extrato enzimático (Anexo F).

### 3.5.3 QUANTIFICAÇÃO DA FLUOXETINA POR HPLC

A quantidade de fluoxetina foi determinada através de análise por cromatografia líquida de alta performance com detetor de fluorescência (HPLC-FLD) utilizando o cromatógrafo Shimadzu LC (Shimadzu Corporation, Japão) equipado com uma bomba LC 20AD, um desgaseificador DGU-20A 5R, um forno 10AS VP, um injetor automático SIL-20A HT e um detetor de fluorescência RF-20A-XS. Para a separação cromatográfica, utilizou-se a coluna Luna C18 (150 x 4,6 mm, com tamanho de partícula 5 µm). A fase móvel foi constituída por uma solução de 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura (eluente A) e acetonitrilo (eluente B).

O programa cromatográfico começou com um gradiente de 10 a 100% (eluente B) em 5 minutos, mantida a 100% (eluente B) durante 4 minutos e depois o eluente B diminuiu de 100 para 10% em 1 minuto e foi mantido durante 6 minutos a 10%. O tempo total de análise cromatográfica foi 16 minutos. O caudal de fase móvel foi definido como 1,0 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL. Os comprimentos de onda de excitação/emissão utilizados na deteção de fluorescência foram 230 e 290 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicado. A aquisição de dados foi realizada usando LC Solutions Lite, versão de software 5.82 (Shimadzu Corporation, Japão).

Foi preparada uma solução stock de hidrocloreto de fluoxetina (1300 mg/L) em metanol e armazenada a -20 °C num vial de vidro escuro. Para a análise HPLC, todas as

soluções foram preparadas com água de alto grau de pureza (resistividade 18,2 MΩ/cm) obtida a partir do sistema Simplicity 185 (Milipore, Molsheim, França).

A identificação da fluoxetina foi feita com base no seu tempo de retenção, comparativamente a uma solução padrão. A quantificação foi realizada utilizando curvas de calibração para diferentes valores de pH. Estabeleceu-se uma relação linear entre a área do pico e a concentração de fluoxetina, [FLX] no intervalo de 1-2000 µg/L, de acordo com as equações apresentadas na Tabela 3.4.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), foram determinados com base na relação sinal-ruído, utilizando a resposta analítica de 3 e 10 vezes o ruído de fundo, respectivamente.

**Tabela 3.4** Informações das curvas de calibração da FLX para diferentes valores de pH.

pH	Parâmetros da curva de calibração	$R^2$	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
6	$\text{Área pico} = (121,0 \pm 0,7) \times [FLX] + (213 \pm 154)$	0,9998	7,8	26,1
7	$\text{Área pico} = (109,6 \pm 0,4) \times [FLX] + (-61 \pm 87)$	0,99996	4,6	15,3

A eficiência de remoção de fluoxetina foi calculada de acordo com a equação 3.2:

$$\text{Remoção (\%)} = \left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right) \times 100 \quad (3.2)$$

Em que  $C_0$  (µg/L) corresponde à concentração inicial e  $C_t$  (µg/L) à concentração de fármaco no instante de tempo t (anexo G).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ENSAIOS REALIZADOS EM SISTEMA FECHADO

Realizaram-se ensaios com substrato colonizado, extratos enzimáticos e um ensaio em branco com solução tampão e fluoxetina, onde se verificou que a sua concentração variava sem que houvesse qualquer tipo de reação a decorrer. Ao final de 1 h, a remoção abiótica de fluoxetina foi cerca de 8%, sugerindo potenciais interações do fármaco com o meio. É de salientar que a remoção de fluoxetina nos ensaios foi calculada considerando a remoção abiótica verificada no ensaio em branco.

No início e no final de cada ensaio, registou-se o valor de pH e temperatura (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1** Valores de pH e temperatura no início e no final de cada ensaio realizado em sistema fechado.

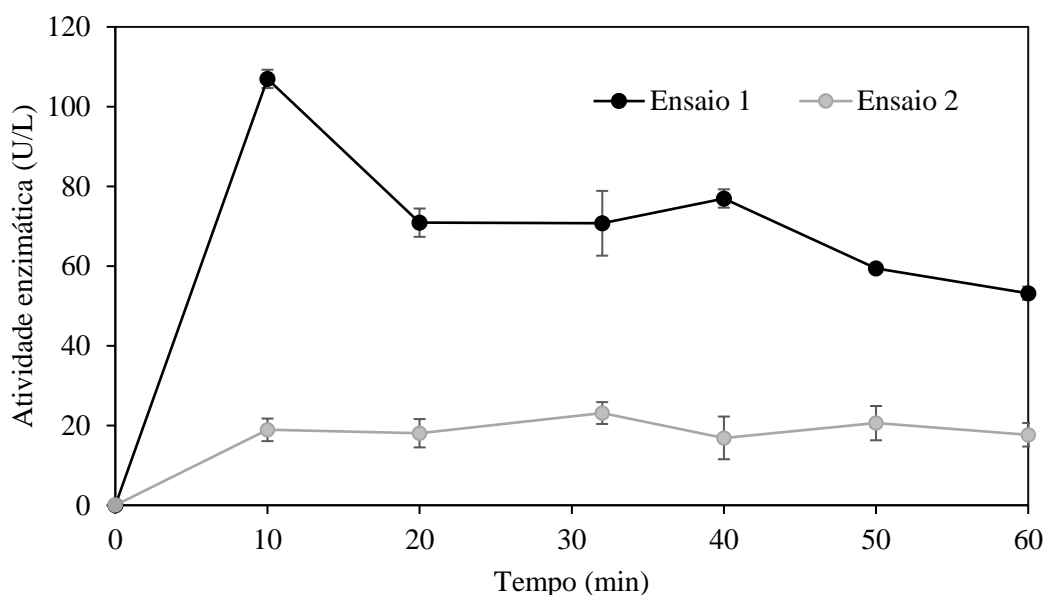
Ensaio			pH		Temperatura (°C)	
			Inicial	Final	Inicial	Final
Sistema fechado	Substrato colonizado	Ensaio 1	6,8	6,7	22,0	24,0
		Ensaio 2	7,0	6,7	20,0	24,0
		Autoclavado	6,9	6,5	24,0	25,0
		Com inibidor	6,7	6,7	23,0	24,0
	Extratos enzimáticos	pH 6	6,0	6,0	23,8	23,8
		pH 7	6,7	6,7	24,5	24,5

De modo a identificar os mecanismos envolvidos no processo de remoção de fluoxetina, foram realizados vários ensaios em sistema fechado, nomeadamente ensaios com substrato colonizado, ensaio com substrato colonizado autoclavado e ensaio com substrato colonizado, com adição de 1-ABT.

### 4.1.1 ENSAIOS REALIZADOS COM SUBSTRATO COLONIZADO

Neste ensaio, utilizou-se substrato colonizado de modo a avaliar a remoção global de fluoxetina, sem qualquer tratamento do biomaterial em estudo.

A Figura 4.1 mostra a variação da atividade enzimática da lacase (U/L) ao longo do tempo para ambos os ensaios.



**Figura 4.1** Variação da atividade enzimática ao longo dos ensaios com substrato colonizado.

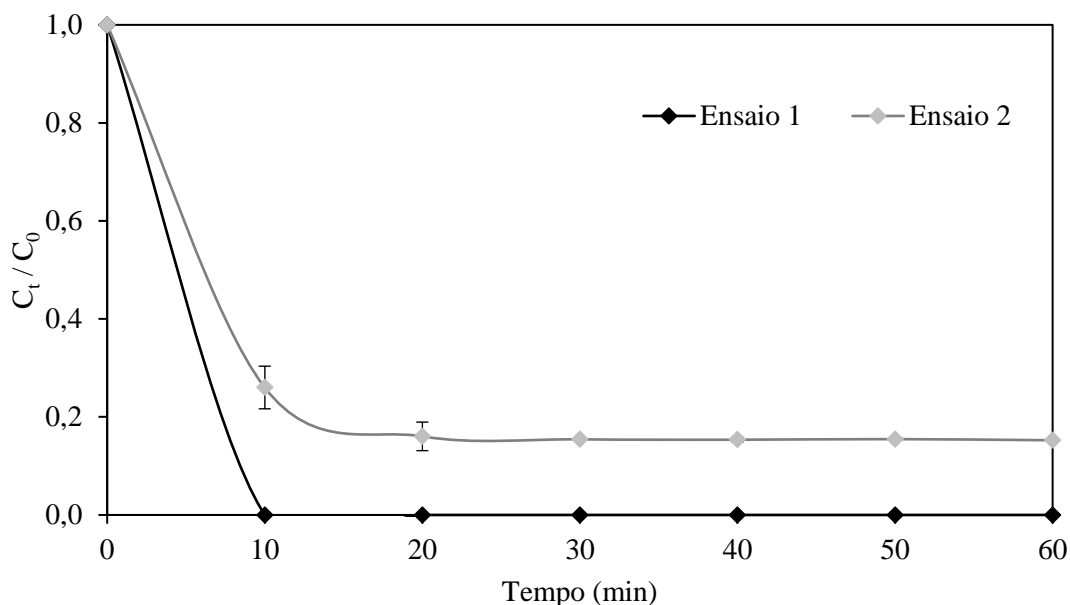
Através da análise do gráfico da Figura 4.1, é possível verificar que houve uma diferença de atividade enzimática entre os ensaios. Mais concretamente, a atividade média da lacase foi  $73 \text{ U/L} \pm 2,60$  e  $19,2 \text{ U/L} \pm 3,11$  para o ensaio 1 e 2, respetivamente.

Tal como está descrito na Tabela 3.2, o ensaio 1 e 2 foram realizados em datas diferentes e, por isso, o decréscimo da atividade enzimática no ensaio 2 pode ser explicado tendo em conta o tempo decorrido entre ensaios.

De acordo com um estudo feito por Hultberg *et al.*, utilizando *P. ostreatus* colonizado num substrato constituído essencialmente por serradura, a atividade máxima da lacase corresponde à fase do início de frutificação, isto é, da produção de corpos frutíferos (cogumelos) [15]. A partir desse momento, espera-se uma diminuição gradual da atividade enzimática que corresponde ao período de crescimento. Desta forma, entende-se que o ensaio 1 corresponde ao momento em que se inicia a frutificação e por isso apresenta uma elevada atividade enzimática, comparativamente com o ensaio 2.

Além disso, os autores referem que os resultados obtidos sugerem a influência do estado fisiológico do fungo na exsudação de lacases e que a enzima desempenha uma função importante no crescimento do micélio e na aquisição de nutrientes antes da produção de corpos de frutificação [15]. Esta explicação está de acordo com outros estudos disponíveis na literatura [96, 97].

Na Figura 4.2 é possível observar a remoção de fluoxetina no ensaio 1 no ensaio 2.



**Figura 4.2** Concentração relativa de fluoxetina ao longo dos ensaios com substrato colonizado.

No ensaio 1 atingiu-se a remoção total de fármaco (pelo menos até níveis quantificáveis) nos primeiros 10 min de experiência. Pelo contrário, no ensaio 2 a remoção média foi de 84,9%, ligeiramente inferior comparando com o ensaio 1. Esta diferença pode estar relacionada com o decréscimo da atividade enzimática (Figura 4.1), tendo em conta que o único fator que variou foi o tempo decorrido entre a utilização do substrato colonizado. Estes dados sugerem que a remoção do fármaco se relaciona diretamente com a atividade enzimática e estão de acordo com os dados disponíveis na literatura [15].

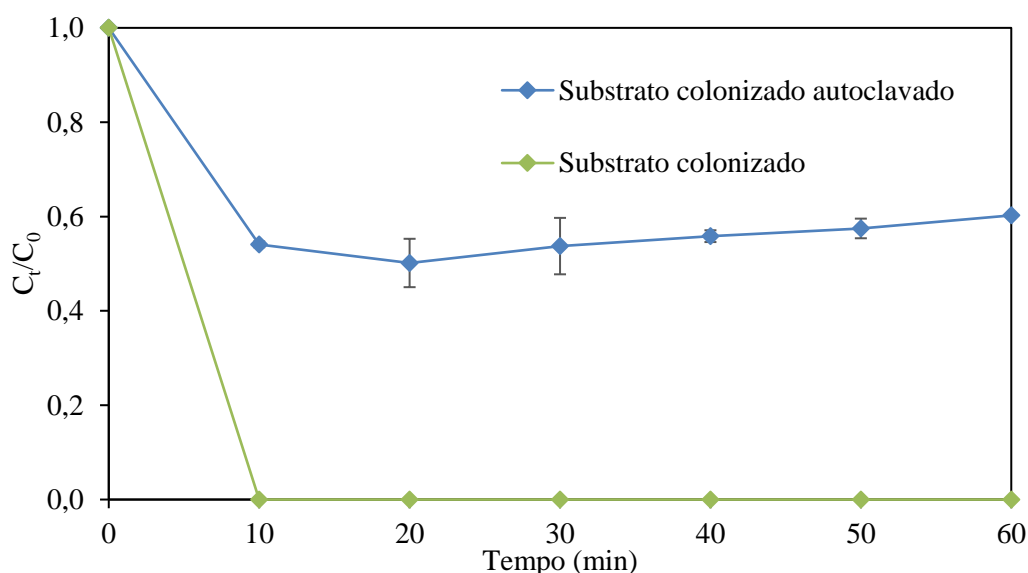
A utilização de SMS colonizado por FPB tem-se mostrado eficaz na remoção de vários contaminantes emergentes [98]. Chang *et al.*, estudaram a remoção de paracetamol com SMS colonizado por *P. ostreatus*, atingindo cerca de 90% de remoção ao final de 48 h [98].

Córdova Juárez *et al.*, utilizaram SMS colonizado com *P. pulmonarius* para o tratamento de águas residuais contendo clorotalonil e alcançaram 100% da remoção após 45 min de reação [99].

Na presente dissertação a remoção total foi atingida 10 min após o início do ensaio, o que é considerado um curto período de tempo comparativamente aos estudos citados anteriormente. Hurtberg *et al.*, obtiveram resultados semelhantes observando 80-90% de remoção do fármaco diclofenac (2 µg/L) após 5 min de ensaio com 200 g/L de SMS com *P. ostreatus* [15].

#### 4.1.2 ENSAIOS COM SUBSTRATO COLONIZADO AUTOCLAVADO

Para este ensaio, o substrato colonizado foi autoclavado previamente, de modo a inativar termicamente a sua atividade biológica e quantificar a contribuição do mecanismo de sorção do fármaco ao substrato colonizado. Verificou-se que a atividade enzimática determinada durante todo o ensaio foi nula. A razão entre a concentração no instante  $t$  e a concentração inicial de fluoxetina ao longo do tempo está ilustrada na Figura 4.3.



**Figura 4.3** Concentração relativa de fluoxetina no ensaio com substrato colonizado e substrato colonizado autoclavado.

Através da análise do gráfico da Figura 4.3, é possível observar a diferença na remoção de fluoxetina quando se utiliza substrato colonizado e substrato colonizado autoclavado. De modo geral, o ensaio com substrato autoclavado resultou numa remoção

de 44,7%, o que significa que essa terá sido a contribuição do mecanismo de sorção na remoção do fármaco.

Estes resultados estão de acordo com um estudo feito por Hultberg *et al.*, em que utilizaram SMS colonizado por *P. ostreatus* e SMS não colonizado e observaram uma remoção significativa dos fármacos bicalutamida (36%), lamotrigina (27%) e metformina (80%), atribuindo essa remoção ao contributo da adsorção dos compostos ao SMS [15].

A diferença de remoção para compostos diferentes sugere que a contribuição do mecanismo de sorção pode estar relacionada com as características do fármaco. A fluoxetina apresenta um coeficiente de partição de octanol-água ( $\text{Log } K_{ow}$ ) de 4,17, o que significa que possui um carácter hidrofóbico [100]. Além disso, a fluoxetina apresenta um valor de  $\text{pKa}$  de 9,8 (Tabela 3.1) e, por isso, a pH 7 apresenta uma carga predominantemente positiva. Seria esperado que dada a composição do substrato colonizado, rico em celulose, se apresentasse com carga predominantemente negativa, o que aumentaria a atração adsorvente/ adsorvato [101].

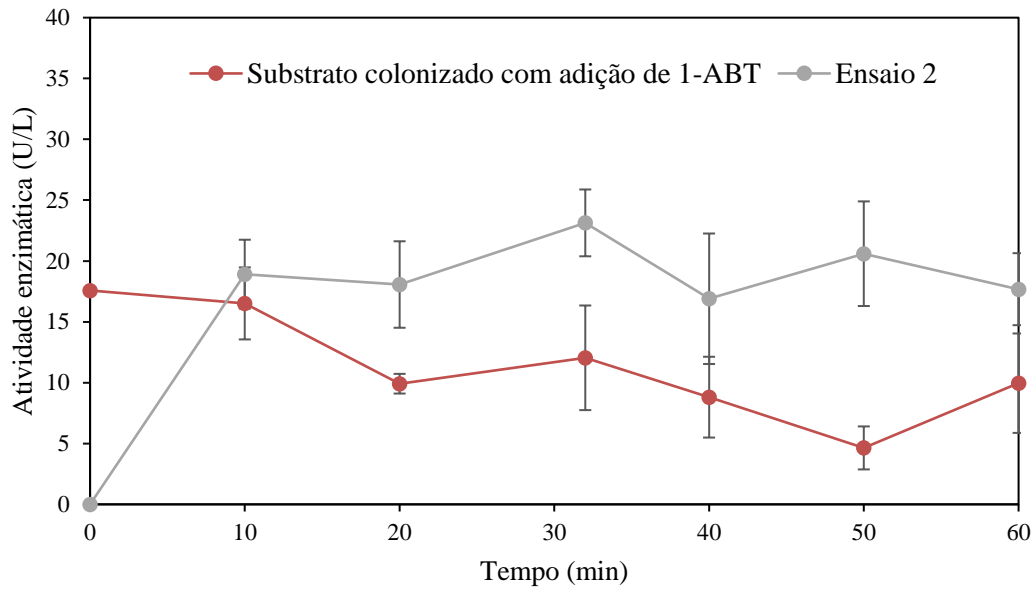
Segundo a literatura, o SMS é um adsorvente eficaz na remoção de fármacos, referindo que a capacidade de adsorção para diferentes compostos varia devido às diferenças nas suas estruturas químicas e salientam a influência do pH e da atração eletrostática [101].

#### **4.1.3 ENSAIOS COM SUBSTRATO COLONIZADO, COM ADIÇÃO DE 1-ABT**

O 1-ABT é um inibidor não específico e irreversível do citocromo P450 e é utilizado para avaliar a contribuição deste complexo enzimático intracelular na degradação de compostos xenobióticos [102]. Neste ensaio, utilizou-se substrato colonizado juntamente com 1-ABT de forma a inibir o mecanismo de degradação intracelular, esperando apenas a atuação da lacase e o fenómeno de sorção.

É de notar que este ensaio foi realizado 14 dias depois da chegada do substrato colonizado, ou seja, aproximadamente nas mesmas condições que o ensaio 2. Desta forma, estabelece-se a comparação entre estes dois ensaios, de modo a aferir sobre a contribuição da degradação intracelular na remoção de fluoxetina.

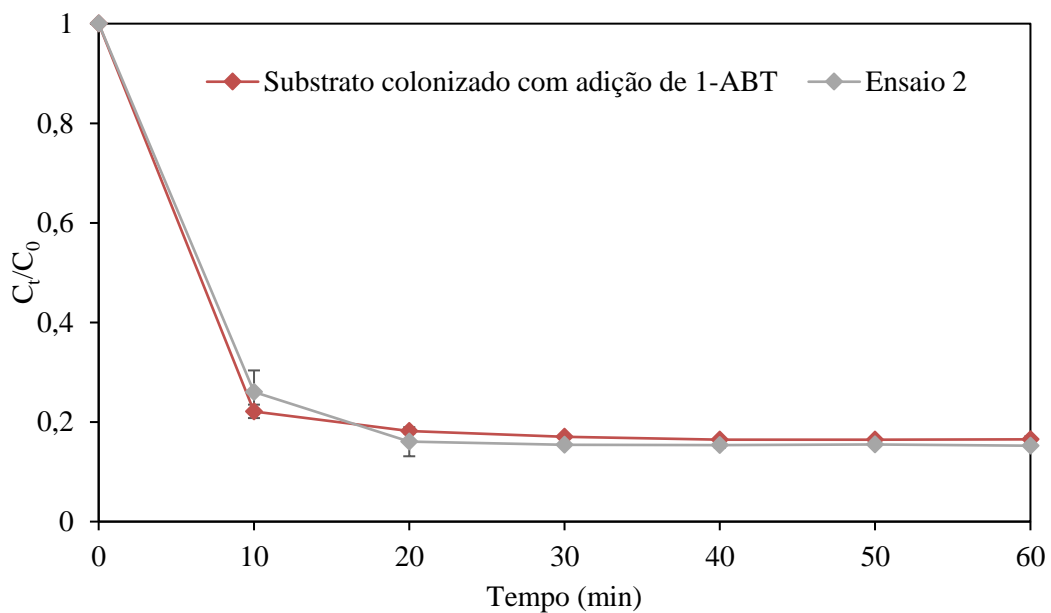
Na Figura 4.4 é possível observar a variação da atividade enzimática (U/L) ao longo do ensaio, comparativamente com o ensaio de remoção geral 2.



**Figura 4.4** Variação da atividade enzimática ao longo do ensaio com substrato colonizado com e sem a adição do inibidor 1-ABT.

Tendo em conta o que foi referido anteriormente acerca da influência do tempo na atividade enzimática do substrato colonizado, seria de esperar uma baixa atividade enzimática da lacase.

Na Figura 4.5 estabelece-se a comparação da remoção de fluoxetina entre o ensaio 2 e o ensaio com o inibidor do citocromo P450.



**Figura 4.5** Concentração relativa de fluoxetina no ensaio com substrato colonizado e com adição de inibidor 1-ABT.

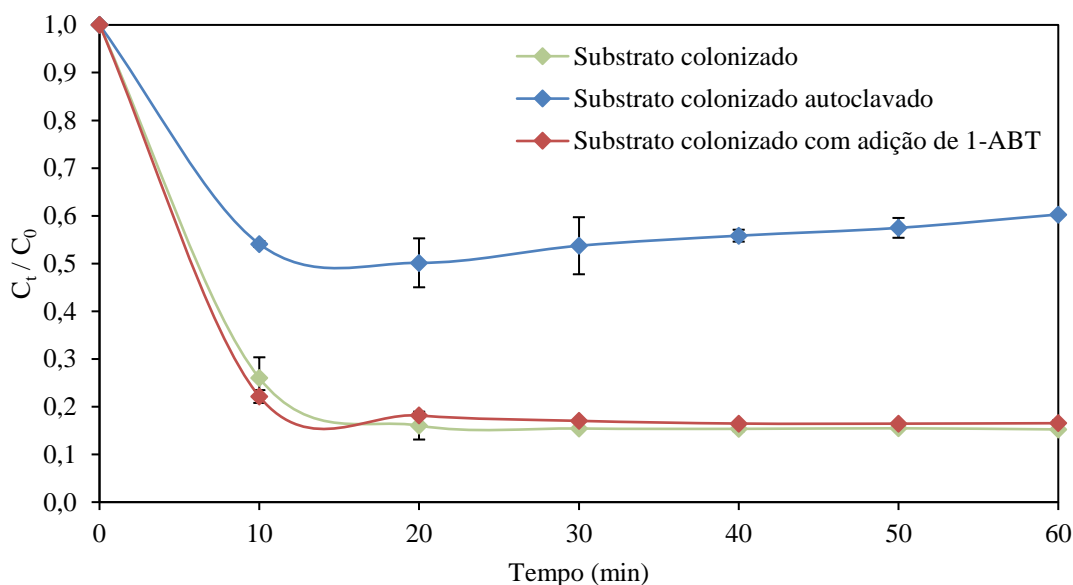
Tal como se pode observar no gráfico da Figura 4.5, a remoção de fluoxetina foi praticamente a mesma em ambos os ensaios, tendo ocorrido nos primeiros 10 min de experiência.

Na literatura existem vários estudos que destacam o papel de enzimas associadas ao micélio e do sistema intracelular CP450 na degradação de compostos farmacêuticos [59, 103].

Tal como foi dito anteriormente, a remoção de fluoxetina nos ensaios com e sem a adição do inibidor 1-ABT foi muito semelhante (83,1% e 84,9%, respetivamente). Estes valores sugerem que a degradação intracelular pelo citocromo P450 não teve relevância na degradação de fluoxetina. Isto pode dever-se ao facto dos enzimas do citocromo P450 estarem associadas ao micélio [104]. No entanto, neste caso utilizou-se substrato colonizado cujo micélio estava ainda numa fase de desenvolvimento inicial.

#### 4.1.4 COMPARAÇÃO DOS ENSAIOS REALIZADOS COM SUBSTRATO COLONIZADO

Na Figura 4.6 estabelece-se a comparação entre os ensaios realizados com substrato colonizado relativamente à remoção de fluoxetina.



**Figura 4.6** Concentração relativa de fluoxetina no ensaio com substrato colonizado (ensaio 2), substrato colonizado autoclavado e ensaio com substrato e adição de 1-ABT.

Através da análise do gráfico da Figura 4.6 é possível verificar que a remoção no ensaio com substrato colonizado com e sem adição de inibidor do CP450 foi praticamente

a mesma, atingindo 83,1% e 84,9%, respetivamente. Desta forma, é possível constatar que a contribuição da degradação intracelular pelo complexo enzimático CP450 foi praticamente inexistente. No entanto, o mecanismo de sorção apresenta um papel relevante sendo responsável por quase metade da remoção do fármaco (44,7%).

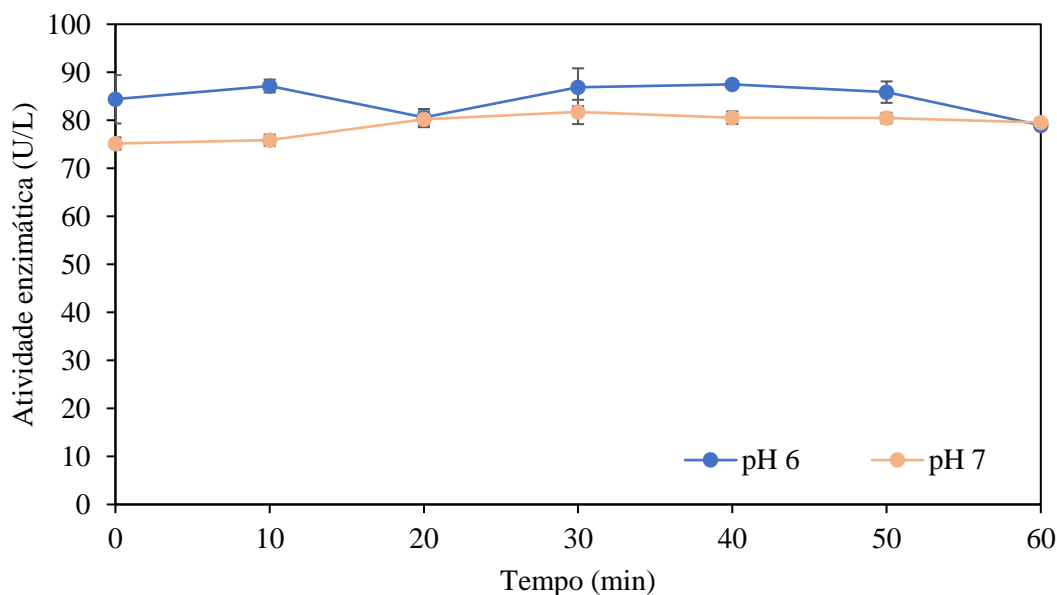
## **4.2 ENSAIOS COM EXTRATOS ENZIMÁTICOS**

Nestes ensaios, extraíram-se os enzimas extracelulares a partir do substrato colonizado em vez da sua utilização direta. Tal como foi dito anteriormente, os valores de pH estipulados para a descarga de águas residuais tratadas estão entre 6 e 9. Tendo em conta a gama de valores de pH esperado após o tratamento secundário numa ETAR (6,5-7,5) [93], foram realizados ensaios com extratos enzimáticos a pH 6 e 7. Estes ensaios tiveram como objetivo o estudo da utilização de extratos enzimáticos tendo em conta as suas vantagens relativamente ao uso de culturas vivas e/ou enzimas purificados.

Comparativamente à utilização de culturas vivas, os extratos enzimáticos dispensam a adição contínua de nutrientes ao meio e resolvem o problema de possível contaminação e/ou competição com outros microrganismos (p.e bactérias). Além disso, é possível atingir elevadas velocidades de reação em condições moderadas de temperatura e pH [52].

Relativamente à utilização de enzimas purificados, os extratos têm demonstrado melhores taxas de remoção devido à presença de mediadores naturais. Acrescendo a isso, são uma opção mais económica [52].

Desta forma, estudou-se a remoção de fluoxetina com extratos enzimáticos obtidos a partir do substrato colonizado para pH 6 e 7. A variação da atividade enzimática (U/L) ao longo do tempo nos diferentes ensaios está representada na Figura 4.7.



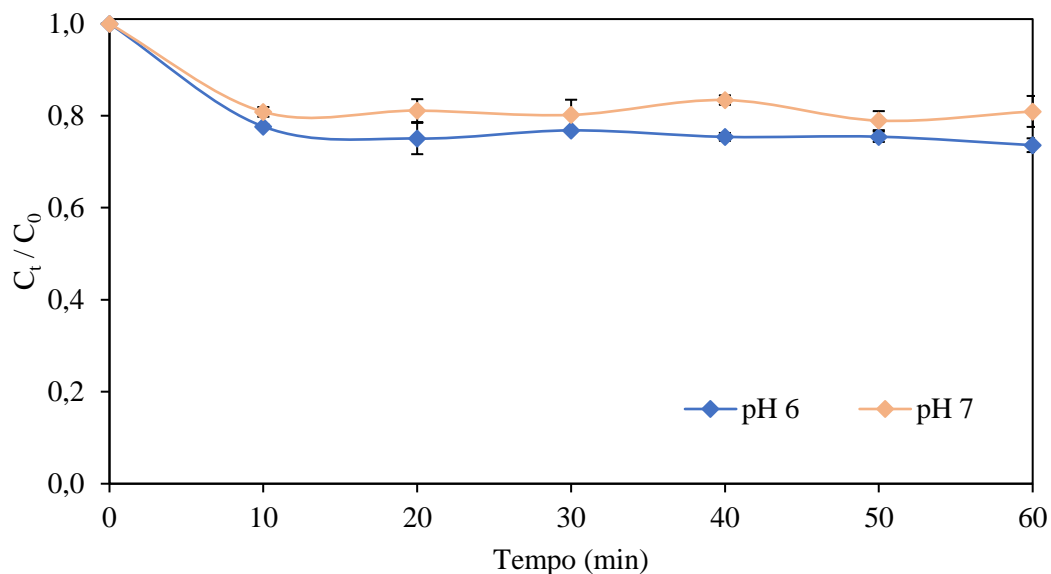
**Figura 4.7** Variação da atividade enzimática nos ensaios com extratos enzimáticos.

Através da análise do gráfico da Figura 4.7, é possível observar que a atividade enzimática da lacase é influenciada pelo pH. O pH ótimo da lacase depende das isoformas que são produzidas pelo fungo. Neste caso, os valores ótimos de pH das isoformas produzidas por *P. ostreatus* estão entre 3,0 e 6,5 (Tabela 2.3). Desta forma, seria de esperar maior atividade enzimática nesse intervalo.

Os resultados obtidos estão em concordância com a afirmação anterior, uma vez que a atividade enzimática foi superior no ensaio a pH inferior. Para pH 6, a atividade enzimática média foi 84,5 U/L e para pH 7 foi de 79,08 U/L.

Além do pH, é importante referir que os ensaios não foram realizados à temperatura ótima de atuação da lacase, 35-65 °C (Tabela 2.3), o que pode ter influenciado negativamente a sua atividade enzimática.

A remoção de fluoxetina nos ensaios com extratos enzimáticos para pH 6 e 7 está ilustrada na Figura 4.8.



**Figura 4.8** Concentração relativa de fluoxetina nos ensaios com extratos enzimáticos.

A remoção de fluoxetina foi relativamente baixa nos extratos enzimáticos, tendo em conta os valores de atividade da lacase, atingindo 24,4% e 19,6% para pH 6 e 7, respetivamente.

Um estudo realizado por Ashe *et al.*, apresenta resultados semelhantes, uma vez que utilizam extrato enzimático com lacase a partir de *P. ostreatus* para a remoção de oxibenzona e naproxeno, atingindo 23% e 15% de remoção, respetivamente. Os autores atribuem a baixa remoção de naproxeno à presença de grupos funcionais pouco suscetíveis à oxidação enzimática. Isto é, à presença do grupo carboxílico, que constitui um grupo funcional “retirador” de eletrões, e à ausência de grupos “dadores” de eletrões [105].

Existem grupos funcionais “dadores” de eletrões, como por exemplo hidroxilo (-OH) e amina (-NH<sub>2</sub>), que são mais suscetíveis ao ataque oxidativo. Pelo contrário, grupos funcionais “retiradores” de eletrões, como grupos amida (-CONR<sub>2</sub>), carboxílico (-COOH), halogénio (-X) e nitro (-NO<sub>2</sub>) são menos vulneráveis [106].

Nguyen *et al.*, referem que de 16 compostos não-fenólicos, apenas o diclofenac apresentou uma remoção significativa (68%), sendo que nos restantes compostos a remoção foi baixa e negligenciável. No entanto, entre os 14 compostos fenólicos em estudo, 9 foram significativamente removidos. Este estudo sugere que a diferença de remoção entre diferentes fármacos pode estar relacionada com uma inadequada ação

oxidativa da lacase devido à diferença de potencial redox entre o enzima e o substrato [106].

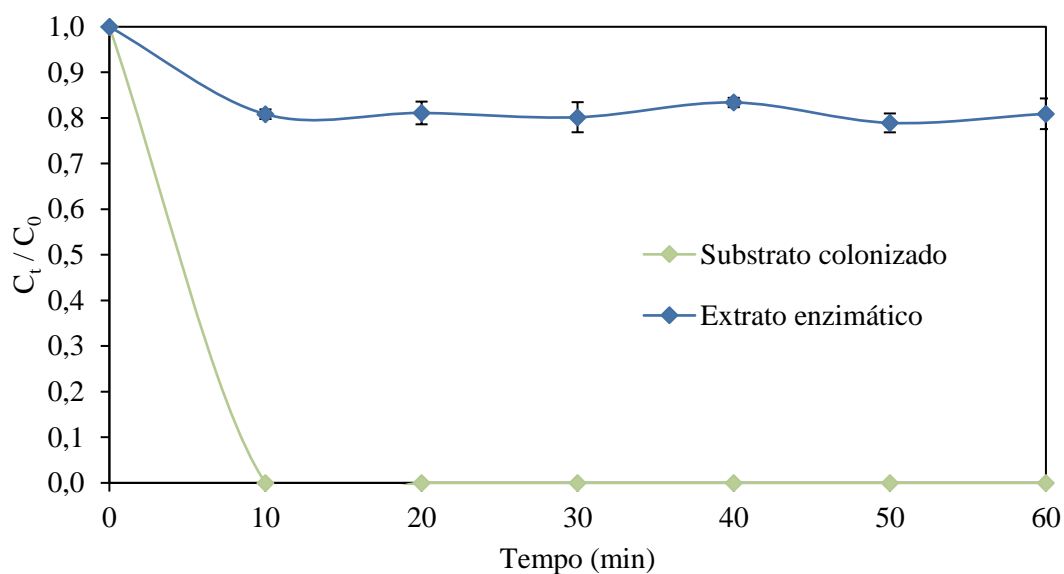
Além disso, baixas remoções podem dever-se a fatores estéricos relacionados com grupos funcionais que impedem a aproximação do substrato ao centro ativo dos enzimas [106].

Tran *et al.*, relata a remoção completa (>99%) de alguns compostos farmacêuticos não fenólicos como diclofenac e ibuprofeno utilizando extrato de lacase a partir de *T. versicolor*, salientando que a remoção completa dos fármacos está relacionada com a presença de mediadores naturais presentes no extrato enzimático [58, 107].

Segundo a literatura, a baixa degradação de um fármaco pode estar relacionada com a sua estrutura química, nomeadamente devido à presença de grupos funcionais “retiradores” de elétrons, como os halogéneos [105]. Além disso, a utilização de extratos enzimáticos com lacase apresenta, geralmente, remoções elevadas para compostos fenólicos e remoções inferiores para compostos não fenólicos [58].

### **4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS COM SUBSTRATO COLONIZADO E OS EXTRATOS ENZIMÁTICOS**

Na Figura 4.9 estabelece-se a comparação da remoção de fluoxetina no ensaio com substrato colonizado e com extrato enzimático, ambos a pH 7.



**Figura 4.9** Concentração relativa de fluoxetina no ensaio com substrato colonizado e extrato enzimático (pH 7).

Comparando o ensaio com substrato colonizado e o ensaio com extrato enzimático, é possível observar que a remoção de fluoxetina é bastante inferior quando se utiliza apenas extratos enzimáticos. Esta diferença pode ser explicada pela ausência do mecanismo de sorção que apenas está presente quando se utiliza substrato.

Vários estudos destacam o sistema mediador da lacase e associam a presença de mediadores a maiores percentagens de remoção de fármacos [59, 106]. Além disso, como já foi referido, a remoção de compostos não fenólicos utilizando extratos enzimáticos costuma ser pouco eficiente [58].

Na Tabela 4.2 encontra-se o resumo dos ensaios realizados em sistema fechado.

**Tabela 4.2** Resumo dos resultados dos ensaios realizados em sistema fechado.

Ensaio		Atividade enzimática (U/L)	Remoção (%)
Substrato colonizado	Ensaio 1	73 ± 3	100 ± 0
	Ensaio 2	19 ± 3	85 ± 1
	Autoclavado	0,0 ± 0,0	45 ± 2
	Com inibidor	8,9 ± 2,5	83,1 ± 0,4
Extratos enzimáticos	pH 6	85 ± 2	24 ± 1
	pH 7	79 ± 1	20 ± 2

Tal como se pode verificar pela Tabela 4.2, os melhores resultados foram alcançados utilizando substrato colonizado, conseguindo atingir a remoção total com substrato colonizado no início da formação de corpos de frutificação. Pelo contrário, os extratos enzimáticos apresentam valores de remoção relativamente baixos, não conseguindo remover totalmente a fluoxetina.

A remoção total de fluoxetina utilizando SMS constitui uma vantagem, do ponto de vista económico e ambiental, uma vez que permite valorizar um material que é considerado um desperdício resultante da produção de cogumelos. Além disso, o SMS tem sido reportado como um adsorvente eficaz, facilmente biodegradável e que não causa poluição acrescida [101].

A utilização deste biomaterial dispensa a purificação de enzimas e também evita a necessidade de fornecer nutrientes e condições específicas para o crescimento dos fungos em águas residuais. Por outro lado, pode não ser a melhor escolha para a biorremediação de águas, tendo em conta que a diminuição da atividade enzimática da lacase acontece logo após a colheita dos cogumelos [15].

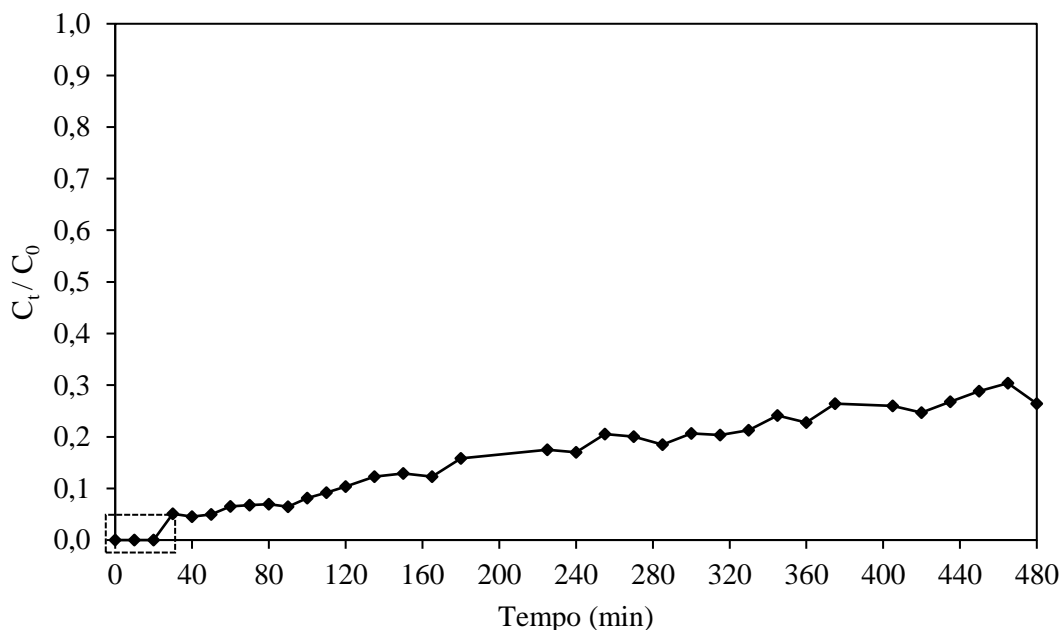
Além disso, é preciso ter em conta a questão do transporte e do armazenamento do SMS, que demonstrou ser um fator determinante na eficiência de remoção de contaminantes [99].

#### **4.4 ENSAIO EM COLUNA**

Os resultados obtidos em matrizes permitem compreender os mecanismos que atuam na remoção de fármacos utilizando substrato colonizado. No entanto, torna-se necessário realizar ensaios em contínuo à escala laboratorial que tentem simular os processos de tratamento de uma ETAR. Por esse motivo, realizou-se um ensaio em coluna

utilizando substrato colonizado (12,10 g, humidade  $69,93 \pm 0,01\%$ ). A coluna foi alimentada por uma solução de fluoxetina ( $600 \mu\text{g/L}$ ) em tampão pH 7, durante 8 h, à temperatura ambiente, com um caudal de  $2 \text{ mL/min}$ . Ao longo do ensaio o pH manteve-se constante e verificou-se um ligeiro aumento na temperatura de  $23^\circ\text{C}$  para  $26^\circ\text{C}$ .

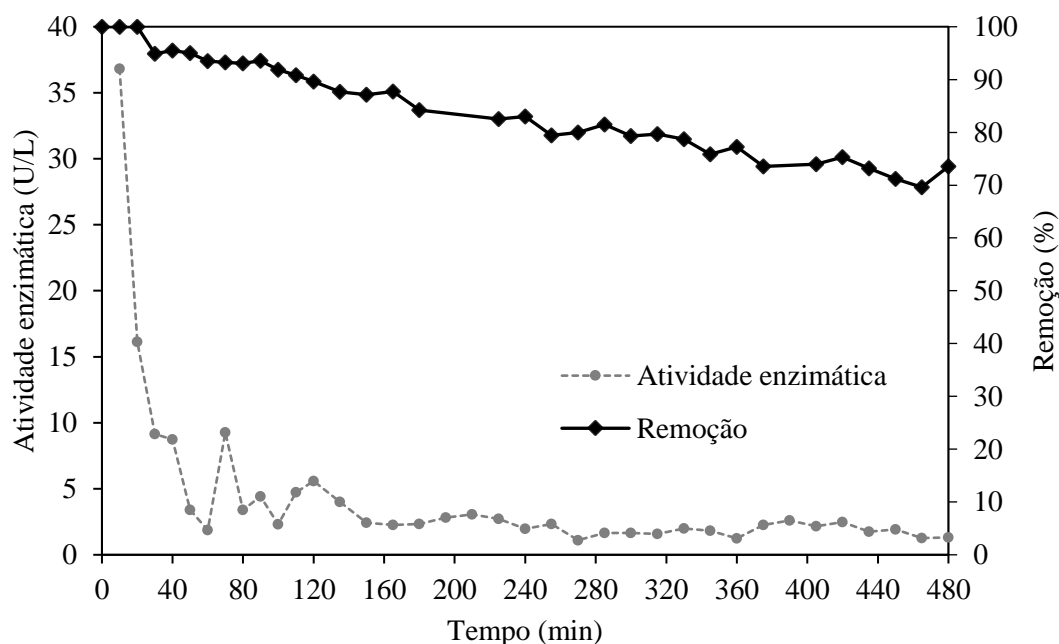
Geralmente, considera-se o ponto de rutura como 3-5% da concentração inicial do efluente ou então fixa-se o valor limite legal, se existir. O ponto de exaustão corresponde a 90-95% da concentração inicial de efluente [108]. Tendo em conta que não existem valores legais definidos para a concentração de fármacos, considerou-se como ponto teórico de rutura e exaustão, respetivamente 5 e 95% da concentração do fármaco alimentado à coluna. O ponto de exaustão teórico tem o valor de  $682 \mu\text{g/L}$ , no entanto, não foi atingido durante o tempo experimental. O ponto teórico de rutura corresponde a  $35,9 \mu\text{g/L}$  e foi atingido aproximadamente após 30 min de experiência. Na Figura 4.10 é possível observar o que foi descrito anteriormente.



**Figura 4.10** Concentração relativa de fluoxetina ao longo do ensaio em coluna, sendo  $C_0$  a concentração da solução alimentada à coluna.

O ponto de rutura indica o momento em que se aproxima a saturação do adsorvente e começa a ser detetado o analito no efluente [109]. Tal como se pode observar na Figura 4.10, a concentração de fluoxetina no efluente vai aumentando a partir desse momento. Eventualmente, num maior tempo de experiência, iria atingir-se o patamar em que não existe qualquer remoção de fluoxetina e a concentração antes e depois da coluna se mantém constante (ponto de exaustão).

Na Figura 4.11 está relacionado a remoção de fluoxetina (%) com a atividade enzimática da lacase ao longo do tempo.



**Figura 4.11** Atividade enzimática (U/L) e remoção de fluoxetina (%) ao longo do ensaio em coluna.

A atividade enzimática foi medida à saída da coluna, ou seja, corresponde ao *wash-out* do enzima. Analisando o gráfico da Figura 4.11, é possível verificar que o *wash-out* foi máximo no início do ensaio, registrando-se 35,8 U/L aos 10 min. A partir daí, apresentou uma tendência decrescente até estabilizar. Para evitar o *wash-out*, poderia recorrer-se à imobilização de enzimas em suportes sólidos ou à utilização de micro-membranas [52, 110].

A remoção de fluoxetina foi completa (100%) até aos 20 min de ensaio e manteve-se elevada ( $\geq 70\%$ ) durante toda a experiência. Estes dados sugerem que a lacase e, provavelmente outros enzimas, estiveram envolvidos e são importantes para que se verifique remoção total de fluoxetina. No entanto, tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios em sistema fechado, é expectável que a sorção tenha uma forte contribuição durante todo o processo de remoção.

Comparando com a literatura, um ensaio realizado com 50 g de substrato colonizado por *P. eryngii* em biorreator resultou na remoção total de paracetamol (10 mg/L) após 24 h. Os autores destacam o mecanismo de adsorção e degradação enzimática como mecanismos de remoção [98].

Chang *et al.*, utilizou substrato colonizado com *P. ostreatus* em biorreator para a remoção de ftalatos (20 ppm) presentes em águas contaminadas. Os resultados indicam que a aplicação direta de SMS é eficaz na remoção de alguns tipos de ftalatos através do processo de biodegradação por enzimas extracelulares e adsorção. Os autores atribuem a diferença de remoção entre compostos aos grupos funcionais e à sua interação com os enzimas [111].

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Na presente dissertação realizou-se o estudo da remoção de fluoxetina, um fármaco antidepressivo de elevado consumo detetado com frequência em águas superficiais e residuais, utilizando um biomaterial constituído por substrato colonizado pelo fungo *Pleurotus ostreatus*.

Foram realizados ensaios em sistema fechado utilizando substrato colonizado e extratos enzimáticos. Foi possível atingir a remoção total do fármaco num curto período de tempo (10 min) utilizando substrato colonizado. Pelo contrário, os extratos enzimáticos demonstraram não ser eficazes, apresentando apenas cerca de 22% de remoção.

Foi também estudada a variação da atividade enzimática da lacase no substrato ao longo do tempo, tendo-se observado que a atividade da lacase variava com a fase de crescimento dos corpos frutíferos, verificando-se maior atividade no período que antecede a fase de frutificação.

Nos ensaios com substrato colonizado, testou-se a contribuição dos vários mecanismos de remoção característicos dos fungos da podridão branca. Verificou-se que a sorção foi responsável por 44,7% da remoção do fármaco e que a degradação intracelular pelo citocromo P450 foi negligenciável. Constatou-se que a remoção total só foi alcançada com a participação simultânea de enzimas extracelulares e do mecanismo de sorção, verificando-se que a remoção abiótica da fluoxetina foi cerca de 8%.

No ensaio em contínuo (em coluna de leito fixo), atingiu-se a completa remoção de fluoxetina nos primeiros 20 minutos de experiência, coincidindo com a máxima atividade da lacase. No restante tempo, a remoção manteve-se acima dos 70%, sugerindo, tal como nos ensaios em sistema fechado, a atuação de enzimas extracelulares em conjunto com o mecanismo de sorção.

De modo geral, o facto de se conseguir atingir a remoção total de fluoxetina com substrato colonizado, sugere a possibilidade de utilizar SMS, um subproduto abundante resultante da produção de cogumelos, na biorremediação de águas residuais. Como vantagem, este biomaterial dispensa os custos associados à purificação de enzimas ou a necessidade de suplementar nutrientes para o crescimento de fungos.

No entanto, a sua implementação em larga escala enfrenta ainda muitos desafios. É preciso ter em conta as condições reais no tratamento de águas residuais, nomeadamente, a possibilidade de contaminação por outros microrganismos, condições de pH e temperatura, arejamento e presença de compostos potencialmente inibitórios.

Além disso, o *wash-out* de enzimas pode aumentar a carga orgânica no efluente final, podendo ser evitado através da imobilização em suportes sólidos ou utilização de micro-membranas, que requer algum investimento. É necessário considerar também a questão do transporte e armazenamento do SMS, tendo em conta a sua influência no decréscimo da remoção dos contaminantes.

Em trabalhos futuros seria pertinente testar a remoção em condições reais, utilizando águas residuais. Seria também relevante a análise do efluente após biorremediação, nomeadamente, a análise dos metabolitos formados e a avaliação da sua ecotoxicidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. R. Cunha *et al.*, “Removal of captopril pharmaceutical from synthetic pharmaceutical-industry wastewaters: Use of activated carbon derived from *Butia catarinensis*,” *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 8, no. 6, p. 104506, Dec. 2020.
- [2] K. Kümmerer, “Pharmaceuticals in the Environment,” 2010.
- [3] F. M. Christensen, “Pharmaceuticals in the environment - A human risk?,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 28, no. 3, pp. 212–221, Dec. 1998.
- [4] S. D. Costanzo, J. Murby, and J. Bates, “Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment,” in *Marine Pollution Bulletin*, 2005, vol. 51, no. 1–4, pp. 218–223.
- [5] T. P. Rodgers-Gray *et al.*, “Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 34, no. 8, pp. 1521–1528, Apr. 2000.
- [6] A. R. Schwindt, D. L. Winkelmann, K. Keteles, M. Murphy, and A. M. Vajda, “An environmental oestrogen disrupts fish population dynamics through direct and transgenerational effects on survival and fecundity,” *J. Appl. Ecol.*, vol. 51, no. 3, pp. 582–591, Jun. 2014.
- [7] T. Brodin, S. Piovano, J. Fick, J. Klaminder, M. Heynen, and M. Jonsson, “Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 369, no. 1656. Royal Society of London, 19-Nov-2014.
- [8] L. Bijlsma *et al.*, “Investigation of pharmaceuticals in a conventional wastewater treatment plant: Removal efficiency, seasonal variation and impact of a nearby hospital,” *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 9, no. 4, p. 105548, Aug. 2021.
- [9] N. A. Al-Odaini, M. P. Zakaria, M. I. Yaziz, S. Surif, and M. Abdulghani, “The occurrence of human pharmaceuticals in wastewater effluents and surface water of Langat River and its tributaries, Malaysia,” *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 93, no. 3, pp. 245–264, Mar. 2013.
- [10] J. B. Quintana and T. Reemtsma, “Sensitive determination of acidic drugs and triclosan in surface and wastewater by ion-pair reverse-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 18, no. 7, pp. 765–774, 2004.
- [11] S. Rodriguez-Mozaz, M. J. López De Alda, and D. Barceló, “Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry,” in *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1045, no. 1–2, pp. 85–92.
- [12] T. Heberer, K. Schmidt-Bäumler, and H.-J. Stan, “Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part I: Drug residues and other polar contaminants in Berlin surface and groundwater,” *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, vol. 26, no. 5, pp. 272–278, 1998.

- [13] S. Weigel, K. Bester, and H. Hühnerfuss, “New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography-mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 912, no. 1, pp. 151–161, Mar. 2001.
- [14] S. Ba, L. Haroune, L. Soumano, J. P. Bellenger, J. P. Jones, and H. Cabana, “A hybrid bioreactor based on insolubilized tyrosinase and laccase catalysis and microfiltration membrane remove pharmaceuticals from wastewater,” *Chemosphere*, vol. 201, pp. 749–755, Jun. 2018.
- [15] M. Hultberg, L. Ahrens, and O. Golovko, “Use of lignocellulosic substrate colonized by oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) for removal of organic micropollutants from water,” *J. Environ. Manage.*, vol. 272, no. May, p. 111087, 2020.
- [16] “DIRECTIVA 2000/60/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 23 de Outubro de 2000 que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água,” 2000. [Online]. Available: [https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:5c835afb-2ec6-4577-bdf8-756d3d694eeb.0009.02/DOC\\_1&format=PDF](https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:5c835afb-2ec6-4577-bdf8-756d3d694eeb.0009.02/DOC_1&format=PDF). [Accessed: 12-May-2021].
- [17] “DIRETIVA 2013/39/UE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 12 de agosto de 2013 que altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água,” 2013. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039&from=bg>. [Accessed: 12-May-2021].
- [18] “Decisão de execução (UE) 2018/840 da comissão de 5 de junho de 2018,” 2018. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0840&qid=1624893361965&from=EN>. [Accessed: 14-May-2021].
- [19] “Decisão de execução (EU) 2020/1161 da comissão de 4 de agosto de 2020,” 2020. [Online]. Available: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020D1161&qid=1624893684573&from=EN>. [Accessed: 14-May-2021].
- [20] C. Buşoi, G. Sidl, J. Huitema, M. Rivasi, S. Baldassarre, and K. Konečná, “Abordagem estratégica relativa aos produtos farmacêuticos no ambiente.” 2020.
- [21] H. de O. Souza, R. dos S. Costa, G. R. Quadra, and M. A. dos S. Fernandez, “Pharmaceutical pollution and sustainable development goals: Going the right way?,” *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 21, p. 100428, Jun. 2021.
- [22] A. Silva, C. Delerue-Matos, S. A. Figueiredo, and O. M. Freitas, “The use of algae and fungi for removal of pharmaceuticals by bioremediation and biosorption processes: A review,” *Water (Switzerland)*, vol. 11, no. 8, 2019.
- [23] D. C. Da Silva and C. C. Oliveira, “Development of Micellar HPLC-UV Method for Determination of Pharmaceuticals in Water Samples,” *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2018, 2018.
- [24] P. Verlicchi, M. Al Aukidy, and E. Zambello, “Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after

- a secondary treatment-A review,” *Science of the Total Environment*, vol. 429. Elsevier, pp. 123–155, 01-Jul-2012.
- [25] K. Kümmerer, Ed., *Pharmaceuticals in the Environment: Source, Fate, Effects and Risk*, Third. Copenhagen: Springer, 2008.
- [26] F. Deng, H. Shi, Y. Guo, X. Luo, and J. Zhou, “Engineering Paths of Sustainable and Green Photocatalytic Degradation Technology for Pharmaceuticals and Organic Contaminants of Emerging Concern,” *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, p. 100465, Feb. 2021.
- [27] N. A. Al-Odaini, M. P. Zakaria, M. I. Yaziz, S. Surif, and M. Abdulghani, “The occurrence of human pharmaceuticals in wastewater effluents and surface water of Langat River and its tributaries, Malaysia,” *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 93, no. 3, pp. 245–264, Mar. 2013.
- [28] S. B. Svendsen, H. El-taliawy, P. N. Carvalho, and K. Bester, “Concentration dependent degradation of pharmaceuticals in WWTP effluent by biofilm reactors,” *Water Res.*, vol. 186, p. 116389, Nov. 2020.
- [29] T. Deblonde, C. Cossu-Leguille, and P. Hartemann, “Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature,” *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 214, no. 6, pp. 442–448, Nov. 2011.
- [30] M. Petrović, S. Gonzalez, and D. Barceló, “Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 22, no. 10, pp. 685–696, Nov. 2003.
- [31] N. Le-Minh, S. J. Khan, J. E. Drewes, and R. M. Stuetz, “Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes,” *Water Res.*, vol. 44, no. 15, pp. 4295–4323, Aug. 2010.
- [32] Statista, “Consumption of antidepressants in selected countries as of 2019.” [Online]. Available: <https://www.statista.com/statistics/283072/antidepressant-consumption-in-selected-countries/#statisticContainer>. [Accessed: 03-Aug-2021].
- [33] J. Neuwoehner, K. Fenner, and B. I. Escher, “Physiological modes of action of fluoxetine and its human metabolites in algae,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, no. 17, pp. 6830–6837, 2009.
- [34] PubChem, “Fluoxetine hydrochloride.” [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/62857>. [Accessed: 05-Sep-2021].
- [35] A. Silva, L. H. M. L. M. Santos, C. Delerue-Matos, and S. A. Figueiredo, “Impact of excipients in the chronic toxicity of fluoxetine on the alga *Chlorella vulgaris*,” <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2014.932438>, vol. 35, no. 24, pp. 3124–3129, Dec. 2014.
- [36] A. J. Englande, P. Krenkel, and J. Shamas, *Wastewater Treatment & Water Reclamation*. Elsevier Inc., 2015.
- [37] F. R. Spellman, *Handbook of Water and Wastewater Treatment Plant Operations*. 2013.
- [38] Grupo Aguas Portugal, “Tecnologias de tratamento.” [Online]. Available: <https://www.aguasdoalgarve.pt/content/tecnologias-de-tratamento>. [Accessed: 16-

Mar-2021].

- [39] Y. Luo *et al.*, “A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment,” *Science of the Total Environment*, vol. 473–474. Elsevier B.V., pp. 619–641, 01-Mar-2014.
- [40] F. Zaviska, P. Drogui, A. Grasmick, A. Azais, and M. Héran, “Nanofiltration membrane bioreactor for removing pharmaceutical compounds,” *J. Memb. Sci.*, vol. 429, pp. 121–129, Feb. 2013.
- [41] M. Esterhuizen-Londt, K. Schwartz, and S. Pflugmacher, “Using aquatic fungi for pharmaceutical bioremediation: Uptake of acetaminophen by *Mucor hiemalis* does not result in an enzymatic oxidative stress response,” *Fungal Biol.*, vol. 120, no. 10, pp. 1249–1257, 2016.
- [42] S. Varjani and R. Patel, “Fungi: A Remedy to Eliminate Environmental Pollutants,” vol. 1, 2017, pp. 17–37.
- [43] J. Deacon, *Fungal Biology*, 4th ed. Edinburgh, 2006.
- [44] M. Pletsch, B. S. De Araujo, and B. V. Charlwood, “Novel biotechnological approaches in environmental remediation research,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 17, no. 8, pp. 679–687, Dec. 1999.
- [45] V. Christian, R. Shrivastava, D. Shukla, H. A. Modi, and B. R. M. Vyas, “Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: Enzymology and mechanisms involved,” *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 43, no. 4, pp. 301–312, 2005.
- [46] C. J. Rhodes, “Mycoremediation (bioremediation with fungi) - growing mushrooms to clean the earth,” *Chem. Speciat. Bioavailab.*, vol. 26, no. 3, pp. 196–198, 2014.
- [47] N. Akhtar and M. A. ul Mannan, “Mycoremediation: Expunging environmental pollutants,” *Biotechnol. Reports*, vol. 26, p. e00452, 2020.
- [48] S. Rodríguez-Couto, “Potential of White-Rot Fungi to Treat Xenobiotic-Containing Wastewater,” in *Fungal Applications in Sustainable Environmental Biotechnology*, Switzerland, 2016.
- [49] C. Wright, A. P. Gryganskyi, and Bonito Gregory, “Fungi in Composting,” in *Fungal Applications in Sustainable Environmental Biotechnology*, D. Purchase, Ed. 2016.
- [50] R. Cohen, L. Persky, and Y. Hadar, “Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 58, no. 5, pp. 582–594, 2002.
- [51] G. R. Tortella, M. C. Diez, and N. Durán, “Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants,” *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 31, no. 4, pp. 197–212, 2005.
- [52] M. Naghdi, M. Taheran, S. K. Brar, A. Kermanshahi-pour, M. Verma, and R. Y. Surampalli, “Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes,” *Environ. Pollut.*, vol. 234, pp. 190–213, 2018.

- [53] G. Akerman-Sanchez and K. Rojas-Jimenez, "Fungi for the bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants: A bioengineering approach to water treatment," *Environ. Adv.*, vol. 4, no. March, p. 100071, 2021.
- [54] M. Jureczko, W. Przysaś, T. Krawczyk, W. Gonciarz, and K. Rudnicka, "White-rot fungi-mediated biodegradation of cytostatic drugs - bleomycin and vincristine," *J. Hazard. Mater.*, vol. 407, p. 124632, Apr. 2021.
- [55] S. Zhang *et al.*, "Contrasting characteristics of anthracene and pyrene degradation by wood rot fungus *Pycnoporus sanguineus* H1," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 105, pp. 228–232, Nov. 2015.
- [56] K. Syed and J. S. Yadav, "P450 monooxygenases (P450ome) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*," <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2012.682050>, vol. 38, no. 4, pp. 339–363, Nov. 2012.
- [57] T. Lu, Q.-L. Zhang, and S.-J. Yao, "Application of Biosorption and Biodegradation Functions of Fungi in Wastewater and Sludge Treatment," in *Fungal Applications in Sustainable Environmental Biotechnology*, D. Purchase, Ed. Springer International, 2016.
- [58] M. B. Asif, F. I. Hai, L. Singh, W. E. Price, and L. D. Nghiem, "Degradation of Pharmaceuticals and Personal Care Products by White-Rot Fungi—a Critical Review," *Curr. Pollut. Reports*, vol. 3, no. 2, pp. 88–103, 2017.
- [59] E. Marco-Urrea, M. Pérez-Trujillo, P. Blánquez, T. Vicent, and G. Caminal, "Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 7, pp. 2159–2166, Apr. 2010.
- [60] E. Marco-Urrea, M. Pérez-Trujillo, C. Cruz-Morató, G. Caminal, and T. Vicent, "White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR," *Chemosphere*, vol. 78, no. 4, pp. 474–481, Jan. 2010.
- [61] A. I. Rodarte-Morales, G. Feijoo, M. T. Moreira, and J. M. Lema, "Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply," *Biodegradation*, vol. 23, no. 1, pp. 145–156, Feb. 2012.
- [62] G. Akerman-Sanchez and K. Rojas-Jimenez, "Fungi for the bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants: A bioengineering approach to water treatment," *Environ. Adv.*, vol. 4, p. 100071, 2021.
- [63] L. Ferrando-Climent *et al.*, "Non conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater," *Chemosphere*, vol. 136, pp. 9–19, Oct. 2015.
- [64] J. A. Mir-Tutusaus *et al.*, "Pharmaceuticals removal and microbial community assessment in a continuous fungal treatment of non-sterile real hospital wastewater after a coagulation-flocculation pretreatment," *Water Res.*, vol. 116, pp. 65–75, Jun. 2017.
- [65] L. Haroune, S. Saibi, J. P. Bellenger, and H. Cabana, "Evaluation of the efficiency

- of *Trametes hirsuta* for the removal of multiple pharmaceutical compounds under low concentrations relevant to the environment,” *Bioresour. Technol.*, vol. 171, no. 1, pp. 199–202, Nov. 2014.
- [66] A. I. Rodarte-Morales, G. Feijoo, M. T. Moreira, and J. M. Lema, “Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply,” *Biodegradation*, vol. 23, no. 1, pp. 145–156, Feb. 2012.
- [67] C. Cruz-Morató *et al.*, “Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds,” *Sci. Total Environ.*, vol. 493, pp. 365–376, Sep. 2014.
- [68] C. Cruz-Morató *et al.*, “Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor,” *Water Res.*, vol. 47, no. 14, pp. 5200–5210, Sep. 2013.
- [69] T. Cajthaml, Z. Křesinová, K. Svobodová, and M. Möder, “Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi,” *Chemosphere*, vol. 75, no. 6, pp. 745–750, May 2009.
- [70] A. Pérez Montes, E. Rangel-Vargas, J. M. Lorenzo, L. Romero, and E. M. Santos, “Edible mushrooms as a novel trend in the development of healthier meat products,” *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 37, pp. 118–124, 2021.
- [71] J. M. Marín-Benito, M. J. Sánchez-Martín, and M. S. Rodríguez-Cruz, “Impact of spent mushroom substrates on the fate of pesticides in soil, and their use for preventing and/or controlling soil and water contamination: A review,” *Toxics*, vol. 4, no. 3, 2016.
- [72] R. Bánfi *et al.*, “Characterisation of the large-scale production process of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with the analysis of succession and spatial heterogeneity of lignocellulolytic enzyme activities,” *Fungal Biol.*, vol. 119, no. 12, pp. 1354–1363, 2015.
- [73] L. Naim, M. A. Alsanad, N. Shaban, Z. El Sebaaly, S. Abou Fayssal, and Y. N. Sassine, “Production and composition of *Pleurotus ostreatus* cultivated on Lithovit®-Amino25 supplemented spent substrate,” *AMB Express*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2020.
- [74] S. Aslam and M. Asgher, “Partial purification and characterization of ligninolytic enzymes produced by *Pleurotus ostreatus* during solid state fermentation,” *African J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 77, pp. 17875–17883, 2011.
- [75] E. Dorr, M. Koegler, B. Gabrielle, and C. Aubry, “Life cycle assessment of a circular, urban mushroom farm,” *J. Clean. Prod.*, vol. 288, Mar. 2021.
- [76] S. Ozcirak Ergun and R. Ozturk Urek, “Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*,” *Ann. Agrar. Sci.*, vol. 15, no. 2, pp. 273–277, 2017.
- [77] B. Kózka, G. Nałęcz-Jawecki, J. Turło, and J. Giebułtowicz, “Application of *Pleurotus ostreatus* to efficient removal of selected antidepressants and immunosuppressant,” *J. Environ. Manage.*, vol. 273, no. July, 2020.
- [78] V. Lettera, A. Piscitelli, G. Leo, L. Birolo, C. Pezzella, and G. Sannia,

- “Identification of a new member of Pleurotus ostreatus laccase family from mature fruiting body,” *Fungal Biol.*, vol. 114, no. 9, pp. 724–730, Sep. 2010.
- [79] M. Siroosi, M. A. Amoozegar, and K. Khajeh, “Purification and characterization of an alkaline chloride-tolerant laccase from a halotolerant bacterium, *Bacillus* sp. strain WT,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 134, pp. 89–97, Dec. 2016.
- [80] A. Patel, V. Patel, R. Patel, U. Trivedi, and K. Patel, *Fungal laccases: versatile green catalyst for bioremediation of organopollutants*. INC, 2020.
- [81] H. Singh, “Fungal Lignin Degradation and Decolorization of Pulp And Paper Mill Effluents,” in *Mycoremediation: fungal bioremediation*, New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [82] S. Lele and V. Madhavi, “Laccases properties and applications,” *Bioresources*, pp. 1694–1717, 2009.
- [83] P. Baldrian, “Fungal laccases-occurrence and properties,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 30, no. 2, pp. 215–242, 2006.
- [84] K. Hildén and M. R. Mäkelä, “Role of Fungi in Wood Decay,” *Ref. Modul. Life Sci.*, pp. 1–9, 2018.
- [85] K. Brijwani, A. Rigdon, and P. V. Vadlani, “Fungal laccases: Production, function and applications in food processing,” *Enzyme Res.*, vol. 2010, 2010.
- [86] S. Kurniawati and J. A. Nicell, “Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 41, pp. 353–361, 2007.
- [87] A. I. Cañas and S. Camarero, “Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 6, pp. 694–705, Nov. 2010.
- [88] R. Debnath and T. Saha, “An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi,” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 26, no. August 2019, p. 101645, 2020.
- [89] S. R. Couto and J. L. Toca-Herrera, “Laccase production at reactor scale by filamentous fungi,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, no. 6, pp. 558–569, Nov. 2007.
- [90] V. Cerdrá, “A Britton-Robinson buffer of known ionic strength,” p. 5, 1974.
- [91] A. Silva *et al.*, “Adsorption of Fluoxetine and Venlafaxine onto the Marine Seaweed *Bifurcaria bifurcata*,” *Environ. Eng. Sci.*, vol. 36, no. 5, pp. 573–582, 2019.
- [92] M. Hultberg, T. Prade, H. Bodin, A. Vidakovic, and H. Asp, “Adding benefit to wetlands – Valorization of harvested common reed through mushroom production,” *Sci. Total Environ.*, vol. 637–638, pp. 1395–1399, Oct. 2018.
- [93] F. L. Burton, G. Tchobanoglous, and H. D. Stensel, *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, Fourth. 2003.
- [94] Ministério do Ambiente, “Decreto-Lei n.º 236/98,” *Diário da República n.º 176/1998, Série I-A 1998-08-01*, vol. N.º 176, pp. 3676–3722, 1998.

- [95] A. Parenti *et al.*, “Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts,” *Bioresour. Technol.*, vol. 133, pp. 142–149, 2013.
- [96] S. Kurt and S. Buyukalaca, “Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 9, pp. 3164–3169, May 2010.
- [97] H. H. Suguimoto, A. M. Barbosa, R. F. H. Dekker, and R. J. H. Castro-Gomez, “Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 194, no. 2, pp. 235–238, Jan. 2001.
- [98] B. V. Chang, S. N. Fan, Y. C. Tsai, Y. L. Chung, P. X. Tu, and C. W. Yang, “Removal of emerging contaminants using spent mushroom compost,” *Sci. Total Environ.*, vol. 634, pp. 922–933, 2018.
- [99] R. A. Córdova Juárez, L. L. Gordillo Dorry, R. Bello-Mendoza, and J. E. Sánchez, “Use of spent substrate after *Pleurotus pulmonarius* cultivation for the treatment of chlorothalonil containing wastewater,” *J. Environ. Manage.*, vol. 92, no. 3, pp. 948–952, 2011.
- [100] C. F. Couto, L. C. Lange, and M. C. S. Amaral, “Occurrence, fate and removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) in water and wastewater treatment plants—A review,” *J. Water Process Eng.*, vol. 32, no. August, p. 100927, 2019.
- [101] A. Zhou, Y. Zhang, R. Li, X. Su, and L. Zhang, “Adsorptive removal of sulfa antibiotics from water using spent mushroom substrate, an agricultural waste,” *Desalin. Water Treat.*, vol. 57, no. 1, pp. 388–397, 2016.
- [102] P. R. O. de Montellano, “1-Aminobenzotriazole: A Mechanism-Based Cytochrome P450 Inhibitor and Probe of Cytochrome P450 Biology,” *Med. Chem. (Los Angeles)*, vol. 8, no. 3, 2018.
- [103] B. Chefetz *et al.*, “Transformation of lamotrigine by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*,” *Environ. Pollut.*, vol. 250, pp. 546–553, Jul. 2019.
- [104] B. Črešnar and Š. Petrič, “Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1814, no. 1, pp. 29–35, Jan. 2011.
- [105] B. Ashe *et al.*, “Impacts of redox-mediator type on trace organic contaminants degradation by laccase: Degradation efficiency, laccase stability and effluent toxicity,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 113, pp. 169–176, 2016.
- [106] L. N. Nguyen *et al.*, “Enhancement of trace organic contaminant degradation by crude enzyme extract from *Trametes versicolor* culture: Effect of mediator type and concentration,” *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 45, no. 4, pp. 1855–1862, 2014.
- [107] N. H. TRAN, T. URASE, and O. KUSAKABE, “Biodegradation Characteristics of Pharmaceutical Substances by Whole Fungal Culture *Trametes versicolor* and its Laccase,” *J. Water Environ. Technol.*, vol. 8, no. 2, pp. 125–140, 2010.
- [108] V. M. F. da Cruz, “Tecnologias Alternativas de Remoção de Antibióticos de Águas Contaminadas,” pp. 1–305, 2011.

- [109] H. Marsh and F. Rodríguez-Reinoso, “Characterization of Activated Carbon,” 2006.
- [110] H. Cabana, C. Alexandre, S. N. Agathos, and J. P. Jones, “Immobilization of laccase from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 14, pp. 3447–3458, 2009.
- [111] B. V. Chang, C. P. Yang, and C. W. Yang, “Application of fungus enzymes in spent mushroom composts from edible mushroom cultivation for phthalate removal,” *Microorganisms*, vol. 9, no. 9, 2021.



## ANEXOS

### ANEXO A. DETERMINAÇÃO DA HUMIDADE DO SUBSTRATO

Tabela A.1 Valores do peso e humidade do substrato colonizado.

	1	2	3	
<b>Substrato colonizado húmido (g)</b>	50,01	50,01	50,00	
<b>Substrato colonizado seco (g)</b>	15,24	15,27	14,60	15,04 ± 0,029
<b>Humidade (%)</b>	69,52	69,46	70,81	69,93 ± 0,01

A humidade (%) do substrato colonizado foi calculada da seguinte forma (réplica 1):

$$\frac{m(\text{SMS húmido}) - m(\text{SMS seco})}{m(\text{SMS húmido})} \times 100 \leftrightarrow \frac{50,01 - 15,24}{50,01} \times 100 = 69,52\%$$



## ANEXO B. RESULTADOS DOS ENSAIOS COM SUBSTRATO COLONIZADO

**Tabela B.1** Resultados do ensaio com substrato colonizado (9/06/2021).

<b>Réplica 1</b>						
Tempo (min)	Abs <sub>480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	0,000	0	8913	445,7	1,0	0,0
10	2,459	104,66	0	0,0	0,0	100,0
20	1,749	74,44	0	0,0	0,0	100,0
30	1,853	78,87	0	0,0	0,0	100,0
40	1,754	74,66	0	0,0	0,0	100,0
50	1,391	59,20	0	0,0	0,0	100,0
60	1,210	51,50	0	0,0	0,0	100,0
<b>Réplica 2</b>						
Tempo (min)	Abs <sub>480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	0,000	0	9865	445,7	1,0	0,0
10	2,567	109,26	0	0,0	0,0	100,0
20	1,582	67,33	0	0,0	0,0	100,0
30	1,471	62,61	0	0,0	0,0	100,0
40	1,862	79,25	0	0,0	0,0	100,0
50	1,401	59,63	0	0,0	0,0	100,0
60	1,289	54,86	0	0,0	0,0	100,0

**Tabela B.2** Resultados do ensaio com substrato colonizado (23/06/2021).

<b>Réplica 1</b>						
Tempo (min)	Abs <sub>480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	0,000	0	19066	445,7	1,00	0,0
10	0,378	16,09	16249	154,7	0,35	65,3
20	0,341	14,51	10219	97,5	0,22	78,1
30	0,479	20,39	7182	68,7	0,15	84,6
40	0,271	11,53	6928	66,3	0,15	85,1
50	0,383	16,30	7343	70,2	0,16	84,2
60	0,346	14,73	7172	68,6	0,15	84,6
<b>Réplica 2</b>						
Tempo (min)	Abs <sub>480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	0,000	0	19999	445,7	1,0	0,0
10	0,511	21,75	12160	115,9	0,26	74,0
20	0,508	21,62	7476	71,5	0,2	84,0
30	0,608	25,88	7199	68,9	0,2	84,6
40	0,523	22,26	7382	70,6	0,2	84,2
50	0,585	24,90	7081	67,7	0,2	84,8
60	0,485	20,64	7029	67,2	0,15	84,9

**Tabela B.3** Resultados do ensaio com substrato colonizado autoclavado.

<b>Réplica 1</b>						
Tempo (min)	Abs <sub>480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	0	0	42224	445,7	1,0	0,0
10	0	0	25647	243,8	0,5	45,3
20	0	0	28324	269,2	0,6	39,6
30	0	0	30808	292,8	0,7	34,3
40	0	0	26765	254,4	0,6	42,9
50	0	0	25968	246,9	0,6	44,6
60	0	0	28113	267,2	0,6	40,0
<b>Réplica 2</b>						
Tempo (min)	Abs <sub>480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	0	0	40877	445,7	1,0	0,0
10	0	0	25074	238,4	0,5	46,5
20	0	0	23505	223,5	0,5	49,9
30	0	0	25187	239,5	0,5	46,3
40	0	0	25590	243,3	0,5	45,4
50	0	0	27923	265,4	0,6	40,4
60	0	0	28414	270,1	0,6	39,4

**Tabela B.4.** Resultados do ensaio com substrato colonizado, com adição de 1-ABT.

<b>Réplica 1</b>						
Tempo (min)	Abs <sub>480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	0,414	17,62	19215	445,7	1,00	0,0
10	0,249	10,60	9075	86,7	0,19	80,6
20	0,195	8,30	8683	82,9	0,19	81,4
30	0,081	3,45	7991	76,4	0,17	82,9
40	0,051	2,17	7632	73,0	0,16	83,6
50	0,026	1,11	7654	73,2	0,16	83,6
60	0,042	1,79	7437	71,1	0,16	84,0
<b>Réplica 2</b>						
Tempo (min)	Abs <sub>480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	0,413	17,58	19264	445,7	1,00	0,0
10	0,388	16,51	10343	98,7	0,22	77,9
20	0,233	9,92	8261	78,9	0,18	82,3
30	0,283	12,05	7895	75,5	0,17	83,1
40	0,207	8,81	7725	73,8	0,17	83,4
50	0,109	4,64	7684	73,5	0,16	83,5
60	0,234	9,96	7991	76,4	0,17	82,9

## ANEXO C. RESULTADOS DOS ENSAIOS COM EXTRATOS ENZIMÁTICOS

**Tabela C.1** Resultados do ensaio com extrato enzimático a pH 6.

<b>Réplica 1</b>						
Tempo (min)	Ab <sub>S480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	1,864	79,34	42512	445,7	1,00	0,0
10	2,016	85,81	40714	348,0	0,78	21,9
20	1,854	78,91	37373	319,3	0,72	28,4
30	1,949	82,95	40082	342,6	0,77	23,1
40	2,041	86,87	38879	332,2	0,75	25,5
50	1,965	83,64	38754	331,2	0,74	25,7
60	1,857	79,04	39163	334,7	0,75	24,9
<b>Réplica 2</b>						
Tempo (min)	Ab <sub>S480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	2,101	89,42	41891	445,7	1,00	0,0
10	2,079	88,49	40258	344,1	0,77	22,8
20	1,935	82,36	40900	349,6	0,78	21,6
30	2,134	90,83	40030	342,1	0,77	23,2
40	2,070	88,10	39766	339,8	0,76	23,8
50	2,070	88,10	39931	341,3	0,77	23,4
60	1,854	78,91	37609	321,3	0,72	27,9

**Tabela C.2** Resultados do ensaio com extrato enzimático a pH 7.

<b>Réplica 1</b>						
Tempo (min)	Abs <sub>480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	1,736	73,89	40217	445,7	1,00	0,0
10	1,810	77,04	37922	360,3	0,81	19,2
20	1,923	81,85	38051	361,5	0,81	18,9
30	1,980	84,27	37612	357,3	0,80	19,8
40	1,923	81,85	39130	371,7	0,83	16,6
50	1,916	81,55	37028	351,8	0,79	21,1
60	1,890	80,44	37967	360,7	0,81	19,1
<b>Réplica 2</b>						
Tempo (min)	Abs <sub>480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	[Fluoxetina] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	1,796	76,44	39155	445,7	1,00	0,0
10	1,755	74,70	36935	350,9	0,79	21,3
20	1,846	78,57	40391	383,7	0,86	13,9
30	1,861	79,21	40713	386,7	0,87	13,2
40	1,862	79,25	40092	380,8	0,85	14,6
50	1,865	79,38	38973	370,2	0,83	16,9
60	1,849	78,70	41127	390,7	0,88	12,3

## ANEXO D. ENSAIO EM COLUNA

**Tabela D.1** Resultados do ensaio em coluna.

Tempo (min)	Abs <sub>480nm</sub>	Atividade enzimática (U/L)	Área cromatograma	Ct (µg/L)	[FLX] adsorvida (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0			0	0	717,9	0	100
10	0,865	36,8	0	0	717,9	0	100
20	0,379	16,1	0	0	717,9	0	100
30	0,215	9,2	3828	36,6	681,3	0,051	94,9
40	0,205	8,7	3433	32,5	685,4	0,045	95,5
50	0,080	3,4	3753	35,8	682,1	0,050	95,0
60	0,044	1,9	4819	46,9	671,0	0,065	93,5
70	0,218	9,3	4973	48,5	669,4	0,068	93,2
80	0,080	3,4	5082	49,7	668,2	0,069	93,1
90	0,104	4,4	4745	46,2	671,7	0,064	93,6
100	0,054	2,3	5933	58,6	659,3	0,082	91,8
110	0,111	4,7	6641	65,9	652,0	0,092	90,8
120	0,131	5,6	7452	74,4	643,5	0,104	89,6
135	0,094	4,0	8788	88,3	629,6	0,123	87,7
150	0,057	2,4	9201	92,6	625,3	0,129	87,1
165	0,053	2,3	8756	88,0	629,9	0,123	87,7

180	0,055	2,3	11203	113,5	604,4	0,158	84,2
195	0,066	2,8	12373	125,7	592,2	0,175	82,5
210	0,072	3,1					
225	0,064	2,7	12035	122,2	595,7	0,170	83,0
240	0,046	2,0	14468	147,5	570,4	0,205	79,5
255	0,055	2,3	14112	143,8	574,1	0,200	80,0
270	0,026	1,1	13045	132,7	585,2	0,185	81,5
285	0,039	1,7	14549	148,4	569,5	0,207	79,3
300	0,039	1,7	14305	145,8	572,1	0,203	79,7
315	0,037	1,6	14983	152,9	565,0	0,213	78,7
330	0,047	2,0	16945	173,4	544,5	0,241	75,9
345	0,043	1,8	15973	163,2	554,7	0,227	77,3
360	0,029	1,2	18525	189,8	528,1	0,264	73,6
375	0,053	2,3	18232	186,8	531,1	0,260	74,0
390	0,061	2,6					
405	0,051	2,2	17304	177,1	540,8	0,247	75,3
420	0,058	2,5	18776	192,4	525,5	0,268	73,2
435	0,041	1,7	20177	207,0	510,8	0,288	71,2
450	0,045	1,9	21242	218,2	499,7	0,304	69,6
465	0,030	1,3	18516	189,7	528,2	0,264	73,6
480	0,031	1,3	20785	213,4	504,5	0,297	70,3

## ANEXO E. REMOÇÃO ABIÓTICA

**Tabela E.1** Resultados do ensaio com solução tampão e fluoxetina.

Tempo (min)	Área cromatograma	[FLX] (µg/L)	C <sub>t</sub> /C <sub>0</sub>	Remoção (%)
0	51412	488,2	1	0
60	46928	445,7	0,91	8,71

## ANEXO F. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Exemplo de cálculo da atividade enzimática para uma amostra (t=60 min) com extrato enzimático a pH 6 (réplica 1):

$$\text{Atividade enzimática } \left(\frac{U}{L}\right) = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \cdot \frac{V_r}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s} \cdot 10^6 \quad \leftrightarrow$$
$$\leftrightarrow \text{Atividade enzimática } \left(\frac{U}{L}\right) = \frac{1,857 - 0,167}{1 - 0} \cdot \frac{950}{49600 \cdot 1 \cdot 450} \cdot 10^6 = 79,04 \text{ U/L}$$

## ANEXO G. CÁLCULO DA REMOÇÃO DE FLUOXETINA

Exemplo de cálculo da remoção de fluoxetina para uma amostra (t=60 min) com extrato enzimático a pH 6 (réplica 1):

$$[FLX] = \frac{\text{Área do cromatograma} - \text{interseção}}{\text{Declive}} \times \text{Fator de diluição} \quad \leftrightarrow$$

$$[FLX] = \frac{(39163 - 213)}{121} \times \frac{1040}{1000} = 334,7 \text{ µg/L}$$

$$\text{Remoção (\%)} = \left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right) \times 100 \quad \leftrightarrow \quad \text{Remoção (\%)} = \left(1 - \frac{334,7}{445,7}\right) \times 100$$
$$= 24,9\%$$