

Avaliação do potencial de fungos para remoção de compostos emergentes

Carla Filipa Pimenta Rocha

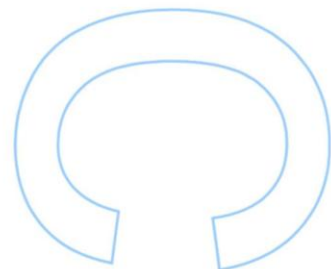
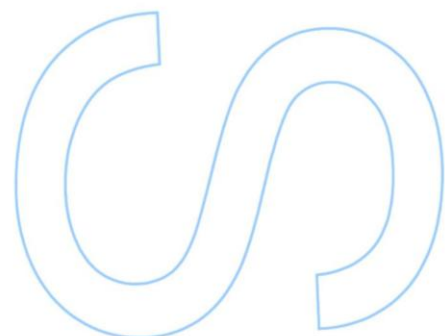
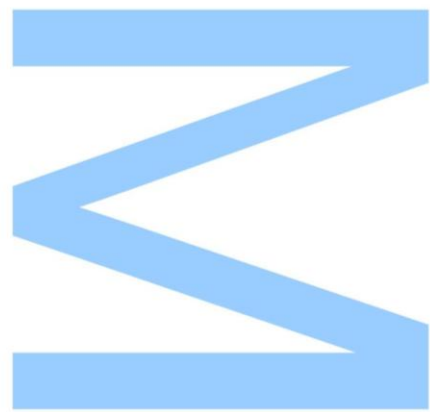
Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água
Departamento de Biologia
2013

Orientador

Ruth Maria Oliveira Pereira, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Ana Cristina Freitas, Professor Auxiliar do ISEIT/Instituto Piaget de Viseu e Estagiária de Pós-Doutoramento do CESAM-Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro.

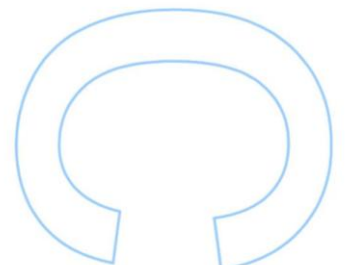
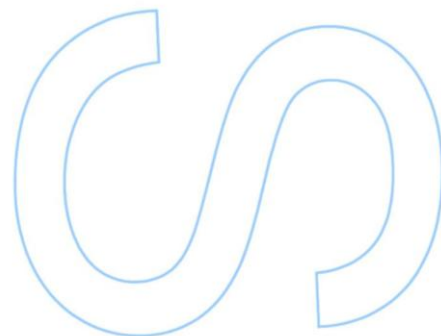
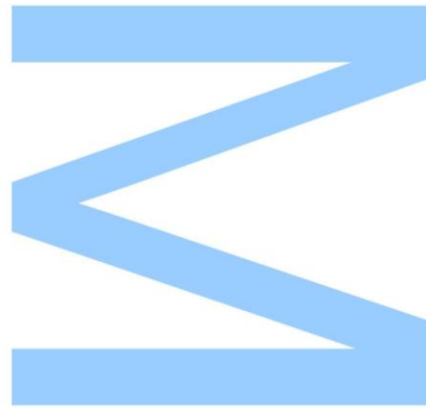




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Quero expressar os melhores agradecimentos e o meu profundo reconhecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste trabalho:

À Doutora Ruth Pereira agradeço a orientação científica, o incentivo, a confiança depositada, a disponibilidade e o apoio ao longo de todo o trabalho em especial durante a escrita da tese e a revisão final;

À Doutora Ana Cristina Freitas agradeço a orientação prática, a disponibilidade e a confiança depositada em mim;

À coordenadora do mestrado Professora Maria Natividade Vieira, por todo o apoio dado ao longo destes dois anos, pela ajuda prestada e pelo incentivo;

Às técnicas da Faculdade de Ciências Liliya, Teresa e D. Helena por todo o apoio e ajuda ao longo do trabalho;

À Ana Gavina o meu sincero obrigado pelo apoio e ajuda, e toda a amizade partilhada ao longo deste trabalho;

À Margarida, agradeço todo o companheirismo e ajuda prestada durante a parte prática e teórica;

Aos meus companheiros de laboratório, agradeço toda a amizade e carinho;

Aos meus pais, que são as pessoas que mais me ajudaram, pois sem eles este sonho não se podia tornar realidade, obrigado por todo o amor e dedicação;

A todos os meus amigos, agradeço a amizade, carinho, apoio e incentivo que sempre me deram em todos os momentos;

E por fim agradeço ao meu marido João Pereira, por me ter aturado todas as vezes que estava stressada, por me apoiar e ajudar sempre;

A todos um muito obrigado!!

Resumo

Um dos principais objetivos das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) urbanas é receber e tratar as águas residuais com uma elevada carga orgânica, de forma a adquirirem as condições mínimas de qualidade que permitam a devolução ao meio ambiente, sem comprometerem a sustentabilidade dos ecossistemas recetores. O principal problema reside no facto de as ETARs terem sido desenhadas para eliminarem matéria orgânica e nutrientes, não estando preparados para remover uma grande diversidade de compostos emergentes, como os fármacos, que podem estar presentes em concentrações extremamente baixas. O presente trabalho teve assim como objetivo testar a sensibilidade e a capacidade de três espécies de fungos: dois fungos-da-podridão-branca (*Lentinus sajor caju* e *Trametes versicolor*) e *Rhizopus oryzae* para removerem Indometacina e Diatrizoato, um anti-inflamatório não-esteróide e um composto usado como meio de contraste em métodos de diagnóstico, respetivamente. Os fármacos em causa foram selecionados por terem sido detetados em águas residuais urbanas, não sendo removidos pelos métodos tradicionais de tratamento encontrados em ETARs. As concentrações detetadas nas ETARs não causaram efeitos tóxicos agudos em *Daphnia magna*, contudo não se descarta o seu potencial de induzir efeitos sub-letais.

As três espécies de fungos foram expostas a meio de cultura com três concentrações diferentes dos dois fármacos, isoladamente, sendo que a concentração mais baixa corresponde à detetada à entrada e saída de ETARs. No final do ensaio, através da determinação da biomassa seca, calcularam-se as taxas de crescimento diário das três espécies. Os meios de cultura foram analisados por cromatografia líquida de elevada performance (HPLC) para quantificar os níveis de fármaco no meio de cultura no final do ensaio. *Lentinus sajor caju* foi a espécie mais sensível aos dois fármacos, sendo que a sua taxa de crescimento foi significativamente afetada em quase todas as concentrações testadas. Não obstante a sua sensibilidade, a espécie apresentou níveis de eficácia semelhantes na remoção do meio de cultura. As taxas de remoção de Indometacina variaram entre 74,68 e 84,97%, sendo *Rhizopus oryzae* e *Trametes versicolor* as espécies mais eficazes. As taxas de remoção de Diatrizoato foram de 99% para as três espécies de fungos. As espécies de fungos testadas provaram ter uma elevada eficácia na remoção dos fármacos estudados. Contudo, será necessário complementar este estudo submetendo as espécies a misturas destes e de outros compostos emergentes frequentes em águas residuais.

Palavras-chave: compostos emergentes; Indometacina; Diatrizoato; *R. oryzae*; *L. sajo* caju; *T. versicolor*; *D. magna*.

Abstract

The main goal of urban wastewater treatment plants (WWTPs) is to receive and treat wastewaters with a high organic load, in order to attain a minimum quality for their discharge in the environment without compromising the sustainability of receptor ecosystems. However, the WWTPs were designed for eliminating organic matter and nutrients, and are not prepared to remove the large diversity of emerging compounds, as pharmaceuticals, which might be present in extremely low concentrations.

In this context, the main aim of this work was to test the sensitivity and the ability of three species of fungi: two white-rot-fungi (*Lentinus sajor caju* and *Trametes versicolor*) and *Rhizopus oryzae* to remove indomethacin and diatrizoate, a non-steroid anti-inflammatory and a contrast-agent used for diagnostic purposes, respectively. These pharmaceuticals were selected because they were detected in urban wastewaters, and they were not removed by the traditional treatments used in WWTPs. No acute toxicity for *D. magna* was recorded for the concentrations recorded in urban wastewaters. However, potential sublethal effects can not be neglected. The three fungi species were exposed to culture medium containing three different concentrations of the pharmaceutical compounds. The lowest concentration tested were the ones recorded after the treatments provided in WWTPs.

At the end of each exposure period the dry biomass and the daily growth rate of the three species was calculated. The culture medium was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) to quantify the remaining levels of pharmaceuticals in the growing medium, after the contact with the fungi. *Lentinus sajor caju* was the most sensitive species to both pharmaceutical compounds because its growth rate was significantly affected in almost all the concentrations. Despite its sensitivity, this species showed a similar ability to remove indomethacin and diatrizoate from the culture medium, when compared with the other two species. Indomethacin removal rates ranged between 74.68 and 84.97%. *R. oryzae* and *T. versicolor* were the most efficient species, showing the highest removal rates for indomethacin. Diatrizoate removal rates were of 99% for the three fungi species. The fungi species tested proved to have a high ability to remove these pharmaceuticals from aqueous medium.

In the future, it will be necessary to complement this study by subjecting the species studied to mixtures of these and other emerging compounds usually present in wastewaters. **Keywords**

Emerging compounds; Indomethacin; Diatrizoate; *R. oryzae*; *L. sajor caju*; *T. versicolor*; *D. magna*.

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura química da molécula Indometacina de acordo com a base de dados DrugBank.....	14
Figura 2. Estrutura química da molécula Diatrizoato de acordo com a base de dados DrugBank.....	15
Figura 3. Variação da taxa média de crescimento das três espécies de fungos, expostas às diferentes concentrações de Indometacina (CTL-controlo; C1=0,140 $\mu\text{g L}^{-1}$ C2=0,280 $\mu\text{g L}^{-1}$ e C3=0,560 $\mu\text{g L}^{-1}$). As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias e os asteriscos correspondem a diferença significativa relativamente ao controlo, para cada uma das espécies de fungos.	23
Figura 4. Variação da taxa média de crescimento das três espécies de fungos, expostas às diferentes concentrações de Diatrizoato (CTL-controlo; C1=3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$; C2=7,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e C3=14,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias e os asteriscos correspondem a diferenças significativas relativamente ao controlo de acordo com o teste de Dunnett, para cada uma das espécies de fungos..	23
Figura 5. Variação das taxas de remoção de de Indometacina efetuadas pelas três espécies de fungos, quando expostas às diferentes concentrações do fármaco (C1=0,140 $\mu\text{g L}^{-1}$; C2=0,280 $\mu\text{g L}^{-1}$ e C3=0,560 $\mu\text{g L}^{-1}$). As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias e os asteriscos correspondem a diferenças significativas entre concentrações de acordo com o teste Tukey de comparações múltiplas, para cada uma das espécies de fungos.....	24
Figura 6. Variação das taxas de remoção de de Diatrizoato efetuadas pelas três espécies de fungos, quando expostas às diferentes concentrações do fármaco (C1=3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$; C2=7,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e C3=14,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias e os asteriscos correspondem a diferenças significativas entre concentrações de acordo com o teste Tukey de comparações múltiplas, para cada uma das espécies de fungos.....	24

Lista de tabelas

Tabela 1. Principais classes de compostos utilizados nos hospitais (Tabela adaptada de Kumerer, 2001; Ternes and Joss, 2006; Schuster et al., 2008).....	6
Tabela 2. Resumo dos principais tratamentos testados e descritos na bibliografia para a remoção de compostos emergentes em águas residuais	7
Tabela 3. Concentrações testadas de Indometacina no ensaio agudo de <i>D. magna</i> ..	13
Tabela 4. Composição do meio para testes de toxicidade com organismos de água doce, Meio ASTM (OCDE 2004).....	14
Tabela 5. Gamas de concentrações testadas nos ensaios de degradação com as quatro espécies de fungos	17
Tabela 6. Valores de pH e de oxigénio dissolvido, medidos no início e no final do ensaio com Indometacina numa réplica selecionada aleatoriamente para cada concentração testada no ensaio de toxicidade aguda com <i>D. magna</i>	21
Tabela 7. Valores de pH e de oxigénio dissolvido medidos no início e no final do ensaio com Diatrizoato numa réplica selecionada aleatoriamente para cada concentração testada no ensaio de toxicidade aguda com <i>D. magna</i>	21
Tabela 8. Número de organismos imóveis por concentrações de indometacina testada a taxa de imobilização respetiva	22

1. Introdução

1.1. Qualidade da água

A água é um bem necessário e imprescindível para o ser humano. Para que a água seja considerada de boa qualidade para consumo humano é necessário que seja desprovida de microrganismos causadores de doenças e de poluentes orgânicos e inorgânicos. Deve também, reunir três condições essenciais: ser inodora, incolor e insípida (Pontius, 1990). Assim, a importância e a disponibilidade limitada deste recurso, faz com que possua um enorme valor económico, ambiental e social.

Atualmente, o planeta debate-se com uma crise a nível global, resultante do aumento da população e, subsequente aumento do consumo de água, aliado ao seu desperdício. Situação esta que será ainda enfatizada no futuro, em virtude das alterações climáticas e do papel que estas vão ter no aumento das assimetrias em termos de distribuição de água no planeta. Atualmente, um terço da população mundial vive já em regiões com elevadas carências de água, sendo que mais de mil milhões de pessoas não têm acesso a recursos de água doce seguros e 2,6 mil milhões de pessoas não têm acesso a saneamento básico adequado (WHO 2005).

Após a utilização humana, para os mais diversos fins, a água passa a ser denominada de água residual (Metcalf e Eddy, 2004).

As águas residuais podem ser classificadas com base na sua origem, sendo a sua definição dada pelo Decreto - Lei nº 152/97, de 19 de Julho (MA 1997), que transpõe para o quadro legal nacional a diretiva comunitária nº 91/271/CEE do Conselho, de 21 de Maio (CEE 1991). Assim, estas podem ser definidas como: i) águas domésticas, quando resultam fundamentalmente do metabolismo e atividades humanas e provêm de residências e/ou serviços; ii) industriais, quando resultam de qualquer origem que não doméstica ou pluvial e, iii) urbanas, quando são domésticas e, resultam da mistura das domésticas com industriais e/ou pluviais (MA 1997).

Além de uma elevada carga orgânica, as águas residuais transportam elevadas quantidades de poluentes, que precisam de ser retirados das massas de água, pois caso persistam podem prejudicar a qualidade dos meios recetores, comprometendo assim a fauna e a flora, bem como toda a sustentabilidade dos ecossistemas

aquáticos, de todos os serviços que eles prestam e das atividades que suportam como, por exemplo, o fornecimento de água, a pesca e as atividades balneares. As estações de tratamento de águas residuais foram desenhadas para eliminação de resíduos para que a água seja devolvida ao meio ambiente nas condições ambientais seguras.

1.2. Legislação nacional e Europeia relativa ao tratamento e descarga de águas residuais

De acordo com o mencionado previamente, o Decreto – Lei nº 152/97, de 17 de Julho, transpõe para o direito nacional parte da diretiva comunitária nº 91/271/CEE do Conselho, de 21 de Maio (CEE 1991) e regulamenta as condições gerais que devem ser respeitadas quer na utilização do domínio hídrico, quer na descarga de águas residuais urbanas (MA 1997). O presente diploma define ainda os diferentes tipos de tratamento a efetuar, nomeadamente tratamento primário, secundário e apropriado, estabelecendo que o licenciamento de descargas de águas urbanas só pode ser efetuado se o tratamento secundário das mesmas for garantido (nº1, do art. 5º). O Decreto - Lei nº 348/98, de 9 de Novembro (MA 1998a) veio transpor a diretiva 98/271/CEE, de 21 de Fevereiro, que alterou a diretiva anterior no sentido de tomar medidas mais restritivas no que refere às concentrações de azoto e fósforo nas águas residuais antes da sua descarga em zonas sensíveis (MA 1998b). Na década de 90, muitas portarias vieram definir as normas de descarga de águas residuais industriais de diferentes origens (e.g. indústrias da pasta de papel, curtumes, alimentar, etc.). O Decreto - Lei nº 236/98, de 1 de Agosto, vem estabelecer as normas de descarga de águas residuais na água e no solo, de modo a garantir a proteção do solo e dos ecossistemas aquáticos. Para o efeito, define, no seu anexo XVIII, os valores limites de emissão (VLE) para um conjunto limitado de parâmetros e substâncias, incluindo entre outros, metais, óleos e gorduras, fenóis, detergentes e cianetos (MA 1998). Esta legislação previa e prevê o controlo das descargas individuais, sem, contudo, ter em consideração os efeitos acumulativos das descargas nos meios recetores.

Em 2000, a Diretiva Quadro da Água (DQA), diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro, transposta pela Lei da Água (Lei nº 58/2005, de 29 de Dezembro), estabeleceu uma nova política de proteção dos recursos de água doce, tendo por base uma visão ecossistemática dos mesmos, segundo a qual a manutenção da sua qualidade, só será garantida se a

sustentabilidade do ecossistema como um todo for garantida (AR 2005). Subsequentemente, e ao contrário da legislação anterior, este novo documento legal vem impor não apenas a avaliação do estado químico, mas também do estado ecológico da água (Moss, 2008). Deste modo, a proteção dos recursos de água doce torna-se mais efetiva, na medida em que, além do controlo de qualidade das descargas, prevê-se a monitorização do estado das comunidades biológicas, que vão integrar os efeitos cumulativos das mesmas (Hering et al., 2006; Moss, 2008). Na senda do combate à poluição, e de forma a avaliar o estado químico do meio aquático (art. 16º da DQA) a Comissão Europeia propôs ainda a apresentar uma lista de substâncias prioritárias (a definir com base no seu risco para o meio ambiente) e a desenvolver medidas que promovam a redução progressiva das descargas destas substâncias, ou de quaisquer outras substâncias perigosas que ponham em risco os objetivos definidos para 2015 (art. 30º do DL nº 58/2005, de 29 de Dezembro) (AR 2005). Oito anos depois, a diretiva nº 2008/105/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro (CE 2008), transporta em Portugal pelo Decreto-Lei nº 103/2010, de 24 de Setembro (MAOT, 2011), vem estabelecer as normas de qualidade ambiental (NQA) para as 33 substâncias prioritárias definidas (anexo I do DL nº 103/2010, de 24 de Setembro) e ainda 8 substâncias adicionais consideradas como poluentes perigosas (anexo II do DL nº 103/2010, de 24 de Setembro). A legislação nacional estabelece ainda que cabe às regiões hidrográficas a responsabilidade de elaborar inventários das descargas e perdas destas substâncias nas bacias hidrográficas debaixo da sua jurisdição de monitorizar a presença das mesmas nas águas superficiais e de verificar o cumprimento das NQAs. A lista de substâncias prioritárias inclui desde metais, pesticidas, ftalatos, hidrocarbonetos aromáticos e disruptores endócrinos (CE 2008). Ainda que inovadores, a aplicação destes novos documentos legais tem enfrentado grandes dificuldades e a sua eficácia pode ser discutível. Apesar de a lista ser numerosa e diversificada, o número está longe de englobar a grande diversidade de compostos químicos que atingem as águas superficiais, muitos dos quais serão ainda desconhecidos, devido a, entre muitos outros aspetos, serem metabolitos, alguns desconhecidos dos processos de degradação de compostos químicos no meio ambiente. Por outro lado, e ainda que a DQA preveja uma revisão da lista de substâncias prioritárias (nº4, do artigo 16º) a cada quatro anos, de forma a integrar a nova informação científica referente às avaliações de riscos a serem efetuadas (CE, 2000), dificilmente se conseguirá alguma vez integrar nesta lista todas as potenciais substâncias perigosas. Por outro lado, no que refere à aplicação da diretiva, a deteção das substâncias químicas nas matrizes ambientais tem-se revelado um grande desafio do ponto de vista analítico (Coquery et

al., 2005). Entre outros aspetos, a harmonização de metodologias analíticas entre estados membros terá que ser feita; será preciso desenvolver métodos analíticos para a deteção de algumas substâncias, para as quais estes ainda não estão disponíveis e melhorar os níveis de deteção e a sensibilidade de muitos dos métodos existentes (Coquery et al., 2005).

Em muitos estados-membros e provavelmente a nível mundial, a redução das descargas das substâncias prioritárias já identificadas e de outras que se possam vir a identificar, prevista na DQA, será ainda outro aspeto complexo, na medida em que a grande maioria das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) foram desenhadas para efetuar tratamento secundário, sendo poucas as que efetuam tratamento terciário (Larsen et al., 2004). Qualquer um destes tipos de tratamento é eficaz na remoção de resíduos orgânicos sólidos, nitratos e fosfatos, mas tem uma baixa eficácia na remoção de outros compostos químicos (Altin et al., 2003).

1.3. Compostos Emergentes

Nos últimos anos, têm aumentado as preocupações com a presença de poluentes emergentes nas águas de superfície e nas águas subterrâneas (Daughton e Ternes, 1999; Heberer, 2002; Barceló, 2003; Daughton, 2004; Petrovic et al., 2009).

Os compostos emergentes ou compostos de preocupação emergente (CPE) apresentam-se como poluentes sem regulamentação, produzidos pelo Homem e que se encontram no ambiente em concentrações traço (Murray et al., 2010). Neste grupo podemos encontrar: surfatantes, substâncias componentes de produtos de higiene pessoal, de limpeza e desinfeção, disruptores endócrinos, aditivos de gasolina, drogas ilícitas, fármacos, cafeína, novos pesticidas e muitos outros grupos de compostos, incluindo aqueles que podem derivar da degradação ou da combinação de outros compostos químicos (Barceló, 2003; Naidu e Wong, 2013).

Na verdade, muitos dos CPEs provêm do uso doméstico, industrial e hospitalar, tendo sido libertados em larga escala, de modo cumulativo, no meio ambiente, e que, neste momento, pelo facto de aí persistirem começam a ser detetados (Deblonde et al., 2011; González et al., 2012; Martín et al., 2012; Santos et al., 2012; Writer et al., 2013; Kosma et al., 2014).

A estrutura química de uma grande maioria dos compostos emergentes torna-os difíceis de remover nos tratamentos convencionais, não só devido ao seu reduzido tamanho e às suas propriedades hidrofóbicas, mas também ao facto de as suas concentrações à chegada das ETARs estarem na gama dos 10^{-3} e dos 10^{-6} mg/L, sendo, por isso, concentrações muito inferiores às dos macropoluentes, o que, de facto, constitui uma dificuldade para a sua remoção pelos tratamentos convencionais (Larsen et al., 2004).

Os fármacos estão entre um dos grandes grupos de CPEs (Murray et al., 2010). A sua libertação para o meio ambiente representa um grave problema, pois estes são especialmente produzidos para afetar funções bioquímicas e fisiológicas nos seres humanos e nos animais, pelo que existe forte possibilidade de muitos destes compostos e respetivos metabolitos se manterem ativos no meio ambiente, atuando sobre organismos não-alvo, provocando efeitos subletais, como, por exemplo, perturbações do sistema endócrino (Ikeahata et al., 2006; Jjemba, 2006) ou desenvolvimento de resistência nos microrganismos aquáticos (e.g. antibióticos) (Rizzo et al., 2013). O seu efeito real sobre o meio ambiente depende da sua natureza química, concentração, bem como de outros fatores químicos, coeficientes de adsorção, tempo de exposição, bioacumulação e persistência (Esplugas et al., 2007).

Nas últimas décadas os fármacos têm sido usados em todo o mundo em quantidades elevadas (Kummerer, 2001; Ternes e Joss, 2006; Jjemba, 2006; Lienert et al., 2007; USEPA, 2009). Estima-se que o consumo anual *per capita* de fármacos, a nível mundial, seja de 15g, sendo este consumo três vezes superior nos países desenvolvidos (Zhang et al., 2008). Entre os fármacos mais consumidos, pode-se destacar o ibuprofeno, analgésico conhecido mundialmente como um fármaco consumido regularmente, pelo fato de ser de venda livre, com taxas elevadas em alguns países como: França, Alemanha, Espanha e Canadá. Os antibióticos estão igualmente entre os fármacos mais consumidos, podendo-se referir, por exemplo, que nos Estados Unidos por ano são consumidos 23.000 toneladas de antibióticos (Ternes e Joss, 2006).

Os hospitais são igualmente uma importante fonte destes compostos, mas nem todos são utilizados da mesma forma, existindo fármacos utilizados com mais regularidade, como mostra a tabela 1. Como resultado da frequente utilização, a presença de resíduos de fármacos tem sido registada por diversos estudos em (ETARs) em diferentes países, tendo-se, igualmente, provado que a remoção de muitos destes compostos através dos tratamentos convencionais não é totalmente

eficaz (Kummerer, 2001; Petrovic et al., 2003; Carballa et al., 2004; Onesios et al., 2009; Verlicchi et al., 2010).

Tabela 1. Principais classes de compostos utilizados nos hospitais (tabela adaptada de Kumerer, 2001; Ternes and Joss, 2006; Schuster et al., 2008).

Classe	Exemplos
Antibióticos	Cefazolina, chlortetracycline, ciprofloxacino, coprofloxacino, doxiciclina, eritromicina, lincomicina, norfloxacino, pofloxacin, oxitetraciclina, penicilina, sulfametoxazol, tetracycline, trimetoprima.
Analgésicos e anti-inflamatórios	Codeína, diclofenac, dipirona, ibuprofeno, indomethacina, cetoprofeno, ácido mefenâmico, naproxeno, paracetamol, ácido salicílico
Citostáticos	5 – Fluorouracila, ifosfamida
Anestésicos	Propofol
Desinfetantes	Triclosan, glutaraldeído
Elementos raros da terra	Gadolinium
Metais	Platina, mercúrio
Meios de contraste (ICM)	Iopromida, iopamidol

Tal como acima referido, as ETARs Municipais foram construídas com o objetivo de remover carbono, azoto e fósforo, bem como, agentes patogénicos, pelo que, os tratamentos convencionais não se destinam a remover micropoluentes. Deste modo, será necessário desenvolver métodos de tratamento complementares, existindo, já reportados na literatura, diversos estudos que tiveram como objetivo testar a eficácia de diferentes tipos de tratamento químico (Jurgens et al., 2002) e/ou biológico (Jansen et al., 2009) para o efeito. Alguns destes tratamentos estão resumidos na tabela 2. Contudo, e em paralelo, existem estudos que procuram perceber qual a eficácia dos tratamentos convencionais na eliminação de alguns dos CPEs dominantes (Joss et al., 2006; Le-Minh et al., 2010) constando que, de facto, a eficácia é sempre bastante limitada e não é semelhante para todos os compostos presentes (Kumerer, 2001; Ternes and Joss, 2006; Schuster et al., 2008).

Tabela 2. Resumo dos potenciais tratamentos testados e descritos na bibliografia para a remoção de compostos emergentes em águas residuais.

Tipo de tratamento	Eficácia
Coagulação/Floculação	Considerado pouco eficaz na remoção de compostos de higiene pessoal (Ternes e Joss, 2006).
Adsorção por carvão ativado	Tem-se verificado como um potencial tratamento, em particular na remoção de compostos não polares com um $\log K_{ow} > 2$. Para disruptores endócrinos, a eficácia de remoção pode ir até aos 90% (Schafer et al., 2003).
Lamas ativadas	Podem atingir rendimentos de degradação variáveis, desde 10 a 70% para anti-inflamatórios (Carballa et al., 2004; Kosjek et al., 2007; Suárez et al., 2005). Degradam compostos como o ibuprofeno e cafeína, no entanto, é menos eficaz do que o processo utilizando reatores de membrana.
Reatores de membrana biológica	Pouco eficiente na remoção, pois as membranas têm espessuras 100 a 1000 vezes maior do que o tamanho físico das partículas (Clara et al., 2005b; Kimura et al., 2007; Radjenovic et al., 2009).
Osmose reversa	Vários estudos apontam este processo como eficaz na remoção de produtos de higiene pessoal e disruptores endócrinos (Shyder et al., 2003; Oppenheimer et al., 2007). Estima-se remoções na ordem dos 90% (Braghetta e Brownawell, 2002).
Nanofiltração	A sua eficácia varia de composto para composto, tendo em conta as propriedades físico-químicas dos micropoluentes, as propriedades da membrana e as condições em que a membrana opera. Apresenta taxas de remoção superiores a

	90% (Yoon et al., 2006; Bolong et al., 2009).
Oxidação e ozonização avançada	O grau de eficácia depende da dose do oxidante, a concentração do fármaco e o modo de operação. A dose de ozono, que é normalmente aplicada, varia entre 5 e 15 mg/L, com um tempo de contacto de 15 a 30 minutos (Ternes et al., 2003; Ternes e Joss, 2006). É o processo que apresenta maior percentagem de remoção (até 100% para o naproxeno) na remoção de anti-inflamatórios (Gagnon et al., 2008; Mendez-Arriaga et al., 2010).
Polimento natural através das águas residuais através da construção de zonas húmidas	A existência de condições aeróbias, anaeróbias e anóxicas em proximidade com raízes das plantas promove a redução das concentrações dos compostos farmacêuticos. As condições aeróbias são aquelas que apresentam uma maior eficácia (Andreozzi et al., 2003; Bartels e Von Tumpling, 2008; Zhou et al., 2009).
Photo – fenton	Este tratamento leva a cabo a oxidação dos compostos orgânicos sob radiação ultravioleta na presença do ião ferro em meio ácido, obtendo-se taxas de remoção entre os 80% aos 100% (Gagnon et al., 2008; Mendez-Arriaga et al., 2010).

1.4. Tratamentos biológicos: os Fungos-da-podridão-branca

Muitos estudos têm sido feitos sobre o papel dos microorganismos na degradação de compostos emergentes, como fármacos (Kirk et al., 2008). Tal como revisto por Velicchi et al. (2010), o enfoque tem sido, sobretudo, na adaptação dos sistemas de lamas ativadas convencionais, alterando, entre outros fatores, os tempos de retenção de forma a promover o desenvolvimento de microrganismos de crescimento mais lento (e.g. bactérias nitrificantes), aumentando, deste modo, a diversidade de microrganismos presentes no sistema, assim como dos processos metabólicos que executam. Deste modo, existe a expectativa de que estes sejam capazes de metabolizar uma maior diversidade de micropoluentes, alguns deles recalcitrantes. O aumento dos tempos de retenção tem sido testado, entre outros processos, através da aplicação de membranas bioreatoras, que separam a fase

sólida da fase líquida, mantendo as lamas no reator (Rizzo et al., 2013). Contudo, invariavelmente, tem sido constatado, nos diversos estudos, que nem todos os compostos são degradados da mesma forma, apresentando, por isso, taxas de remoção muito variáveis nas ETARs municipais no final do tratamento biológico, o que leva a que apenas ocorra uma redução muito limitada das cargas de fármacos e outros CPEs que entram nos meios recetores (Joss et al., 2006). Neste sentido, torna-se crucial o desenvolvimento de novos tratamentos químicos, físicos ou biológicos que deem resposta a este problema.

Entre os microrganismos promissores para novos tratamentos terciários encontram-se os fungos, os maiores decompositores da biosfera, com a capacidade de degradar moléculas orgânicas complexas.

Os fungos são microrganismos ubíquos, presentes na natureza e nos mais variados ambientes. A sua dispersão é feita de diferentes formas e por diferentes agentes: insetos e outros animais, homem, água e, principalmente, através das massas de ar. São organismos notáveis pela habilidade de se poderem nutrir a partir das mais diversas moléculas, desde as mais simples, como os açúcares, às mais complexas, como os hidrocarbonetos complexos (e.g. lignina e a celulose). São formados por células com o núcleo isolado por membrana (eucariontes), parede celular rígida, imóveis, heterotróficos, osmotróficos (absorvem o alimento, em vez de ingeri-lo) e a sua reprodução pode ser sexuada ou assexuada (Pereira et al., 2003).

Os fungos degradam, preferencialmente, macromoléculas insolúveis, em unidades mais pequenas e solúveis, para, depois, poderem ser assimiladas, como, por exemplo, os polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina, lípidos e outros compostos que sejam insolúveis e com elevado peso molecular. Assim, os fungos absorvem nutrientes de baixo peso molecular dissolvidos em água através da membrana plasmática, e para o efeito segregam enzimas específicas para o meio exterior, que irão reduzir o tamanho das moléculas e aumenta a sua solubilidade (Putzke, 2002).

Nos ecossistemas florestais, os fungos-da-podridão-branca (do inglês: *white-rot-fungi*) destacam-se pela sua capacidade única de degradar a lignina por completo, de forma a atingirem a celulose (Aust and Benson, 1993; Baldrian, 2003). A sua designação comum resulta exatamente do aspeto esbranquiçado adquirido pela madeira, conferido pelas fibras de lignina em decomposição. A degradação da lignina, um polímero complexo, é conseguida através de um conjunto de enzimas

extracelulares, que recebem a designação genérica de oxiredutases, porque têm a capacidade de catalisar reações altamente reativas e de baixa especificidade, e que envolvem a produção de radicais livres de oxigénio, que, por sua vez, vão degradar a lignina (Aust and Benson, 1993; Wesenberg et al., 2003). As principais enzimas produzidas por estes fungos, designadas por enzimas modificadoras da lignina (EML), são: a manganês peroxidase (MnP), lacases (Lac) e lignina peroxidase (LiP) (Reddy, 1995). Nem todos os fungos-da-podridão-branca produzem as mesmas enzimas, sendo que as MnP têm um papel determinante na degradação da lignina, ao contrário das LiP que não são essenciais para o processo (Wesenberg et al., 2003). A produção destas enzimas depende de várias condições, incluindo a composição química do meio onde os fungos se estão a desenvolver. Embora a sua produção seja geralmente estimulada pela carência de nutrientes, estas enzimas são produzidas durante o metabolismo secundário destes fungos, na medida em que eles não utilizam a lignina como fonte de carbono e outros nutrientes (Reddy, 1995; Wesenberg et al., 2003). Em adição ao seu sistema enzimático de baixa especificidade, os fungos-da-podridão-branca possuem ainda a capacidade de levar a cabo mecanismos de degradação intracelular, que envolvem o citocromo P450 (Marco-Urrea et al., 2010) e ainda mediadores naturais como fenóis relacionados com a lignina ou ácidos gordos insaturados presentes no micélio das hifas (Marco-Urrea et al., 2011). Estes mediadores naturais estimulam a atividade enzimática.

A diversidade de mecanismos de degradação altamente específicos e eficazes dos fungos-da-podridão-branca estão na base da capacidade destes para degradarem uma grande diversidade de contaminantes complexos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), clorofenóis, bisfenol A, nitrotoluenos, pesticidas, bifenilos policlorados (PCBs), TNT e outros nitroexplosivos, cianetos, azidas, pigmentos, tetracloreto de carbono, fármacos e disruptores endócrinos (e.g. Aust and Benson, 1993; Reddy, 1995; Chen et al., 2010; Marco-Urrea et al., 2010; Marco-Urrea et al., 2011; Loffredo et al., 2012; Yang et al., 2013). Esta capacidade persiste quando estes compostos se encontram em misturas complexas, como as que se encontram em águas residuais de diversas atividades industriais (e.g. efluentes de tinturarias, efluentes de lagares de azeite e de pasta de papel) ou em águas residuais urbanas (Cruz-Morató et al., 2013), onde são capazes de degradar poluentes orgânicos de forma indiferenciada (D'Annibale et al., 1998; Pereira et al., 2009; Wesenberg et al., 2003), mesmo quando presentes em baixas concentrações nestas matrizes complexas (Cruz-Morató et al., 2013). Estes tratamentos têm ainda a possibilidade de ser realizados quer com a biomassa fúngica, quer com as enzimas modificadoras de

lignina (e.g. Majeau et al., 2010). Contudo, neste último caso, os mediadores naturais das reações enzimáticas têm que ser substituídos por substratos oxidáveis que funcionem com intermediários redox, entre os centros ativos das enzimas e os substratos não fenólicos (Majeau et al., 2010). Os tratamentos com EMLs apenas têm sido aplicados em laboratório, dadas as dificuldades em produzir enzimas em grandes quantidades (Majeau et al., 2010).

1.5. Objetivo do trabalho

Tendo por base as capacidades dos fungos-da-podridão-branca para degradarem uma grande diversidade de xenobióticos, alguns de elevada toxicidade para outros seres vivos, e os relatos, cada vez mais frequentes, de ocorrência de CPEs nas águas residuais urbanas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de 2 espécies de fungos-de podridão-branca (*Trametes versicolor*, e *Lentinus sajor caju*) e ainda *Rhizopus oryzae*, para degradarem dois fármacos já identificados em águas residuais urbanas e para os quais as taxas de remoção nas ETARs são reduzidas ou nulas, nomeadamente a indometacina (anti-inflamatório) e o diatrizoato (agente radio-contrastante). Para o efeito, foi avaliado o crescimento das diferentes espécies de fungos em meio de cultura líquido com diferentes concentrações dos dois CPEs, testadas individualmente, e próximas das que ocorrem no meio ambiente. Dado que não existem dados de toxicidade para estes compostos, começou-se, igualmente, por se fazer uma avaliação da toxicidade aguda destes CPEs para a *Daphnia magna*.

2. Material e Métodos

2.1. Toxicidade

Dada a ausência de dados de toxicidade para os dois fármacos em estudo, realizaram-se ensaios de toxicidade aguda com *D. magna*, seguindo o protocolo padronizado (OCDE, 2004). A escolha desta espécie para iniciar a recolha de dados ecotoxicológicos, foi feita com base na sua importância ecológica nas cadeias tróficas dos meios recetores. Os organismos teste foram obtidos de uma cultura laboratorial, mantida em “ASTM hard water” com a composição química descrita na tabela 4. As soluções *stock* dos diferentes compostos são mantidas em frascos de vidro, no frigorífico, a 4°C. O meio de cultura ASTM é preparado, semanalmente, num bidão de plástico de 20 litros, com o pH ajustado a valores entre 6 e 9.

Para avaliar a toxicidade do diatrizoato e da indometacina, o organismo teste foi exposto a diferentes concentrações (como descrito na tabela 3) dos dois compostos, após a realização de ensaios preliminares, que começaram por testar concentrações mais baixas, baseadas no trabalho Deblonde et al. (2001), que reporta as concentrações dos dois fármacos à saída das ETARs. Em cada réplica (4 ao todo por concentração mais o controlo) adicionaram-se 20 mL da diluição a testar e 5 neonatos, nascidos entre a 3^a e a 4^a ninhada, com menos de 24 horas. Após a preparação das diferentes réplicas do ensaio, mediu-se o pH e o oxigénio dissolvido de cada solução, adicionando, posteriormente, os organismos e o ensaio decorreu à temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h^L:8 h^E. Às 24 horas, observou-se a imobilidade dos organismos em cada tubo, retirando-se os organismos imóveis e, às 48 horas deu-se o ensaio por terminado, registando-se de novo os organismos imóveis e procedendo-se à leitura do pH e do oxigénio dissolvido.

Tabela 3. Concentrações testadas de indometacina e diatrizoato no ensaio agudo de *D. magna*.

Concentrações $\mu\text{g L}^{-1}$ (factor de diluição 1,4)	
Indometacina	Diatrizoato
0,000	0,000
10,00	132,81
14,00	185,93
19,60	260,31
27,44	364,43
38,42	510,20
53,78	714,29
—	1000,00

Tabela 4. Composição do meio para testes de toxicidade com organismos de água doce, Meio ASTM (OCDE, 2004).

Fórmula Química	Quantidade de composto para a solução <i>stock</i>	Volume de solução concentrada para 20 litros de meio de cultura
NaHCO_3	$19,20 \text{ g L}^{-1}$	200 mL
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$24,57 \text{ g L}^{-1}$	200 mL
KCl	$0,80 \text{ g L}^{-1}$	200 mL
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot 8$	$2,40 \text{ g L}^{-1}$	2 L
Tiamina HCl (B1) Biotina (H) Cianocobalamina (B12)	$0,150 \text{ g L}^{-1}$ $0,002 \text{ g L}^{-1}$ $0,0015 \text{ g L}^{-1}$	1 mL de solução combinada com vitaminas

2.2. Fármacos

2.2.1 Indometacina

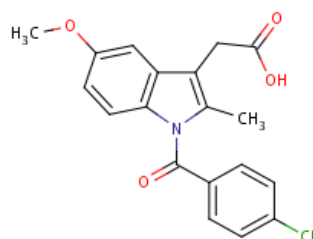


Figura 1. Estrutura química da molécula Indometacin de acordo com a base de dados DrugBank.

De acordo com a base de dados DrugBank¹, a indometacina é um medicamento pertencente ao grupo farmacoterapêutico dos anti – inflamatórios não esteróides-com a fórmula química $C_{19}H_{16}ClNO_4$, representada na figura 1. Está indicado para o tratamento de quadros dolorosos e inflamatórios do aparelho locomotor tais como: contusões e entorses; dores musculares ligeiras e moderadas; infeções reumáticas dos tecidos moles: tendinite, tenossinovite, periartrose do ombro; infeções reumatismais degenerativas: artrose (incluindo a da coluna vertebral). Inibe a atividade das enzimas ciclooxigenases (COX) responsáveis pela catálise da síntese de diversas prostaglandinas envolvidas na dor, febre e processos inflamatórios a partir do ácido araquidónico. É absorvido pelo organismo em aproximadamente 100% após administração oral e de 80%-90% após administração retal. É eliminada por excreção renal, excreção biliar e pelo metabolismo. Este composto tem um tempo médio de vida de 4,5 h, e a sua solubilidade em água é de 0,937 mg L⁻¹ a 2,4 mg L⁻¹, a uma temperatura de 25°C.

O produto utilizado neste trabalho foi adquirido na empresa Sigma Aldrich. Não obstante o seu tempo de meia vida, a indometacina foi detetada por Deblond et al., (2011) à entrada de ETARs com tratamento secundário por lamas ativadas, em concentrações médias de 0,136 µg L⁻¹. O composto em causa foi selecionado pela facto de a sua taxa de remoção pelos tratamentos convencionais ser nula, pelo que a concentração deste composto na fase líquida se mantém à saída da ETAR, indo atingir os meios recetores.

2.2.2. Diatrizoato

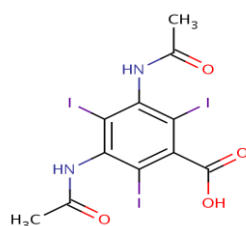


Figura 2. Estrutura química da molécula diatrizoato de acordo com a base de dados DrugBank.

¹<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00328>, acedido em Outubro de 2013.

O diatrizoato é um meio de contraste solúvel em água e iodado, usado com frequência em técnicas de raios-X, sendo que o diatrizoato de sódio, em particular, utilizado no presente estudo, é usado para estudos gastrointestinais, angiografia e urografia². O iodo por ser um elemento eletro-denso dispersa os raios-X causando um bom contraste entre órgãos e tecidos. Com a fórmula química $C_{11}H_9I_3N_2O_4$, o diatrizoato faz parte da classe das aminobenzoates e das acetanilidas com uma boa solubilidade na água até um máximo de 107 mg L^{-1} . Não é metabolizado pelo organismo, sendo excretado, inalterado, através da urina. O fígado e o intestino grosso são as principais vias de excreção alternativa para o diatrizoato.

À semelhança do composto anterior, o diatrizoato foi identificado à entrada de ETARs em concentrações $3,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, apresentando, igualmente, uma taxa de remoção nula pelos tratamentos convencionais (Deblonde et al., 2011).

O composto químico usado no presente trabalho foi adquirido na empresa Sigma Aldrich na forma de diatrizoato de sódio hidratado.

2.3 Fungos: origem e condições de crescimento

Neste estudo foram utilizadas três espécies de fungos basidiomicetes e uma espécie de fungo zigomicete, fornecidos pela Universidade Estadual Paulista (UNESP, Brasil) ou através da BCCMTM/MUCL Culture Collection (Bélgica): *Lentinus sajor caju* (UNESP) (antes designado *Pleurotus sajor caju* (Fries) Singer), *Trametes versicolor* [(Linnaeus:Fries) Pilát, 38412], e *Rizopus oryzae* (Went & Prinsen Geerlings, 31002).

Todos os fungos foram colocados a crescer, sob condições assépticas, a 30°C , exceto *L. sajor caju* que foi colocado a crescer a 25°C . O crescimento foi efetuado em meio de cultura contendo 20 g L^{-1} de extrato de malte, 1 g L^{-1} de peptona e 16 g L^{-1} de agar. Após o crescimento, que ocorreu entre 8 a 10 dias, as culturas foram mantidas a 4°C no meio de crescimento.

Para obtenção da biomassa necessária para os estudos de degradação dos dois fármacos, descritos na secção anterior, procedeu-se ao crescimento de micélio em meio líquido de composição semelhante ao já descrito, mas sem adição de agar e nas mesmas condições de incubação. Micélio de *L. sajor caju* foi obtido após 7 dias de

² <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00271>, acedido em Outubro de 2013.

incubação, a 25°C, sob agitação a 120 ± 10 rpm. Micélio de *T. versicolor* e de *R. oryzae* foram obtidos após 7 dias de incubação, a 30°C, sob agitação a 120 ± 10 rpm. Após os respetivos períodos de crescimento, os diferentes micélios foram recolhidos por filtração com gaze esterilizada e guardados em recipientes estéreis a 4°C.

2.4. Desenho Experimental

A gama de concentrações definida para os dois fármacos utilizados neste estudo foi baseada nas concentrações reportadas por Deblonde et al. (2011), como sendo concentrações registadas à saída das ETARs. Valores aproximados das concentrações reportadas foram tomadas como as concentrações mais baixas, tendo-se aplicado um fator de 2, para obter as outras duas concentrações testadas para cada um dos compostos (Tabela 5) para antever cenários que possam conduzir a concentrações mais elevadas nas águas residuais. Para os ensaios foram preparadas duas soluções *stock* dos compostos, em água destilada, as quais foram vigorosamente agitadas, num agitador magnético durante o tempo necessário para garantir a sua solubilidade, e posteriormente filtradas, utilizando um filtro de acetato de celulose com poro de 0,2 μm da empresa Orange Scientific.

Tabela 5. Gamas de concentrações testadas nos ensaios de degradação com as 3 espécies de fungos.

Diatrizoato ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Indometacina ($\mu\text{g L}^{-1}$)
3,5	0,140
7,0	0,280
14,0	0,560

O meio de cultura dos ensaios foi preparado adicionando extrato de malte (16 g L^{-1}) e peptona micológica (0,8 g L^{-1}) a 800 mL de água destilada, em frascos de 1 L. Cada frasco de meio foi, posteriormente, agitado num agitador magnético e esterilizado num autoclave, à temperatura de 121°C, durante 16 minutos, à pressão de 1 bar.

O ensaio foi realizado em erlenmeyers previamente esterilizados, com 200 mL de meio, cada um, preparando-se, deste modo, 3 réplicas por concentração e controlo com fungo. A cada réplica com fungo, adicionou-se aproximadamente 1 g de biomassa fresca de fungo. Todos os valores de peso fresco iniciais de biomassa adicionada a

cada frasco foram registados. Os erlenmeyers foram posteriormente tapados com uma rolha de gaze e papel de alumínio e colocados em banho-maria com agitação (a 27,5°C durante 10 dias), exceto *R. oryzae*, que se manteve a 27,5°C, mas apenas durante 6 dias, devido ao seu rápido crescimento. Todos os procedimentos foram efetuados com material previamente esterilizado e numa câmara de fluxo laminar.

Para cada fungo, no início de cada ensaio, separaram-se ainda três pedaços de biomassa com cerca de 1 g (peso fresco) que foram colocados na estufa a 100°C, durante 24 horas, até estabilização do peso. Posteriormente, foi feita a pesagem com uma precisão 0,001 g para determinação do peso seco inicial e, subseqüentemente, para determinação de percentagem média de água do fungo. Este valor de percentagem permitiu estimar os valores de peso seco correspondentes aos valores de peso fresco iniciais adicionados a cada réplica.

Após o período de incubação, com o auxílio da pinça retirou-se a biomassa de fungo de cada erlenmeyer, a qual foi colocada numa caixa de alumínio previamente feita e etiquetada para a pesagem. Depois de retiradas as biomassas de fungo de cada erlenmeyer, todas as caixas de alumínio foram colocadas na estufa a 100°C, durante 24 horas. Do meio líquido contido nos erlenmeyers, cerca de 20 ml foram colocados num tubo falcon, para medição do pH, e o restante colocado em frascos de vidro previamente submetidos a lavagem básica e etiquetados para análise química.

Após as 24 horas todas as caixas de alumínio contendo o fungo seco foram retiradas da estufa, colocando-as no excicador para arrefecimento, e procedendo-se, posteriormente, à pesagem (numa balança analítica com 3 casas decimais) para determinação do peso seco de cada porção de biomassa de fungo colocada no início do ensaio.

2.5. Análise química do meio de cultura

As amostras foram pré-concentradas por extração de fase sólida SPE usando cartuchos C18 SPE. Antes da extração de SPE, as amostras foram só submetidas à filtração, utilizando-se uma membrana de nylon com 0,45 µm. Antes da aplicação das amostras, os cartuchos foram anteriormente condicionados com 5 mL de metanol e água (pH 2,0 com HCl), levadas ao vácuo para secar. 25 mL da amostra foram aplicados no cartucho, o seu fluxo foi controlado cerca de 4 mL por minuto. Uma vez carregadas, as amostras foram lavadas com 2 mL de metanol (2%). E após a

secagem, os analitos foram diluídos com 10 mL de metanol. Procedeu-se, posteriormente, à evaporação através de um evaporador rotativo a 50°C, e foram novamente dissolvidos com 1 mL de metanol.

O método utilizado foi um sistema de cromatografia líquida de elevada performance HPLC, que consiste na passagem de água por um detetor de UV. A separação foi conseguida numa coluna (200 mm×3,9 mm I.D., 5 µm). A fase móvel foi lavada com acetonitrila - 0,5% ácido acético (50:50, v/v) e o fluxo era 1,5 mL por minuto. O cromatograma foi monitorizado com o comprimento de onda de 254 nm ao longo da análise. A análise foi realizada à temperatura de 20°C.

A recuperação dos fármacos foi feita com a amostra que não contém indometacina e diatrizoato e amostras que contém os fármacos, que foram fixados com o padrão e processadas através do procedimento descrito. A eficiência da extração foi determinada pela comparação com os resultados do HPLC.

2.6. Tratamento estatístico

A influência do fator concentração de fármaco nas taxas de crescimento das três espécies de fungos assim como nas percentagens de remoção dos fármacos dos meios de crescimento foi analisada com recurso à análise de variância de uma via (ANOVA). No caso das taxas de crescimento, sempre que se registaram diferenças significativas, realizou-se um teste de Dunnet para identificar as diferenças relativamente ao controlo. E no caso das taxas de remoção aplicou-se um teste de Tukey de comparações múltiplas, para avaliar as diferenças deste parâmetro, entre as concentrações de fármacos testadas (Zar, 2010).

3. Resultados

3.1. Ensaio de toxicidade aguda com *D. magna*

Nas tabelas 6 e 7 estão reportados os valores de pH e de oxigénio dissolvido registados no final dos ensaios de imobilização com *D. magna* efetuados para avaliar a toxicidade aguda de indometacina e de diatrizoato. Como é possível verificar, os ensaios podem ser considerados válidos, na medida em que não se registaram alterações marcantes no pH do meio teste e o nível de oxigénio dissolvido permaneceu sempre elevado e superior ao limiar de 3 mg L⁻¹ (OCDE, 2004).

Tabela 6. Valores de pH e de oxigénio dissolvidos, medidos no início e no final do ensaio com indometacina, numa réplica selecionada aleatoriamente para cada concentração, registados no ensaio de toxicidade aguda com *D. magna*.

Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Oxigénio dissolvido (mg L^{-1}) no início e no final do ensaio		pH no início e no final do ensaio	
	53,78	8,69	8,35	7,91
38,42	8,55	8,45	7,99	7,91
27,44	8,47	8,52	7,95	7,91
19,60	8,45	8,47	7,99	7,91
14,00	7,66	8,50	7,94	7,88
10,00	7,99	8,69	7,98	7,79
0,000	7,81	8,47	7,88	7,75

Tabela 7. Valores de pH e de oxigénio dissolvido medidos no início e no final do ensaio com diatrizoato numa réplica selecionada aleatoriamente para cada concentração

Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Oxigénio dissolvido ($\text{mg}^{-1} \text{L}$) no início e no final do ensaio		pH no início e no final do ensaio	
	1000,00	8,59	8,56	6,95
714,29	8,63	8,65	7,02	7,51
510,20	8,52	8,61	7,03	7,42
364,43	8,51	8,50	7,05	7,61
260,31	8,61	8,60	7,10	7,54
185,93	8,46	8,52	7,18	7,64
132,81	8,24	8,26	7,22	7,55
0,000	8,10	8,22	7,19	7,60

Na tabela 8 estão representados os resultados dos ensaios de imobilização para os dois fármacos testados. A indometacina foi o fármaco mais tóxico, para o qual se registou uma percentagem de mortalidade de 60% na concentração de 27,44mg L⁻¹ contudo não foi possível calcular valores de EC₂₀ e de EC₅₀ para *D. magna*. Não obstante a levada toxicidade deste composto, os valores de toxicidade aguda estão cerca de 400 vezes acima das concentrações registadas à saída das ETARs. No que refere ao diatrizoato, foram testadas concentrações até 1000 µg L⁻¹, sem que se tivessem registado efeitos agudos nos organismos. A percentagem de mortalidade foi sempre de 0% para todas as concentrações testadas. Não obstante os resultados obtidos, será de extrema importância avaliar a toxicidade crónica destes compostos, na medida em que efeitos crónicos são esperados a concentrações com maior relevância ecológica.

Tabela 8. Número de organismos imóveis por concentração de indometacina testada e taxa de imobilização respetiva.

Concentrações (µg L ⁻¹)	Total organismos	Mortalidade 24 horas	Mortalidade 48 horas	% Mortalidade 48 horas
53,78	20	0	2	10
38,42	20	0	2	10
27,44	20	0	12	60
19,60	20	0	11	55
14,00	20	0	0	0
10,00	20	0	0	0
0,00	20	0	0	0

3.2. Viabilidade dos fungos-de-podridão-branca e de *Rhizopus oryzae* em meios contaminados com os fármacos

Os gráficos das figuras 3 e 4, representam as taxas médias de crescimento diário para as três espécies de fungos expostas às diferentes concentrações de diatrizoato e indometacina testadas, respetivamente.

Indometacina

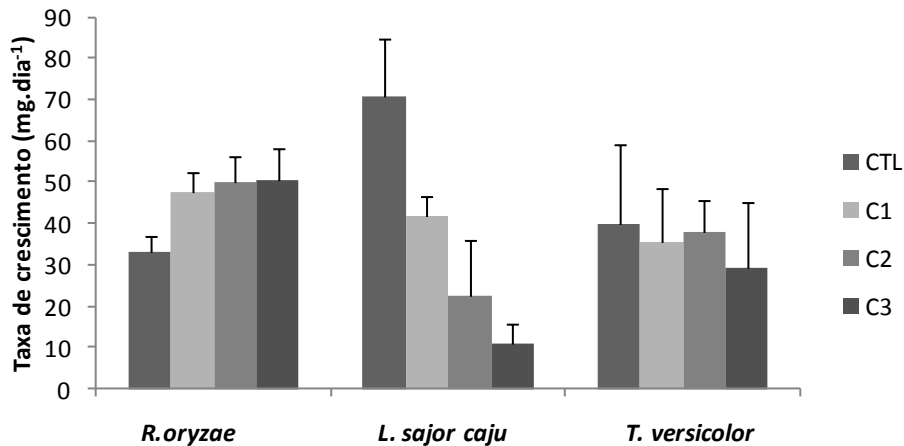


Figura 3. Variação da taxa média de crescimento das três espécies de fungos, expostas às diferentes concentrações de indometacina (CTL-controlo; C1=0,140 µg L⁻¹, C2=0,280 µg L⁻¹ e C3=0,560 µg L⁻¹). As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias e os asteriscos correspondem a diferenças significativas relativamente ao controlo, para cada uma das espécies de fungos.

Diatrizoato

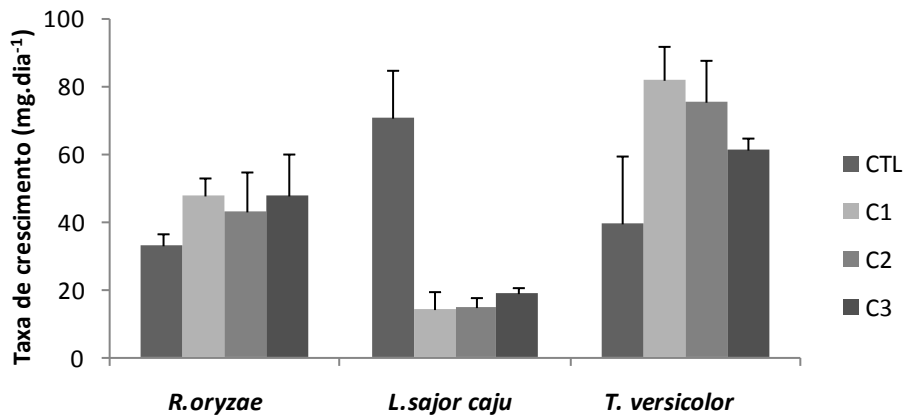


Figura 4. Variação da taxa média de crescimento das três espécies de fungos, expostas às diferentes concentrações de diatrizoato (CTL-controlo; C1= 3,5 µg L⁻¹, C2=7,0 µg L⁻¹ e C3=14,0 µg L⁻¹). As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias e os asteriscos correspondem a diferenças significativas relativamente ao controlo de acordo com o teste de Dunnett, para cada uma das espécies de fungos.

O fungo *L. sajour caju* foi o mais sensível à exposição aos dois fármacos, sobretudo ao diatrizoato (Figuras 3 e 4). A taxa de crescimento desta espécie foi

significativamente diferente nas exposições quer à indometacina ($F=9,49$; d.f. 4, 7; $p=0,027$), quer ao diatrizoato ($F=18,65$; d.f. 4, 7; $p=0,008$), comparativamente ao controlo sem fármaco. Não se registaram diferenças significativas em termos de taxas de crescimento para nenhuma das outras espécies de fungos e nenhum dos fármacos ($p>0,05$). Ao contrário do observado para a espécie *L. sajor caju*, o diatrizoato provocou uma estimulação aparente da taxa de crescimento de *R. oryzae* e de *T. versicolor*, e a indometacina teve o mesmo efeito apenas sobre *R. oryzae*. A taxa de crescimento de *L. sajor caju* começou logo por ser significativamente inibida ($p<0,05$), comparativamente ao controlo, pela concentração mais baixa de diatrizoato a qual é equivalente à registada para este fármaco nas ETARs (De Blonde et al., 2011). No caso da indometacina, apenas as duas concentrações mais elevadas tiveram um efeito inibitório significativo sobre a taxa de crescimento desta espécie.

A figura 5 representa as percentagens médias de remoção de indometacina efetuada pelas diferentes espécies de fungos, quando expostas às diferentes concentrações de fármaco testadas.

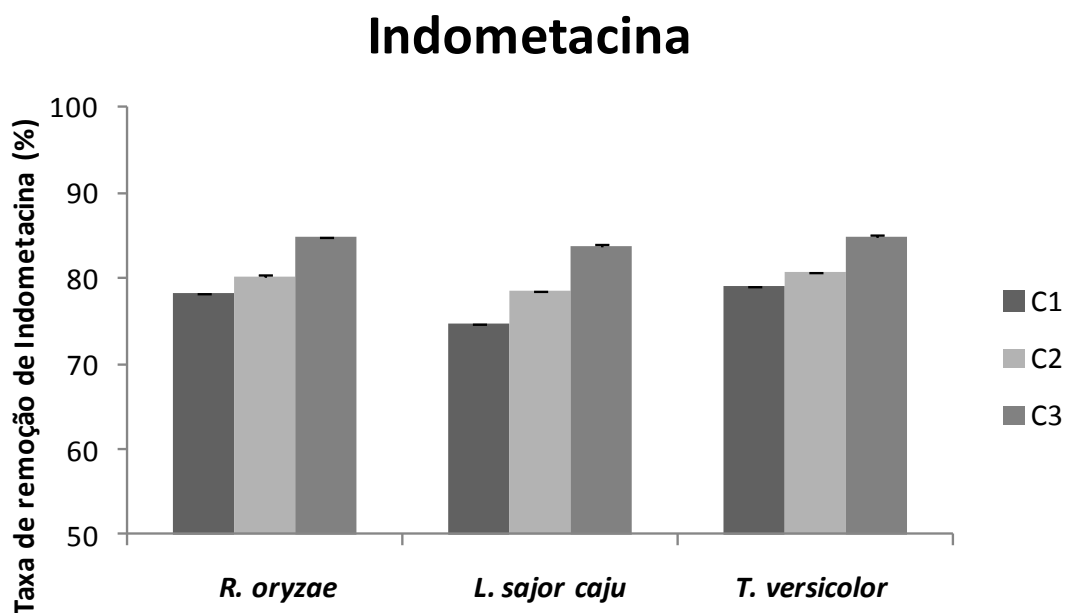


Figura 5. Variação das taxas de remoção de Indometacina efetuadas pelas três espécies de fungos, quando expostas às diferentes concentrações do fármaco (C1= 0,140 $\mu\text{g L}^{-1}$, C2=0,280 $\mu\text{g L}^{-1}$ e C3=0,560 $\mu\text{g L}^{-1}$). As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias e os asteriscos correspondem a diferenças significativas entre concentrações de acordo com o teste Tukey de comparações múltiplas, para cada uma das espécies de fungos.

Para todas as espécies a percentagem de remoção de indometacina aumentou ligeiramente com a concentração do fármaco no meio de crescimento do fungo, sendo que as percentagens mais elevadas de 84,78 e 84,97%, respetivamente, foram alcançadas pelas espécies *R. oryzae* e *T. versicolor*, respetivamente, na concentração mais alta $0,560 \mu\text{g L}^{-1}$. A menor taxa de remoção, 74,68%, foi visualizada no ensaio utilizando *L. sajor caju* na concentração $0,140 \mu\text{g L}^{-1}$. Contudo, é de destacar o facto de não obstante o efeito negativo deste fármaco na taxa de crescimento de *L. sajor caju*, esta espécie ter sido tão eficaz como as outras na remoção do fármaco do meio de cultura. A análise de variância de uma via registou para cada fungo diferenças significativas entre concentrações (*R. oryzae*: $F=2537$; d.f. 6, 8; $p<0,001$; *L. sajor caju*: $F=5079$; d.f. 6, 8; $p<0,001$; *T. versicolor* $F=2146$; d.f. 6, 8; $p<0,001$) no que refere às taxas de remoção.

O diatrizoato foi completamente removido do meio de crescimento dos fungos, em todas as concentrações testadas e para todas as espécies de fungos (Figura 6). No final dos ensaios as taxas de remoção registadas foram sempre de 99% em todas as situações. Não foram registadas diferenças significativas entre concentrações para as três espécies de fungos ($p>0,05$). Uma vez mais, apesar de *L. sajor caju* ter sido significativamente inibido pelo fármaco, desde a concentração mais baixa que foi testada, foi igualmente eficaz na sua remoção do meio de crescimento.

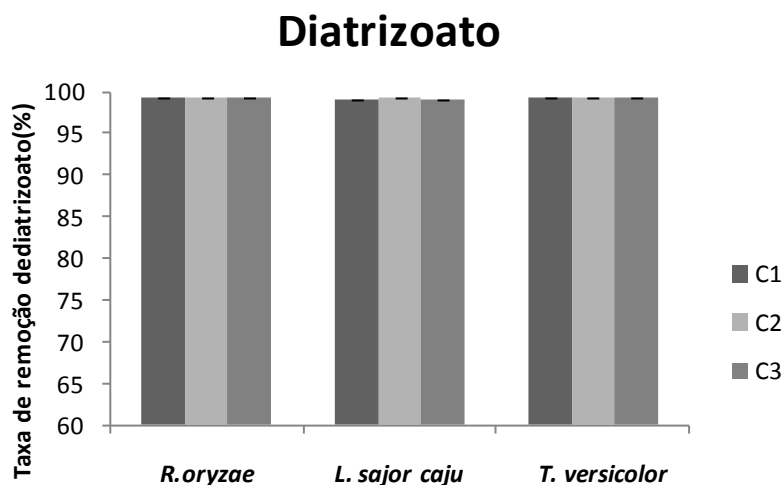


Figura 6. Variação das taxas de remoção de diatrizoato efetuadas pelas três espécies de fungos, quando expostas às diferentes concentrações do fármaco (C1= $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$, C2= $7,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e C3= $14,0 \mu\text{g L}^{-1}$). As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias e os asteriscos correspondem a diferenças significativas entre concentrações de acordo com o teste Tukey de comparações múltiplas, para cada uma das espécies de fungos.

Pela análise de pH no final do ensaio, *L. sajor caju* apresentou o valor mais alto de pH, quer para a indometacina, quer para o diatrizoato, sendo que para a indometacina o valor mais alto registado de pH é na concentração C3 (pH=5,57), e no diatrizoato o valor mais alto registado é na concentração C2 (pH=5,42). O controlo apresenta um valor significativamente mais baixo (pH=4,99). Os meios com *R. oryzae* foram os que apresentaram os valores mais baixos de pH nos dois fármacos. No fungo *R. oryzae*, os valores mais altos registados para a indometacina foi na concentração C2 (pH=4,37), e para o diatrizoato na concentração C1 (pH=4,52). O controlo apresenta um valor relativamente próximo (pH=4,10) dos tratamentos anteriores. Para *T. versicolor* o valor mais alto de pH foi registado nos meios com indometacina e particularmente na concentração C3; no diatrizoato na concentração C2, o controlo apresentou um valor de pH=5,16, sendo este o maior valor de pH registado nas três concentrações.

4. Discussão

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de duas espécies de fungos-da-podridão-branca e ainda de uma outra espécie de fungo, com elevado potencial de degradação da matéria orgânica (*L. sajor caju*, *T. versicolor* e *R. oryzae*, respetivamente), de tolerarem a presença dos fármacos indometacina e diatrizoato no seu meio de cultura e de os removerem desse meio, tendo em vista a potencial utilização destas espécies no tratamento biológico de água residuais, onde a ocorrência de diversos compostos da mesma origem foi já registada por muitos autores (Santos et al., 2013; Kosma et al., 2014). Uma das espécies de fungos, *L. sajor caju*, viu a sua taxa de crescimento significativamente afetada pela presença dos fármacos no meio de cultura, sobretudo de diatrizoato, que conseguiu causar uma inibição significativa logo na concentração mais baixa de $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$, que corresponde à concentração registada nas ETARs (Deblonde e tal., 2011). Contrariamente, este fármaco não apresentou toxicidade aguda para *D. magna*, até à concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. Não obstante a ausência de toxicidade aguda, em concentrações muito superiores às registadas nas ETARs, e que subseqüentemente vão atingir os meios de água doce, a avaliação ecotoxicológica terá que ser estendida para outras espécies e para ensaios sub-letais, já que estes efeitos podem ocorrer nas concentrações mais baixas e serão igualmente comprometedores da sustentabilidade dos meios recetores. De facto, Cleuvers et al. (2003) não só registaram toxicidade para a grande diversidade de fármacos testados no seu estudo, como reportaram a particular sensibilidade de *Lemna minor* para quase todos os compostos. A sensibilidade desta espécie de plantas a fármacos diversos foi igualmente reportada por outros autores (e.g. Pomati et al., 2004) o que confirma a necessidade de reforçar a avaliação ecotoxicológica efetuada para o diatrizoato e a indometacina, para espécies de outros níveis tróficos, incluindo produtores, de forma a avaliar seu o risco para o meio aquático, uma vez que esta informação não está disponível.

L. sajor caju foi igualmente sensível a indometacina, contudo apenas nas duas concentrações mais altas de $0,280$ e $0,560 \mu\text{g L}^{-1}$. Este resultado não deixa de ser interessante, na medida em que apesar de estarem 2 e 4 vezes acima das concentrações registadas em água residuais urbanas (Deblonde et al., 2011), as concentrações testadas continuam a ser bastante baixas, o que revela o potencial ecotoxicológico de indometacina. Este fármaco foi igualmente capaz de induzir uma

percentagem de mortalidade de 60% em *D. magna*, numa concentração de 27,44 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A sensibilidade dos fungos aos fármacos não tem sido alvo de análise nos estudos dedicados a avaliar o seu potencial de remoção destes compostos de meios líquidos ou até mesmo de efluentes. Contudo, não deixa de ser um aspeto importante na medida em que a sensibilidade do fungo pode comprometer inclusivamente a sua manutenção mais prolongada nos sistemas de tratamento. De facto, Cruz-Moráto et al. (2013), ao reportarem experiências de remoção de fármacos expondo *T. versicolor* a águas residuais urbanas esterilizadas e não esterilizadas, registaram ausência de variação na biomassa de fungo, o que os autores atribuíram à manutenção das condições em que o ensaio decorreu. Contudo, tal facto não faz muito sentido, dado que em algumas destas experiências foi efetuada a adição de nutrientes, pelo que seria de esperar que a biomassa aumentasse. A não variação de biomassa pode assim ter resultado, do efeito inibitório que alguns compostos podem ter tido no crescimento do fungo, tal como observado no presente estudo.

Até à data apenas uma espécie de *Pleurotus* (*P. ostreatus*) havia sido testada para transformar e remover carbamazepina, um fármaco anti-epilético, de meios de cultura (Golan-Rozen et al., 2011). Neste estudo a taxa de remoção mais alta (99,7%) foi observada da presença de Mn^{2+} (substrato da enzima manganês peroxidase) e na ausência de 1-aminobenzotriazole (1-ABT inibidor do citocromo P_{450}), após 32 dias de incubação. O estudo não avaliou variações na biomassa fúngica, pelo que não é possível comparar a sua sensibilidade com a registada para *Lentinus sajor caju* (anteriormente *P. sajor caju*)

T. versicolor e *R. oryzae* ao contrário de *L. sajor caju*, mostraram uma estimulação do seu crescimento promovida pela presença dos fármacos no seu meio de crescimento (excepto para *T. versicolor* na presença de indometacina). Este comportamento sugere que o processo de remoção pode ter sido diferente, sendo que *T. versicolor* e sobretudo *R. oryzae* podem ter usado os fármacos como substrato que, em conjunto com outros componentes do meio, terão sido absorvidos e metabolizados internamente. Contrariamente, *L. sajor caju*, por ser sensível aos fármacos pode ter intensificado a produção de enzimas lignolíticas extracelulares (e.g. manganês peroxidase e a lacase), para promoverem a degradação dos fármacos em ambiente extracelular. De facto outros autores referem que ambos os processos podem ocorrer em fungos-da-podridão branca, sendo necessário estudos mais aprofundados de identificação dos metabolitos secundários nos meios de crescimento, ou que envolvam

inibidores enzimáticos específicos, para se perceber os mecanismos envolvidos na remoção dos compostos farmacêuticos por estes organismos (Marcos-Urrea et al., 2010; Golan-Rozen et al., 2011). Os estudos já efetuados sugerem de forma consistente a presença dos dois mecanismos, ainda que um possa dominar sobre o outro, consoante a espécie.

Na bibliografia existente o fungo que mais se destaca é *T. versicolor*, pois foram já feitos diversos estudos que envolveram a utilização desta espécie na remoção de outros compostos farmacêuticos, desde anti-inflamatórios (Marco-Urrea et al., 2009, 2010a e 2010b), analgésicos (Marco-Urrea et al., 2010a e 2010c), antibióticos (Prieto et al., 2011), drogas psiquiátricas (Jelic et al., 2012) e drogas para a redução de lípidos (Marco-Urrea et al., 2009; Cruz-Morató et al., 2013). Assim, *T. versicolor* foi usado na remoção de cetoprofeno, um anti-inflamatório não esteróide e verificou-se que a mesma foi quase imediata. Cerca de metade da concentração adicionada inicialmente ao meio de cultura tinha sido removida ao fim de 6 horas e, ao fim de 24 horas, foi totalmente eliminada do meio líquido (Marco-Urrea et al., 2009a). Os mesmos autores Marco-Urrea et al. (2010a), avaliaram ainda a capacidade de *T. versicolor* de remover naproxeno, um analgésico e anti-inflamatório não esteróide, tal como a indometacina, do meio de cultura, obtendo taxas de remoção semelhantes para concentrações iniciais elevadas (10 mg L^{-1}) e concentrações próximas das registadas no ambiente ($55 \mu\text{g L}^{-1}$), correspondentes a uma remoção quase total após 5 a 6h de contacto. À semelhança do registado neste estudo, as taxas de remoção de naproxeno foram proporcionais à sua concentração, não havendo por isso um efeito inibidor do substrato. Com base nos estudos efetuados, estes autores sugeriram ainda a degradação intracelular de naproxeno como mecanismo responsável pela sua remoção do meio, o que vem de encontro à nossa hipótese, baseada no facto de a taxa de crescimento da espécie não ter sido inibida durante o ensaio. Uma taxa de remoção de 94% foi igualmente registada para o anti-inflamatório diclofenac, após 1h de incubação, com remoção total após 4h (Marcos-Urrea et al., 2010b). O mesmo fármaco quando adicionado em concentrações ambientalmente relevantes ($45 \mu\text{g.L}^{-1}$) foi completamente removido em 0,5h, e os seus metabolitos num máximo de 24h. Os mesmos autores avaliaram ainda a capacidade de biosorção da biomassa fúngica, verificando que esta aumenta após a morte pelo calor (Marcos-Urrea et al., 2010b). No presente estudo, não podemos ignorar a possibilidade de a remoção ter ocorrido também por biosorção dos fármacos à superfície da biomassa fúngica, ainda que este processo possa ter uma baixa contribuição

Cruz-Morató et al. (2013), registaram a capacidade de *T. versicolor* para remover por completo o ácido clofíbrico adicionado numa concentração de $30 \mu\text{gL}^{-1}$, a meio líquido enriquecido com glucose. Da ação do fungo resultou um metabolito secundário que foi responsável por aumentar a toxicidade do efluente para *V. fischeri*. Marco-Urrea et al. (2009b), constatou o mesmo após a remoção de ibuprofeno pela mesma espécie de fungo-da-podridão-branca. O que de facto reforça que esta possibilidade não pode ser ignorada em todos os estudos de degradação de compostos farmacêuticos por tratamento biológico com fungos, sendo portanto crucial avaliar a toxicidade dos meios/efluentes tratados. Prieto et al. (2011), reportaram igualmente a capacidade de *T. versicolor* para remover os antibióticos ciprofloxacina e norfloxacina do meio líquido de crescimento (taxa de remoção 90%), ao fim 7 dias de contacto, após a adição numa concentração inicial de 2 mg L^{-1} . Estes autores sugerem uma vez mais o envolvimento quer da enzima extracelular lacase, quer o sistema enzimático intracelular formado pelo citocromo P_{450} , na degradação destes antibióticos. Por último, no que refere a compostos recalcitrantes, como a carbamazepina, *T. versicolor* foi igualmente eficaz na sua remoção, a partir de uma concentração inicial de 9 mg L^{-1} , após 6 dias de contacto, sendo contudo menos eficaz para concentrações ambientalmente relevantes ($50 \mu\text{gL}^{-1}$). A eficácia e a rapidez de remoção foram melhoradas significativamente em leito de pulso-fluidizado, com total ausência de metabolitos secundários no final e uma redução significativa da toxicidade do meio (Jelic et al., 2012).

Pensando na possível aplicação destes fungos em sistemas reais de tratamento Cruz-Morató et al. (2013b) verificaram que *T. versicolor* se mantém ativo, quer em águas residuais urbanas esterilizadas, quer não esterilizadas, mantendo a sua eficácia na remoção de fármacos, onde contribuíram para a remoção completa de mais de 50% dos fármacos detetados. Rodríguez-Rodríguez et al. (2011 e 2012), confirmaram ainda a capacidade da mesma espécie de remover fármacos de lamas resultantes do tratamento de águas residuais, o que demonstra também a versatilidade da espécie para atuar em diferentes meios e matrizes ambientais.

Até à data nenhum estudo reporta a utilização de *R. oryzae* para este fim. Contudo, os resultados obtidos mostraram, que para os fármacos em estudo, *R. oryzae* mostrou uma capacidade de remoção semelhante à de *T. versicolor*. Do mesmo modo a taxa de crescimento de *R. oryzae* foi estimulada de forma progressiva pela presença do fármaco. Assim, e ainda que seja necessário testar para um maior número e diversidade de fármacos, esta espécie de fungo surge como alternativa a *T.*

versicolor com a vantagem de ter um crescimento mais rápido, sendo por isso capaz de atingir as mesmas taxas de remoção num tempo mais reduzido.

5. Conclusão

O presente estudo, não tinha o objetivo de perceber os mecanismos de degradação, mas sim avaliar a sensibilidade das espécies de fungos e a sua capacidade para remover indometacina e diatrizoato, dois fármacos para os quais nunca havia sido feita nenhuma avaliação. A questão da sensibilidade revelou-se particularmente importante, na medida em que os fungos têm sido submetidos aos fármacos isoladamente, sem se ter a verdadeira percepção, salvo algumas exceções e apenas para *T. versicolor* (Cruz-Morató et al., 2013b), da sua tolerância e eficácia quando submetidos a misturas complexas. A sua capacidade de crescer e renovar a biomassa é igualmente importante para aplicação deste tratamento em larga escala, na medida em que o nível de tolerância irá aumentar o tempo de residência do fungo nos tanques de tratamento. O aumento do tempo de residência é importante, pois embora os processos de remoção se tenham demonstrado rápidos, são variáveis entre fármacos. Além do mais, e uma vez que muitas vezes ocorre a degradação completa do composto seguida da degradação dos seus metabolitos secundários, será de todo desejável, manter a biomassa fúngica o mais tempo possível nos tanques de tratamento, para garantir a eliminação destes metabolitos e reduzir a formação de mais um resíduo orgânico. Sendo, assim, no caso de *Pleurotus sajor caju*, será necessário perceber se de facto misturas complexas de fármacos e outros compostos emergentes não acabarão por inibir por completo o seu crescimento e atividade de degradação. Por outro lado, mais importante que estudar o tempo de remoção completa de cada fármaco individualmente, em estudos futuros será interessante estudar a exposições frequentes e repetidas, para avaliar igualmente o tempo durante o qual os fungos se mantêm ativos.

O presente estudo revelou ainda a capacidade de outras duas espécies de fungos, além de *T. versicolor*, para removerem de forma eficaz fármacos de meios líquidos, tendo analisado para o efeitos dois fármacos nunca testados.

Referências Bibliográficas

- Altin, A., Altin, S., Degirmend, M., 2003. Characteristics and treatability of hospital (medical) wastewaters. *Fresenius Environmental Bulletin* (1219):1098-1108.
- Andreozzi, R., Marotta, R., Paxeus, N., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* (50):1319-1330.
- AR-Assembleia da República, 2005. Lei nº 58/2005 de 23 de Outubro. Diário da República nº 249, Série I-A: 7280-7310.
- Aust, D., Benson, J., 1993. The fungus among Us: Use of white-rot-fungi to biodegrade environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* (101):1-3.
- Baldrian, P., 2003. Interactions of heavy metals white-rot-fungi. *Enzyme Microbial Technology* (32):78-91.
- Barceló, D., 2003. Emerging pollutants in water analysis, TrAc, Trends Analysis Chemical (22):10 XIV – XVI.
- Bartels, P., Von Tumpling, W., 2008. The environmental fate of the antiviral drug oseltamivir carboxylate in different waters. *Scientific Total Environmental* (405):215-225.
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsura, T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination* (239):229-246.
- Braghetta, A., Brownawell, B., 2002. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds through advanced wastewater treatment technologies. In: AWWA-Water Quality Technology Conference.
- Chen, F., Ying, G.G., Yang, J. F., Zhao, J. L., Wang, L., 2010. Rapid resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of endocrine disrupting chemicals, pharmaceuticals and personal care products in wastewater irrigated soils. *Journal Environmental Scientific Health Part B* 45 (7):682-693.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, JM., Llompart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T., 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research* (38):2918-2926.

CEE-Diretiva nº 271 do conselho de 21 de Maio de 1991 do Conselho das Comunidades Europeias.

CE-Diretiva nº 105 de 16 de Dezembro de 2008 do Parlamento Europeu e do Conselho.

CE-Diretiva nº 98 de 19 Novembro de 2008 do Parlamento Europeu e do Conselho.

Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., Kroiss, H., 2005b. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research* (19):4797-4807.

Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* (142):185-194.

Coquery, M., Morin, A., Bécue, A., Lepot, B., 2005. Priority substances of the European water framework directive: analytical challenges in monitoring water quality. *Analysis chemical* (24):117-127.

Cruz-Morató, C., Jelic, A., Perez, S., Petrovic, M., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Sarrà, M., Vicent, T., 2013. Continuous treatment of clofibric acid by *Trametes Versicolor* in a fluidized bed bioreactor: Identification of transformation products and toxicity assessment. *Journal Biochemical Engineering* (75):79-85.

D' Annibale A., Crestini C., Vinciguerra V., Sermanni GG., 1998. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *Journal Biotechnology* (61):209-218.

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

Daughton, C.G., 2004. Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environmental. Review* (24):711-732.

Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (214):442-448.

DQA-Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Série I – 327/1:327/72.*

Esplugas, S., Bila, DM., Krause., GT., Dezott, M., 2007. Review article ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *J Hazard Mater* (149):631-642.

Gagnon, C., Lajeunesse, A., Cejka, P., Gagné, F., Hansler, R., 2008. Degradation of selected acidic and neutral pharmaceutical products in a primary-treated wastewater by disinfection process. *Science Engineering* (30):387-392.

Golan-Rozen, N., Chefez, B., Bem-Ari, J., Geva, J., Hadar, Y., 2009. Transformation of the recalcitrant pharmaceutical compound carbamazepine by *Pleurotus ostreatus*: role of cytochrome P450 monooxygenase and manganese peroxidase. *Environmental Science and Technology* (45):6800-6805.

González, S., López-Roldán, R., Cortina, J.L., 2012. Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: Review *Environmental Pollution* (161):83-92.

Heberer, T., 2002. Occurrence, fate and removal of pharmaceuticals residues in the aquatic environment: a review of recent data. *Toxicological Lett* (131):5-17

Hering, D., Feld, C. K., Moog, O., Ofenbo, T., 2006. Cook book for the development of a Multimetric Index for biological condition of aquatic ecosystems: experiences from the European AQEM and STAR projects and related initiatives. *Hydrobiologia* (566):311–324.

Ikeahata, K., Naghashkar, N. J., El-Din, M.G., 2006. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: a review ozone: *Science Engineering* (28):353-414.

Jansen, N., Banzhaf, S., Scheytt, T., Bester, K., 2009. Vertical flow soil filter for the elimination of micro pollutants from stream and wastewater. *Chemosphere* (77):1358-1365.

Jelic, A., Cruz-Morató, C., Marco-Urrea, E., Sarrà, M., Perez, S., Vicent, T., Petrovic, M., Barcelo, D., 2012. Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Research* (46):955-964.

Jjemba, P.K., 2006. Excretion and ecotoxicity of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Ecotoxicology Environmental Safety* (1):113-130.

Joss, A., Zabczynski, S., Gabel, a., Hoffmann, B., Loeffler, D., McArdell, C.S., Ternes, T.A., Thomsen, A., Siegrist, H., 2006. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme. *Water Research* (40):1686-1696.

Jurgens, M.D., Holthans, K.I.E, Johnson, A.C., Smith, J.J.L., Hetheridge, M., Williams, R.J., 2002. The potencial for stradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environmental Toxicology Chemistry* (21):480-488.

Kimura, K., Hara, H., Watanabe, Y., 2007. Elimination of selected acidic pharmaceuticals from municipal wastewaters by activated sludge systems and membrane bioreactors. *Environmental Science Technology* (41):3708-3714.

Kirk, P.M., Canon, P.F., Minder, D.W.& Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of the fungi*. CAB International, Wallingford.

Kosjek, T., Heath, E., Kompare, B., 2007. Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Analytical Bioanly Chemistry* (387):1379-1387.

Kosma CI, Lambropoulon DA, Albanis TA. 2014. Occurrence and removal of PPCPs in municipal and hospital wastewaters in Greece. *J. Hazard Mater* (179):804-17.

Kummerer, K., 2001. Drugs in the environment: Emission of drugs aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. *Chemosphere* (45):957-69.

Larsen, T.A., Lienert, J., Joss, A., Siegrist, H., 2004. How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Biotechnology* (113):295-304.

Lei da Água-Assembleia da República de 29 Dezembro, Lei nº 58/2005. *Diário da República* nº 249, Série I-A: 7280-7310.

Le-Minh, N., Goleman, H.M., Khan, S.J., van Luer, Y., Trang, T.T.T., Watkins, G., Stuetz, R.M., 2010. The application of membrane biorreactores as decentralized systems for removal of endocrine disrupting chemicals and pharmaceuticals. *Water Science and Technhology* (61):1081-1088.

Lienert, J., Gudel, K, Escher, BI., 2007. Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. *Environmental Science Technology* (41):4471-8.

Loffredo, E., Traversa, A., Senesi, N., 2000. Biodecontamination of water from bisphenol A using ligninolytic fungi and the modulation role of humic acids. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (79):288-193.

MA-Ministério do Ambiente, 1998. Decreto-Lei nº 152/97 de 19 de Julho. Diário da República nº 139, Série I-A (139): 2959-2966.

MA-Ministério do Ambiente, 1998a. Decreto-Lei nº 348/98 de 9 de Novembro. Diário da República nº 259, Série I-A: 5982-5983.

MAOT-Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território 2011: 1º Fórum de boas práticas – Partilhar para melhorar o desempenho.

Majeau A. J., Brar K. S., Tyagi D. R., Lacases for removal of recalcitrant and emerging pollutants 2010. *Bioresource Technology* (7):2331-2350.

Martín, J., Buchberger, W., Alonso, E., Himmelsbach, M., Aparício, I., 2012. Comparasion of different extraction methods for the determination of stadin drugs in wastewater and river water by HPLC/Q-TOF-MS. *Talanta* (85):607-15.

Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G., 2009. Ability of white-rot-fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* (74):765-772.

Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Blánquez, P., Vicent, T., Caminal, G., 2010. Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. *Bioresource Technology* (101):2159-2166.

Marco-Urrea, E., Prieto, A., Moder, M., Rodil, R., Adrian, L., 2011. Degradation of the antibiotics norfloxacin and citrofloxation by a white-rot fungus and identification of degradation products (102):10987-10995.

Méndez-Arriaga, F., Esplugas, S., Giménez, J., 2010 Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in water by photo-Fenton. *Water Research* (11):387-395

Metcalf e Eddy, 2004. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, fourth ed. McGraw-Hill Co., New York.

Moss, B., 2008. The water framework directive: Total environment or political compromise? *Science of the total environment* (400):32-41.

Murray, K., Thomas, S., Bodour, A., 2010. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution* (158): 3462-3471.

Naidu, R., Wong, M.H., 2013. Contaminantes of emerging concern. *Science of the Total Environment*.

OCDE 202, 2004. Organization For Economic Co-Operation and development. Guideline 202. *Daphnia sp.* Acute Imobilisation Teste. Abril, 1-12.

Onesios, K.M., Yu, J.T., Bouwer, E.J., 2009. Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. *Biodegradation* (20):441-466.

Oppenheimer, J., Stephenson, R., Burbano, A., Liu, L., 2007. Characterizing the passage of personal care products wastewater treatment processes. *Water Environmental Research* (13):2564-2577.

Pereira, R., Antunes, S.C., Gonçalves, A.M.M., Marques, S.M., Gonçalves, F., Ferreira, F., Freitas, A.C., Rocha-Santos, T.A.P., Diniz, M.S., Castro, L., Peres, I., Duarte, A.C., 2009. The effectiveness of a biological treatment with *Rhizopus oryzae* and of a photo-Fenton oxidation in the mitigation of toxicity of a bleached Kraft pulp mill effluent. *Water Research* (43):2471-2480.

Pereira, L.T.C., Lemos, J.L.S., 2003. Os Fungos Filamentosos, uma opção em estudo para a Biorremediação II. XI Jornada de iniciação Científico, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT

Petrovic, M., Gonzales, S., Barceló, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewaters and drinking waters. *TrAC Trends Analysis. Chemistry* (22):685-696.

Petrovic, M., De alda, M.J.L., Diaz-Cruz, S., Postigo, C., Radjenovic, J., Gros, M., Barceló, D., 2009. Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. *Philos. Physical. Engineering Scientific* (367):1904 3979-4003.

Pomati, F., Nettinh, G.A., Calamari, D., Neilan, A.B., 2004. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *synechocystis sp.* and *Lemma minor*. *Aquatic Toxicology* (67):387-396.

Pontius, F.W., 1990. *Water Quality and Treatment: A Handbook of Community Water Supplies*. 4rd ed, I. McGraw – Hill, New York, USA.

Prieto, A., Moder, M., Rodil, R., Adrian, L., Marco-Urrea, E., 2011. Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation *Technology* (102):10987-10995.

Putzke, J., Putzhe, M.T.L., 2002. *Os Reinos dos Fungos*. Santa Cruz do Sul: Edunisc, (214):2.

Radjenovic, J., Godehardt, M., Petrovic, M., Hein, A., Farre, M., Jekel, M., Barcelo, D., (2009). Evidencing generation of persistent ozonation products of antibiotics roxithromycin and trimethoprim. *Environmental Science & Technology* (43):6808-6815.

Reddy, A., 1995. The potencial for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current opinion in Biotechnology* (6):320-328.

Rizzo, L., Grassi, M., Farina, A., 2013. Endocrine disruptors compounds, pharmaceuticals and personal care products in urban wastewaters: implications for agricultural reuse and their removal by adsorption process. *Environmental Scientific Pollutant Research* 10.1007/s 11356-013-1636-7.

Rodriguez-Rodriguez, E.C., Jelic, A., Llorca, M., Farré, M., Caminal, G., Petrovic, M., BAceló, D., Vicent, T., 2011. Solid.phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludg. *Bioresource Technology* (102):5602-5608.

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

Schuster, A., Hadrick, C., Kumerer, K., 2008. Flow of active pharmaceutical ingredients originating from health care practices on a local, regional and nationwide level in Germany-is Hospital effluent treatment an effective approach for risk reduction? *Water, Air Soil Pollution. Focus* (8):457-471.

Schafer, A.I., Nghiem, L.D., Waite, T.D., 2003. Removal of the natural hormone estrone from aqueous solutions using nanofiltration and reverse osmosis. *Environmental Science and Technology* (37):182-188.

Snyder, S.A., Westerhoff, P., Yoon, Y., Sedlak, D.L., 2003. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disruptors in water. Implications for the Water Industry. *Environmental Engineering Science*. (20):449-469.

Suárez, S., Ramil, M., Omil, F., Lema, JM., 2005. Removal of pharmaceutically active compounds in nitrifying-denitrifying plants. *Water Science Technology* (52):9-14.

Ternes, T.A., Joss, A. 2006, Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances. The Challenge of Micropollutants in Urban Water Management, IWA Publishing, London.

Ternes, T.A., Stuber, J., Herrman, N., McDowell, D., Ried. A., Kampmann, M., Teiser, B., 2003. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Research* (37):1976-1982.

USEPA 2009 Nutrient Control Design Manual: State of Technology Review Report, EPA/600/R-09/0.12.

Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M., Barceló, D., 2010. Hospital effluents as a source of emerging pollutants: an overview of micropollutants and treatment options. *Journal Hydrol* (389):416-28.

Zar, J.H., 2010. Biostatistical analysis. 5th Edition. Pearson Upple Saddle River, New Jersey, USA.

WHO, 2005. The World Health Report 2005-Make every mother and child count.

Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, N.S., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* (22):161-187.

Writer, J. H., Ferrer, I., Barber, L. B., Thurman, E. M., 2013. Widespread occurrence of neuro-active pharmaceuticals and metabolites in 24 Minnesota rivers and wastewaters. *Science of the Total Environment* 461–462 519–527.

Yang, S., 2013. Removal of micropollutants by a fungus-augmented membrane bioreactor. *Environmental Engineering*. University of Wollongong, Austrália.

Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S.A., Wert, E.C., 2006. Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products. *Journal Membrane Science* (270):88-100.

Zhang, Y., Geiben, S-U., Gal, C., 2008. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* (73):1151-1161.

Zhou, J.L., Zhang, Z.L., Banks, E., Grover, D., Jiang, J.Q., 2009. Pharmaceuticals residues in wastewaters treatment works effluents and their impact on receiving river water. *J. Hazard. Mater* (166):655-661.