

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

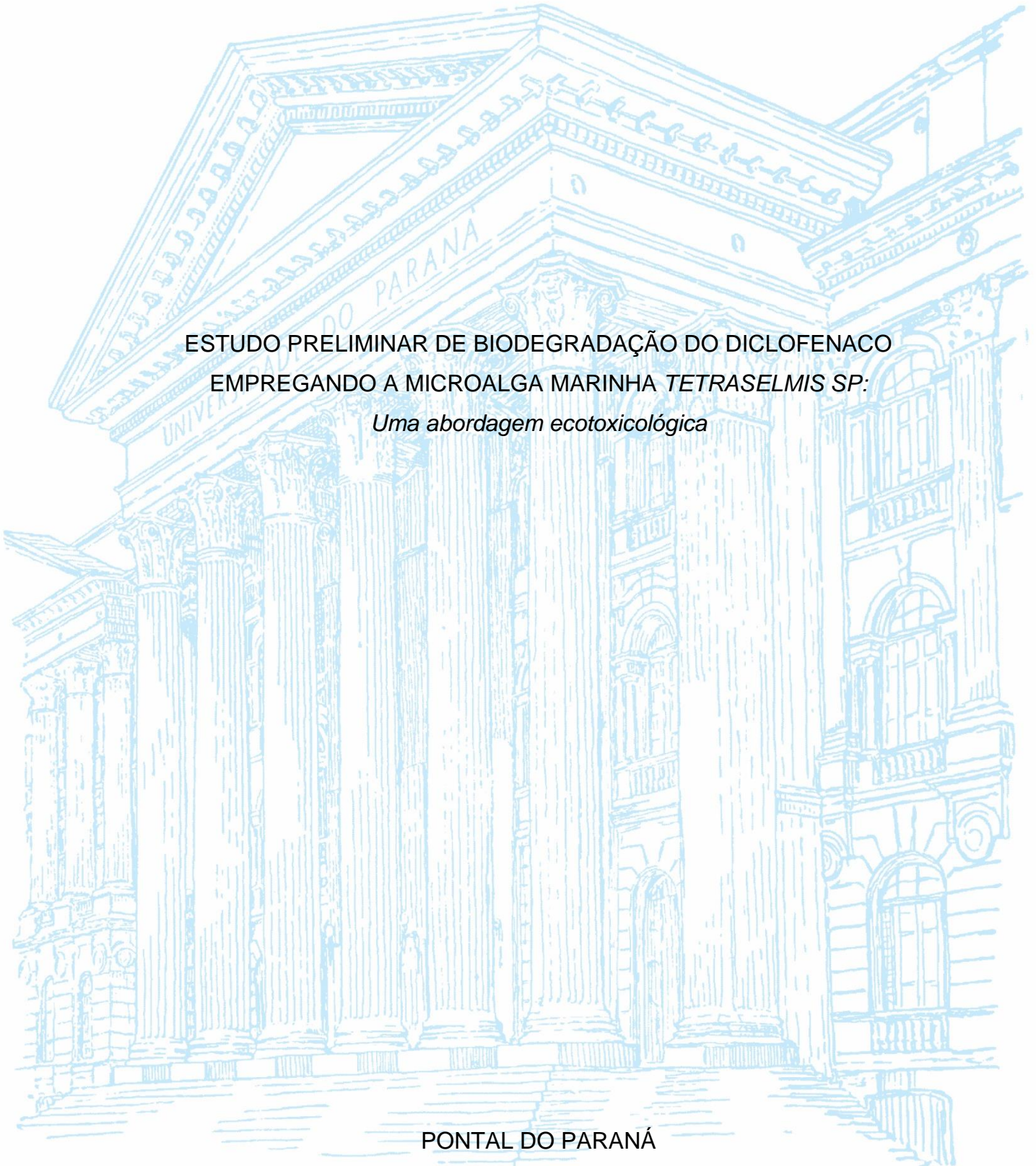
CAMILA SOUZA PARIS

ESTUDO PRELIMINAR DE BIODEGRADAÇÃO DO DICLOFENACO
EMPREGANDO A MICROALGA MARINHA *TETRASELMIS SP.*:

Uma abordagem ecotoxicológica

PONTAL DO PARANÁ

2022



CAMILA SOUZA PARIS

ESTUDO PRELIMINAR DE BIODEGRADAÇÃO DO DICLOFENACO
EMPREGANDO A MICROALGA MARINHA *TETRASELMIS SP*:
Uma abordagem ecotoxicológica

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, Campus Pontal do Paraná – Centro de Estudos do Mar – CPP-CEM, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Pedroso Melegari

PONTAL DO PARANÁ

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DO CENTRO DE ESTUDOS DO MAR

Paris, Camila Souza

P232e Estudo preliminar de biodegradação do diclofenaco empregando a microalga marinha *Tetraselmis sp*: uma abordagem ecotoxicológica. / Camila Souza Paris. – Pontal do Paraná, 2022.

1 arquivo [45 f.] : PDF.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Pedroso Melegari.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Paraná, Campus Pontal do Paraná, Centro de Estudos do Mar, Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária.

1. Toxicidade aquática. 2. Diclofenaco. 3. Microalga verde maninha. 4. *Tetraselmis sp*. 5. Biodegradação. I. Melegari, Sílvia Pedroso. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD – 615.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Avenida Deputado Anibal Khury, 2033, - Bairro Baileário Pontal do Sul, Pontal do Paraná/PR, CEP 83255-976
Telefone: 4135118600 - <http://www.ufpr.br/>

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

CAMILA SOUZA PARIS

**“ESTUDO PRELIMINAR DE BIODEGRADAÇÃO DO DICLOFENACO EMPREGANDO A MICROALGA VERDE MARINHA *Tetraselmis* sp:
Uma abordagem toxicológica.”**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária, da Universidade Federal do Paraná, pela Banca formada pelos membros:

Prof^a. Dra. Amanara Potykyta de Sousa Dias Vieira - CPP-CEM/UFPR

Prof^a. Dra. Cristiane Funghetto Fuzinato - UFFS/Campus Erechim

Prof^a. Dra. Sílvia Pedrosa Melegari - CPP-CEM/UFPR
Presidente

Pontal do Paraná, 16 de Setembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **SÍLVIA PEDROSO MELEGARI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/09/2022, às 17:54, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Funghetto Fuzinato, Usuário Externo**, em 21/09/2022, às 17:59, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **AMANARA POTYKYTA DE SOUSA DIAS VIEIRA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 24/09/2022, às 08:19, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4917017** e o código CRC **1A2283EF**.

AGRADECIMENTOS

Á Deus por ter me dado coragem e força nos momentos difíceis durante toda a graduação.

Aos meus pais Catia e Getulio, meus grandes incentivadores, agradeço imensamente por todo apoio e amor ao longo da minha vida e trajetória na graduação e por sempre acreditarem em meu potencial.

Ao meu parceiro de vida e de graduação, Leandro por ter percorrido essa trajetória ao meu lado sempre me apoiando e incentivando a cada dia.

Á todos os amigos que fiz durante a graduação, em especial Anny Karolina e Sara Teles que me ouviram sempre que precisei e se tornaram grandes amigas para a vida.

Á minha orientadora Prof^a Dra. Silvia Pedroso Melegari por todos os ensinamentos, dedicação, paciência e zelo comigo durante toda a graduação e em especial durante o período de orientação.

Á todos os funcionários e estagiários da Biblioteca do CEM, em especial agradeço à Liliam Orquiza por todos os ensinamentos passados a mim, por todo carinho e zelo durante os quatro anos que trabalhamos juntas na biblioteca.

Às minhas colegas de laboratório Alana, Sabrina, Laís e Jassiara, agradeço por terem me apoiado e me ajudado imensamente nas práticas de laboratório.

Finalizo agradecendo à banca por estar presente nesse momento e a todos os professores(as) da UFPR Centro de Estudos do mar, Campus Pontal do Paraná que passaram por mim durante a graduação. Vou sempre lembrar de cada um com muito carinho.

RESUMO

A presença de contaminantes emergentes como produtos de cuidados pessoais, de higiene e drogas farmacêuticas está cada vez mais constante nos ambientes aquáticos. Isso aumenta a preocupação da comunidade científica em avaliar os efeitos e riscos desses contaminantes sobre os ecossistemas e os microrganismos presentes na água. Dentre os medicamentos mais encontrados em amostras de água em todo o mundo em diferentes compartimentos, é o diclofenaco (DCF). Trata-se de um anti-inflamatório não esteroideal que é frequentemente prescrito como analgésico e antipirético. Portanto este estudo tem por objetivo avaliar a toxicidade do DCF sobre microalgas verde marinhas *Tetraselmis sp.* e, posteriormente, avaliar preliminarmente a capacidade de biodegradação da mesma sobre o contaminante DCF. Para isso, foram realizados testes de toxicidade crônica utilizando cinco concentrações distintas de DCF (0,1; 1; 10; 100 e 200 mg/L) em diferentes tempos de exposição (24, 48, 72 e 96h). Os testes de biodegradação foram realizados utilizando-se as concentrações avaliadas como não tóxicas de 10 e 50 mg/L nos tempos de 24, 48, 72 e 96h. O teste de toxicidade para a *Tetraselmis sp.* apresentou valores de CEO de 100 mg/L e CENO de 10 mg/L em 48 e 72h. A concentração que diminuiu a densidade celular em 50% (CE50) foi de 112,7 mg/L em 48h. Os testes de biodegradação do DCF não apresentaram taxas remoção significativas nos tempos (24, 48, 72 e 96h) e concentrações iniciais (10 e 50 mg/L) estudadas. Este estudo observou valores de remoção na ordem de 12,1% em 24 h de remoção para a concentração inicial de 10 mg/L e 11,1 a 14,6% de remoção, nos tempos de 24 e 96h, respectivamente, para a concentração inicial de 50 mg/L. Apesar destes resultados, a microalga *Tetraselmis sp.* apresentou potencial para biodegradação do DCF sendo necessária a condução de estudos complementares empregando técnicas mais precisas de detecção do DCF e com variação de algumas condições experimentais. Os resultados obtidos deste estudo evidenciam a importância de conhecer melhor os efeitos toxicológicos do DCF sobre ecossistemas aquáticos, e ainda investigar mais profundamente potenciais para a degradação do DCF por vias sustentáveis.

Palavras-chave: Toxicidade aquática; Diclofenaco; Microalga verde marinha; *Tetraselmis sp.*; Biodegradação.

ABSTRACT

The presence of emerging contaminants such as personal care products, hygiene products and pharmaceutical drugs is increasingly constant in aquatic environments. This increases the scientific community's concern in evaluating the effects and risks of these contaminants on ecosystems and microorganisms present in water. Among the drugs most found in water samples around the world in different compartments, is diclofenac (DCF). It is a non-steroidal anti-inflammatory drug that is often prescribed as an analgesic and antipyretic. Therefore, this study aims to evaluate the toxicity in DCF on marine green microalgae *Tetraselmis* sp. and later to evaluate preliminarily its biodegradation capacity on the DCF contaminant. For this, chronic toxicity tests were performed using five different concentrations of DCF (0.1; 1; 10; 100 and 200 mg/L) at different exposure times (24, 48, 72 and 96h). Biodegradation tests were performed using concentrations evaluated as non-toxic of 10 and 50 mg/L at times of 24, 48, 72 and 96h. The toxicity test for *Tetraselmis* sp. showed OEC values of 100 mg/L and NOC of 10 mg/L at 48 and 72h. The concentration that decreased cell density by 50% (EC50) was 112.7 mg/L in 48h. The DCF biodegradation tests did not show significant removal rates at the times (24, 48, 72 and 96h) and initial concentrations (10 and 50 mg/L) studied. This study observed removal values in the order of 12.1% in 24 h of removal for the initial concentration of 10 mg/L and 11.1 to 14.6% of removal, in the times of 24 and 96h, respectively, for the initial concentration of 50 mg/L. Despite these results, the microalgae *Tetraselmis* sp. showed potential for the biodegradation of DCF, being necessary to conduct further studies using more precise techniques for detection of DCF, and with variation of some experimental conditions. The results obtained from this study show the importance of better understand the toxicological effects of DCF on aquatic ecosystems, and further investigate potentials for the degradation of DCF in sustainable ways.

Keywords: Aquatic toxicity; Diclofenac; Marine green microalgae; *Tetraselmis* sp.; Biodegradation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	JUSIFICATIVA	8
1.2	OBJETIVOS	9
1.2.1	OBJETIVO GERAL	9
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	DCF	11
2.1.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DO DCF	11
2.1.2	EFEITOS AO MEIO AMBIENTE	12
2.2	BIODEGRADAÇÃO DO DCF POR MICROALGAS	16
2.3	ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	16
2.4	TOXICOLOGIA	17
2.4.1	ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA	17
2.5	ORGANISMO-TESTE	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	CULTIVO E MANUTENÇÃO DA MICROALGA <i>TETRASELMIS SP.</i>	21
3.1.1	PROCEDIMENTOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DA MICROALGA <i>TETRASELMIS SP.</i>	23
3.1.2	PROCEDIMENTOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO DCF	24
3.2	PROCEDIMENTOS DO ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA COM DCF	24
3.3	PROCEDIMENTOS DO ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO DO DCF	25
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4	RESUTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA MICROALGA E DO DCF	27
4.2	CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DA TAXA DE REMOÇÃO DO DCF	28
4.3	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DA <i>TETRASELMIS SP.</i>	29
4.4	TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA DO DCF	30
4.5	TESTE DE BIODEGRADAÇÃO DO DCF PELA <i>TETRASELMIS SP.</i>	34
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
5.1	RECOMENDAÇÕES	39
	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas ambientais relacionadas à poluição ambiental por fármacos vêm sendo estimuladas pelo crescente consumo mundial de medicamentos e o grande avanço da medicina no desenvolvimento de novas drogas utilizadas no tratamento de doenças humanas e animais (BANHARA, 2016). Além disso, a introdução anual significativa e contínua de fármacos nos corpos d'água vem aumentando o interesse na determinação desses contaminantes, devido à capacidade de persistência no meio ambiente e a potencialidade de causar danos aos ecossistemas e saúde pública (HANIF, 2019). A maior preocupação acerca dos fármacos é que são projetados para agir de forma maximizada em doses pequenas por meio de mecanismos enzimáticos e metabólicos. Por esse motivo, acredita-se na alta possibilidade de serem farmacologicamente ativos em organismos não-alvo (DOPICO, 2018).

Especificamente os ambientes aquáticos, incluindo água doce, águas marinhas costeiras e estuários, são contaminados com frequência por compostos orgânicos e inorgânicos que podem exercer efeitos adversos nas comunidades biológicas que habitam esses compartimentos (DOPICO, 2018). Uma das principais vias introdutórias dos fármacos nos ecossistemas aquáticos são os lançamentos de esgotos *in natura* ou tratados em Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) nos cursos d'água (FENT, WESTON, CAMINADA, 2006). Os fármacos chegam às redes coletoras de esgoto através de excreções e do descarte inadequado de medicamentos vencidos nas instalações sanitárias. As ETEs geralmente empregam técnicas de tratamento baseadas na eliminação de matéria orgânica, nutrientes e patógenos, não visando especificamente a remoção de fármacos (DE AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

A legislação brasileira que dispõe sobre a qualidade e padrões de lançamento de efluentes em corpos hídricos receptores é atendida pelas Resoluções CONAMA nº 357/2005 e CONAMA nº 430/2011. Tais Resoluções estabelecem limites máximos aceitáveis para o lançamento de substâncias orgânicas e inorgânicas, porém não englobam a classe de contaminantes emergentes. Por outro lado, a legislação internacional, mais especificamente a comunidade europeia, já estabeleceu diretrizes para compostos prioritários com elevado riscos ambientais como os contaminantes emergentes. A Diretiva 2008/105/CE atualizada em 2017, inclui o diclofenaco (DCF)

na lista de substâncias prioritárias e estabelece um limite máximo de detecção de 10 ng/L (DECISÃO DE EXECUÇÃO (UE) 2015/495, 2017).

Dentre as diversas classes de fármacos existentes, a mais detectada em ambientes aquáticos são os anti-inflamatórios não-esteróides (AINES), como o DCF (SANTOS et al., 2010). O Brasil ocupa a quarta posição mundial no consumo de medicamentos (RAMOS et al., 2017) e a utilização dos AINES é amplamente difundida, uma vez que esses medicamentos não precisam de prescrição médica para serem adquiridos (EMERENCIANO ET AL., 2008). Em geral, os primeiros efeitos causados pelos poluentes em ambientes aquáticos são observados em microalgas, pois respondem rapidamente a mudanças ambientais, e, por serem as principais produtoras primárias, efeitos sobre elas podem causar danos a níveis tróficos (CAMPANELLA ET AL., 2001; CID ET AL., 2012).

Atualmente diferentes fármacos foram detectados em compartimentos aquáticos como lagos, rios, mares, efluentes de ETEs e até mesmo em Estações de Tratamento de Água (ETAs). Mesmo que sejam encontrados em baixas concentrações, ainda podem causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos (HANIF, 2019). Testes de toxicidade já tem demonstrado evidências do potencial tóxico do DCF sobre organismos aquáticos. Oliveira et. al. (2015) evidenciou utilizando concentrações de 0,0005; 0,5 e 7,2 mg L⁻¹ que o DCF possui potencial para afetar a neurotransmissão do microcrustáceo *Daphnia magna* por comprometer a produção de enzimas responsáveis pela atividade colinesterásica. Em outro estudo expondo a microalga *Chlorella pyrenoidosa* ao DCF em concentrações que variaram de 2 a 150 mg L⁻¹, comprovou-se a perturbação significativa da via metabólica das algas, acúmulo de lipídios nas células, além da inibição da fotossíntese e redução do crescimento (ZHANG et. al., 2019).

1.1 JUSIFICATIVA

A toxicidade dos fármacos pode afetar organismos de diferentes níveis tróficos dos ecossistemas aquáticos, podendo chegar ao ser humano. Dependendo das condições ambientais, o DCF tende a ser fotodegradado em ecossistemas aquáticos, mas os produtos resultantes aumentam a toxicidade dessa substância (SCHMITT-JANSEN et al., 2007). Além disso, há uma escassez de informações na literatura científica a respeito da toxicidade do DCF sobre microalgas, um organismo da base

da cadeia trófica que pode fornecer resultados relevantes sobre os efeitos desse fármaco. Nesse sentido, os estudos sobre concentrações ambientalmente relevantes deste fármaco e sua toxicidade sobre microrganismos aquáticos podem fazer uma importante contribuição científica.

O DCF, assim como outros fármacos, é pouco monitorado em ecossistemas aquáticos no Brasil devido à ausência de uma legislação específica que estabeleça limites para lançamento desses contaminantes em corpos receptores. Com isso, este estudo pretende contribuir para um melhor entendimento dos efeitos toxicológicos do DCF em concentrações ambientalmente relevantes. Os achados deste estudo podem contribuir como arcabouço para atuais e futuras discussões, para a criação de legislações regulamentadoras com o intuito de proteger a saúde humana e o meio ambiente dos potenciais efeitos toxicológicos do DCF e fármacos similares.

Tendo em vista o aumento da demanda por recursos naturais e a maior necessidade de tecnologia para tratamento de efluentes, torna-se essencial o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de suprir as demandas de forma sustentável e econômica. Os processos de biorremediação que empregam biorreatores de microalgas para a degradação de contaminantes de preocupação emergente tem sido muito explorado em pesquisas em todo mundo, como uma alternativa eficiente e sustentável para tratamento de efluentes. Além disso, esse processo de biorremediação gera uma biomassa algal, que, devido à sua composição química, pode ser aplicada como matéria-prima em diversos outros processos. Assim, estudos que explorem essas potencialidades, podem contribuir para os avanços dessas biotecnologias de tratamentos de efluentes.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar as potencialidades da microalga marinha *Tetraselmis sp* na biodegradação do diclofenaco de sódio (DCF), abordando ainda aspectos toxicológicos desse fármaco sobre a microalga.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o DCF empregado nos ensaios toxicológicos e de biodegradação empregando espectrofotometria de UV-Visível;
- Estabelecer o cultivo da microalga verde marinha *Tetraselmis* sp, assim como validar o método de quantificação da densidade celular das microalgas e do DCF por espectrofotometria de UV-Visível;
- Avaliar o potencial toxicológico do DCF utilizando testes de toxicidade crônica com a microalga verde marinha *Tetraselmis* sp., em concentrações ambientalmente relevantes
- Avaliar o potencial preliminar de biodegradação do DCF empregando a microalga marinha *Tetraselmis* sp.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DCF

2.1.1 Características físicas e químicas do DCF

O DCF sódico (Figura 1) é um AINE que possui propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antipiréticas e antirreumáticas. Trata-se de um dos princípios ativos mais vendidos no Brasil e esse grande consumo deve-se a sua abundante diversidade de aplicações (HOST; EVERS, 1989; BONFIM, 2004).

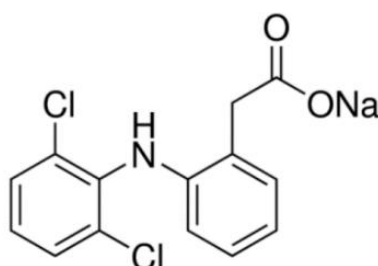
Com pKa em torno de 4 como mostra a Tabela 1, a solubilidade do DCF de sódio depende do pH do meio, sendo largamente solúvel em metanol, etanol, ligeiramente solúvel em água e praticamente insolúvel em ácido clorídrico. Sua volatilização em ambiente aquático não é esperada e pode formar produtos clorados como cloro-diclofenaco e clorofórmio (PAIS, 2013). No meio ambiente, o DCF não sofre biodegradação expressiva, sendo a absorção por radiação solar o principal processo de remoção, com um tempo de meia-vida de oito dias (HSDB, 2012).

TABELA 1 - Características físico-químicas do DCF

Composto	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Número CAS	pKa	log Kow
Diclofenaco sódico	$C_{14}H_{10}Cl_2NO_2 \cdot Na$	318,1	15307-86-5	4,15	13,4

Fonte: INMETRO, 2013.

FIGURA 1 – Estrutura molecular do DCF.



Fonte: Sigma-Aldrich (2019).

O DCF é utilizado no tratamento de condições inflamatórias e dolorosas com rápido início de ação. As concentrações plasmáticas máximas são atingidas cerca de 1 hora após a administração e sua meia-vida plasmática é em média 1-2 horas. No organismo humano o DCF sofre biotransformação, resultando em metabólitos fenólicos (3'-hidroxi-, 4'-hidroxi-, 5-hidroxi-, 4',5-dihidroxi- e 3'-hidroxi-4'-metoxidiclofenaco) os quais são transformados, em sua maioria, em conjugados glicurônicos. Cerca de 60% da dose administrada de DCF é excretada através da urina como conjugado glicurônico. Menos de 1% é excretado como molécula inalterada e o restante é eliminado como metabólitos através da bile nas fezes (ANVISA, 2021).

2.1.2 Efeitos ao meio ambiente

Uma vez que as substâncias tóxicas atingem o meio ambiente, estão sujeitas a processos que podem alterar seu destino e comportamento. O DCF pode ser degradado por mecanismos abióticos e bióticos que acontecem no ambiente. Porém, algumas dessas substâncias resistem aos processos de degradação natural e por esse motivo permanecem no ambiente por longos períodos. Quando a substância potencialmente tóxica e persistente é despejada continuamente no meio ambiente pode ocorrer a sua acumulação em níveis ambientais suficientes para caracterizar toxicidade aos organismos (COSTA; OLIVI, 2008). A fotólise é o principal processo oxidativo de degradação do DCF em águas superficiais cuja eficiência depende da intensidade da radiação solar, altura da coluna de água, turbidez e elementos presentes na água que podem agir como fotossensibilizadores (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

A presença de fármacos no meio ambiente pode ocasionar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres. Os efeitos podem ocorrer em qualquer nível da organização biológica: células, órgãos, organismos, populações, ecossistemas (JORGENSEN; HALLING-SORENSEN, 2000). Podem ainda, interferir na fisiologia, metabolismo e comportamento dos organismos, além de causar alterações imunológicas tornando-os mais vulneráveis a parasitas e doenças (PETROVIĆ et al., 2005). Devido a sua característica intrínseca de lipofilia, o DCF é considerado

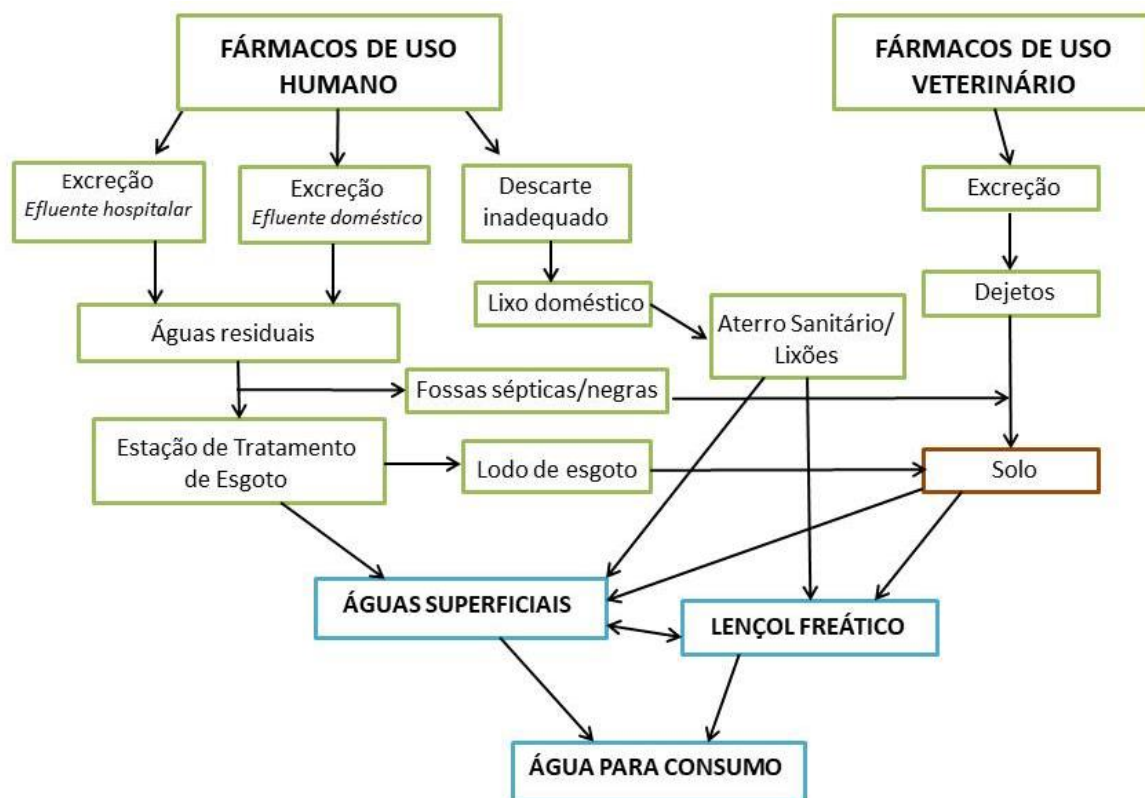
potencialmente perigoso para o meio ambiente e para a saúde pública (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

Barros (2017) demonstrou em seu estudo que o DCF apresentou toxicidade crônica em peixes da espécie *Solea senegalensis* em concentrações de 2 µg/L por via trófica. Os peixes foram alimentados com poliquetas previamente expostas ao DCF por 28 dias nas concentrações de 0,5, 1 e 2 µg/L. Como resultado observou-se nos peixes a inibição significativa da atividade enzimática da acetilcolinesterase, relacionada a alterações neurológicas, o que demonstra o potencial de bioacumulação e intoxicação secundária dentro da cadeia alimentar aquática (BARROS, 2017). Outro estudo realizado por Oliveira et. al (2015) detectou diminuição significativa de atividades enzimáticas neurológicas acetilcolinesterase (0,0005 à 7,2 mg/L) e imunológicas Glutathione peroxidase (0,0005 à 0,5 mg/L) na espécie de microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* (OLIVEIRA et al., 2015).

Após sua utilização, os fármacos são eliminados pelo organismo e entram nos ecossistemas aquáticos de maneiras distintas. As águas residuárias configuram a principal rota de introdução dessas substâncias nos ambientes aquáticos (FENT, WESTON, CAMINADA, 2006). A Figura 2 ilustra as diferentes fontes e rotas dos fármacos no ecossistema aquático.

Existe também a contaminação desses ambientes devido ao descarte inadequado de medicamentos oriundo de utilização doméstica, já que no Brasil a legislação específica para o descarte é destinada apenas aos estabelecimentos de saúde. Dessa forma os medicamentos são destinados aos resíduos comuns e no esgoto sanitário. O descarte inadequado pode ocasionar ainda a contaminação de lençóis freáticos e solos pela excreção de medicamentos utilizados na medicina veterinária e também através da lixiviação em decorrência do descarte em aterros sanitários e lixões (BANHARA, 2016).

FIGURA 2 – Fluxograma de possíveis fontes e rotas para ocorrência de fármacos no ecossistema aquático.



Fonte: Adaptado de (HEBERER, 2002).

O monitoramento de fármacos em ecossistemas aquáticos tem sido realizado em vários países e demonstram que essas substâncias estão muito difundidas em águas superficiais e residuárias. Os organismos aquáticos, em especial, podem ser expostos às águas residuárias ao longo de toda sua vida, por isso são alvos importantes de pesquisa (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

O DCF pode ser detectado em ETEs em concentrações na faixa de $\mu\text{g/L}$ e nos ecossistemas aquáticos na faixa de ng/L a $\mu\text{g/L}$. A maioria das ETEs utiliza o processo de Lodos Ativados, e, embora a taxa de remoção varie, este tipo de tratamento apresenta baixas eficiências para a remoção do DCF, pois a biodegradabilidade neste sistema é baixa (ZHANG; GEISSEN; GAL, 2008).

Na Tabela 2, são apresentados dados compilados na literatura de valores de concentração de DCF reportados em amostras de água em corpos hídricos do Brasil e do mundo. Em estudos de monitoramento de águas residuárias realizado por Heberer et al (2002), foram encontradas concentrações médias de DCF nos efluentes e afluentes das ETEs municipais de Berlim, Alemanha, na ordem de 3,02 e 2,51 $\mu\text{g/L}$,

respectivamente. Isso demonstra uma taxa de remoção de apenas 17%, o que configura a persistência do DCF em estações de tratamento. O DCF foi detectado também em quatro amostras de diferentes rios na Espanha com concentração máxima de 610 ng/L (FARRÉ et al., 2001). Na Alemanha, Quintana e Reemtsma (2004) encontraram uma concentração máxima de 272 ng/L no Lago Tegel. Nas águas superficiais da Bacia Hidrográfica do Rio Turia na Espanha, a concentração máxima encontrada foi de 3.462 ng/L (CARMONA; ANDREU; PICÓ, 2014).

No Brasil, estudos realizados por Kramer et al. (2015), o DCF foi detectado com concentrações máximas de 285 ng/L e 54 ng/L nos Rios Iguazu e Atuba, respectivamente. No município de Campinas em São Paulo, o DCF foi detectado em amostras de água nos riachos Pinheiros (96 ng/L) e Anhumas (115 ng/L) (MONTAGNER & JARDIM, 2011).

TABELA 2 – Concentrações de DCF encontrados em amostras de água.

Local	Matriz	Concentração	Fonte	Ano
Espanha	Água de rio	0,000610 mg L ⁻¹	FARRÉ et al.	2001
Espanha	Água de rio	0,003462 mg L ⁻¹	CARMONA et al.	2014
Brasil - Curitiba	Água de rio	0,000285 mg L ⁻¹	KRAMER et al.	2015
Brasil – São Paulo	Água de rio	0,000115 mg L ⁻¹	MONTAGNER; JARDIM	2011
Alemanha	Água de rio	0,000272 mg L ⁻¹	QUINTANA; REEMTSMA	2004
Brasil – Baía de Santos	Água do mar	0,000019 mg L ⁻¹	PEREIRA et al.	2016
Brasil - Paranaguá	Água do mar	0,000862 mg L ⁻¹	LIMA	2019
Portugal	Água do mar	0,000241 mg L ⁻¹	LOLIĆ	2015
Alemanhã	Água do mar	0,000092 mg L ⁻¹	NÖDLER	2014
Alemanhã	Esgoto	0,0063 mg L ⁻¹	SCHMIDT et al.	2018
Portugal	Esgoto	0,001137 mg L ⁻¹	PEREIRA et al.	2016
Eslovênia/Croácia	Esgoto	0,000812 mg L ⁻¹	CESEN et al.	2019
Inglaterra	Esgoto	0,000201 mg L ⁻¹	WILKINSON et al.	2016
França	Água potável	0,000056 mg L ⁻¹	VULLIET, E; CREN-OLIVE,C	2011
Espanha	Água potável	0,000025 mg L ⁻¹	CARMONA et al.	2014
Japão	Água potável	0,000016 mg L ⁻¹	SIMAZAKI et al.	2015
Suécia	Água potável	0,000008 mg L ⁻¹	TRÖGER et al.	2018

Fonte: A autora (2022).

2.2 BIODEGRADAÇÃO DO DCF POR MICROALGAS

A biodegradação pode ser entendida como um método que utiliza microrganismos com capacidade de reduzir, eliminar ou degradar contaminantes (MACHADO; NASCIMENTO; ARAUJO, 2016; KRZMARZICK et al., 2018). A biodegradação surgiu como um mecanismo alternativo que realiza a remoção de DCF e outros contaminantes emergentes baseados na utilização de microalgas e outros microrganismos como uma solução econômica e sustentável (ESCAPA et al, 2017). Atualmente existem poucos estudos que envolvem a remoção de DCF em meio aquático e microalgas, pois ainda é desconhecida a capacidade das microalgas de acumular DCF (ESCAPA et al., 2017 ; VILLAR-NAVARRO et al., 2018).

Apesar de estudos recentes comprovarem a remoção de DCF por microalgas e outros microrganismos como bactérias e fungos, ainda existem lacunas relacionadas ao conhecimento do processo de degradação. As microalgas mais indicadas para utilizar nos processos de degradação de contaminantes são as espécies extremófilas, que toleram concentrações mais altas de poluentes (VARSHNEY et al., 2014).

Segundo Aguiar & Machado (2022), estudos que envolvem a utilização de microrganismos para remoção de contaminantes como o DCF, precisam levar em consideração a realização de ensaios de toxicidade preliminares para garantir que a concentração utilizada não será tóxica para o microrganismo influenciando os resultados da biodegradação.

2.3 ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

A espectrofotometria é a técnica que utiliza a medida da radiação absorvida pela substância de interesse, sendo classificada conforme o comprimento de onda envolvido na análise. A espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis) fundamenta-se nas transições eletrônicas resultantes da absorção da radiação na região do ultravioleta (190 a 300 nm) e do visível (300 a 800 nm) (HARRIS, 2017). No procedimento espectrofotométrico a radiação absorvida pela substância contida na amostra em determinado comprimento de onda é comparada com a radiação absorvida por uma amostra com concentração conhecida da mesma substância.

O DFC pode ser detectado de forma direta e rápida através da espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), uma vez que, absorve radiação no comprimento de onda entre 200 e 300 nm. Os limites de detecção alcançados pela espectrofotometria UV é da ordem de $\mu\text{g/L}$ a ng/L (DA SILVA; COLLINS, 2011), mas depende da presença de outras estruturas na solução que absorvam nessa faixa de onda. Além disso, a espectrofotometria pode ser utilizada para determinar a contagem do crescimento ou declínio algal (COSTA; OLIVI, 2008), utilizando comprimento de ondas dos pigmentos clorofilianos, que absorvem em comprimentos de onda no visível nas faixas de 425 e 680 nm.

2.4 TOXICOLOGIA

2.4.1 Ecotoxicologia aquática

A ecotoxicologia pode ser entendida como uma área específica da toxicologia ambiental que estuda os efeitos tóxicos causados por substâncias químicas, físicas, naturais ou sintéticas sobre organismos pertencentes a um ecossistema definido. Tem o objetivo de entender a introdução dos agentes tóxicos no ambiente e suas interações com populações e comunidades naturais. A ecotoxicologia aquática é uma ferramenta de monitoramento ambiental que tem a finalidade de analisar os efeitos de substâncias tóxicas sobre indivíduos representativos do ecossistema aquático. Ensaios de toxicidade aquática são amplamente utilizados, pois os ecossistemas aquáticos representam os principais receptores de substâncias contaminantes (COSTA; OLIVI, 2008).

Os ensaios toxicológicos são testes laboratoriais executados de forma controlada, perante características e condições experimentais específicas com o objetivo de avaliar efeitos nocivos de substâncias nos organismos vivos. Nesses ensaios, os organismos-teste são expostos a distintas concentrações do agente tóxico e os resultados dos efeitos observados são quantificados (COSTA; OLIVI, 2008). Os testes toxicológicos aquáticos são classificados em agudos e crônicos e podem ser utilizados para avaliar os efeitos nocivos de diversos fármacos com diferentes organismos-teste (SOUZA; AQUINO; SILVA, 2020).

Os ensaios de toxicidade aguda são empregados com o intuito de avaliar os efeitos tóxicos de um agente sobre organismos aquáticos em um curto período de

tempo em detrimento do tempo de vida desse organismo. Tem como propósito quantificar as dose ou concentrações de substâncias tóxicas capazes de estimular uma resposta específica no organismo-teste, geralmente em um período curto de tempo. Comumente, os efeitos observados em ensaios de toxicidade aguda em organismos aquáticos são a mortalidade e o estado de imobilidade natatória. As variáveis determinadas nos ensaios de toxicidade aguda são expressas em termos de concentração efetiva média (CE_{50}) ou a concentração letal média (CL_{50}), ou seja, estima a concentração do agente tóxico que causa imobilidade ou mortalidade à 50% dos organismos após um tempo de exposição (COSTA e OLIVI, 2008).

Os ensaios de toxicidade crônica são aplicados para avaliar os efeitos de substâncias tóxicas sobre organismos aquáticos por períodos maiores, que podem englobar todo o ciclo de vida do organismo-teste ou parte dele (geralmente 2/3 do ciclo de vida). Testes de toxicidade crônica utilizam exposições prolongadas a concentrações subletais. Nestes ensaios os resultados obtidos são apresentados em termos de concentração de efeito não observado (CENO) caracterizado como a maior concentração do contaminante testado que não causa efeito significativo comparado a um controle, e concentração de efeito observado (CEO), que se caracteriza pela menor concentração testada do contaminante que causa efeito significativo comparado a um controle (COSTA e OLIVI, 2008).

Os testes toxicológicos devem ser realizados conforme protocolos padronizados que permitam atingir níveis de certeza aceitáveis e que sirvam de guia para agências reguladoras para tomadas de decisões. Existem agências de normatização nacionais e internacionais que recomendam a utilização de diferentes protocolos e espécies para a realização de testes toxicológicos, dentre elas: *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), *Association of Analytical Communities* (AOAC) e *International Organization for Standardization* (ISO).

No Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) elabora normas técnicas para especificar os métodos de ensaio de toxicidade, além da Companhia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) que também está elaborando testes padronizados de toxicidade (COSTA e OLIVI, 2008). No presente trabalho, para a realização dos testes crônicos empregando a microalga marinha *Tetraselmis* sp., foi utilizado como guia a norma técnica NBR 16.181/2021.

2.5 ORGANISMO-TESTE

A escolha do organismo-teste empregado nos ensaios de toxicidade é de fundamental importância para o estudo de toxicidade. O organismo deve possuir sensibilidade relativamente constante, para que os resultados obtidos sejam precisos e para que seja garantida boa reprodutibilidade dos resultados (RUBINGER, 2009). Para isso, é necessário conhecer previamente aspectos relacionados com a biologia da espécie, como reprodução, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento. Além disso, a espécie utilizada deve ser representativa do ambiente e abundante (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

O organismo-teste utilizado nessa pesquisa é a microalga verde marinha *Tetraselmis* sp. (FIGURA 3) pertencente à família *Chlorodendraceae*. Trata-se de um gênero de microalga unicelular cujo tamanho das células variam de 10 a 14 µm, possuem formas cordiformes, elípticas ou quase esféricas, e ainda, podem ocorrer nas formas bentônicas ou planctônicas. São organismos livres e de alta mobilidade por possuírem flagelos, e são encontrados em abundância nos ecossistemas marinhos (CORREIA, 2013). A escolha dessa microalga como organismo teste deste estudo baseou-se na disponibilidade das cepas, recomendação da ABNT e posição do microrganismo na cadeia trófica.

A utilização de microalgas como bioindicadores é ampla e importante, pois como produtoras primárias, estão situadas na base da cadeia alimentar e qualquer alteração nessas comunidades pode afetar os demais níveis tróficos. Dentre as vantagens de utilizar algas em ensaios toxicológicos podem ser citados a boa sensibilidade às alterações ambientais e o ciclo de vida curto (COSTA; OLIVI, 2008).

Tem sido difundida a utilização da *Tetraselmis* sp. para avaliação da toxicidade de substâncias em níveis tróficos de produtores e consumidores primários (quando em estudos de transferência trófica) nos ecossistemas marinhos. Possuem uma importante função como produtoras e são fontes significativas de alimento para outros organismos como os crustáceos (FERREIRA et al., 2007).

FIGURA 3 – Microalga verde marinha *Tetraselmis* sp. Barra de escala 10 μm .



Fonte: LEVINE, FLEURENCE (2018).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes toxicológicos e de biodegradação do DCF foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Paraná, Campus Avançado Pontal do Paraná no Centro de Estudos do Mar (LABTOX, CPP/CEM-UFPR). As microalgas marinhas verdes foram obtidas no Laboratório de Engenharia e Malacocultura no mesmo campus. A microalga verde marinha *Tetraselmis* sp. foi escolhida para ser utilizada neste estudo, pois são representativas da base da cadeia trófica e estão disponíveis para uso nos laboratórios do CPP/CEM-UFPR. Além disso, a utilização dessa espécie é recomendada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e o seu cultivo foi realizado em meio Conway conforme norma técnica NBR 16.181/2013, Anexo A (ABNT, 2021). O DCF utilizado neste estudo foi sal de sódio (*Diclofenac sodium salt* - $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$), da marca *Sigma-Aldrich* (D6899 – 10 g) adquirido comercialmente.

3.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DA MICROALGA *TETRASELMIS SP*

O cultivo do organismo teste foi realizado em meio de cultura Conway descrito no anexo A da Norma Brasileira ABNT NBR 16181 de 2021, que estabelece métodos de ensaios ecotoxicológicos para algas marinhas. O meio de cultivo Conway foi estabelecido em recipientes de 1 L de meio e foi preparado de acordo com a Tabela 3, que apresenta o preparo de soluções-estoque e nutrientes utilizadas para a fabricação do meio. O meio de cultura foi preparado com água do mar filtrada em membrana 0,45 μ m de acetato de celulose como água de diluição. Após o preparo, o meio teve o pH corrigido para aproximadamente 7,2 e foi autoclavado em 121°C por 20 minutos. Depois de resfriado foi introduzida a solução de vitaminas sob o fluxo laminar. O meio foi aerado por 30 minutos e então a microalga foi inoculada no meio em recipiente de 0,5 L.

TABELA 3 - Composição do meio de cultivo Conway, empregado no cultivo e nos testes de toxicidade da microalga *Tetraselmis sp.* * V = volume das soluções para o preparo de 1 L do meio de cultura.

Solução	Substância	Quantidade	Preparo
1- Solução de Metais Traço (SMT) (para 50 mL)	ZnCl ₂	2,10 g	Os sais foram dissolvidos para 100 mL de água destilada autoclavada e foi acidificado HCl concentrado.
	CoCl ₂ .6H ₂ O	2,00 g	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,90 g	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	2,00 g	
2- Solução de Vitaminas (para 500 mL)	B12 (Cianocobalamina)	50 mg	As vitaminas foram dissolvidas para 1000 mL de água destilada autoclavada. Foi armazenada na geladeira ao abrigo da luz. A solução não foi autoclavada.
	B1 (Tiamina)	50 mg	
	Vitamina H (Biotina)	1,00 mg	
3- Solução de Silicatos (para 1000 mL)	Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	40 g	A solução foi preparada em 800 ml e completada até 1000 mL com água destilada.
4- Solução de Nutrientes (para 1000 mL)	FeCl ₃ .6H ₂ O	1,30 g	Os nutrientes foram preparados em 600 ml, foi adicionado 1 mL de SMT e completada em 1000 ml com água destilada.
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,36 g	
	H ₃ BO ₃	33,6 g	
	EDTA	45 g	
	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	20 g	
	NaNO ₃	100 g	
Preparo do meio (para 1000 ml)	SMT (Sol. 1)	1,00 mL	A água do mar foi filtrada em membrana 0,45 µm e transferida para recipiente de 1 L. Foram adicionados 1 mL da solução de nutrientes e 1 ml da solução de silicato. Após autoclavada e fria, foi adicionado 0,1 ml da solução de vitaminas.
	Água do mar filtrada	1000 mL	
	Solução de nutrientes	1 mL	
	Solução de silicato	1 mL	
	Solução de vitaminas	0,1 mL	

Fonte: ABNT 16181 (2021).

O cultivo foi mantido sob iluminação mínima de 4500 lux, aeração e agitação constantes e a temperatura se manteve em 20 ± 2 °C. A agitação foi promovida por agitador magnético com 150 rpm, enquanto a aeração foi promovida por bomba de aeração de aquário com filtro de ar de $0,45 \mu\text{m}$. Após o período de adaptação (aproximadamente 30 dias), a alga se desenvolveu de forma saudável e ritmo de crescimento esperado.

A manutenção do meio de cultura foi realizada semanalmente com a troca de 90% do volume do cultivo por meio Conway (ABNT, 2021). A manutenção teve o intuito de manter o cultivo de microalgas saudável e em constante crescimento. Todas as manutenções do cultivo foram realizadas em fluxo laminar com o intuito de evitar a contaminação do cultivo com outros microrganismos. Este processo de manutenção ocorreu em toda a fase do estudo.

3.1.1 Procedimentos para a quantificação da densidade celular da microalga *Tetraselmis* sp.

Os métodos tradicionais que realizam a contagem celular de forma visual por meio de microscópio estão sujeitos a erro humano de contagem, além de necessitar de técnicos experientes e um maior tempo para quantificar os resultados. Por isso, para a quantificação da densidade celular da microalga *Tetraselmis* sp, o método escolhido foi o espectrofotométrico indireto, utilizando um espectrofotômetro UV-visível (KASUAKI, mod. IL-593-S, 190-1100 nm, China).

Para validar o método de quantificação espectrofotométrico, foi preciso estabelecer um padrão de equivalência entre o método tradicional de contagem visual em microscópio ótico e as leituras das absorvâncias das suspensões de algas no espectrofotômetro em comprimentos de ondas de absorvância máxima. Para isso, primeiramente foi realizada uma varredura no espectrofotômetro utilizando o intervalo de comprimento de onda de 200 a 700 nm em cubeta de quartzo. O espectro de varredura realizado, demonstrou que o comprimento de onda que apresentou um pico de absorção máxima foi de aproximadamente 680 nm (Gráfico 4). Com isso, este comprimento de onda se mostrou o mais adequado para a quantificação da densidade celular.

Após a definição do comprimento de onda mais adequado de 680 nm, foi construída a curva de calibração da densidade celular da microalga. Para isso, a partir

de uma amostra de solução algal foram realizadas as contagens pelo método tradicional em microscópio ótico, utilizando a câmara de Neubauer, de acordo com a técnica descrita por VALER; GLOCK (1999), por meio de uma alíquota da solução de alga do cultivo foram preparadas diluições em meio Conway a partir da solução mãe (mais concentrada, 100%) com percentuais de diluição de 75, 50, 25, 12,5 e 6,25%. Em paralelo foram realizadas as leituras das absorvâncias no espectrofotômetro no comprimento de onda de 680 nm para todas as diluições. Uma curva de calibração foi construída correlacionando as absorvâncias e respectivas densidades celulares das diluições obtidas pela contagem em microscópio e a equação da reta obtida foi utilizada para determinar a densidade celular de todas as exposições de microalgas nos ensaios de toxicidade e de biodegradação.

3.1.2 Procedimentos para quantificação do DCF

Para realizar a quantificação de DCF nos ensaios de biodegradação foi preciso estabelecer uma correlação linear entre absorvância e concentração do DCF, para a construção de uma curva de calibração. Foi realizada uma varredura de uma solução de DCF na concentração de 25 mg/L preparada no meio Conway no espectrofotômetro de UV-Vis utilizando o intervalo de 200 a 800 nm, utilizando uma cubeta de quartzo. O espectro de varredura realizado, demonstrou que o comprimento de onda que apresentou um pico de absorção máxima foi de aproximadamente 275 nm. Para a curva, diferentes concentrações de DCF (1,0; 5,0; 10; 25,0; 50,0; 100 mg/L) foram preparadas em meio Conway, e a leitura da absorvância das soluções foram realizadas em cubetas de quartzo em espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 275 nm. Uma curva de calibração foi construída, correlacionando as absorvâncias e as concentrações das diluições, e a equação da reta obtida foi utilizada para determinar a concentração de DCF nas exposições de microalgas para os ensaios de biodegradação nos diferentes tempos.

3.2 PROCEDIMENTOS DO ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA COM DCF

Os ensaios de toxicidade crônica deste estudo foram efetuados de acordo com a Norma Brasileira Técnica NBR 16181 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2021). Trata-se de uma norma específica que descreve diretrizes e métodos

padronizados de ensaios de ecotoxicidade crônica envolvendo o meio aquático, mais especificamente envolvendo microalgas marinhas.

Para os testes de toxicidade foram testadas cinco concentrações diferentes de DCF, mais um controle negativo apenas com meio de cultura e a microalga. Todas as concentrações empregadas no teste, incluindo o controle, foram realizadas em triplicata para uma melhor avaliação e comparação do crescimento de células expostas ao DFC com o controle do teste. Para as exposições, foram utilizados tubos estéreis do tipo Falcon transparentes de 50 mL.

A solução estoque de DCF foi preparada na concentração de 1.000 mg/L em meio Conway. A solução estoque foi homogeneizada utilizando-se uma sonda ultrassônica (B.BRAUM, mod. Labsonic U, 500W, Alemanha). A solução estoque foi utilizada então para preparação das diluições nas concentrações de 1; 10 e 100 mg/L, em meio Conway. As concentrações finais de exposição foram preparadas nos frascos de exposição nas concentrações de 0,1; 1; 10 100 e 200 mg/L. Os frascos de exposição contendo as microalgas em concentrações iniciais de 1×10^5 cel/mL e as concentrações e DCF foram mantidos em condições de iluminação (min. 4500 lux) e agitação (250 rpm) constantes e temperatura de 20 ± 2 °C por meio de uma incubadora refrigerada do tipo *Shaker* (LIMATEC, mod. LT600/2, Brasil).

Nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após o início do ensaio foram realizadas leituras da absorbância em 680 nm de uma alíquota homogeneizada da exposição para obter dados de densidade celular das exposições.

3.3 PROCEDIMENTOS DO ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO DO DCF

Os ensaios de biodegradação do DCF foram realizados tubos de centrifuga estéreis do tipo Falcon com o intuito de replicar o mecanismo de biodegradação em escalas menores utilizando a microalga *Tetraselmis* sp. como uma possível agente de remoção do DCF. Inicialmente, os testes foram preparados duas concentrações diferentes de DCF (10 e 50 mg/L, preparado em meio Conway) mais um controle negativo das algas e um controle para acompanhamento do DCF diluído em meio Conway e sem microalgas, com o intuito de monitorar mecanismos de fotodegradação. As concentrações foram escolhidas de acordo com os resultados monitorados nos testes de toxicidade, cuja ação não demonstrou efeito tóxico para as microalgas. Foram realizados dois testes independentes, ambos preparados em

triplicata sob as mesmas condições de agitação, temperatura, luminosidade e tempos de exposição dos testes de toxicidade na *Tetraselmis* sp. A concentração inicial de microalgas para os ensaios de biodegradação foi de $2,5 \times 10^5$ cell/mL.

O acompanhamento da degradação do DCF nos tratamentos foi feito espectrofotometricamente através da medição da absorbância no comprimento de onda de 275 nm e as concentrações foram extrapoladas com o auxílio da curva de calibração construída para o DCF. Paralelamente, durante todo o ensaio a densidade da microalga foi monitorada no comprimento de onda de 680 nm.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

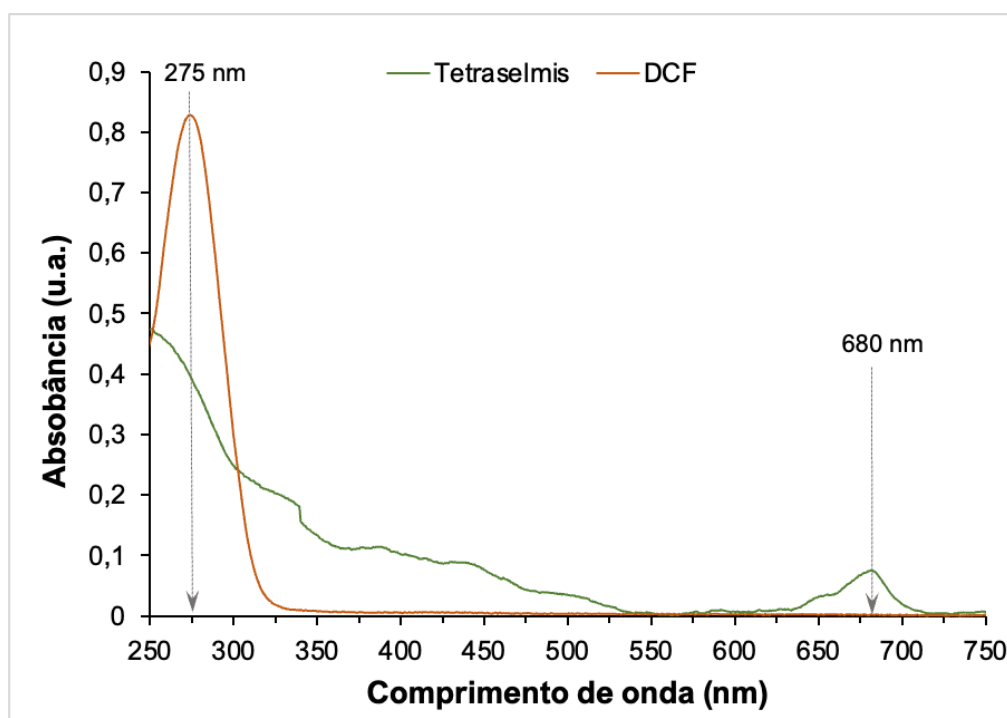
Foram realizados 3 testes independentes para verificar a reprodutibilidade dos ensaios nas condições definidas para os ensaios. Todos os testes toxicológicos utilizaram triplicatas para todas as concentrações testadas, e os valores de densidade celular foram expressos pela média e desvio padrão. Após os testes toxicológicos, foram obtidas diferentes respostas tóxicas em relação às concentrações de DCF utilizadas. Para avaliar a relação entre amostras de exposição e controle em detrimento da densidade celular da alga, foi utilizada análise de variância (ANOVA) bifatorial seguida do teste de Tukey. O teste de Tukey foi aplicado para avaliar estatisticamente as diferenças significativas entre as médias dos tratamentos em comparação ao controle negativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software R 4.2.1 com nível de significância de 0,05. Adicionalmente, para avaliar a robustez do script do R, os dados de CE50 do DCF foram também calculados utilizando o software GraphPad Prism (v. 8.0.0, GraphPad Software, San Diego, California USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA MICROALGA E DO DCF

Com o objetivo de encontrar o comprimento de onda mais adequado para quantificação da densidade celular da microalga *Tetraselmis* sp. e para detecção do DCF, fez-se a varredura espectrofotométrica na faixa de 250 a 750 nm da suspensão de microalgas *Tetraselmis* sp. e da solução de 25 mg/L de DCF, ambos preparados em meio Conway. (FIGURA 4).

FIGURA 4 - Espectro de varredura da suspensão de microalga verde marinha *Tetraselmis* sp. e da solução de 25 mg/L de DCF, ambos diluídos em meio Conway.



Fonte: A autora (2022).

Destas análises, constatou-se o comprimento de onda considerado mais adequado para a quantificação da *Tetraselmis* sp. foi de 680 nm, valores referentes a absorbância da Clorifila *a*. Considerando o espectro de varredura do DCF, constatou-se o comprimento de onda mais indicado para a quantificação do DCF foi 275 nm, região onde apresenta um pico máximo nos comprimentos de onda. A varredura realizada na suspensão contendo *Tetraselmis* sp. demonstrou picos de absorbâncias

na região entre 250 e 350 nm, fator que podem apresentar interferência na medição do DCF nos meios de exposição com microalga empregando essa técnica. Essa interferência pode afetar o limite de detecção do método. Para contornar problemas metodológicos na detecção do DCF, medidas de absorvâncias em 275 nm foram realizadas no controle apenas com microalgas em todos os tempos amostrais e esses valores de absorvância foram subtraídos das exposições com DCF. Essa diferenciação entre comprimentos de onda da microalga e o DCF é de fundamental importância durante as análises, para minimizar erros de quantificação relacionados as interferências de picos de absorvância e outras espécies presentes no meio que também absorvem nos mesmos comprimentos de onda escolhidos para quantificação.

4.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DA TAXA DE REMOÇÃO DO DCF

Para estabelecer o método de quantificação da taxa de remoção de DCF, foram realizadas leituras das absorvâncias em diferentes diluições das soluções do contaminante, no comprimento de onda de 275 nm, preparadas a partir da solução estoque de 1000 mg/L conforme Tabela 4.

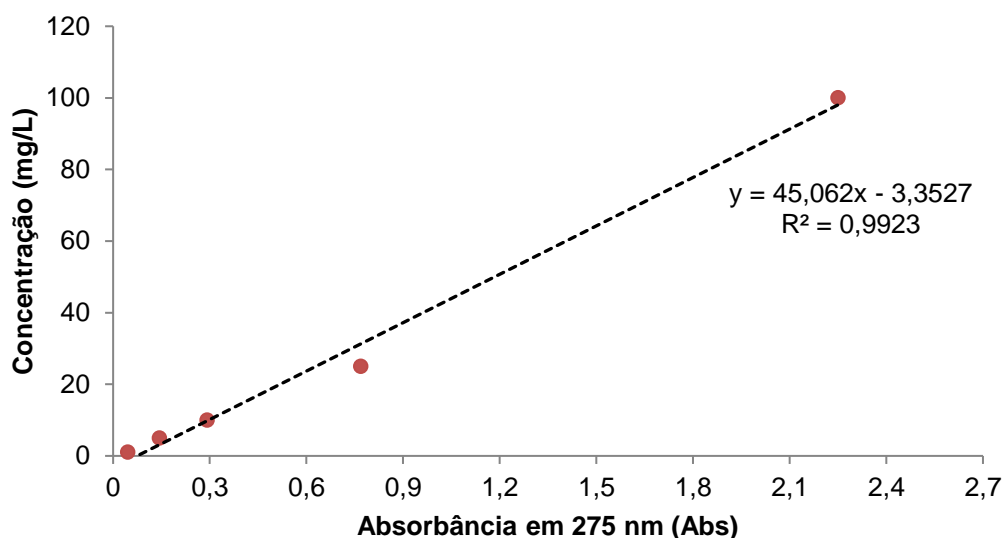
TABELA 4 – Concentrações de DCF (mg/L) e as respectivas absorvâncias em 275 nm.

Conc. DCF (mg/L)	Abs (275nm)
1,0000	0,046
5,0000	0,144
10,000	0,292
25,000	0,769
50,000	1,520
100,00	2,250

Fonte: A autora (2022).

A curva de calibração foi construída a partir dos dados de absorvância obtidos em função da concentração do DCF. A seguir é apresentada na Figura 5 curva utilizada para quantificar a concentração de DCF que permitiu o cálculo da taxa de remoção do mesmo os ensaios.

FIGURA 5 - Correlação linear da absorvância em função da concentração de DCF (mg/L).



Fonte: A autora (2022)

De acordo com a Figura 5, a correlação linear testada apresentou R^2 de 0,9923 e pode ser considerada adequada para a quantificação da concentração de DCF na faixa de concentração de 1 a 100 mg/L.

4.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DA *Tetraselmis sp.*

Na Tabela 5 são apresentadas as concentrações calculadas (a partir da equação da curva) da densidade celular e as absorvâncias lidas para as diferentes diluições da suspensão celular da microalga do cultivo.

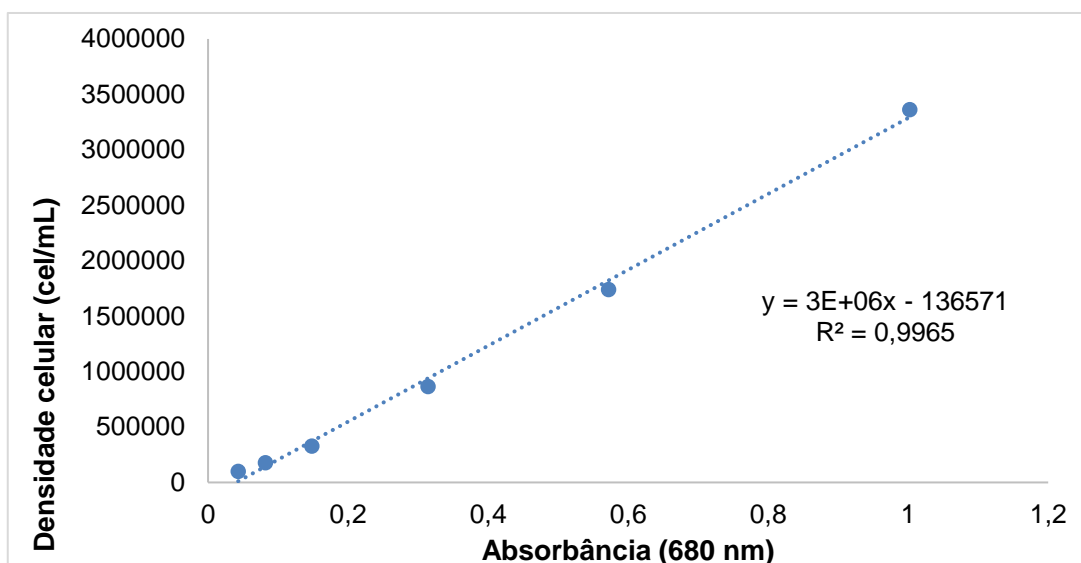
TABELA 5 - Dados de absorvância e concentração para as diferentes diluições

Diluição %	Concentração celular (cel/mL)	Abs. (680 nm)
100	3362500	1,002
75	1931250	0,847
50	1740000	0,572
25	865000	0,314
12,5	330000	0,148
6,25	180000	0,082
3,125	101250	0,043

Fonte: A autora (2022).

Para o método de quantificação da densidade celular, foi construída a curva de calibração no comprimento de onda de 680 nm, em razão das diferentes diluições da suspensão de algas preparadas a partir do cultivo (100%). A curva de calibração foi construída a partir dos dados de absorvância obtidos em função da densidade celular. A seguir, na Figura 6, está apresentada a curva de calibração utilizada para realizar a quantificação da densidade celular da *Tetraselmis* sp.

FIGURA 6 - Correlação linear da absorvância em função da densidade celular para a microalga *Tetraselmis* sp. (cel/mL).



Fonte: A autora (2022).

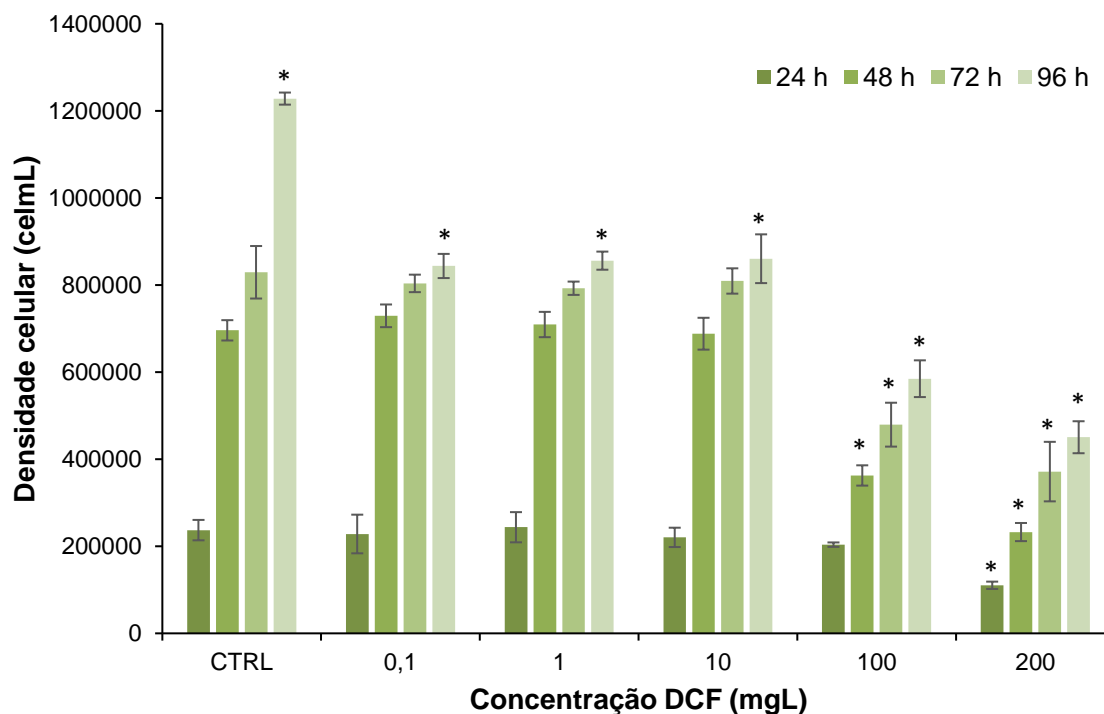
Conforme Figura 6, a correlação linear da curva de calibração apresentou R^2 de 0,9965 sendo considerada adequada para realizar a extrapolação da densidade celular em um intervalo de concentração de 1×10^5 à $3,4 \times 10^6$ cel/mL.

4.4 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA DO DCF

Com o objetivo de obter respostas toxicológicas similares para testes diferentes, foram realizados 3 testes independentes de toxicidade crônica com a microalga *Tetraselmis* sp., com todas as concentrações expostas testadas em triplicata. Foram empregadas nos testes cinco concentrações distintas de DCF (0,1; 1; 10; 100 e 200 mg/L) mais o controle negativo em quatro tempos de exposição diferentes (24, 48, 72 e 96h). Os resultados expressivos do teste que obteve o melhor

ajuste são apresentados a seguir na Figura 7 e Tabela 7 com o intuito de avaliar a resposta toxicológica crônica da *Tetraselmis sp.* à exposição ao DCF.

Figura 7 - Ensaio de exposição crônica da microalga verde marinha *Tetraselmis sp* ao DCF, pela resposta da densidade celular (cel/mL) em função da concentração de DCF (mg/L) nos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96 h. Diferença significativa entre o tratamento e o controle do teste ($p < 0,05$) estão indicados com *.



Fonte: A autora (2022).

A Figura 7 apresenta a resposta toxicológica da microalga *Tetraselmis sp.* quando exposta ao DCF em diferentes tempos e concentrações, sendo essa relação expressa em densidade celular (cel/mL) em função da concentração do contaminante (mg/L). É possível observar, um decréscimo significativo da densidade celular da microalga nas concentrações de 100 e 200 mg/L.

Conforme apresentado Tabela 7, e destacado na Figura 6 com asterisco (*), a análise estatística demonstrou que densidade celular foi significativamente diferente entre o controle e o tratamento na concentração de 200 mg/L em 24h de exposição ($p < 0,05$). Em 48h e 72h, as densidades celulares dos tratamentos nas concentrações de 100 e 200 mg/L também se mostraram significativas quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,05$). Já para a exposição em 96h, todas as concentrações diferiram significativamente do controle ($p < 0,05$). Com base nas análises estatísticas dos

resultados obtidos, podemos definir que para a *Tetraselmis* sp. a resposta crônica em 48 e 72h foram uma CEO de 100 mg/L e uma CENO de 10 mg/L. As menores concentrações (0,1; 1 e 10 mg/L) apresentaram comportamento similar ao controle negativo, onde é possível verificar o aumento da densidade celular nos respectivos tempos de exposição.

TABELA 6 – Resultados do Teste de Tukey comparando controle com demais concentrações de DCF e as variações sobre a densidade celular da microalga *Tetraselmis* sp. Valores significativos ($P < 0,05$) são identificados em negrito.

Fator	24h	48h	72h	96h
	P valor < 0,05			
CTRL : 0,1 mg/L	0.9981939	0.6646387	0.9835304	0.0000002
CTRL : 1 mg/L	0.9995470	0.9886584	0.9271047	0.0000003
CTRL : 10 mg/L	0.9691085	0.9990823	0.9945313	0.0000003
CTRL : 100 mg/L	0.6576283	0.0000000	0.0000128	0.0000000
CTRL : 200 mg/L	0.0009397	0.0000000	0.0000007	0.0000000

Fonte: A autora (2022)

Os valores de CE50 para a microalga *Tetraselmis* sp. foram calculados em dois softwares distintos, o GraphPad Prism e o R para todos os testes realizados. Os resultados obtidos para o Teste 1 são apresentados na Tabela 7. Assim, considerando o melhor ajuste dos dados ao modelo, a concentração de DCF que provoca o declínio em metade da população de microalgas expostas (CE50) submetidas aos testes desse estudo é de 112,7 mg/L no tempo de exposição de 48h. Ambos os softwares utilizados apresentaram valores de CE50 e R^2 muito próximos, sendo ambos adequados para o cálculo da CE50.

TABELA 7 – Valores de CE50 calculado para os diferentes tempos de exposição e respectivos R^2 e intervalo de confiança de 95% calculado por em softwares distintos.

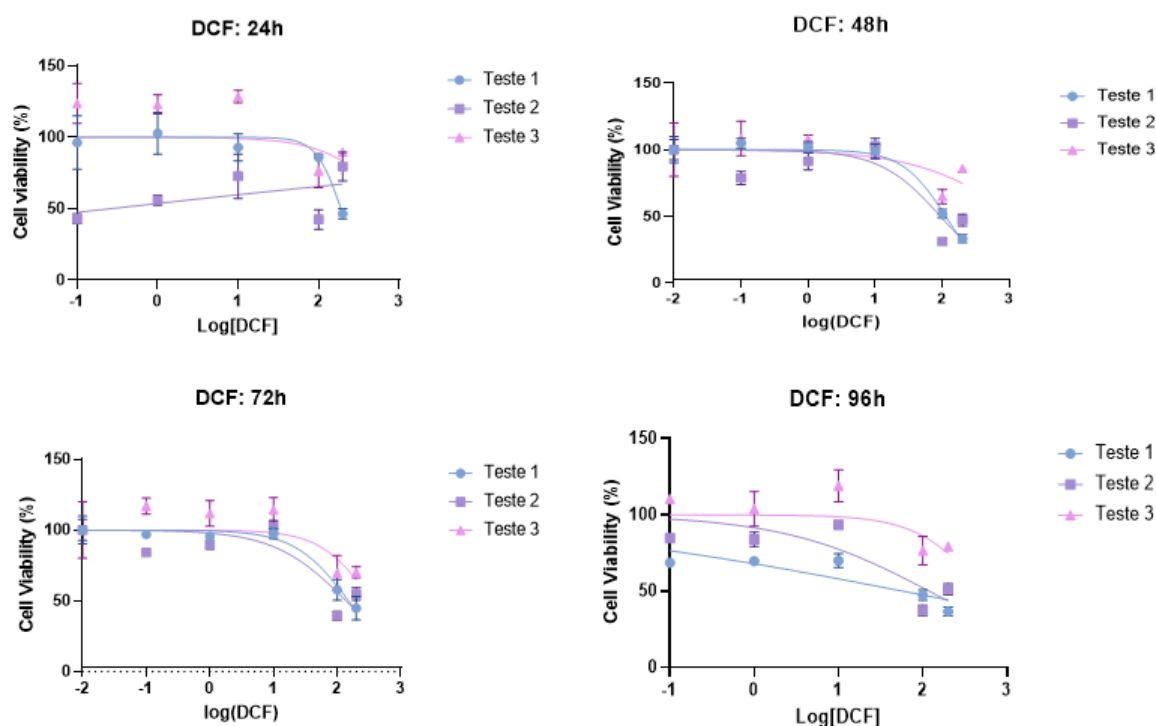
Tempo	Parâmetro	Software	
		R	Graphpad
24 h	CE50 (mg/L)	948,609	190,5
	R^2	0,746	0,787
	IC 95%	-	160,1 – 258,8
48h	CE50 (mg/L)	112,691	112,7
	R^2	0,943	0,968
	IC 95%	-	95,45 – 131,0
72h	CE50 (mg/L)	151,274	151,3
	R^2	0,908	0,933

	IC 95%	-	122,0 – 196,2
	CE50 (mg/L)	58,632	58,63
96h	R²	0,937	0,699
	IC 95%	-	19,62 – 328,5

Fonte: A autora (2022).

Na Figura 8 pode ser observada a relação dose-resposta da taxa de inibição de todos os testes realizados, expressa em curvas que relacionam a dose do contaminante ($\log[\text{DCF}]$) e a resposta do organismo testado expressa em viabilidade celular. Observa-se que todos os testes realizados apresentaram comportamentos muito semelhantes nos tempos de 48 e 72h, e o teste que apresentou a melhor ajuste a curva dose-resposta foi o teste 1.

FIGURA 8 – Curvas dose-respostas dos diferentes testes realizados nos diferentes tempos e concentrações de DCF testados.

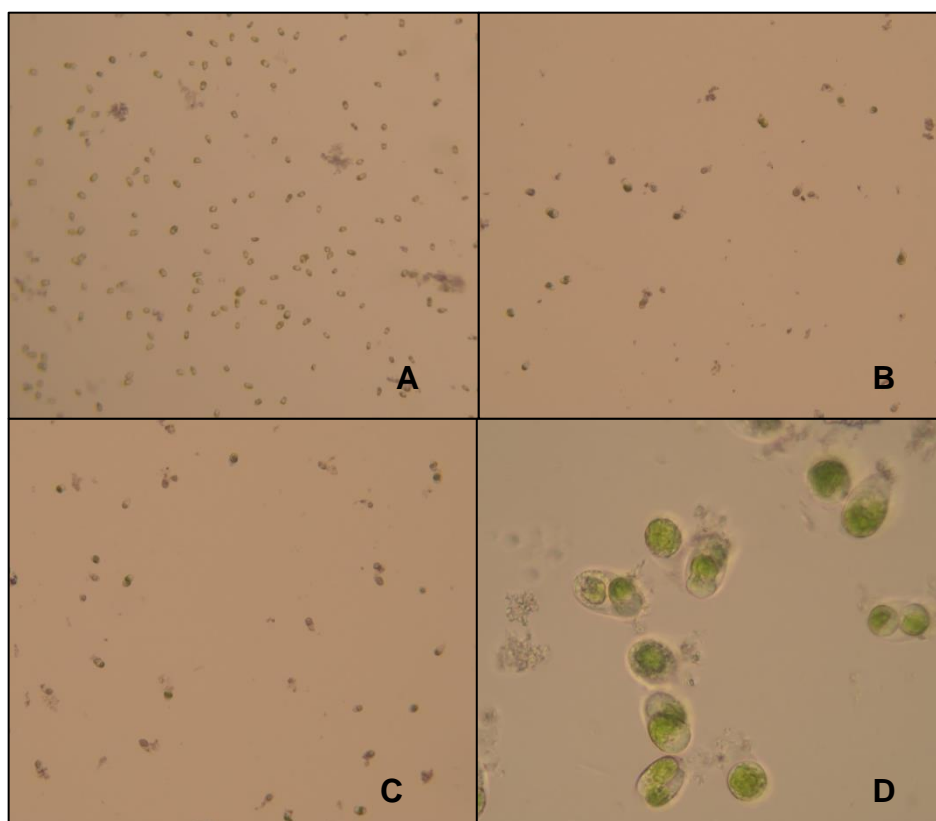


Fonte: A autora (2022).

Com o objetivo de avaliar danos celulares nas microalgas, as soluções de exposição de todas as concentrações em 96h foram avaliadas em microscópio óptico (Figura 9). Foi possível observar visualmente um declínio da densidade celular comparando o controle com as demais exposições. Ademais, no controle negativo as

algas se mostraram muito ativas e a partir da concentração de 10 mg/L as algas demonstraram uma menor mobilidade. Nas concentrações de 100 e 200 mg/L praticamente não havia microalgas em movimento, fato este explicado por uma possível imobilização das células pelo DCF. Numa análise visual das imagens das microalgas não foi possível observar danos celulares ou alterações morfológicas evidentes das células. Contudo, estudos mais aprofundados utilizando marcadores celulares de danos para análise de microscopia deve ser conduzido para maiores conclusões a respeito dos danos morfológicos.

FIGURA 9 – Avaliação do controle (A) e exposições de 100 (B) e 200 (C) mg/L 96 h após o início do teste. Em (D) é possível ver em detalhes microalgas expostas ao DCF em 200 mg/L. Magnificação de 100X (A, B e C) e 400X (D).



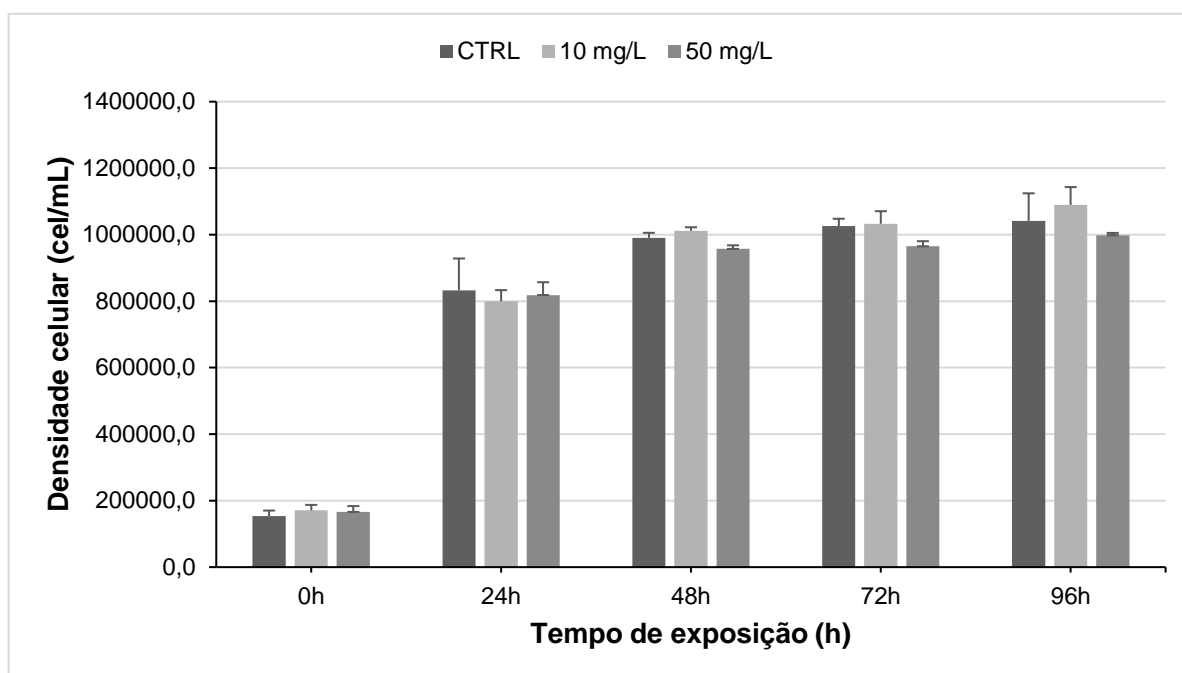
Fonte: A autora (2022).

4.5 TESTE DE BIODEGRADAÇÃO DO DCF PELA *Tetraselmis* sp.

O teste de biodegradação foi realizado com o objetivo de investigar preliminarmente a capacidade da microalga verde marinha *Tetraselmis* sp. de

atuar na remoção do contaminante DCF. A seguir, os resultados obtidos de acompanhamento da densidade celular com a exposição e os valores de concentração de DCF nos tempos amostrais são apresentados nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

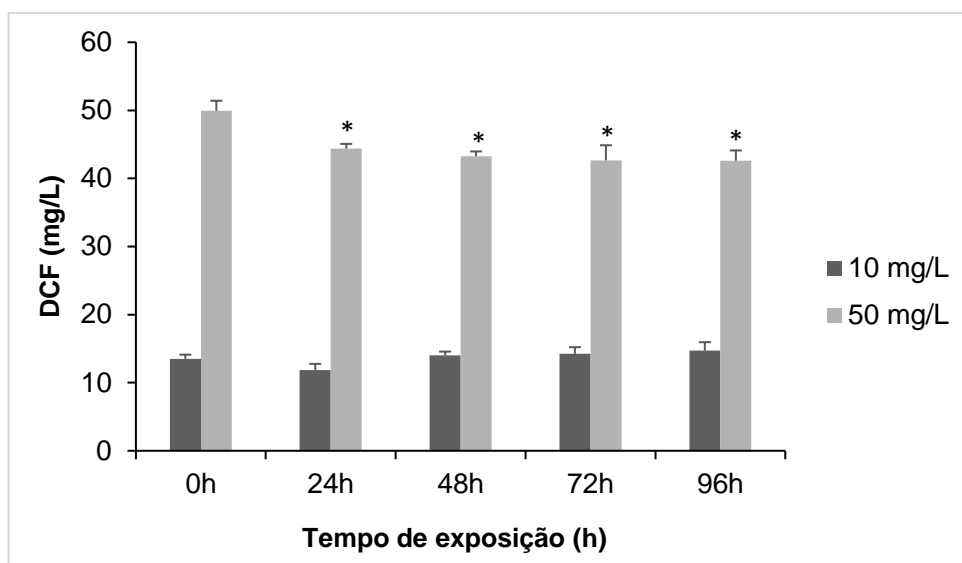
FIGURA 10 – Controle do crescimento da *Tetraselmis sp.* no controle e nas concentrações de 10 e 50 mg/L de DCF, monitorada nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h.



Fonte: A autora (2022).

A Figura 10 mostra a relação entre a densidade celular da microalga *Tetraselmis sp.* nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 h. É possível observar que a alga estava em fase de crescimento exponencial da sua biomassa não sendo afetada pela presença de DCF, sendo assim, mostrou-se adequada para aplicação do teste nas concentrações testadas.

FIGURA 11 – Biodegradação do DCF empregando a microalga *Tetraselmis* sp. empregando duas concentrações iniciais de DCF, 10 e 50 mg/L, acompanhado nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h (* $p < 0,05$).



Fonte: A autora (2022).

Quanto a biodegradação do DCF pela microalga *Tetraselmis* sp. (Figura 11), é possível observar uma visível alteração da concentração no meio de exposição para as exposições que partiram de 50 mg/L. Na concentração de 10 mg/L foi possível observar uma visível redução no tempo de exposição de 24 h, da ordem de 12,4%. Contudo não foi possível observar uma redução da concentração de DCF nos tempos de 48, 72 e 96 h.

Acredita-se que a metodologia de quantificação do DCF escolhida neste estudo apresentou fragilidades para avaliação da biodegradação de DCF nessa concentração. Isso é possível devido a absorvância residual da microalga no mesmo comprimento de onda do DCF, conforme discutido no item 4.1, além da possibilidade de geração de subproduto do DCF também pode estar absorvendo em comprimentos de onda de 275 nm. Os fatores listados limitaram a metodologia escolhida para acompanhar a biodegradação do DCF na concentração de 10 mg/L. Já para a concentração de 50 mg/L foi possível observar uma visível redução da concentração de DCF em todos os tempos avaliados, quando comparados ao tempo 0 h. Essa redução foi da ordem de 11,1 %, 13,3%, 14,5% e 14,6% nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h. Contudo, devido a limitação já descrita, os valores de degradação do DCF podem estar sendo subestimados.

TABELA 9 – Taxa de remoção de DCF para diferentes concentrações e tempos. * Valores negativos indicam aumento na concentração de DCF no meio de exposição.

Concentração	Taxa de remoção (%)			
	24h	48h	72h	96h
10 mg/L	12,4	-3,7*	-5,7*	-8,8*
50 mg/L	11,1	13,3	14,5	14,6

Fonte: A autora (2022).

O controle negativo apenas com DCF utilizado para avaliar a fotodegradação do DCF pela luz mostrou-se inalterado em todos os tempos de exposição, indicando que o DCF não sofreu fotodegradação pela exposição constante à luz nas condições testadas. Esse potencial de biodegradação do DCF por microalgas já foi reportado na literatura num estudo realizado por OUADA et al (2019). Nesse estudo, os autores demonstraram a remoção de DCF por duas microalgas verdes extremófilas, a *Picocystis* sp. e *Graesiella* sp. A microalga *Picocystis* sp. foi capaz de remover 73%, 43% e 25% para concentrações de 25, 50 e 100 mg/L de DCF, respectivamente, no tempo de 120 h. Já a microalga *Graesiella* sp. removeu 52%, 28% e 24% de DCF nas mesmas concentrações e tempo de exposição. Este estudo demonstrou que a taxa de remoção reduz com o aumento da concentração de DCF exposta. Além disso, o tempo de exposição testado foi superior ao tempo observado no presente estudo (até 96 h). Em outro estudo realizado por SANTOS et al (2017) utilizando as microalgas verdes *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*, demonstrou remoção de cerca de 20 a 80%, na concentração inicial de DCF \leq 25 mg/L em 48h.

Apesar das limitações da metodologia empregada, foi possível observar nesse estudo preliminar uma redução potencial de DCF pela microalga nas condições testadas. Contudo, cabe uma análise mais aprofundada dessas potencialidades, empregando metodologias mais precisas e robustas de quantificação do DCF com técnicas de cromatografia líquida, e ensaios em tempos de contato maiores com a microalga. Técnicas analíticas mais precisas permitiriam ainda monitoramento do da formação de subprodutos da degradação do DCF e acúmulo de DCF pela microalga.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou os efeitos toxicológicos do contaminante DCF sobre a microalga verde marinha *Tetraselmis sp.*, através da aplicação de testes ecotoxicológicos crônicos. A partir da resposta obtida nos testes de toxicidade foi possível obter uma concentração não tóxica para realizar os testes de biodegradação de DCF utilizando a microalga *Tetraselmis sp.* Com os resultados obtidos nesse estudo foi possível concluir que:

- Foram encontrados valores de CEO de 100 mg/L e uma CENO de 10 mg/L em 48 e 72h.
- A concentração de resposta aguda encontrada foi uma CE50 de 112,7 mg/L no tempo de 48h.
- O método indireto desenvolvido neste estudo para a quantificação da densidade celular da microalga se mostrou eficiente e rápido para aplicação em estudos futuros.
- O método de quantificação de DCF nos testes de biodegradação deve ser estudado com mais profundidade, sendo que para estudos futuros é recomendável utilizar-se de técnicas mais robustas como as cromatográficas.
- Os ensaios de biodegradação do DCF empregando como microrganismo a microalga *Tetraselmis sp.* demonstraram uma baixa eficiência na remoção nos tempos (24, 48, 72 e 96h) e concentrações iniciais (10 e 50 mg/L) estudadas.

Apesar da baixa eficiência de remoção, a microalga *Tetraselmis sp.* apresentou potencialidades para a biodegradação do DCF, uma vez que foram observadas remoção, e estudos complementares precisam ser conduzido empregando variações das condições experimentais, além do emprego de técnicas mais precisas para quantificação do DCF nas amostras de água e diferentes tempos de exposição dos testados nesse estudo.

5.1 RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados encontrados neste estudo e as dificuldades encontradas durante a pesquisa, recomenda-se para complementar o estudo:

- Realizar outros testes de biodegradação utilizando técnicas mais precisas de detecção do DCF, como por exemplo a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) que permite também a investigação da formação de subprodutos do contaminante.
- Realizar testes de biodegradação utilizando diferentes concentrações e tempos, investigando o comportamento do contaminante e da microalga em tempo superior às 96h.
- Investigar mais profundamente por microscopia ótica possíveis danos do contaminante a nível celular sobre a microalga.
- Realizar mais testes de toxicidade utilizando o DCF e a microalga *Tetraselmis* sp. e outras microalgas, inclusive espécie de água doce com o intuito de tonar os dados mais robustos.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. **DICLOFENACO**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=DICLOFENACO>>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- ALEXANDRA, C.; ROSADO CORREIA, S. **Desenvolvimento e otimização de meios de cultura para o cultivo de microalgas marinhas**. 2013.
- AGUIAR, P. A; MACHADO, K. M. G. Biodegradação do diclofenaco: uma revisão. **Revista Leopoldianum**, 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16181**: Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com microalgas marinhas. Rio de Janeiro, 2013.
- BANHARA, V. F. **ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES BIOMOLECULARES CAUSADAS PELO FÁRMACO DICLOFENACO SÓDICO EM PEIXES DA ESPÉCIE *Brycon opalinus* ATRAVÉS DA ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**. 78 f. Dissertação (Mestrado Bioengenharia) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2016.
- BANKS, A. T. et al. Diclofenac-associated hepatotoxicity: Analysis of 180 cases reported to the food and drug administration as adverse reactions. **Hepatology**, v. 22, n. 3, p. 820–827, set. 1995.
- BARROS, J. A. A. **Estudo toxicológico dos efeitos de um fármaco de uso humano (diclofenac) ao longo de uma cadeia trófica simulada em ambiente marinho**. Porto, Portugal: [s.n.]. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/302953553.pdf>>. Acesso em: 7 jul. 2021.
- BONFIM, J. R. A.; **Boletim Sobravime** 2004, 40/41, 23.
- BORGES, R. M. et al. Uso de filtros de carvão ativado granular associado a microrganismos para remoção de fármacos no tratamento de água de abastecimento. **Eng Sanit Ambient**. v.21 n.4. out/dez 2016. p. 709-720.
- CAMPANELLA, L., CUBADDA, F., SAMMARTINO, MP., SAONCELLA, A. (2001). **An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments**. *Water Res.* 35(1): 69-76.
- CARMONA, E., ANDREU, V., PICÓ, Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River basin: from waste to drinking water. **Sci. Total Environ**. 484, 53–63, 2014.
- CESEN, M. et al. The occurrence of contaminants of emerging concern in slovenian and croatian wastewaters and receiving sava river. **Science of the Total Environment**, Elsevier, v. 650, p. 2446-2453, 2019.

CID, A., PRADO, R., RIOBOO, C., SUAREZ-BREGUA, P., HERRERO, C. (2012). **Use of Microalgae as Biological Indicators of Pollution: Looking for New Relevant Cytotoxicity Endpoints**. En: Johnsen, MN. (ed.). *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy*. New York: Nova Science Publishers, pp: 311-323.

CORREIA, C. A. S. R. **Desenvolvimento e otimização de meios de cultura para o cultivo de microalgas marinhas**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos) – Instituto Politécnico de Leiria, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Leiria, 2013.

DA SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. APLICAÇÕES DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA O ESTUDO DE POLUENTES ORGÂNICOS EMERGENTES. **Quim. Nova**, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 907-938, Dec 1999.

DE AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: Revisão da literatura. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013.

DE BARROS, H. L. B. V. **Desenvolvimento de procedimentos espectrofluorimétricos para a determinação de diclofenaco e sulfametoxazol em amostras de águas**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2014.

DECISÃO DE EXECUÇÃO (UE) 2015/495 da Comissão, de 20 de março de 2015 - Estabelece uma lista de vigilância das substâncias para monitorização a nível da União no domínio da política da água nos termos da **Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu**. Disponível em: . Acesso em: 20 maio 2017.

DEMIREL, S.; SARAC, O. **Perfuração tardia da córnea com uso tópico de diclofenaco de sódio após radioterapia**, Olho e lentes de contato: Ciência e prática clínica: maio de 2012 - Volume 38 - Edição 3 - p 197-199 doi: 10.1097 / ICL.0b013e318235c4ed.

DE MOURA, J. A. **Estudo da Eficiência de Estações de Tratamento de Esgoto - ETE e Estações de Tratamento de Água – ETA na Eliminação de Resíduos de Estrógenos Naturais e Sintéticos na UGRHI-13 (Tietê-Jacaré)**. 188 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.

DOMINGUES, D.F. e BERTOLETTI, E. **Seleção, manutenção e cultivo de organismos Aquáticos**. Cap. 7, p: 153 – 184. 2006. In: ZAGATO, P.A. e

BERTOLETTI, E. 2006. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. ZAGATTO e BERTOLETTI (org.) São Carlos: Rima; 2006.

DOPICO, S. M. **Estudio del efecto citotóxico ejercido por el diclofenaco sobre las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Phaeodactylum tricornutum*.**

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Avançada) – Departamento de Biología, Universidade da Coruna, Coruna, 2019.

EMERENCIANO, D. P.; SILVA, H. F. O.; CARVALHO, G. C.; SOUZA, J. M.; CRUZ, M. F. C.; RIBEIRO, L. P. D.; MOURA, F. V. **Controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco sódico e potássico utilizando a espectroscopia no Infravermelho próximo NIR.** Congresso Brasileiro de Química, 48. Rio de Janeiro 2008.

ESCAPA, C., COIMBRA, R.N., PANIAGUA, S., GARCÍA, A.I., OTERO, M. (2017) Comparative assessment of pharmaceutical removal from wastewater by the microalgae *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. In: Biological Wastewater Treatment and Resource Recovery, Robina Farooq and Zaki Ahmad. Intech, pp. 99–117. <https://doi.org/10.5772/66772>.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. **Ecotoxicology of human pharmaceuticals *Aquatic Toxicology***, Elsevier, 10 fev. 2006.

FARRÉ, M.; FERRER, I.; GINEBREDÀ, A.; FIGUEIRAS, M.; OLIVELLA, L.; TIRAPU, L.; VILANOVA, M.; BARCELÓ, D. (2001). Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. **Journal of Chromatography**, v. 938, n. 1-2, p. 187-197.

FERREIRA, C. S. G. et al. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 3, p. 452–458, 1 jul. 2007.

HANIF, H. et. al. Environmental risk assessment of diclofenac residues in surface waters and wastewater: a hidden global threat to aquatic ecosystem. **Environmental Monitoring and Assessment**, Springer, v. 192, n. 204, March 2020.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2017.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. **Toxicology Letters**, v. 131, n. 1–2, p. 5–17, 10 maio 2002.

HEBERER, T.; REDDERSEN, K.; MECHLINSKI, A. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. **Water science and technology**, 2002;46(3):81-8. PMID: 12227607.

HSDB, 2012. **Diclofenac**. Disponível em: <<https://www.nlm.nih.gov/toxnet/index.html>>. Acesso em: 07 ago. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA INMETRO. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos: diclofenaco sódico**. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mrc-descricao/mrc-8937-](http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mrc-descricao/mrc-8937-FISPQ_MRC_8937_Informacoes__de_Seguranca_e_Transporte.pdf)

[FISPQ_MRC_8937_Informacoes__de_Seguranca_e_Transporte.pdf](http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/mrc-descricao/mrc-8937-FISPQ_MRC_8937_Informacoes__de_Seguranca_e_Transporte.pdf)>. Acesso em: 07 ago. 2022.

JORGENSEN, S. E.; HALLING-SORENSEN, B. Drugs in the environment. **Chemosphere**, v. 40, n. 7, p. 691–699, 1 abr. 2000.

KRZMARZICK, M.J.; TAYLOR, D.K.; FU, X.; MCCUTCHAN, A.L. Diversity and niche of archaea in bioremediation. **Archaea**, p. 1-17, set. 2018.

LEVINE, I. A; FLEURENCE, J. **Microalgae in Health and Disease Prevention**, Academic Press, 2018, ISBN 9780128114056, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00001-3>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128114056000013>>.

LOLIĆ, A., PAÍGA, P., SANTOS, L.H.M.L.M., RAMOS, S., CORREIA, M., DELERUE-MATOS, C., 2015. Assessment of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawaters of north of Portugal: occurrence and environmental risk. **Sci. Total Environ.** 508, 240–250.

MACHADO, K.M.G.; NASCIMENTO, E.A.; ARAUJO, J.C.S.B. Aplicação da biorremediação no Estado de São Paulo. **Revista Leopoldianum, Santos**, v. 42, n. 166-118, 2016.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, 2011.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Diclofenac - LiverTox - Estantería NCBI. In: **Información clínica y de investigación sobre la lesión hepática inducida por fármacos**. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012. p. 22.

NÖDLER, K., VOUTSA, D., LICHA, T. Polar organic micropollutants in the coastal environment of different marine systems. **Mar. Pollut. Bull.** 85, 50–59, 2014.

OLIVEIRA, L. L. D. et al. Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 123–131, 1 set. 2015.

OLIVI, C. R.; et. al. A toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de Avaliação, São Paulo. **Química Nova**, Vol. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

OUADA, S. B. et al. Biodegradation of diclofenac by two green microalgae: *Picocystis sp.* and *Graesiella sp.*, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Volume 186, 2019, ISSN 0147-6513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109769>

PAIS, M. C. N. **Avaliação da presença de fármacos, por LC-MS/MS em águas superficiais pré e pós-tratamento convencional por ensaio jar-test e caracterização do risco humano.** 136 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, universidade de São Paulo, 2013.

PEREIRA, A. M. et al. Assessing environmental risk of pharmaceuticals in portugal: Na approach for the selection of the portuguese monitoring stations in line with directive 2013/39/eu. **Chemosphere**, Elsevier, v. 144, p. 2507-2515, 2016.

PETROVIĆ, M. et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1–2, p. 1–14, 4 mar. 2005.

QUINTANA, J. B.; REEMTSMA T. **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. 18,7 (2004): 765-74. doi:10.1002/rcm.1403.

QUINTANA, J.B; RODIL, R; MAHI, P.L; LORENZO, S.M; RODRIGUEZ, D.P. Investigating the chlorination of acidic pharmaceutical and by-product formation aided by an experimental design methodology. **Water Research**, 2010.

RAMOS, et al. DESCARTE DE MEDICAMENTOS: UMA REFLEXÃO SOBRE OS POSSÍVEIS RISCOS SANITÁRIOS E AMBIENTAIS. **Ambiente & Sociedade**, São Paulo, v. XX, n. 4, p. 149-174, out.-dez. 2017.

RUBINGER, C. F.. **Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais.** Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SIGMA-ALDRICH. **Diclofenac sodium salt.** [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma>. Acesso em: 01 fev. 2019.

SANTOS, C. E. et al. Comparative Assessment of Pharmaceutical Removal from Wastewater by the Microalgae *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. **Web of Science** (2017). <http://dx.doi.org/10.5772/66772>

SANTOS, DO C. E. M. **Priorização de fármacos em água destinada ao consumo humano baseada em avaliação da toxicidade e do comportamento ambiental por meio de modelos computacionais (in silico) para fins de gestão ambiental.** 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2015.

SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment *Journal of Hazardous Materials*. **Elsevier**, 15 mar. 2010.

SIMAZAKI, D., KUBOTA, R., SUZUKI, T., AKIBA, M., NISHIMURA, T., KUNIKANE,

S. Occurrence of selected pharmaceuticals at drinking water purification plants in Japan and implications for human health. **Water Res.** 76, 187–200, 2015.

SOUZA, C. C.; AQUINO, S. F.; SILVA, S. de Q. Ensaio toxicológicos aplicados à análise de águas contaminadas por fármacos. **Eng. Sanit. Ambient.**, Ouro Preto, MG, v.25 n.2, p. 217-228, mar/abr 2020.

SCHMIDT, S. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection of diclofenac and related compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, Elsevier, v. 1538, p. 112-116, 2018.

SCHMITT-JANSEN, M. et al. **Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products**. Analytical and Bioanalytical Chemistry. **Anais**. Springer, 10 fev. 2007.

TRÖGER, R., KLÖCKNER, P., AHRENS, L., WIBERG, K. Micropollutants in drinking water from source to tap - Method development and application of a multiresidue screening method. **Sci. Total Environ.** 627, 1404–1432, 2018.

VALER, R. M.; GLOCK, L. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. **Atla Limnologia Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 149–156, 1999.

VARSHNEY, P., MIKULIC, P., VONSHAK, A., BEARDALL, J., WANGIKAR, P.P., 2014. Extremophilic micro-algae and their potential contribution in biotechnology. **Bioresour. Technol.** <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.040>.

VILLAR-NAVARRO, E., BAENA-NOGUERAS, R.M., PANIW, M., PERALES, J.A., LARA-MARTÍN, P.A., 2018. Removal of pharmaceuticals in urban wastewater: high rate algae pond (HRAP) based technologies as an alternative to activated sludge based processes. **Water Res.** 139, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.072>.

VULLIET, E., CREN-OLIVE, C. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and ground waters intended to human consumption. **Environ. Pollut.** 159, 2929–2934, 2011.

WILKINSON, J.L., SWINDEN, J., HOODA, P.S., BARKER, J., BARTON, S. Markers of anthropogenic contamination: A validated method for quantification of pharmaceuticals, illicit drug metabolites, perfluorinated compounds, and plasticisers in sewage treatment effluent and rain runoff. **Chemosphere** 159, 638–646, 2016.

ZHANG, Y. et al. The influence of four pharmaceuticals on *Chlorella pyrenoidosa* culture. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1624, febr. 2019. DOI. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36609-4>.

ZHANG, Y.; GEISSEN, S. U.; GAL, C. **Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies** **Chemosphere** Pergamon, , 1 nov. 2008.