

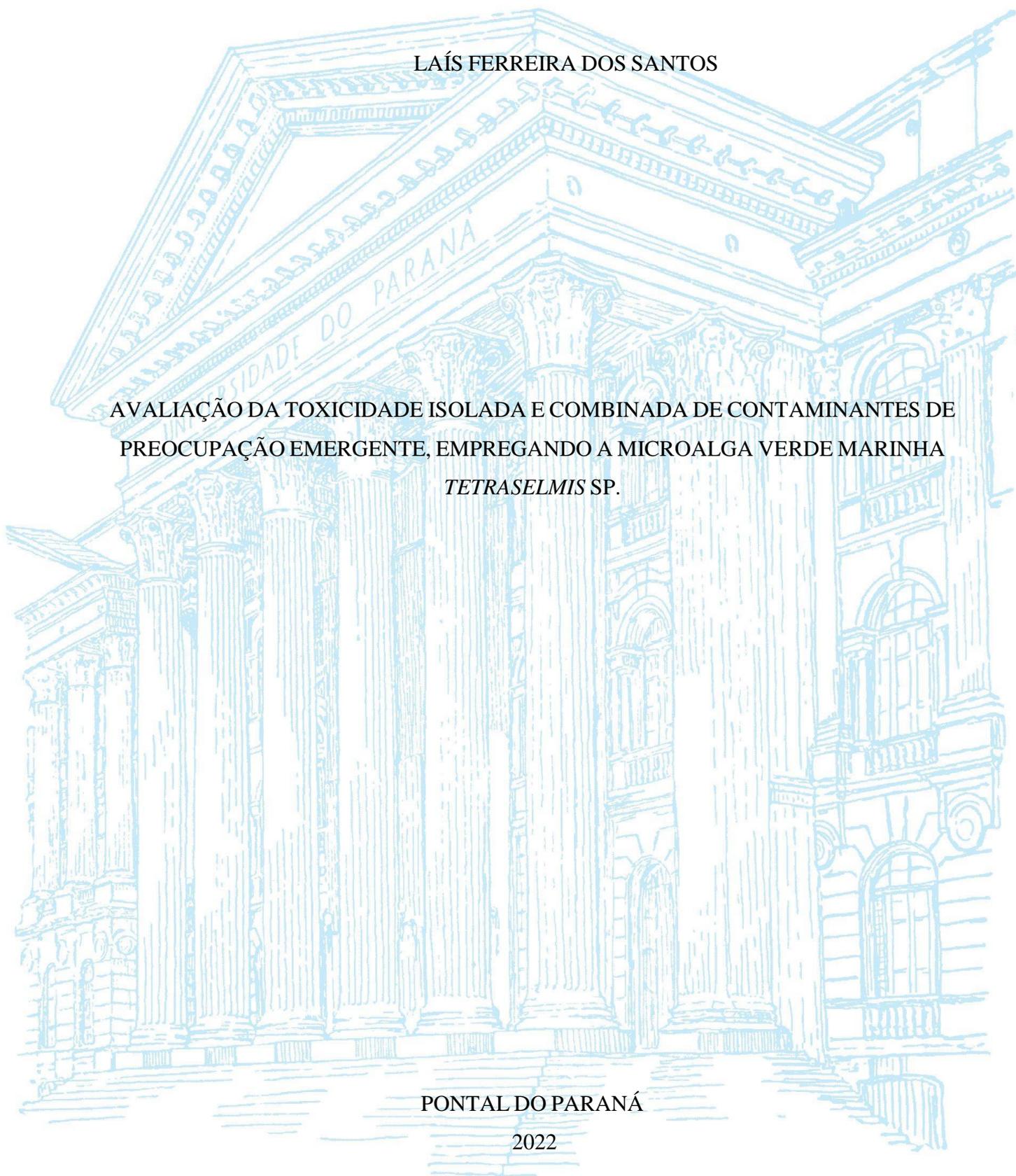
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAÍS FERREIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ISOLADA E COMBINADA DE CONTAMINANTES DE  
PREOCUPAÇÃO EMERGENTE, EMPREGANDO A MICROALGA VERDE MARINHA  
*TETRASELMIS SP.*

PONTAL DO PARANÁ

2022



LAIS FERREIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ISOLADA E COMBINADA DE CONTAMINANTES DE  
PREOCUPAÇÃO EMERGENTE, EMPREGANDO A MICROALGA VERDE MARINHA  
*TETRASELMIS SP.*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Oceanografia, Setor de Ciências da Terra da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Oceanografia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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

Santos, Laís Ferreira dos  
S237a Avaliação da toxicidade isolada e combinada de contaminantes de preocupação emergente, empregando a microalga verde marinha *Tetraselmis sp.* / Laís Ferreira dos Santos. – Pontal do Paraná, 2022.  
1 arquivo [67 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 Oceanografia.

1. Microalga. 2. Toxicidade. I. Melegari, Sílvia Pedroso. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD – 579.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE OCEANOGRAFIA  
Avenida Deputado Aníbal Khury, 2033, - Bairro Balneário Pontal do Sul, Pontal do Paraná/PR, CEP 83255-976  
Telefone: (41) 3511-8626 - <http://www.ufpr.br/>

ATA DE REUNIÃO

TERMO DE APROVAÇÃO

Laís Ferreira dos Santos

**“AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ISOLADA E COMBINADA DE CONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO EMERGENTE, EMPREGANDO A MICROALGA VERDE MARINHA *Tetraselmis sp.*”**

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos membros:

Profa. Dra. Silvia Pedroso Melegari

Profa. Orientadora - Centro de Estudos do Mar (CPP-CEM) - UFPR

Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Junior

Centro de Estudos do Mar (CPP-CEM) - UFPR

Me. Jassira da Silva Pessoa

Doutoranda PGISISCO - Centro de Estudos do Mar (CPP-CEM) - UFPR

Pontal do Paraná, 09 de dezembro de 2022



Documento assinado eletronicamente por **LUIZ LAURENO MAFRA JUNIOR, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/02/2023, às 18:57, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **SILVIA PEDROSO MELEGARI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/02/2023, às 19:30, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **JASSIARA DA SILVA PESSOA, Usuário Externo**, em 03/03/2023, às 21:29, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **5113147** e o código CRC **0C814450**.

À minha família,  
por terem acreditado.

## AGRADECIMENTOS

À CNPq, pelo fomento da pesquisa, bem como à Universidade Federal do Paraná, Campus Pontal do Paraná – Centro de Estudos do Mar pela educação de qualidade;

À todos aqueles que passaram por mim ao longo da graduação e compartilharam um pouco da beleza da vida comigo;

À minha orientadora, Dra. Silvia Melegari, pela paciência e ensinamentos durante toda a graduação. Obrigada por me ceder e confiar um espaço no seu laboratório, mesmo no início da minha vida acadêmica. Essa oportunidade transformou toda a minha jornada. Agradeço também às minhas colegas de laboratório, que sempre estiveram dispostas a ajudar, Alana, Jassi, Ana Claudia, Camila e Ana Karine;

Aos meus amigos, de diferentes grupos: Bruna, Beatriz, Freitas, Luanna, Fabiano, Júlia, Matheus e Marcela, por todo o apoio e compreensão, apesar da distância. À Bruna, em especial, por crescer e se fazer presente como uma irmã ao longo desses vários anos;

À família pontalense, Anna Karolyna, Sabrina, Paloma e Luiz por terem feito a melhor limonada com os limões entregues em Pontal. Obrigada por todas as risadas e encontros que transformavam o meu dia para melhor. À Karol, principalmente, pelo acolhimento.

À Ingrid e Lavínia, por terem dividido as vidas e casas comigo em Pontal. Agradeço a paciência, carinho e companheirismo ao longo dessa jornada. Saibam que as boas memórias, e vocês, estarão pra sempre em meu coração. À Lavínia, em especial, pelas noites em claro e por ter dividido tanto deste ano comigo;

À Giovanna Bellotto, pela dedicação em me fazer feliz nos dias mais difíceis e por toda ajuda nesta e em outras etapas da vida. Obrigada pelo amor ao longo deste ano;

À minha família estendida, inclusive à Luna, pelo suporte e compreensão sobre as minhas ausências nos eventos familiares;

À minha irmã, Lilian Ferreira, que é minha grande inspiração desde sempre. Obrigada por ser este exemplo de mulher potente e livre, que me mostra diariamente ser possível conquistar o mundo;

Aos meus pais, Ana Alice e Adelgenor, pelo incentivo, apoio e amor ao longo de toda a minha vida. Este sonho, idealizado por mim, se concretizou graças a força e dedicação de vocês! Obrigada por me permitirem sonhar.

Uma vez, um velho mestre falou:

O ser-tempo se ergue nos mais altos picos das montanhas;

O ser-tempo se move no mais profundo leito dos oceanos;

O ser-tempo tem três cabeças e oito braços;

O ser-tempo tem a altura de oito ou dezesseis pés;

O ser-tempo é um bastão de um mestre;

O ser-tempo é um pilar ou um farol;

O ser-tempo é qualquer José ou Maria;

**O ser-tempo é a terra inteira e o mar infinito.**

- Adaptado de Dogen Zenji (1200-1253)

## RESUMO

O ecossistema marinho constantemente encontra-se exposto a situações de alta complexidade ambiental, principalmente no que envolve o lançamento e tratamento de águas residuais industriais e domésticas. O descarte inadequado e a ausência de tratamento 100% eficazes contribuem para a entrada de contaminantes emergentes no ecossistema aquático, como os metais, fármacos e detergentes. Entre eles, é possível destacar o nanomaterial (NM) de óxido de zinco (ZnO), componente usual de tintas anti-incrustantes utilizadas para pintura de embarcações, o fármaco diclofenaco (DCF), analgésico anti-inflamatório amplamente distribuído e, o surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS), um dos detergentes mais utilizados na atualidade. Considerando que, ao longo do tempo, esses contaminantes ficam retidos no ambiente aquático em diferentes concentrações, e podem interagir com outras substâncias e provocar efeitos adversos à biota, é necessário que sejam realizadas identificações e avaliações dessas interações entre os compostos. Dessa maneira, o estudo teve como principal objetivo avaliar o potencial de toxicidade individual do NM ZnO, DCF e SDS sobre a microalga verde *Tetraselmis* sp. e o potencial de toxicidade combinada dos compostos NM ZnO e DCF, quando misturados ao SDS. Para a determinação dos potenciais tóxicos individuais, foram realizados testes independentes de toxicidade aguda e crônica, devidamente respaldados pela norma ABNT 16181:2021, com duração de 96 h. Nestes ensaios, a microalga foi exposta a diferentes concentrações dos contaminantes, as quais foram preparadas através da diluição progressiva de uma solução-estoque específica. Para a elaboração dos ensaios de mistura, utilizou-se um isobograma com design de raio fixo. Nele, foram adotados 31 pontos amostrais, descritos em função das unidades tóxicas (UTs), que foram obtidas utilizando como referência os valores de EC50 dos testes individuais. Os ensaios de mistura tiveram duração de 72h. Através da análise dos resultados de toxicidade individual, tratados estatisticamente no *RStudio* e *GraphPad Prism*, foi possível constatar: Para o NM ZnO, uma EC50<sub>72h</sub> de 107,5 mg/L, CENO de 10 mg/L e CEO de 100 M; Para o DCF, uma EC50<sub>48h</sub> de 112,7 mg/L, CENO de 10 mg/L e CEO de 100 mg/L; E para o SDS, foi observado uma EC50<sub>48h</sub> de 37 mg/L, e CENO de 1 mg/L e CEO de 10 mg/L. Os isobogramas com os dados de efeitos foram construídos com o auxílio do software *Surfer*. Com os ensaios de toxicidade combinada, foi possível observar que ambas as misturas binárias testadas (NM ZnO+SDS e DCF+SDS) apresentaram uma relação direta entre o aumento das concentrações e inibição da densidade celular da microalga, sendo que a dose de SDS apresentou uma maior relevância para a interação na mistura do NM ZnO. Essa relação pode estar relacionada com o aumento da estabilidade do NM ZnO em suspensão na presença do SDS. Com a análise realizada através dos modelos descritos por Könnemann (1981) e Abbot (1925), foi possível estabelecer que o modelo que melhor explica a toxicidade da mistura é o de adição de concentração, com comportamentos predominantemente sinérgicos. Considerando todos os resultados analisados e as dificuldades enfrentadas ao longo do estudo, é importante que mais testes de toxicidade aguda e crônica, com os contaminantes aqui apresentados e a microalga *Tetraselmis* sp., sejam realizados e que novos modelos de misturas toxicológicas sejam explorados, a fim de obter resultados de maneira mais simples, eficientes e menos custosas de identificar os efeitos de misturas binárias sobre microrganismos aquáticos.

**Palavras-chave:** Toxicidade individual e combinada; óxido de zinco; diclofenaco; dodecil sulfato de sódio.

## ABSTRACT

The marine ecosystem is constantly exposed to situations of high environmental complexity, mainly involving the release and treatment of industrial and domestic wastewater. Improper disposal and the absence of 100% effective treatment contribute to the entry of emerging contaminants into the aquatic ecosystem, such as metals, drugs and detergents. Among them, it is possible to highlight the nanomaterial (NM) of zinc oxide (ZnO), a common component of antifouling paints used for painting boats, the drug diclofenac (DCF), widely distributed anti-inflammatory analgesic, and the surfactant dodecyl sodium sulfate (SDS), one of the most used detergents today. Considering that, over time, these contaminants are retained in the aquatic environment in different concentrations, and can interact with other substances and cause adverse effects to the biota, it is necessary to carry out identifications and evaluations of these interactions between compounds. Thus, the main objective of the study was to evaluate the individual toxicity potential of NM ZnO, DCF and SDS on the green microalgae *Tetraselmis* sp. and the combined toxicity potential of NM ZnO and DCF compounds when mixed with SDS. To determine the individual toxic potentials, independent tests of acute and chronic toxicity were carried out, duly supported by the ABNT 16181:2021 standard, lasting 96 h. In these tests, the microalgae were exposed to different concentrations of contaminants, which were prepared through progressive dilution of a specific stock solution. For the preparation of the mixing tests, an isobologram with a fixed radius design was used. In it, 31 sampling points were adopted, described in terms of toxic units (UTs), which were obtained using the EC50 values of the individual tests as a reference. The mixing tests lasted 72 hours. Through the analysis of individual toxicity results, treated statistically in *RStudio* and *GraphPad Prism*, it was possible to verify: For NM ZnO, an EC50<sub>72h</sub> of 107.5 mg/L, CENO of 10 mg/L and CEO of 100 M; For DCF, an EC50<sub>48h</sub> of 112.7 mg/L, CENO of 10 mg/L and CEO of 100 mg/L; And for SDS, an EC50<sub>48h</sub> of 37 mg/L was observed, and CENO of 1 mg/L and CEO of 10 mg/L. The isobolograms with the effects data were constructed with the aid of the *Surfer* software. With the combined toxicity assays, it was possible to observe that both binary mixtures tested (NM ZnO+SDS and DCF+SDS) showed a direct relationship between the increase in concentrations and inhibition of microalgae cell density, and the dose of SDS showed greater relevance for the interaction in the mixture of NM ZnO. This relationship may be related to the increased stability of NM ZnO in suspension in the presence of SDS. With the analysis carried out through the models described by Könemann (1981) and Abbot (1925), it was possible to establish that the model that best explains the toxicity of the mixture is the addition of concentration, with predominantly synergistic behaviors. Considering all the results analyzed and the difficulties faced throughout the study, it is important that more tests of acute and chronic toxicity, with the contaminants presented here and the microalgae *Tetraselmis* sp., be carried out and that new models of toxicological mixtures be explored, in order to obtain results in a simpler, more efficient and less costly way to identify the effects of binary mixtures on aquatic microorganisms.

**Key-words:** Individual and combined toxicity; zinc oxide; diclofenac; sodium dodecyl sulfate.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	14
1.2 OBJETIVOS .....	15
1.2.1 Objetivo Geral .....	15
1.2.2 Objetivos Específicos .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 ZnO EM ESCALA NANOMÉTRICA .....	16
2.1.1 Toxicidade do NM ZnO .....	16
2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO DCF .....	18
2.2.1 Toxicidade do DCF .....	19
2.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO SDS .....	19
2.3.1 Toxicidade do SDS .....	21
2.4 TOXICIDADE DE MISTURAS .....	22
2.4.1 Efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos .....	23
2.4.2 Métodos de Avaliação de Misturas .....	24
2.5 ORGANISMO-TESTE: A MICROALGA <i>Tetraselmis</i> sp. ....	25
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
3.1 OBTENÇÃO DOS CONTAMINANTES .....	27
3.2 MANUTENÇÃO DO CULTIVO DA MICROALGA <i>Tetraselmis</i> sp. ....	28
3.3 QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DA MICROALGA .....	30
3.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE INDIVIDUAL AGUDA E CRÔNICA.....	31
3.4.1 Preparo da SE de NM ZnO, DCF e SDS .....	32
3.5 PROCEDIMENTOS DE ENSAIO DE TOXICIDADE DE MISTURA .....	33
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DA <i>Tetraselmis</i> sp.....	36

4.2 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO NM ZnO SOBRE A <i>Tetraselmis</i> sp.....	37
4.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO DCF SOBRE A <i>Tetraselmis</i> sp.	40
4.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO SDS SOBRE A <i>Tetraselmis</i> sp.	44
4.5 TESTE DE TOXICIDADE DO NM ZnO E DCF QUANDO COMBINADOS COM SDS .....	47
4.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	52
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>6. RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O meio ambiente, desde os primórdios da vida humana, esteve sob constante ameaça considerando a quantidade, qualidade e uso de seus recursos. Atualmente, uma das grandes problemáticas que o envolvem refere-se ao lançamento de águas residuais nos ecossistemas aquáticos. Globalmente, e principalmente em países de baixa renda, estima-se que mais de 80% de todas as águas residuais, industriais e domésticas, sejam lançadas no meio ambiente, sem qualquer tipo de tratamento prévio (WWAP, 2017). Esse descarte inadequado, ausência de saneamento básico e o lançamento de esgoto bruto em corpos hídricos contribuem diretamente para a entrada de contaminantes emergentes no ecossistema aquático (ANA, 2017; BRANCO; ALBERT; ROMÃO, 2021; WWAP, 2017). Esses contaminantes não costumavam ganhar destaque na década passada, porém eles vêm sendo cada vez mais identificados nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água e ar) e podem representar algum tipo de risco ao ecossistema, por isso o nome (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). Entre eles contaminantes é possível destacar os metais, fármacos e detergentes.

A produção em massa de nanomateriais (NMs), materiais que variam na escala de 1 a 100 nm em pelo menos uma de suas dimensões (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010), e o uso constante de fármacos se torna cada vez maior com o passar do tempo e, conseqüentemente, os seus descartes no meio ambiente acompanham essa proporção. Com o avanço industrial e demanda social desse tipo de material, se faz necessário entender os processos pelos quais esses compostos são submetidos e quais as suas interações com os ecossistemas e organismos (CHEN et al., 2012).

Um NM bastante conhecido é o óxido de zinco (ZnO), que pode ser encontrado em diferentes morfologias. A versatilidade do composto permite uma variada aplicação nos setores de fabricação de borrachas, cosméticos, tintas anti-incrustantes, cerâmicas, indústrias eletrônicas e optoeletrônicas (CHOI; CHOY, 2014). A preocupação quanto aos seus potenciais riscos surge a partir do momento em que, segundo pesquisas, uma vez lançado ao meio ambiente, o contaminante poderia simplesmente afundar e se incorporar ao meio aquático (WANG; VIJVER; PEIJNENBURG, 2018).

Dentro da nanotecnologia existem inúmeras áreas promissoras quanto a utilização de nanopartículas (NPs), entre elas destaca-se a associação de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (ANE) na redução da toxicidade gastrointestinal (GUTERRES et al., 1995), sendo um bom exemplo o fármaco diclofenaco (DCF), que é altamente distribuído devido às suas funcionalidades analgésicas. Sua concentração nos diferentes ecossistemas também provoca

uma necessidade de estudo e investigação sobre os tipos de interação e riscos associados a ela, visto que seu descarte nem sempre é feito de forma adequada e o tratamento de efluentes contaminados nem sempre é eficaz.

Além deles, os surfactantes, poluentes orgânicos popularmente conhecidos como sabões e detergentes, são compostos amplamente utilizados nos mais diversos aspectos da vida humana (CAO et al., 2020; YADAV et al., 2021). O seu consumo per capita, que aumenta significativamente a cada ano (MARSH; BUGUSU, 2007) vêm gerando preocupações quanto ao seu impacto, uma vez que sua extensa aplicabilidade inibe, em um 1º plano, o problema que seu uso contínuo pode gerar. Um dos surfactantes mais conhecidos é o dodecil sulfato de sódio (SDS).

Considerando as questões que envolvem o descarte desses contaminantes e sua disponibilidade em águas residuais, é importante compreender que os problemas envolvendo saneamento vêm crescendo a cada dia, devido principalmente à industrialização, desenvolvimento populacional contínuo e à urbanização que ameaça a saúde dos seres vivos (VISHALI et al., 2019). Atualmente, uma das grandes questões que envolvem o tratamento de águas residuais refere-se a presença significativa de surfactantes e na dificuldade de remoção desses contaminantes através de métodos de tratamento tradicionais (PALMER; HATLEY, 2018; WOŁOWICZ; STASZAK, 2019).

Ao avaliar esses contaminantes sob a perspectiva ambiental, é importante assumir também que além de seus efeitos individuais sobre o ambiente, eles ainda podem interagir com outras substâncias e potencializar ou não estes efeitos. Para realizar esse tipo de avaliação foram criados modelos que, com o auxílio de testes toxicológicos em organismos suficientemente representativos, são capazes de prever o destino e o impacto ambiental desses compostos. Os testes de toxicidade são amplamente utilizados na avaliação e monitoramento do meio ambiente, uma vez que sua aplicação permite que diversos contaminantes sejam detectados em pequenas ou grandes concentrações (JORGE; MOREIRA, 2005).

As algas são as principais fontes de alimento no ecossistema aquático, ocupando um papel essencial na cadeia alimentar aquática e na realização dos ciclos biogeoquímicos globais (CHEN et al., 2012; SAXENA; HARISH, 2019). Isso significa que qualquer perturbação ou dano à flora de algas pode levar a um desequilíbrio na cadeia e indiretamente ao ecossistema aquático (NOWACK; BUCHELI, 2007). Portanto, as microalgas são grandes aliadas na toxicologia ambiental, uma vez que sua rápida resposta permite a identificação e avaliação de potenciais perigos ao ambiente ecológico.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O ecossistema marinho, conhecido por apresentar características físicas, químicas, biológicas e geológicas bastante específicas, é usualmente utilizado como um grande receptor de efluentes industriais e domésticos. Dessa maneira, ao longo do tempo, ficam retidos nesse ambiente uma série de substâncias e contaminantes tóxicos que, em diferentes doses, podem interagir e potencialmente provocar efeitos adversos à biota. Em vista disso, se faz necessária a realização de avaliações de toxicidade ambiental que considerem tamanha complexidade.

Uma vez que o estudo se propõe a investigar a toxicidade individual e combinada de contaminantes de preocupação emergente (CPE), que são continuamente utilizados, mas pouco monitorados, os resultados desta pesquisa buscam contribuir com a construção e aperfeiçoamento de testes toxicológicos e modelos voltados à complexidade apresentada pela interação desses contaminantes no ambiente. Considerando ainda que a legislação brasileira dispõe de resoluções que estabelecem padrões máximos para lançamento de efluentes, respectivamente a CONAMA nº 357/2005 e nº 430/2011 (BRASIL, 2005, 2011), mas não incluem em suas listas os CPEs, os resultados aqui apresentados também podem ser utilizados como premissas para discussão de metodologias mais adequadas quanto ao lançamento e tratamento de águas residuais, que armazenam grande parte desses compostos tóxicos. É importante realizar esse movimento de análise voltado às legislações brasileiras, para que elas possam se adequar aos regulamentos instituídos internacionalmente também, como é o caso da Diretiva 2008/105/CE (UE, 2008), que já incorporou o DCF em sua lista de substâncias prioritárias e estabeleceu um limite máximo de 10 (ng/l) (UE, 2015).

Além disso, a Agenda 2030 estabelecida pela Organização das Nações Unidas (ONU), em 2017, pretende alcançar 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que visam a prosperidade do planeta. Entre eles, encontra-se o “*ODS 14 - Vida na água*”, que diz respeito à conservação e uso sustentável dos oceanos, dos mares e dos recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável. Portanto, o projeto também possui o intuito de cooperar com a Década das Nações Unidas da Ciência Oceânica para o Desenvolvimento Sustentável (2021-2030), através da ampliação da ciência oceânica, da visibilidade para as pesquisas na área e fortalecimento do investimento na ODS.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade individual e combinada de NM ZnO, DCF e SDS sobre a microalga verde marinha *Tetraselmis* sp., através de um levantamento de literatura amplo, análises experimentais e aplicação em modelos toxicológicos.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial de toxicidade aguda e crônica do NM ZnO e do DFC, de forma isolada, sobre a microalga *Tetraselmis* sp.;
- Avaliar o potencial de toxicidade combinada dos compostos NM ZnO e DCF quando combinados ao SDS, sobre a microalga *Tetraselmis* sp.;
- Aplicar modelagem aos resultados de toxicidade das misturas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ZnO EM ESCALA NANOMÉTRICA

O ZnO, composto químico naturalmente encontrado no mineral zincita, possui propriedades que dependem da sua microestrutura e são determinadas principalmente pela sua morfologia e tamanho. Ele também é um material de fácil cristalização e quando está na forma de nanopartícula (NP) apresenta algumas mudanças em suas propriedades, tais como, área superficial e estrutural (CHEN et al., 2011). Sua estrutura cristalina ocorre na forma hexagonal, e é constituída por átomos de zinco (na forma  $Zn^{2+}$ ) e oxigênio (na forma  $O^{2-}$ ).

Devido sua grande versatilidade e propriedades favoráveis como alta condutividade térmica, alto índice de refração, e característica antibacteriana, o ZnO vêm sendo trabalhado em série de nanoestruturas com diferentes morfologias, que contemplam diferentes demandas, como é o caso das NPs, nanobastões (NBs), nanofitas, nanotubos, entre outras. Globalmente, a NP ZnO é a terceira maior produzida, com cerca de 550 toneladas por ano, sendo seguida por dióxido de sílica ( $SiO_2$ ) e dióxido de titânio ( $TiO_2$ ), respectivamente (PICCINNO et al., 2012). O mercado global de ZnO foi avaliado em US \$4,43 bilhões em 2021 e estima-se que anualmente haverá uma taxa de crescimento de 6,9% de 2022 a 2023 (VIEW, 2022).

As NPs ZnO, que apresentam um amplo gap de 3,37 eV em temperatura ambiente, são excelentes absorvedoras de radiação ultravioleta da luz solar (YUNG et al., 2017) e não são consideradas tóxicas para a pele humana, constituindo-se como um ótimo componente para os cosméticos e protetores solares (LOHANI et al., 2014; SRIVASTAVA; GUSAIN; SHARMA, 2013). De acordo com uma pesquisa realizada em 2008, menos de 25% do protetor solar aplicado na pele é lavado durante o banho e/ou natação, o que representa uma liberação de 4.000 - 6.000 toneladas/ano em áreas de recife (DANOVARO et al., 2008). Posteriormente, Wong *et al.* (2010) afirmou que cerca de 250 toneladas de NMs, incluindo o ZnO, são potencialmente descarregadas no meio marinho.

As tintas provenientes deste NM, que apresenta característica anti-incrustante (CARVALHO et al., 2014; GONÇALVES et al., 2018; NG et al., 2013), são utilizadas na pintura de cascos de embarcações, navios e submarinos, tendo assim um contato direto com o ambiente marinho.

#### 2.1.1 Toxicidade do NM ZnO

Muitos estudos já têm demonstrado o efeito tóxico do NM ZnO nas algas marinhas (ALMEIDA et al., 2021; MANZO et al., 2013; MIAO et al., 2010; MILLER et al., 2010; WONG et al., 2010) e em outros níveis tróficos (BONDARENKO et al., 2013; DIMKPA et al., 2013; FRANKLIN et al., 2007; LI; LIN; ZHU, 2013; SIRELKHATIM et al., 2015). Em suas células, as microalgas apresentam uma camada adicional de parede celular rígida e porosa que interfere na entrada de materiais estranhos, íons e partículas na célula (BHATTACHARYA et al., 2010; LIN et al., 2009). Com os dados existentes foi possível conferir que as NPs ZnO podem exercer um potencial tóxico de inibição de funções celulares até a mortalidade (ARUOJA et al., 2009; FRANKLIN et al., 2007; JI; LONG; LIN, 2011). Dessa forma, compreender as interações entre NMs e algas verdes é um passo essencial para avaliar a resposta do ambiente ecológico aos NMs e desenvolver programas de crescimento sustentável e equilibrado com a nanotecnologia (CHEN et al., 2012).

Os cátions presentes dentro do espaço extracelular e ânions no plasma celular podem se deslocar através das membranas, impulsionados pela carga adicional e gradiente espacial das NPs, induzindo a despolarização da membrana (CHEN et al., 2012). Além disso, a atração eletrostática entre as NP ZnO e as paredes celulares podem facilitar a absorção dos íons de Zn liberados, e alterar o potencial das membranas. Essa dinâmica pode ocorrer em baixa ou grandes concentrações, no caso da alga verde *Chlorella* sp., os efeitos induzidos pelas NPs ZnO foram neutralizados pela agregação da NPs ZnO e secreção de exsudação de algas, que é um processo natural de saída de líquidos orgânicos através das membranas celulares (CHEN et al., 2012).

Ao contrário de outras NPs de óxido de metal, como TiO<sub>2</sub>, óxido de cério (CeO<sub>2</sub>) e óxido de ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), o NM ZnO tende a se dissolver em solução aquosa, e conseqüentemente liberar íons de zinco de suas partículas (CHO et al., 2011; LI; LIN; ZHU, 2013; MUDUNKOTUWA et al., 2012; SONG et al., 2010). A solubilidade dessa NP depende diretamente do pH, concentração, tamanho de partícula e presença de compostos orgânicos (HENDERSON et al., 1995; LI; LIN; ZHU, 2013; MIAO et al., 2010). Importante ressaltar que para obter informações básicas sobre a NP ZnO, como características de absorção, biodisponibilidade, tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), tempos de residência, taxas de depuração entre outras informações, é necessário realizar estudos biocinéticos mais aprofundados deste NM. Esse tipo de pesquisa é muito importante na previsão de efeitos toxicológicos potenciais e identificação de correlações com toxicidade aguda ou subaguda (CHOI; CHOY, 2014).

Outros estudos ainda revelam que esses fatores determinantes para a solubilidade da NP afetam também a agregação e dissolução de ZnO, assim como o revestimento do NM. Um aumento na dispersão de NPs poderia ser gerado através da modificação da superfície da partícula, revestindo-a com um agente para aumentar a repulsão eletrostática entre as NPs. Esse tipo de modificação pode transformar até as propriedades físico-químicas do material, e consequentemente alterar sua potência tóxica (YUNG et al., 2017). Grande parte das suas propriedades também podem ser controladas com o uso de substâncias estabilizadoras ou surfactantes adequados (CHINTADA; KOONA, 2018).

## 2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO DCF

O DCF ( $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ ) é um fármaco de ação analgésica muito utilizado no tratamento de dores em humanos e animais, visto que o mesmo possui também ação anti-inflamatória (GAMARRA et al., 2015; LONAPPAN et al., 2016). Apesar de possuir uma meia vida bastante curta (poucos dias e horas), o DCF costuma ser bastante encontrado em efluentes domésticos e ambientes naturais, devido à dificuldade de remoção desse composto pelos sistemas de tratamento de esgoto e também pela sua grande utilização na sociedade (uso tópico ou oral, sem necessidade de prescrição médica) (CARMONA; ANDREU; PICÓ, 2014; DAI et al., 2014). Ele pode ainda interagir com outros contaminantes inorgânicos presentes nas águas residuais, como metais, metabólitos e contaminantes orgânicos (LONAPPAN et al., 2016).

Como a sua venda é feita de forma livre, o cálculo sobre seu consumo global torna-se complicado, porém foi estimado que cerca de 940 toneladas de DCF são consumidos globalmente com base nas Estatísticas Médicas Intercontinentais (IMS Health) (ZHANG; GEISSEN; GAL, 2008). Apesar de sua fonte ser primariamente farmacêutica, o DCF apresenta uma série de possíveis rotas que atingem o meio ambiente, sendo que sua presença nos ecossistemas aquáticos já foi descrita em muitos estudos laboratoriais (CLEUVERS, 2003; FENT; WESTON; CAMINADA, 2006; JONES; VOULVOULIS; LESTER, 2002; LEE et al., 2011).

Outra característica importante de ser retratada sobre o DCF, é que a sua degradação por fotólise foi confirmada (BUSER; POIGER; MÜLLER, 1998) e oxidação via ozônio também (ZWIENER; FRIMMEL, 2000), porém testes laboratoriais relatam que ele pode ser altamente resistente a degradação e potencialmente preocupante para o ambiente aquático, principalmente nas entradas contínuas de esgotos industriais (LAWRENCE et al., 2007). Através de dados de

cromatografia líquida, espectroscopia de massa e carbono orgânico dissolvido, foi observado também que o DCF não havia sido degradado ao longo de 28 dias de experimento intenso (QUINTANA; WEISS; REEMTSMA, 2005).

Em algumas pesquisas, que monitoram a longo prazo as águas superficiais de esgotos, o DCF foi identificado como um dos componentes mais importantes presentes no ciclo da água (HEBERER, 2002). Ele foi também encontrado em amostras de água dos rios, sedimentos e lamas (KUNKEL; RADKE, 2012; LANGFORD; REID; THOMAS, 2011; STUMPF et al., 1999), tanto em afluentes quanto efluentes.

### 2.2.1 Toxicidade do DCF

O DCF já foi relatado como tóxico para bactérias e algas em biofilmes (PAJE et al., 2002). Um experimento, que utilizou a imobilização aguda em testes de ação, realizado em bactérias, algas, microcrustáceos e peixes, o DCF apresentou efeitos relativamente menos tóxicos em concentrações ambientais (FERRARI et al., 2003). Testes agudos posteriores, utilizando algas e o microcrustáceo *Daphnia magna*, demonstraram que o DCF tinha potencial para gerar um impacto negativo nos organismos do ambiente aquático, mesmo em concentrações baixas (CLEUVERS, 2004). Outros estudos realizados com crustáceos e peixes, em concentrações agudas de DCF, obtiveram uma alta taxa de mortalidade, atraso e redução significativa na eclosão dos ovos, respectivamente (FERRARI et al., 2003; HAAP; TRIEBSKORN; KÖHLER, 2008; LEE et al., 2011; LETZEL; METZNER; LETZEL, 2009).

Em seres humanos, já foram relatadas alterações degenerativas e inflamatórias no fígado e o comprometimento de funções renais por exposição ao DCF (BANKS et al., 1995). Em 2011, a ANVISA passou a recomendar que os fármacos que contivessem DCF em sua composição não fossem receitados para gestantes, uma vez que a substância é capaz de provocar alterações cardiovasculares nocivas para o feto. Outros estudos reportaram também efeitos colaterais como febre, náuseas e perda de peso (NCBI, 2017).

## 2.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO SDS

Os surfactantes são os compostos químicos caracterizados por possuir duas porções distintas em sua estrutura molecular: uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica (BHATT; MAHERIA; PARIKH, 2013; FINK, 2020; NAKAMA, 2017; SINGER; TJEERDEMA, 1993).

Essa propriedade permite que os surfactantes interajam com agentes polares e não polares (FREITAS et al., 2021).

Dentro desse amplo grupo, pode-se destacar o uso do SDS, um tensoativo aniônico sintético, que é frequentemente utilizado na produção de produtos de limpeza e higiene, como sabonetes líquidos, xampus, géis, espumas de banho e cremes dentais (CAO et al., 2020). Ele ainda é utilizado na fabricação de produtos farmacêuticos e alimentícios, bem como é aplicado em setores industriais e científicos (CAO et al., 2020; SINGER; TJEERDEMA, 1993). De forma simplista, é possível compreender que o SDS foi concebido com o intuito de se tornar um produto altamente capaz de remover sujeiras quaisquer, emulsionar, solubilizar estruturas orgânicas, principalmente as gorduras (WOŁOWICZ; STASZAK, 2019), e atualmente o SDS responde por aproximadamente 25-30% do total de tensoativos artificiais do mundo (SUHAIL et al., 2019 (apud. YADAV et al., 2021)).

Nos laboratórios, o SDS é utilizado como uma substância de referência padrão em investigações toxicológicas aquáticas, capazes de monitorar e avaliar o ambiente de acordo com as respostas dos organismos ao contaminante (SINGER; TJEERDEMA, 1993). Em geral, as substâncias de referências são determinadas de acordo com a constatação de ser tóxica em baixas concentrações, rapidamente letal, estável e não seletiva, detectável através de técnicas analíticas conhecidas e capaz de fornecer resultados consistentes (JORGE; MOREIRA, 2005). De acordo com Lee e Maibach (1995), o SDS foi o primeiro tóxico de referência que passou a ser exigido por uma agência governamental reguladora para emprego em testes de toxicidade aquática, e atualmente o surfactante permanece como tal (ABNT, 2021).

Além do SDS, um outro surfactante bastante utilizado é o lauriléter sulfato de sódio (SLS), que consiste em aproximadamente 70% de SDS e 30% de STS (tetradecil-sulfato de sódio) (CAO et al., 2020). Geralmente, em produtos de consumo, sua gramatura varia de acordo com o fabricante, porém as taxas costumam ser de 0,01 a 50% em produtos cosméticos e de 1 a 30% em produtos de limpeza (BONDI et al., 2015).

É importante ressaltar também que com a pandemia de COVID-19, o uso de detergentes e sabões contendo SLS aumentou muito, uma vez que a Organização Mundial da Saúde (OMS), passou a recomendar que os indivíduos lavassem suas mãos com mais frequência e por pelo menos 20 segundos, para garantir a remoção de bactérias e vírus da pele (CHIRANI et al., 2021; JAHROMI et al., 2020). De acordo com a Globe Newswire (2020), o mercado de SLS estimado em US\$ 525,4 M no ano de 2020, deverá atingir um tamanho revisado de US\$ 666,4 M até 2027, alcançando uma taxa de crescimento anual de 3,5% no período 2020-2027.

As características físico-químicas, aliado aos benefícios e vantagens econômicas do uso de surfactantes mantém o grupo em constante crescimento e provoca, por consequência, uma descarga progressiva que, via águas residuais, alcança o meio aquático e afeta os organismos que ali vivem (FREITAS et al., 2021; MESSINA et al., 2014; YADAV et al., 2021). Estudos apontam que os surfactantes são a maior classe de compostos presentes em águas residuais, principalmente pelo fato dos métodos tradicionalmente aplicados no tratamento de efluentes não serem tão eficientes para a remoção do composto. (MADHAV et al., 2018; PALMER; HATLEY, 2018).

### 2.3.1 Toxicidade do SDS

Considerando sua aplicação em larga escala, os surfactantes chegam ao ambiente costeiro por diversas fontes como tóxicos silenciosos, cuja toxicidade tende a aumentar de acordo com os níveis tróficos (YADAV et al., 2021). Devido sua natureza nociva (BASHIR et al., 2020), a toxicidade do SDS já foi demonstrada em bactérias, microalgas, crustáceos, equinodermos, peixes, ratos e humanos (CAO et al., 2020; MARIANI et al., 2006). De acordo com Mitru *et al.*, (2020), uma concentração de mais de 3-12 mg/L do surfactante na água já é capaz de prejudicar a vida de organismos aquáticos.

O SDS possui uma tendência a se ligar com biomoléculas (DNA, peptídeos, proteínas entre outros) (KIM et al., 2020) e provocar um efeito solubilizante em muitos compostos orgânicos que aumentam o impacto carcinogênico (YADAV et al., 2021). Dessa maneira, sua ação tóxica está relacionada com a alteração do equilíbrio iônico celular (GRANT; ACOSTA, 1996) e a indução de estresse oxidativo (BROMBERG; PICK, 1985), que pode vir a provocar outros estresses fisiológicos e bioquímicos (CAO et al., 2020; MESSINA et al., 2014).

Nas células, o SDS provoca efeitos físicos e bioquímicos na membrana celular, os quais podem variar desde a perda da fundação de barreira e aumento da permeabilidade até a completa lise celular (CAO et al., 2020). Além disso, o SDS ainda é capaz de elevar a produção de glutathiona, peroxidação lipídica e alterar o metabolismo do carbono (BINDU; PHILIP, 2001). O cálculo da toxicidade de qualquer surfactante utiliza o potencial de adsorção e penetração na membrana celular (HEERKLOTZ, 2008).

Em humanos, a sua toxicidade está relacionada com carcinogenicidade, irritação da pele e olhos e úlceras aftosas (CAO et al., 2020). De acordo com alguns testes realizados,

concentrações de SDS > 2% são consideradas irritantes para a pele normal e > 5% causa depressão, respiração difícil, diarreia e morte (4 em 20 animais) (CAO et al., 2020).

Após a mistura com determinadas moléculas, o SDS gera uma diminuição da tensão superficial de H<sub>2</sub>O, redução do potencial de reprodução de animais aquáticos, danos em brânquias e na camada externa do muco de peixes e contribuem para a formação de proliferação de algas (YADAV et al., 2021).

Em ambientes costeiros, uma série de fatores ambientais são capazes de influenciar o impacto de surfactantes, como é o caso da temperatura, pH, aeração do sistema, concentração inicial do SDS e a presença ou não de outros contaminantes com ele (VÁZQUEZ et al., 2020). Alguns estudos já demonstraram também que surfactantes possuem diferentes níveis de toxicidade de acordo com a faixa de concentração e espécie que está sendo testada (MARKINA, 2010; PAVLIĆ; VIDA KOVIĆ-CIFREK; PUNTARIĆ, 2005; STIBLER et al., 2020).

## 2.4 TOXICIDADE DE MISTURAS

A maioria dos relatórios de avaliação de risco e dos estudos de ecotoxicologia costuma focar principalmente na toxicidade individual dos compostos, em condições controladas (BARATA et al., 2006), onde geralmente são analisados os conceitos de EC50 (concentração do contaminante requerida para causar efeito à 50% da população exposta, do inglês: *Half Maximal Effective Concentration*); CENO (concentração de efeito não observado, do inglês: *No-Observed Effect Concentration*); e CEO (menor concentração de efeito observado, do inglês: *Lowest Observed Effect Concentration*).

Nos ecossistemas, em geral, a realidade costuma ser outra: os organismos diariamente encontram-se expostos a uma complexa rede de contaminantes químicos, cujos efeitos podem se apresentar tanto de forma individual quanto combinada. Uma mistura química pode ser definida como um conjunto de várias substâncias químicas, que possam ser identificadas ou não, e contribuam para a criação de uma toxicidade conjunta em uma população (ATSDR, 2001).

Portanto, para o entendimento profundo sobre essas interações químicas é fundamental que sejam compreendidos os mecanismos de ação tóxica entre dois ou mais poluentes e realizadas análises e previsões adequadas sobre os potenciais efeitos da toxicidade de misturas (também conhecida como toxicidade combinada) (VAZ, 2020). Além disso, é preciso se atentar também aos principais agentes que são capazes de alterar essas interações de misturas:

composição, concentrações e taxas de cada contaminante, sequência e vias de exposição (KONEMANN; PIETERS, 1996).

Devido a isso, nas últimas décadas, novas ferramentas vêm sendo exploradas a fim de identificar os comportamentos interativos entre as substâncias da forma mais realística possível (PAVLAKI et al., 2011).

#### 2.4.1 Efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos

A “aditividade” ocorre quando os produtos químicos em uma determinada mistura agem juntos para produzir um efeito, porém não aumentam ou diminuem as ações uns dos outros (CEDERGREEN et al., 2008; KORTENKAMP; ALTENBURGER, 2011). O termo “não interação” muitas vezes é usado como sinônimo de “aditividade”.

Dentro da adição toxicológica, que possui conceitos diferentes da “adição” matemática, encontram-se alguns métodos capazes de calcular e descrever as relações estabelecidas, entre eles: Adição de Concentração (*Concentration Addition - CA*), que considera que os estressores possuem um modo de ação toxicológico semelhante; e Ação Independente (*Independent Action - IA*), onde os componentes apresentam alvos moleculares diferentes (BARATA et al., 2006; BLISS, 1939; PAVLAKI et al., 2011). Quando os modos de ação dos estressores não são conhecidos, ambos modelos são aplicados e o que apresentar melhor ajuste será considerado o mais adequado, posteriormente, será o escolhido para descrever a interação entre os componentes.

Ambas as abordagens permitem o cálculo da toxicidade de uma mistura com base nas toxicidades conhecidas dos componentes individuais e, portanto, podem ser limitadas a situações em que as substâncias promovem um mesmo “ponto final experimental” (morte celular do organismo) (BARATA et al., 2006).

As substâncias químicas podem também provocar efeitos diferentes destes presentes na suposição de que “nenhum componente influencia a ação do outro”. Esses desvios à aditividade são geralmente avaliados em termos de “sinergismos” e “antagonismos”. Quando a toxicidade de uma mistura é maior que o esperado, ou seja, maior que a soma das toxicidades dos seus constituintes, há um efeito sinérgico (S); quando a toxicidade de uma mistura é menor que o esperado, ou seja, menor que soma das toxicidades de seus componentes, há um efeito antagônico (A) (COSTA et al., 2008). Na linguagem da toxicologia de misturas, os conceitos

de sinergismo e antagonismo, podem ser utilizados como sinônimos de “interações” (KORTENKAMP; ALTENBURGER, 2011).

Além disso, os efeitos sinérgicos também podem ser interpretados como “ações facilitadoras ou complementares” que aumentam a capacidade toxicológica de determinadas substâncias que agem tanto sobre os mesmos alvos, em locais diferentes, quanto em alvos diferentes, de mesma via (GINEBREDA et al., 2014; JIA et al., 2009). Os efeitos antagônicos, no entanto, apresentam-se como “ações opostas ou repulsivas” (BACKHAUS et al., 2003; CHEN et al., 2015).

Apesar de haver muitos estudos que confirmam a adequação dos modelos CA e IA na avaliação de misturas de substâncias de ação semelhantes e diferentes, respectivamente, nem todos os dados farão referência a esses padrões aditivos (PAVLAKI et al., 2011). Considerando isso, foram estabelecidos também padrões de desvios sinérgicos e antagônicos. Para fins práticos, nesse estudo será realizada a abordagem toxicológica de misturas binárias, ou seja, a combinação de apenas duas substâncias, e as implicações derivadas desse tipo de mistura.

O Desvio Dependente do Nível da Dose (*Dose level-dependent deviation* - DL), refere-se ao momento em que o desvio do nível de dose baixa é diferente do desvio em nível de dose alta. Nesse caso, por exemplo, o antagonismo poderia ser observado em altas concentrações dos estressores, enquanto o sinergismo seria observado em baixas concentrações. O Desvio Dependente da Razão entre as Doses (*Dose ratio-dependent deviation* - DR), no entanto, refere-se aos desvios que apresentam comportamentos distintos dependendo da composição da mistura. Isso significa que no caso de duas substâncias (subst. 1 e 2), o antagonismo poderia ser observado quando a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo tóxico 1, enquanto o sinergismo seria observado quando a toxicidade fosse causada pelo composto 2 (JONKER et al., 2005).

#### 2.4.2 Métodos de Avaliação de Misturas

Considerando que, no meio ambiente, os mais diversos poluentes podem estar expostos sob diferentes concentrações e condições ambientais, é importante realizar avaliações que contemplem uma gama maior de combinações entre os contaminantes (JONKER et al., 2005; VAZ, 2020).

O isoblograma realiza uma varredura no maior número possível de combinações de concentrações entre dois compostos (JONKER et al., 2005; RODEA-PALOMARES et al.,

2015; VAZ, 2020), portanto, sua análise permite entender os potenciais efeitos que ocorrem quando determinados compostos interagem de maneira complexa no ambiente.

Para a otimização dos dados, foram descritos dois designs importantes: raio fixo e fatorial. O design de raio fixo considera que a interação entre os dois compostos resulta em um comportamento próprio, distinto das substâncias em questão, por isso, a proporção da mistura projeta linhas com a mesma inclinação e garantem a mesma razão entre todos os pontos (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015; VAZ, 2020). O design fatorial, ao contrário, apresenta pontos equidistantes, simbolizando que não há alterações nos efeitos intermediários (FOUCQUIER; GUEDJ, 2015). As linhas que causam o mesmo efeito são denominadas de isoboles (y).

## 2.5 ORGANISMO-TESTE: A MICROALGA *Tetraselmis* sp.

As espécies utilizadas em testes de toxicidade possuem características que facilitam a execução do experimento e interpretação dos resultados. Entre elas encontram-se a elevada disponibilidade e abundância dos organismos, a uniformidade e estabilidade genética nas populações, a representatividade no seu nível trófico, a facilidade de adaptação, e a sensibilidade constante aos contaminantes (COSTA et al., 2008). Além disso, são necessários conhecimentos sobre a biologia da espécie, como aspectos reprodutivos, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento, tanto para o cultivo quanto para a realização dos testes (MAGALHÃES; FERRÃO, 2008).

As microalgas são as principais fontes de alimento no ecossistema aquático, ocupando um papel essencial na cadeia alimentar aquática e na realização dos ciclos biogeoquímicos globais (CHEN et al., 2012; SAXENA; HARISH, 2019). Isso significa que qualquer perturbação ou dano à flora de algas pode levar a um desequilíbrio na cadeia e indiretamente ao ecossistema aquático (NOWACK; BUCHELI, 2007). Compreender as interações entre NPs e microalgas verdes é, portanto, essencial para avaliar a resposta do ambiente ecológico aos NMs e desenvolver programas de crescimento sustentável e equilibrado com a nanotecnologia (CHEN et al., 2012).

A microalga marinha unicelular *Tetraselmis* sp. é uma espécie recomendada por órgãos regulamentadores como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para realização de ensaios de toxicidade crônica de ambientes marinhos (ABNT, 2021). Conhecida por suas características de crescimento, mobilidade e abundância, suas populações são importantes

componentes do fitoplâncton, sendo assim amplamente utilizadas como representantes de produtores primários (DAVARPANA; GUILHERMINO, 2015).

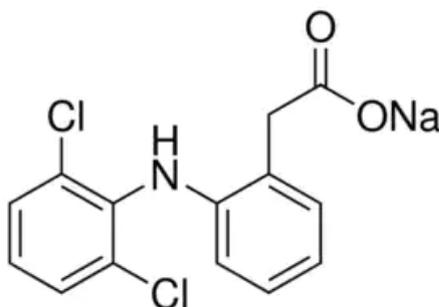
### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS CONTAMINANTES

O NM ZnO utilizado neste estudo foi sintetizado conforme metodologia de Melegari *et al.*, (2019), pela qual o acetato de zinco ( $ZnC_4H_6O_4$ ) e o hidróxido de potássio (KOH) foram solubilizados em 40 e 60 mL de metanol ( $CH_3OH$ ), e agitados sob fluxo constante durante 72h, a 60°C. O precipitado deste processo foi isolado, lavado e secado por  $48h \pm 2h$ . As sínteses foram realizadas no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Campus Avançado Pontal do Paraná, no Centro de Estudos do Mar (CPP/CEM-UFPR).

O DCF sal de sódio (*Diclofenac sodium salt* -  $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ ), da marca *Sigma-Aldrich* (Figura 1; D6899 – 10 g), grau ACS, foi adquirido comercialmente. Suas especificações foram descritas na Tabela 1.

FIGURA 1 - Representação estrutural do DCF.



FONTE: Merck KGaA© (2022).

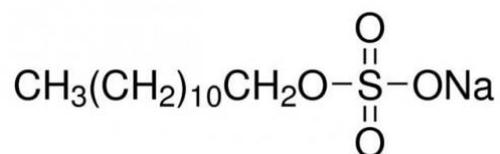
TABELA 1 - Especificações do DCF adquirido comercialmente (CAS 15307-79-6).

Peso Molecular	Aparência	Pureza	Solubilidade	Teor de Carbono	Teor de Nitrogênio
318,13 g/Mol	Pó branco	≥ 98%	50 mg/mL em Metanol	51,6 - 54,2%	4,1 - 4,7%

FONTE: Adaptado de Merck KGaA© (2022).

O SDS, (Figura 2; 95% puro -  $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$ ), da marca *NEON Comercial* (01137 – 500 g), foi adquirido comercialmente. Suas especificações foram descritas na Tabela 2.

FIGURA 2 - Representação estrutural do SDS.



FONTE: NEON Comercial © (2022).

TABELA 2 - Especificações do SDS adquirido comercialmente (CAS 151-21-3).

Peso Molecular	Teor	Aparência	Metais pesados	pH da solução a 1%	Cloreto de sódio e sulfato de sódio
288,38 g/Mol	>= 95,0 %	Pó a grânulos brancos	<= 20 ppm	7,5 - 10,5	<= 8,0 %

FONTE: Adaptado de Neon Comercial© (2022).

### 3.2 MANUTENÇÃO DO CULTIVO DA MICROALGA *Tetraselmis* sp.

A cepa da microalga *Tetraselmis* sp. foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia e Malacocultura da UFPR, localizado no CPP/CEM-UFPR. O cultivo foi desenvolvido através da metodologia descrita pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) 16181:2021, e o meio empregado foi o *Conway*.

O meio de cultura foi preparado conforme a descrição da Tabela 3. Após filtrar a água do mar com membrana de 0,45 µm (Analítica, 47 mm de diâmetro), o meio teve o pH corrigido para 7,5 ± e foi autoclavado em 121°C por 20 minutos. Depois de resfriado, a solução de vitaminas foi introduzida sob fluxo laminar e o meio foi aerado por no mínimo 30 minutos. A microalga foi inoculada no meio em recipiente de 0,5 L.

TABELA 3 - Composição do meio de cultura *Conway*, empregado no cultivo e nos testes de toxicidade da microalga *Tetraselmis* sp.

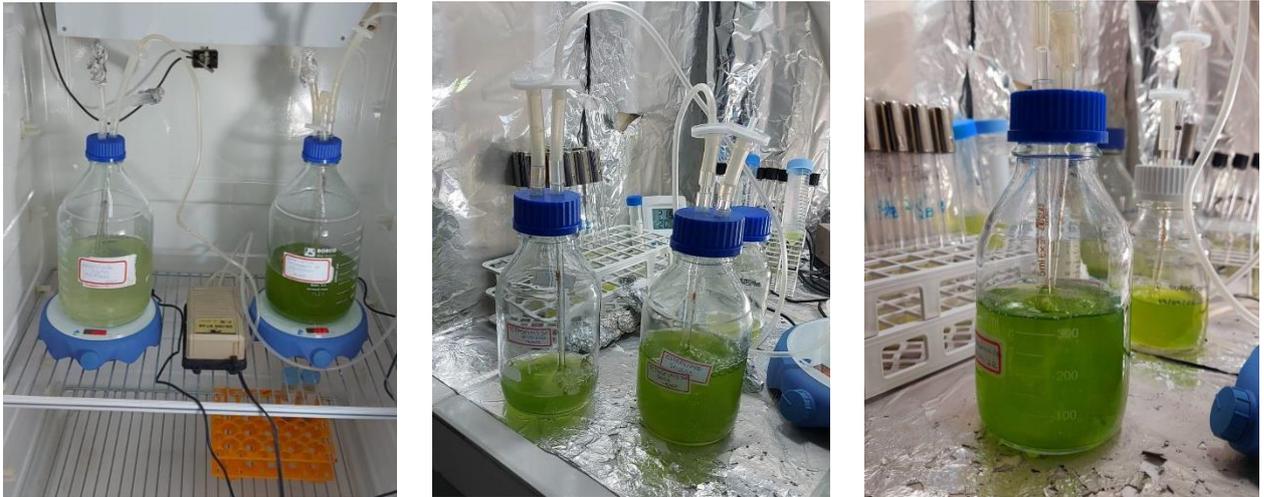
Solução	Reagente	Quantidade	Preparo
(1) Solução de Metais Traço (SMT) (para 50 mL)	ZnCl <sub>2</sub>	2,10 g	Preparada e completada em 100 mL de água destilada autoclavada. Foram adicionadas algumas gotas de HCL para clarear a solução.
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,00 g	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,90 g	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,00 g	
(2) Solução de Vitaminas (para 500 mL)	B12	50 mg	Preparada e completada para 1000 mL de água destilada autoclavada. A solução foi armazenada na geladeira, ao abrigo da luz.
	B1	50 mg	
	Vitamina H	1 mg	
(3) Solução de Nutrientes (para 1000 mL)	FeCl <sub>3</sub> • 6H <sub>2</sub> O	1,3 g	Preparada em 800 ml e completada até 1000 mL com água destilada autoclavada.
	MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	0,36 g	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33,6 g	
	EDTA	45 g	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	20 g	
	NaNO <sub>3</sub>	100 g	
	SMT (Sol. 1)	1,00 mL	
(4) Solução de Silicatos (para 1000 mL)	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> • 5H <sub>2</sub> O	40 g	Preparada em 800 ml e completada até 1000 mL com água destilada.
(5) Preparo do meio (para 1000 ml)	Água do mar filtrada	100 mL	A água do mar foi filtrada em membrana 0,45 µm e transferida para recipiente de 1L. Foram adicionadas 1 mL da S3 e S4. Após autoclavada e fria, foi adicionado 0,1 mL da S2.
	S3	1 mL	
	S4	1 mL	
	S2	0,1 mL	

FONTE: Adaptada de ABNT 16181/2021.

O cultivo foi mantido a uma temperatura de  $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , iluminação mínima de 4500 lux, aeração por bomba de aquário (filtro de ar de 0,45 µm) e agitação manual (2 vezes ao dia) (Figura 3).

Visando o crescimento saudável e constante das microalgas, durante a fase experimental, semanalmente, 70% do volume do cultivo era trocado por meio *Conway*, sob fluxo laminar.

FIGURA 3 - Cultivos da microalga *Tetraselmis* sp., empregados ao longo dos experimentos.



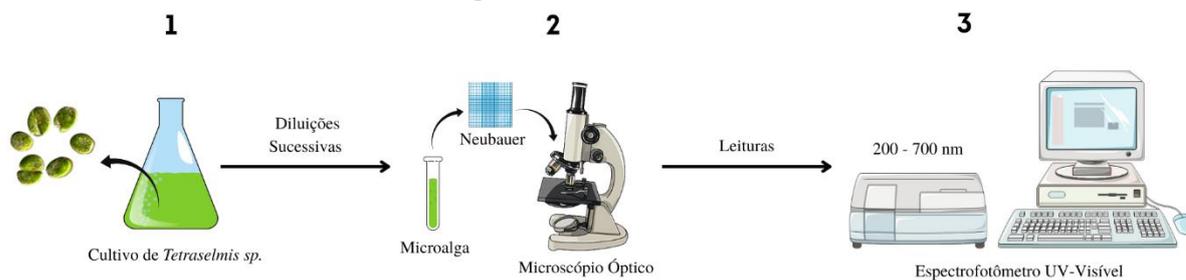
FONTE: A autora (2022).

### 3.3 QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DA MICROALGA

A metodologia em questão foi fundamentada através de observações feitas em pesquisas que utilizavam o método tradicional de contagem visual de células e estavam sujeitas ao erro humano, visto que o processo naturalmente demanda foco, tempo e treinamento específico. Portanto, visando a otimização de tempo em um cenário com múltiplas análises, a quantificação da densidade celular foi baseada no método espectrofotométrico, o qual utiliza-se de um espectrofotômetro UV-VIS. Resumidamente, o método consiste em estabelecer um padrão de equivalência, com um número determinado de amostras e, através delas, realizar a contagem visual de células em microscópio óptico e medir as absorvâncias em comprimentos de onda (nm) adequados.

Para a curva de calibração com a *Tetraselmis* sp. foram preparadas cinco diluições sucessivas (50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3%) em meio *Conway*, a partir de uma amostra do cultivo (alíquota de 100%). A quantificação manual foi realizada em um microscópio óptico, com o auxílio da Câmara de Neubauer e contador digital, segundo a técnica descrita por Almeida *et al.* (2021). Para a definição do comprimento de onda, que seria utilizado nas leituras das absorvâncias, foi realizado previamente uma varredura no espectrofotômetro (KASUAKI, mod. IL-593-S, 190-1100 nm, China), em um intervalo de comprimento de 200 – 700 nm, em cubeta de quartzo (Figura 4).

FIGURA 4 - Esquema do método de quantificação celular da microalga *Tetraselmis* sp., utilizando um espectrofotômetro UV-VIS.



FONTE: A autora.

Com os dados obtidos, foi construída uma curva de calibração de densidade celular, cuja equação da reta foi utilizada para a quantificação indireta da densidade celular da microalga exposta nos testes de toxicidade individual e de mistura, descritos a seguir.

### 3.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE INDIVIDUAL AGUDA E CRÔNICA

Os testes de toxicidade crônica foram realizados de acordo com as diretrizes e métodos de ensaio com microalgas marinhas NBR 16181:2021 (ABNT, 2021). Para todos os ensaios foram preparadas concentrações distintas, através da diluição de uma solução-estoque (SE) específica e um controle negativo (sem a interferência do contaminante). As concentrações finais de exposição foram escolhidas de acordo com os resultados de ensaios preliminares com as microalgas *Tetraselmis* sp. e revisão de outros artigos dentro da área.

Para as exposições, foram utilizados tubos estéreis transparentes, Tipo Falcon, de 50 mL, os quais foram mantidos em uma incubadora refrigerada do tipo shaker (LIMATEC, mod. LT600/2, Brasil). Nela, as exposições foram submetidas a iluminação mínima de 4500 lux, agitação de 250 rpm e temperatura de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ . Todos os ensaios individuais dos contaminantes continham um volume final de 20 mL e foram feitos em triplicata durante um período de 96h, sendo realizadas leituras no espectrofotômetro a cada 24h. Para a realização das leituras de todos os testes, foram utilizadas alíquotas homogêneas das respectivas exposições, as quais foram obtidas sob fluxo laminar (Figura 5). Nas exposições, a microalga continha uma concentração inicial de  $1 \times 10^5$  cel/mL.

FIGURA 5 - Procedimento de ensaio de toxicidade individual, no início do teste, onde a microalga era exposta, sob fluxo laminar, às diferentes concentrações dos contaminantes.



FONTE: A autora (2022).

#### 3.4.1 Preparo da SE de NM ZnO, DCF e SDS

O preparo das SEs teve como referência o mesmo método (ABNT, 2021), com pequenas adaptações de acordo com as particularidades de cada contaminante.

Para o NM ZnO, foi preparada uma SE com concentração de 10.000 mg/L, para a qual foi pesado 0,25 mg de NM ZnO, através da balança analítica (Shimadzu, mod. AG200) e colocado em suspensão em 25 mL de meio *Conway*. A solução foi homogeneizada por uma sonda ultrassônica (B-BRAUN, mod. Labsonic U, 500W, Alemanha) por 5 min, a uma potência de 80%, para manter o NM em suspensão, e foi diluída sucessivamente para o preparo das concentrações de exposição de 0,1; 1; 10; 100 e 1000 mg/L.

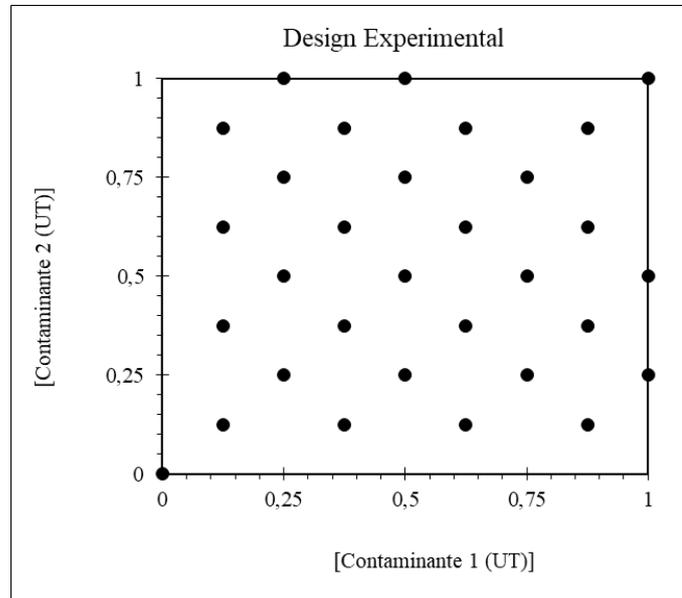
A SE de DCF, com concentração de 1000 mg/L, foi preparada em um balão volumétrico, onde 50 mg do contaminante foi diluído em 50 mL de meio *Conway*. As concentrações de exposição escolhidas foram as de 0,1; 1; 10; 100 e 200 mg/L.

Por fim, para o preparo da SE de SDS, com concentração de 10.000 mg/L, foram pesados 50 mg de SDS, o qual foi diluído em 50 mL de meio *Conway*. Após a diluição sucessiva, foram preparadas as respectivas concentrações de exposição: 0,1; 1; 10; 100 e 1000 mg/L. Devido a alta capacidade de solubilização do contaminante, durante o preparo da SE, parte da espuma gerada foi eliminada para evitar interferência nas concentrações pré-estabelecidas.

### 3.5 PROCEDIMENTOS DE ENSAIO DE TOXICIDADE DE MISTURA

Para a elaboração das misturas utilizou-se um isoblograma com design de raio fixo. A metodologia proposta por Vaz (2020) indicava 25 pontos amostrais (adaptado de Gestel et al., 2012), no entanto, o presente estudo adotou 31 pontos descritos em função das unidades tóxicas (UTs) dos compostos (Figura 6). Os novos pontos foram escolhidos de acordo com o próprio design estabelecido e foram propostos principalmente para englobar determinadas concentrações que não eram descritas no design anterior.

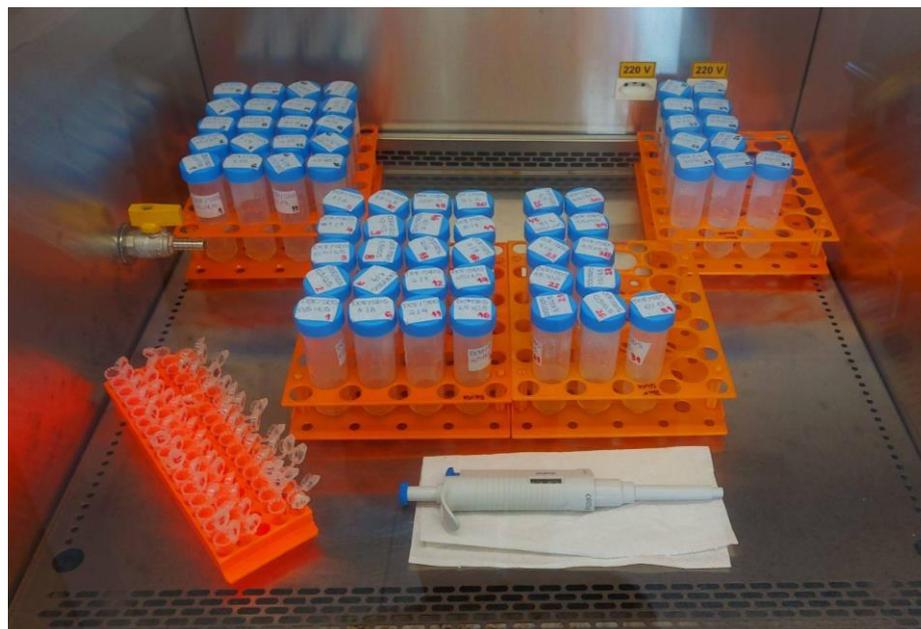
FIGURA 6 - Isoblograma de raio fixo utilizado para o preparo das soluções de exposição para os testes de mistura.



FONTE: A autora (2022), adaptado de Vaz (2020).

Para a preparação das UTs estabelecidas foram utilizados como referência os valores de EC50 dos testes individuais de toxicidade aguda dos contaminantes, obtidos através de análise estatística. Assim, considerando que  $1 \text{ UT} = \text{EC}_{50} \text{ do Contaminante } [\text{mg/L}]$ , foi elaborada para cada contaminante uma SE de 10 UTs, em 100 mL de meio *Conway*, ou seja, uma SE 10 vezes maior que a EC50 encontrada. Essa concentração de SE possibilitou a diluição para todas as outras UTs estabelecidas no design experimental, que ao final, continham 50 mL de volume. Toda a elaboração do ensaio foi realizada sob fluxo laminar, a fim de minimizar contaminação da *Tetraselmis sp.* com outros microrganismos (Figura 7).

FIGURA 7 - Procedimento de ensaio de toxicidade de mistura, no início do teste, onde a microalga era exposta, sob fluxo laminar, às diferentes concentrações dos contaminantes.



FONTE: A autora (2022).

Para os ensaios de mistura, foram realizadas três exposições independentes, com uma réplica de cada combinação proposta no isoblograma. Visando a robustez e aplicabilidade estatística dos resultados, a cada 24h, dentro do período de 72h, as amostras tiveram suas absorbâncias lidas no espectrofotômetro 2 vezes. Estes dados foram ajustados a diferentes modelos toxicológicos posteriormente.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados um mínimo de 03 testes independentes para verificar a reprodutibilidade dos ensaios nas condições definidas previamente. Todos os valores de densidade celular foram expressos pela média e desvio padrão, viabilidade e inibição celular. Após os testes toxicológicos, foram obtidas diferentes respostas tóxicas em relação às concentrações utilizadas de NM ZnO, DCF e SDS.

A fim de observar as diferenças entre as densidades celulares médias, foi aplicada uma Análise de Variância (ANOVA) bi fatorial ortogonal, seguida do teste de Tukey. Para atender as premissas da ANOVA, com relação à homogeneidade de variância e normalidade das distribuições, as concentrações celulares foram transformadas em  $\text{Log}(x+1)$  e submetidas aos testes de *Levene* e *Shapiro-Wilk*.

O teste de Tukey foi aplicado para avaliar estatisticamente as diferenças significativas entre as densidades celulares dos tratamentos em comparação ao controle negativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Software R Studio* (v. 4.2.1), adotando como nível de significância  $p > 0,05$ . Adicionalmente, para avaliar a robustez do script do R, os dados de EC50 dos contaminantes também foram calculados utilizando o *Software GraphPad Prism* (v. 8.0.0, GraphPad Software, San Diego, California USA).

Para a análise de mistura foram utilizados os modelos matemáticos descritos por Könemman (adaptado de ALTENBURGER; NENDZA; SCHÜÜRMAN, 2003), e Abbot (adaptado de DAS et al., 2022). As metodologias foram resumidas na Tabela 4, as derivações matemáticas das e interpretações mais aprofundadas foram descritas por Könemman (1996) e Abbot (1925).

TABELA 4 – Resumo dos modelos matemáticos utilizados para a obtenção de índices de misturas.

Índice	Unidade tóxica (UT)	Toxicidade da mistura (MTI)	Razão de inibição (R1)
Autor	Sprague; Ramsey (1965); Anderson; Weber (1975)	Könemann (1980)	Abbot (1925)
	$TU_i = \frac{C_i}{EC50_i}$	$MTI = \frac{\log M_0 - \log M}{\log M_0}$	$R_1 = \frac{C_{obs}}{C_{exp}}$
	onde:	onde:	onde:
Modelo matemático	$c_i$ : concentração do componente i EC50 <sub>i</sub> : EC50 do componente i	$M = \sum TU_i$ $M_0 = \frac{M}{\max(TU_i)}$	$C_{exp} = X + Y - \left(\frac{X * Y}{100}\right)$ C <sub>obs</sub> : inibição celular X : toxicidade do contaminante 1 Y : toxicidade do contaminante 2
Classificação		MTI > 1 : Sinergismo MTI < 0 : Antagonismo MTI = 1 : Adição de concentração MTI = 0 : Ação independente 1 > MTI > 0 : Parcialmente aditivo	R <sub>1</sub> > 1 : Sinergismo R <sub>1</sub> < 1 : Antagonismo R <sub>1</sub> = 1 : Aditivo

FONTE: A autora (2022), adaptado (ALTENBURGER; NENDZA; SCHÜÜRMAN, 2003; DAS et al., 2022)

Os isobogramas foram construídos com o auxílio do *Software Surfer*® (v. 18.1.186), através do método de Krigagem, que promoveu a suavização da superfície e dados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DA *Tetraselmis* sp.

Quanto a varredura realizada no espectrofotômetro, o comprimento de onda que apresentou um pico de absorção máxima adequado foi o de 680 nm, comprimento este que havia sido declarado, em outros estudos, como o ponto de absorção ideal da clorofila *a* (GUIDI; TATTINI; LANDI, 2017).

Considerando que o cultivo da *Tetraselmis* sp. se desenvolveu de acordo com as expectativas, foi possível construir uma curva de calibração para a medida da densidade celular, através dos valores obtidos para as densidades celulares da *Tetraselmis* sp. e absorbâncias correspondentes.

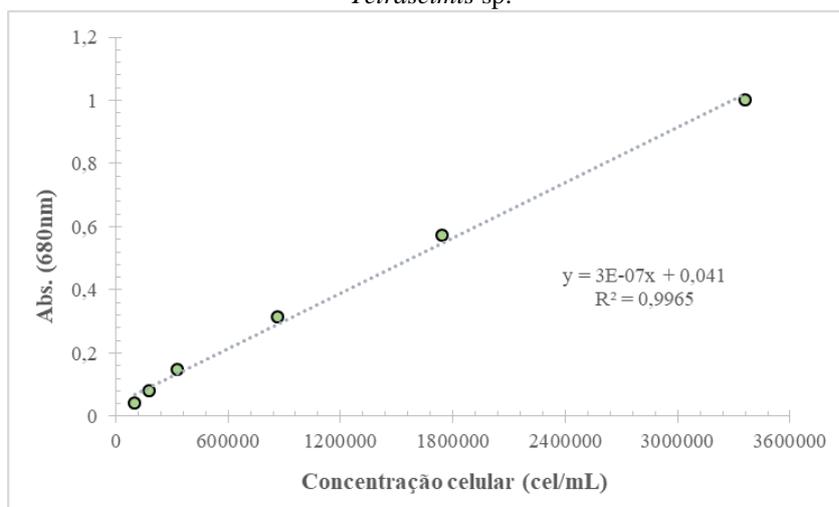
TABELA 5 - Dados de concentração celular (densidade em cel/mL) e absorbância para as diferentes diluições preparadas a partir da suspensão celular da microalga *Tetraselmis* sp. do cultivo.

Diluição (%)	Concentração celular (cel/mL)	Absorbância (680 nm)
100	33,6x10 <sup>5</sup>	1,002
50	17,4x10 <sup>5</sup>	0,572
25	8,6x10 <sup>5</sup>	0,314
12,5	3,3x10 <sup>5</sup>	0,148
6,25	1,8x10 <sup>5</sup>	0,082
3,12	1x10 <sup>5</sup>	0,043

FONTE: A autora (2022).

A curva de calibração construída, que apresentou a correlação linear da absorbância em função da concentração celular, pode ser observada na Figura 8.

FIGURA 8 - Correlação linear da absorbância em função da concentração celular (cel/mL) para a microalga *Tetraselmis* sp.



FONTE: A autora (2022).

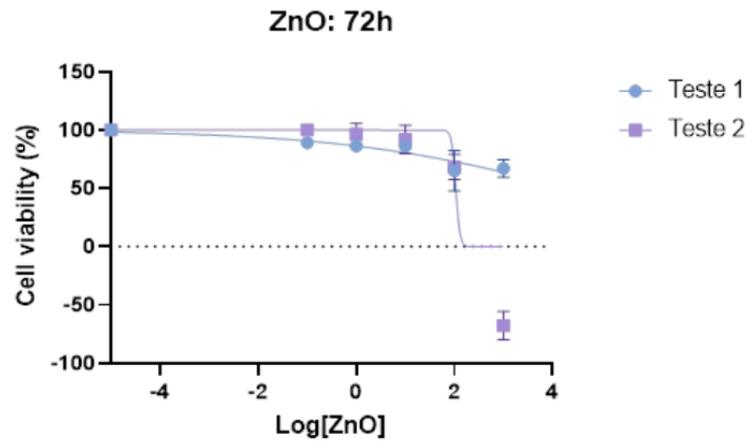
A correlação linear apresentou um  $R^2$  de 0,996 e foi considerada, portanto, adequada para a extrapolação da densidade celular em um intervalo de concentração de  $1 \times 10^5 - 33,6 \times 10^5$  cel/mL. Desta maneira, utilizando como base os resultados de regressão linear de densidade celular em função da absorbância, o método aplicado para leitura indireta da densidade celular demonstrou-se apropriado.

#### 4.2 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO NM ZnO SOBRE A *Tetraselmis* sp.

Após o estabelecimento da metodologia de quantificação da densidade celular da microalga, os testes de toxicidade crônica pela exposição da *Tetraselmis* sp. foram iniciados. Os resultados apresentados a seguir referem-se à quantificação da densidade celular da microalga após a sua exposição por 96h às concentrações de 0,1 – 1000 mg/L de NM ZnO. No total, foram realizados 6 testes independentes, dos quais apenas 2 apresentaram semelhanças. Os outros 4 testes realizados apresentaram baixas correlações lineares, portanto, não foi possível utilizá-los na análise.

Apesar disso, com o auxílio do *GraphPad Prism* foi possível obter as curvas de dose-resposta da exposição de NM ZnO sobre a microalga nos diferentes tempos de exposição. O teste 2, que apresentou o melhor ajuste e foi escolhido, portanto, para representar as concentrações expostas, obteve a melhor correlação dos dados em 72h de exposição (Figura 9), com  $R^2 = 0,77$  e  $EC50_{72h}$  de 107,5 mg/L.

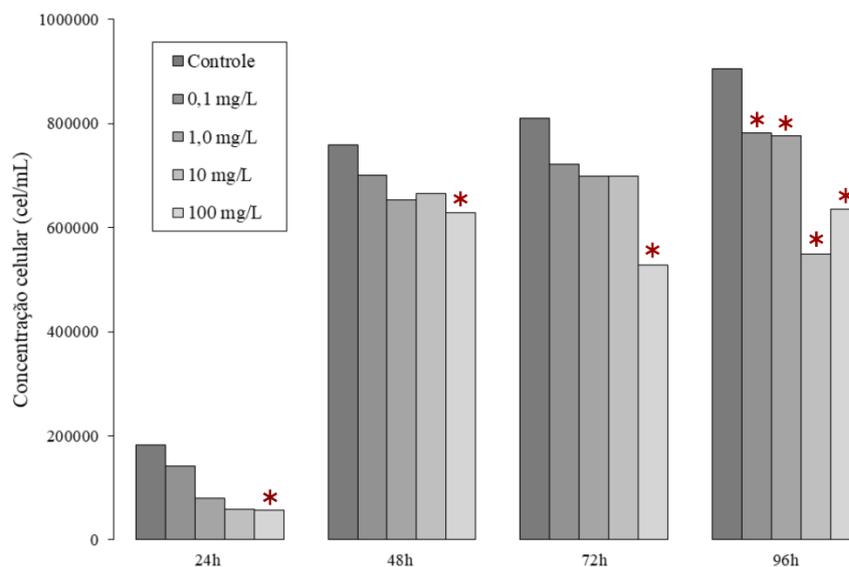
FIGURA 9 - Curva dose-resposta da exposição de NM ZnO sobre a microalga *Tetraselmis* sp. no tempo de exposição de 72 h.



FONTE: A autora (2022).

Os resultados representativos do teste 2 estão dispostos na Figura 10, a qual possibilita a visualização das respostas toxicológicas da microalga *Tetraselmis* sp. à exposição ao NM ZnO nos diferentes tempos e concentrações do contaminante. Para um melhor ajuste dos dados, optou-se por apresentar apenas as exposições de 0,1; 1; 10 e 100 mg/L.

FIGURA 10 - Ensaio de exposição crônica da microalga *Tetraselmis* sp. ao NM ZnO. \* P<0,05 indica diferença significativa entre o Tratamento Controle Negativo (Ctrl) e as outras concentrações, em função do tempo.



FONTE: A autora (2022)

Com os dados da Tabela 6, obtidos através da aplicação da ANOVA bifatorial ortogonal, foi possível observar que a densidade celular da microalga variou significativamente

entre o controle e as concentrações em todos os períodos de exposição. Além disso, também foi possível identificar que o tempo corresponde a 87% da variabilidade da densidade celular, enquanto o tratamento a apenas 7%, ou seja, as densidades celulares tendem a apresentarem diferenças mais significativas ao longo do tempo do que entre as concentrações em um único período.

TABELA 6 - Resultados obtidos com a aplicação da ANOVA bifatorial ortogonal, considerando os efeitos dos fatores tempo (Te) e tratamento (Tr: concentrações) com NM ZnO sobre a densidade celular da microalga *Tetraselmis* sp. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) foram destacados. gl = graus de liberdade; Q.M = média da soma dos quadrados; F = valor calculado da variância da ANOVA; P = valor de significância; Explicação (%) = estimativa dos componentes de variação em porcentagem.

Fatores	gl	Q.M	F	P	F-crítico	Explicação (%)
Te	3	1,33E+12	3,45E+02	< 0,0001	2,84E+00	87
Tr	4	8,01E+10	2,07E+01	< 0,0001	2,61E+00	7
Te:Te	12	1,04E+10	2,69E+00	9,32E-03	2,00E+00	3
Resíduo	40	3,87E+09	-	-	-	3
Total	59	-	-	-	-	-

FONTE: A autora (2022).

Essa observação pode ser reafirmada através da análise dos resultados do Teste de *Tukey*, onde foram encontradas diferenças significativas entre o controle e a concentração de 100 mg/L, em 24, 48, 72h e 96h. Em 96h, todas as concentrações apresentaram diferenças significativas em comparação com o controle.

TABELA 7 - Resultados obtidos com a aplicação do Teste de *Tukey*, considerando as diferenças significativas de densidade celular entre o controle e as demais concentrações de NM ZnO, de acordo com o tempo de exposição, sobre a microalga *Tetraselmis* sp. Valores significativos ( $> DMS$ ) foram destacados. \*DMS = diferença mínima significativa.

Fatores	24h	48h	72h	96h
	<i>DMS = 123476,12</i>			
CTRL : 0,1 mg/L	40000	57777,78	88888,89	<b>124444,44</b>
CTRL : 1 mg/L	102222,22	104444,44	111111,11	<b>128888,89</b>
CTRL : 10 mg/L	122222,22	93333,33	112222,22	<b>357777,78</b>
CTRL : 100 mg/L	<b>124444,44</b>	<b>130000</b>	<b>282222,22</b>	<b>301111,11</b>

FONTE: A autora (2022).

Através do teste de *Tukey* realizado, foi possível encontrar uma CENO de 10 mg/L e CEO de 100 mg/L, para 24, 48 e 72h e CENO < 0,1 mg/L e CEO de 0,1 mg/L, para 96h. Com isso, é possível compreender que em termos de toxicidade (sem considerar o tempo de exposição), o NM ZnO é mais tóxico para a microalga *Tetraselmis* sp. quando se encontra em maiores concentrações. No entanto, ao avaliar a concentração versus tempo de exposição, o tempo apresenta maior relevância, visto que independente da presença de diferentes

concentrações do poluente, a densidade celular da microalga tende a se alterar de acordo com o tempo decorrido, por conta do crescimento populacional natural.

Ao comparar estes resultados com os obtidos por Almeida et al., (2021), os quais apresentam uma CENO < 0,1 mg/L e CEO de 0,1 mg/L, é possível notar que ainda não há um padrão de comportamento estabelecido para o NM ZnO quanto a exposição à microalgas, portanto, se faz necessário que mais ensaios de toxicidade com o contaminante sejam realizados, para que outros aspectos, como meio de cultura, tempo de exposição e organismo-teste também sejam discutidos.

Considerando que já houveram relatos de que NB ZnO com concentrações entre 0,6 e 100 mg/L apresentava toxicidade à microalgas (CHEN et al., 2012; FRANKLIN et al., 2007; HOU et al., 2017; MIAO et al., 2010; SAXENA; HARISH, 2019), é possível dizer que, de modo geral, os resultados obtidos com esses testes de exposição ao NM ZnO cumpriram com as expectativas. Contudo, entende-se que a ausência de replicabilidade dos resultados e desafio em normalizá-los, provêm da dificuldade em estabilizar o NM ZnO em suspensão e homogeneizar as concentrações preparadas, uma vez que o contaminante não se dissolveu facilmente no meio Conway. Além disso, para o preparo dos testes de toxicidade, foram utilizadas sínteses cedidas por diferentes laboratórios, o que pode ter gerado características morfológicas distintas no NM, dificultando ainda mais a replicabilidade dos resultados nos testes independentes. Devido a facilidade com que o NM pode ter suas propriedades físico-químicas alteradas, é possível que a composição química do meio Conway tenha influenciado a agregação do NM ZnO, devido à elevada força iônica e pH da água do mar (GONÇALVES et al., 2018). Dessa maneira, é possível inferir que a toxicidade do NM também pode ser influenciada pela composição do meio aquoso em que se encontra suspenso (ALMEIDA, 2018).

#### 4.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO DCF SOBRE A *Tetraselmis* sp.

Os resultados apresentados abaixo referem-se à quantificação da densidade celular da microalga a sua exposição às concentrações de 0,1 – 200 mg/L de DCF. No total, foram realizados 6 testes independentes, dos quais 4 apresentaram semelhanças.

Com o auxílio do *GraphPad Prism*, foi possível obter as curvas de dose-resposta da exposição de DCF sobre a microalga nos diferentes tempos de exposição (Figura 11). Considerando os efeitos de toxicidade aguda, através da análise dos gráficos e comparação entre as correlações lineares de cada teste, foi possível evidenciar que o teste 3 apresentou um R<sup>2</sup>

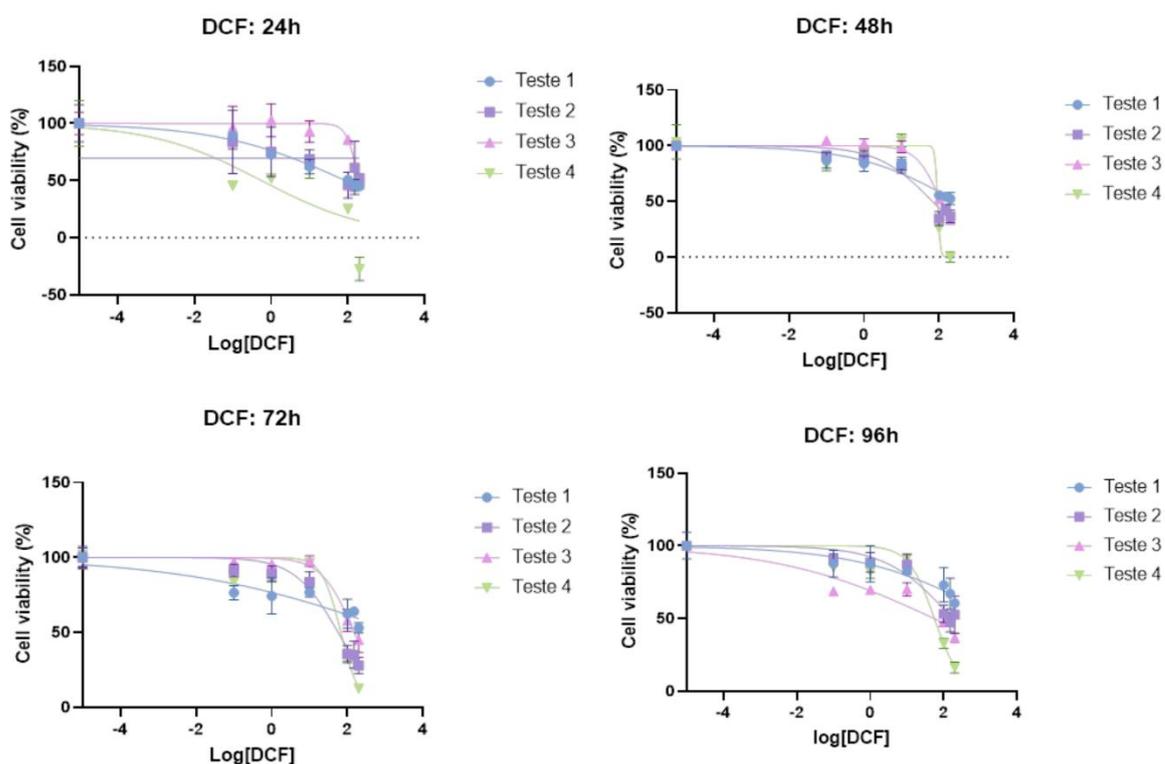
igual a 0,9791 em 48h e, portanto, foi o escolhido para representar os resultados nas análises dos testes de toxicidade crônica apresentados a seguir. Este ajuste expressou um valor de  $EC50_{48h} = 112,7 \text{ mg/L}$  (IC 95%: 98,87 – 127,1 mg/L). Os valores de EC50 foram calculados no *GraphPad Prism* e *RStudio*, e ambos apresentaram valores muito semelhantes (Tabela 8).

TABELA 8 - Valores de EC50 (mg/L) obtidos nos diferentes tempos de exposição e softwares utilizados na pesquisa. Estes valores são referentes ao teste 3 de exposição do DCF à microalga *Tetraselmis* sp.

Software	EC50 (mg/L)			
	24h	48h	72h	96h
<b>RStudio</b>	948,6	112,6	151,2	58,6
<b>GraphPad Prism</b>	190,5	112,7	151,3	58,6

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 11 - Curva dose-resposta da exposição do DCF sobre a microalga *Tetraselmis* sp. nos respectivos tempos de exposição, 24, 48, 72 e 96h, em quatro testes independentes.



FONTE: A autora (2022).

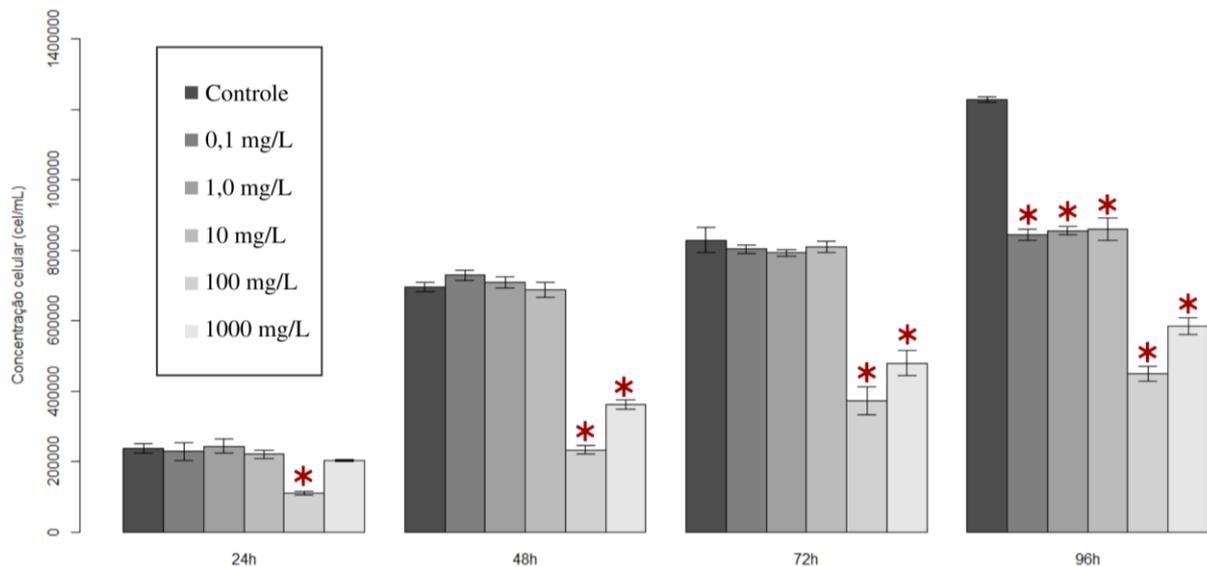
Considerando que na literatura já foram encontrados valores de EC50 entre 16,3 e 71,9 mg/L à exposição de microalgas verdes (CLEUVERS, 2004; FERRARI et al., 2003, 2004; WEISSMANNÓVÁ et al., 2018), e entre 11,4 e 115 mg/L à exposição de outros organismos (FERRARI et al., 2003; SCHMIDT et al., 2011), é possível dizer que o valor obtido no projeto se encaixa dentro do range de toxicidade já estudada do DCF. Além disso, o valor ainda pode

ser considerado ecologicamente relevante, uma vez que em águas superficiais o DCF já foi encontrado com concentrações de 1,36E-6 a 3,32E-5 mg/L, e em água de consumo humano com 2,5E-6 mg/L (TOGOLA; BUDZINSKI, 2008).

Para confirmar a homogeneidade de variância dos dados, foi realizado o teste de *Levene*, o qual demonstrou um *p-value* maior que 5% e, portanto, dados homogêneos. Com relação a normalidade dos resíduos, foi aplicado o teste de *Shapiro-Wilk*, o qual também apresentou  $p > 0,05$  (maior que 5%). Dessa maneira, considerando que os pressupostos foram atendidos, a ANOVA foi aplicada e, ao serem encontradas variações significativas ( $p < 0,05$ ), o teste de Tukey foi utilizado para determinar a interação entre os tratamentos (fator 1) e o tempo (fator 2). Essa interação pode ser melhor observada na Figura 12.

Através da observação gráfica, é possível identificar que a *Tetraselmis sp.* exposta as concentrações de 100 (tratamento TD) e 200 mg/L (tratamento TF) de DCF teve sua densidade celular significativamente reduzida após 48h, quando comparada aos outros tratamentos e tempos de exposição. A análise estatística corroborou com essa interpretação gráfica, visto que seu resultado demonstrou uma tendência de diferença significativa entre o controle e as maiores concentrações a partir de 24h de exposição (Tabela 9).

FIGURA 12 - Ensaio 3 de exposição crônica da microalga *Tetraselmis sp.* ao DCF. \* $P < 0,05$  indica diferença significativa entre o Tratamento Controle (Ctrl) e as outras concentrações, em função do tempo.



FONTE: A autora (2022).

TABELA 9 - Resultados obtidos com a aplicação do Teste *Tukey*, considerando as diferenças significativas de densidade celular entre o controle e as demais concentrações de DCF, de acordo com o tempo de exposição, sobre a microalga *Tetraselmis* sp. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) foram destacados. \* $P < 0,05$  indica diferença significativa entre o Tratamento Controle (Ctrl) e as outras concentrações, em função do tempo.

Fatores	24h	48h	72h	96h
	<i>p &lt; 0,05</i>			
CTRL : 0,1 mg/L	10.000.000	10.000.000	10.000.000	<b>0.0004754</b>
CTRL : 1 mg/L	10.000.000	10.000.000	10.000.000	<b>0.0009455</b>
CTRL : 10 mg/L	0.9999892	10.000.000	10.000.000	<b>0.0011367</b>
CTRL : 100 mg/L	<b>0.0000000</b>	<b>0.0000000</b>	<b>0.0000000</b>	<b>0.0000000</b>
CTRL : 200 mg/L	0.8841732	<b>0.0000000</b>	<b>0.0000001</b>	<b>0.0000000</b>

FONTE: A autora (2022).

Como é possível observar, em 24h, a concentração a partir de 100 mg/L já apresentava diferença significativa quando comparada com o controle, em 48, 72 e 96h de exposição às concentrações de 100 e 200 mg/L se mostraram significativas. Dessa maneira, é possível interpretar que a densidade celular da microalga passou a reduzir significativamente, em relação ao controle, a partir das 24h. Através destes dados, e com o auxílio do *RStudio*, também foi possível obter uma CEO de 100 mg/L, CENO de 10 mg/L para 48h de exposição. Nos estudos de Ferrari et al., (2004) e Cleuvers et al., (2004), as microalgas verdes de água doce *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Desmodemus subspicatus* também apresentaram uma CENO de 10 mg/L para 96h de exposição.

Atualmente, no Brasil, não existem legislações e/ou diretrizes que estabeleçam limites máximos para o lançamento de DCF no ambiente ou que controlem seu consumo, no entanto, internacionalmente o DCF vêm se consolidando como um CPE (LONAPPAN et al., 2016). De acordo com a Diretiva 2008/105/CE (UE, 2008), que incluiu o DCF na “lista de substâncias prioritárias” e passou a exigir que as empresas buscassem tratamentos eficazes na remoção do DCF em águas residuais, o limite de detecção máximo do contaminante em águas residuais é de 10 ng/L. Apesar deste ser um valor muito abaixo dos citados acima, é importante considerar que o consumo de DCF cresce anualmente e, portanto, sua concentração no ambiente tende a aumentar também. Além disso, os dados observados no estudo evidenciam que mesmo as baixas concentrações do contaminante, quando aliadas a um determinado período de exposição, podem gerar reduções significativas no crescimento celular da microalga. Dessa maneira, é preciso que sejam realizadas mais pesquisas sobre o assunto, para que as concentrações usuais do DCF em águas residuais brasileiras sejam encontradas e assim sejam estabelecidos limites apropriados para a preservação da biota.

#### 4.4 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO SDS SOBRE A *Tetraselmis* sp.

A introdução do SDS no projeto se deu principalmente devido a necessidade de encontrar uma maneira eficaz de estabilizar o NM ZnO em meio Conway, uma vez que seus ensaios de toxicidade individuais não se desenvolveram da maneira como esperado. Dessa forma, o SDS, cientificamente conhecido por ser uma substância padrão de referência para a construção de cartas-control (ABNT, 2021), foi escolhido para possivelmente “auxiliar” a estabilidade de NMs em suspensão nos testes de mistura. No entanto, para que a substância pudesse ser utilizada da maneira mais correta, foram realizados testes de toxicidade individuais com a mesma. Os resultados que serão apresentados nesta seção, referem-se à quantificação da densidade celular da microalga a sua exposição às concentrações de 0,1 – 1000 mg/L de SDS. No total, foram realizados 3 testes independentes e todos apresentaram semelhanças.

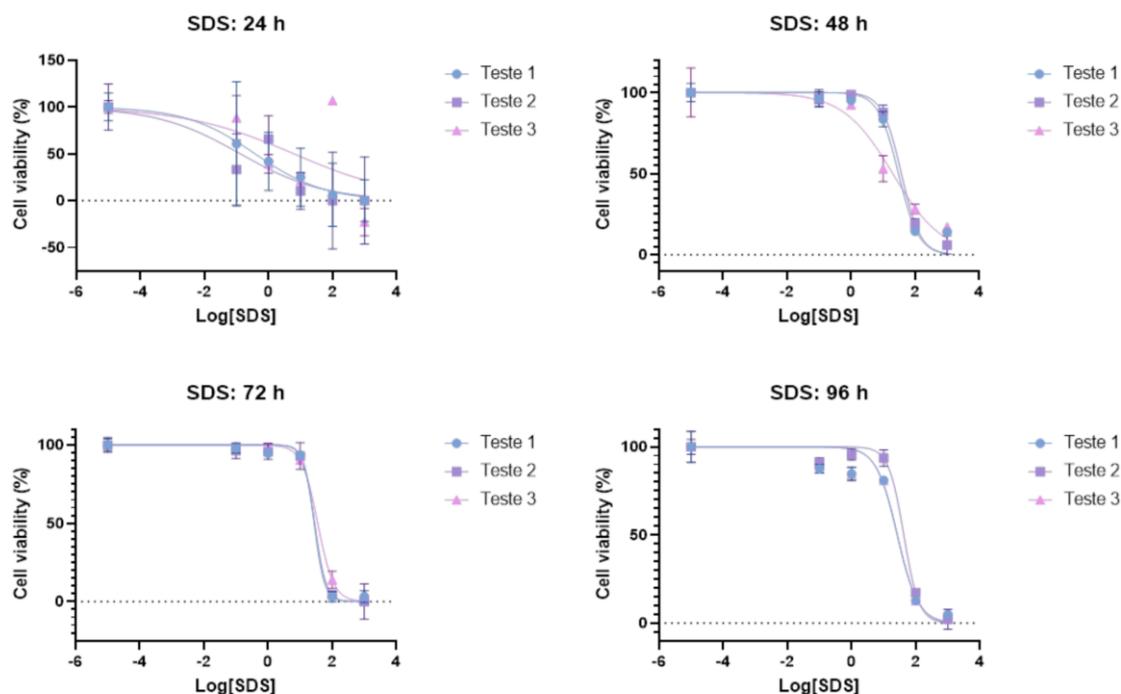
Com o auxílio do *GraphPad Prism*, foi possível obter as curvas de dose-resposta da exposição de SDS sobre a microalga nos diferentes tempos de exposição (Figura 13). Com ela, é possível notar que as curvas dos testes 1 e 2 apresentaram praticamente a mesma inclinação, por isso, a escolha do teste representativo, que foi utilizado nas análises estatísticas, teve como fator decisivo o parâmetro de correlação linear ( $R^2$ ) mais adequado. No caso, o teste 2 apresentou um elevado  $R^2$ , de 0,989, e uma  $EC50_{48h}$  de 37 mg/L, em 48h. Todos os valores de  $R^2$  e  $EC50$  dos testes foram calculados igualmente nos dois softwares, e ambos obtiveram resultados semelhantes (Tabela 10).

TABELA 10 - Valores de  $EC50$  (mg/L) obtidos nos diferentes tempos de exposição e softwares utilizados na pesquisa. Estes valores são referentes ao teste 2 de exposição do SDS à microalga *Tetraselmis* sp.

Software	EC50 (mg/L)			
	24h	48h	72h	96h
<b>RStudio</b>	0,15	37,53	28,39	14,4
<b>GraphPad Prism</b>	0,13	37,53	28,47	42,67

FONTE: A autora (2022).

FIGURA 13 - Curvas dose-resposta das exposições do SDS sobre a microalga *Tetraselmis* sp. nos respectivos tempos de exposição, 24, 48, 72 e 96h, em três testes independentes.



FONTE: A autora (2022).

Na literatura, valores bem semelhantes (entre 1,4 e 36,58 mg/L) de EC<sub>50</sub> já foram encontrados para a exposição de SDS à diversos organismos marinhos (HAN; CHOI, 2005; IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010; LIWARSKA-BIZUKOJC et al., 2005; NIPPER et al., 2001). A resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005) aponta que o valor máximo de Sulfato total (SO<sub>4</sub>) em águas doces deveria ser de 250 mL, portanto apesar dos testes terem obtido resultados suficientemente representativos dentro do range de concentrações testadas, é recomendado que mais ensaios sejam realizados, visando a robustez da pesquisa e a inclusão do SDS dentro das normas referente as condições e padrões de lançamento de efluentes.

Além disso, com os dados obtidos após a aplicação da ANOVA bifatorial (Tabela 11) foi possível observar que ao contrário do que ocorreu com o NM, as concentrações (tratamento) responderam a cerca de 51% dos resultados obtidos, enquanto o tempo explicou apenas 37%. Em outras palavras, é possível concluir que as concentrações escolhidas de SDS corresponderam a 51% dos resultados obtidos, independentemente do tempo em que a microalga passou exposta ao SDS.

TABELA 11 - Resultados obtidos com a aplicação da ANOVA bifatorial ortogonal, considerando os efeitos dos fatores tempo (Te) e tratamento (Tr) com SDS sobre a densidade celular da microalga *Tetraselmis* sp. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) foram destacados. gl= graus de liberdade; Q.M= média da soma dos quadrados; F = valor calculado da variância da ANOVA; P = valor de significância; Explicação (%) = estimativa dos componentes de variação em porcentagem.

Fatores	gl	Q.M	F	P	F-crítico	Explicação (%)
Te	3	8,58E+11	8,36E+02	< <b>0,0001</b>	2,80E+00	37
Tr	5	7,30E+11	7,11E+02	< <b>0,0001</b>	2,41E+00	51
Te:Tr	15	5,85E+10	5,70E+01	< <b>0,0001</b>	1,88E+00	12
Resíduo	48	1,03E+09	-	-	-	0
Total	71	-	-	-	-	100

FONTE: A autora (2022).

Com a análise de Tukey, foi possível compreender de forma mais profunda a interação que ocorreu entre o controle e as diferentes concentrações de SDS, ao longo dos tempos de exposição (Tabela 12). Com ela, foram encontradas diferenças significativas entre o controle e a concentração de 100 e 1000 mg/L em 24h, e de 10, 100 e 1000 mg/L em 48h. Apesar de não se mostrar diferentemente significativa, a concentração de 10 mg/L em 24h apresentou um valor bem próximo ao estabelecido. Considerando que a EC50 do contaminante encontra-se entre as concentrações de 10 e 100 mg/L, ou seja, as diferenças significativas obtidas com o teste Tukey se encaixam com os outros dados já encontrados.

TABELA 12 - Resultados obtidos com a aplicação do Teste *Tukey*, considerando as diferenças significativas de densidade celular entre o controle e as demais concentrações de SDS, de acordo com o tempo de exposição, sobre a microalga *Tetraselmis* sp. Valores significativos ( $> DMS$ ) foram destacados. \*DMS = diferença mínima significativa.

Fatores	24h	48h	72h	96h
	<b>DMS = 63624,02</b>			
CTRL : 0,1 mg/L	45555,56	23333,33	24444,44	61111,11
CTRL : 1 mg/L	23333,33	7777,78	28888,89	30000
CTRL : 10 mg/L	61111,11	<b>82222,22</b>	47777,78	43333,33
CTRL : 100 mg/L	<b>88888,89</b>	<b>54555,56</b>	<b>64555,56</b>	<b>56555,56</b>
CTRL : 1000 mg/L	<b>130000</b>	<b>631111,11</b>	<b>751111,11</b>	<b>565555,56</b>

FONTE: A autora (2022).

Com estes dados, foi possível obter uma CENO de 10 mg/L e CEO de 100 mg/L em 24, 72 e 96h de exposição, CENO de 1 mg/L e CEO de 10 mg/L em 48h. Outros estudos também evidenciaram valores de CENO semelhantes (HAN; CHOI, 2005; IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010).

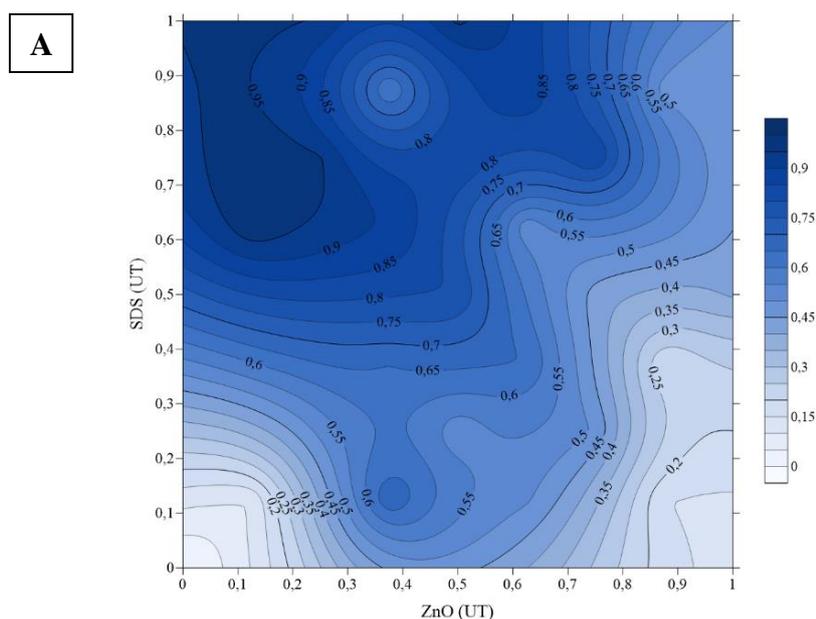
Vale ressaltar ainda que, diferentemente dos outros contaminantes, as menores concentrações (0,1 e 1 mg/L) não passaram a apresentar diferenças significativas com o controle ao longo do tempo, ou seja, em baixas concentrações o SDS não alcançou o auge do seu

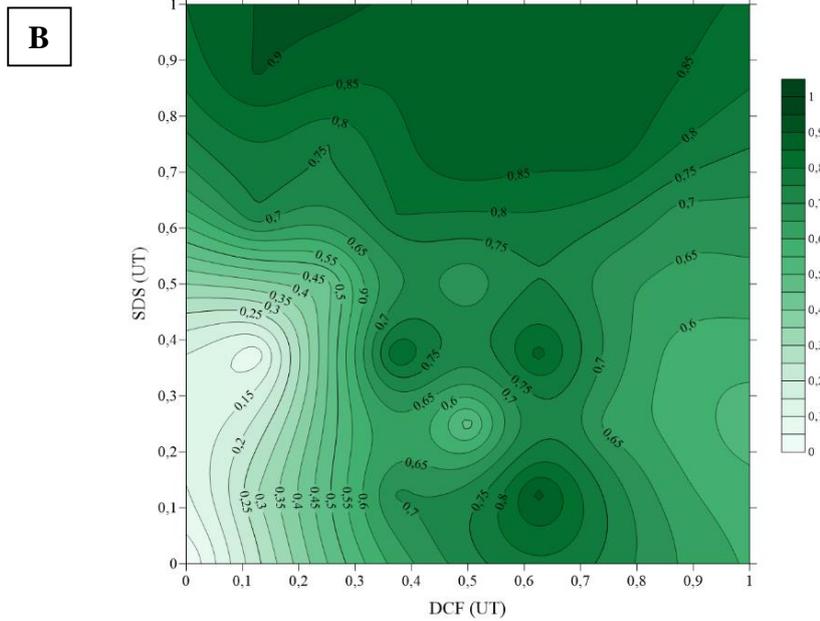
potencial tóxico e, portanto, não interferiu no crescimento celular da microalga. Esse comportamento também pôde ser verificado através de observações visuais feitas sob os frascos de exposição dos ensaios: enquanto o controle e as menores concentrações apresentavam uma cor mais esverdeada, as maiores concentrações encontravam-se praticamente translúcidas.

#### 4.5 TESTE DE TOXICIDADE DO NM ZnO E DCF QUANDO COMBINADOS COM SDS

Para os ensaios de misturas, foram realizados 4 testes independentes de DCF (Composto 1) e SDS (Composto 2) e 2 testes independentes de NM ZnO (Composto 1) e SDS (Composto 2). Os ensaios consideraram os 31 pontos propostos no design experimental (Figura 6), gerando assim, através dos dados brutos de inibição celular, os seguintes isobogramas (Figura 14). Esses dados foram produzidos a partir das densidades celulares das exposições em 24h e 48h respectivamente das misturas de NM ZnO com SDS e DCF com SDS. Conforme apresentado anteriormente, esses foram os tempos que apresentaram as melhores correlações dose-resposta para definição da EC50 dos contaminantes estudados. De maneira geral, as duas misturas apresentaram uma relação direta entre o aumento das concentrações e inibição da densidade celular da microalga, sendo que a dose de SDS apresentou uma maior relevância para a interação na mistura do NM ZnO.

FIGURA 14 – Isobogramas de dados de inibição da densidade celular da microalga marinha *Tetraselmis* sp., no tempo de exposição de 24h, para a mistura de NM ZnO com SDS (A) e, de 48h, para a mistura de DCF com SDS (B), com concentrações expressas em termos de UT.





FONTE: A autora (2022).

A fim de entender melhor os efeitos das misturas, os dados foram analisados em diferentes modelos, descritos por Könemann (1996) e Abbott (1925). Com a primeira metodologia, foi possível obter os diferentes índices de toxicidade de mistura (MTI, em inglês *Mixture toxicity index*), onde foram previstos os tipos de interação (sinergismo, antagonismo, adição de concentração, ação independente e parcialmente aditivo) que deveriam ocorrer entre os contaminantes de acordo com as UTs, enquanto com a segunda, foram obtidos os valores correspondentes às interações (sinergismo, antagonismo e aditividade) que ocorreram entre as misturas. Portanto, ao utilizar essas duas modelagens, foi possível construir uma tabela de comparação entre tipos de interação previstas e as que de fato ocorreram entre as misturas de NM ZnO e SDS (Tabela 13) e DCF e SDS (Tabela 14).

TABELA 13 – Resultados da comparação entre índices de mistura do teste de NM ZnO com SDS. Os valores convergentes entre os modelos foram destacados. Cexp = Concentração esperada; Cobs = Concentração esperada; R1 = Cobs/Cexp.

Amostra	ZnO		KÖNEMMAN (1981)		ABBOTT (1925)			
	UT	UT	MTI	Tipo de interação Prevista	Cexp (UT)	Cobs (mg/L)	R1	Tipo de interação obtida
1	<b>0,125</b>	<b>0,375</b>	<b>3,41</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>37,50</b>	<b>60,00</b>	<b>2,4 ± 0,01</b>	<b>Sinergismo</b>
2	<b>0,125</b>	<b>0,625</b>	<b>2,58</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>50,00</b>	<b>98,85</b>	<b>2,6 ± 0,04</b>	<b>Sinergismo</b>
3	0,125	0,875	1,00	Adição de concentração	12,50	95,00	2,0 ± 0,01	Sinergismo
4	0,125	0,125	3,00	Sinergismo	50,00	10,80	1,0 ± 0,05	Aditivo
5	<b>0,250</b>	<b>0,250</b>	<b>2,00</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>25,00</b>	<b>51,54</b>	<b>2,0 ± 0,05</b>	<b>Sinergismo</b>
6	<b>0,250</b>	<b>0,500</b>	<b>1,71</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>37,50</b>	<b>81,54</b>	<b>2,2 ± 0,03</b>	<b>Sinergismo</b>
7	0,250	0,750	1,00	Adição de concentração	50,00	95,38	2,0 ± 0,05	Sinergismo
8	0,250	1,000	0,00	Ação independente	62,50	94,62	1,5 ± 0,01	Sinergismo
9	<b>0,375</b>	<b>0,125</b>	<b>3,41</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>25,00</b>	<b>69,23</b>	<b>2,8 ± 0,03</b>	<b>Sinergismo</b>
10	<b>0,375</b>	<b>0,375</b>	<b>1,42</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>37,50</b>	<b>65,38</b>	<b>1,7 ± 0,04</b>	<b>Sinergismo</b>
11	0,375	0,625	1,00	Adição de concentração	50,00	89,23	1,8 ± 0,02	Sinergismo
12	<b>0,375</b>	<b>0,875</b>	<b>0,37</b>	<b>Parcialmente aditivo</b>	<b>0,00</b>	<b>59,62</b>	<b>1,0 ± 0,05</b>	<b>Aditivo</b>
13	0,500	1,000	0,00	Ação independente	75,00	96,15	1,3 ± 0,02	Sinergismo
14	<b>0,500</b>	<b>0,250</b>	<b>1,71</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>37,50</b>	<b>51,54</b>	<b>1,4 ± 0,03</b>	<b>Sinergismo</b>
15	0,500	0,500	1,00	Adição de concentração	50,00	79,23	1,6 ± 0,02	Sinergismo
16	0,500	0,750	0,56	Parcialmente aditivo	62,50	85,00	1,4 ± 0,04	Sinergismo
17	0,625	0,875	0,25	Parcialmente aditivo	75,00	87,31	1,2 ± 0,04	Sinergismo
18	<b>0,625</b>	<b>0,125</b>	<b>2,58</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>37,50</b>	<b>50,77</b>	<b>1,4 ± 0,05</b>	<b>Sinergismo</b>
19	0,625	0,375	1,00	Adição de concentração	50,00	64,62	1,3 ± 0,01	Sinergismo
20	<b>0,625</b>	<b>0,625</b>	<b>0,68</b>	<b>Parcialmente aditivo</b>	<b>75,00</b>	<b>51,92</b>	<b>1,0 ± 0,05</b>	<b>Aditivo</b>
21	0,750	0,750	0,42	Parcialmente aditivo	75,00	85,00	1,1 ± 0,03	Sinergismo
22	<b>0,750</b>	<b>0,250</b>	<b>1,00</b>	<b>Adição de concentração</b>	<b>50,00</b>	<b>49,23</b>	<b>1,0 ± 0,02</b>	<b>Aditivo</b>
23	0,750	0,500	0,56	Parcialmente aditivo	62,50	43,08	0,7 ± 0,01	Antagonismo
24	0,875	0,625	0,25	Parcialmente aditivo	68,75	52,69	0,8 ± 0,03	Antagonismo
25	0,875	0,125	1,00	Adição de concentração	50,00	15,38	0,3 ± 0,01	Antagonismo
26	0,875	0,375	0,37	Parcialmente aditivo	68,75	20,77	0,3 ± 0,03	Antagonismo
27	0,875	0,875	0,19	Parcialmente aditivo	50,00	47,69	0,6 ± 0,05	Antagonismo
28	1,000	1,000	0,00	Ação independente	100,00	49,62	0,5 ± 0,01	Antagonismo
29	1,000	0,500	0,00	Ação independente	75,00	40,77	0,5 ± 0,01	Antagonismo
30	1,000	0,250	0,00	Ação independente	37,50	20,00	0,3 ± 0,01	Antagonismo

FONTE: A autora (2022).

Ao analisar a Tabela 13, a qual revela os tipos de interações previstas e obtidas a partir da mistura de NM ZnO com SDS, foi possível inferir que em 11 combinações binárias (interações em destaque) houve uma correlação entre o comportamento esperado e o obtido. Apesar da previsão modelada por Könemman (1996) não chegar à 50% das interações modeladas por Abbot (1925), é possível considerar que os resultados tiveram boa adequação.

Além disso, considerando apenas as interações obtidas pelo modelo de Abbot (1925), foi possível determinar que houve na mistura uma predominância (18 amostras) de interações sinérgicas, principalmente nas amostras com as menores UT's dos contaminantes e ainda com as concentrações mais diluídas de NM ZnO. Fazendo a relação deste resultado com o isoblograma da mistura (Figura 14, A), é possível conferir que mesmo nas menores concentrações de NM ZnO houveram interações significativas com SDS, muito provavelmente devido a potencialidade do surfactante em estabilizar o NM no meio Conway (SAMAELE; AMORNPITOKSUK; SUWANBOON, 2010; VINODGOPAL et al., 2006). Esse

comportamento é similar ao descrito por (JONKER et al., 2005), como um desvio razão-dose dependente, que no caso de uma mistura binária, o antagonismo pode ser observado quando a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo tóxico 1 em maior concentração, enquanto que o sinergismo pode ser observado quando a toxicidade é causada pelo tóxico 2 em maior concentração. Contudo, estudos mais aprofundados precisam ser conduzidos para confirmar esse comportamento, empregando também outros modelos que preveem essas interações.

Além destes, a mistura também apresentou 4 pontos com interação aditiva e 8 pontos com antagonismo. As interações antagônicas também puderam ser observadas no isoblograma da mistura, uma vez que as combinações de 23 a 30, que continham as maiores UT's de NM ZnO, não apresentaram os níveis de inibição celular esperados. Tendo em visto também a instabilidade do NM ZnO em suspensão (CHOI; CHOY, 2014), suponha-se que em elevadas concentrações a ação do SDS na estabilização do NM em suspensão não é tão efetiva, o que favorece os mecanismos de aglomeração, reduz a área superficial e consequentemente a sua toxicidade.

Tabela 14 – Resultados da comparação entre índices de mistura do teste de DCF com SDS. Os valores convergentes entre os modelos foram **destacados**. Cexp = Concentração esperada; Cobs = Concentração esperada; R1 = Cobs/Cexp.

Amostra	DCF		SDS		KÖNEMMAN (1981)		ABBOTT (1925)	
	UT	UT	MTI	Tipo de interação Prevista	Cexp (UT)	Cobs (mg/L)	R1	Tipo de interação obtida
1	0,125	0,375	3,41	Sinergismo	25,00	7,02	0,3 ± 0,02	Antagonismo
2	<b>0,125</b>	<b>0,625</b>	<b>2,58</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>37,50</b>	<b>74,33</b>	<b>2,0 ± 0,02</b>	<b>Sinergismo</b>
3	0,125	0,875	1,00	Adição de concentração	50,00	90,31	1,8 ± 0,01	Sinergismo
4	<b>0,125</b>	<b>0,125</b>	<b>3,00</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>12,50</b>	<b>29,78</b>	<b>2,4 ± 0,02</b>	<b>Sinergismo</b>
5	<b>0,250</b>	<b>0,250</b>	<b>2,00</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>25,00</b>	<b>46,25</b>	<b>1,9 ± 0,05</b>	<b>Sinergismo</b>
6	<b>0,250</b>	<b>0,500</b>	<b>1,71</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>37,50</b>	<b>43,34</b>	<b>1,2 ± 0,04</b>	<b>Sinergismo</b>
7	0,250	0,750	1,00	Adição de concentração	50,00	74,82	1,5 ± 0,01	Sinergismo
8	0,250	1,000	0,00	Ação independente	62,50	91,04	1,5 ± 0,04	Sinergismo
9	<b>0,375</b>	<b>0,125</b>	<b>3,41</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>25,00</b>	<b>70,70</b>	<b>2,8 ± 0,03</b>	<b>Sinergismo</b>
10	<b>0,375</b>	<b>0,375</b>	<b>1,42</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>37,50</b>	<b>85,23</b>	<b>2,3 ± 0,03</b>	<b>Sinergismo</b>
11	0,375	0,625	1,00	Adição de concentração	50,00	80,15	1,60 ± 0,01	Sinergismo
12	0,375	0,875	0,37	Parcialmente aditivo	62,50	85,96	1,4 ± 0,02	Sinergismo
13	0,500	1,000	0,00	Ação independente	75,00	88,62	1,2 ± 0,02	Sinergismo
14	<b>0,500</b>	<b>0,250</b>	<b>1,71</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>37,50</b>	<b>47,46</b>	<b>1,3 ± 0,03</b>	<b>Sinergismo</b>
15	0,500	0,500	1,00	Adição de concentração	50,00	65,62	1,3 ± 0,01	Sinergismo
16	0,500	0,750	0,56	Parcialmente aditivo	62,50	90,07	1,5 ± 0,05	Sinergismo
17	0,625	0,875	0,25	Parcialmente aditivo	75,00	85,96	1,2 ± 0,05	Sinergismo
18	<b>0,625</b>	<b>0,125</b>	<b>2,58</b>	<b>Sinergismo</b>	<b>37,50</b>	<b>91,53</b>	<b>2,5 ± 0,05</b>	<b>Sinergismo</b>
19	0,625	0,375	1,00	Adição de concentração	50,00	86,92	1,70 ± 0,03	Sinergismo
20	0,625	0,625	0,68	Parcialmente aditivo	62,50	79,66	1,3 ± 0,03	Sinergismo
21	0,750	0,750	0,42	Parcialmente aditivo	75,00	89,59	1,2 ± 0,01	Sinergismo
22	0,750	0,250	1,00	Adição de concentração	50,00	62,95	1,3 ± 0,04	Sinergismo
23	<b>0,750</b>	<b>0,500</b>	<b>0,56</b>	<b>Parcialmente aditivo</b>	<b>62,50</b>	<b>66,83</b>	<b>1,0 ± 0,05</b>	<b>Aditivo</b>
24	<b>0,875</b>	<b>0,625</b>	<b>0,25</b>	<b>Parcialmente aditivo</b>	<b>68,75</b>	<b>68,04</b>	<b>1,0 ± 0,01</b>	<b>Aditivo</b>
25	0,875	0,125	1,00	Adição de concentração	50,00	61,74	1,2 ± 0,03	Sinergismo
26	<b>0,875</b>	<b>0,375</b>	<b>0,37</b>	<b>Parcialmente aditivo</b>	<b>62,50</b>	<b>58,11</b>	<b>1,0 ± 0,05</b>	<b>Aditivo</b>
27	<b>0,875</b>	<b>0,875</b>	<b>0,19</b>	<b>Parcialmente aditivo</b>	<b>87,50</b>	<b>85,23</b>	<b>1,0 ± 0,03</b>	<b>Aditivo</b>
28	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>0,00</b>	<b>Ação independente</b>	<b>100,00</b>	<b>84,02</b>	<b>1,0 ± 0,05</b>	<b>Aditivo</b>
29	<b>1,000</b>	<b>0,500</b>	<b>0,00</b>	<b>Ação independente</b>	<b>75,00</b>	<b>63,44</b>	<b>1,0 ± 0,05</b>	<b>Aditivo</b>
30	<b>1,000</b>	<b>0,250</b>	<b>0,00</b>	<b>Ação independente</b>	<b>62,50</b>	<b>52,54</b>	<b>1,0 ± 0,05</b>	<b>Aditivo</b>

FONTE: A autora (2022).

Ao analisar a Tabela 14, a qual revela os tipos de interações previstas e obtidas a partir da mistura de DCF com SDS, foi possível constatar que dos 30 pontos analisadas, 15 convergiram entre os modelos, ou seja, 50% das ações previstas por Könemman (1996), aconteceram na modelagem de Abbot (1925). Com isso, é possível inferir que os dados tiveram bons ajustes aos modelos.

Além disso, considerando apenas os resultados obtidos pelo modelo de Abbot (1925), foi possível identificar que em 22 amostras, as interações foram sinérgicas. Esse comportamento também pode ser observado no isoblograma da mistura (Figura 14, B), uma vez que as amostras que continham as maiores concentrações dos contaminantes, principalmente de SDS, atingiram níveis de inibição celular mais significativos. De acordo com alguns autores (GINEBREDA et al., 2014; JIA et al., 2009), os efeitos sinérgicos podem contribuir com o aumento da capacidade toxicológica de determinadas substâncias, o que pode ter acontecido nesta mistura com ambos os contaminantes, visto que suas ações, mesmo nas

menores concentrações (baixas UT's), inibiram o crescimento celular da microalga. O modelo ainda identificou 1 ponto com interação antagônica e 6 pontos com aditividade, os quais em sua maioria possuíam uma UT de DCF maior que de SDS.

Vale ressaltar ainda que modelo de Könemman (1996) previa que de 9 a 10 amostras, em ambas as misturas, apresentariam um comportamento de CA ou IA, no entanto, o modelo de Abbot (1925) não leva em consideração esses tipos de interações, portanto, elas não puderam ser identificadas através desta metodologia. Apesar disso, é possível considerar que para ambas as misturas havia uma previsão de predominância de CA, por isso, se faz necessário o ajuste dos dados para outros modelos validados e bem estabelecidos na literatura, para que os resultados obtidos e hipóteses propostas sejam confirmados.

#### 4.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao avaliar os resultados de toxicidade do projeto, foi possível constatar que a toxicidade das misturas de ZnO com SDS e DCF com SDS apresentaram resultados bastante amplificados quando comparados com os efeitos individuais de cada um desses contaminantes. Ao serem misturados com SDS, ambos os contaminantes apresentaram um comportamento que se assemelha com “DR – Desvio dependente da razão entre as doses”, que apresenta em um cenário com 2 substâncias, o comportamento antagonista observado quando a toxicidade da mistura fosse causada pelo tóxico 1, enquanto que o comportamento sinérgico seria observado quando fosse causada pelo tóxico 2 (JONKER et al., 2005).

As implicações desse potencial tóxico mais significativo quando os contaminantes estão combinados provoca uma preocupação emergencial, uma vez que no ambiente complexo, as substâncias e contaminantes estão em constante interação, ou seja, dificilmente a biota do ecossistema marinho, por exemplo, estará exposta à um único contaminante por vez. Além disso, na literatura, um tema bastante atual refere-se as elevadas concentrações de SDS que são encontradas em águas residuais e, conseqüentemente lançadas em corpos receptores (MADHAV et al., 2018; PALMER; HATLEY, 2018).

Considerando todos os fatores apresentados no trabalho, e que a legislação brasileira não possui uma regulamentação precisa sobre a concentração desses contaminantes em águas residuais, é preciso que mais pesquisas e projetos envolvendo a temática sejam abertos para discussão com o público geral e governo. Este problema ambiental, que cresce silenciosamente a cada ano, precisa e deve ser compartilhado com todos aqueles que potencialmente sofrerão as

consequências do descarte inadequado de contaminantes (fármacos, detergentes e metais), dos tratamentos ineficazes na remoção destes nas águas residuais, e da ausência de diretrizes que controlem estes e outros fatores.

## 5. CONCLUSÕES

Este estudo avaliou os efeitos toxicológicos individuais e combinados do NM ZnO, DCF e SDS, quando expostos à microalga *Tetraselmis sp.*, através da aplicação em modelos toxicológicos validados. Com os resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que:

- A metodologia aplicada para quantificação da densidade celular da microalga *Tetraselmis sp.*, através da correlação da absorbância com a densidade (cel/mL), se mostrou confiável e adequada.
- Os ensaios de toxicidade aguda e crônica com a *Tetraselmis sp.* exposta ao NM ZnO, apresentaram uma EC50<sub>72h</sub> de 107,5 mg/L, CENO de 10 mg/L e CEO de 100 mg/L para 72h de exposição. No futuro, a toxicidade individual do NM deve ser estudada com mais profundidade, com atenção aos fatores que envolvem o organismo-teste, meio de cultura e concentrações aplicadas.
- O NM ZnO possui baixa estabilidade em suspensão, o que dificultou sua aplicabilidade em testes toxicológicos e reforçou a importância de serem utilizadas substâncias estabilizadoras em conjunto com o contaminante.
- Os ensaios de toxicidade aguda e crônica com a *Tetraselmis sp.* exposta ao DCF, apresentaram uma EC50<sub>48h</sub> de 112,7 mg/L, CENO de 10 mg/L e CEO de 100 mg/L para 48h de exposição.
- Os ensaios de toxicidade aguda e crônica com a *Tetraselmis sp.* exposta ao SDS, apresentaram uma EC50<sub>48h</sub> de 37 mg/L, CENO de 1 mg/L e CEO de 10 mg/L para 48h de exposição. O SDS apresenta ainda uma relação direta entre o aumento das suas concentrações e a redução da densidade celular.
- Os ensaios de toxicidade combinada com a *Tetraselmis sp.* exposta as misturas de DCF com SDS e NM ZnO com SDS demonstraram que o modelo que melhor explica a toxicidade da mistura é o de adição de concentração com comportamentos de mistura predominantemente sinérgicos. Além disso, os modelos aplicados para análise dos tipos de interação se mostraram confiáveis, adequados e complementares.

## 6. RECOMENDAÇÕES

Com base nos ensaios realizados, nos resultados analisados e nas dificuldades enfrentadas ao longo do projeto, a fim de complementar a pesquisa, recomenda-se:

- Realizar mais testes de toxicidade aguda e crônica com os contaminantes aqui apresentados e a microalga *Tetraselmis sp.*, para que os dados se tornem mais robustos;
- Explorar e (re)construir metodologias mais abrangentes, que levem em consideração os diferentes fatores que podem comprometer o sucesso dos resultados dos testes toxicológicos individuais e combinados, sejam eles externos ou internos ao processo de elaboração do teste.
- Abrir a discussão para criação de modelos toxicológicos mais flexíveis, que sejam capazes de rodar resultados de maneiras mais simples, eficientes e menos custosas;
- Aplicar as análises de toxicidade combinada nas avaliações e relatórios ambientais da área.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. The Value of the Dry Substitutes for Liquid Lime. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265–267, 1925.

ABNT. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com microalgas marinhas** ABNT NBR 16181:2021, 2021.

ALMEIDA, A. C. O. **Avaliação da toxicidade de nanobastões de óxido de zinco sobre clorófitas de ecossistemas marinhos e dulcícolas**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2018.

ALMEIDA, A. C. O. DE et al. Evaluation of toxicity of zinc oxide nanorods on green microalgae of freshwater and marine ecosystems. **Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 3, p. 85–90, 1 jan. 2021.

ALTENBURGER, R.; NENDZA, M.; SCHÜÜRMAN, G. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 1900–1915, 2003.

ANA, A. N. DE Á. **Atlas Esgotos: Despuição de Bacias Hidrográficas**. [s.l.: s.n.].

ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 4, p. 1461–1468, 2009.

ATSDR. **Guidance for the Preparation of an Interaction Profile**, 2001.

BACKHAUS, T. et al. The BEAM-project: Prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. **Continental Shelf Research**, v. 23, p. 1757–1769, 2003.

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, 1995.

BARATA, C. et al. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 1–14, 2006.

BASHIR, I. et al. Bioremediation and biotechnology: Sustainable approaches to pollution

degradation. In: **Bioremediation and Biotechnology: Sustainable Approaches to Pollution Degradation**. [s.l: s.n.]. p. 1–327.

BHATT, D.; MAHERIA, K. C.; PARIKH, J. Studies on Surfactant-Ionic liquid interaction on clouding behaviour and evaluation of thermodynamic parameters. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 16, n. 4, p. 547–557, 2013.

BHATTACHARYA, P. et al. Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 39, p. 16556–16561, 2010.

BINDU, P.; PHILIP, B. Surfactant-induced lipid peroxidation in a tropical euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) adapted to fresh water. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, p. 0–4, 2001.

BLISS, C. I. the Toxicity of Poisons Applied Jointly. **Annals of Applied Biology**, v. 26, n. 3, p. 585–615, 1939.

BONDARENKO, O. et al. **Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review** *Archives of Toxicology* Arch Toxicol, , jul. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23728526/>>. Acesso em: 13 mar. 2021

BONDI, C. A. M. et al. Human and environmental toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLS): Evidence for safe use in household cleaning products. **Environmental Health Insights**, v. 9, p. 27–32, 2015.

BRANCO, N. M. C.; ALBERT, A. L. M.; ROMÃO, C. M. C. P. A. Poluentes emergentes: Antimicrobianos no ambiente, a educação ambiental e o aspecto regulatório nacional e internacional. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, 2021.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de Março de 2005 (Retificada)**. Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 430/2011, de 13 de maio de 2011**. Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2011.

BROMBERG, Y.; PICK, E. Activation of NADPH-dependent superoxide production in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 25, p.

13539–13545, 1985.

BUSER, H.-R.; POIGER, T.; MÜLLER, M. D. Occurrence and fate of the pharmaceutical Drug Diclofenac in surface waters: Rapid photodegradation in a lake. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 32, p. 3449–3456, 1998.

CAO, C. et al. Genome-wide identification for genes involved in sodium dodecyl sulfate toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2020.

CARMONA, E.; ANDREU, V.; PICÓ, Y. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. **Science of the Total Environment**, v. 484, p. 53–63, 2014.

CARVALHO, P. et al. Influence of thickness and coatings morphology in the antimicrobial performance of zinc oxide coatings. **Applied Surface Science**, v. 307, p. 548–557, 2014.

CEDERGREEN, N. et al. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1621–1632, 2008.

CHEN, C. et al. The effect of C60 on the ZnO-nanorod surface in organic-inorganic hybrid photovoltaics. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 95, n. 2, p. 740–744, 2011.

CHEN, C. et al. The synergistic toxicity of the multiple chemical mixtures: Implications for risk assessment in the terrestrial environment. **Environment International**, v. 77, p. 95–105, 2015.

CHEN, P. et al. Adaptive interactions between Zinc Oxide Nanoparticles and *Chlorella* sp. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 12178–12185, 2012.

CHINTADA, V. B.; KOONA, D. R. Influence of surfactant on the properties of Ni-P nano ZnO composite coating. **Materials Research Express**, v. 6, n. 2, p. 22, 2018.

CHIRANI, M. R. et al. Environmental impact of increased soap consumption during COVID-19 pandemic: Biodegradable soap production and sustainable packaging. **Science of the Total Environment**, v. 796, 2021.

CHO, W. S. et al. Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of

Zn<sup>2+</sup>-dissolution inside lysosomes. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 27, 6 set. 2011.

CHOI, S.; CHOY, J. Biokinetics of zinc oxide nanoparticles: toxicokinetics, biological fates, and protein interaction. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 2, p. 261–269, 2014.

CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 185–194, 2003.

CLEUVERS, M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, p. 309–315, 2004.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

DAI, G. et al. Major pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in wastewater treatment plant and receiving water in Beijing, China, and associated ecological risks. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 92, n. 6, p. 655–661, 2014.

DANOVARO, R. et al. Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 4, p. 441–447, 2008.

DAS, S. et al. Nanoplastics enhance the toxic effects of titanium dioxide nanoparticle in freshwater algae *Scenedesmus obliquus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 256, n. February, p. 109305, 2022.

DAVARPANA, E.; GUILHERMINO, L. Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 167, p. 269–275, 2015.

DIMKPA, C. O. et al. Fate of CuO and ZnO nano and micro particles in the plant environment. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 9, p. 4734–4742, 2013.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 122–159, 2006.

FERRARI, B. et al. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of Carbamazepine, Clofibric acid, and Diclofenac. **Ecotoxicology and Environmental**

**Safety**, v. 55, p. 359–370, 2003.

FERRARI, B. et al. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1344–1354, 2004.

FINK, J. Surfactants. In: **Hydraulic Fracturing Chemicals and Fluids Technology (Second edition)**. [s.l: s.n.]. p. 147–156.

FOUCQUIER, J.; GUEDJ, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. **Pharmaceutical Research & Perspectives**, v. 3, n. 3, 2015.

FRANKLIN, N. M. et al. Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a Freshwater Microalga subcapitata (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 24, p. 8484–8490, 2007.

FREITAS, R. et al. The influence of salinity on sodium lauryl sulfate toxicity in *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 87, p. 9, 2021.

GAMARRA, J. S. J. et al. Environmental Risk Assessment (ERA) of diclofenac and ibuprofen : A public health perspective. **Chemosphere**, v. 120, p. 462–469, 2015.

GINEBREDA, A. et al. Assessment of multi-chemical pollution in aquatic ecosystems using toxic units: Compound prioritization, mixture characterization and relationships with biological descriptors. **Science of the Total Environment**, v. 468–469, p. 715–723, 2014.

GONÇALVES, R. A. et al. Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests. **Aquatic Toxicology**, v. 197, p. 32–40, 2018.

GRANT, R.; ACOSTA, D. Prolonged adverse effects of Benzalkonium Chloride and Sodium Dodecyl Sulfate in a Primary Culture System of Rabbit Corneal Epithelial Cells. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 33, n. 144, p. 71–82, 1996.

GUIDI, L.; TATTINI, M.; LANDI, M. How does chloroplast protect chlorophyll against excessive light? **Intech**, n. June, p. Chapter 3, 2017.

GUTERRES, S. et al. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I . Formulation

and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57–63, 1995.

HAAP, T.; TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H.-R. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: Immobilisation and hsp70-induction. **Chemosphere**, v. 73, p. 353–359, 2008.

HAN, T.; CHOI, G. A novel marine algal toxicity bioassay based on sporulation inhibition in the green macroalga *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Aqua**, v. 75, p. 202–212, 2005.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**, v. 131, n. 3, p. 5–17, 2002.

HEERKLOTZ, H. Interactions of surfactants with lipid membranes. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 41, n. 3, p. 205–264, 2008.

HENDERSON, L. M. et al. Effect of intragastric pH on the absorption of oral zinc acetate and zinc oxide in young healthy volunteers. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 19, n. 5, p. 393–397, 1995.

HOU, J. et al. Toxic Effects of Different Types of Zinc Oxide Nanoparticles on Algae, Plants, Invertebrates, Vertebrates and Microorganisms. **Chemosphere**, 2017.

IVANKOVIĆ, T.; HRENOVIĆ, J. Surfactants in the environment. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 61, n. 1, p. 95–110, 2010.

JAHROMI, R. et al. Synergistic effects of anionic surfactants on coronavirus (SARS-CoV-2) virucidal efficiency of sanitizing fluids to fight COVID-19. **Food and Chemical Toxicology**, v. 145, n. August, p. 111702, 2020.

Jl, J.; LONG, Z.; LIN, D. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, n. 2–3, p. 525–530, 2011.

JIA, J. et al. Mechanisms of drug combinations: Interaction and network perspectives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 111–128, 2009.

JONES, O. A. H.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. N. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. **Water Research**, v. 36, p. 5013–5022, 2002.

JONKER, M. J. et al. **Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis** *Environmental*

**Toxicology and Chemistry.** [s.l: s.n.].

JORGE, R. A. D. L. V. C.; MOREIRA, G. S. Use of sodium dodecyl sulfate and zinc sulfate as reference substances for toxicity tests with the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 2, p. 280–285, 2005.

KIM, H. et al. Chirality control of inorganic materials and metals by peptides or amino acids. **Materials Advances**, v. 1, n. 4, p. 512–524, 2020.

KONEMANN, W. H.; PIETERS, M. N. Confusion of concepts in Mixture Toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1996, p. 1025–1031, 1996.

KORTENKAMP, A.; ALTENBURGER, R. Toxicity from Combined Exposure to Chemicals. In: **Mixture Toxicity**. [s.l: s.n.], p. 95–119.

KUNKEL, U.; RADKE, M. Fate of pharmaceuticals in rivers: Deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions. **Water Research**, v. 46, n. 17, p. 5551–5565, 2012.

LANGFORD, K. H.; REID, M.; THOMAS, K. V. Multi-residue screening of prioritised human pharmaceuticals, illicit drugs and bactericides in sediments and sludge. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 2284–2291, 2011.

LAWRENCE, J. R. et al. Structural and functional responses of river biofilm communities to the nonsteroidal anti-inflammatory diclofenac. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 573–582, 2007.

LEE, C.; MAIBACH, H. The sodium lauryl sulfate model: an overview. **Contact Dermatitis**, v. 33, p. 1–7, 1995.

LEE, J. et al. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1216–1225, 2011.

LETZEL, M.; METZNER, G.; LETZEL, T. Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input. **Environment International**, v. 35, n. 2, p. 363–368, 2009.

LI, M.; LIN, D.; ZHU, L. Effects of water chemistry on the dissolution of ZnO nanoparticles and their toxicity to *Escherichia coli*. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 97–102, 2013.

- LIN, S. et al. Effects of quantum dots adsorption on algal photosynthesis. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 25, p. 10962–10966, 2009.
- LIWARSKA-BIZUKOJC, E. et al. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. **Chemosphere**, v. 58, p. 1249–1253, 2005.
- LOHANI, A. et al. Nanotechnology-Based cosmeceuticals. **ISRN Dermatology**, p. 1–14, 22 maio 2014.
- LONAPPAN, L. et al. Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review. **Environment International**, v. 96, p. 127–138, 2016.
- MADHAV, S. et al. A review of textile industry: Wet processing, environmental impacts, and effluent treatment methods. **Environmental Quality Management**, v. 27, n. 3, p. 31–41, 2018.
- MAGALHÃES, D.; FERRÃO, A. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008.
- MANZO, S. et al. Toxic effects of ZnO nanoparticles towards marine algae. **Science of the Total Environment**, v. 445–446, p. 371–376, 2013.
- MARIANI, L. et al. The Use of a Test Battery in Marine Ecotoxicology : The Acute Toxicity of Sodium Dodecyl Sulfate. p. 373–379, 2006.
- MARKINA, Z. V. Effects of sodium dodecyl sulfate on the growth dynamics and physiological state of the microalga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). **Russian Journal of Marine Biology**, v. 36, n. 3, p. 191–194, 2010.
- MARSH, K.; BUGUSU, B. Food packaging - Roles, materials, and environmental issues: Scientific status summary. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 3, 2007.
- MELEGARI, S. P. et al. Can the surface modification and/or morphology affect the ecotoxicity of zinc oxide nanomaterials? **Chemosphere**, v. 224, p. 237–246, 2019.
- MESSINA, C. et al. Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on stress response in the Mediterranean mussel (*Mytilus Galloprovincialis*): Regulatory volume decrease (Rvd) and modulation of biochemical markers related to oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 157, p. 94–100, 2014.

MIAO, A.-J. et al. Zinc oxide-engineered nanoparticles: dissolution and toxicity to marine phytoplankton. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 12, p. 2814–2822, 2010.

MILLER, R. J. et al. Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 19, p. 7329–7334, 2010.

MITRU, D. et al. Removal and effects of surfactants in activated sludge system. **Revista de Chimie**, v. 71, n. 1, p. 100–106, 2020.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 2017.

MUDUNKOTUWA, I. A. et al. Dissolution of ZnO nanoparticles at circumneutral pH: A study of size effects in the presence and absence of citric acid. **Langmuir**, v. 28, n. 1, p. 396–403, 2012.

NAKAMA, Y. Surfactants. In: **Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 231–244.

NCBI, N. C. FOR B. I. Diclofenac. In: **LiverTox: Clinical and Research Information on DrugInduced Liver Injury [Internet]**. [s.l.: s.n.]. p. 1–22.

NEWSWIRE, G. **Insights on the sodium lauryl sulfate global market to 2027Focus on Surfactants**. [s.l.: s.n.].

NG, L. Y. et al. Polymeric membranes incorporated with metal/metal oxide nanoparticles: A comprehensive review. **Desalination**, v. 308, p. 15–33, 2013.

NIPPER, M. et al. Development of Marine Toxicity Data for Ordnance Compounds. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, p. 308–318, 2001.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, p. 5–22, 2007.

PAJE, M. L. F. et al. Inhibition of lotic biofilms by Diclofenac. **Microbiol Biotechnology**, v. 59, p. 488–492, 2002.

PALMER, M.; HATLEY, H. The role of surfactants in wastewater treatment: impact, removal

and future techniques: A critical review. **Water Research**, 2018.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, F. W. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.

PAVLAKI, M. D. et al. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 99–110, 2011.

PAVLIĆ, Ž.; VIDAKOVIĆ-CIFREK, Ž.; PUNTARIĆ, D. Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1061–1068, 2005.

PICCINNO, F. et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. **Journal Nanopart Res**, v. 14, p. 11, 2012.

QUINTANA, J. B.; WEISS, S.; REEMTSMA, T. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. **Water Research**, v. 39, p. 2654–2664, 2005.

RODEA-PALOMARES, I. et al. Additivity and Interactions in Ecotoxicity of Pollutant Mixtures: Some Patterns, Conclusions, and Open Questions. **Toxics 2015, Vol. 3, Pages 342-369**, v. 3, n. 4, p. 342–369, 25 set. 2015.

SAMAELE, N.; AMORNPITOKSUK, P.; SUWANBOON, S. Effect of pH on the morphology and optical properties of modified ZnO particles by SDS via a precipitation method. **Powder Technology**, v. 203, n. 2, p. 243–247, 2010.

SAXENA, P.; HARISH. Toxicity assessment of ZnO nanoparticles to freshwater microalgae *Coelastrella terrestris*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 26991–27001, 2019.

SCHMIDT, W. et al. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 7, p. 1389–1395, 2011.

SINGER, M. M.; TJEERDEMA, R. S. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 133, p. 95–149, 1993.

SIRELKHATIM, A. et al. **Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism** *Nano-Micro Letters* SpringerOpen, , 19 abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30464967/>>. Acesso em: 13 mar. 2021

SONG, W. et al. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 199, n. 3, p. 389–397, 2010.

SRIVASTAVA, V.; GUSAIN, D.; SHARMA, Y. C. Synthesis, characterization and application of zinc oxide nanoparticles (n-ZnO). **Ceramics International**, v. 39, n. 8, p. 9803–9808, 2013.

STIBLER, U. et al. Toxicity of surfactants sodium dodecyl sulphate and triton x-100 to marine microorganisms. n. April, 2020.

STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135–141, 1999.

TOGOLA, A.; BUDZINSKI, H. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, n. 1, p. 150–158, 2008.

UE. **Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão, de 20 de março de 2015.** *Jornal Oficial da União Europeia*, 2015.

UE, U. E. **Diretiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho.**, 2008. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=celex%3A32008L0105>>

VAZ, V. P. **Avaliação da interação toxicológica de misturas: nanoplastico de poliestireno e Hormônio 17a-Etinilestradiol.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.

VÁZQUEZ, M. et al. Potential Impact of Biodegradable Surfactants on. **Processes**, v. 8, n. 1640, p. 1–16, 2020.

VIEW, G. **Zinc Oxide market size, share & trends analysis report by application (rubber, paints & coatings, chemicals, ceramics), by process (wet chemical, direct, indirect), by region, and segment forecasts, 2022 - 2030**, 2022.

VINODGOPAL, K. et al. Sonochemically prepared Platinum-Ruthenium bimetallic nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 9, p. 3849–3852, 2006.

VISHALI, S. et al. Studies on kinetics and settling behavior of flocs formed using a sustainable

coagulant in sewage water treatment. **Desalination and Water Treatment**, v. 169, p. 72–81, 2019.

WANG, Z.; VIJVER, M. G.; PEIJNENBURG, W. J. G. M. Multiscale coupling strategy for nano ecotoxicology prediction. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 14, p. 7598–7600, 2018.

WEISSMANNOVÁ, H. et al. Toxicity of Diclofenac: Cadmium Binary Mixtures to Algae *Desmodesmus subspicatus* Using Normalization Method. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 2018 **101:2**, v. 101, n. 2, p. 205–213, 4 jul. 2018.

WOŁOWICZ, A.; STASZAK, K. Study of surface properties of aqueous solutions of sodium dodecyl sulfate in the presence of hydrochloric acid and heavy metal ions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 299, 2019.

WONG, S. W. Y. et al. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms : influences of aggregate size and ion solubility. **Anal Bioanal Chem**, v. 396, p. 609–618, 2010.

WWAP, W. W. A. P. Relatório Mundial das Nações Unidas sobre Desenvolvimento dos Recursos hídricos 2017 - Resumo Executivo. **Un Water**, p. 1–12, 2017.

YADAV, V. K. et al. Nanobioremediation: A sustainable approach towards the degradation of sodium dodecyl sulfate in the environment and simulated conditions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 3–4, p. 348–360, 2021.

YUNG, M. M. N. et al. Physicochemical characteristics and toxicity of surface-modified zinc oxide nanoparticles to freshwater and marine microalgae. **Scientific Reports**, v. 7, n. 15909, p. 1–14, 2017.

ZHANG, Y.; GEISSEN, S.; GAL, C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. **Chemosphere**, v. 73, n. 8, p. 1151–1161, 2008.

ZWIENER, C.; FRIMMEL, F. H. Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. **Water Research**, v. 34, n. 6, p. 1881–1885, 2000.