



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

DRIKA DANIELI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA DOS CONTAMINANTES
EMERGENTES DICLOFENACO RESINATO E PARACETAMOL FRENTE AO
ORGANISMO-TESTE MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*:
ESTUDO PRELIMINAR**

ERECHIM

2022

DRIKA DANIELI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA DOS CONTAMINANTES
EMERGENTES DICLOFENACO RESINATO E PARACETAMOL FRENTE AO
ORGANISMO-TESTE MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*:
ESTUDO PRELIMINAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado na
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane Funghetto Fuzinatto

Coorientador: Prof. Dr. Liérson Borges de Castro

ERECHIM

2022

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Danieli, Drika

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA DOS CONTAMINANTES EMERGENTES DICLOFENACO RESINATO E PARACETAMOL FRENTE AO ORGANISMO-TESTE MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*: ESTUDO PRELIMINAR / Drika Danieli. -- 2022. 45 f.:il.

Orientador: Doutora em Engenharia Ambiental
Cristiane Funghetto Fuzinatto

Co-orientador: Doutorado em Química Liérson Borges de Castro

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária, Erechim, RS, 2022.

1. fármacos; concentração efetiva; qualidade de água; toxicologia.. I. Fuzinatto, Cristiane Funghetto, orient. II. Castro, Liérson Borges de, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

DRIKA DANIELI

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA DOS CONTAMINANTES
EMERGENTES DICLOFENACO RESINATO E PARACETAMOL FRENTE AO
ORGANISMO-TESTE MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*:
ESTUDO PRELIMINAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de grau de
Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da
Universidade Federal da Fronteira Sul.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 29/03/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cristiane Funghetto Fuzinatto

UFFS – Erechim/RS



Prof. Dr. Liérson Borges de Castro

UFFS – Erechim/RS



Prof^a. Dr^a. Gean Delise Leal Pasquali

UFFS – Erechim/RS



Prof^a. Dr^a. Helen Treichel

UFFS – Erechim/RS

Para Méri e Fumaça, dedico.

AGRADECIMENTOS

Escrevi este trabalho e me dediquei a ele arduamente, mas isso seria impossível sem apoio da minha família de sangue ou não. Nenhuma vitória é alcançada sozinha.

Começo agradecendo a minha mãe Méri, que nunca soltou minha mão nesses 24 anos de existência. Minha base e fortaleza. Me faltam palavras para agradecer, elas são limitantes para o tanto que sinto. Uma vida só é pouco para retribuir. Obrigada, infinitamente!

Ao meu avô Pedro (*in memoriam*), ainda hoje depois de tanto tempo de sua morte é difícil falar dele. Obrigado pela nossa conexão que transcende esse mundo, por me acalmar pelos sonhos e me proteger.

Aos meus avós Angelina (*in memoriam*) e Valdomiro. Tenho tantas lembranças maravilhosas, formadoras de caráter e da linguagem do amor com os dois. Minha infância jamais seria a mesma e eu seria diferente se meus avós paternos não tivessem participado tão ativamente de minha vida.

A minha família, os Murari são ruim! Valeu por tudo e a todos.

Ao Fumaça, meu gatinho que chegou no final de 2020 e me adotou. Meu companheirinho e um dos melhores presentes que a vida me deu.

Aos amigos que fiz nessa caminhada dentro da universidade. Meu deus... Vocês foram imprescindíveis e decisivos em inúmeros momentos. Quanto choro, conversas, cafés, lanchinhos, muita risada e momentos memoráveis. O fardo fica menor quando dividido. Muito obrigada a todos, aos primeiros Caroline, Giovanna e Vilson (meu trio!) e aos que vieram com o tempo Taís, Luana e Dani (minha companheira de laboratório!! Obrigada por todo o apoio) e também a Hevelin, Júlia, Inete e Jordana.

Ao Leonardo, afinal são mais de 8 anos e tantas fases diferentes de cada um vividas. É lindo ver alguém crescendo junto. Obrigada por todo companheirismo e caronas.

A minha orientadora, que mesmo enfrentando tantas adversidades da vida e inúmeros compromissos entre as aulas e a coordenação, acreditou em mim e nesse trabalho, muito obrigada, você é uma mulher e profissional inspiradora. Ao meu coorientador, professor que admiro desde o primeiro contato, obrigada por ser metódico e me direcionar tão bem nesta caminhada.

A toda estrutura da Universidade Federal da Fronteira Sul em Erechim, técnicos, servidores, mestres e colegas. Entrar na universidade foi um divisor de águas em minha vida, um ciclo que encerro com muito orgulho de dizer que sou “cria da UFFS”. Universidade gratuita e de qualidade.

“Só existe uma maneira de se viver para sempre irmão
Que é compartilhando a sabedoria adquirida
E exercitando a gratidão, sempre
É o homem entender que ele é parte do todo
É sobre isso que o manifesto fala
Nem ser menos e nem ser mais, ser parte da natureza, certo
Ao caminhar na contramão disso, a gente caminha
Para nossa própria destruição”

(FRESNO, 2014)

RESUMO

Os contaminantes emergentes são formados por um grupo extenso de substâncias químicas que em sua maioria não possuem valores máximos permitidos em legislações, mas com potencial de acarretar efeitos adversos no meio que se inserem. Os fármacos estão cada vez mais presentes no ecossistema aquático, em doses cumulativas que denotam preocupação com toxicidade crônica de organismos. As microalgas na avaliação da toxicidade aquática trazem respostas de contaminação e qualidade da água. Às vistas deste fato, este trabalho utilizou a microalga *Desmodesmus subspicatus* como espécie bioindicadora e avaliou a exposição a soluções orais de diclofenaco resinato e paracetamol por meio de toxicidade crônica. O cultivo da *D. subspicatus* foi realizado em meio CHU e a curva representativa da calibração foi gerada através da combinação de metodologias: contagem de células em câmara de Neubauer e método espectrofotométrico no comprimento de onda 682 nm. O teste de sensibilidade frente ao dicromato de potássio, realizado para atestar a qualidade do lote algal, alcançou concentração efetiva compreendida entre os valores fixados na literatura. Nos testes crônicos, para diclofenaco resinato as concentrações médias efetivas foram $181,06 \pm 11,1 \text{ mg. L}^{-1}$ e $31,47 \pm 6,5 \text{ mg. L}^{-1}$ para paracetamol. Perante classificações consolidadas mundialmente, o diclofenaco resinato não atinge valores para ser considerado com alta toxicidade, já a concentração de paracetamol é considerada como perigosa ao ambiente aquático. A avaliação das substâncias foi feita de forma isolada, enfatiza-se que ambientalmente outros compostos podem perturbar o sistema aquático potencializando efeitos tóxicos e sinérgicos.

Palavras-chave: fármacos; concentração efetiva; qualidade de água; toxicologia.

ABSTRACT

Emerging contaminants are formed by an extensive group of chemical substances that mostly do not have maximum values allowed in legislation, but with the potential to cause adverse effects in the environment in which they are present. Pharmaceuticals are increasingly present in the aquatic ecosystem, in cumulative doses that denote concern about chronic toxicity of organisms. Microalgae in the aquatic toxicity evaluation bring answers about contamination and water quality. Because of this fact, this work used the microalgae *Desmodesmus subspicatus* as a bioindicator specie and evaluated the exposure to oral solutions of diclofenac resinate and paracetamol through chronic toxicity. The *D. subspicatus* cultivation was performed in CHU medium and the representative calibration curve was generated through a combination of methodologies: cell counting in a Neubauer chamber and spectrophotometric method at a wavelength of 682 nm. The sensitivity test with potassium dichromate, performed to attest the algal batch quality, reached an effective concentration between the values established in the literature. In the chronic tests, for diclofenac resinate the effective mean concentrations were $181.06 \pm 11.1 \text{ mg. L}^{-1}$ and $31.47 \pm 6.5 \text{ mg. L}^{-1}$ for paracetamol. In the face of worldwide consolidated classifications, diclofenac resinate does not reach values to be considered as highly toxic, on the other hand the concentration of paracetamol is considered dangerous to the aquatic environment. The evaluation of the substances was done in isolation, but it is noteworthy that environmentally other compounds can disturb the aquatic system, potentiating toxic and synergistic effects.

Keywords: pharmaceuticals; effective concentration; water quality; toxicology.

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 13 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 4. METODOLOGIA | 17 |
| 4.1 CULTIVO..... | 18 |
| 4.2 CONTAGEM DE CÉLULAS E CURVA DE CALIBRAÇÃO | 19 |
| 4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE..... | 21 |
| 4.4 SELEÇÃO DE FÁRMACOS E DILUIÇÃO | 24 |
| 4.5 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA..... | 24 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 26 |
| 5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO..... | 26 |
| 5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE..... | 27 |
| 5.3 TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA | 28 |
| 5.3.1 Toxicidade Crônica para o diclofenaco resinato..... | 28 |
| 5.3.2 Toxicidade Crônica para o paracetamol..... | 31 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 33 |
| 7. RECOMENDAÇÕES | 34 |
| REFERÊNCIAS | 36 |
| ANEXOS | 44 |

1 INTRODUÇÃO

Formados por um grupo extenso de substâncias, os contaminantes emergentes são encontrados nos mais diversos produtos consumidos na sociedade: de produtos de limpeza, higiene pessoal, produtos farmacêuticos, embalagens até agrotóxicos e afins (BARCELÓ, 2003; MAIA, 2020). Está também atrelado a aqueles compostos que não são estabelecidos valores máximos permitidos em legislações e normativas.

Estudos nos anos 70 iniciam a discussão sobre a presença dos compostos farmacêuticos no ambiente aquático e, a partir deste momento, em várias partes do mundo, houve interesse científico focado no tema com fins de conscientização pública (TABAK; BRUNCH, 1970; NORPOTH et al., 1973; GARRISON, 1977; HIGNITE; AZARNOFF, 1977). Na década de 90, as substâncias de origem farmacêutica e seus destinos no meio ambiente puderam experimentar um crescimento e maior relevância constatado, as discussões cresceram notoriamente, apesar de seu consumo ter englobado um período de tempo maior. O aprimoramento de técnicas de detecção e equipamentos foi ampliado ao longo dos anos com os avanços da tecnologia, sendo assim, conseqüentemente, a identificação dos fármacos de uso humano e veterinário marcam cada vez mais os corpos hídricos (SAUVÉ; DESROSIERS, 2014).

Assegurar as características físico-químicas da água se torna essencial, pois ela é imprescindível para os seres vivos que cumprem suas funções biológicas e nela habitam (ALEXANDER; FAIRBRIDGE, 1999). A preocupação com os parâmetros da qualidade da água se tornaram maiores e vão além, visto que a água, mesmo depois de tratada, pode conter os contaminantes emergentes (PAL et al., 2014; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). Nas últimas décadas, a comunidade científica tem chamado a atenção para a presença no meio ambiente de uma variedade de compostos emergentes e em escalas de concentrações cada vez menores (OVALLE; VIVAS, 2021).

Os contaminantes orgânicos são usualmente encontrados em concentrações próximas a escalas de nanograma por litro (ng. L^{-1} , escala de 10^{-9}) e micrograma por litro ($\mu\text{g. L}^{-1}$, escala de 10^{-6}). Em suas classificações salientam-se produtos farmacêuticos, drogas não prescritas, pesticidas, hormônios sintéticos, cosméticos e nanopartículas (LI et al., 2014; PAL et al., 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), destaca que os países apresentam baixa adesão a sistemas de monitoramento de fármacos na água devido ao custo elevado das tecnologias e métodos analíticos com infraestrutura laboratorial robusta. Ademais, os métodos de tratamento convencionais não promovem a remoção de forma eficaz. Os levantamentos das

ocorrências de fármacos encontrados devem-se a esforços científicos com objetivos acadêmicos, a fim de investigar a detecção e análise (ARAGÃO, 2018).

Os fármacos classificados como Medicamentos Isentos de Prescrição (MIP) e Antiinflamatórios Não Esteroidais (AINE), abrangem os dois objetos de estudos: diclofenaco resinato e paracetamol. O diclofenaco possui ação antitérmica, analgésica e antiinflamatória, enquanto o paracetamol atua como analgésico e antitérmico (BRASIL, 2003). Comercialmente constituem medicamentos de livre de prescrição, portanto a aquisição é facilitada e conseqüentemente de amplo uso (BRASIL, 2019).

A necessidade de monitorar estes contaminantes emergentes no ambiente aquático e seus efeitos pode ser sanada por testes toxicológicos e bioindicadores representativos dos níveis tróficos. Estes testes toxicológicos com organismos aquáticos são empregados como mecanismos para o controle ambiental, sendo úteis para detectar lançamentos tóxicos e estruturar as prioridades de direção em caso de áreas críticas, viabilizando ações de cunho legislativo (ARRAES; LONGHIN, 2012). Com seu auxílio consegue-se delimitar os impactos relacionados a influência dos compostos químicos, sua interação e toxicidade (BRENTANO, 2010; BOHRER, 1995).

Conforme Limberger (2011), as microalgas constituem papel fundamental acerca de estudos envolvendo a toxicidade aquática, sendo uma importante classe de bioindicadores de contaminação, visto que alterações de cunho qualitativo ou quantitativo nesses organismos são diretamente correlacionadas a alterações na qualidade da água.

As microalgas do gênero *Desmodesmus* são encontradas predominantemente em ambientes de água doce e em menor escala na água salgada, sendo denominadas por microrganismos clorofilados e unicelulares, integrantes da família Scenedesmaceae (CAMBRA SÁNCHEZ et al., 1998). Os estudos e pesquisas que correlacionam esse gênero de microalga estão associadas principalmente a áreas como biologia molecular, biocombustíveis e toxicologia (VOLKER et al., 2017).

A alga verde planctônica denominada *D. subspicatus* é uma importante produtora primária nos ecossistemas de água doce. Desempenha um papel chave na base do ciclo de vida das águas, visto que serve de alimento para outros organismos e é função de subsistência do equilíbrio aquático a partir dos ciclos biogeoquímicos (KNIE; LOPES, 2004).

À vista do exposto, este trabalho busca complementar lacunas acerca da exposição aos contaminantes emergentes diclofenaco resinato e paracetamol através da microalga *Desmodesmus subspicatus* como espécie bioindicadora, avaliando suas toxicidades crônicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os efeitos de toxicidade dos contaminantes emergentes diclofenaco resinato e paracetamol para a microalga dulcícola *Desmodesmus subspicatus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* em meio CHU;
- Verificar a sensibilidade da *D. subspicatus* frente a substância de referência: dicromato de potássio;
- Avaliar os efeitos de toxicidade crônica para a microalga *D. subspicatus* após exposição a diferentes concentrações do fármaco diclofenaco resinato;
- Verificar toxicidade crônica de diferentes concentrações do fármaco paracetamol para a microalga *D. subspicatus*;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O crescimento no consumo de fármacos está alinhado ao crescimento populacional, quanto mais indivíduos, maior se torna a margem e a necessidade de utilização de medicamentos frente a doenças. Este crescimento exponencial de consumo é liderado principalmente nas classes medicamentosas que não necessitam de prescrição, como os Medicamentos Isentos de Prescrição Médica (MIP's) (BISOGNIN; WOLFF; CARISSIMI, 2018). Os fármacos categorizados como Antiinflamatórios não Esteroidais (AINE) também possuem forte atuação em indicações terapêuticas para alívio de dores e inflamações (KO; ALBUQUERQUE, 2018).

O diclofenaco resinato pertence à classe terapêutica de anti reumáticos não esteroidais puros, utilizado para tratar dores e inflamações e sua ação antiinflamatória é conhecida desde 1974. O diclofenaco consegue ser totalmente absorvido a partir da suspensão de resinato, com percentual de aproximadamente 60% de excreção da dose administrada através do conjugado glicurônico da molécula intacta e seus metabólitos, sendo esses que acumulam-se em organismos aquáticos (PEAKE et al., 2016). Caracteriza-se por ser um dos princípios ativos mais comercializados no Brasil, o que se deve ao leque de aplicações do medicamento que podem abranger tratamentos pós-operatórios até mesmo tratamentos pós-traumáticos de dores (ROCHA et al., 2009).

O paracetamol é classificado como um Medicamento Isento de Prescrição (MIP), indicado para o tratamento de febre e para o alívio de dores de intensidade leve a moderada (CAETANO, 2005). O fármaco apresenta melhor tolerabilidade digestiva em relação aos anti-inflamatórios não esteroides, além disso, o baixo custo torna-o um dos fármacos mais consumidos no mundo (SENA et al., 2007; WANNMACHER, 2010). O reconhecimento como pseudo-persistente atrelada ao contaminante faz jus aos dados acerca de ser comumente prescrito e consumido (KÜMMERER, 2009).

Em panorama geral, o brasileiro está entre um dos países que apresenta maior consumo de produtos farmacêuticos, o estudo de Campanha et al., (2015) relata que o consumo médio anual per capita estimado é de 15 gramas, índice que na média ultrapassa em três a dez vezes o consumo de países industrializados (BISOGNIN; WOLFF; CARISSIMI, 2018).

Miranda et al. (2018) avaliou por meio de um estudo em cidades do estado de São Paulo que 90% da população amostral consumia algum medicamento de forma contínua, sendo os anti-inflamatórios correlacionados com 53% da classe de consumo.

Os contaminantes emergentes estão em comunicação com os componentes da água natural, água superficial e subterrâneas, sinalizando potenciais riscos para os seres humanos, vida aquática e terrestre. Os produtos farmacêuticos são combinados nos sistemas de esgoto com fezes, urina, águas de uso doméstico, para formação das águas residuais brutas. Ainda, pode-se ressaltar outra potencial fonte de contaminação vinda dos resíduos de indústrias e empresas farmacêuticas e de saúde (BILA; DEZOTTI, 2003; DEO; HALDEN, 2013).

Para a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), na categoria de produtos medicinais, os valores abaixo de 10 ng.L^{-1} possuem margem de risco ambiental pouco provável, já valores maiores impõe-se análises sobre seus efeitos toxicológicos no meio natural (CASTIGLIONI et al., 2004; RIGOBELLO, 2012). No estudo de Muller (2002), a proposta de limites toxicológicos em águas de consumo humano para os fármacos diclofenaco e paracetamol foi de, respectivamente, $7,5$ e $150 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$.

Os autores Heberer (2002) e Stumpf et al. (1999) atestaram que as concentrações dos fármacos variam sazonalmente, em virtude da maior prescrição de anti-inflamatórios no inverno. Além disso, Nunes et al. (2017) cita através de análises que existe interferência na presença e concentração desses produtos por meio da diluição ocasionada pelas chuvas, períodos de seca e padrões de uso doméstico da água, diária e sazonalmente.

Richardson e Bowron (1985) citam os destinos possíveis para fármacos, que compreendem (i) biodegradação pela mineralização referente a gás carbônico e água; (ii) processos metabólicos e degradação parcial; (iii) agir como persistente. Contribuem ainda para

a dispersão desses contaminantes orgânicos o escoamento superficial, vazamentos encontrados em fossas sépticas e até mesmo aterros sanitários (FAIRBAIRN et al., 2016).

Pautando as discussões a nível brasileiro, levantamentos liderados pelo Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), entre 2010 e 2020, mostraram que os níveis de cobertura da população entre água e esgoto sofreram aumento nos últimos 10 anos analisados. Em contrapartida, para um país continental como o Brasil, com aproximadamente 211,8 milhões de habitantes, o aumento de 3% (de 81,1% em 2010 para 84,1% em 2020) em atendimento com rede de água e do patamar de 46,2% para 55% para atendimento com rede de esgoto cumpre um papel pouco louvável.

O déficit na infraestrutura disposta para o saneamento básico contribui ativamente para que a principal rota possível dos fármacos no meio ambiente seja o despejo de esgoto em corpos hídricos. Em 2020, somente 50,8% do esgoto gerado passa pela etapa de tratamento no Brasil (SNIS, 2021). Kramer et al. (2015) remete que de modo geral, contaminações com medicamentos são verificadas pelo consumo, mas especialmente pelo despejo de efluentes sem tratamento ou tratados de forma ineficaz sobre as águas.

A tendência se confirma com a detecção de diclofenaco e paracetamol (fármaco de maior uso mundialmente) e outros de origem farmacêutica em efluentes de estações de tratamento, águas tratadas, águas superficiais e águas subterrâneas no território brasileiro. Em estudos destacados, diclofenaco alcança valores de $0,193 \text{ mg.L}^{-1}$ em água superficial (VERAS et al., 2019), em lançamento de efluente tratado da ETE $0,458 \text{ mg.L}^{-1}$, esgoto bruto com $0,310 \text{ mg.L}^{-1}$ e efluente tratado $0,009 \text{ mg.L}^{-1}$ conforme Ragassi (2018).

Nos trabalhos de Américo et al. (2012) em coletas de esgoto bruto, Dias (2014) em água tratada e Stelato et al. (2016) em córregos, respectivamente o diclofenaco atingiu concentrações de $2,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, $38,09 \text{ ng.L}^{-1}$ e 11 mg.L^{-1} e o paracetamol $0,13 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, $421,64 \text{ ng.L}^{-1}$ e de 228 até 590 ng.L^{-1} .

Os métodos analíticos para detecção de fármacos em amostras ambientais mais empregados são derivados na extração em fase sólida, cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alta eficiência acopladas a espectroscopia de massa e detectores ultravioleta, com suas derivações (STUMPF et al., 1999; BILLA, DEZOTTI, 2003; NEBOT, GIBB BOYD, 2007; SODRÉ, MONTAGNER, JARDIM, 2007; SILVA, COLLINS, 2011; MENDONZA et al., 2015; BAENA-NOGUERAS et al., 2016; ZHOU et al., 2017). Para a descontaminação, os processos oxidativos como fotólise de peróxido de hidrogênio, ozonização, fotocatalise heterogênea, fenton e foto fenton são os mais utilizados como alternativas para o tratamento dos efluentes (MELO, 2009; DICK et al., 2021).

A detecção de fármacos em baixas concentrações vem sendo relatada por diversas décadas e em aspecto mundial na literatura disponível. A constância do reconhecimento de classes analgésicas e antiinflamatórios em ambientes aquáticos, faz surgir um alerta quanto a capacidade de ocasionar efeitos crônicos. A longo prazo, a acumulação das substâncias ocorre e pelo fato de serem biologicamente ativas existe a possibilidade de resultar em efeitos ecológicos relevantes. Independentemente das concentrações efetivas de exposição da microalga *D. subspicatus* aqui relatadas obedecerem a ordem de mg.L^{-1} para o diclofenaco resinato e paracetamol, a persistência entre os organismos aquáticos pode ir além de comprometer a qualidade da água mas também com potencial de mostrar-se desarmônica para estes ecossistemas.

Os compostos farmacêuticos são reportados em efluentes pela baixa capacidade em sua remoção através dos processos clássicos de tratamento, corroborando com o efeito de contaminação ambiental. Neste cenário, surgem tecnologias promissoras visando a obtenção de métodos eficientes para remoção, degradação e mineralização destas substâncias.

A espécie *D. subspicatus* foi avaliada no trabalho de Paiva et al. (2020) quanto a sua eficácia em remover nutrientes e matéria orgânica de uma ETE no Brasil. O efluente utilizado na pesquisa era coletado após os decantadores secundários. Encontrou-se índices altos na eficiência de remoção dos parâmetros Demanda Bioquímica de Oxigênio (DQO), nitrogênio de Kjeldahl total (NTK), nitrogênio amoniacal e fósforo, principalmente em metabolismo autotrófico. Constatou-se que a microalga pode ser empregada com fins de tratamento terciário de efluentes.

As microalgas como tratamento terciário também se mostraram eficazes no estudo de Dimas (2021), com alta remoção da amônia e desinfecção ocasionada pela fotossíntese, seu consumo de gás carbônico que leva ao aumento de pH e deriva em um ambiente hostil para sobrevivência de patógenos. O lado desfavorável do sistema foi retratado pela ineficiência da eliminação de sólidos suspensos totais (SST), onde a biomassa suspensa não decanta.

A revisão da literatura sobre a utilização de microalgas na descontaminação das águas, elaborada por Rossato, Oliveira e Sagrillo (2021), demonstrou que principalmente a espécie *Chlorella vulgaris* possui eficácia na remoção e é promissora para contaminação por compostos citotóxicos.

Quanto a fatores legislativos, ainda há um longo caminho de aprimoramento de políticas, programas de monitoramento e fiscalização dos contaminantes emergentes em aspecto mundial. Alguns países contam com um aparato de diretrizes para as concentrações de alguns compostos em água, mas em casos como o do Brasil, existe muito a avançar.

A legislação brasileira, quanto aos tópicos de interesse ambiental, é regida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) através do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Os padrões de lançamento de efluentes são regulados pela CONAMA 357/2005, sendo apresentados na resolução Valor Máximo Permitido (VMP) para um conjunto de substâncias orgânicas e inorgânicas (BRASIL, 2005). Entretanto, não existem previsões para fármacos.

A Agência Ambiental (EA) da Inglaterra e País de Gales adotou um mecanismo classificatório conforme o risco relativo, objetivando a identificação de substâncias com potencial de causar danos no ambiente aquático. O sistema contou com uma associação de parâmetros avaliativos como avaliação de risco, critérios de persistência, bioacumulação e toxicidade (PBT). Foi obtido como resposta 10 principais compostos: Lofepramina, Dextropropoxifeno, Prociclidina, Tramadol, Paracetamol, Clotrimazol, Tioridazina, Mebeverina, Aminofilina e Tamoxifeno (ASHTON; HILTON; THOMAS, 2004).

A União Europeia criou uma política que determina que empresas que fabricam substâncias químicas com volume maior de 1 tonelada por ano devem entender as dinâmicas de risco da utilização e agir para gerir riscos que reconhecerem, intitulada como REACH (“*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical Substances*”). Derivada do sistema REACH, surge a Diretiva Européia 93/97/EEC que possui classificação toxicológica para os organismos aquáticos (CORTEZ, 2011; SANTOS, 2012).

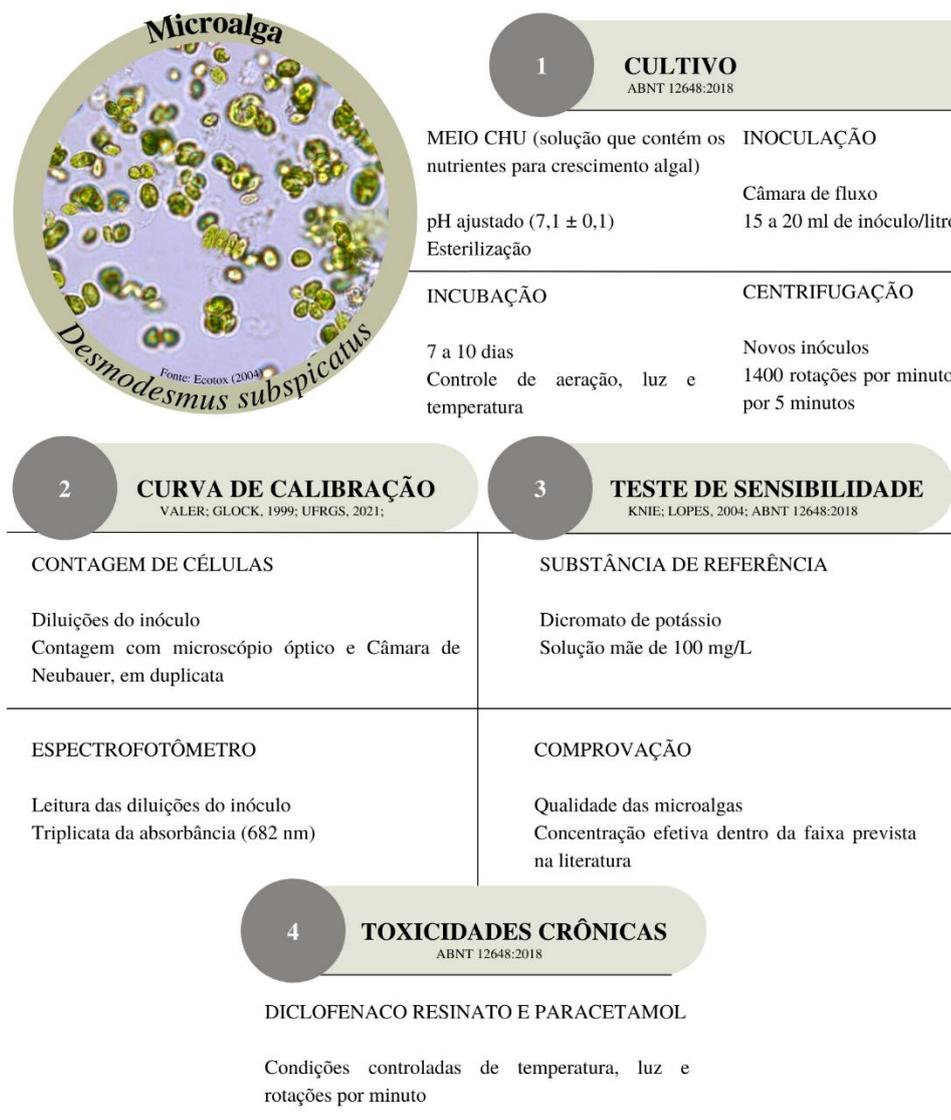
De forma semelhante, em 2002, a Comissão OSPAR, ligada a proteção do ambiente marinho do Atlântico Nordeste, classificou substâncias perigosas em uma lista, identificando contaminantes como: Lofepramina, Dextropropoxifeno, Prociclidina, Tramadol, Paracetamol, Clotrimazol, Tioridazinas, Mebeverine, Aminofilina, Tamoxifen, Fluoxetina, Trimetoprim, Sulfametoxazol, Fenofibrate e Diclofenaco (OSPAR COMMISSION, 2002).

4. METODOLOGIA

A metodologia proposta foi executada no Laboratório de Qualidade da Água, com auxílio de outros laboratórios que compreendem a estrutura e envolvem o curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, da Universidade da Fronteira Sul (UFFS) - Campus Erechim, RS.

A cultura inicial de microalgas para estabelecer o cultivo foi obtida na Universidade Federal de Santa Catarina e em todas as fases de desenvolvimento as diluições foram realizadas com a água do tipo água Mili-Q Ultrapura (equipamento Direct-Q® Water Purification System). O esquema apresentado na Figura 1 traça estratégia experimental utilizada durante o trabalho.

Figura 1 - Visão geral dos procedimentos experimentais que foram realizados.



Fonte: Autora (2022).

4.1 CULTIVO

O cultivo da microalga desenvolveu-se com o exposto na ABNT 12.648 (2018): Ecotoxicologia Aquática – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae) e mantido no Laboratório de Qualidade da Água.

O meio de cultivo é o meio CHU, que possui 10 soluções com reagentes homogeneizados em proporções pré estabelecidas que asseguram um ambiente saudável de desenvolvimento algal. Seus componentes estão descritos no Anexo 1, como também o preparo de 1 litro do meio, ordem e quantidades. O pH foi corrigido, quando necessário, para a faixa de $7,1 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl). Após sua preparação, o

meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos em kitassatos com capacidade de 1 litro.

A partir da esterilização do meio CHU e seu resfriamento até a temperatura ambiente, ocorreu a inoculação. Visando evitar contaminações, o procedimento transcorreu na câmara de fluxo laminar. Com a flambagem do tubo falcon contendo o inóculo homogeneizado e o bocal do kitassato, uma alíquota entre 15 ml de inóculo foi adicionada ao kitassato com o meio CHU já autoclavado. A câmara de fluxo permaneceu ligada somente com o fluxo ascendente e a luz fluorescente, já que a luz UV interfere sobre a microalga devido sua susceptibilidade à exposição da radiação emitida.

O cultivo (meio CHU juntamente com o inóculo), necessita de armazenamento em incubadora, em ambiente com temperatura, aeração e iluminação controlada conforme a norma ABNT 12.648 (2018), no período de 7 a 10 dias. Na Figura 2, é possível notar a diferença na coloração entre o primeiro dia do cultivo, nas condições controladas e após 7 dias, com coloração mais intensa, indicando o crescimento algal.

Figura 2 - Cultivo da microalga *D. subspicatus* em meio CHU e ambiente controlado.

Figura a) - Incubação, dia 1. Figura b) - Incubação, dia 7.



Fonte: Autora (2022).

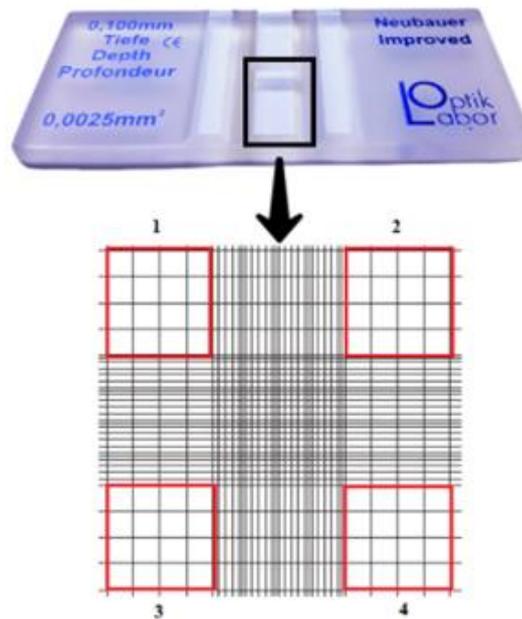
4.2 CONTAGEM DE CÉLULAS E CURVA DE CALIBRAÇÃO

A determinação da densidade celular foi realizada por meio da contagem das células com o auxílio da câmara de Neubauer e de microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

Para realização da contagem, é essencial entender sobre a densidade celular nos campos. Se a amostra analisada possuir uma alta densidade celular, a contagem será feita através dos

quadrados médios da região central. Caso a amostra apresente baixa densidade celular, a área de contagem compreenderá os quadrantes maiores (CARNEIRO, 2017). Na Figura 3 é possível observar a Câmara de Neubauer com área de contagem identificada em preto e em vermelho os 4 quadrantes em que se realizou a contagem de células.

Figura 3 - Detalhamento da Câmara de Neubauer empregada na metodologia e seus quadrantes.



Fonte: Adaptado de SPLabor (2016).

Realizou-se 11 diluições sequenciais, a fim de identificar a concentração algácea por mililitro das amostras. A metodologia seguida para a contagem com adaptações é disposta pelo Laboratório de Virologia (LabVir) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, 2021). O procedimento foi realizado através da pipetagem de uma alíquota de cada diluição na câmara de Neubauer, a contagem ocorreu por quadrantes, com orientação da esquerda para a direita, em ziguezague, de cima para baixo. As células contidas sobre as linhas inferiores e direita não foram contabilizadas.

Posteriormente, realiza-se a leitura de absorbância com auxílio do espectrofotômetro (Nova Instruments NI 1800 UV), praticadas nos comprimentos de onda em que ocorre o pico de absorbância (682 nm). A contagem das células pela câmera de Neubauer e as medidas de absorbância da suspensão microalgal foram relacionadas, gerando uma curva de calibração de densidade celular. A densidade ótica por meio da técnica espectrofotométrica, durante todo este trabalho, foi fixada no comprimento de onda de 682 nm e para calibrar o equipamento utilizou-se água de diluição (branco).

Então, para obtenção da curva de calibração que estima a densidade algácea correlacionando com os valores de absorvância e número de células advindo da contagem na câmara de Neubauer, o modelo empírico para a equação de regressão com coeficiente de determinação melhor delineado está descrito na Equação 1:

$$y = ax + b \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

- y = valor da leitura da absorvância;
- a, b = parâmetros da função da equação da reta;
- x = incógnita que determina o número de células;

4.3 TESTE DE SENSIBILIDADE

O teste de sensibilidade foi empregado para verificar as influências externas e suas condições de vida no laboratório para o organismo testado. A sensibilidade é o reflexo de todo o conjunto de procedimentos relativos ao cultivo da microalga indicando a estabilidade da microalga *D. subspicatus*, garantindo, assim, a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados dos testes ecotoxicológicos (KNIE; LOPES, 2004).

As concentrações para o teste de sensibilidade são fixadas de acordo com o valor de CE50, para 72 horas ($0,53 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$), que corresponde a concentração que consegue oferecer 50% de inibição do crescimento algal (KNIE; LOPES, 2004).

O ensaio de sensibilidade utiliza uma substância de referência, neste caso, o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ com concentração de 100 mg.L^{-1}), abarcada na ABNT 12.648 (ABNT, 2018). Os erlenmeyers foram alocados no equipamento Incubadora Shaker Refrigerada, marca Solab SL – 223, configurado com agitação de 135 rpm, temperatura controlada de $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e iluminação ininterrupta por 72 horas. Em cada período de 18 a 24 horas até completar as 72 horas do teste realiza-se a troca de posição de cada erlenmeyer a fim de evitar quaisquer oscilações da incidência de luz.

Na Tabela 1 estão organizados os respectivos valores e soluções para o volume final em cada erlenmeyer. Para completar 100 mL ocorreu a adição de água de diluição. Os componentes da solução nutriente estão discriminados no Anexo 2.

Tabela 1 – Soluções e volumes empregados no teste de sensibilidade com dicromato de potássio frente a microalga *D. subspicatus*.

| K ₂ Cr ₂ O ₇ (mg. L ⁻¹) | K ₂ Cr ₂ O ₇ (μL) | Solução nutriente (mL) | Inóculo (10 ⁵ células.mL ⁻¹) | Volume final (mL) |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------|
| Controle | 0 | 10 | 10 | 100 |
| 0,1 | 80 | 10 | 10 | 100 |
| 0,3 | 240 | 10 | 10 | 100 |
| 0,5 | 400 | 10 | 10 | 100 |
| 0,7 | 560 | 10 | 10 | 100 |
| 0,9 | 720 | 10 | 10 | 100 |

Fonte: Autora (2022).

Para o preparo do inóculo teste, foi necessário incubar uma pré cultura por 3 dias. O preparo da pré cultura aconteceu através do inóculo armazenado em tubo Falcon e diluição com meio CHU para atingir 10⁴ células por cada mililitro. A Equação 2 descreve o procedimento do cálculo realizado para retirar a alíquota correspondente e iniciar a pré-cultura. Nela, temos que a incógnita $V_{inóculo}$ representa o volume de inóculo que será retirado da cultura estoque em ml; C_i é a concentração inicial da pré cultura e expressa em células por mL (10.000); V_{pc} é o volume da pré cultura e está interligado com o volume do frasco a ser utilizado (250 mL) e; $C_{estoque}$ sendo a concentração de algas da cultura estoque em células por mililitros.

$$V_{inóculo} = \frac{C_i \times V_{pc}}{C_{estoque}} \quad (\text{Equação 2})$$

A alíquota calculada pelo $V_{inóculo}$, na Equação 2 é adicionada a 75 mg de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e completada com a solução da pré cultura para um volume de 250 mL (Anexo 2). Após o processo descrito, a pré cultura fica incubada com temperatura, aeração e luminosidade controladas por 3 dias, conforme a Figura 4.

Figura 4 - Pré cultura em fase de incubação em condições controladas pela norma ABNT 12.648/2018.



Fonte: Autora (2022).

Depois do período de 3 dias, uma alíquota do frasco é retirada para leitura da absorbância correlacionando através da equação da reta obtida o valor de células por mililitro e então calcula-se o volume necessário por meio da equação 3:

$$V_{\text{inóculo}} = \frac{C_{\text{it}} \times V_{\text{it}}}{C_{\text{pré cultura}}} \quad (\text{Equação 3})$$

Na equação 3, os valores de C_{it} que é a concentração inicial do inóculo teste é fixada em 100.000 células por mililitro, a V_{it} é atribuído 250 ml a partir da capacidade do frasco. Para obtenção do valor de $C_{\text{pré cultura}}$ utiliza-se a relação da equação da reta originando um novo número de células por mililitro. Então, alcança-se o volume que será retirado da pré-cultura depois dos 3 dias de incubação para compor o inóculo junto com o bicarbonato de sódio e o meio da pré cultura. Finalizada esta etapa, obtém-se a solução que engloba o inóculo e que adiciona-se ao teste de sensibilidade.

A partir de 5 concentrações distintas de dicromato de potássio o ensaio ocorreu em triplicata. Ao final, determina-se o pH, oxigênio dissolvido e biomassa. Os valores de absorbância obtidos são convertidos em número de células através da equação da reta gerada pela contagem de células e então organizadas no *software* GraphPad Prism® 6.0, resultando em um valor relacionado diretamente com a sensibilidade.

4.4 SELEÇÃO DE FÁRMACOS E DILUIÇÃO

A escolha dos fármacos que integraram a pesquisa foi baseada nos critérios de disponibilidade e preço comercial; o tempo disponível para os experimentos e análises de dados; possibilidade de reprodução de resultados inéditos; grande consumo no Brasil e mundo como também a presença marcada em águas residuárias e corpos d'água.

O diclofenaco resinato foi adquirido comercialmente, em forma de apresentação farmacêutica oral, sob registro da companhia farmacêutica Cimed Indústria Farmacêutica Ltda com 15 mg.mL⁻¹. A partir da concentração comercial gerou-se uma solução de 500 mg.L⁻¹, sendo esta utilizada para os testes de toxicidade crônica.

O paracetamol foi adquirido comercialmente, em forma de apresentação farmacêutica oral, sob registro da companhia farmacêutica União Química Farmacêutica Nacional S.A. com 200 mg.mL⁻¹. A partir da concentração comercial gerou-se uma solução de 1 g.L⁻¹, sendo esta utilizada para os testes de toxicidade crônica.

4.5 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA

O objetivo do ensaio para definir a toxicidade crônica que consiste na exposição de uma amostra de densidade algal conhecida a partir do meio CHU, com diferentes diluições por um intervalo de 72 horas em condições controladas (temperatura e luminosidade). A comparação entre a reprodução das algas nas diluições e o controle, onde não se realiza nenhuma adição de amostra, caracteriza o efeito. O teste de toxicidade é classificado como crônico, compreendendo múltiplas gerações dos organismos (KNIE; LOPES, 2004).

Os procedimentos realizados foram regidos pela ABNT 12.648 (2018) e OECD 201 (2011), conduzidos em triplicata. Com a análise estatística, que define a resposta crônica para o organismo-teste no intervalo de 72 horas, obtém-se o valor de concentração efetiva (CE₅₀). A toxicidade se dá por meio dos efeitos acerca da taxa de crescimento.

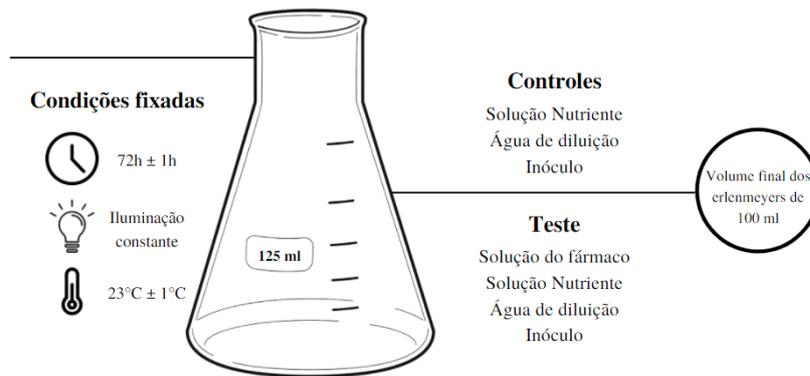
As concentrações delimitadas para os testes crônicos com os fármacos baseiam-se na literatura disponível, cada contaminante emergente foi testado em uma faixa com 5 concentrações e com diluições de fator 2.

Os testes de toxicidade crônica ao diclofenaco resinato para *D. subspicatus* foram montados a partir de cinco concentrações-teste, sendo elas: [14,06; 28,12; 56,25; 112,50; 225,00] mg.L⁻¹. Além disto, dois controles laboratoriais constituídos por água de diluição, solução nutriente e inóculo para cada teste.

Da mesma forma, os teste de toxicidade crônica para o paracetamol transcorreram com cinco concentrações-teste de: [15,62; 31,25; 62,50; 125,00; 250,00] mg.L⁻¹ e também com dois controles laboratoriais contendo água de diluição, solução nutriente e inóculo para cada teste.

A Figura 5 representa de forma ilustrativa um desenho experimental do teste realizado com o diclofenaco resinato e o paracetamol.

Figura 5 - Elementos importantes para a execução do teste crônico de toxicidade.



Fonte: Autora (2022).

Os erlenmeyers foram vedados com parafilm e acondicionados na mesa de agitação de forma aleatória (Figura 6), após acomodar os testes no equipamento, iniciou-se o teste crônico. Este processo foi repetido para ambos os fármacos.

Figura 6 - Disposição dos erlenmeyers na mesa de agitação durante o período do teste de toxicidade crônica com *D. subspicatus*.



Fonte: Autora (2022).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para construção da curva de calibração utilizou-se a Câmara de Neubauer, com a contagem dos quadrantes delimitados pela metodologia e as leituras de absorbância das amostras diluídas. Dessa forma, os dados contidos na Tabela 2 foram convertidos em uma equação de reta que representa de forma satisfatória o sistema.

Tabela 2 - Resultados a partir da Câmara de Neubauer e leitura no espectrofotômetro da série de diluições realizadas.

| Contagem dos quadrantes (média) | Absorbância (682 nm) | Número de células por mililitro |
|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| 1190 | 1.160 | 2975000 |
| 887 | 0.995 | 2217500 |
| 918 | 0.784 | 2295000 |
| 400 | 0.368 | 1000000 |
| 369 | 0.248 | 922500 |
| 234 | 0.191 | 585000 |
| 150 | 0.120 | 375000 |
| 112 | 0.077 | 280000 |
| 123 | 0.071 | 307500 |
| 102 | 0.059 | 255000 |

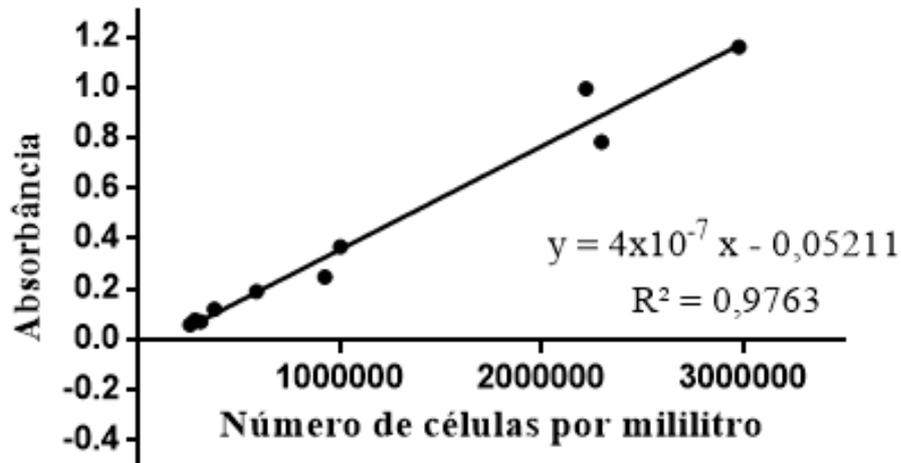
Fonte: Autora (2022).

Através dos resultados, utilizando o *software* GraphPad Prism® 6.0, a equação da reta foi delimitada e expressa pela Equação 4:

$$y = 4 \times 10^{-7}x - 0,05211 \quad (\text{Equação 4})$$

No caso deste trabalho, a curva padrão apresentada na Figura 7 corresponde a relação gráfica entre os valores de absorbância e de concentração, sendo a concentração dada pelo número de células da amostra por mililitro.

Figura 7 - Representação gráfica da curva de calibração, absorvância a 682 nm e número de células por mililitro advindo da contagem na câmara de Neubauer.



Fonte: Autora (2022).

Com a curva de calibração foi possível durante a execução experimental utilizar a equação da reta encontrada para relacionar os valores de absorvância (y) com os de concentração (x). Quanto ao coeficiente de determinação, considera-se um valor satisfatório e representativo de aproximadamente 97% da amostra.

A quantificação de algas clorofíceas utilizando espectrofotometria e contagem do número de células (expresso em número de células por mililitro) para acompanhamento de crescimento e concentração algal são considerados métodos eficientes de determinação e de baixo custo (DIN, 1989; ISO, 1989). A combinação de ambos, análise espectrofotométrica e contagem do número de células, assegura a precisão dos resultados (WONG; CHAU; PATEL, 1983).

Nota-se que, quanto mais alta for a concentração do organismo teste na suspensão analisada, maior também a quantidade de luz absorvida e também o valor convertido em absorvância. Espécies clorofíceas possuem pico de absorção de luz a um comprimento de onda em torno de 687 nm (VALER; GLOCK, 1999). Para a microalga selecionada neste estudo, *Desmodesmus subspicatus*, o pico de absorção de luz acontece em 685 nm, segundo Knie e Lopes (2004).

5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE

Ao todo, foram realizados três ensaios de sensibilidade para avaliar o lote de organismos e a aplicabilidade deles nos testes crônicos. A Tabela 3 apresenta os dados de cada teste, a

Concentração Efetiva (CE₅₀) e as análises estatísticas do valor médio e desvio padrão da amostra.

Tabela 3 - Teste de sensibilidade com dicromato de potássio como substância de referência e *D. subspicatus* como organismo teste.

| Testes | CE _{50,72h} |
|---------------|----------------------|
| 1 | 0,5367 |
| 2 | 0,3907 |
| 3 | 0,4095 |
| Média | 0,4456 |
| Desvio padrão | 0,0794 |

Fonte: Autora (2022).

O teste de sensibilidade, revelou um valor médio de CE_{50,72h} de $0,4456 \pm 0,09 \text{ mg.L}^{-1}$, concentração em que ocorre o efeito tóxico do dicromato de potássio para a *D. subspicatus* e representa a faixa de 50% da inibição do crescimento algal.

A CE₅₀ dos organismos para esta substância está compreendida em $0,53 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$, de acordo com os autores Knie e Lopes (2004). O teste de sensibilidade executado neste trabalho possui resultados dentro do intervalo fixado de concentrações citadas (CE₅₀ = $0,4456 \pm 0,09 \text{ mg.L}^{-1}$), apresentando desvio padrão de $0,07 \text{ mg.L}^{-1}$ e coeficiente de variação (CV) inferior a 25%, indicando uniformidade amostral. Após esta análise, garantiu-se a viabilidade do organismo teste nos ensaios e foi dado prosseguimento ao estudo da toxicidade crônica.

5.3 TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA

5.3.1 Toxicidade Crônica para o diclofenaco resinato

A avaliação da exposição crônica para o diclofenaco resinato e organismo teste *D. subspicatus*, resultou em valor médio de $181,06 \pm 11,1 \text{ mg.L}^{-1}$, os dados para cada teste, média e desvio padrão compõem a Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados obtidos de CE_{50} com o fármaco diclofenaco resinato para *D. subspicatus* nas concentrações testadas de [14,06; 28,12; 56,25; 112,50; 225,00] mg. L⁻¹.

| Testes | $CE_{50,72h}$ |
|---------------|---------------|
| 1 | 186,70 |
| 2 | 186,80 |
| 3 | 169,70 |
| Média | 181,06 |
| Desvio padrão | 9,84 |

Fonte: Autora, 2022.

O diclofenaco resinato, com valor médio de CE_{50} de $181,06 \pm 11,1$ mg. L⁻¹ pode ser considerado como uma concentração sem classificação para toxicidade conforme o disposto pela Diretiva 93/67/EEC da União Europeia.

A baixa sensibilidade da *D. subspicatus* pode ser atribuída a característica de menor adsorção imposta pela parede celular, visto que a microalga possui a quarta camada composta por esporopolenina, que é um polímero com ótima resistência a degradação (HEGEWALD et al., 2000; PAMPLONA NETO, 2017). A metabolização dos compostos também pode ser uma hipótese a ser avaliada, por meio dos processos bioquímicos e interações com o meio (FERRARI et al., 2003).

Os autores Buser, Poiger e Muller (1998) relatam que a fotodegradação do diclofenaco em um corpo de água alcança índices maiores que 90% e que a principal fonte de entrada no ambiente aquático se dá por meio de despejos orgânicos. Outro destaque importante, feito pelo estudo de Américo-Pinheiro et al., (2017) é que a temperatura apresenta-se como um agente fundamental na ocorrência do antiinflamatório na água, sendo inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a temperatura do corpo hídrico, menos presente será o fármaco nele.

O diclofenaco possui tendência a fixação no solo e no sedimento das matrizes aquosas por apresentar um valor alto de coeficiente de partição n-octanol-água (Kow de 4,51), indicando facilidade em ser hidrofóbico (FREITAS, 2021). Com essa característica, a afinidade e absorção pelo solo acarreta em menores concentrações em água, fato que não deixa de apresentar um alerta para sua ocorrência em demasia em outras matrizes ambientais.

A Tabela 5 possui informações relevantes quanto às concentrações efetivas de resposta para diferentes níveis tróficos relatados na literatura, cada bioindicador selecionado contempla um valor diferente de concentração. Os valores mensurados abaixo são respectivos ao fármaco

diclofenaco sódico, visto que as contribuições na literatura não abarcam o objeto de estudo que é o diclofenaco resinato.

Tabela 5 - Diferentes organismos teste frente a toxicidade do diclofenaco sódico.

| Diclofenaco sódico | | |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Organismo-teste | CE ₅₀ (mg. L ⁻¹) | Autor |
| <i>Alga - Desmodesmus subspicatus</i> | 72 | Cleuvers (2003) |
| <i>Alga - Desmodesmus communis</i> | 82,36 - 101,70 | Quintana (2019) |
| <i>Crustáceo - Ceriodaphnia silvestrii</i> | 37.9 | Oliveira et al. (2018) |
| <i>Planta - Lemna minor</i> | 148 | Kaza, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2007) |
| | 7,5 | Cleuvers (2003) |
| <i>Microcrustáceo - Daphnia magna</i> | 68 | Cleuvers (2003) |
| <i>Peixe - Danio rerio</i> | 5,3 | Brandhof e Montforts (2010) |

Fonte: Autora (2022)

Cleuvers (2003) avaliou por meio de suas CE₅₀ um total de 10 fármacos, em organismos de classe taxonômicas: microcrustáceo *Daphnia magna*, a microalga *Desmodesmus subspicatus* e a macrófita *Lemna minor*. Os valores encontrados para o diclofenaco foram de 68 mg. L⁻¹ para *Daphnia*, 72 mg. L⁻¹ para *D. subspicatus* e 7.5 mg. L⁻¹ para *Lemna* que se mostrou o organismo mais sensível na maioria dos compostos testados. Ainda, ressaltou que é pouco provável que os produtos farmacêuticos apresentem efeito agudo no ambiente aquático.

Quintana (2019) avaliou metilparabeno e diclofenaco para microalgas verdes utilizando diversos modelos matemáticos. Para a *D. comunis* as concentrações estão dentro do intervalo de 82,36 e 101,70 mg. L⁻¹. Concluiu-se que o valor de concentração efetiva pode sofrer variação para o mesmo conjunto amostral, organismo e composto teste, dependendo do modelo de regressão utilizado para o cálculo da toxicidade.

No trabalho de Oliveira et al. (2018) foi avaliado o efeito agudo e crônico em crustáceos *Ceriodaphnia silvestrii* do paracetamol, diclofenaco e propranolol, alcançando concentrações efetivas de 37,9 mg. L⁻¹ para o fármaco diclofenaco. Os autores recomendam o uso do

organismo teste em regiões tropicais para realização de ensaios ecotoxicológicos devido a espécie ser comum nesse clima.

Com objetivo de analisar a toxicidade de 13 fármacos para *Lemna minor*, os autores Kaza, Nalecz-Jawecki e Sawicki (2007) obtiveram toxicidade para o diclofenaco de 148 mg.L⁻¹ averiguando que o teste de inibição do crescimento para este bioindicador é um mecanismo útil no alcance dos dados de toxicidade crônica de drogas.

A utilização do organismo teste *Danio rerio* para medição da toxicidade crônica de fármacos foi empregada por Brandhof e Montforts (2010). Os embriões do peixe foram expostos por 72 horas a carbamazepina, diclofenaco e metoprolol, o efeito para o diclofenaco foi deformação do saco vitelino e cauda acima de 1,5 mg.L⁻¹ e obteve-se uma CE₅₀ de 5,3 mg.L⁻¹.

Conforme a Diretiva 93/67/EEC da União Europeia, o valor de CE₅₀ determina se uma substância tem potencial de ser tóxica. Para tanto, valores abaixo de 1 mg.L⁻¹ possuem fator muito tóxico para organismos aquáticos, de 1 a 10 mg.L⁻¹ tóxico, de 11 a 100 mg.L⁻¹ perigoso e maior que 100 mg.L⁻¹ não existe classificação nesta diretiva. Isto indica que quanto menor for o valor de CE₅₀, uma pequena concentração é capaz de indicar efeitos de toxicidade.

Os estudos retratados na literatura com fins de determinação da toxicidade crônica selecionados na Tabela 5 analisam o composto diclofenaco sódico. Para fins de comparação, não foram encontrados trabalhos com o diclofenaco resinato em solução oral ou outra forma de apresentação, o que configura uma contribuição inédita.

5.3.2 Toxicidade Crônica para o paracetamol

Os estudos da toxicidade crônica frente ao paracetamol com a *D. subspicatus* alcançaram CE_{50,72h} média de 31,47 ± 6,5 mg.L⁻¹. A Tabela 6 apresenta os dados dos ensaios para alcançar o valor relatado.

Tabela 6 - Resultados de CE₅₀ com o fármaco paracetamol para *D. subspicatus* nas concentrações testes de: [15,62; 31,25; 62,50; 125,00; 250,00] mg.L⁻¹.

| Testes | CE _{50,72h} |
|--------|----------------------|
| 1 | 38,13 |
| 2 | 27,71 |
| 3 | 28,59 |

| | |
|---------------|-------|
| Média | 31,47 |
| Desvio padrão | 5,77 |

Fonte: Autora, 2022.

O paracetamol apresenta potencial de excreção entre 58% e 68%, com características de bioacumulação nos organismos aquáticos (PI et al, 2017; GOGOI et al, 2018; ZUR et al, 2018). O seu baixo valor de Kow, relatado na literatura como 0,46, reflete em seu comportamento hidrofílico e na tendência de ser observado e absorvido no ambiente aquático, além de maior susceptibilidade de diluição natural e ótima mobilidade entre solo e água (MADIKIZELA; TAVENGWA; CHIMUKA, 2017; FREITAS, 2021). A Tabela 7 busca trazer um levantamento sobre bioindicadores já relatados e suas toxicidades frente ao paracetamol, em diferentes níveis tróficos.

Tabela 7 - Organismos-testes e concentrações efetivas para o paracetamol.

| Paracetamol | | |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|
| Organismo-teste | CE ₅₀ (mg. L ⁻¹) | Autor |
| Alga - <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 134 | Henschel et al. (1997) |
| Alga - <i>Pseudokirchneiella subcapita</i> | 317,4 | Nunes et al. (2014) |
| Bactéria - <i>Vibrio fischeri</i> | 697,34 | Escalante e Alejandro (2018) |
| Microcrustáceo - <i>Daphnia magna</i> | 50 | Henschel et al. (1997) |
| Cyanobacteria - <i>Nostoc muscorum</i> | 113,68 | Fatima et al. (2020) |

Fonte: Autora (2022).

Henschel et al. (1997) observou para o mesmo organismo teste (*D. subspicatus*) usado para este trabalho, uma CE₅₀ de 134 mg.L⁻¹ com duração de teste de 72 horas e para o microcrustáceo *Daphnia magna* 50 mg.L⁻¹. A *Daphnia* foi o segundo organismo mais sensível em termos de valores de concentração efetiva, apresentando maior toxicidade.

Ainda se tratando de algas, Nunes et al. (2014) realizaram ensaios com o paracetamol e uma série de organismos de água doce, retratando: *Pseudokirchneriella subcapitata* (317,4 mg.L⁻¹) *Daphnia magna* (4,7 mg.L⁻¹), *Vibrio fischeri* (92,2 mg.L⁻¹), *Cylindrospermopsis raciborskii* (192,9 mg.L⁻¹), *Daphnia longispina* (65,9 mg.L⁻¹), *Lemna minor* (429,9 mg.L⁻¹) e *Lemna gibba* (> 1000 mg.L⁻¹). O estudo aponta que a toxicidade do paracetamol pode ser alterada em cada organismo analisado por fatores fisiológicos imprevisíveis.

Com a utilização da bactéria *Vibrio fischeri*, os autores Escalante e Alejandro (2018) registraram para o paracetamol uma CE_{50} de 697,34 mg.L⁻¹, após 15 minutos de exposição. Experimentalmente comprovaram a ocorrência de hormese ecotoxicológica em uma mistura de paracetamol e edaravone.

Para a bactéria fotossintetizante *Nostoc muscorum*, Fatima et al. (2020) avaliaram concentrações distintas de paracetamol e constataram efeito tóxico em 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mg.L⁻¹, com concentração efetiva final de 113,68 mg.L⁻¹ após 6 dias de interação. O fármaco ocasionou a diminuição de crescimento da cianobactéria e os pigmentos fotossintéticos mostraram-se inversamente proporcionais ao aumento dele, decaindo.

Neste estudo, optou-se pela utilização de solução oral de paracetamol, onde existem excipientes e também veículos contidos no medicamento além do princípio ativo. A ampla maioria dos estudos registrados na Tabela 7, empregam reagentes do composto com grau analítico, ou seja, pureza maior que 99%. Existe a possibilidade das discrepâncias no valor encontrado de concentração efetiva da mesma microalga, envolver o fator supracitado.

Evidencia-se que a menor CE_{50} deste estudo em comparação ao relatado por Henschel et al. (1997) para o paracetamol configura maior toxicidade ao composto, tornando um resultado importante e com maior risco de exposição ao ambiente aquático. Os organismos fotossintetizantes como a espécie de microalga utilizada são a base da cadeia trófica, que servindo de alimento para outros níveis tróficos possui potencial de atingir o topo da cadeia e disseminar a contaminação para os consumidores. Em vista disso, as alterações ambientais neste organismo teste provocam o desequilíbrio do sistema e o impactam (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ensaios que indicam o efeito crônico são os mais recomendados para avaliar riscos derivados da presença de fármacos e seus subprodutos no meio natural e em organismos aquáticos. O monitoramento sobre a exposição prolongada das doses que são cumulativas dos contaminantes e suas concentrações limites necessitam de controle ambiental e legislativo, pois os fármacos são substâncias biologicamente ativas.

Este trabalho avaliou a toxicidade crônica para a microalga *D. subspicatus* de um analgésico (paracetamol) e um antiinflamatório (diclofenaco resinato), ambos princípios ativos com alto índice de prescrição.

A toxicidade crônica mais alta correspondeu ao paracetamol, com valores médios de $CE_{50,72h}$ de $31,47 \pm 6,5$ mg.L⁻¹, onde conforme a Diretiva 93/67/EEC da União Europeia, a

substância pode ser classificada como perigosa ao ambiente aquático. O diclofenaco resinato atingiu valor médio de $CE_{50,72h}$ de $181,06 \pm 11,1 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo considerado como não tóxico ao ambiente.

Os resultados aqui detalhados para o diclofenaco resinato apresentam $CE_{50,72h} > 100 \text{ mg.L}^{-1}$ onde classificações mundiais que avaliam o valor da concentração efetiva podem não correlacionar toxicidade ao composto. O diclofenaco como princípio ativo já foi elencado como uma substância perigosa quanto presente aquaticamente, portanto, um grau de complexidade é conferido quando, a rigor, o assegura como sem toxicidade e não pode ser subestimado. De forma similar, a baixa tolerância da microalga para o paracetamol pode ser extrapolada para avaliação em outros testes com condições diferentes do utilizado neste trabalho em vista de obtenção de respostas quanto à interação de variáveis na toxicidade da amostra. As informações sobre suas toxicidades crônicas possuem papel nos estudos de avaliação de risco ambiental, tendo em vista que as inserções nos ecossistemas aquáticos convergem desde os primórdios de uso de medicamentos, acarretando em seu reconhecimento como persistentes.

A utilização das comunidades algais como modelos biológicos com fins de tratamento de efluentes com contaminantes emergentes é uma alternativa interessante economicamente e para este fim ainda estão sendo refinadas e ampliadas para atender grandes demandas. O avanço nesse cenário de técnicas sustentáveis de remoção é necessário, por ser uma forma menos agressiva de tratamento. Além disso, atende plenamente os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, perpassando temáticas de preocupação ambientais e de saúde pública, já que os fármacos acendem um alerta sobre seus potenciais efeitos deletérios nos ecossistemas aquáticos.

Os fármacos e suas concentrações aqui relatadas foram avaliadas com teste de toxicidade crônica para analisar o grau de periculosidade das substâncias de forma isolada. No meio ambiente, existem outros compostos que podem perturbar os sistemas e causar efeito sinérgico, de forma a potencializar quaisquer efeitos tóxicos.

7. RECOMENDAÇÕES

- Ampliar as concentrações testadas, diminuindo o fator de diluição;
- Analisar a influência combinada dos dois fármacos concomitantemente com a microalga;
- De forma a avaliar melhor os efeitos toxicológicos crônicos, recomenda-se incluir outros níveis tróficos englobando consumidores primários e secundários, além dos produtores que englobam as algas;

- Executar testes com os fármacos a partir de amostras de água advindas de ambientes naturais e modificados a fim de investigar as alterações na concentração efetiva dos fármacos devido a presença de despejos antropogênicos e outras alterações na qualidade da água;
- Ensaios de sensibilidade com outras substâncias tóxicas a microalga;
- Estender o estudo a outros compostos denominados contaminantes emergentes, bem como suas mesclas;

REFERÊNCIAS

- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648:2018** - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica: Método de ensaio com algas. Rio de Janeiro, 2018.
- ALEXANDER, D. e; FAIRBRIDGE, R. W. Environmental Geology. **Encyclopedia Of Earth Science**, [S.L.], 1999.
- AMÉRICO, J. et al. Fármacos em Uma Estação de Tratamento de Esgoto na Região Centro-Oeste do Brasil e os Riscos aos Recursos Hídricos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 17, n. 3, p. 61–67, 2012.
- AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. et al. Ocorrência de diclofenaco e naproxeno em água superficial no município de Três Lagoas (MS) e a influência da temperatura da água na detecção desses anti-inflamatórios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 3, p. 429–435, maio 2017.
- ARAGÃO, R. B. de A. **Fármacos como poluentes emergentes em ambientes aquáticos: panorama de consumo na Região Metropolitana de São Paulo e quadro comparativo de políticas públicas entre países**. 2018. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa Interunidades de Pós-Graduação em Análise Ambiental Integrada, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2018.
- ARRAES, A. I. O. M. e; LONGHIN, S. R. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1958-1972, jun. 2012. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/engenharia/otimizacao.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2021.
- ASHTON, D.; HILTON, M.; THOMAS, K.V.. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 333, n. 1-3, p. 167-184, out. 2004.
- BAENA-NOGUERAS, R. M. et al. Determination of Pharmaceuticals in Coastal Systems Using Solid Phase Extraction (SPE) Followed by Ultra Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). **Current Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 12, n. 3, p. 183-201, 5 maio 2016.
- BARCELÓ, D. Emerging pollutants in water analysis. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 22, n. 10, p. 14-16, nov. 2003.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 651-666, jun. 2007.
- BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E. Revisão sobre fármacos no ambiente. **Revista Dae**, [S.L.], v. 66, n. 210, p. 78-95, 2018
- BOHRER, M. B. **Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do sistema de tratamento dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do sul**. Triunfo, RS, através da comunidade zooplancônica. 1995. 469p.

- BRANDHOF, E van D.; MONTFORTS, M. Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 73, n. 8, p. 1862-1866, nov. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC 138 de 29 de maio de 2003**. Dispõe sobre o enquadramento na categoria de venda de medicamentos. D.O.U., Brasília, 02 jun. 2003.
- BRASIL. **Resolução CONAMA n° 357**, de 17 de março de 2005. Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopéia Brasileira**. 6ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2019.
- BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna***: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário. 2006. 149f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Santa Catarina. 2006. Disponível em: [https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/88729/230242.pdf?sequence=1 &isAllowed=y](https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/88729/230242.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 2 jul. 2021.
- 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 & Technology**, v. 32, n. 22, p. 3449–3456, nov. 1998.
- CAETANO, N. **Guia de Remédios** 2005. 7ª ed. São Paulo: Escala; 2005.
- CAMBRA SÁNCHEZ, J. et al. Lista florística y bibliográfica de los clorófitos (Chlorophyta) de la Península Ibérica, Islas Baleares e Islas Canarias. Burgos: **Asociación Española de Limnología**. 1998.
- CAMPANHA, M. C. et al. A 3- year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 10, p. 7936-47, 2015.
- CARNEIRO, R. D. **Avaliação da ecotoxicidade da losartana potássica em *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus***. 2017. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.
- CASTIGLIONI, S. et al. Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River Po, Italy. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 25-32, fev. 2004.
- CLEUVERS, M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 142, n. 3, p. 185-194, 15 maio 2003.
- CORTEZ, F. S. **Avaliação da toxicidade do fármaco triclosan através de ensaios ecotoxicológicos empregando organismos marinhos em água e sedimento marcado (spiked)**. 2011. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2011.
- DEO, R.; HALDEN, R. Pharmaceuticals in the Built and Natural Water Environment of the United States. **Water**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 1346-1365, 11 set. 2013.

DIAS, R. V. A. (2014). **Avaliação da ocorrência de microcontaminantes de preocupação emergentes em sistemas de abastecimento de água e da atividade estrogênica do estinilestradiol** (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DICK, V. et al. Análise dos efeitos tóxicos relacionados aos resíduos farmacológicos na água tratada. **RevInter**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 11–23, 2021. Disponível em: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=148741644&lang=pt-br&site=ehost-live>. Acesso em: 16 mar. 2022.

DIMAS, C. S. D. **Otimização do tratamento terciário de águas residuais urbanas através da utilização de microalgas**. 2021. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciclo Urbano da Água, Universidade do Algarve, Portugal, 2021.

Deutsches Institut für Normung. DIN 38 412 (9) (1989). Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Grünalgen (Scenedesmus - Zellvermehrungs-Hemmtest) (L9).

ESCALANTE, Á.; ALEJANDRO, I. **Estudo ecotoxicológico usando ensaios de bioluminescência das drogas Edaravone e Paracetamol**. 2018. 74 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidad de Valladolid Escuela de Ingenierias Industriales, Valladolid, 2018. Disponível em: <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/34008/TFG-I-1046.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 fev. 2022.

FAIRBAIRN, D. J. et al. Sources and transport of contaminants of emerging concern: a two-year study of occurrence and spatiotemporal variation in a mixed land use watershed. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 551-552, p. 605-613, maio 2016.

FATIMA, S. et al. Toxicity of NSAID drug (paracetamol) to nontarget organism—*Nostoc muscorum*. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 27, n. 28, p. 35208-35216, 25 jun. 2020.

FERRARI, B. et al. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 55, n. 3, p. 359–70, jul. 2003.

FREITAS, M. G.; **Antiinflamatórios não esteroidais em mananciais da região metropolitana de Belo Horizonte – correlação com a sazonalidade**. 2021. 60 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.

GARRISON, A. W.. ANALYSIS OF ORGANIC COMPOUNDS IN WATER TO SUPPORT HEALTH EFFECTS STUDIES. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 298, n. 1, p. 2-19, set. 1977.

GOGOI, A. et al. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 6, p. 169–180, mar. 2018.

HEBERER, T.. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. **Journal Of Hydrology**, [S.L.], v. 266, n. 3-4, p. 175-189, set. 2002.

HEGEWALD, E. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmeceae). **Algalogical Studies**, v. 96, p. 1-18. 2000.

HENSCHER, K.-P. et al. Environmental Hazard Assessment of Pharmaceuticals. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 220-225, jun. 1997.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D. L.. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. **Life Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 2, p. 337-341, jan. 1977.

International Organization for Standardization. ISO 8692 (1989). Water quality: Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.

KAZA, M.; NALECZ-JAWECKI, G.; SAWICKI, J. The toxicity of selected pharmaceutical to the aquatic plant *Lemna minor*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 16, p. 524-531.2007. Disponível em: http://www.pspparlar.de/pdf/F_26_251_OriginalPaper_pp524_531.pdf. Acesso em: 4 mar. 2022.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: Métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis-SC: FATMA/ GTZ. 2004.

KO, L. T. Y.; ALBUQUERQUE, C. N. de. **A evolução do mercado de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e o papel do farmacêutico frente á automedicação**. [S.l: s.n.], 2018.

KRAMER, R. et al. Determinação de anti-inflamatórios na água e sedimento e suas relações com a qualidade da água na bacia do Alto Iguaçu, Curitiba-PR. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 657-667, 2015.

KÜMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. **Journal Of Environmental Management**, [S.L.], v. 90, n. 8, p. 2354-2366, jun. 2009.

LI, Y. et al. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 468-469, p. 908-932, jan. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969713010462?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jul. 2021.

LIMBERGER, S. **Microalgas perifíticas como bioindicadores na foz do Rio Ocoy: tributário do Lago de Itaipu – PR**. 2011. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2011.

MADIKIZELA, L. M.; TAVENGWA, N. T.; CHIMUKA, L. Status of pharmaceuticals in African water bodies: Occurrence, removal and analytical methods. **Journal of Environmental Management**, v. 193, p. 211–220, maio 2017.

MAIA, A. C. B. L.. **Regime de responsabilidade pelos danos causados pelos contaminantes emergentes como risco do desenvolvimento**. 2020. Dissertação (Mestrado em Direito) - Instituto CEUB de Pesquisa e Desenvolvimento, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2020.

MELO, S. A. S. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 1, 188-197, 2009.

MENDOZA, A. et al. Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: a case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard. **Environmental Research**, [S.L.], v. 140, p. 225-241, jul. 2015.

MIRANDA, A. C. et al. Avaliação Do Conhecimento Dos Consumidores De Duas Cidades Da Grande Sp, Brasil, Sobre Os Impactos Causados Pelo Descarte Incorreto De Medicamentos Tt - Evaluación Del Conocimiento De Los Consumidores De Dos Ciudades Del Gran Sao Paulo, Brasil, Sobre Los. **Interciencia**, v. 43, n. 8, p. 580–584, 2018.

MONTAGNER, 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. São Paulo, 2017.

MULLER, J. J. A. **Toxicological limits**. Toxicological limits of medicines in drinking-water. Holanda: RIVM, 2002, p-35-45. (Repport, M/703719/004/2003). Disponível em: www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten. Acesso em: 12 fev. 2022.

NEBOT, C. GIBB, S. W.; BOYD, K. G. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, p. 87-94, 2007.

NORPOTH, K. et al. **Investigations on the problem of solubility and stability of steroid ovulation inhibitors in water, wastewater and activated sludge**, Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig, B 156, 500-511, 1973.

NUNES, B. et al. Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: a headache to environmental regulators?. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 107, p. 178-185, set. 2014.

NUNES, B. et al. Toxicological effects of paracetamol on the clam *Ruditapes philippinarum*: exposure vs recovery. **Aquatic Toxicology**, [S. L], v. 122, p. 198-206, nov. 2017.

OECD. **Test no. 201: freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test**. [s.l.] OECD, 2011.

OLIVEIRA, L. L. D. de. et al. Acute and Chronic Effects of Three Pharmaceutical Drugs on the Tropical Freshwater Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Water, Air, & Soil Pollution**, [S.L.], v. 229, n. 4, p. 116-135, 15 mar. 2018.

OSPAR COMMISSION. **Dynamic Selection and Prioritisation Mechanism for Hazardous Substances (DYNAMEC)**. [S. L], 2002. 24 p. Disponível em: <https://www.ospar.org/documents?v=6942>. Acesso em: 25 jul. 2021.

OVALLE, J. M. P.; VIVAS, A. C. Presença de poluentes farmacêuticos na água devido à pandemia do covid-19. **Publicação digital da UNAM Water Network Número 17, outubro-dezembro de 2021**, p. 48. 2021.

PAIVA, M. V. C. et al. II- 464 Avaliação comparativa do crescimento e produção lipídica da espécie de microalga (*desmodesmus subspicatus*) utilizando metabolismos autotrófico e heterotrófico em efluente doméstico. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 2243-2256, 2020.

PAL, A. et al. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. **Environment International**, [S.L.], v. 71, p. 46-62, out. 2014. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412014001767?via%3Dihub>. Acesso em: 02 jul. 2021.

PAMPLONA NETO, D. **Produção de biomassa microalgal de *Desmodesmus subspicatus* em condição autotrófica e mixotrófica**. 2017. 44 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017. Disponível em:

<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/65673/DANIEL%20PAMPLONA%20NETO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 03 fev. 2022.

PEAKE, B. M. et al. Impact of pharmaceuticals on the environment. **The Life-Cycle Of Pharmaceuticals In The Environment**, [S.L.], p. 109-152, 2016.

PI, N.; NG, J.Z.; KELLY, B.C. Bioaccumulation of pharmaceutically active compounds and endocrinedisrupting chemicals in aquatic macrophytes: results of hydroponic experiments with *Echinodorus horemanii* and *Eichhornia crassipes*. **Science of the Total Environment**, v. 601-602, p. 812-820, 2017.

QUINTANA, Y. T. P.. **Uso de modelos matemáticos para estimar a toxicidade dos PPCPs metilparabeno e diclofenaco para diferentes espécies de microalgas verdes**. 2019.

Dissertação (Mestrado em biologia de ambientes aquáticos continentais.) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

RAGASSI, B. **Monitoramento de fármacos em água superficial e efluente de estação de tratamento de esgoto no município de Dracena - SP**. 2018. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, 2018.

RICHARDSON, M. L; BOWRON, J. M. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 1-12, jan. 1985.

RIGOBELLO, S. E. **Avaliação da remoção de diclofenaco e formação de subprodutos em tratamento de água**. 2012. 259 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

ROCHA, R. S. et al. Avaliação da degradação do diclofenaco sódico utilizando H₂O₂/fenton em reator eletroquímico. **Química Nova**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 354-358, 2009.

ROSSATO, A.; OLIVEIRA, P. S.; SAGRILLO, M. R.. Microalgas como aditivos de descontaminação de ambientes aquáticos: uma revisão. **Disciplinarum Scientia - Ciências Naturais e Tecnológicas**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 1-13, 2021.

SANTOS, D. R. A. dos. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco cloridrato de fluoxetina e do surfactante dodecil sulfato de sódio quando submetidos a tratamento por radiação ionizante**. 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M.. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, [S.L.], v. 8, n. 1, 26 fev. 2014.

- SENA, M.M. et al. Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. **Quim. Nova**, v.30, n1, p.75-79, 2007.
- SILVA, C. G. A. da; COLLINS, C. H.. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.
- SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO – SNIS. (2021). **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto 2010-2021**. Ministério do Desenvolvimento Regional. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnosticos/agua-e-esgotos>. Acessado em: 25 fev. 2022.
- SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.2, n.2, p. 187-196, 2007.
- SPLABOR. **Câmara de Neubauer: Saiba como realizar a limpeza correta**. 2016. Disponível em: <http://www.splabor.com.br/blog/camara-de-contagem-neubauer/aprendendo-mais-saiba-como-realizar-a-limpeza-correta-de-sua-camara-de-contagem-camara-de-neubauer/>. Acesso em: 15 jan. 2022.
- STELATO, E. DA S. et al. Avaliação da presença de resíduos de anti-inflamatórios não esteroides nos córregos veado e cedro do município de Presidente Prudente (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 39, p. 97–113, mar. 2016.
- STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 135–141, jan. 1999.
- TABAK, H. H.; BRUNCH, R. L. Steroid hormones as water pollutants I. Metabolism of natural and synthetic ovulation inhibiting hormones by microorganisms of activated sludge and primary settled sludges. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 11, p.3694-376, 1970.
- UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – Laboratório de Virologia. **BMM 5777 – Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia**. Disponível em: https://www.ufrgs.br/labvir/materia/c ontagem_celulas.pdf. Acesso em: 29 set. 2021.
- VALER, R. M. GLOCK, L.. Quantificação de algas cloríceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. **Acta Limnológica Brasiliensis**, v.11, n.2, p. 149-156. 1998.
- VERAS, T. B. et al. Analysis of the presence of anti-inflammatory drugs in surfacewater: A case study in Beberibe river - PE, Brazil. **Chemosphere**, Kidlington, v. 222, p. 961-969, 2019.
- VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 139145, 2004.
- VOLKER, J. et al. Extended anaerobic conditions in the biological wastewater treatment: Higher reduction of toxicity compared to target organic micropollutants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 116, p. 220-230. 2017.

WANNMACHER, L. Medicamentos de uso corrente no manejo de dor e febre. Tema 8. **Uso Racional de Medicamentos**. Temas Seleccionados 2010. Ministério da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=35811&janela=1. Acessado em: 20 de dez. 2021.

WONG, P. T. S.; CHAU, Y. K.; PATEL, D. 1983. The use of algal batch and continuous culture techniques in metal toxicity study. In: Nriagu, J. O (ed.) **Aquatic Toxicology**. Vol. 13 da série Advances in Environmental Science and Technology. John Wiley & Sons Publ. New York. p. 449-466.

ZHOU, H. et al. Temporal and spatial features of selected wastewater-marking pharmaceuticals and potential mechanisms of their removal from urban rivers. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 24, n. 18, p. 15712-15726, 19 maio 2017.

ŽUR, J. et al. Paracetamol – toxicity and microbial utilization. *Pseudomonas moorei* KB4 as a case study for exploring degradation pathway. **Chemosphere**, v. 206, p. 192–202, 1 set. 2018.

ANEXOS

1 – CULTIVO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*.

Tabela 8 - Composição do meio de cultura, meio CHU.

| Solução | Reagente | Quantidade (mg) |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1 | NaNO ₃ | 25.000 |
| 2 | CaCl ₂ . 2H ₂ O | 2.500 |
| 3 | MgSO ₄ . 7H ₂ O | 7.500 |
| 4 | K ₂ HPO ₄ | 7.500 |
| 5 | KH ₂ PO ₄ | 17.500 |
| 6 | NaCl | 2.500 |
| 7 | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₆ . 2H ₂ O | 50.000 |
| | KOH | 31.000 |
| 8 | FeSO ₄ . 7H ₂ O | 4.980 |
| 9 | H ₃ BO ₃ | 11.420 |
| | ZnSO ₄ . 7H ₂ O | 88.2 |
| | MnCl ₂ . 4H ₂ O | 14.4 |
| | MoO ₃ | 7.1 |
| 10 | CuSO ₄ . 5H ₂ O | 15.7 |
| | Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O | 4.9 |

Fonte: ABNT NBR 12648:2018.

Tabela 9 - Alíquotas de cada solução para preparo de 1 litro de meio CHU.

| Solução | Volume (ml) |
|---------|-------------|
| 1 a 6 | 10 |
| 7 a 10 | 1 |

Fonte: ABNT NBR 12648:2018.

2 - SOLUÇÃO ESTOQUE

Tabela 10 – Componentes da solução estoque.

| Solução | Reagente | Quantidade |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| I | NH ₄ Cl | 1,5 g |
| | MgCl ₂ . 6H ₂ O | 1,2 g |
| | CaCl ₂ . 2H ₂ O | 1,8 g |
| | MgSO ₄ . 7H ₂ O | 1,5 g |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,16 g |
| II | FeCl ₃ . 6H ₂ O | 80 mg |
| | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ . 2H ₂ O | 100 mg |
| III | H ₃ BO ₃ | 185 mg |
| | MnCl ₂ . 4H ₂ O | 415 mg |
| | ZnCl ₂ | 3 mg |
| | Cl ₂ Co. 6H ₂ O | 1,5 mg |
| | CuCl ₂ . 2H ₂ O | 0,01 mg |
| | Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O | 7 mg |

Fonte: Knie e Lopes (2004).

A Tabela 11 discretiza as alíquotas necessárias para compor 1 litro de solução nutriente, ainda, ao sistema é adicionado 3 g de bicarbonato de sódio.

Tabela 11 - Solução nutriente, quantidades para 1 litro.

| Solução estoque | I | II | III |
|-----------------|--------|-------|-------|
| Volume | 100 ml | 10 ml | 10 ml |

Fonte: Knie e Lopes (2004).

A pré cultura contém os volumes descritos na Tabela 12 e para cada litro de seu preparo é adicionado 300 mg de bicarbonato de sódio.

Tabela 12 - Alíquotas necessárias para 1 litro de pré cultura.

| Solução estoque | I | II | III |
|-----------------|-------|------|------|
| Volume | 10 ml | 1 ml | 1 ml |

Fonte: Knie e Lopes (2004).