



Avaliação de Ecotoxicidade Usando Microalgas como Complemento de Estudos para a Remoção de Psicofármacos em ETARs

SÍLVIA GONÇALVES GRUND BASTOS

Novembro de 2016

**Avaliação de Ecotoxicidade Usando Microalgas
como Complemento de Estudos para a Remoção de
Psicofármacos em ETARs**

Sílvia Gonçalves Grund Bastos

Orientação: Professora Doutora Sónia Adriana Ribeiro Figueiredo

Coorientação: Doutora Lúcia Helena M. L. M. Santos

Novembro 2016

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Sónia Figueiredo, pelo convite para a realização deste trabalho, pelo carinho, disponibilidade e partilha de experiências.

À minha coorientadora, Doutora Lúcia Santos, pela grande ajuda na parte técnica, partilha de conhecimentos e incentivo.

À Doutora Cristina Delerue-Matos pelo apoio, palavras de estímulo e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Professora Doutora Ana Cristina Freire e Doutora Diana Fernandes pelo material cedido para a realização desta investigação, que foi financiada pela Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT) através do projeto FCT-Austin FOTOCATGRAF (referência UTAP-ICDT/CTM-NAN/0025/2014).

À Doutora Ana Carvalho pela carinhosa receção no GRAQ, pela ajuda e partilha de conhecimentos.

À Doutora Aurora Silva e à Dra. Valentina Domingues pelo empréstimo de material para os ensaios e pela preciosa informação acerca da utilização dos microscópios.

Ao Professor António Crispim pela calorosa receção no ISEP, bem como pela sua disponibilidade e prontidão com que tratou das solicitações burocráticas.

Ao pessoal do GRAQ: Paulinha, Idalina, Manuela, Cristina, Diana, Susana, Maria, Clara, pela colaboração, companhia e conversas amenas a qualquer hora do dia.

Ao Américo, que me desafiou, entusiasmou e acompanhou ao longo deste projeto.

À minha mãe, que sempre manda *energias positivas* do outro lado do Atlântico.

Ao Teo e Cacá, por todo o apoio e paciência durante a realização desta etapa.

A todos, o meu muito obrigada!

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

RESUMO

O estilo de vida atual provoca, em grande parte da população, preocupações, *stress* e depressões, o que tem levado a um aumento do consumo de antidepressivos na maioria dos países. Consequentemente tem aumentado a entrada destas substâncias, e dos seus metabolitos, no meio ambiente provenientes de descargas de águas residuais domésticas tratadas, pois os tratamentos convencionais não removem estes fármacos eficientemente, podendo causar efeitos prejudiciais nos ecossistemas.

Os objetivos deste trabalho foram a avaliação da ecotoxicidade de um psicofármaco e de alguns nanocatalisadores desenvolvidos para a remoção de fármacos através de tratamentos de fotoxidação catalítica, utilizando a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Os ensaios foram realizados de acordo com o teste de inibição para algas, descrito no Regulamento CE 440/2008 da Comissão, de 30 de maio de 2008, que por sua vez, se baseia no documento “Guidelines for the Testing of Chemicals: Freshwater Alga and Cyanobacteria Growth Inhibition Test” (OECD, 2011). O princípio do teste baseia-se na determinação do efeito no crescimento de culturas de algas expostas a uma gama de concentrações de uma dada substância. A resposta é avaliada em função da concentração do material de exposição comparativamente a uma cultura de controlo. A duração dos ensaios foi de 72 h. Um ensaio prévio com uma substância de referência, o dicromato de potássio, serviu para demonstrar que, nas condições do ensaio, a sensibilidade da espécie de alga utilizada não se alterou significativamente. As culturas de controlo apresentaram uma taxa de crescimento de acordo com os valores de referência definidos pelo método. O crescimento da biomassa das culturas foi avaliado a partir da determinação do conteúdo de clorofila *in vivo* por fluorescência num leitor de microplacas. As curvas de inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração testada foram traçadas com base na redução da fluorescência e as estimativas dos parâmetros ecotoxicológicos foram obtidas a partir das equações de regressão linear.

O psicofármaco selecionado para os ensaios foi a venlafaxina. Os nanomateriais testados foram o grafeno, os polioxometalatos ($\text{PMo}_{10}\text{V}_2$, PMo_{11}V e PMo_{12}) e os polioxometalatos imobilizados em flocos de grafeno ($\text{PMo}_{10}\text{V}_2@\text{GF}$, $\text{PMo}_{11}\text{V}@\text{GF}$ e $\text{PMo}_{12}@\text{GF}$). Foram avaliadas as concentrações efetivas que causam 10, 20 e 50% de inibição na população de algas (CE_{10} , CE_{20} e CE_{50}) para todos os compostos testados. A venlafaxina foi classificada como substância tóxica para o ambiente aquático, bem como o $\text{PMo}_{10}\text{V}_2$ e o $\text{PMo}_{10}\text{V}_2@\text{GF}$. As substâncias prejudiciais para o ambiente aquático são o PMo_{11}V e o

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

PMo₁₁V@GF. Os restantes materiais, grafeno, PMo₁₂ e PMo₁₂@GF, apresentam uma toxicidade mais baixa, sendo classificados como substâncias com possíveis efeitos prejudiciais para os organismos aquáticos.

Palavras-chave: ecotoxicidade, grafeno, microalgas, nanomateriais, polioxometalatos, venlafaxina.

ABSTRACT

Today's lifestyle raises concerns, stress and depressions to a large extent in the population, which has led to an increase in antidepressant consumption in most countries. As a consequence, the entrance of these substances and their metabolites in the environment due to discharges of treated domestic wastewaters has increased since conventional wastewater treatments do not efficiently remove these pharmaceuticals, which can cause harmful effects on ecosystems.

The objectives of this work were to evaluate the ecotoxicity of a psychiatric drug and some nanocatalysts developed for the removal of pharmaceuticals through catalytic photooxidation treatments using the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. The tests were carried out in accordance with the algae inhibition test described in Commission Regulation of European Community 440/2008 of May 30 2008, which was based in the document "Guidelines for the Testing of Chemicals: Freshwater Alga and Cyanobacteria Growth Inhibition Test" (OECD, 2011). The test principle is based on the determination of the effect on the growth of algae cultures exposed to a concentration range of a given substance. The response is evaluated as a function of the concentration of the exposure material compared to a control culture. The tests were carried out over a period of 72 h. A previous test with a reference substance, potassium dichromate, was performed to demonstrate that, under the test conditions, the sensitivity of the algal species did not change significantly. Control cultures showed a growth rate according to the reference values defined by the method. Growth of the biomass of the cultures was assessed from the determination of the in vivo chlorophyll content by fluorescence in a microplate reader. The growth inhibition curves were plotted as a function of the logarithm of the concentration tested on the basis of the fluorescence reduction. The ecotoxicological parameters effective concentration that causes 10, 20 and 50% inhibition to the algal population (EC_{10} , EC_{20} and EC_{50}) were estimated from the linear regression equations.

The pharmaceutical selected for the trials was venlafaxine. The nanomaterials tested were graphene, polyoxometalates ($PMo_{10}V_2$, $PMo_{11}V$ and PMo_{12}) and polyoxometalates immobilized on graphene flakes ($PMo_{10}V_2@GF$, $PMo_{11}V@GF$ and $PMo_{12}@GF$). EC_{10} , EC_{20} and EC_{50} were determined for all composites. Venlafaxine was classified as a toxic substance for the aquatic environment, as well as $PMo_{10}V_2$ and $PMo_{10}V_2@GF$. Substances harmful to the aquatic environment were $PMo_{11}V$ and $PMo_{11}V@GF$. The remaining materials, graphene, PMo_{12} and

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

PMo₁₂@GF, had a lower toxicity and were classified as substances with possible harmful effects on aquatic organisms.

Keywords: ecotoxicity, graphene, microalgae, nanomaterials, polyoxometalates, venlafaxine.

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Siglas e Abreviaturas	xv
1. Introdução: motivação e objetivos	1
1.1. Psicofármacos	2
1.2. Presença de psicofármacos nas águas residuais e superficiais	3
1.3. Enquadramento legal.....	6
2. Revisão da Literatura	9
2.1. Ecotoxicologia/ecotoxicidade	9
2.2. Microalgas.....	10
2.2.1. <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	11
2.3. Novos materiais para a remoção de psicofármacos das águas residuais..	16
3. Descrição Experimental.....	19
3.1. Princípio do Método de ensaio.....	19
3.2. Substâncias de teste.....	19
3.2.1. Substância de referência	19
3.2.2. Cloridrato de Venlafaxina.....	20
3.2.3. Nanomateriais em fase de testes para futura utilização no tratamento de efluentes.....	21
3.3. Organismos de ensaio	21
3.4. Condições físicas dos ensaios.....	22
3.5. Meio de cultura	22
3.6. Procedimento de ensaio	25
3.7. Controlo Analítico.....	26
3.7.1. Medição de pH.....	26
3.7.2. Medição de condutividade	26
3.7.3. Medição da concentração de venlafaxina	26

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

3.7.4.	Avaliação do crescimento da biomassa	26
4.	Resultados e Discussão	29
4.1.	Introdução	29
4.2.	Curvas de calibração	29
4.3.	Critérios de Validade.....	32
4.4.	Curvas de crescimento, relação concentração/efeito e cálculo das concentrações efetivas.....	32
4.5.	Resultados dos testes de inibição de crescimento	34
4.5.1.	Venlafaxina	34
4.5.2.	Grafeno.....	36
4.5.3.	PMo ₁₀ V ₂	37
4.5.4.	PMo ₁₁ V	39
4.5.5.	PMo ₁₂	40
4.5.6.	PMo ₁₀ V ₂ @GF.....	41
4.5.7.	PMo ₁₁ V@GF	43
4.5.8.	PMo ₁₂ @GF	45
4.6.	Análise de resultados.....	46
4.7.	Outros efeitos observados	48
6.	Conclusões e sugestões para trabalho futuro	51
	Referências Bibliográficas	53
	Anexos	59
	Anexo A – Resultados do ensaio com dicromato de potássio.....	59
	59
	Anexo B – Variação de pH nas culturas de controlo	60
	Anexo C – Crescimento celular e coeficiente de variação do crescimento (CV) nas réplicas de controlo de cada ensaio	61
	Anexo D – Avaliação da concentração da substância de ensaio - venlafaxina.....	65
	Anexo E – Variação da condutividade nos ensaios dos nanomateriais.....	66
	Anexo F- Equações de regressão linear usadas na determinação dos pontos finais	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Exemplos de estudos realizados com <i>P. subcapitata</i> e psicofármacos	12
Tabela 3.1: Concentração de nutrientes (adaptado do Regulamento CE 440/2008)	24
Tabela 4.1: Resultados obtidos nos ensaios realizados com a venlafaxina	34
Tabela 4.2: Resultados obtidos nos ensaios realizados com o grafeno	36
Tabela 4.3: Resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMo ₁₀ V ₂	38
Tabela 4.4: Resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMo ₁₁ V	40
Tabela 4.5: Resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMo ₁₂	41
Tabela 4.6: Resultados obtidos nos testes do PMo ₁₀ V ₂ @GF	43
Tabela 4.7: Resultados obtidos nos testes do PMo ₁₁ V@GF	44
Tabela 4.8: Resultados obtidos nos testes do PMo ₁₂ @GF	46
Tabela 4.9: Parâmetros ecotoxicológicos referentes aos materiais testados	48
Tabela A.1: Resultados do ensaio com o dicromato de potássio	63
Tabela B.1: Variação de pH nas culturas de controlo	64
Tabela C.1: Crescimento celular e CV no ensaio do dicromato de potássio	65
Tabela C.2: Crescimento celular e CV no ensaio da venlafaxina	65
Tabela C.2.1: Crescimento celular e CV no ensaio da venlafaxina com os resultados da absorvância	65
Tabela C.3: Crescimento celular e CV no ensaio do grafeno	66
Tabela C.4: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo ₁₀ V ₂	66
Tabela C.5: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo ₁₁ V	66
Tabela C.6: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo ₁₂	67
Tabela C.7: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo ₁₀ V ₂ @GF	67
Tabela C.8: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo ₁₁ V@GF	67
Tabela C.9: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo ₁₂ @GF	68
Tabela D.1: Concentração de venlafaxina no início e no final do ensaio	69
Tabela E.1: Variação da condutividade no ensaio com PMo ₁₀ V ₂	70
Tabela E.2: Variação da condutividade no ensaio com PMo ₁₁ V	70
Tabela E.3: Variação da condutividade no ensaio com PMo ₁₂	70
Tabela E.4: Variação da condutividade no ensaio com PMo ₁₀ V ₂ @GF	71
Tabela E.5: Variação da condutividade no ensaio com PMo ₁₁ V@GF	71
Tabela E.6: Variação da condutividade no ensaio com PMo ₁₂ @GF	71

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura química da venlafaxina (Pubchem, 2016b)	20
Figura 3.2: <i>P. subcapitata</i>	22
Figura 3.3: Culturas de <i>P. subcapitata</i>	22
Figura 4.1: Curva de calibração densidade celular x absorvância a 750 nm	30
Figura 4.2: Curva de calibração densidade celular x fluorescência	30
Figura 4.3: Curva de calibração concentração de biomassa x absorvância	31
Figura 4.4: Curva de calibração concentração de biomassa x fluorescência	31
Figura 4.5: Redução da fluorescência em função da concentração de venlafaxina	35
Figura 4.6: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de venlafaxina	35
Figura 4.7: Redução da fluorescência em função da concentração de grafeno	37
Figura 4.8: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de grafeno	37
Figura 4.9: Redução da fluorescência em função da concentração de $\text{PMo}_{10}\text{V}_2$	38
Figura 4.10: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de $\text{PMo}_{10}\text{V}_2$	39
Figura 4.11: Redução da fluorescência em função da concentração de PMo_{11}V	40
Figura 4.12: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de PMo_{11}V	41
Figura 4.13: Redução da fluorescência em função da concentração de PMo_{12}	42
Figura 4.14: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de PMo_{12}	42
Figura 4.15: Redução da fluorescência em função da concentração de $\text{PMo}_{10}\text{V}_2@\text{GF}$	43
Figura 4.16: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de $\text{PMo}_{10}\text{V}_2@\text{GF}$	44
Figura 4.17: Redução da fluorescência em função da concentração de $\text{PMo}_{11}\text{V}@\text{GF}$	45
Figura 4.18: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de $\text{PMo}_{11}\text{V}@\text{GF}$	45
Figura 4.19: Redução da fluorescência em função da concentração de $\text{PMo}_{12}@\text{GF}$	46

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Figura 4.20: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de $\text{PMo}_{12}\text{@GF}$	47
Figura 4.21: Cultura de controlo	50
Figura 4.22: Cultura exposta à venlafaxina	50
Figura 4.23: Cultura exposta ao $\text{PMo}_{10}\text{V}_2\text{@GF}$	50
Figura 4.24: Suspensão de $\text{PMo}_{11}\text{V@GF}$ após o ensaio	51
Figura 4.25: Suspensão de $\text{PMo}_{12}\text{@GF}$ após o ensaio	51
Figura A.1: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de dicromato de potássio	63
Figura F.1: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de venlafaxina	72
Figura F.2: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de venlafaxina	72
Figura F.3: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de grafeno	73
Figura F.4: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de PMo_{11}V	73

SIGLAS E ABREVIATURAS

FBA: Fator de bioacumulação

CE: Concentração efetiva

CENO: Concentração de efeito não observado

CEO: Concentração de efeito observado

CI: Concentração de inibição

DDD: Dose diária definida

EPA: Environmental Protection Agency

ETAR: Estação de tratamento de águas residuais

EUA: Estados Unidos da América

GHS: Global Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals

HPLC – FLD: High performance liquid chromatography with fluorescence detection

INFARMED: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

ISRS: Inibidor seletivo de recaptção de serotonina

ISRSN: Inibidor seletivo da recaptção da serotonina e noradrenalina

NQA: Normas de qualidade ambiental

OECD: Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico

PEC: Concentração previsível de exposição

PNEC: Concentração previsível de efeito não observado

POM: Polioxometalato

POM@GF: Polioxometalato imobilizado em flocos de grafeno

SNS: Serviço Nacional de Saúde

TOC: Carbono orgânico total

UN: United Nations

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

1. INTRODUÇÃO: MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

O avanço da ciência e, em particular, da indústria farmacêutica ao longo dos anos promoveu uma melhoria da qualidade de vida. Hoje em dia, há milhares de medicamentos no mercado que ajudam no tratamento, prevenção e diagnóstico das mais variadas doenças, contribuindo para o aumento da esperança de vida do homem. São disso exemplo, os anti-inflamatórios, os antidepressivos, as hormonas sexuais ou os redutores de lípidos no sangue, entre outros.

O estilo de vida atual provoca, em grande parte da população, preocupações, *stress* e depressões. Para ajudar a combater estas situações de falta de bem-estar, a indústria farmacêutica desenvolveu fármacos que atuam no sistema nervoso central e que promovem um retorno à sensação de harmonia, são os antidepressivos ou estabilizadores do humor. Nos últimos anos tem-se observado o aumento do consumo deste tipo de medicamentos. Em Portugal, entre 2000 e 2012, o consumo destas substâncias aumentou 240 % (Furtado, 2014). O aumento do consumo de antidepressivos também é evidenciado noutros países da União Europeia (Furtado, 2014), como se pode comprovar através dos indicadores da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico (*Organisation for Economic Co-operation and Development* - OECD) (OECD, 2015), no âmbito da saúde referente aos países da Organização entre os anos 2000 e 2013. No setor farmacêutico, o consumo de antidepressivos tem aumentado consideravelmente na maioria dos países da Organização, sendo que esta análise foi feita para 28 países dos 34 pertencentes à OECD. O consumo médio nestes países aumentou para quase o dobro durante o período analisado. Os valores variam de 32 para 58 doses diárias definidas (DDD) por 1000 pessoas por dia. Em Portugal, no ano de 2000, a média do consumo era equivalente à média dos 28 países escolhidos para o estudo. Já em 2013, o consumo quase triplicou, ultrapassando a média dos indicadores de consumo e atingindo um valor de 88 DDD por 1000 pessoas por dia (OECD, 2015).

Evidentemente que estes medicamentos melhoram a qualidade de vida de todos os que deles necessitam e utilizam. No entanto, há outra situação que começa a ser preocupante: a deposição destas substâncias, ou dos seus metabolitos, no meio ambiente depois da sua utilização. Os primeiros relatos de fármacos no ambiente remontam à década de 70. Embora só nas últimas duas décadas tenha havido um

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

aumento mais significativo da investigação nesta área. O avanço das técnicas analíticas, principalmente nos meios de deteção, permitiu reduzir os valores dos limites de deteção permitindo assim a deteção de níveis residuais de fármacos no ambiente. Deste modo, a comunidade científica ficou mais consciente e preocupada com este problema. Assim passou a ser motivo de apreensão a possibilidade de aparecimento de efeitos adversos devido à presença de fármacos no ambiente, não só para os organismos aquáticos como, em última instância, para a saúde humana (Santos *et al.*, 2010).

A avaliação da ecotoxicidade de um psicofármaco para a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* executada neste trabalho pretende ser um contributo para a análise dos riscos ambientais envolvidos na presença de fármacos nas águas residuais domésticas.

Outro dos objetivos do estudo foi a avaliação da ecotoxicidade provocada por alguns nanocatalisadores desenvolvidos para a remoção de fármacos através de tratamentos de fotoxidação catalítica na mesma alga.

1.1.PSICOFÁRMACOS

Segundo a Estatística do Medicamento 2014, publicada pelo INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (2014), o número de embalagens comparticipadas do grupo dos psicofármacos é de 21 450 330, perfazendo 14% do total de embalagens comparticipadas pelo Serviço Nacional de Saúde (SNS). Na listagem das 100 substâncias ativas com maior número de embalagens no SNS estão o alprazolam (posição 7), o lorazepam (posição 10), o zolpidem (posição 24), o bromazepam (posição 26), o diazepam (posição 28), a sertralina (posição 32), a venlafaxina (posição 35), a fluoxetina (posição 40), o citalopram ou escitalopram (posição 47), a trazodona (posição 48), a mirtazapina (posição 70), o mexazolam (posição 85), o loflazepato (posição 86), a paroxetina (posição 90) e o clonazepam (posição 96). A carbamazepina não se encontra nesta listagem, mas está na listagem dos 100 medicamentos com maior número de embalagens no SNS (posição 90).

O diazepam é uma benzodiazepina, usado como anticonvulsivo, ansiolítico, sedativo e relaxante muscular, com ação de longa duração. A sertralina é um fármaco que atua como inibidor seletivo da recaptção da serotonina (ISRS) sendo utilizado como antidepressivo, no tratamento de *stress* pós-traumático ou transtorno obsessivo-compulsivo. A fluoxetina também pertence à classe dos ISRS e é um agente

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

antidepressivo, também utilizado para tratar bulimia nervosa, distúrbio de pânico e *stress* pós-traumático. Outro ISRS é o citalopram, um derivado de ftaleno dicíclico, com atividade antidepressiva e ansiolítica. A trazodona é um derivado da triazolopiridina sintética, que pertence à classe dos antidepressivos atípicos, sendo usado como antidepressivo e sedativo. A venlafaxina é um derivado do ciclohexanol e feniletilamina, que atua como inibidor seletivo da recaptação da serotonina e da noradrenalina (ISRSN), sendo utilizado como antidepressivo. A carbamazepina é uma dibenzoazepina, e é um dos principais fármacos a ser utilizado como antiepilético e anticonvulsivo (PubChem, 2016a).

1.2. PRESENÇA DE PSICOFÁRMACOS NAS ÁGUAS RESIDUAIS E SUPERFICIAIS

O uso de fármacos pela população tem como destino final as águas residuais. Depois de utilizados, estes compostos são excretados sob a forma original ou como metabolitos, e seguem o curso normal das águas residuais: são encaminhados para as estações de tratamento de águas residuais (ETARs), as quais descarregam os seus efluentes tratados nas águas superficiais, as quais serão contaminadas com fármacos caso estes não sejam eficientemente removidos na ETAR. Inadequadamente, os medicamentos sem uso, por exemplo quando fora do prazo de validade, são por vezes rejeitados em conjunto com as águas residuais ou com o lixo doméstico, contribuindo também para a sua presença no ambiente.

A comunidade científica tem demonstrado uma crescente preocupação com a poluição originada por fármacos. Já foram identificadas centenas de fármacos e produtos de higiene pessoal nas águas residuais e superficiais. A ocorrência de fármacos no ambiente foi relatada pela primeira vez em 1976, por Garison *et al.*, nos Estados Unidos. Passados 5 anos, foi no Reino Unido, e outros 5 anos, no Canadá. Nos anos seguintes foram detetados pelo menos 150 fármacos no ambiente, especialmente no meio hídrico. Encontram-se, entre os mais comuns, os anti-inflamatórios diclofenac e ibuprofeno, os psicofármacos carbamazepina e diazepam, bem como outros tipos de fármacos: antibióticos, beta-bloqueadores, esteroides e reguladores hormonais, reguladores de lípidos e ainda antineoplásicos (Nikolaou, Meric e Fatta, 2007). Além dos fármacos originais, também aparecem no meio hídrico os produtos de transformação, devido a transformações bióticas, ou abióticas, como a fotodegradação (Andreozzi, Marotta e Paxéus, 2003). Uma das propriedades físico-

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

químicas importantes no desenvolvimento de fármacos é o coeficiente de partição octanol/água. A transferência de fármacos no corpo humano depende da bicamada lipídica da membrana celular, ou seja, uma das principais propriedades pretendidas num fármaco para promover a sua permeação através de membranas biológicas é a lipofilia (Fatta-Kassinos, Meric e Nikolaou, 2011). Para além disso, na metabolização, a tendência é para os fármacos sofrerem oxidação, redução ou clivagem, originando metabolitos mais hidrofílicos, que são mais facilmente eliminados na urina ou nas fezes (Mompelat, Le Bot e Thomas, 2009).

Há referências de que as ETARs convencionais não removem eficientemente a maioria destes compostos. Verificou-se uma degradação do ibuprofeno até 90% em reatores biológicos do tipo biodiscos, mas a concentração do metabolito começou a diminuir apenas depois de 150 h de tratamento (Winkler *et al.*, 2001), sendo um tempo de retenção muito longo.

Num estudo realizado por Mackul'ak *et al.*, (2015), foram identificados 13 compostos no afluente de uma ETAR em Petralka (Eslováquia). Nestes 13 compostos, drogas ilícitas e fármacos, estavam incluídos o citalopram e a venlafaxina em concentrações de 93 e 371 ng/L respetivamente. Estes foram também detetados no efluente tratado da ETAR, revelando uma eficiência de remoção de apenas 10% para estes dois fármacos. Foram feitos três tipos de ensaios de degradação com este afluente: o primeiro tipo foi de biossorção e degradação, em três matrizes diferentes, um com a alga *Chlorella kessleri*, e outros dois com os fungos da madeira, *Pleurotus cornucopie* e *Lentinus edodes*; o segundo tipo refere-se à degradação usando uma mistura multienzimática, especificada como BIO-P4 (Biopropect, República Checa); e o terceiro recorreu à utilização do reagente de Fenton. Por fim, comparou-se a eficiência da remoção dos fármacos nos diferentes tratamentos. A melhor eficiência de remoção foi registada com o reagente de Fenton, na ordem dos 95% para o citalopram e 99% para a venlafaxina. A mistura multienzimática mostrou uma boa eficiência comparada com o tratamento convencional mais utilizado, que é o de lamas ativadas, verificando-se eficiências de remoção de 91 % para o citalopram, mas apenas 52% para a venlafaxina. Em oposição, a pior eficiência registada foi no tratamento com *L. edodes*, que não apresentou valor significativo para a venlafaxina. Para os restantes organismos, as eficiências situaram-se entre 1,5 e 25%.

Um outro exemplo, descrito por Rizzo *et al.*, (2009), utiliza o tratamento fotocatalítico com TiO₂ numa mistura de carbamazepina, amoxicilina e diclofenac. Os

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

autores mediram o carbono orgânico total (TOC), constatando que a cinética do processo é lenta. A taxa de mineralização encontrada foi de $t_{1/2} = 86,6$ min, para a mistura na água residual, em contraste com $t_{1/2} = 46,5$ min, para a mistura em água destilada. A finalização do tratamento por oxidação com ozono seguido de filtração em carvão ativado granular permite melhores resultados na remoção dos fármacos. Mesmo a carbamazepina, considerado um poluente persistente, de difícil degradação biológica, apresentou uma remoção da ordem de 99 %. No entanto, o seu metabolito epoxicarbamazepina, não revelou tão elevada redução, ficando pelos 63%, e permanecendo em concentrações acima de 13 ng/L (Huerta-Fontela *et al.* 2011).

De uma maneira geral, os efluentes das ETARs são descarregados para os cursos de água de superfície, nomeadamente rios. É possível que a jusante do local de descarga de uma ETAR exista uma captação para o tratamento e abastecimento de água para consumo humano, a qual poderá ficar contaminada com fármacos em quantidades residuais que não foram totalmente degradados e/ou removidos. Numa compilação de estudos feita por Jones *et al.* (2005), estão referenciados 11 fármacos encontrados na água de consumo humano de vários países: Alemanha, Itália, Reino Unido, Canadá e Estados Unidos da América. Neste estudo, a carbamazepina, o diazepam, o diclofenac e o ibuprofeno foram encontrados em concentrações que variam dos 3 ng/L aos 258 ng/L. Pode-se constatar que o problema da presença de fármacos no ambiente está a aumentar, uma vez que estes compostos não são totalmente removidos nas ETARs e são descarregados continuamente no ambiente, tornando-se poluentes persistentes.

De acordo com Winkler *et al.* (2001), foram feitos estudos nos rios Elba e Saale (Alemanha), e ambos apresentaram contaminação com ibuprofeno. No rio Elba detetou-se ibuprofeno em níveis de $0,087 \text{ mg L}^{-1}$, e também foi detetado o seu metabolito hidroxibuprofeno.

No entanto, deve-se ressaltar que os fármacos aparecem na água potável em concentrações muito baixas, como foi referido. Mesmo consumindo a quantidade recomendada, cerca de dois litros por dia, a dose não chega a ser equivalente a uma prescrição. Apesar de não provocarem efeitos agudos, não se pode excluir a possibilidade de efeitos crónicos (Jones, Lester e Voulvoulis, 2005).

Assim deve investir-se na investigação centrada na remoção de fármacos, nomeadamente nas ETARs domésticas de forma a propor processos de tratamento

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

eficientes, sustentáveis e que não originem subprodutos prejudiciais para o meio ambiente.

1.3. ENQUADRAMENTO LEGAL

Considerando que “A água não é um produto comercial como outro qualquer, mas um património que deve ser protegido, defendido e tratado como tal.”, o Parlamento Europeu, no conselho da União Europeia de 23 de outubro de 2000, adotou a Diretiva 2000/60/CE, que estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política da água. A Diretiva tem como objetivo estabelecer um enquadramento para a proteção das águas de superfície interiores, das águas de transição, das águas costeiras e das águas subterrâneas. Depois de analisadas as características de cada região hidrográfica, registadas as zonas protegidas e identificadas as massas de água a utilizar para tratamento e consumo humano, deve ser garantida a monitorização da qualidade das mesmas.

A Decisão nº 2455/2001/CE do Parlamento Europeu, do conselho de 20 de novembro de 2001 estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água e altera a Diretiva 2000/60/CE. Nesta lista constam 33 substâncias entre metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos halogenados e pesticidas ou herbicidas, mas nenhum fármaco.

A Diretiva 2008/105/CE, de 16 de novembro, relativa a normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, que altera e subseqüentemente revoga as Diretivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE e 86/280/CEE do Conselho, e que altera a Diretiva 2000/60/CE, estabelece normas de qualidade ambiental (NQA) para as mesmas substâncias da lista anterior. Os fármacos ainda não aparecem como substâncias prioritárias.

A Diretiva 2013/39/EU, de 12 de agosto, altera as Diretivas 2000/60/CE e 2008/105/CE no que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água. A Comissão procedeu a uma revisão da lista das substâncias prioritárias, de modo a identificar novas substâncias, determinar NQA para estas substâncias e atualizar as já existentes. A lista das substâncias prioritárias aumentou para 45 e foi estabelecida uma lista de vigilância, para recolha de dados de monitorização para servir de base a novas discussões e estabelecimento de novas prioridades. Nesta lista de vigilância foram incluídos três fármacos (diclofenac, 17alfa-etinilestradiol e 17beta-estradiol). A Decisão

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

de Execução 2015/495, de 20 de março de 2015, vem aumentar o número de fármacos presente na lista de vigilância das substâncias para monitorização, através da inclusão da família de antibióticos dos macrólidos (eritromicina, claritromicina e azitromicina). Atualmente são seis os fármacos presentes na lista de vigilância criada pela União Europeia.

Examinando a lei nacional, o Decreto-Lei n.º 103/2010, de 24 de setembro, estabelece as normas de qualidade ambiental no domínio da política da água, transpondo a Diretiva n.º 2008/105/CE. No que respeita às substâncias prioritárias no domínio da política da água, o Decreto-Lei n.º 218/2015 de 7 de outubro procede à segunda alteração ao Decreto-Lei n.º 103/2010, transpondo a Diretiva n.º 2013/39/UE do Parlamento Europeu para a ordem jurídica nacional.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ECOTOXICOLOGIA/ECOTOXICIDADE

Segundo Carson (1969) “A água também deve ser pensada em termos das cadeias de vida que ela sustenta (...). Podemos nós presumir que os venenos que introduzimos na água deixem de penetrar nestes ciclos de vida da natureza?” O seu livro “Primavera Silenciosa” é considerado um marco na fundação do movimento ambientalista moderno e documenta uma série de descrições de males observados após o uso de inseticidas (Glausiusz, 2007). O termo ecotoxicologia foi definido pelo médico René Truhaut em 1977 como o ramo da toxicologia que envolve os efeitos causados por poluentes naturais ou sintéticos em cada um dos componentes dos ecossistemas como parte de um todo, inclusive humanos (Truhaut, 1977).

Os fármacos foram desenvolvidos para o tratamento da saúde humana e animal, no entanto, os organismos não-alvo estão sujeitos a possíveis efeitos após a sua libertação no ambiente, devido a estes partilharem com o homem e os animais recetores, biomoléculas e vias metabólicas semelhantes (Richardson & Ternes 2014). Uma vez que todas as substâncias são potenciais venenos (Paracelso, séc. XVI), mesmo em doses mínimas, depois de utilizados os fármacos são libertados para o ambiente, podendo tornar-se prejudiciais para os organismos não-alvo. Nos últimos anos os investigadores têm focado a sua atenção neste problema emergente tendo sido publicados muitos estudos sobre esta temática.

Um estudo realizado por Cleuvers (2003) com fármacos de prescrição comum, entre eles a carbamazepina, avaliou os seus efeitos em três organismos pertencentes a classes taxonómicas distintas: a *Daphnia magna*, um cladóceros – pequeno crustáceo de água doce; a *Desmodesmus subspicatus*, uma clorófita – microalga verde; e a *Lemna minor*, uma macrófita – planta aquática. Para a *Daphnia* avaliou-se a sua imobilização aguda, após 48 h; enquanto que para a *D. subspicatus* e a *L. minor* avaliou-se a inibição do crescimento, em três e sete dias, respetivamente. Os resultados mostraram uma concentração efetiva para 50% dos organismos (CE₅₀) maior do que 100 mg/L para a *Daphnia*, 74 mg/L para a *D. subspicatus* e 25,5 mg/L para a *L. minor*, sendo os dois últimos pertencentes ao intervalo 10–100 mg/L, estando classificados como nocivos. Avaliando a toxicidade da carbamazepina numa mistura

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

com ácido clofíbrico (um antilipídico), os resultados foram muito mais acentuados do que o esperado a partir dos testes individuais para a *Daphnia*. Utilizando uma concentração de carbamazepina de $CE_{50}/2$, a imobilização da *Daphnia* foi de 12%. Para a mesma concentração na mistura dos fármacos, a imobilização atingiu os 50%. No entanto, a inibição de crescimento da alga, no ensaio com carbamazepina numa concentração de $CE_{50}/2$, foi de 13% e na mistura de fármacos diminuiu para 9% (Cleuvers, 2003).

Os perigos da presença de quantidades residuais de fármacos no ambiente são atualmente uma preocupação no campo da ecotoxicologia no que concerne aos organismos não-alvo. A sensibilidade de sete espécies de diferentes níveis tróficos, de água doce e marinhas, foi investigada utilizando os antidepressivos fluoxetina, sertralina e clomipramina (Minguez *et al.*, 2014). Um dos objetivos deste estudo foi a comparação de sensibilidade entre os organismos. Os ensaios selecionados foram o teste de inibição de crescimento (72 h) das algas *Skeletonema marinoi* e *Pseudokirchneriella subcapitata*, o teste de imobilização (48 h) dos microcrustáceos *Artemia salina* e *Daphnia magna*, testes de desenvolvimento e sobrevivência de adultos (96 h) em *Hydra attenuata* (cnidário de água doce), testes de embriotoxicidade (36 h) e metamorfose (24 h) em *Crassostrea gigas* (ostra-do-pacífico), e ensaios *in vitro* em culturas primárias de hematócitos de *Haliotis tuberculata* (molusco marinho). Os resultados mostraram um intervalo de toxicidade bastante alargado: CE_{50} desde 4,70 µg/L clomipramina para *S. marinoi*, até maior do que 100 mg/L clomipramina para *A. salina*. Os organismos mais sensíveis foram as algas e a ostra do pacífico, *C. gigas*, no teste de embriotoxicidade. Comparando os valores de toxicidade dos três fármacos, a sertralina apresenta a maior taxa de toxicidade em todas as espécies estudadas. A equipa de trabalho deste estudo ainda sugere testes de toxicidade crónica com mais espécies de organismos. Mais estudos como o sugerido tornar-se-ão valiosos para a obtenção de conclusões mais apuradas nesta questão da ecotoxicidade no sentido de proteção dos ecossistemas aquáticos.

2.2.MICROALGAS

As microalgas são algas microscópicas, também chamadas micrófitas. Encontram-se na coluna de água ou nos sedimentos, existindo espécies de água doce e espécies marinhas. As microalgas são organismos unicelulares e, conforme a

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

espécie, apresentam-se isolados, em colônias ou filamentos, proporcionando dimensões que podem variar de alguns micrómetros (μm) para algumas centenas de micrómetros. Contrariamente às plantas, as microalgas não têm raízes, caules e folhas. No entanto, à semelhança das primeiras, as suas células são providas de clorofila e assim são capazes de realizar a fotossíntese (Zeitzschel, 1978; Thurman, 2001). São importantes para a vida na Terra, uma vez que produzem oxigénio ao utilizar o dióxido de carbono para o seu próprio crescimento, são, por isso, organismos autotróficos. Também são significativas por constituírem a base de várias cadeias alimentares do meio aquático e assim fornecerem energia para os níveis tróficos superiores (Thrush *et al.*, 2006; Ramakrishnan *et al.*, 2010). Assim, um efeito tóxico que afete a base da estrutura vai provocar consequências nos níveis tróficos seguintes (Minagh *et al.*, 2009).

2.2.1. *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA*

A microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* é também conhecida pelas denominações mais antigas *Selenastrum capricornutum* ou *Raphidocelis subcapitata*. Na classificação filogenética, pertence à Divisão/Filo: Chlorophyta; Classe: Chlorophyceae; Ordem: Sphaeropleales (CCAP, 2014). Esta microalga é altamente sensível à contaminação de ambientes aquáticos, e por esta razão é recomendada, pela EPA (United States Environmental Protection Agency) e OECD, como um organismo padrão em testes de ecotoxicidade (Vannini *et al.*, 2011).

Os testes de toxicidade, padronizados para cada espécie, constituem um modo de projeção dos perigos a que possam estar sujeitos os organismos não-alvo a uma determinada substância ou conjunto de substâncias. Conjuntamente com a avaliação da presença de um determinado composto, estes testes constituem a base para o estabelecimento de critérios de qualidade da água, com o objetivo de proteger a vida aquática da atividade antropogénica (Brooks *et al.*, 2003a, 2003b). Assim sendo, e tendo em consideração que os critérios de qualidade da água ainda não contemplam os psicofármacos, têm sido realizados estudos no sentido de previsão de risco ambiental. Na Tabela 2.1 é apresentada uma revisão de estudos realizados com alguns dos psicofármacos já mencionados.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Tabela 2.1: Exemplos de estudos realizados com *P. subcapitata* e psicofármacos

Fármaco	Ensaio	Ponto final	Resposta	Referência
Fluoxetina	Inibição de crescimento, 96 h	CE ₅₀	24 µg/L	(Brooks <i>et al.</i> , 2003) (Brooks <i>et al.</i> , 2003a)
Fluoxetina / Sertralina	Inibição de crescimento, 96 h	CI ₁₀ CI ₅₀	31,34 / 44,99 µg/L 4,57 / 12,10 µg/L	(Johnson <i>et al.</i> , 2007)
Fluoxetina / Sertralina	Inibição de crescimento, 72 h	CE ₅₀ CE ₂₀ CE ₁₀	200 / 150 µg/L 120 / 100 µg/L 90 / 70 µg/L	(Minguez <i>et al.</i> , 2014)
Sertralina	Inibição de crescimento, 72 h	CE ₅₀ CENO CEO	140 µg/L 50 µg/L 75 µg/L	(Minagh <i>et al.</i> , 2009)
Carbamazepina	Inibição de crescimento, 96 h	CENO CEO	> 100 000 µg/L > 100 000 µg/L	(Ferrari <i>et al.</i> , 2003)
Carbamazepina	Inibição de crescimento, 96 h	CE ₅₀	> 100 000 µg/L	(Ferrari <i>et al.</i> , 2004)
Carbamazepina	Inibição de crescimento, 72 e 96 h	CI ₁₀	161,2(± 64,0) mg/L	(Aguirre-Martínez <i>et al.</i> , 2014)
Carbamazepina (numa mistura de 13 fármacos)	Inibição de crescimento, 72 h	Concentração de clorofila a e b	Alterações nos cloroplastos	(Vannini <i>et al.</i> , 2011)
Fluoxetina Sertralina Citalopram Paroxetina	Inibição de crescimento, 48 h	CE ₅₀	0,027 mg/L 0,043 mg/L 1,6 mg/L 0,14 mg/L	(Christensen <i>et al.</i> , 2007)
Carbamazepina	Transferência na cadeia trófica	Bioacumulação	10,2 mg/g de biomassa seca	(Vernouillet <i>et al.</i> , 2010)

CE - concentração efetiva, sendo CE₅₀, CE₂₀ e CE₁₀ os efeitos observados em 50, 20 e 10 % dos organismos do teste, respetivamente; CI - concentração de inibição, CI₅₀ e CI₁₀, referem-se à inibição de crescimento em 50 e 10 % dos indivíduos submetidos ao teste, respetivamente. CENO - concentração de efeito não observado, a concentração mais elevada que não causa inibição de crescimento; CEO - concentração de efeito observado, sendo esta a menor concentração que causa efeito nos organismos do teste.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Na seleção de artigos que descrevem estudos com a microalga *P. subcapitata* e psicofármacos, a fluoxetina é um dos antidepressivos mais utilizados pelo homem, conseqüentemente aparece num maior número de estudos, uma vez que foi dos primeiros ISRS a ser desenvolvido e continua a ser comercializado (Wong, Bymaster e Engleman, 1995). Outra provável razão está ligada às propriedades antibacterianas que os ISRS mostram, sendo potencialmente mais tóxicos do que os seus antecessores, situação registada também com a sertralina e a paroxetina (Munoz-Bellido, Munoz-Criado e Garcia-Rodriguez, 2000). Segundo Brooks *et al.* (2003a), nos Estados Unidos da América (EUA), uma concentração estimada de 0,012 µg/L de fluoxetina foi detetada nas águas superficiais, sendo que a concentração nos efluentes pode atingir 0,54 µg/L. Os organismos selecionados para o estudo foram a microalga *P. subcapitata*, os cladóceros *Ceriodaphnia dubia* e *D. magna* e o peixe *Pimephales promelas*. Relativamente à microalga, os ensaios realizados foram de inibição de crescimento (96 h). Foi obtido um CE₅₀ de 24 µg/L (Brooks *et al.*, 2003a, 2003b) e um CEO de 13,6 µg/L (Brooks *et al.*, 2003a). Os efeitos adversos observados são relativos a concentrações mais elevadas do que aquelas detetadas nos efluentes, no entanto, não deixam de ser preocupantes, já que os fármacos estão continuamente a ser descarregados no ambiente.

O estudo realizado por Johnson *et al.* (2007), com os fármacos fluoxetina e sertralina, concluiu que a sertralina é ainda mais tóxica para a alga do que a fluoxetina. No teste de inibição de crescimento, referido como o pior caso, com um ponto final referido como concentração de inibição (CI), CI₁₀/96 h de 4,6 µg/L enquanto que para o mesmo ponto final para a fluoxetina, o resultado foi de 31,3 µg/L. Os resultados para CI₅₀ foram no mesmo sentido, isto é, piores para a sertralina do que para a fluoxetina, com valores de 12,10 e 44,99 µg/L, respetivamente.

Num estudo mais recente com sertralina, um conjunto de ensaios com organismos de vários níveis tróficos registou resultados comparativos para a sensibilidade entre *P. subcapitata*, *D. magna*, *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* e *Oncorhynchus mykiss* (Minagh *et al.*, 2009). Apenas a *D. magna* revelou maior sensibilidade do que a alga *P. subcapitata*. Nos ensaios de mortalidade e reprodução, a 21 dias com o microcrustáceo, os valores de CE₅₀ foram 0,066 mg/L e 0,12 mg/L, respetivamente. Já o CE₅₀ obtido para a alga num teste de inibição de crescimento/72 h, foi de 0,14 mg/L.

Numa comparação entre bioensaios com sete organismos, marinhos e de água doce, e três fármacos, fluoxetina, sertralina e clomipramina, a *P. subcapitata* foi

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

classificada como particularmente sensível (Minguez *et al.*, 2014), tendo sido estabelecida uma escala, do mais ao menos sensível, na seguinte ordem: *S. marinoi*, *C. gigas*, *P. subcapitata*, *D. magna*, *H. tuberculata*, *Hidra attenuata* e *A. salina*. No ensaio de inibição de crescimento da *P. subcapitata*, 72 h de exposição, a sertalina apresenta a toxicidade mais baixa ($CE_{50} = 150 \mu\text{g/L}$). Considerando o organismo mais sensível, a alga *S. marinoi*, para o mesmo ponto final a CE_{50} foi de $4,70 \mu\text{g/L}$, referente à clomipramina. Com a *A. salina*, o organismo menos sensível, o ensaio realizado foi de imobilização, 48 h e apresentou uma CE_{50} maior do que 100 mg/L , também referente à exposição à clomipramina.

A carbamazepina também foi alvo de estudos, sendo avaliado o impacto ambiental em seis organismos de diferentes níveis tróficos, incluindo a alga *P. subcapitata*. Para o ponto final inibição de crescimento da alga, foram avaliados CE_{50} e CENO, ambos com resultados acima de $10000 \mu\text{g/L}$, não sendo registado como o organismo mais sensível (Ferrari *et al.*, 2004). Além disso, foram monitorizadas sete ETARs em França, Grécia, Itália e Suécia, e a concentração de carbamazepina no efluente tratado variava entre $0,30$ e $1,20 \mu\text{g/L}$. Com a obtenção destes dados e considerando a contínua utilização do fármaco, bem como as taxas de remoção, foi calculada a estimativa de risco, através da razão entre a concentração previsível de exposição (PEC) e a concentração previsível de efeito não-observado para o menor valor registado (PNEC). Para a carbamazepina, a razão PEC/PNEC alcançou um valor de 47 para o pior cenário possível, muito superior a 1, valor considerado como suspeita de risco, de acordo com a Diretiva 93/67/CEE. Num estudo complementar, Ferrari *et al.* (2004) sugere que a avaliação, no caso dos fármacos, deve ser preferencialmente feita com base em testes de efeito crónico e não agudo. Considerando a carbamazepina, a justificação para esta escolha resulta da persistência no ambiente e possível bioacumulação. No entanto, a legislação atualizada pelo Regulamento (CE) nº 1907/2006 ainda permite a escolha entre os testes de efeito crónico ou agudo.

Uma outra crítica acerca do sistema de avaliação de risco ambiental, publicada por Aguirre-Martínez *et al.* (2014), refere que os testes de inibição de crescimento com microalgas não são suficientemente sensíveis para detetar o efeito dos fármacos porque o modo de ação dos mesmos está previsto para atuação no ser humano. Na investigação realizada consideraram as larvas como organismos mais sensíveis, uma vez que, ao perderem a membrana protetora estão totalmente expostos às substâncias tóxicas. Por outro lado, as microalgas são amplamente utilizadas em testes de

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

ecotoxicidade e recomendadas em várias normas de ensaios e estatutos. Para além disso, fazem parte do primeiro nível trófico e são organismos produtores de oxigénio, importantes características para a ponderação da utilização deste tipo de organismo nos testes de ecotoxicidade, bem como fazem parte de avaliações de risco ambiental, apesar de mostrarem menor sensibilidade do que outros organismos.

No sentido de reproduzir as condições encontradas no ambiente aquático, foi preparada uma mistura de 13 fármacos, incluindo a carbamazepina (Pomati *et al.*, 2006). Esta mistura foi utilizada num estudo com a alga *P. subcapitata*, tendo como objetivo a avaliação de efeitos tóxicos. Além da inibição de crescimento, também foi monitorizado o conteúdo de pigmentos, clorofila a, clorofila b e carotenoides por espectrofotometria (Vannini *et al.*, 2011). Quanto à inibição de crescimento, não foi identificada uma alteração significativa das células expostas à mistura, em comparação com a amostra de controlo. No entanto, foi observado um aumento da concentração de clorofila b. Os resultados mostram que a ausência de alteração no crescimento não é suficiente para excluir outros efeitos fisiológicos em organismos não-alvo.

Para realizar uma comparação entre compostos, Christensen *et al.* (2007) relacionaram os fármacos numa classificação de toxicidade crescente: citalopram, paroxetina, sertralina e fluoxetina. Para tal, foram realizados ensaios de inibição de crescimento, 48 h, com a microalga *P. subcapitata*. As respostas para CE₅₀ variaram entre 0,027 e 1,6 mg/L. Os autores referem que estes fármacos deveriam ser classificados como tóxicos para o ambiente.

Um estudo de biomagnificação para avaliar a bioacumulação através da cadeia trófica foi realizado em organismos aquáticos com carbamazepina e incluiu a alga *P. subcapitata* (Vernouillet *et al.*, 2010). Constatou-se uma concentração de fármaco de 10,2 mg/mg de biomassa seca após uma exposição de 24 h da alga a uma solução de carbamazepina de 150 mg/L. O fator de bioacumulação após 24 h de exposição (FBA_{24h}), considerado como a razão entre a concentração do fármaco nas células e a concentração do mesmo na solução inicial, foi calculado em 2,2. Na sequência da cadeia trófica, a alga contaminada serviu de alimento para o crustáceo *Thamnocephalus platyurus* durante 24 h. Por sua vez, este serviu de alimento para a *Hydra attenuata* durante 6 h. A acumulação de fármaco foi mais elevada no *T. platyurus*, apresentando um FBA_{24h} de 12,6. Já na *H. attenuata*, foram encontradas apenas quantidades residuais de carbamazepina. Isto pode indicar que a absorção foi fraca ou que existe um

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

metabolismo de desintoxicação. O trabalho revelou a necessidade de mais investigações para verificação de efeitos de longo prazo à exposição ao fármaco.

Após a análise dos estudos mencionados, foi possível verificar que a comunidade científica está de acordo que os efeitos adversos nos organismos não-alvo são uma realidade e que os psicofármacos tendem a ser perigosos para o ambiente. Apesar das concentrações determinadas no ambiente estarem situadas abaixo dos valores considerados prejudiciais, a verdade é que o consumo se mostra cada vez mais alargado, estando estes compostos a ser continuamente introduzidos no ambiente. Portanto, e uma vez que estes compostos não podem ser banidos da utilização pelas pessoas que deles necessitem, a estratégia mais adequada será a de melhoria das técnicas de remoção dos mesmos.

2.3. NOVOS MATERIAIS PARA A REMOÇÃO DE PSICOFÁRMACOS DAS ÁGUAS RESIDUAIS

As evidências relatadas de que os psicofármacos estão presentes em quantidades residuais nas águas superficiais, mostram a necessidade, e talvez urgência, em aumentar a investigação na área do tratamento deste tipo de compostos. Os sistemas convencionais de tratamento de águas residuais não dão a resposta necessária, assim sendo, há necessidade de desenvolver processos de tratamento eficientes, sustentáveis e, se possível, económicos.

Na última década do século XX observou-se um crescimento alucinante na área da nanotecnologia e espera-se que possa vir a contribuir para o tratamento de águas contaminadas por fármacos. As partículas da ordem de alguns nanómetros podem ter propriedades diferenciadas daquelas observadas em escala macroscópica (Zarbin e Oliveira, 2013). A redução do tamanho das partículas a dimensões nanométricas aumenta a área superficial do material, melhorando o tempo de resposta e a eficiência em aplicações de interface sólido-líquido (Eder, 2010), como é o caso do tratamento de águas residuais.

O grafeno é uma estrutura sólida e lamelar de carbono, em camada única, em que cada átomo de carbono está ligado a outros três, numa espécie de favo de mel. Esta estrutura revela excelentes características para aplicações na área da eletroquímica, aliada a uma elevada área superficial específica e ainda com a capacidade de funcionar como suporte para outras espécies de materiais. Entre outras variadíssimas aplicações, o grafeno é um material que pode ser utilizado em processos

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

de tratamento de águas, nomeadamente como fotocatalisador na decomposição de compostos orgânicos (Zarbin e Oliveira, 2013).

Os polioxometalatos (POMs) constituem uma classe de materiais inorgânicos com excepcionais funcionalidades e aplicações em diversos campos, por exemplo catálise, sensores, bioquímica, materiais fotocromáticos, entre outros (Luo e Yang, 2011). Aglomerados volumosos de iões, com uma estrutura central tetraédrica de fosfato (PO_4), rodeado de 12 oxoaniões de molibdénio formam uma estrutura fechada e são conhecidos por estrutura de Keggin (Cuentas-Gallegos *et al.*, 2006). Os iões fosfomolibdato (PMo_{12}) e posteriormente com substituições de um ou dois átomos de molibdénio por vanádio (PMo_{11}V , $\text{PMo}_{10}\text{V}_2$), outro metal de transição, podem apresentar-se na forma de sais de tetrabutílamónio. Estes iões revelam propriedades eletroquímicas favoráveis para a aplicação em reações de oxidação-redução. Uma das suas propriedades é a capacidade para sofrer reduções multi-reversíveis de valência, levando à formação de espécies de valência mista, ou seja, favorável em termos de propriedades eletrocatalíticas (Fernandes e Freire, 2015), consistente com a necessidade já referida da oxidação dos compostos orgânicos. Os nanocompósitos, baseados na imobilização destes POMs em flocos de grafeno (POM@GF), são materiais ainda mais estáveis e com melhores propriedades eletroquímicas que os POMs, além disso, a espectroscopia de raios X revelou que os POM@GF são mais sensíveis à fotorredução. Também foram avaliadas as propriedades eletrocatalíticas na oxidação do ácido ascórbico, sendo os elétrodos de POMs e POM@GF usados na determinação deste ácido (Fernandes e Freire, 2015). Estas propriedades revelam-se essenciais para o processo de oxidação dos fármacos usando estes nanocompósitos como fotocatalisadores. Assim revela-se promissora a utilização dos POMs e POM@GF em tratamentos de afinação para a remoção de fármacos de águas residuais.

Por outro lado, a utilização em larga escala destes novos materiais no domínio do tratamento da água pode ter consequências no ambiente. Talvez por ser tão recente ainda não existe legislação específica referente ao uso de nanomateriais. Por isso, e numa perspetiva de segurança ambiental, os novos materiais devem ser avaliados no sentido de determinar a interação com organismos vivos, nomeadamente toxicidade aguda e crónica, antes de serem produzidos para comercialização, conforme recomenda o *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS) (UN, 2015).

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

3. DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

3.1. PRINCÍPIO DO MÉTODO DE ENSAIO

Os ensaios foram realizados de acordo com o teste de inibição para algas, que se encontra descrito no Regulamento CE 440/2008 da Comissão, de 30 de maio de 2008, que estabelece métodos de ensaio nos termos do Regulamento (CE) nº 1907/2006, do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas. Adicionalmente, também serviu de orientação o *OECD, test nº 201 Guidelines for the Testing of Chemical, Freshwater Alga and Cyanobacteria Growth Inhibition Test* (OECD, 2011).

O princípio do teste baseia-se na determinação do efeito no crescimento, ou na inibição deste, numa cultura de alga exposta a uma dada substância ou mistura de substâncias. A resposta, inibição de crescimento, é avaliada em função da concentração do material de exposição comparativamente a uma cultura de controlo. A cultura deve estar em fase de crescimento exponencial, sob condições de fornecimento de nutrientes, iluminação e temperatura ideais e num período de tempo suficiente para poder avaliar os efeitos durante várias gerações, sendo considerado um teste crónico. A duração dos testes foi de 72 h.

3.2. SUBSTÂNCIAS DE TESTE

3.2.1. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Foi feito um ensaio prévio com uma substância de referência, o dicromato de potássio, para demonstrar que, nas condições do ensaio, a sensibilidade da espécie de alga utilizada não se alterou significativamente. Ou seja, as culturas de controlo apresentaram uma taxa de crescimento de acordo com os valores de referência definidos pelo método. A sensibilidade da alga *P. subcapitata* foi verificada, sendo obtido um valor para CE_{50} (0-72 h) de 0,51 mg/L, que se encontra dentro dos limites referidos no Regulamento (CE) nº 440/2008 (0,20 – 0,75 mg/L). Os resultados do ensaio encontram-se no Anexo A.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

3.2.2. CLORIDRATO DE VENLAFAXINA

O fármaco utilizado neste trabalho foi a venlafaxina, na forma de cloridrato de venlafaxina ($C_{17}H_{27}NO_2 \cdot HCl$), com grau de pureza 99,9%, obtido de *USP, reference standard* (EUA), com número CAS 99300-78-4 (*Sigma-Aldrich*, 2016).

A substância apresenta massa molecular de 313,86 g/mol, sendo francamente solúvel em água, 572 mg/mL (a 25 °C) (*PubChem*, 2016b). Apresenta um coeficiente de partição n-octanol/água de 2,74, demonstrando afinidade pela fase orgânica. Na figura 3.1 está ilustrada a estrutura química da venlafaxina.

Uma solução mãe de venlafaxina foi preparada dissolvendo o fármaco diretamente em meio de cultura. Posteriormente foi utilizada na preparação das diferentes concentrações utilizadas no ensaio. Esta técnica foi utilizada para que o meio de cultura não ficasse diluído e os nutrientes se encontrassem na concentração correta nas culturas de ensaio. O fármaco revelou-se quimicamente estável nas condições do teste, sem alteração significativa das concentrações em solução nos ensaios em branco desenvolvidos paralelamente ao teste de ecotoxicidade.

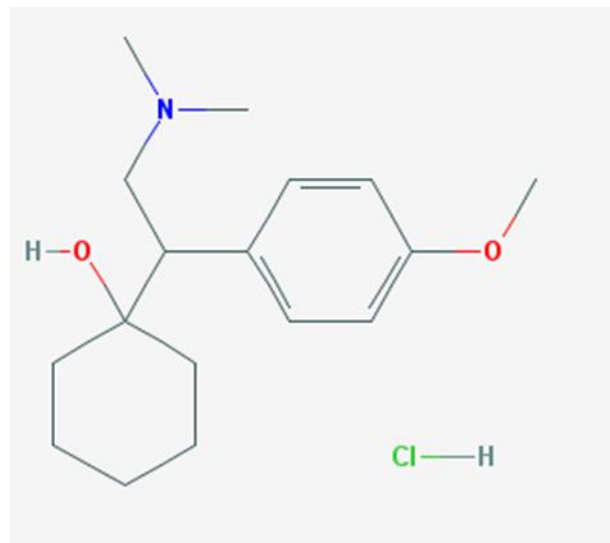


Figura 3.1: Estrutura química da venlafaxina (Pubchem, 2016b)

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

3.2.3. NANOMATERIAIS EM FASE DE TESTES PARA FUTURA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

O grafeno, os POMs, ($\text{PMo}_{10}\text{V}_2$, PMo_{11}V , PMo_{12}) utilizados na forma de sais de tetrabutílamónio, bem como os compósitos imobilizados em flocos de grafeno ($\text{PMo}_{10}\text{V}_2@\text{GF}$, $\text{PMo}_{11}\text{V}@\text{GF}$, $\text{PMo}_{12}@\text{GF}$) foram cedidos pela Professora Doutora Ana Cristina Freire, investigadora do REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Os POMs imobilizados em flocos de grafeno foram preparados pela Doutora Diana Fernandes, no âmbito do seu projeto de pós-doutoramento, financiado pela Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT), com referência SFRH/BPD/111264/2015, que, tal como o presente trabalho, está inserido no projeto FCT-Austin FOTOCATGRAF, com referência UTAP-ICDT/CTM-NAN/0025/2014.

Estes materiais revelaram-se praticamente insolúveis no meio de cultura, sendo determinada a variação da condutividade no meio aquoso em que foram dispersos, que sustenta esta hipótese.

Os materiais compósitos híbridos ($\text{POM}@\text{GF}$) revelaram-se mais sensíveis à fotorredução do que os POMs livres. De acordo com Fernandes e Freire (2015), ficou comprovada a reprodutibilidade e estabilidade dos elétrodos preparados, bem como as vantagens em termos das suas características eletroquímicas. Uma vez que as propriedades estruturais mantêm-se e as propriedades eletroquímicas mostram-se reforçadas, estes novos materiais apresentam potencial para serem usados na oxidação dos fármacos.

3.3. ORGANISMOS DE ENSAIO

A cultura da alga *P. subcapitata*, estirpe 278/4, (figura 3.2) foi originalmente obtida através do *Culture Centre of Algae and Protozoa* (Reino Unido). Procedeu-se à transferência da microalga para matrizes de vidro com rolha estéril de algodão cardado e gaze e protegidos com folha de alumínio, de modo a permitir trocas gasosas e evitar contaminações com outros microrganismos. A figura 3.3 ilustra os matrizes com as culturas. As culturas de alga de reserva foram mantidas em meio de cultura, que será descrito na secção 3.4.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

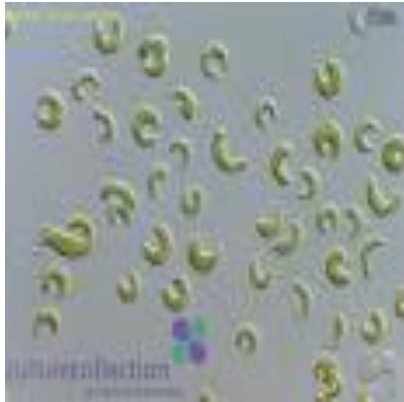


Figura 3.2: *P. subcapitata*



Figura 3.3: Culturas de *P. subcapitata*

3.4. CONDIÇÕES FÍSICAS DOS ENSAIOS

A temperatura foi controlada para 22 °C, com variação de $\pm 2^\circ\text{C}$, recorrendo a um aparelho de ar condicionado (Sanyo, 105ASP01). Durante o decorrer de todo o trabalho foram feitas verificações periódicas da temperatura da sala onde decorriam os ensaios com um termómetro químico (Nahita, $-10/110^\circ\text{C}$) posicionado próximo das culturas de algas. A intensidade luminosa necessária foi proporcionada por quatro lâmpadas fluorescentes geradoras de luz branca universal (Osram, L36W/865) a uma distância de 0,35 m das culturas de algas.

3.5. MEIO DE CULTURA

As culturas de algas desenvolveram-se em meio de cultura capaz de proporcionar substrato e promover o seu crescimento. O meio de cultura foi preparado conforme as orientações do Regulamento já mencionado anteriormente. Foram preparadas quatro soluções de reserva, contendo macro e micronutrientes. A solução número um era constituída pelos seguintes macronutrientes: 1,5 g/L de cloreto de amónio, NH_4Cl (Merck); 1,2 g/L de cloreto de magnésio hexahidratado, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de-Haen); 1,8 g/L de cloreto de cálcio dihidratado, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck); 1,5 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck); e 0,16 g/L de dihidrogenofosfato de potássio, KH_2PO_4 (Alfa Aesar). A solução número 2 era composta

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

por 80 mg/L de cloreto férrico hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) e 100 mg/L de etilenodiaminotetracetato dissódico dihidratado, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fluka). A solução número três incluía os seguintes micronutrientes: 185 mg/L de ácido bórico, H_3BO_3 (VWR); 415 mg/L de cloreto de manganésio tetrahidratado, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Fluka); 3 mg/L de cloreto de zinco, ZnCl_2 (Merck); 1,5 mg/L de cloreto de cobalto hexahidratado, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich); 0,01 mg/L de cloreto de cobre dihidratado, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (M & B); e 7 mg/L de molibdato de sódio dihidratado, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck). Por fim, a solução de reserva número quatro foi preparada com 50 g/L de hidrogenocarbonato de sódio, NaHCO_3 (Riedel-de-Haen). A concentração desejada do meio de cultura foi obtida por diluição das soluções de reserva, conforme mostra a tabela 3.1.

Todas as substâncias utilizadas na preparação do meio de cultura eram de grau de pureza elevado, mínimo de 95 % para o sulfato de magnésio, 98 % para o cloreto de cobre hexahidratado e as restantes de 99 %.

A água utilizada na preparação destas soluções foi tratada no desionizador Millipore, modelo Helix 3 (França), para proporcionar uma condutividade inferior a $5 \mu\text{Scm}^{-1}$.

De modo a assegurar condições assépticas, as soluções número um, dois e três foram esterilizadas em autoclave (AJC, modelo uniclave 88, Portugal), a 121°C , durante 20 min. A solução número quatro foi filtrada num filtro de membrana estéril de celulose de $0,45 \mu\text{m}$ de diâmetro de poro (GN-6 metricel®, PALL Gelman, EUA), de forma a evitar a precipitação do hidrogenocarbonato de sódio devido à temperatura elevada na autoclave. As soluções de reserva foram guardadas em frigorífico, ao abrigo da luz e com temperatura de 4°C . Todos os restantes materiais utilizados que entraram em contacto com as culturas de alga, bem como a água para as diluições, também foram esterilizados em autoclave. Toda a preparação do meio de cultura, das culturas de reserva e das soluções de ensaio foram realizadas dentro de uma câmara de fluxo laminar (Faster, modelo two 30, Itália) para evitar contaminações com outros microrganismos.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Tabela 3.1: Concentração de nutrientes (adaptado do Regulamento CE 440/2008)

Componente	Concentração na solução de reserva	Concentração no meio de cultura
Solução nº 1		
NH ₄ Cl	1,5 g/L	15 mg/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2 g/L	12 mg/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,8 g/L	18 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g/L	15 mg/L
KH ₂ PO ₄	0,16 g/L	1,6 mg/L
Solução nº 2		
FeCl ₃ .6H ₂ O	80 mg/L	0,08 mg/L
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	100 mg/L	0,1 mg/L
Solução nº 3		
H ₃ BO ₃	185mg/L	0,185 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	415 mg/L	0,415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L	3 x 10 ⁻³ mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,5 mg/L	1,5 x 10 ⁻³ mg/L
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,01 mg/L	10 ⁻⁵ mg/L
Solução nº 4		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7 mg/L	7 x 10 ⁻³ mg/L
Solução nº 4		
NaHCO ₃	50 g/L	50 mg/L

3.6. PROCEDIMENTO DE ENSAIO

A substância de ensaio foi introduzida em matrizes de 250 mL e dissolvida/dispersa em meio de cultura de modo a formar uma série geométrica de concentrações com razão aproximada de 2 entre as mesmas, não sendo maior do que 2,2. A seguir, foi introduzido o meio de cultura e, por fim, um volume de alga suficiente, e igual em todos os matrizes, obtendo-se uma densidade celular aproximada de 10^4 células/mL e um volume final de 50 mL. Para cada concentração testada foram feitas três repetições, o ensaio também inclui três réplicas de controles, isto é, sem substância de ensaio, e ensaios em branco para cada concentração da substância (em meio de cultura), ou seja, sem alga. Os matrizes foram incubados com rolha estéril de algodão cardado e gaze e protegidos com folha de alumínio, para evitar contaminações e permitir trocas gasosas. Sob as condições de temperatura e intensidade luminosa indicadas no Regulamento (CE) 440/2008, os ensaios decorreram durante 72 h. A agitação das microalgas nos ensaios da venlafaxina foi realizada manualmente, duas vezes por dia, (EPA, 2002). Nos ensaios com os nanomateriais, como as substâncias não são solúveis no meio de cultura, a agitação foi assegurada por um agitador orbital Bunsen AO-400, a uma velocidade de 100 ciclos por minuto.

No início do ensaio foram retiradas amostras de todos os matrizes para efetuar as medições de fluorescência, absorvância e pH das amostras com alga. Nas amostras de controlo de POMs também foi determinada a condutividade de cada concentração com a finalidade de avaliar alteração da condutividade de solução devido à possível dissolução de alguns destes materiais. O controlo da concentração de venlafaxina foi feito por análise cromatográfica por HPLC-FLD, conforme descrito na secção 3.7.3. No final do ensaio as mesmas determinações foram efetuadas em amostras de todos os matrizes. Como critério de qualidade, a substância de ensaio deve permanecer a mais de 80 % do valor inicial de concentração.

A determinação da variação do pH também é um critério de qualidade, não devendo ultrapassar 1,5 unidades nos controlos durante o ensaio para a validação dos mesmos. A variação da condutividade foi a estratégia utilizada para comprovar a fraca solubilidade dos POMs e que as condições da exposição não se alteraram.

O crescimento da biomassa das culturas foi avaliado a partir da determinação da variação da absorvância e da fluorescência, com medições logo após a inoculação e passadas 72 h.

3.7. CONTROLO ANALÍTICO

3.7.1. MEDIÇÃO DE PH

A determinação do pH, no início e final de cada ensaio, foi feita com eletrodo de vidro combinado, ligado ao potenciômetro Crison, microPH 2002 (Espanha).

3.7.2. MEDIÇÃO DE CONDUTIVIDADE

A condutividade foi medida com um multiparameter analyser Consort C861 (Bélgica).

3.7.3. MEDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE VENLAFAXINA

A análise cromatográfica da venlafaxina foi efetuada num HPLC Prominance Shimadzu LC (Shimadzu Corporation, Japão) equipado com uma bomba LC 20AB, um degasificador DGU-20A5, um injetor automático SIL 20A, um forno para coluna CTO-20AC e um detetor de fluorescência RF-10AXL. O software LCsolution (Shimadzu Corporation, Japão) foi utilizado para controlar o sistema cromatográfico e adquirir e tratar os dados cromatográficos. A análise cromatográfica foi realizada utilizando as seguintes condições: coluna cromatográfica Luna C18 (4,6 × 150 mm, tamanho de partícula 5 µm) (Phenomenex, EUA), temperatura da coluna de 35 °C, caudal de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL. Como fase móvel foi utilizada água ultra-pura, acidificada com 0,1 % de ácido fórmico como eluente A, e acetonitrilo como eluente B. O tempo de corrida foi de 14 min, com eluição em gradiente, inicialmente com 10 % de eluente B, atingindo 80 % aos 7 min, retornava às condições iniciais até aos 10 min e era feito o reequilíbrio da coluna nas condições iniciais até aos 14 min. A deteção por fluorescência foi realizada no comprimento de onda de excitação de 274 nm e no comprimento de onda de emissão de 610 nm, que é o par ótimo de emissão/excitação para a venlafaxina.

3.7.4. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA BIOMASSA

Na determinação do crescimento da biomassa, a densidade celular, número de células/mL, é a medida recomendada pelo Regulamento CE 440/2008. A contagem direta de células num microscópio é uma tarefa muito morosa, considerando ainda o

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

número de réplicas e concentrações de ensaio, torna-se impraticável. No entanto outras formas de quantificação podem ser usadas, concentração de biomassa, fluorescência, densidade ótica, desde que seja demonstrada a respetiva correlação (OECD, 2011). Foram então feitas curvas de calibração relacionando a densidade celular com a biomassa, a fluorescência da clorofila e a absorvância a 750 nm, comprimento de onda recomendado pela norma da EPA (2002) para a alga usada.

A contagem direta de células foi feita num microscópio óptico *Leica DM500* (Alemanha), com o auxílio de uma câmara de contagem modelo *Neubauer improved, Blaubrand®* (Alemanha). A densidade celular foi relacionada com a absorvância a 750 nm, medida num leitor de microplacas Biotek Synergy HT, com o *software* Gen5 versão 2.0.18 (EUA). A relação entre as duas medições originou uma curva de calibração com o objetivo de considerar as medições da absorvância em detrimento da contagem de células, por ser um método mais ágil.

A determinação do conteúdo de clorofila *in vivo* por fluorescência é uma medida recomendada pela EPA (2002) pela sua rapidez e sensibilidade. As medições da fluorescência foram feitas com o mesmo leitor de microplacas e programa já referidos. O equipamento possui como fonte de excitação uma lâmpada de tungsténio-halogéneo, para esta determinação foi usado como comprimento de onda de excitação 485 nm e a emissão foi detetada no comprimento de onda de 645 nm. As determinações da fluorescência foram realizadas com um volume de suspensão de 0,25 mL, em triplicado de cada uma das réplicas do ensaio e após 10 segundos de agitação para suspender as microalgas.

Adicionalmente foram construídas as curvas de calibração que relacionam a concentração da biomassa com a absorvância e a concentração da biomassa com a fluorescência. A determinação da biomassa das soluções de alga foi realizada através da filtração das soluções com filtros de microfibras de vidro 696, com retenção de partículas de 1,5 µm (VWR european cat. Nº 516-0875), utilizando uma bomba de vácuo Dinko, D95 (Espanha). Os filtros foram secos em estufa, JP Selecta 2000208 (Espanha), a 50 °C durante 3 h. Os filtros foram pesados em balança semi-analítica Metler Toledo, MS205DU (Suíça) até estabilização do peso.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. INTRODUÇÃO

Um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar experimentalmente os efeitos de quantidades residuais de psicofármacos presentes na água sobre o crescimento da alga *P. subcapitata*, utilizando a venlafaxina como modelo. Por outro lado, os novos nanomateriais que estão a ser atualmente desenvolvidos para remoção de fármacos, nomeadamente de psicofármacos, das águas residuais, também podem ter efeitos adversos no ambiente. Assim, numa perspetiva de segurança ambiental, neste trabalho pretendeu-se também fazer a avaliação dos efeitos destes materiais na microalga *P. subcapitata* antes de serem efetivamente utilizados.

4.2. CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As medições de densidade celular constituem a forma preferencial para determinação do crescimento das algas. No entanto, são admitidas alternativas, desde que se comprove que estão bem correlacionados com a densidade celular (EPA, 2002; OECD, 2011). Foram construídas as curvas de calibração que constataam as correlações necessárias.

A figura 4.1 mostra a correlação entre a densidade celular e a absorvância a 750 nm.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

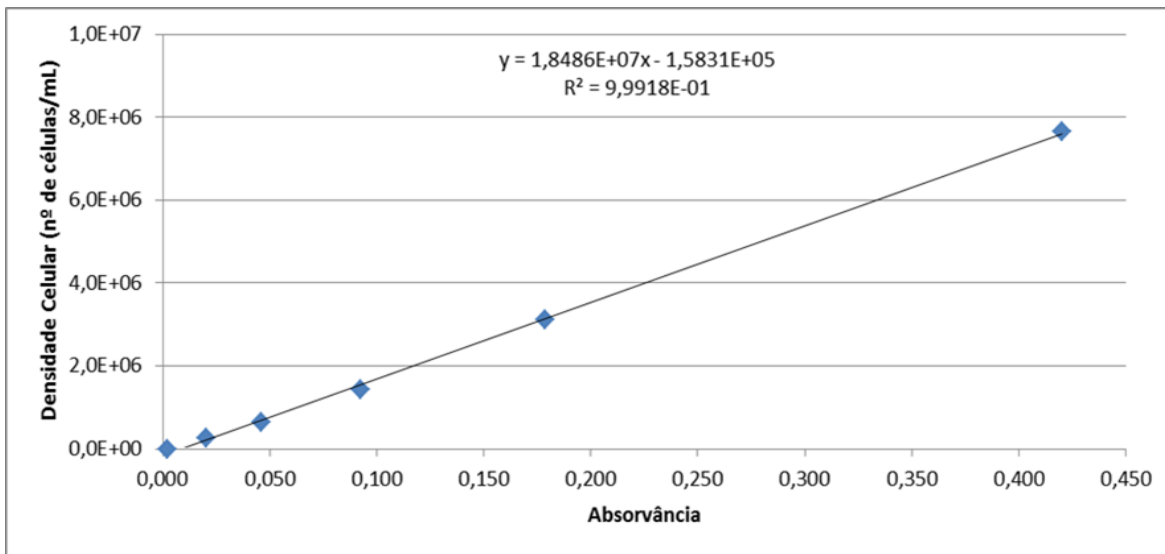


Figura 4.1: Curva de calibração densidade celular x absorvância a 750 nm

A figura 4.2 representa a curva de calibração Densidade Celular x Fluorescência.

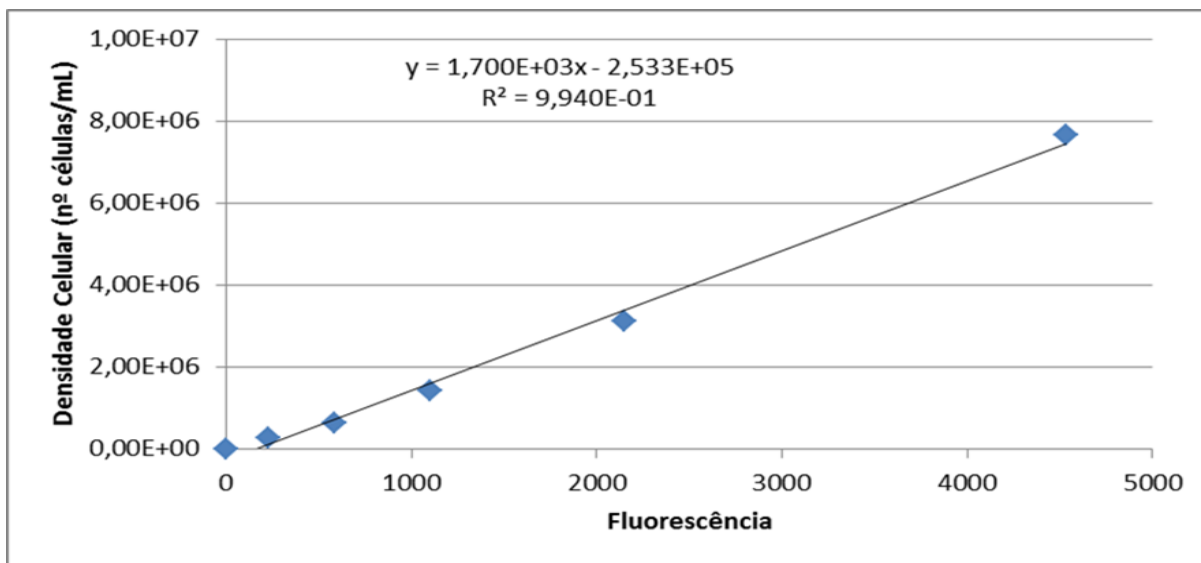


Figura 4.2: Curva de calibração densidade celular x fluorescência

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

A concentração da biomassa foi relacionada com a absorvância a 750 nm originando a curva de calibração representada na figura 4.3.

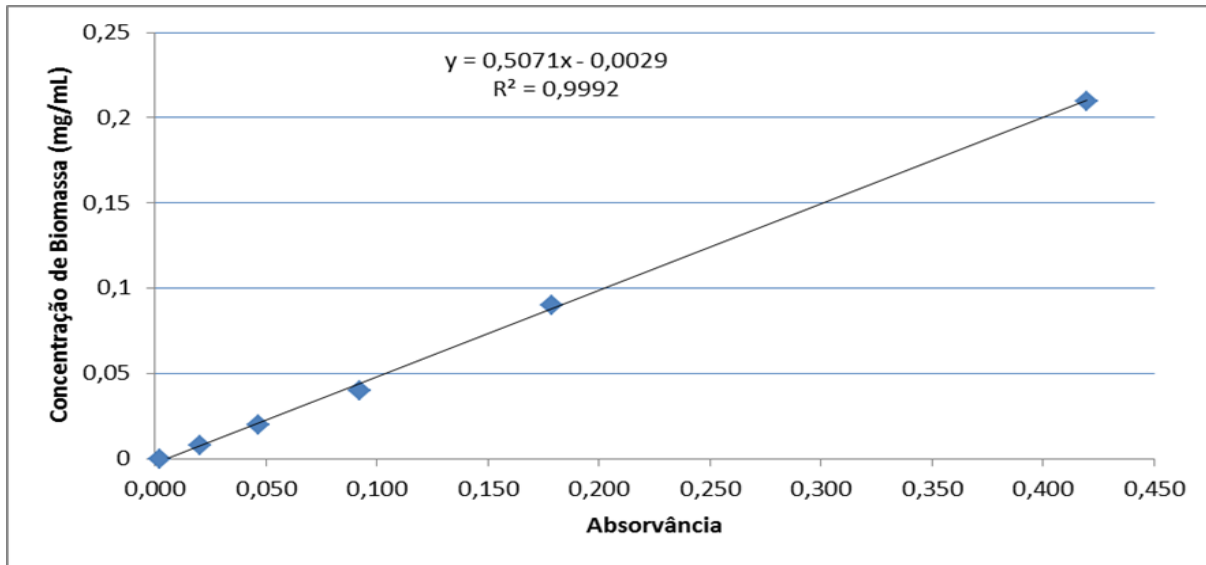


Figura 4.3: Curva de calibração concentração de biomassa x absorvância

A concentração da biomassa foi relacionada com a fluorescência originando a curva de calibração representada na figura 4.4.

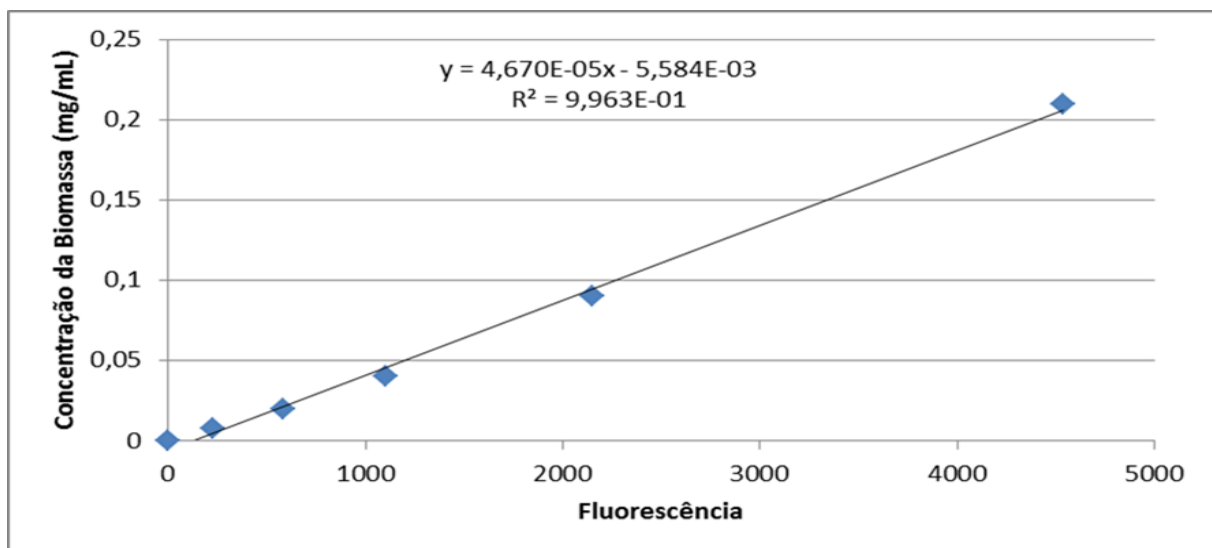


Figura 4.4: Curva de calibração concentração de biomassa x fluorescência

4.3. CRITÉRIOS DE VALIDADE

Os critérios de validade exigidos no Regulamento CE 440/2008 dizem respeito à variação do pH, à taxa de crescimento, à concentração da substância de ensaio ou, se esta for pouco solúvel, a outra medição que confirme a concentração de exposição. Estes parâmetros foram verificados em todos os ensaios.

A variação do pH nos controlos de cada ensaio deve ser inferior a 1,5 unidades. Em todos os ensaios ficou comprovada esta condição. Os dados destas verificações constam no Anexo B.

A densidade celular das culturas deve ser igual ou superior a 10^6 , que corresponde a uma taxa de crescimento específico média (μ) de $0,92 \text{ d}^{-1}$. Esta verificação encontra-se no Anexo C.

A concentração da substância de ensaio deve ser mantida a mais de 80 % do valor inicial. A estabilidade do fármaco foi comprovada por análise cromatográfica, sendo os valores apresentados no Anexo D.

Os restantes materiais testados, grafeno, POMs e POM@GF, revelaram-se fracamente solúveis no meio de ensaio. A condutividade elétrica num meio aquoso está relacionada com a concentração de sais dissolvidos. Se o meio de ensaio apresentar pouca variação em relação a esta característica, pode-se dizer que o material é pouco solúvel. Ficou comprovada a baixa variação de condutividade, verificou-se mais precisamente uma redução deste parâmetro, o que leva a concluir que os materiais não são solúveis. Estes valores estão apresentados no Anexo E.

4.4. CURVAS DE CRESCIMENTO, RELAÇÃO CONCENTRAÇÃO/EFEITO E CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES EFETIVAS

O crescimento das culturas foi determinado a partir da fluorescência da clorofila presente nas células. O aumento da fluorescência está relacionado com o aumento da densidade celular e biomassa, conforme demonstrado nas curvas de calibração. O crescimento corresponde à variação da fluorescência entre o início e o fim do ensaio, ou seja, fluorescência no fim do ensaio menos o valor no início do ensaio. Considerando cada concentração testada, a inibição do crescimento pode ser calculada a partir do crescimento médio das réplicas daquela concentração, comparado com o crescimento médio das réplicas do controlo, como mostra a equação 1.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

$$\text{Inibição \%} = \frac{\Delta F_c - \Delta F_i}{\Delta F_c} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Onde: ΔF_c é a variação da fluorescência média dos controlos e ΔF_i é a variação da fluorescência média para cada concentração.

A redução da fluorescência também foi determinada para cada série de concentrações testadas, sendo a razão entre a fluorescência média de cada concentração e a fluorescência média do controlo. O cálculo foi feito conforme a equação 2.

$$\text{Redução da fluorescência \%} = \frac{\Delta F_i}{\Delta F_c} \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

A escolha do parâmetro fluorescência para a determinação da inibição do crescimento passa não só pela recomendação da EPA (2002) como também pela menor interferência dos materiais testados nas medições realizadas no leitor de microplacas. Estes materiais, com exceção do fármaco, são corados. Os POMs apresentam tonalidades que vão do amarelo ao laranja, o grafeno é cinzento-escuro. Estas cores provocam interferência nas medições da absorvância, não sendo possível obter resultados confiáveis. Esta situação não foi observada na medição da fluorescência.

As curvas de crescimento foram traçadas com a razão de redução da fluorescência versus a concentração testada. Isto é, o crescimento dos controlos corresponde a 100 %, uma vez que não tem agente inibidor. Para cada concentração testada o crescimento será progressivamente menor devido a ação do agente inibidor se a toxicidade do composto se manifestar por inibição do crescimento, caso contrário ocorre uma potenciação.

Seguindo o procedimento sugerido pela norma 201 da OECD (2011) as CE foram estimadas para 50, 20 e 10 % de inibição, a partir da linha de regressão da representação gráfica da inibição de crescimento versus logaritmo da concentração testada. As curvas foram traçadas com folha de cálculo Microsoft® Excel 2010, sendo disponibilizada a equação de regressão utilizada para o cálculo da CE.

4.5. RESULTADOS DOS TESTES DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

Os compostos mencionados em 3.2 foram utilizados nos testes de inibição de crescimento. As taxas de inibição de crescimento, bem como a redução da fluorescência *in vivo* são apresentadas a seguir.

4.5.1. VENLAFAXINA

Os resultados das concentrações determinadas experimentalmente (C), o logaritmo das mesmas (log C), a variação da fluorescência (ΔF), a percentagem de redução (F %) e a inibição de crescimento (I %), obtidos nos testes realizados com a venlafaxina são apresentados na tabela 4.1 As figuras 4.5 e 4.6 ilustram a redução da fluorescência e a inibição do crescimento das culturas de alga expostas à venlafaxina.

Tabela 4.1: Resultados obtidos nos ensaios realizados com a venlafaxina

C (mg/L)	log C	ΔF	F %	I (%)
0		1452	100	0
0,23	-0,631	1525	97,3	2,7
0,44	-0,362	1478	94,3	5,7
0,81	-0,090	1420	90,6	9,4
1,65	0,217	1302	89,7	10,3
3,31	0,520	1194	82,2	17,8
6,95	0,842	1056	72,7	27,3
9,57	0,981	927	63,8	36,2
12,84	1,109	558	38,4	61,6
48,45	1,685	652	31,1	68,9

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

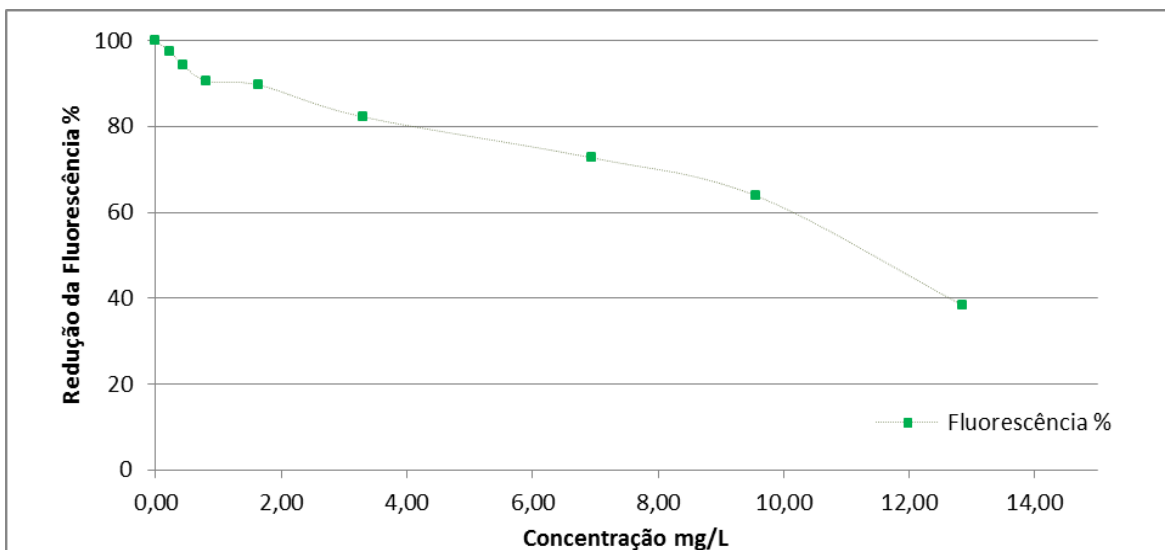


Figura 4.5: Redução da fluorescência em função da concentração de venlafaxina

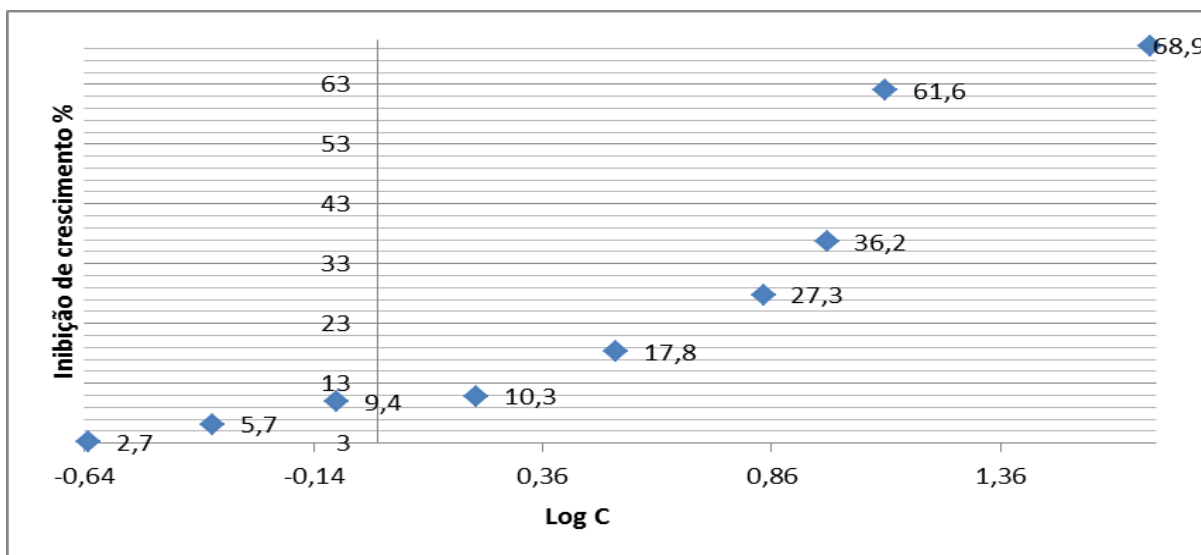


Figura 4.6: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de venlafaxina

Para o cálculo das estimativas dos parâmetros ecotoxicológicos foram feitos outros dois gráficos, tendo em conta um melhor ajuste da regressão linear. Os gráficos encontram-se no Anexo F, onde a figura F.1 mostra o ajuste para o cálculo de CE_{50} , e a figura F.2 mostra o ajuste para estimativa do CE_{20} e do CE_{10} .

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

4.5.2. GRAFENO

Os resultados obtidos no ensaio com as várias concentrações de grafeno (C), o respetivo logaritmo (log C), a variação da fluorescência (ΔF), a percentagem de redução (F %) e a inibição de crescimento (I %), obtidos nos testes realizados com o grafeno são apresentados na tabela 4.2. A figura 4.7 ilustra a redução da fluorescência e a figura 4.8 ilustra a inibição do crescimento das culturas de alga expostas ao grafeno. Para o cálculo do CE_{50} através de regressão linear foram utilizados menos pontos experimentais, tendo sido excluído aquele em que se identifica potenciação no crescimento, como se mostra na figura F.3 do Anexo F.

Tabela 4.2: Resultados obtidos nos ensaios realizados com o grafeno

C (mg/L)	log C	ΔF	F %	I (%)
0,0		1917	100	0
161,3	2,208	2406	125,5	-25,5
201,8	2,305	1381	87,8	12,2
241,3	2,383	1045	54,5	45,5
321,3	2,507	461	24,0	76,0
402,4	2,605	355	22,6	77,4

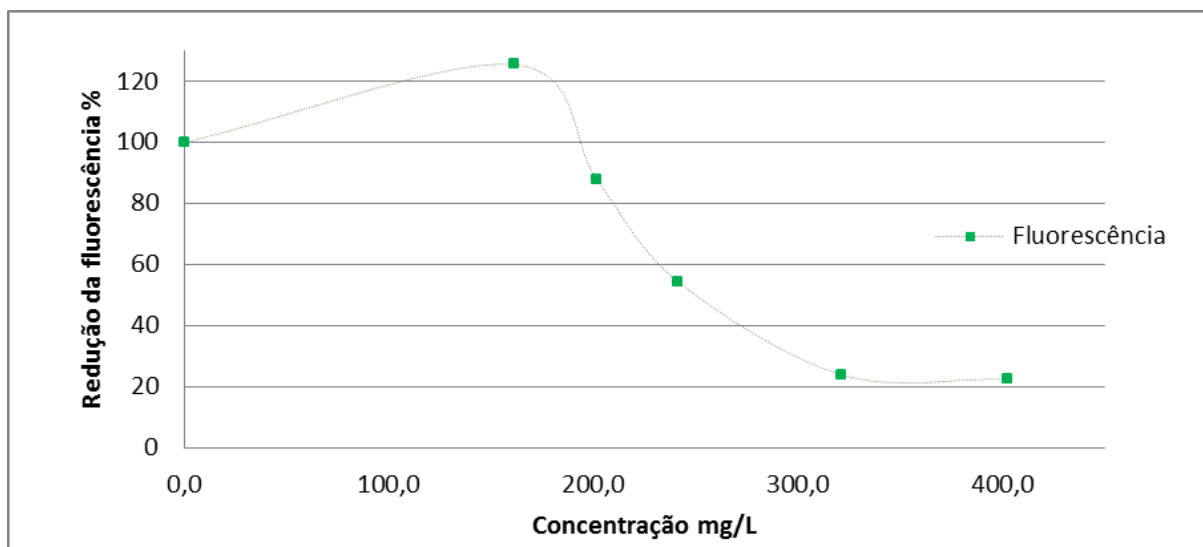


Figura 4.7: Redução da fluorescência em função da concentração de grafeno

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

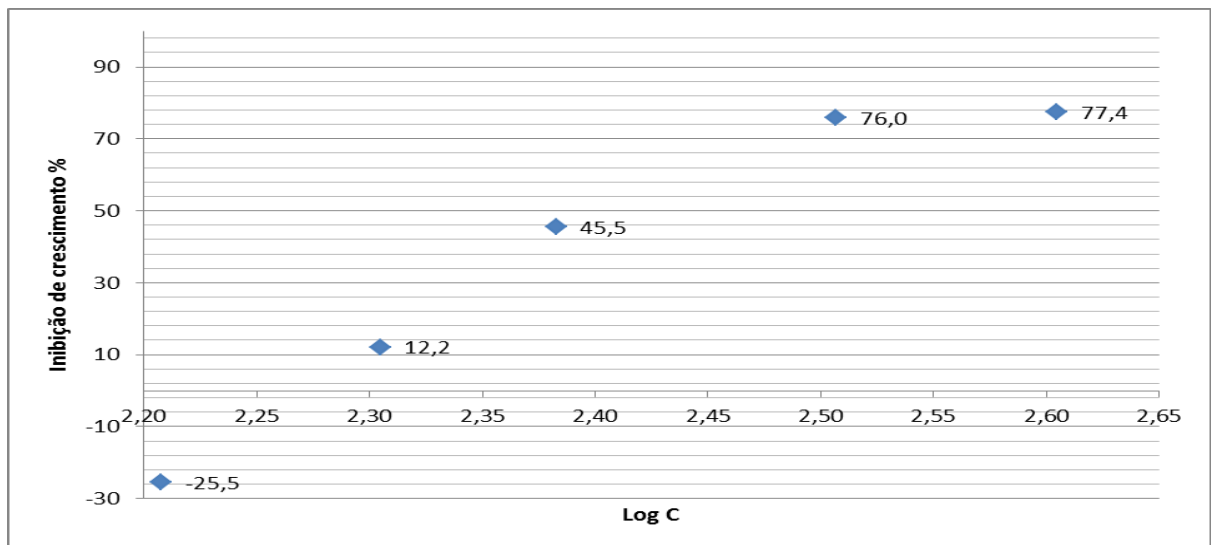


Figura 4.8: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de grafeno

4.5.3. PMO₁₀V₂

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMO₁₀V₂ estão apresentados na tabela 4.3. A figura 4.9 ilustra a redução da fluorescência e a figura 4.10 mostra a inibição de crescimento em função da concentração de PMO₁₀V₂. A equação de regressão linear apresentada na figura 4.12 foi utilizada para a estimativa dos parâmetros ecotoxicológicos CE₁₀, CE₂₀ e CE₅₀.

Tabela 4.3: Resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMO₁₀V₂

C (mg/L)	log C	ΔF	F %	I (%)
0		1270	100	0
2,1	0,315	1133	96,3	3,7
4,6	0,663	931	73,3	26,7
6,3	0,802	873	68,7	31,3
9,4	0,973	678	53,4	46,6
13,2	1,122	508	40,0	60,0
18,4	1,264	360	28,3	71,7
36,2	1,559	126	5,8	94,2

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

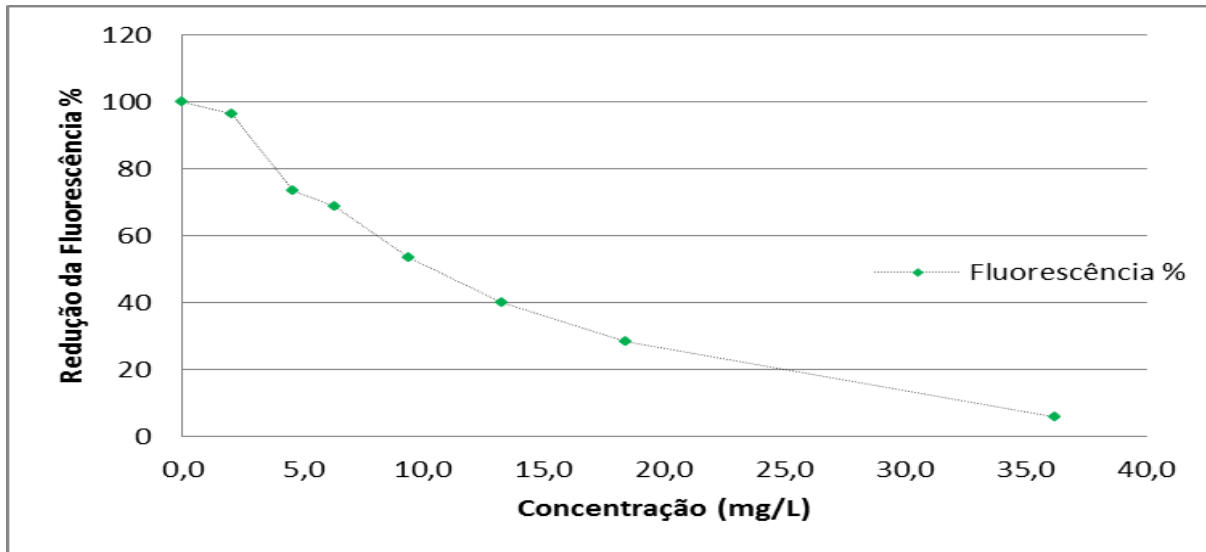


Figura 4.9: Redução da fluorescência em função da concentração de PM₁₀V₂

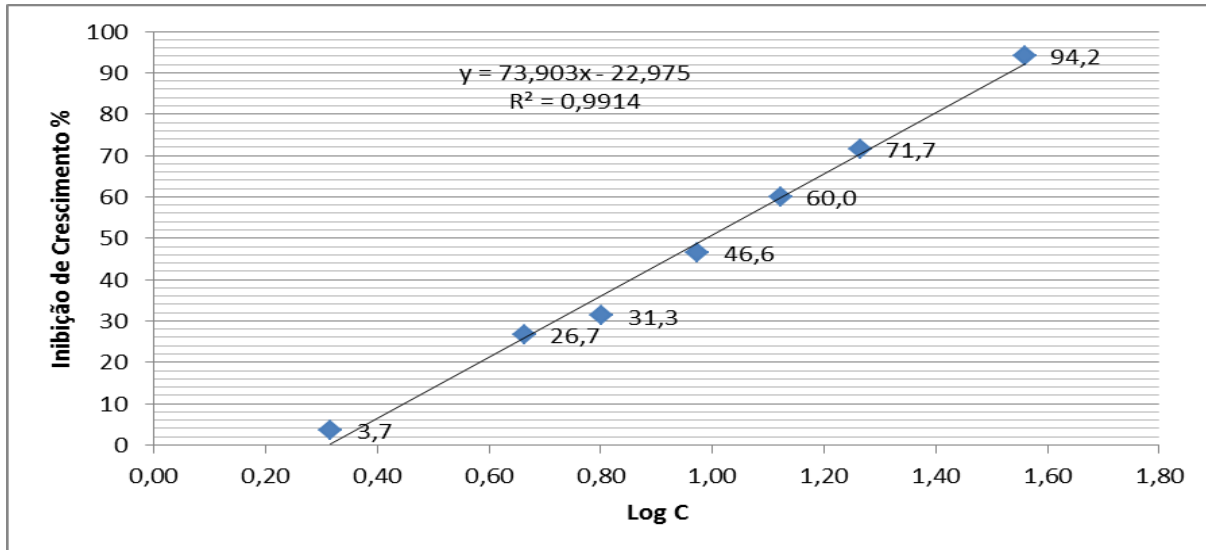


Figura 4.10: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de PM₁₀V₂

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

4.5.4. PMO₁₁V

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMO₁₁V estão apresentados na tabela 4.4. As figuras 4.11 e 4.12 mostram, respectivamente, a redução da fluorescência e a inibição de crescimento em função da concentração de PMO₁₁V. Para o cálculo do CE₅₀ através de regressão linear foram utilizados menos pontos experimentais, tendo sido excluídos aqueles em que se identificou maior inibição no crescimento, como se mostra na figura F.4 do Anexo F.

Tabela 4.4: Resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMO₁₁V

C (mg/L)	log C	ΔF	F %	I (%)
0,0		1312	100	0
10,8	1,033	1248	95,1	4,9
21,3	1,328	1009	76,9	23,1
41,1	1,613	806	61,4	38,6
61,1	1,786	591	45,0	55,0
81,2	1,910	556	42,4	57,6
160,3	2,205	430	24,9	69,6
320,7	2,506	463	32,8	67,2
641,0	2,807	348	24,6	75,4

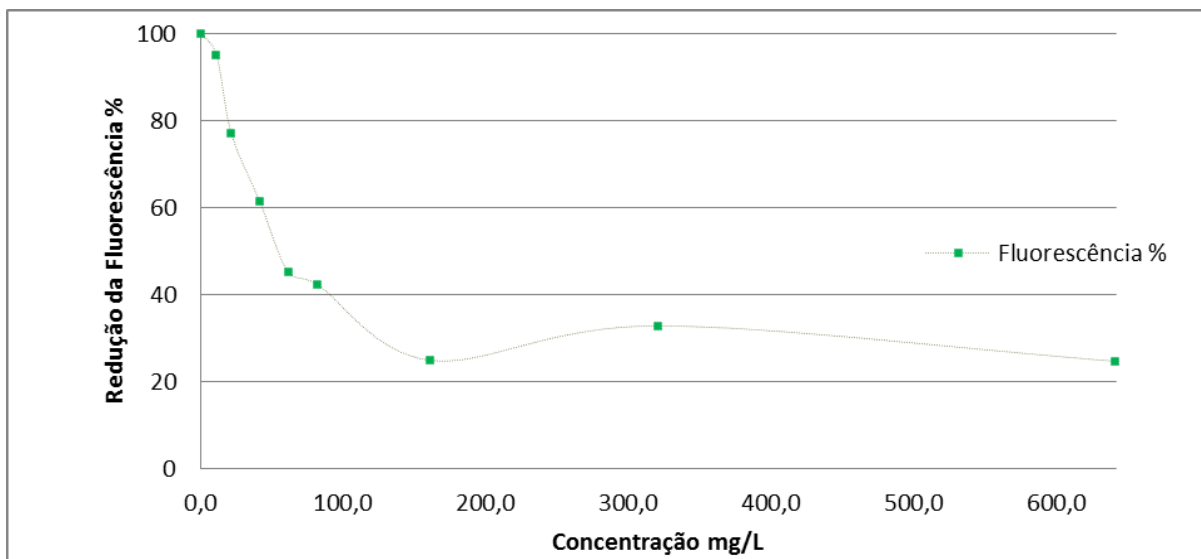


Figura 4.11: Redução da fluorescência em função da concentração de PMO₁₁V

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

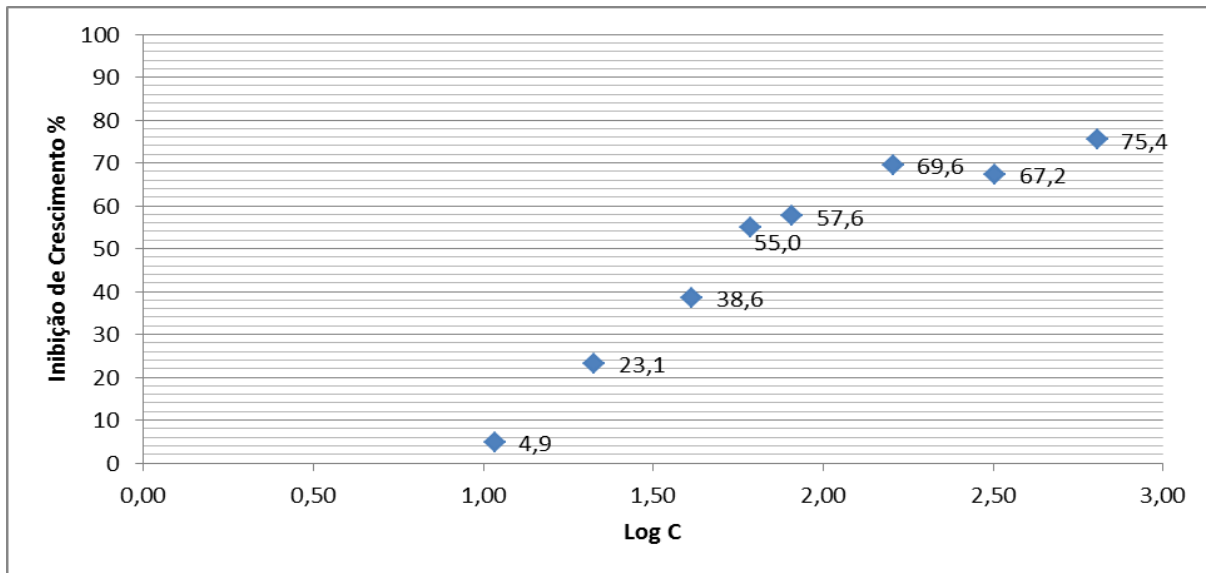


Figura 4.12: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de PMO₁₁V

4.5.5. PMO₁₂

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMO₁₂ estão apresentados na tabela 4.5. A figura 4.13 ilustra a redução da fluorescência e a figura 4.14 mostra a inibição de crescimento em função da concentração de PMO₁₂. A equação de regressão linear apresentada na figura 4.14 foi utilizada para a estimativa dos parâmetros de ecotoxicidade CE₁₀, CE₂₀ e CE₅₀.

Tabela 4.5: Resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMO₁₂

C (mg/L)	log C	ΔF	F %	I (%)
0		1730	100	0
20,7	1,315	1385	99,2	0,8
43,3	1,637	934	79,5	20,5
80,1	1,903	950	54,9	45,1
161,4	2,208	754	43,6	56,4
240,5	2,381	469	27,1	72,9
320,7	2,506	399	23,1	76,9
400,8	2,603	120	6,9	93,1

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

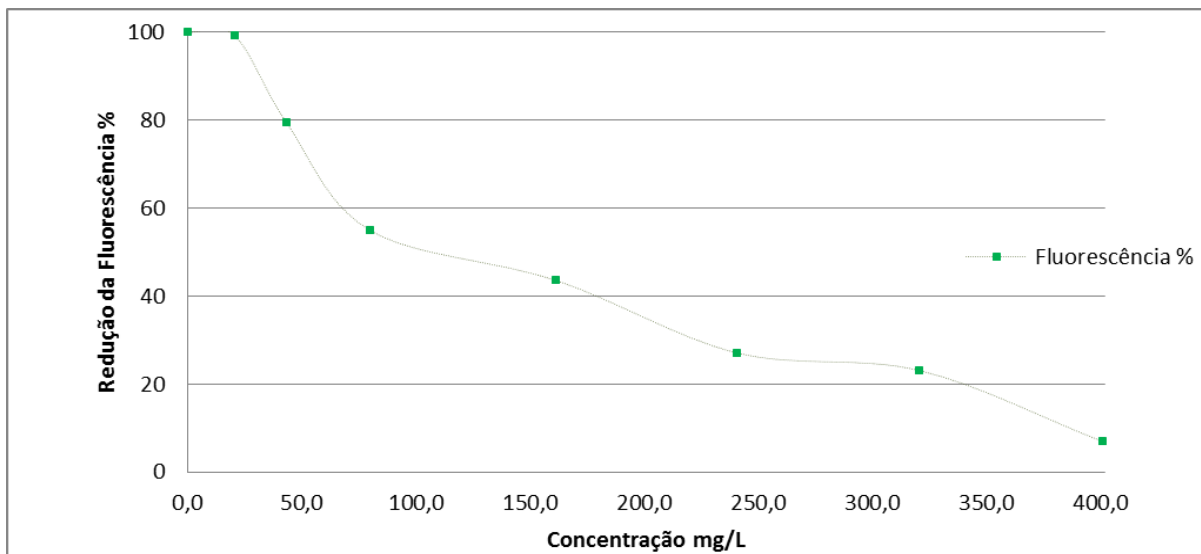


Figura 4.13: Redução da fluorescência em função da concentração de PMO₁₂

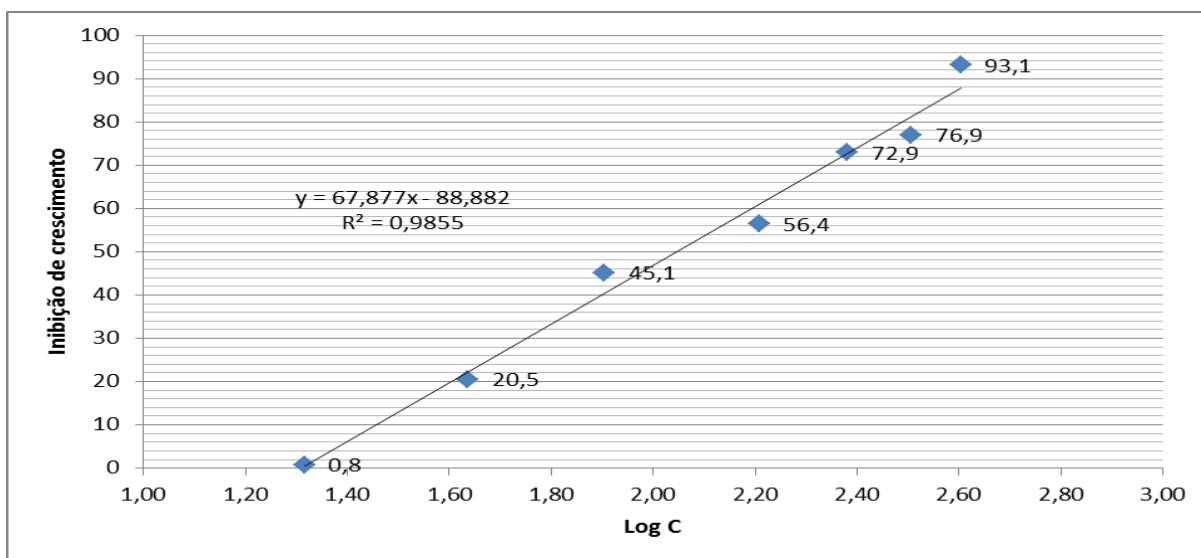


Figura 4.14: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de PMO₁₂

4.5.6. PMO₁₀V₂@GF

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMO₁₀V₂@GF estão apresentados na tabela 4.6. As figuras 4.15 e 4.16 ilustram a redução da fluorescência e

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

a inibição de crescimento em função da concentração de $PMO_{10}V_2@GF$, respectivamente. A figura 4.16 mostra a equação de regressão linear que foi utilizada para a estimativa dos parâmetros ecotoxicológicos CE_{10} , CE_{20} e CE_{50} .

Tabela 4.6: Resultados obtidos nos testes do $PMO_{10}V_2@GF$

C (mg/L)	log C	ΔF	F %	I (%)
0		1674	100	0
1,5	0,176	1201	102,1	-2,1
3,1	0,491	1564	71,5	28,5
6,2	0,792	919	54,9	45,1
12,2	1,088	416	24,9	75,1
20,0	1,302	219	13,1	86,9
30,4	1,482	164	9,8	90,2
40,3	1,605	90	5,4	94,6

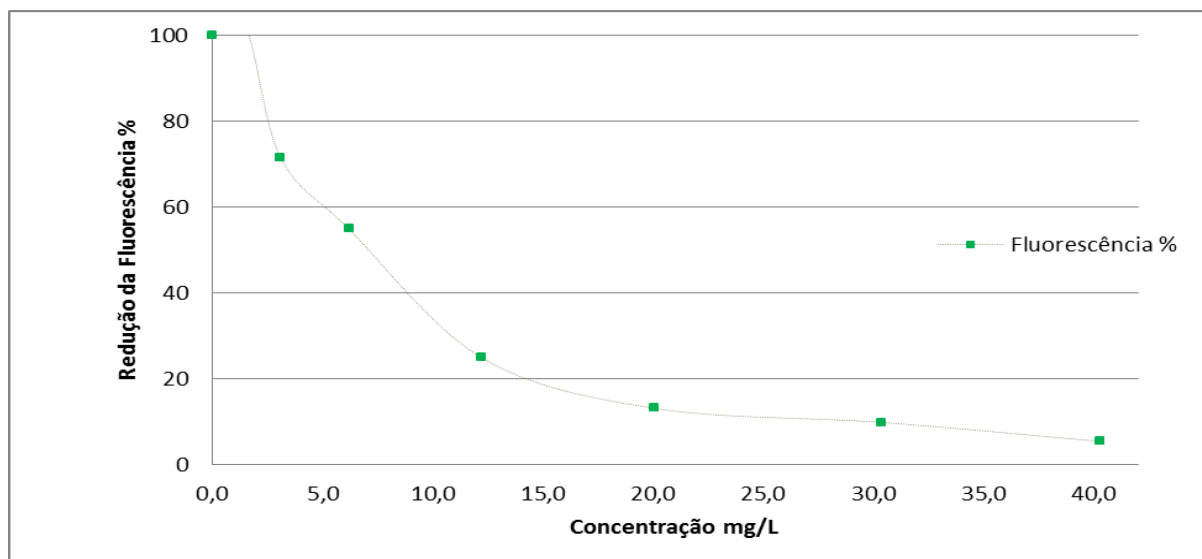


Figura 4.15: Redução da fluorescência em função da concentração de $PMO_{10}V_2@GF$

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

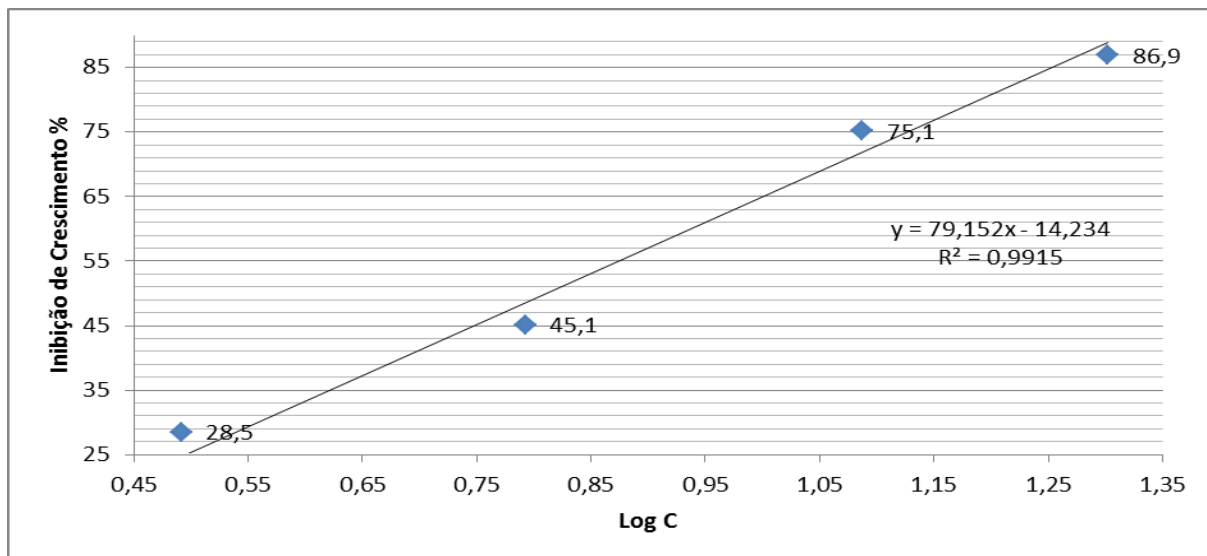


Figura 4.16: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de PMO₁₀V₂@GF

4.5.7. PMO₁₁V@GF

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMO₁₁V@GF estão apresentados na tabela 4.7. As figuras 4.17 e 4.18 ilustram a redução da fluorescência e a inibição de crescimento em função da concentração de PMO₁₁V@GF, respectivamente. A equação de regressão linear mostrada na figura 4.18 foi utilizada para a estimativa dos parâmetros de ecotoxicidade CE₁₀, CE₂₀ e CE₅₀.

Tabela 4.7: Resultados obtidos nos testes do PMO₁₁V@GF

C (mg/L)	log C	ΔF	F %	I (%)
0		1210	100	0
10,2	1,009	1203	86,2	13,8
21,3	1,329	824	68,1	31,9
41,3	1,616	634	52,4	47,6
81,3	1,910	444	36,7	63,3
160,7	2,206	304	25,1	74,9
240,7	2,381	202	16,7	83,3
401,3	2,603	185	13,3	86,7

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

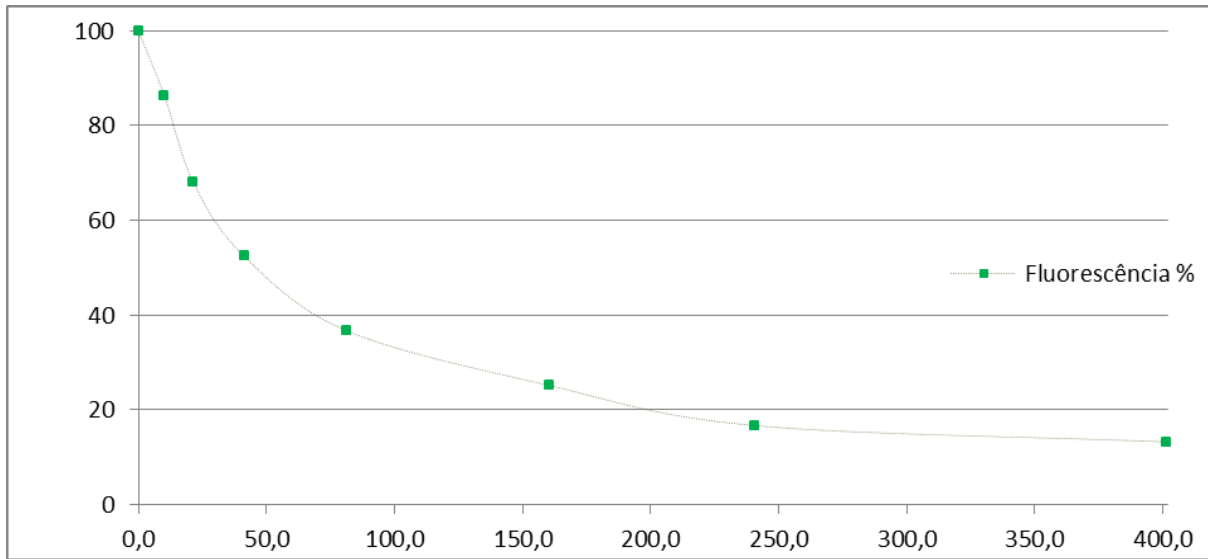


Figura 4.17: Redução da fluorescência em função da concentração de PMO₁₁V@GF

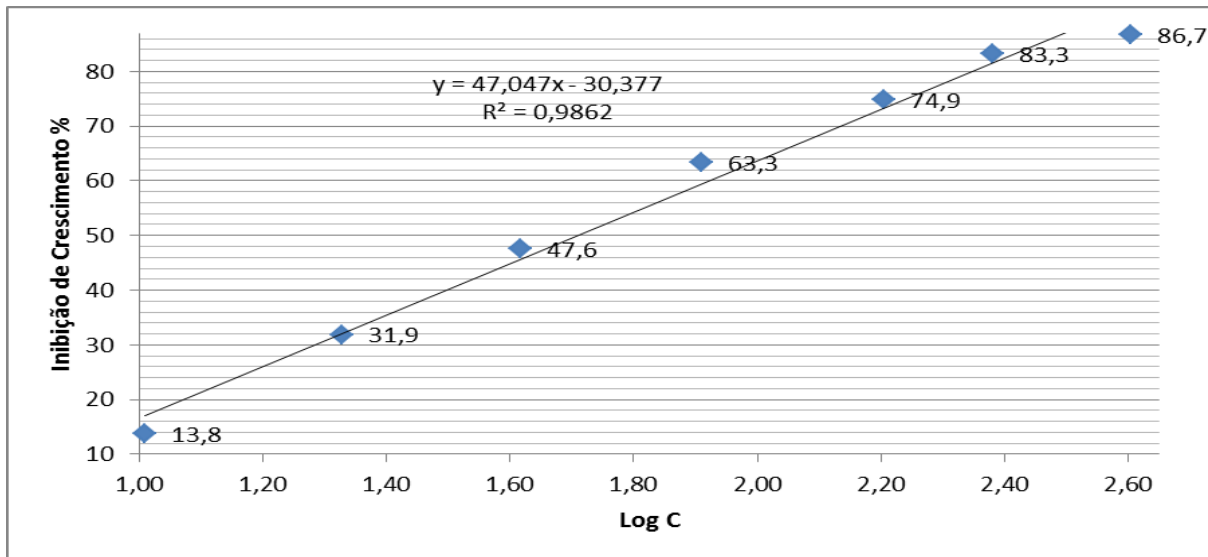


Figura 4.18: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de PMO₁₁V@GF

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

4.5.8. PMO₁₂@GF~

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com o PMO₁₂@GF estão apresentados na tabela 4.8. As figuras 4.19 e 4.20 ilustram a redução da fluorescência e a inibição de crescimento em função da concentração de PMO₁₂@GF, respectivamente. A equação de regressão linear que se apresenta na figura 4.20 foi utilizada para a estimativa dos parâmetros de ecotoxicidade CE₁₀, CE₂₀ e CE₅₀.

Tabela 4.8: Resultados obtidos nos testes do PMO₁₂@GF

C (mg/L)	log C	ΔF	F %	I (%)
0		1433	100	0
41,5	1,618	1850	88,9	11,1
80,0	1,903	1172	81,8	18,2
160,0	2,204	485	33,8	66,2
320,0	2,505	290	20,2	79,8
480,0	2,681	159	11,1	88,9
640,8	2,807	52	2,5	97,5

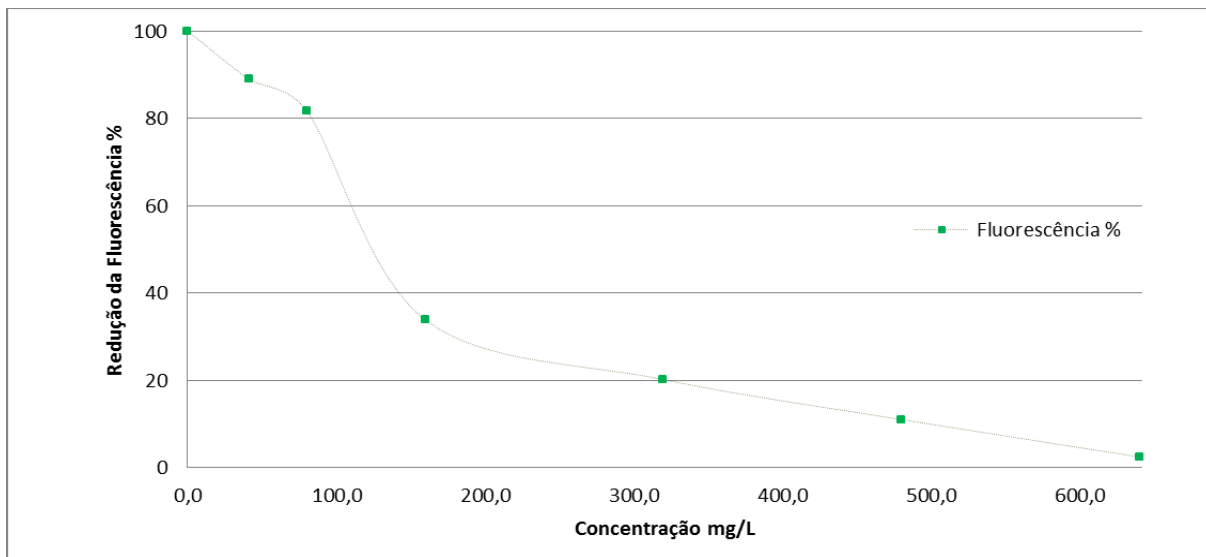


Figura 4.19: Redução da fluorescência em função da concentração de PMO₁₂@GF

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

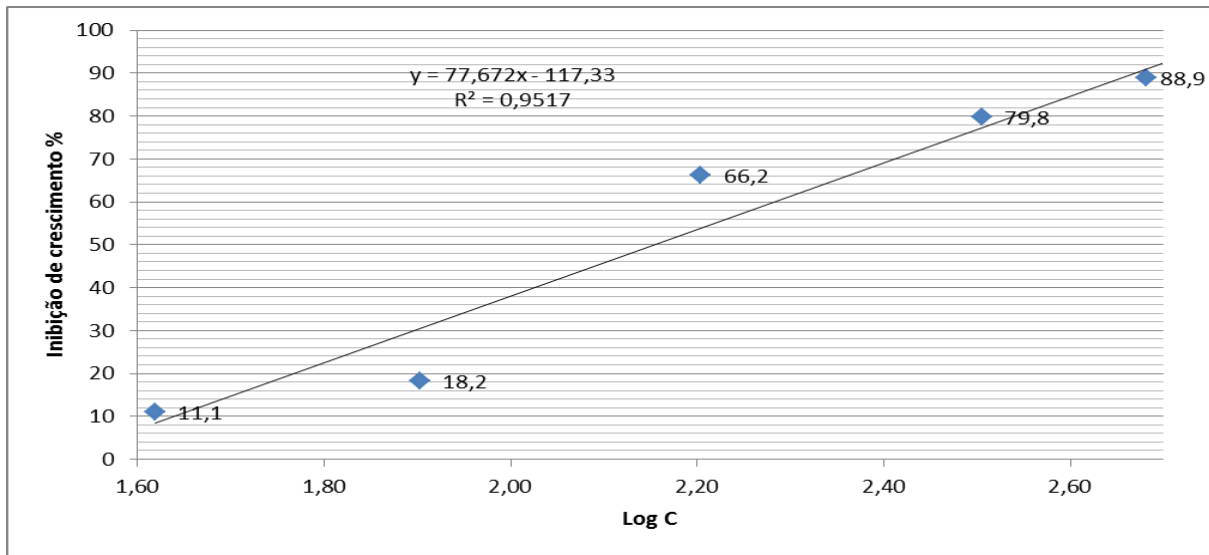


Figura 4.20: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de PMO₁₂@GF

4.6. ANÁLISE DE RESULTADOS

Os resultados dos testes de ecotoxicidade conduziram ao cálculo das concentrações efetivas CE₅₀, CE₂₀ e CE₁₀. Apesar de não terem sido obtidos resultados de inibição abaixo de 10 % para o grafeno, PMo₁₁V@GF e PMo₁₂@GF, foram estimadas as CE₁₀ por uma extrapolação, visto que os resultados não ficam muito acima dos 10 % de inibição. Da mesma forma, também foram apresentadas as estimativas para CE₂₀ e CE₁₀ para o PMo₁₀V₂@GF apesar de não se terem obtido, resultados abaixo de 20 %.

A validação dos resultados está de acordo com o teste da OECD nº 201 (OECD, 2011), em que o coeficiente de variação das taxas de crescimento médio das culturas de controlo não deve exceder os 7%. Os cálculos para esta validação estão no Anexo C, juntamente com os cálculos da taxa de crescimento específico média.

Na tabela 4.9 estão apresentados os valores de CE₁₀, CE₂₀ e CE₅₀, para todos os materiais, permitindo uma visão global dos resultados obtidos e a sua comparação.

Verifica-se que os materiais mais tóxicos são aqueles cuja constituição apresenta dois átomos de vanádio, PMo₁₀V₂ e PMo₁₀V₂@GF. Também se pode observar que a toxicidade vai sendo reduzida à medida que há diminuição do número de átomos desta espécie no material. Ou seja, a toxicidade do PMo₁₂ é menor do que a do PMo₁₁V, que por sua vez é menor do que a do PMo₁₀V₂. Do mesmo modo que se verifica esta

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

redução de toxicidade para os POMs imobilizados em grafeno. Por outro lado, observa-se um aumento da toxicidade do $\text{PMo}_{10}\text{V}_2$ com a mesma espécie imobilizada em grafeno e varia no mesmo sentido a comparação da toxicidade do PMo_{11}V e o respectivo POM imobilizado em grafeno. No entanto, na ausência do átomo de vanádio, na comparação da toxicidade do PMo_{12} e o $\text{PMo}_{12}@GF$, observa-se uma diminuição da toxicidade. A venlafaxina também apresenta níveis bastante elevados de toxicidade, sendo da mesma ordem de grandeza daquela verificada para o $\text{PMo}_{10}\text{V}_2$ e para o $\text{PMo}_{10}\text{V}_2@GF$. O grafeno é o material que apresenta a toxicidade mais baixa de todos os materiais testados.

Tabela 4.9: Parâmetros ecotoxicológicos referentes aos materiais testados

Composto	CE_{10} (mg/L)	CE_{20} (mg/L)	CE_{50} (mg/L)
Venlafaxina	0,9	3,8	11,0
Grafeno	199,9 ¹	213,8	261,6
$\text{PMo}_{10}\text{V}_2$	3,0	4,0	9,9
PMo_{11}V	13,1	19,0	57,8
PMo_{12}	28,6	40,2	111,2
$\text{PMo}_{10}\text{V}_2@GF$	2,0 ¹	2,7 ¹	6,5
$\text{PMo}_{11}\text{V}@GF$	4,4 ¹	11,8	51,1
$\text{PMo}_{12}@GF$	43,4 ¹	58,3	141,8

¹CE estimada apesar de não se observar o critério definido no método.

A classificação proposta pelo GHS considera o tipo de teste: toxicidade aguda ou toxicidade crônica. Na classificação feita de acordo com testes crônicos, as substâncias prejudiciais para o ambiente podem ser divididas em quatro classes, sendo a categoria crônica 1, considerada a mais perigosa, e a 4, a menos perigosa. A classificação é feita conforme os parâmetros CE_{50} e CENO, sendo atribuído um grau de toxicidade a cada categoria. Os materiais que apresentam um CE_{50} inferior a 1 mg/L pertencem à categoria 1 (elevada toxicidade para os organismos aquáticos), se o valor for superior a 1 mg/L e inferior a 10 mg/L

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

enquadram-se na categoria 2 (tóxico para os organismos aquáticos); a categoria 3 (prejudicial para os organismos aquáticos) contempla valores de CE_{50} superiores a 10 mg/L e inferiores a 100 mg/L; e a categoria 4 (possíveis efeitos prejudiciais para os organismos aquáticos) inclui substâncias pouco solúveis e para as quais não tenham sido registados dados de toxicidade aguda para níveis acima da solubilidade (UN, 2015). Considerando este estudo como uma primeira abordagem e seguindo o algoritmo de decisão lógica proposto no GHS, na ausência de dados acerca da toxicidade crónica relativa aos outros níveis tróficos (peixes e crustáceos), os materiais $PMo_{10}V_2$ e $PMo_{10}V_2@GF$ ficam classificados na categoria 2; na categoria 3 podem ser classificados a venlafaxina, $PMo_{11}V$ e $PMo_{11}V@GF$; os restantes nanomateriais testados enquadram-se na categoria 4. Para a venlafaxina tendo em conta não só o valor do CE_{50} , mas também o valor do CE_{10} (0,9 mg/L), esta deveria ser enquadrada na categoria 2.

De acordo com estes dados, recomenda-se a sua comunicação nas etiquetas de embalagem de comercialização, ou na ficha técnica de produto químico, onde constem as declarações de risco ambiental. Nas substâncias classificadas na categoria 2, deve ser referido: tóxico para o ambiente aquático. Nas substâncias classificadas na categoria 3, deve ser referido prejudicial para o ambiente aquático.

Considerando os resultados obtidos neste estudo, em que o grafeno isolado se apresenta como o material menos tóxico, talvez a síntese de um nanomaterial em que o dióxido de titânio fosse suportado em grafeno possa ser uma melhor alternativa do ponto de vista ambiental (Tolasz *et al.*, 2015).

4.7. OUTROS EFEITOS OBSERVADOS

Nos matrizes em que foram observadas as inibições de crescimento mais elevadas, foi realizada uma observação ao microscópio Nikon Eclipse Ti, com um aumento de 100 vezes. As fotografias foram obtidas com o *software* NIS – *Elements* F 4.30.01. A figura 4.21 mostra uma cultura de controlo, a figura 4.22 mostra a cultura de teste da venlafaxina com concentração correspondente à máxima inibição de crescimento verificada, 48,45 mg/L. Pode-se observar alterações na forma da célula na cultura exposta à venlafaxina. Nos restantes materiais testados não se observam alterações na forma, como exemplo está a figura 4.23, que ilustra a cultura exposta ao $PMo_{10}V_2@GF$ na concentração de máxima inibição de crescimento, 40,3 mg/L, e que se revelou o material mais tóxico em termos de inibição de crescimento.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

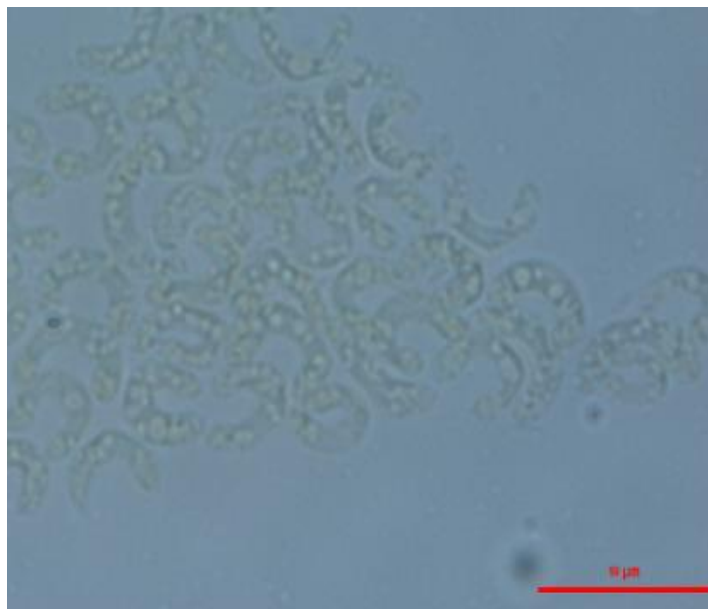


Figura 4.21: Cultura de controlo

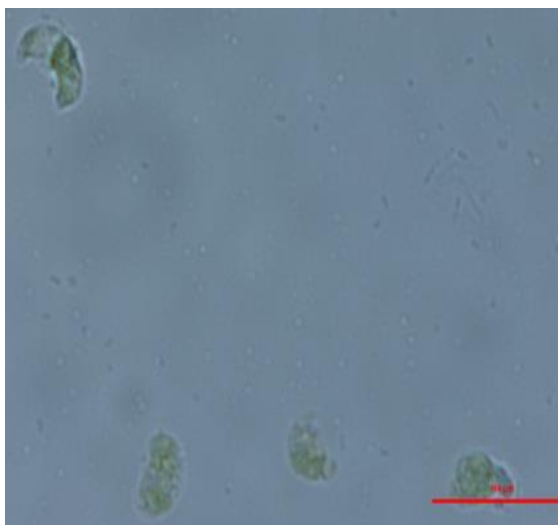


Figura 4.22: Cultura exposta à venlafaxina



Figura 4.23: Cultura exposta ao $\text{PMo}_{10}\text{V}_2\text{@GF}$

A mancha escura que aparece na figura 4.23 deve-se a um aglomerado do nanomaterial.

Embora não sejam visíveis alterações nas microalgas provocadas pelos nanomateriais, é possível que estes afetem a estrutura celular da alga, mas seriam necessários outros ensaios complementares com técnicas de microscopia óptica que permitissem uma maior ampliação

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

para se avaliar melhor como o nanomaterial está a afetar a microalga, nomeadamente, quais as estruturas celulares da alga que estão a ser afetadas.

No fim do ensaio, e apenas no caso do $\text{PMo}_{11}\text{V@GF}$, observou-se uma desagregação do material, ficando o POM separado do grafeno, como se pode observar na figura 4.24, onde para comparação do aspeto final, também se apresenta uma imagem do $\text{PMo}_{12}\text{@GF}$ (figura 4.25), o qual não sofreu qualquer alteração.

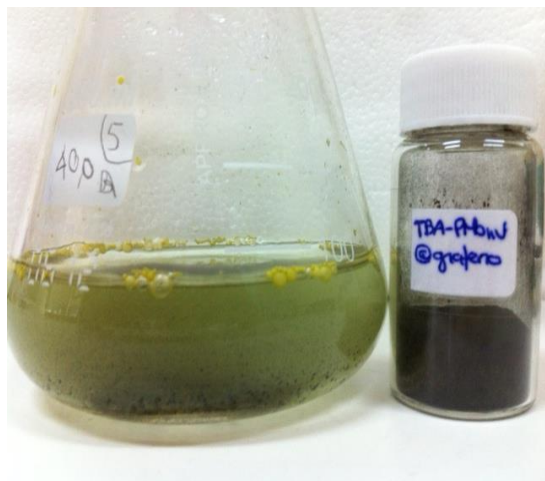


Figura 4.24: Suspensão de $\text{PMo}_{11}\text{V@GF}$ após o ensaio

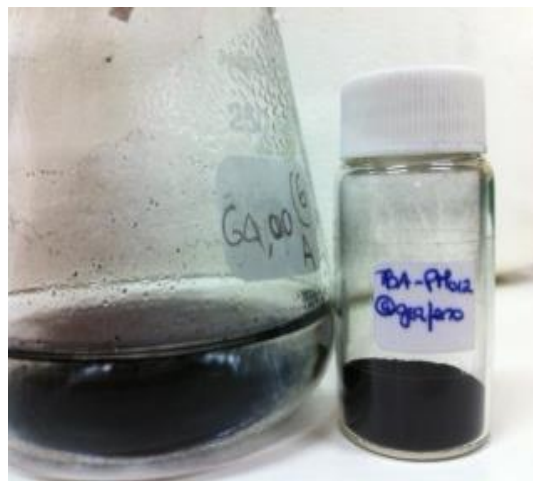


Figura 4.25: Suspensão de $\text{PMo}_{12}\text{@GF}$ após o ensaio

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Este trabalho teve como objetivos avaliar a toxicidade para a alga *P. subcapitata* de psicofármacos, utilizando a venlafaxina com exemplo, bem como avaliar a toxicidade de novos nanomateriais compósitos, os POM@GF, que foram desenvolvidos para a remoção deste tipo de fármacos.

A toxicidade mais elevada corresponde ao $\text{PMo}_{10}\text{V}_2\text{@GF}$, com valores de CE_{50} de 6,5 mg/L e CE_{10} de 2,0 mg/L, indicativos de substância tóxica para o ambiente aquático. A venlafaxina, que apresentou um valor um pouco acima para CE_{50} , 11,0 mg/L, no entanto, mais baixo para CE_{10} , 0,9 mg/L, também poderia ser classificada como substância tóxica para o ambiente aquático.

Outra observação possível foi a de que, com a diminuição dos átomos de vanádio na composição, também diminui a toxicidade do compósito, tanto no POM isolado como no POM@GF. Verificou-se ainda que a ausência de metais pesados diminui consideravelmente a toxicidade do nanomaterial. Para o grafeno isolado, os efeitos são muito menos prejudiciais, pois o valor de CE_{50} é de 261,6 mg/L, quase o dobro do POM menos tóxico, $\text{PMo}_{12}\text{V@GF}$, com CE_{50} de 141,8 mg/L. Talvez a utilização de dióxido de titânio suportada em grafeno possa ser uma alternativa menos tóxica para o ambiente aquático.

Seria desejável que em simultâneo com a realização de estudos para avaliação da eficiência dos nanomateriais na remoção dos antidepressivos, para os quais eles foram projetados, fosse feita a comparação de ecotoxicidade antes e depois do tratamento, considerando que pode ocorrer a formação de subprodutos de oxidação dos fármacos mais tóxicos que a espécie inicial.

Deve ser considerado o problema da remoção dos nanomateriais após tratamento, de forma a garantir uma elevada eficiência na filtração do efluente tratado, de forma a evitar que as concentrações destes materiais, utilizados como fotocatalisadores no tratamento, originem valores superiores aos valores de CE_{10} (obtidos nos testes de ecotoxicidade) no ambiente aquático devido à descarga da água residual tratada. Para esse efeito sugere-se a realização de estudos à escala piloto.

De forma a avaliar melhor os efeitos ecotoxicológicos do uso de nanomateriais, seria recomendável que os testes de ecotoxicidade incluíssem outros níveis tróficos.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre-Martínez, G. V., Owuor, M. a, Garrido-Pérez, C., Salamanca, M. J., Del Valls, T. a e Martín-Díaz, M. L. (2014) «Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs.», *Chemosphere*, 120C, pp. 75–85.

Andreozzi, R., Marotta, R. e Paxéus, N. (2003) «Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment», *Chemosphere*, pp. 1319–1330. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00769-5.

Brooks, B. W., Foran, C. M., Richards, S. M., Weston, J. e Turner, P. K. (2003) «Aquatic ecotoxicology of fluoxetine», *Toxicology Letters*, (142), pp. 169–183.

Brooks, B. W., Turner, P. K., Stanley, J. K., Weston, J. J., Glidewell, E. A., Foran, C. M., Slattery, M., La Point, T. W. e Huggett, D. B. (2003) «Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms», *Chemosphere*, 52(1), pp. 135–142.

Carson, R. (1969) *Primavera Silenciosa*. 2.^a ed. São Paulo: Melhoramentos.

CCAP (2014) *Culture Collection of Algae and Protozoa*. Disponível em: http://www.ccap.ac.uk/strain_info.php?Strain_No=278/4 (Acedido: 19 de Fevereiro de 2016).

Christensen, A. M., Faaborg-Andersen, S., Ingerslev, F. e Baun, A. (2007) «Mixture and single-substance toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors toward algae and crustaceans», *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(1), pp. 85–91.

Cleuvers, M. (2003) «Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects», *Toxicology Letters*, 142(3), pp. 185–194. doi: 10.1016/S0378-4274(03)00068-7.

Cuentas-Gallegos, A. K., Martínez-Rosales, R., Rincón, M. E., Hirata, G. A. e Orozco, G. (2006) «Design of hybrid materials based on carbon nanotubes and polyoxometalates», *Optical Materials*, 29(1), pp. 126–133.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Decisão No 2455/2001/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Novembro de 2001. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, ISSN 0378-6978, L331, vol 44, 15/12/2001. Acedido em 29/01/2016, Disponível em <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2001:331:TOC>

Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão de 20 de março de 2015. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, ISSN 1977-0774, L78. Acedido em 29/01/2016. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2015:078:TOC>

Decreto-Lei n.º 103/2010 de 24 de Setembro do Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Diário da República 1.ª série, n.º 187. Acedido em 19/01/2016. Disponível em: <https://dre.pt/application/file/342207>

Decreto-Lei n.º 218/2015 de 7 de outubro do Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Diário da República 1ª série, nº 196. Acedido em 19/01/2016. Disponível em <https://dre.pt/application/file/70476114>

Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, ISSN 0378-6978, L327, vol 43, 22/12/2000. Acedido em 29/01/2016, URL: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2000:327:TOC>

Directiva 2008/105/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, ISSN 1725-2601, L348, 24/12/2008. Acedido em 29/01/2016, Disponível em <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2008:348:TOC>

Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, ISSN 1977-0774. doi:10.3000/19770774.L_2013.226.por
Eder, D. (2010) «Carbon Nanotube-Inorganic Hybrids», *Chem. Rev.*, pp. 1348–1385.

Environmental Protection Agency (EPA) - Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. EPA-821-R-02-013. 4 Washington, DC 2002

Fatta-Kassinos, D., Meric, S. e Nikolaou, A. (2011) «Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current state of knowledge and future research», *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(1), pp. 251–275. doi: 10.1007/s00216-010-4300-9.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Fernandes, D. M. e Freire, C. (2015) «Carbon Nanomaterial-Phosphomolybdate Composites for Oxidative Electrocatalysis», *ChemElectroChem*. Wiley-VCH Verlag, 2(2), pp. 269–279.

Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. e Garric, J. (2004) «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 / SETAC*, 23(5), pp. 1344–1354. doi: 10.1897/03-246.

Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R. Lo, Pollio, A. e Garric, J. (2003) «Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3), pp. 359–370. doi: 10.1016/S0147-6513(02)00082-9.

Furtado, C. (2014) *Psicofármacos: Evolução do consumo em Portugal Continental (2000 – 2012)*. Disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/ESTUDOS_REALIZADOS/6AE71C8F8502379EE0440017A4761C27 (Acedido: 18 de Janeiro de 2016).

Glausiusz, J. (2007) «Can a Maligned Pesticide Save Lives?», *Discover*, Novembro.

INFARMED (2014) *ESTATÍSTICA DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE*. Disponível em: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/ESTATISTICA_DO_MEDICAMENTO/Estat_Medic_2014_final_13_11_2015.pdf (Acedido: 17 de Janeiro de 2016).

Johnson, D. J., Sanderson, H., Brain, R. A., Wilson, C. J. e Solomon, K. R. (2007) «Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(1), pp. 128–139.

Jones, O. A., Lester, J. N. e Voulvoulis, N. (2005) «Pharmaceuticals: a threat to drinking water?», *Trends in Biotechnology*, 23(4), pp. 163–7. doi: 10.1016/j.tibtech.2005.02.001.

Luo, X. e Yang, C. (2011) «Photochromic ordered mesoporous hybrid materials based on covalently grafted polyoxometalates.», *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 13(17), pp. 7892–902.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Mackuľak, T., Mosný, M., Grabic, R., Golovko, O., Koba, O. e Birořová, L. (2015) «Fenton-like reaction: A possible way to efficiently remove illicit drugs and pharmaceuticals from wastewater», *Environmental Toxicology and Pharmacology*. doi: 10.1016/j.etap.2014.12.016.

Minagh, E., Hernan, R., O'Rourke, K., Lyng, F. M. e Davoren, M. (2009) «Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species.», *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(2), pp. 434–40. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.05.002.

Minguez, L., Di Poi, C., Farcy, E., Ballandonne, C., Benchouala, A., Bojic, C., Cossu-Leguille, C., Costil, K., Serpentine, A., Lebel, J.-M. e Halm-Lemeille, M.-P. (2014) «Comparison of the sensitivity of seven marine and freshwater bioassays as regards antidepressant toxicity assessment.», *Ecotoxicology*, 23(9), pp. 1744–54. doi: 10.1007/s10646-014-1339-y.

Mompelat, S., Le Bot, B. e Thomas, O. (2009) «Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water», *Environment International*. Elsevier Ltd, 35(5), pp. 803–814. doi: 10.1016/j.envint.2008.10.008.

Nikolaou, A., Meric, S. e Fatta, D. (2007) «Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments», *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), pp. 1225–1234. doi: 10.1007/s00216-006-1035-8.

OECD (2015) *Health at a Glance 2015*. Paris: OECD Publishing.

OECD, Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, Paris 2011
DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069923-en>

Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C. e Calamari, D. (2006) «Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells.», *Environmental science & technology*, 40(7), pp. 2442–2447. doi: 10.1021/es051715a.

PubChem (2016a) PubChem - Open Chemistry Database, National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/#collection=compounds> (Acedido: 19 de Janeiro de 2016).

PubChem (2016b) *National Center for Biotechnology Information. Pub; CID=62923*; Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/62923#section=Top> (Acedido: 19 de janeiro e 25 de Setembro de 2016).

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R. e Sethunathan, N. (2010) «The impacts of environmental pollutants on microalgae and cyanobacteria.», *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40(8), pp. 699–821.

Regulamento CE 440/2008 da Comissão, de 30 de maio de 2008. Jornal Oficial da União Europeia. Pág. L 142/464 – 472

Rizzo, L., Meric, S., Guida, M., Kassinos, D. e Belgiorno, V. (2009) «Heterogenous photocatalytic degradation kinetics and detoxification of an urban wastewater treatment plant effluent contaminated with pharmaceuticals», *Water Research*, 43(16), pp. 4070–4078. doi: 10.1016/j.watres.2009.06.046.

Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C. e Montenegro, M. C. B. S. M. (2010) «Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment.», *Journal of hazardous materials*, 175(1–3), pp. 45–95. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.100.

Sigma-Aldrich (2016). Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=99300-78-4&interface=CAS No.&N=0&mode=partialmax&lang=pt®ion=PT&focus=product> (Acedido: 25 de Setembro de 2016).

Thrush, S. F., Hewitt, J. E., Gibbs, M., Lundquist, C. e Norkko, A. (2006) «Functional role of large organisms in intertidal communities: Community effects and ecosystem function», *Ecosystems*, 9(6), pp. 1029–1040.

Thurman, H. V. (2001) *Introductory Oceanography*. New Jersey: Prentice Hall College.

Tolasz, J., Vomacka, P., Stengl, V. e Bludska, J. (2015) «PHOTOCATALYTIC COMPOSITE MATERIALS BASED ON GRAPHENE AND TITANIUM OXIDE PREPARED BY DIFFERENT», pp. 1–9.

Truhaut, R. (1977) *The Evaluation of Toxicological Data for the Protection of Public Health, The Evaluation of Toxicological Data for the Protection of Public Health*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-08-021998-1.50037-3.

UN - United Nations (2015) *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS)*. Sixth revised edition. New York and Geneva : [s.n.] eISBN 978-92-1-057320-7 Acedido em 16/04/2016. Disponível em http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Vannini, C., Domingo, G., Marsoni, M., De Mattia, F., Labra, M., Castiglioni, S. e Bracale, M. (2011) «Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*», *Aquatic Toxicology*, 101(2), pp. 459–465.

Vernouillet, G., Eullaffroy, P., Lajeunesse, A. e Blaese, C. (2010) «Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels», *Chemosphere*, 80(9), pp. 1062–1068. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.05.010.

Winkler, M., Lawrence, J. R. e Neu, T. R. (2001) «Selective degradation of ibuprofen and clofibric acid in two model river biofilm systems», *Water Research*, 35(13), pp. 3197–3205. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00026-4.

Zarbin, A. J. G. e Oliveira, M. M. (2013) «NANOESTRUTURAS DE CARBONO (NANOTUBOS, GRAFENO): QUO VADIS?», *Química Nova*, 36(10), pp. 1533–1539.

Zeitzschel, B. (1978) «Why study phytoplankton?», em Sournia, A. (ed.) *Phytoplankton manual*. Paris: Unesco.

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

ANEXOS

ANEXO A – RESULTADOS DO ENSAIO COM DICROMATO DE POTÁSSIO

Tabela A.1: Resultados do ensaio com o dicromato de potássio

C (mg/L)	log C	ΔF	μ (d ⁻¹)	I %
0		1397	1,29	0,0
0,251	-0,600	857		38,7
0,502	-0,299	710		49,2
1,004	0,002	194		86,1

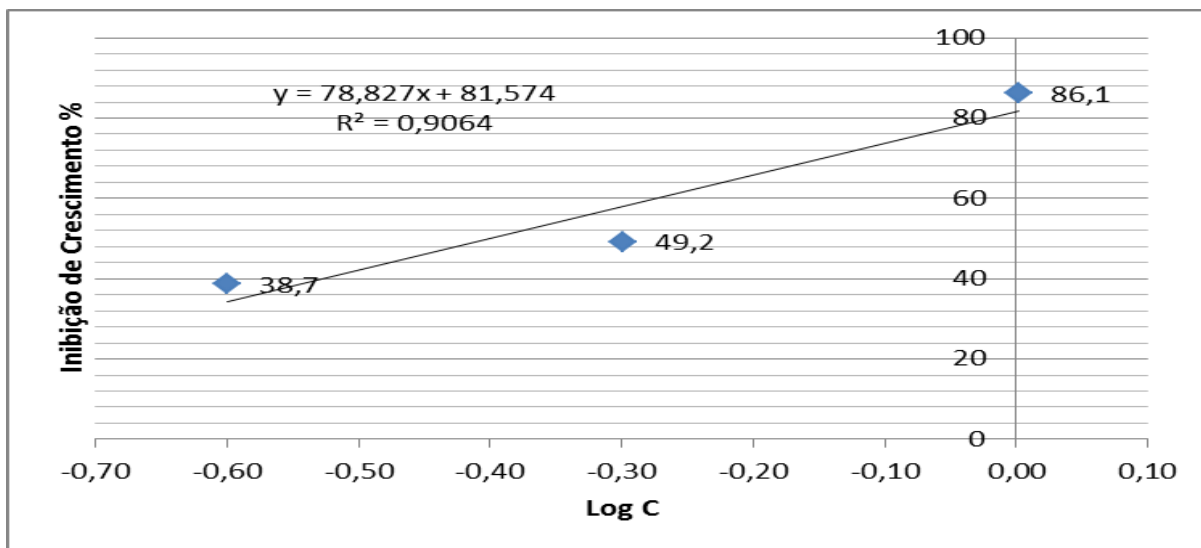


Figura A.1: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de dicromato de potássio

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

ANEXO B – VARIAÇÃO DE PH NAS CULTURAS DE CONTROLO

Tabela B.1: Variação de pH nas culturas de controlo

Ensaio	pH inicial	pH final em cada réplica			Média
	A/B/C	A	B	C	Δ pH
Venlafaxina	7,482	7,402	7,407	7,698	0,020
Grafeno	7,617	6,967	7,104	7,147	-0,544
PMo ₁₀ V ₂	7,568	7,337	7,403	7,359	-0,202
PMo ₁₁ V	7,632	7,034	7,087	7,206	-0,523
PMo ₁₂	7,483	6,837	6,897	6,851	-0,621
PMo ₁₀ V ₂ @GF	7,486	7,778	7,111	8,555	0,329
PMo ₁₁ V@GF	7,424	7,162	7,169	7,136	-0,268
PMo ₁₂ @GF	7,401	7,205	7,167	7,212	-0,206

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

ANEXO C – CRESCIMENTO CELULAR E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO CRESCIMENTO (CV) NAS RÉPLICAS DE CONTROLO DE CADA ENSAIO

Tabela C.1: Crescimento celular e CV no ensaio do dicromato de potássio

K ₂ Cr ₂ O ₇	Fluorescência	Nº cel/mL	Fluorescência	Nº cel/mL	
Réplica	início		fim		μ (d-1)
A	294	4,82E+04	1631	2,31E+06	1,29
B	291	4,31E+04	1743	2,50E+06	1,35
C	303	6,23E+04	1706	2,44E+06	1,22
MC	117		124		
Média					1,29
desvio padrão					0,066
CV %					5

Tabela C.2: Crescimento celular e CV no ensaio da venlafaxina

Venlafaxina	Fluorescência	Nº cel/mL	Fluorescência	Nº cel/mL	
Réplica	início		Fim		μ (d-1)
A	286	2,32E+05	1779	2,77E+06	0,83
B	246	1,65E+05	1828	2,85E+06	0,95
C	270	2,05E+05	1886	2,95E+06	0,89
MC	127		127		
Média					0,89
desvio padrão					0,062
CV %					7

Tabela C.2.1: Crescimento celular e CV no ensaio da venlafaxina com os resultados da absorvância

Venlafaxina	Absorvância	Nº cel/mL	Absorvância	Nº cel/mL	
Réplica	início		Fim		μ (d-1)
A	0,046	2,65E+05	0,114	4,18E+06	0,92
B	0,045	2,28E+05	0,101	3,43E+06	0,90
C	0,046	2,56E+05	0,114	4,18E+06	0,93
MC	0,041		0,040		
Média					0,92
desvio padrão					0,014
CV %					1

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

A taxa média de crescimento específico calculada para os controles do ensaio da venlafaxina fica ligeiramente abaixo do valor de referência estipulado no Regulamento (CE) 440/2008. No entanto, o valor calculado com os resultados da absorvância está de acordo com o requerido, servindo este como validação.

Tabela C.3: Crescimento celular e CV no ensaio do grafeno

Grafeno	Fluorescência	Nº cel/mL	Fluorescência	Nº cel/mL	
Réplica	início		fim		μ (d-1)
A	203	9,12E+04	2345	3,73E+06	1,24
B	203	9,18E+04	2198	3,48E+06	1,21
C	196	8,05E+04	2154	3,41E+06	1,25
MC	117		114		
Média					1,23
desvio padrão					0,019
CV %					2

Tabela C.4: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo₁₀V₂

PMo ₁₀ V ₂	Fluorescência	Nº cel/mL	Fluorescência	Nº cel/mL	
Réplica	início		fim		μ (d-1)
A	197	8,10E+04	1597	2,46E+06	1,14
B	202	9,01E+04	1564	2,41E+06	1,09
C	201	8,84E+04	1250	1,87E+06	1,02
MC	67		116		
Média					1,08
desvio padrão					0,061
CV %					6

Tabela C.5: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo₁₁V

PMo ₁₁ V	Fluorescência	Nº cel/mL	Fluorescência	Nº cel/mL	
Réplica	Início		fim		μ (d-1)
A	227	1,33E+05	1596	2,46E+06	0,97
B	211	1,05E+05	1432	2,18E+06	1,01
C	198	8,33E+04	1550	2,38E+06	1,12
MC	124		132		
Média					1,03
desvio padrão					0,075
CV %					7

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Tabela C.6: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo₁₂

PMo ₁₂	Fluorescência	Nº cel/mL	Fluorescência	Nº cel/mL	
Réplica	início		fim		μ (d-1)
A	201	8,90E+04	1955	3,07E+06	1,18
B	197	8,16E+04	1808	2,82E+06	1,18
C	214	1,10E+05	1765	2,75E+06	1,07
MC	133		159		
Média					1,14
desvio padrão					0,062
CV %					5

Tabela C.7: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo₁₀V₂@GF

PMo ₁₀ V ₂ @GF	Fluorescência	Nº cel/mL	Fluorescência	Nº cel/mL	
Réplica	início		fim		μ (d-1)
A	186	6,23E+04	1737	2,70E+06	1,26
B	183	5,72E+04	2022	3,18E+06	1,34
C	178	4,87E+04	1808	2,82E+06	1,35
MC	116		115		
Média					1,32
desvio padrão					0,052
CV %					4

Tabela C.8: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo₁₁V@GF

PMo ₁₁ V@GF	Fluorescência	Nº cel/mL	Fluorescência	Nº cel/mL	
Réplica	início		fim		μ (d-1)
A	173	4,08E+04	1487	2,28E+06	1,34
B	178	4,99E+04	1545	2,37E+06	1,29
C	178	4,93E+04	1126	1,66E+06	1,17
MC	133		141		
Média					1,27
desvio padrão					0,086
CV %					7

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Tabela C.9: Crescimento celular e CV no ensaio do PMo₁₂@GF

PMo ₁₂ @GF	Fluorescência	nº cel/mL	Fluorescência	nº cel/mL	
Réplica	início		início		μ (d-1)
A	194	7,59E+04	1563	2,40E+06	1,15
B	198	8,39E+04	1713	2,66E+06	1,15
C	190	6,91E+04	1605	2,48E+06	1,19
MC	118		115		
Média					1,17
desvio padrão					0,024
CV %					2

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

ANEXO D – AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA SUBSTÂNCIA DE ENSAIO - VENLAFAXINA

Tabela D.1: Concentração de venlafaxina no início e no final do ensaio

Concentração nominal	Réplica	Concentração média determinada (mg/L)		
		Início	Fim	Variação %
0,25	A	0,234	0,221	5,6
	B	0,233	0,231	0,9
	C	0,236	0,224	5,1
	Controlo	0,234	0,229	2,1
0,50	A	0,424	0,395	6,8
	B	0,426	0,416	2,3
	C	0,456	0,475	-4,2
	Controlo	0,428	0,430	-0,5
1,0	A	0,817	0,803	1,7
	B	0,812	0,802	1,2
	C	0,811	0,796	1,8
	Controlo	0,811	0,827	-2,0
2,0	A	1,627	1,581	2,8
	B	1,662	1,639	1,4
	C	1,652	1,648	0,2
	Controlo	1,627	1,649	-1,4
4,0	A	3,321	3,289	1,0
	B	3,312	3,322	-0,3
	C	3,306	3,223	2,5
	Controlo	3,297	3,325	-0,8
8,0	A	7,139	7,254	-1,6
	B	7,192	7,278	-1,2
	C	6,506	6,476	0,5
	Controlo	6,458	6,539	-1,3
12,0	A	9,936	9,972	-0,4
	B	9,937	9,842	1,0
	C	8,824	8,929	-1,2
	Controlo	9,911	9,952	-0,4
16,0	A	12,900	13,348	-3,5
	B	12,841	13,289	-3,5
	C	12,791	13,207	-3,3
	Controlo	12,924	13,533	-4,7
48,0	A	48,112	49,726	-3,4
	B	48,858	48,996	-0,3
	C	48,367	50,281	-4,0
	Controlo	49,431	41,806	15,4

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

ANEXO E – VARIAÇÃO DA CONDUTIVIDADE NOS ENSAIOS DOS NANOMATERIAIS

Tabela E.1: Variação da condutividade no ensaio com PMo₁₀V₂

PMo ₁₀ V ₂ Concentração	Condutividade (µS/cm)		
	Inicial	Final	Variação
2,1	101,7	101,5	-0,2
4,6	150,7	151,0	0,3
6,3	152,2	149,4	-2,8
9,4	152,4	149,8	-2,6
13,2	154,3	149,0	-5,3
18,4	154,3	152,9	-1,4
36,2	118,8	119,9	1,1

Tabela E.2: Variação da condutividade no ensaio com PMo₁₁V

PMo ₁₁ V Concentração	Condutividade (µS/cm)		
	Inicial	Final	Variação
10,8	157,7	144,3	-13,4
21,3	157,6	144,1	-13,5
41,1	160,5	145,7	-14,8
61,1	159,1	145,9	-13,2
81,2	160,2	146,6	-13,6
160,3	144,4	140,5	-3,9
320,7	139,6	138,2	-1,4
641,0	142,7	143,8	1,1

Tabela E.3: Variação da condutividade no ensaio com PMo₁₂

PMo ₁₂ Concentração	Condutividade (µS/cm)		
	Inicial	Final	Variação
20,7	100,4	102,4	2,0
43,3	142,2	133,5	-8,7
80,1	150,4	142,4	-8,0
161,4	151,3	148,2	-3,1
240,5	156,3	154,1	-2,2
320,7	161,6	159,1	-2,5
400,8	166,5	165,6	-0,9

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

Tabela E.4: Variação da condutividade no ensaio com PMo₁₀V₂@GF

PMo ₁₀ V ₂ @GF Concentração	Condutividade (µS/cm)		
	Inicial	Final	Variação
1,5	147,5	135,5	-11
3,1	101,6	100,4	-1,2
6,2	137,7	137,3	-0,4
12,2	139,7	138,0	-1,7
20,0	141,6	138,8	-2,8
30,4	144,7	141,2	-3,5
40,3	145,5	142,6	-2,9

Tabela E.5: Variação da condutividade no ensaio com PMo₁₁V@GF

PMo ₁₁ V@GF Concentração	Condutividade (µS/cm)		
	Inicial	Final	Variação
10,2	101,6	101,5	-0,1
21,3	146,3	141,0	-5,3
41,3	145,2	139,1	-6,1
81,3	148,0	141,1	-6,9
160,7	149,6	144,6	-5,0
240,7	150,3	145,6	-4,7
401,3	105,8	110,7	4,9

Tabela E.6: Variação da condutividade no ensaio com PMo₁₂@GF

PMo ₁₂ @GF Concentração	Condutividade (µS/cm)		
	Inicial	Final	Variação
41,5	134,2	136,9	2,7
80,0	137,4	138,7	1,3
160,0	138,1	142,2	4,1
320,0	144,7	151,0	6,3
480,0	149,9	163,7	13,8
640,8	161,4	174,0	13,8

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

ANEXO F- EQUAÇÕES DE REGRESSÃO LINEAR USADAS NA DETERMINAÇÃO DOS PONTOS FINAIS

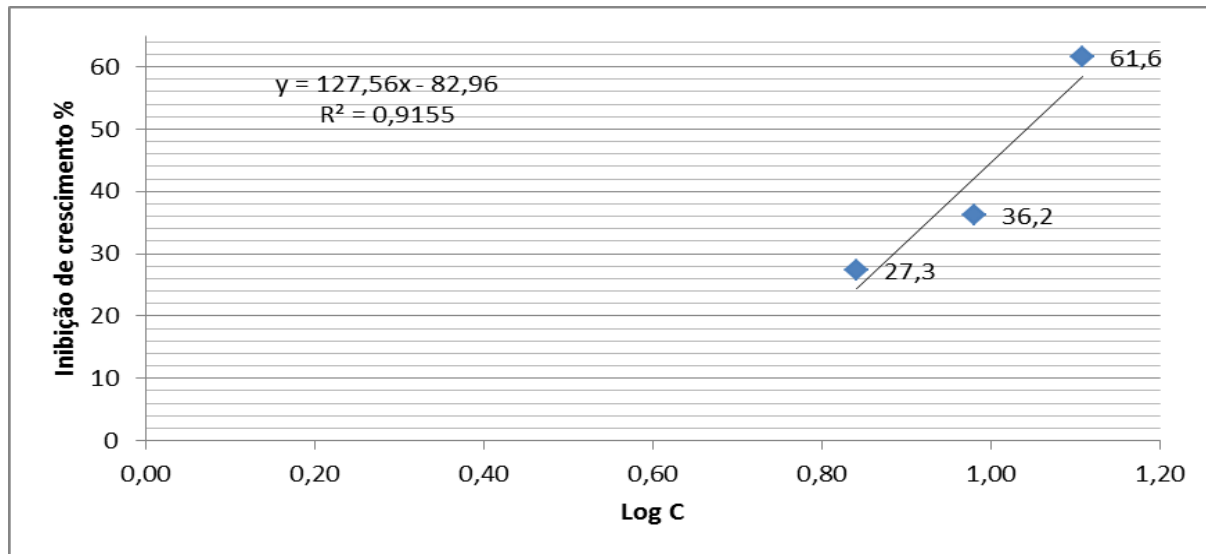


Figura F.1: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de venlafaxina

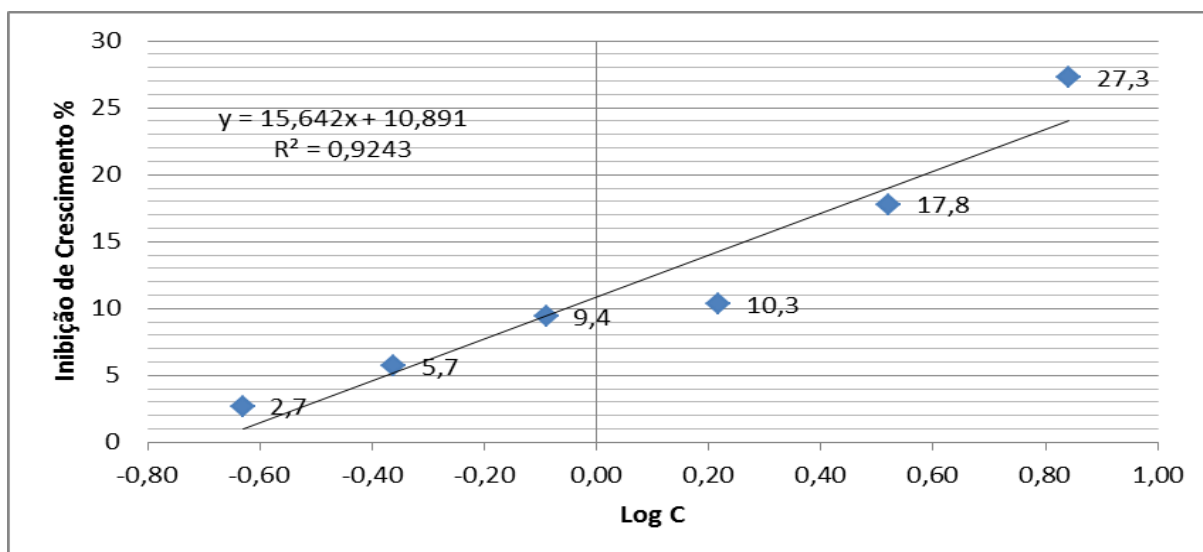


Figura F.2: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de venlafaxina

Avaliação de ecotoxicidade usando microalgas como complemento de estudos para a remoção de psicofármacos em ETARs

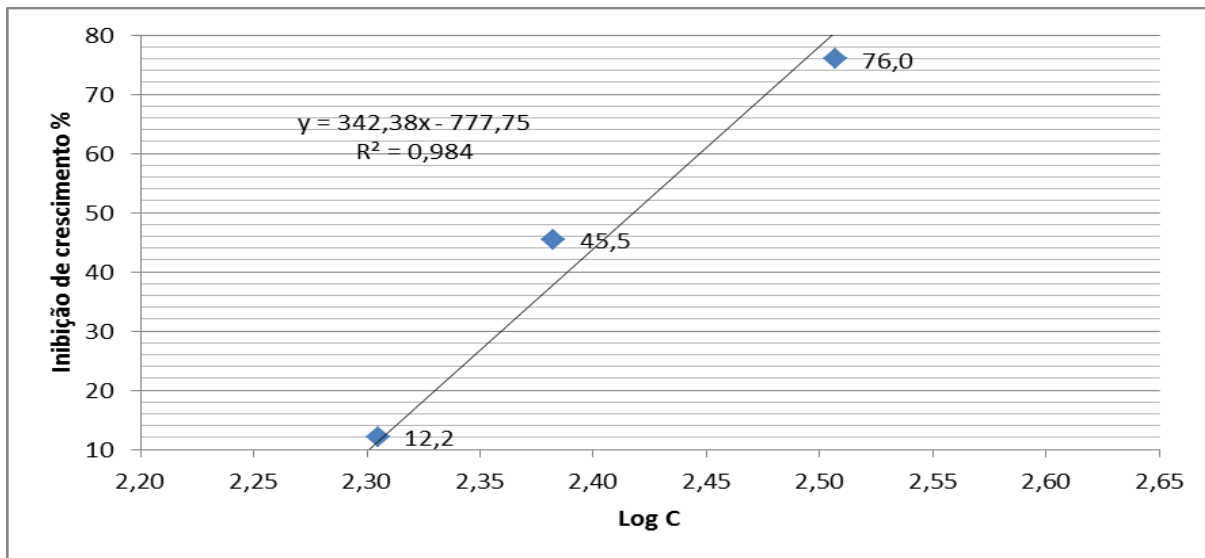


Figura F.3: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de grafeno

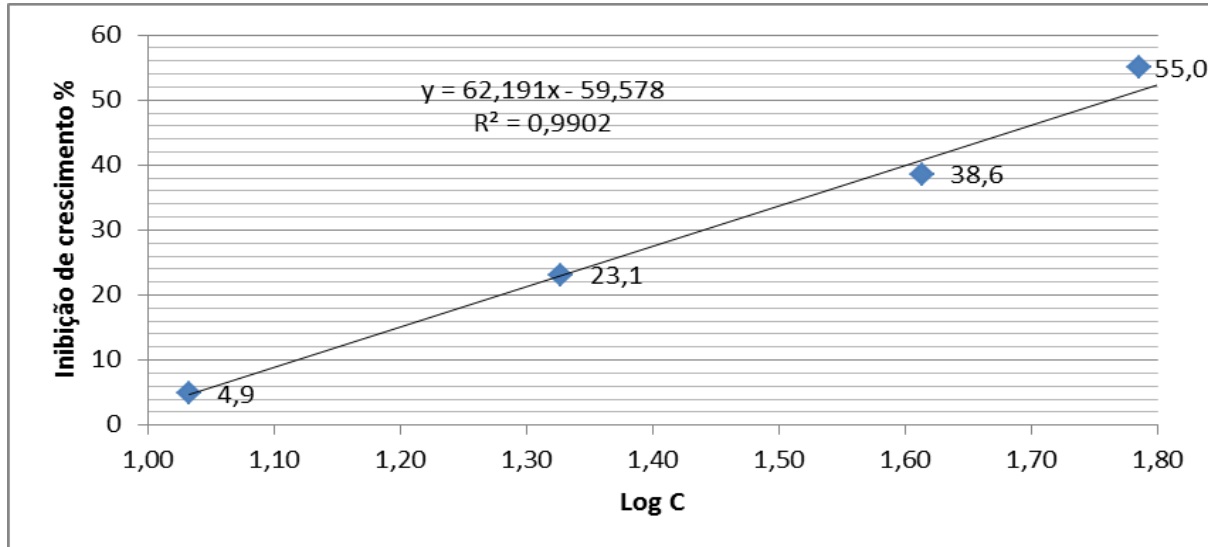


Figura F.4: Inibição de crescimento em função do logaritmo da concentração de PMo₁₁V