

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**ISABELA ARAUJO FIORAVANTE**

**BIODEGRADAÇÃO/BIOACUMULAÇÃO DE FÁRMACOS  
PELA CIANOBACTÉRIA *MICROCYSTIS NOVACEKII*  
COLETADA NO PARQUE ESTADUAL DO RIO DOCE-MG.**

**Belo Horizonte  
2013**

UFMG/ICEx/DQ. 443<sup>a</sup>  
T. 980<sup>a</sup>

**ISABELA ARAUJO FIORAVANTE**

**BIODEGRADAÇÃO/BIOACUMULAÇÃO DE FÁRMACOS  
PELA CIANOBACTÉRIA *MICROCYSTIS NOVACEKII*  
COLETADA NO PARQUE ESTADUAL DO RIO DOCE-MG.**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodinei Augusti  
Co-orientador: Dr. Francisco Barbosa

**Belo Horizonte  
2013**

F517b Fioravante, Isabela Araújo  
2013 Biodegradação/bioacumulação de fármacos pela  
T cianobactéria *Microcystis novacekii* coletada no Parque  
Estadual do Rio Doce-MG [manuscrito] / Isabela Araújo  
Fioravante. 2013.  
151 f. : il.

Orientador: Rodinei Augusti.

Coorientador: Francisco Barbosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas  
Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Química Analítica - Teses 2. Cianobactéria -  
Teses 3. Biodegradação - Teses 4. Bioacumulação -  
Teses 5. Fármacos - Teses I. Augusti, Rodinei,  
Orientador II. Barbosa, Francisco, Coorientador III.  
Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3409-5732  
FAX: 031 - 3409-5711  
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



"Biodegradação/Bioacumulação de Fármacos pela Cianobactéria *Microcystis Novacekii* Coletada no Parque Estadual do Rio Doce-MG"

Isabela Araújo Fioravante

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rodinei Augusti - Orientador  
UFMG

Prof. Maurício Xavier Coutim  
UFOP

Prof. Sérgio Francisco de Aquino  
UFOP

Profa. Leticia Malta Costa  
UFMG

Profa. Zenilca de Lourdes Cardeal  
UFMG

Belo Horizonte, 02 de agosto de 2013.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus que me deu forças durante esta longa caminhada.

Agradeço a meus pais, Pedro e Cristina, pelo exemplo de toda a vida e por me incentivarem e não medirem esforços pra que eu estudasse.

Agradeço aos meus irmãos Lívia e Flávio, pelos anos de maravilhosa convivência, pela companhia e incentivo.

Agradeço também ao meu marido, Paulinho, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades, quero agradecer também à minha filha, Luísa que embora ainda não tenha conhecimento, iluminou de maneira especial os meus pensamentos.

Ao meu orientador Rodinei, pelos ensinamentos e exemplo de ética e dedicação ao trabalho. Agradeço também ao meu co-orientador Francisco, pelo apoio e discussões valiosas. De forma especial agradeço a colaboradora do meu trabalho, Sérgia, pela acolhida e amizade desde o mestrado, além das relevantes contribuições.

Aos colegas do laboratório 167 e 171, Júnia, Júlio, Marquinho, Bruninha, Karla, Vanessa, Amauri, Michelle, Miriane, Helvécio, pelo trabalho em equipe e pelos excelentes momentos de lazer!

Às amigas Jaqueline e Silvéria pela receptividade e apoio desde o início do doutorado.

À aluna de iniciação científica Bruna por todo auxílio na execução deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de águas e do laboratório de limnologia, pelo acolhimento durante estes anos.

Aos amigos de longa data Livia e Luciano.

Aos membros da banca, pelas contribuições e às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG (EDT PRONEX 479/07) pelo apoio financeiro.

Enfim a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, minha eterna gratidão.

Muito obrigada!

“Os fracos é que são maus,  
só se pode esperar  
brandura  
dos fortes”

*Hercília de Araújo*

*Com carinho, dedico este trabalho à meus pais  
e às minhas avós Julieta (in memorian)  
e Hercília(in memorian).*

## Sumário

Sumário.....	1
CAPÍTULO 1 .....	17
1. Justificativa e objetivos.....	18
CAPÍTULO 2 .....	20
2. Revisão Bibliográfica.....	21
2.1. Produtos farmacêuticos e o meio ambiente .....	21
2.2. Legislação ambiental.....	24
2.2.1. Legislação ambiental para o consumo de água potável .....	24
2.2.2. Legislação ambiental para descarte de efluentes .....	25
2.3. Técnicas analíticas em análise ambiental .....	29
2.3.1. Cromatografia .....	29
2.3.1.2. Preparo de amostra – Microextração em fase sólida (SPME) .....	31
2.3.2. Espectrometria de massas.....	33
2.4. Micro-contaminantes estudados .....	36
2.4.1. Etilnilestradiol.....	36
2.4.2. Ácido Clofíbrico .....	38
2.4.3. Diclofenaco .....	39
2.4.4. Tetraciclina.....	40
2.4.5. Atenolol .....	41
2.4.6. Bezafibrato.....	42
2.4.7. Ibuprofeno.....	43
2.5. Uso de cianobactérias como agentes de biodegradação.....	44

2.5.1. Biodegradação de contaminantes aquáticos por microorganismos .....	44
2.5.2. Biodegradação de contaminantes aquáticos por cianobactérias .....	45
2.5.3. Metabolismo de compostos orgânicos por cianobactérias.....	46
2.5.4. Aspectos biotecnológicos das cianobactérias como agentes de biodegradação .....	49
2.6. <i>Microcystis novacekii</i> – Espécie estudada .....	52
2.7. Parque Estadual do Rio Doce .....	54
CAPÍTULO 3 .....	56
3. Materiais e métodos. ....	57
3.1. Condições de cultivo da <i>Microcystis novacekii</i> .....	57
3.1.1. Banco de cianofíceas - Manutenção da cultura-mãe .....	57
3.1.2. Preparo do meio WC.....	57
3.2. Curva de crescimento da <i>M. novacekii</i> .....	59
3.3. Reagentes.....	59
3.4. Ensaio biodegradação/bioacumulação utilizando meio WC.....	60
3.4.1. Montagem do experimento .....	60
3.4.2. Coleta de amostras .....	62
3.4.2.1. Amostras de biodegradação – concentração extracelular dos fármacos .....	62
3.4.2.2. Amostras - Curva de crescimento .....	63
3.4.2.3. Amostras de bioacumulação (Procedimento de lise celular) - concentração intracelular dos fármacos .....	63
3.5. Ensaio de bioacumulação/biodegradação de um efluente farmacêutico real. .....	65

3.5.1. Coleta do efluente.....	65
3.5.2. Termo de Sigilo.....	65
3.5.3. Caracterização do efluente .....	66
3.5.4. Montagem do experimento .....	66
3.5.5. Coleta de amostras.....	67
3.5.5.1. Amostras de biodegradação – concentração extracelular de matéria orgânica.....	67
3.5.5.2. Amostras - Curva de crescimento .....	68
3.5.5.3. Amostras de bioacumulação (Procedimento de lise celular) - presença intracelular dos fármacos.....	68
3.6. Instrumentação- Ensaio com meio WC.....	68
3.6.1. Determinação da concentração extracelular dos fármacos no ensaio com o meio WC. ....	68
3.6.1.1. Etinilestradiol e diclofenaco.....	68
3.6.1.2. Ácido Clofibrico.....	69
3.6.1.3. Atenolol, tetraciclina, bezafibrato e ibuprofeno. ....	70
3.6.2. Determinação da concentração intracelular dos fármacos no ensaio com o meio WC .....	73
3.6.3. Limites de detecção e limites de quantificação.....	73
3.6.4. Pesquisa de metabolitos nos meios extracelular e intracelular no ensaio com o meio WC .....	74
3.7. Instrumentação- Ensaio com o efluente farmacêutico.....	74
3.7.1. Determinação do teor de matéria orgânica no meio extracelular dos fármacos no ensaio com o efluente farmacêutico.....	74

3.7.2. Determinação dos fármacos etinilestradiol, diclofenaco e tetraciclina no meio intracelular no ensaio com o efluente farmacêutico. ....	75
CAPÍTULO 4 .....	76
4. Resultados e discussões.....	77
4.1. Curva de crescimento da cianobactéria <i>M.novacekii</i> .....	77
4.2. Ensaio biodegradação/bioacumulação utilizando meio WC.....	78
4.2.1. Ensaio de biodegradação/bioacumulação do etinilestradiol.....	78
4.2.1.1. Biodegradação.....	78
4.2.1.2. Bioacumulação.....	83
4.2.1.3. Curva de crescimento .....	87
4.2.2. Ensaio de biodegradação/bioacumulação do diclofenaco.....	89
4.2.2.1. Biodegradação.....	89
4.2.2.2. Bioacumulação.....	97
4.2.3 Curva de Crescimento .....	99
4.2.3. Ensaio de biodegradação/bioacumulação do ácido clofíbrico.....	101
4.2.3.1. Biodegradação.....	101
4.2.3.2. Bioacumulação.....	103
4.2.3.3. Curva de crescimento .....	104
4.2.4. Atenolol.....	105
4.2.4.1. Biodegradação.....	105
4.2.4.2. Bioacumulação.....	109
4.2.4.3. Curva de crescimento .....	109
4.2.5. Tetraciclina.....	111
4.2.5.1. Biodegradação.....	111

4.2.5.2. Bioacumulação.....	113
4.2.5.3. Curva de crescimento .....	116
4.2.6. Ibuprofeno.....	117
4.2.6.1. Biodegradação.....	117
4.2.6.2. Bioacumulação.....	121
4.2.6.3. Curva de crescimento .....	121
4.2.7. Bezafibrato.....	123
4.2.7.1. Biodegradação.....	123
4.2.7.2. Bioacumulação.....	125
4.2.7.3. Curva de crescimento .....	126
4.3. Ensaio biodegradação/bioacumulação utilizando o efluente farmacêutico.	127
4.3.1 Biodegradação do efluente farmacêutico.....	128
4.3.2. Bioacumulação.....	132
4.3.3. Curva de crescimento .....	137
<u>CAPÍTULO 5</u> .....	138
5. Considerações finais .....	139
<u>CAPÍTULO 6</u> .....	142
6. Referências Bibliográficas.....	143

## Lista de Figuras

Figura 1. Fontes de contaminação e destino dos produtos farmacêuticos no meio ambiente. [17].....	22
Figura 2. Classes terapêuticas detectadas no ambiente. Dados coletados de 134 artigos de 1997 a 2009. Adaptado de [16].....	23
Figura 3. Representação de SPME por imersão direta na solução (à esquerda). Esquema de dessorção da fibra no injetor do cromatógrafo (à direita).	33
Figura 4. Representação esquemática de um espectrômetro de massas. ...	34
Figura 5. Representação esquemática da ionização por impacto de elétrons (EI) .....	35
Figura 6. Representação da ionização por <i>Eletrospray</i> (ESI).....	36
Figura 7. Estrutura química do etinilestradiol.....	37
Figura 8. Estrutura química do ácido clofibrico.....	39
Figura 9. Estrutura química do diclofenaco.....	40
Figura 10. Estrutura química da tetraciclina.....	41
Figura 11. Estrutura química do atenolol. ....	42
Figura 12. Estrutura química do bezafibrato. ....	43
Figura 13. Estrutura química do ibuprofeno.....	44
Figura 14. Metabolismo de xenobióticos por cianobactérias. Adaptado da referência [63]. ....	48
Figura 15. Aplicações biotecnológicas da biomassa resultante de processos de biodegradação.....	50
Figura 16. Foto da colônia (esquerda) e as células em detalhe (direita). ....	54
Figura 17. Atividades antrópicas ao entorno do PERD.....	55

Figura 18. Esquema do ensaio de biodegradação/bioacumulação. Triplicatas para cada concentração (C1,C2 e C3).....	60
Figura 19. Fotos da montagem de um experimento típico, realizado sob temperatura controlada, agitação constante e foto-período de 12 horas. ....	62
Figura 20. Esquema do procedimento para lise celular.....	64
Figura 21. Correlação entre o crescimento monitorado por densidade óptica (A = 680nm) e a contagem celular ao microscópio da cultura de <i>M.novacekii</i> .....	77
Figura 24. Cromatograma obtido por injeção SPME, de uma solução aquosa de etinilestradiol. ....	78
Figura 25. Espectro de massas da estrona com o íon molecular de $m/z$ 270. ....	79
Figura 26. Espectro de massas do etinilestradiol com o íon molecular de $m/z$ 296. ....	79
Figura 27. Curvas de calibração para o etinilestradiol. ....	80
Figura 28. Foto das amostras (aumento de 40X) antes (a) e após (b) serem submetidas ao procedimento de lise celular.....	83
Figura 29. Curva de calibração usada para quantificação intracelular do etinilestradiol. ....	84
Figura 30. Curva de crescimento da <i>Microcystis novacekii</i> durante o ensaio do etinilestradiol, nos frascos-teste e controle.....	88
Figura 31. Cromatograma obtido por injeção SPME de uma solução aquosa de diclofenaco. ....	90
Figura 32. Espectro de massas da forma lactama do diclofenaco.....	91
Figura 33. Espectro de massas do diclofenaco .....	91
Figura 34. Espectro de massas do metil-éster do diclofanaco.....	92

Figura 35. Curvas de calibração para o diclofenaco.....	93
Figura 36. Curva de calibração usada para quantificação do diclofenaco durante o ensaio.....	94
Figura 37. Curva de calibração do diclofenaco utilizada para o cálculo da fração bioacumulada. ....	98
Figura 38. Curva de crescimento da <i>M.novacekii</i> nos frascos-teste e controle.....	99
Figura 39. Cromatograma obtido a partir da injeção de uma solução padrão de ácido clofíbrico. ....	101
Figura 40. Espectro de massas do ácido clofíbrico.....	101
Figura 41. Espectro de massas do p-clorofenol.....	102
Figura 42. Curva de calibração aquosa para o p-clorofenol. ....	102
Figura 43. Curva de crescimento para o ácido clofíbrico durante o ensaio.	104
Figura 44. Cromatograma de uma solução padrão de atenolol obtido no modo positivo de ionização ( [M+H] <sup>+</sup> =267, 170).....	105
Figura 45. Curva na matriz para o atenolol.....	107
Figura 46. Curva de crescimento durante o ensaio de biodegradação do atenolol.....	109
Figura 47. Cromatograma obtido a partir de uma solução padrão de tetraciclina por HPLC-ESI-MS. ....	111
Figura 48. Curva de calibração matrizada para a tetraciclina (R <sup>2</sup> =0.9981).	111
Figura 49. Curva de calibração para quantificação da tetraciclina intracelular. ....	114
Figura 50. Curva de crescimento durante o ensaio da tetraciclina. ....	116

Figura 51. Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS, de uma solução padrão de ibuprofeno. ....	117
Figura 52. Curva na matriz para quantificação do ibuprofeno extracelular.	118
Figura 53. Estrutura química da isobutilacetofenona.....	120
Figura 54. Mecanismo de formação da isobutilacetofenona por fotólise descrito na referência [105]......	121
Figura 55. Curva de crescimento durante o ensaio para o ibuprofeno. (T1: teste nível 1, T2: teste nível 2, T3: teste nível 3 e A: controle alga.) .....	122
Figura 56. Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS a partir de uma solução padrão de bezafibrato.....	123
Figura 57. Curva de calibração matrizada para o bezafibrato. ....	124
Figura 58. Curva de crescimento durante o ensaio para o bezafibrato. (T1: teste nível 1, T2: teste nível 2, T3: teste nível 3 e A: controle alga.) .....	126
Figura 59. Foto do ensaio de biodegradação do efluente farmacêutico. Frascos-teste e controle são mostrados á esquerda e direita, respectivamente...	129
Figura 60. Espectro de massas da tetraciclina no modo positivo. Forma protonada $m/z$ 445.1636.....	133
Figura 61. Espectro de massas do etinilestradiol no modo negativo. forma desprotonada $m/z$ 295.1695.....	133
Figura 62. Esquema de aproveitamento biotecnológico da biomassa usada no tratamento de efluentes.....	135
Figura 63. Curva de crescimento durante dos frascos teste e controle durante o ensaio com o efluente real. ....	137

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Resumo dos parâmetros regulamentados pela deliberação normativa nº 01, COPAM, 2008. ....	27
Tabela 2. Fibras de SPME e suas principais características. ....	32
Tabela 3. Propriedades físico-químicas do etinilestradiol. Fonte: [36].....	38
Tabela 4. Propriedades físico-químicas do ácido clofíbrico. Fonte: Budavari S., The Merck Index,1989.[36] .....	39
Tabela 5. Propriedades físico-químicas do diclofenaco.....	40
Tabela 6. Propriedades físico-químicas da tetraciclina.....	41
Tabela 7. Propriedades físico-químicas do atenolol. ....	42
Tabela 8. Propriedades físico-químicas do bezafibrato. ....	43
Tabela 9. Propriedades físico-químicas do ibuprofeno. ....	44
Tabela 10. Substâncias isoladas de cianobactérias com atividade biológica. ....	51
Tabela 11. Preparo do meio WC para cultivo de <i>M. novacekii</i> . Composição das soluções estoque de 1 a 7.....	58
Tabela 12. Composição da solução estoque 8 utilizada no preparo do meio WC. ....	58
Tabela 13. Composição da solução estoque 9, utilizada no preparo do meio WC. ....	58
Tabela 14. Concentrações testadas para os fármacos estudados para o ensaio com o meio WC. ....	61
Tabela 15. Condições instrumentais para quantificação dos fármacos nos ensaios com o meio WC.....	72

Tabela 16. Concentrações das curvas de calibração para o etinilestradiol com os desvios relativos S.D. (%). Os ensaios foram feitos em triplicata. ....	80
Tabela 17. Porcentagem de redução do etinilestradiol nos frascos-teste e nos frascos-controle nos três níveis de concentração testados durante o ensaio...	82
Tabela 18. Concentração intracelular (mg/L) de etinilestradiol no sétimo dia de ensaio.....	84
Tabela 19. Balanço de massas para o etinilestradiol no último dia de experimento.....	85
Tabela 20 - Razão do crescimento ( $d^{-1}$ ), dos testes e controle durante o ensaio com etinilestradiol. ....	88
Tabela 21. Concentrações das curvas analíticas com seus desvios relativos S.D.(%).....	92
Tabela 22. Porcentagem de redução do diclofenaco durante o ensaio .....	94
Tabela 23. Dados utilizados para a construção da curva de calibração representada na Figura 17. ....	98
Tabela 24. Razão do crescimento da <i>M.novacekii</i> nos dias 4 e 7 do ensaio. ....	99
Tabela 25. Concentração do ácido clofíbrico no meio extracelular durante o ensaio.....	103
Tabela 26. Razão de crescimento por dia de ensaio ( $d^{-1}$ ) até o quarto e sétimo dia de ensaio.....	105
Tabela 27. Concentração extracelular do atenolol durante o ensaio. ....	108
Tabela 28. Razão do crescimento por dia ( $d^{-1}$ ) dos dias 4 e 7.....	110
Tabela 29. Concentração extracelular da tetraciclina durante o ensaio de biodegradação.....	112

Tabela 30. Concentração intracelular corrigida. (F.C- fator de correção=25)	114
Tabela 31. Balanço de massas da tetraciclina no dia 7.....	115
Tabela 32. Razão do crescimento por dia ( $d^{-1}$ ) até os dias 4 e 7.....	116
Tabela 33. Concentração do ibuprofeno nos frascos-teste e controle durante o ensaio de biodegradação. ....	119
Tabela 34. Razão do crescimento por dia ( $d^{-1}$ ) até o dia 4 e até o dia 7 de ensaio.....	122
Tabela 35. Concentração extracelular do bezafibrato nos frascos teste e controle durante o ensaio.....	124
Tabela 36. Razão do crescimento por dia ( $d^{-1}$ ) até o dia 4 e até o dia 7 de ensaio.....	127
Tabela 37. Resumo dos resultados obtidos nos ensaios com o meio WC.	128
Tabela 39. Resultados das análises de DBO, DQO e OD, dos frascos-teste e controle após 7 dias de ensaio.....	130

## RESUMO

O potencial de biodegradação e bioacumulação de fármacos de meio aquoso pela cianobactéria *Microcystis novacekii* foi investigado. Os ensaios foram feitos com o meio aquoso WC (*water culture*) e com um efluente farmacêutico real. Os fármacos estudados foram: etinilestradiol (hormônio sexual), diclofenaco e ibuprofeno (antiinflamatórios), tetraciclina (antibiótico), atenolol (betabloqueador), ácido clofíbrico e bezafibrato (antilipêmicos).

Na primeira etapa deste trabalho, cada fármaco foi testado separadamente sendo incubados com a cianobactéria cultivada em meio WC. Para estimar a eficiência de remoção dos fármacos pela cianobactéria, as concentrações dos fármacos no meio extracelular foram monitoradas por um período de 7 dias. Verificou-se que a cianobactéria não apresentou capacidade para bioacumular/biodegradar os seguintes fármacos: ibuprofeno, atenolol, ácido clofíbrico e bezafibrato. Por outro lado, a taxa de remoção do hormônio etinilestradiol do meio extracelular foi de 65 a 68% nas concentrações testadas. Para a tetraciclina foi de 60 a 100% e, para o diclofenaco, a redução variou de 70 a 96%. Adicionalmente foi feito um controle de degradação espontânea destes três fármacos, a qual não foi significativa. O crescimento da cianobactéria foi monitorado, o qual não foi afetado pela presença destes fármacos no meio. Possíveis produtos de biodegradação foram também pesquisados utilizando cromatografia acoplada à espectrometria de massas, os quais não foram detectados.

Para avaliar o mecanismo de remoção, foi desenvolvido um procedimento de lise celular, inédito na literatura, com o objetivo de avaliar a bioacumulação destes fármacos no meio intracelular da cianobactéria. Para o etinilestradiol, aproximadamente 35% do hormônio adicionado foi bioacumulado enquanto que

para a tetraciclina, aproximadamente 0,5%. O mecanismo de remoção proposto foi a bioacumulação conjugada com a mineralização. Para o diclofenaco, o qual não foi detectado no meio intracelular e cuja biodegradação não levou à formação de metabólitos, o mecanismo proposto foi a mineralização.

Na segunda etapa deste trabalho, os fármacos que apresentaram degradação biológica (etinilestradiol, diclofenaco e tetraciclina) foram adicionados a um efluente farmacêutico, no qual estavam presentes, além dos fármacos adicionados, outros contaminantes orgânicos. Ao fim de 7 dias de tratamento, observou-se que a cianobactéria foi capaz de reduzir aproximadamente 50% do teor de matéria orgânica total, medida através de análises de demanda química (DQO) e bioquímica de oxigênio (DBO). Consistente com os resultados previamente descritos, apenas dois dos fármacos adicionados (etinilestradiol e tetraciclina) foram detectados no interior das células da cianobactéria. Estes resultados confirmam, portanto, que as cianobactérias apresentam potencial para uso em tratamento de efluentes contaminados com matéria orgânica.

## ABSTRACT

The potential for bioaccumulation/ biodegradation of drugs in aqueous medium by the cyanobacterium *Microcystis novacekii* was investigated. The experiments were performed in a WC (water culture) medium and in a real pharmaceutical effluent. The drugs studied were: ethinylestradiol (sexual hormone), diclofenac and ibuprofen (anti-inflammatory), tetracycline (antibiotic), atenolol (beta blocker), clofibrac acid and bezafibrate (antilipemics)

In the first part of the present study, each drug was tested separately and incubated together with the cyanobacteria in a WC medium. To estimate the efficiency of drugs removal, the analyte concentrations in the extracellular medium were monitored for a period of 7 days. It was found that this cyanobacterium showed no ability to bioaccumulate / biodegrade the following drugs: ibuprofen, atenolol, clofibrac acid and bezafibrate. On the other hand, the removal rate of ethinylestradiol reached 65-68% at the concentrations tested. For tetracycline removal rates varying from 60 to 100 % were observed, whereas for diclofenac a reduction rate ranging from 70 to 96 % was determined. Control experiments indicated that these three drugs underwent spontaneous degradation in an insignificant rate whereas their presence did not affect the cyanobacterium growth. Careful analysis by chromatography coupled to mass spectrometry indicated no formation of degradation products.

To evaluate the removal mechanism and to determine the bioaccumulation rate of these drugs into the cyanobacterium intracellular medium, an unprecedented procedure for cell lysis was developed. For ethinylestradiol and tetracycline approximately 35 % and 0.5 % of the initial drugs were bioaccumulated, respectively. The removal mechanism was proposed to be bioaccumulation

combined with mineralization. For diclofenac, which was not detected in the intracellular medium and whose biodegradation did not lead to the formation of metabolites, a mineralization mechanism was proposed.

In the second part of the present study, the drugs that were biodegraded by the cyanobacterium (ethinylestradiol, tetracycline and diclofenac) were added to a pharmaceutical effluent that contained several other organic contaminants (including pharmaceutical compounds). After 7 days of treatment, the cyanobacterium was able to reduce approximately 50% of the total organic content, measured by analysis of chemical (COD) and biological (BOD) demand of oxygen. Consistent with the results previously described, only ethinylestradiol and tetracycline were detected inside the cells of the cyanobacteria. These results therefore confirm that the cyanobacterium *Microcystis novacekii* has potential to be used in the treatment of wastewater contaminated with large amounts of organic matter.

## **CAPÍTULO 1**

## 1. Justificativa e objetivos

O processo de industrialização, o aumento populacional e a demanda por bens de consumo têm contribuído para a degradação das condições ambientais. Produtos de higiene pessoal e medicamentos têm sido amplamente utilizados na vida moderna. Estes produtos, que possuem propriedades físico-químicas que garantem sua eficácia e durabilidade, têm sido amplamente detectados em amostras de água superficial e subterrânea.

Devido a sua persistência no meio ambiente, novos tratamentos vêm sendo estudados para a remoção de fármacos do esgoto doméstico e de efluentes industriais. O tratamento de água convencional não é eficiente para remover tais poluentes, os quais são freqüentemente encontrados em amostras de água potável, assim como em águas superficiais e subterrâneas. A presença de fármacos no ambiente tem sido relacionada a danos causados à saúde humana e desequilíbrio do ecossistema aquático.

O tratamento biológico possui vantagens em relação aos tratamentos físico-químicos, pois é uma técnica limpa, de baixo custo e que pode causar mineralização dos poluentes. Bactérias e fungos são microorganismos bastante estudados quanto ao seu potencial de biodegradação de poluentes. Por outro lado, as cianobactérias são organismos pouco estudados e bem adaptados a ambientes poluídos. Em comparação aos demais microorganismos utilizados na biodegradação, possuem a vantagem de não precisar suplementar o meio com nutrientes, já que na falta de matéria orgânica podem realizar fotossíntese, transformando o gás carbônico em moléculas de açúcar.

Neste trabalho foi estudada a remoção de alguns fármacos pela cianobactéria *Microcystis novacekii*, em condições simuladas em laboratório e com

um efluente real contaminado por fármacos. Fármacos de diferentes classes terapêuticas foram escolhidos para os estudos, pois são usualmente encontrados em amostras de água, no Brasil e em outros países, indicando sua persistência no ambiente aquático.

Nesta perspectiva, este trabalho tem como objetivo geral:

- Avaliar o potencial de bioacumulação/biodegradação dos fármacos etinilestradiol, diclofenaco, ácido clofíbrico, tetraciclina, ibuprofeno, bezafibrato e atenolol do meio aquoso WC (*water culture*) e de um efluente farmacêutico real pela cianobactéria *Microcystis novacekii*.

Apresenta também os seguintes objetivos específicos:

-Manter o cultivo em laboratório da cianobactéria *Microcystis novacekii*, isolada no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), para fins de utilização nos testes de biodegradação/bioacumulação;

-Avaliar a toxicidade dos fármacos estudados frente à *Microcystis novaceki*;

-Propor e discutir os possíveis mecanismos de biodegradação/bioacumulação dos fármacos estudados pela espécie *Microcystis novacekii*;

-Estimar a eficiência dos processos de biodegradação utilizando o meio WC;

-Estimar a eficiência dos processos de biodegradação em uma amostra real de efluente farmacêutico.

## **CAPÍTULO 2**

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Produtos farmacêuticos e o meio ambiente**

A presença de medicamentos para uso humano e veterinário e produtos de higiene pessoal no meio ambiente tornou-se um tópico recente na pesquisa científica. Os primeiros estudos sobre o problema foram publicados na década de 70, na Inglaterra [1]. O aperfeiçoamento das técnicas analíticas hifenadas tornou possível a identificação e quantificação destes compostos em diferentes matrizes, em concentrações muito baixas (ng/L e µg/L). Sua presença em ambientes aquáticos tem sido relacionada com danos à saúde humana e organismos aquáticos [2].

O consumo destes compostos, mesmo em concentrações subterapêuticas, representa uma ameaça à saúde pública. Embora seja difícil determinar os danos causados à saúde humana, alguns estudos de toxicidade aguda e crônica em diferentes níveis tróficos (fitoplancton, zooplancton e animais vertebrados), têm demonstrado a elevada toxicidade destas substâncias, levando a mutações e feminilização de algumas espécies [3-5].

A vida moderna levou a um aumento do consumo dos produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal e medicamentos, que têm sido amplamente utilizados na medicina humana e veterinária. Estes produtos possuem propriedades físico-químicas que garantem sua eficácia e durabilidade; portanto, as mesmas propriedades que garantem o benefício terapêutico contribuem para sua persistência no ambiente. Geralmente estes compostos são resistentes à inativação, de polaridade intermediária e moderada estabilidade química [3, 6].

Diferentes fármacos têm sido encontrados em efluentes de estações de tratamento de água e esgoto [7], em água potável, rios, lagoas, córregos [9-12], água do mar [13] e águas subterrâneas [14, 15].

O caminho mais óbvio para a contaminação dos ambientes aquáticos é a excreção destes fármacos inalterados, biotransformados ou conjugados pelas fezes e urina. O esgoto pode atingir diretamente os corpos d'água, ou passar por estações de tratamento de esgoto (ETE) contaminando a água potável (Figura 1). A lama residual do tratamento de esgoto é utilizada como fertilizante na agricultura, podendo contaminar os alimentos com medicamentos aderidos ao lodo, e também a cultura de hortaliças ou criações de animais, onde estes compostos são utilizados para viabilizar a produção. Mas existem outras fontes de contaminação, como o descarte inadequado de resíduos hospitalares, o uso de medicamentos na aquicultura, a inadequada disposição de medicamentos vencidos, e o descarte de efluentes contaminados com fármacos pelas indústrias farmacêuticas [16, 17].

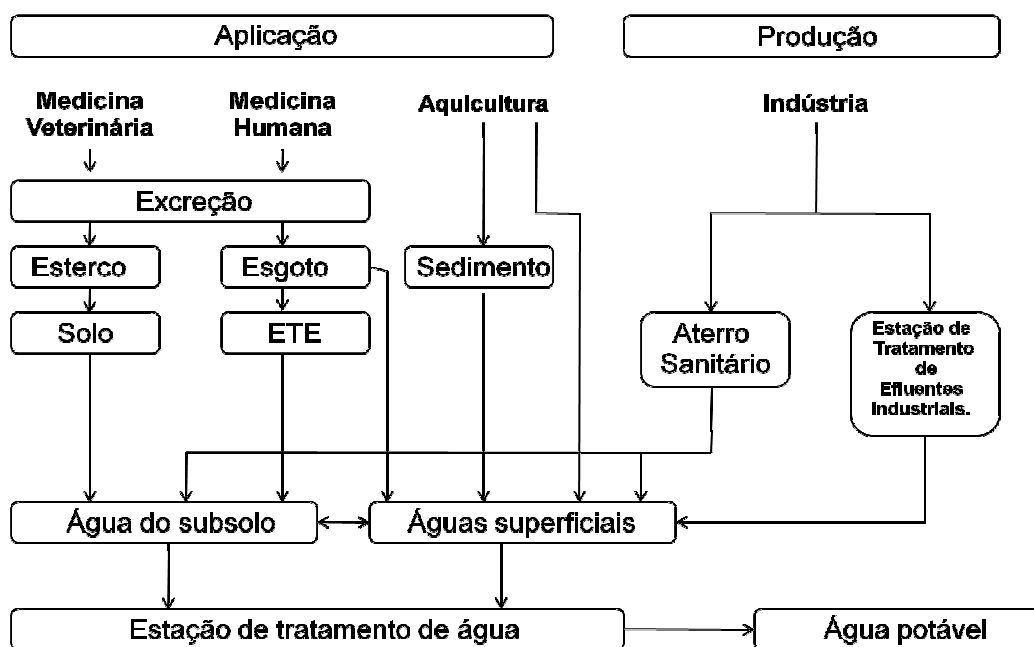
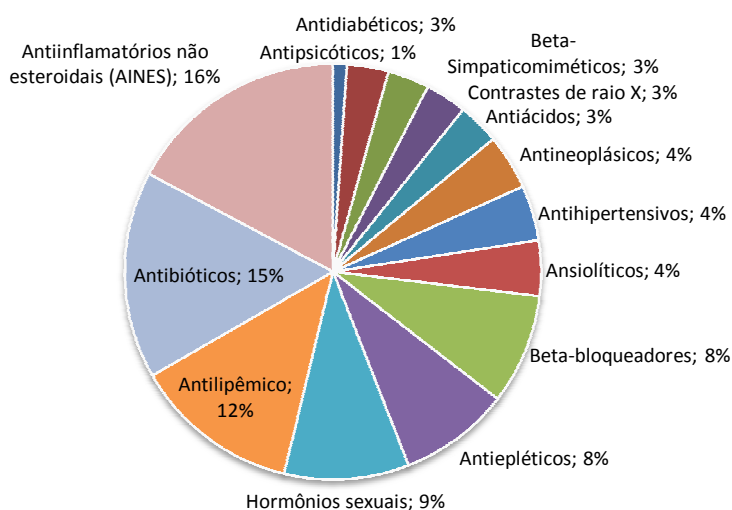


Figura 1. Fontes de contaminação e destino dos produtos farmacêuticos no meio ambiente. [17]

Após atingir o ambiente, o destino e o comportamento dos fármacos são influenciados por processos físico-químicos e microbiológicos. No entanto, estas substâncias possuem moderada persistência e acabam se disseminando no meio ambiente. Os fármacos de polaridade intermediária são distribuídos por transporte aquoso e transferidos através da cadeia alimentar; os mais apolares acabam ficando aderidos aos sedimentos dos corpos d'água ou, no caso do tratamento de esgoto, retidos na lama residual [4].

A persistência e disseminação de produtos farmacêuticos no meio ambiente têm impulsionado a pesquisa de novos tratamentos para a remoção destes poluentes do ambiente aquático. Dentre os métodos físico-químicos, os processos oxidativos avançados são os mais utilizados na tentativa de mineralização, mas são tratamentos dispendiosos para aplicação em larga escala [18]. Entretanto, alguns microorganismos são capazes de degradar estes poluentes e promover sua mineralização [19].



**Figura 2. Classes terapêuticas detectadas no ambiente. Dados coletados de 134 artigos de 1997 a 2009. Adaptado de [16].**

As classes terapêuticas de maior persistência e, conseqüentemente, potenciais causadoras de danos à saúde humana e ambiental, são os antiinflamatórios não esteroidais (AINE'S), os antibióticos, fármacos anti-lipêmicos e os hormônios sexuais. Na última década, estas classes de medicamentos foram as mais encontradas em ambientes aquáticos (Figura 2). Nesta perspectiva, torna-se necessária a pesquisa de tratamentos eficientes e viáveis economicamente, para remoção destes compostos de efluentes industriais e ambientes aquáticos.

## **2.2. Legislação ambiental**

### **2.2.1. Legislação ambiental para o consumo de água potável**

A Agência Americana de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* - EPA) foi a primeira agência a regulamentar mais de 90 limites aceitáveis de contaminantes orgânicos e inorgânicos em água potável, mas os fármacos ainda não foram inseridos nesta lista. No entanto, atualmente a EPA desenvolve estudos para determinar substâncias passíveis de regulamentação, baseadas nos riscos ecotoxicológicos das mesmas. Dentre estas substâncias, os hormônios sexuais e os antimicrobianos são os fármacos que aparecem nesses estudos. Os estudos são de caráter multidisciplinar para determinar níveis seguros para consumo destas substâncias e, conseqüentemente, seu limite máximo permitido em água potável. Esta lista conta com 104 compostos orgânicos, candidatos à regulamentação, e foram selecionados a partir de 6000 substâncias. Estas foram selecionadas de acordo com estudos ecotoxicológicos e a freqüência com que estes compostos são encontrados na água potável. [20]

Estabelecer estes limites máximos aceitáveis é um desafio, mesmo para a *Environmental Protection Agency* (EPA), pois depende de complexos estudos

multidisciplinares, para estabelecer níveis seguros para exposição à saúde humana. Além disso, quando estes limites são estabelecidos em água potável, diversas ações devem ser tomadas pelos órgãos governamentais, no sentido de desencadear outras legislações que regulamentem o descarte e lançamento destes contaminantes pelas principais fontes poluidoras, que no caso dos fármacos são o esgoto doméstico e os efluentes industriais. Este monitoramento por parte dos órgãos públicos ou indústrias privadas requer recursos humanos e físicos especializados, como equipamentos de cromatografia e espectrometria de massas, e analistas experientes na área de química analítica.

No Brasil, a Portaria Nº 2.914 de 2011, do Ministério da Saúde, regulamenta os limites máximos aceitáveis em água potável de substâncias que causam danos à saúde. Para alguns compostos orgânicos, como por exemplo, alguns pesticidas, os limites já foram estabelecidos. Mas assim como na EPA, não há limites máximos aceitáveis para medicamentos em água potável. A legislação brasileira é permissiva em comparação com a americana, já que os limites estabelecidos para compostos orgânicos estão respectivamente, na faixa de mg/L e ng/L. No Brasil a falta de recursos humanos e recursos físicos também são fatores limitantes para a adoção de uma legislação mais rígida; e para a quantificação de limites máximos aceitáveis em concentração muito baixas.

### **2.2.2. Legislação ambiental para descarte de efluentes**

Para que os limites máximos na água potável sejam respeitados, é necessária a adoção de medidas que regulamentem o descarte de esgotos domésticos e de efluentes industriais, já que são as principais fontes poluidoras dos mananciais de captação de água potável.

A Resolução CONAMA nº 430 de 2011 (CONAMA, 2011) estabelece padrões de lançamento de efluentes. Nesta resolução, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água após o devido tratamento e desde que obedçam às condições, padrões e exigências dispostos na resolução e em outras normas aplicáveis. Substâncias inorgânicas e orgânicas têm seus limites máximos estabelecidos e devem ser quantificados de acordo com o tipo de efluente industrial.

As legislações federais e estaduais classificam os seus corpos de água em função de seus usos preponderantes, ou seja, para cada classe de uso de água, os padrões de qualidade são diferentes. A maioria dos corpos de água receptores, no Brasil, se enquadra na classe 2 (águas que podem ser destinadas: ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e à aqüicultura e à atividade de pesca).

O Conselho de Política Ambiental - COPAM, é o órgão responsável pela formulação e execução da política ambiental em Minas Gerais. De acordo com a Deliberação Normativa COPAM nº 01, de 05 de maio de 2008, quanto aos lançamentos de efluentes realizados direta ou indiretamente, nos corpos de água pelas indústrias devem seguir os parâmetros descritos na Tabela 1

**Tabela 1. Resumo dos parâmetros regulamentados pela deliberação normativa nº 01, COPAM, 2008.**

Parâmetro	Valor limite	Considerações
pH	6-9	
Temperatura	40 °C	A temperatura não deve oscilar mais que 3 °C no limite da zona de leitura
Materiais sedimentáveis	1 ml/L	Teste de 1 hora em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes;
Óleos e Graxas	20mg/L 50mg/L	Óleos minerais Óleos vegetais e gordura animal
DBO	60mg/L	Os limites a que se referem só poderão ser ultrapassados quando o estudo de autodepuração comprovar que o sistema de tratamento reduz a carga poluidora dos efluentes, em termos de DBO5 dias a 20°C, no mínimo, 70%.
DQO	180mg/L	Os limites a que se referem só poderão ser ultrapassados quando o estudo de autodepuração comprovar que o sistema de tratamento reduz a carga poluidora dos efluentes, em termos de DBO5 dias a 20°C, no mínimo, 70%.
OD	No mínimo 6 mg/L	

\* DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio; DQO: Demanda Química de Oxigênio; OD: oxigênio dissolvido.

. Outros parâmetros inorgânicos e orgânicos também são descritos nesta deliberação, mas devem ser avaliados de acordo com o tipo de efluentes e possíveis contaminantes encontrados no mesmo. Os parâmetros descritos na Tabela 1, são importantes de serem avaliados em qualquer tipo de efluente industrial, pois são parâmetros gerais, para que o efluente não interfira com processos aquáticos, preservando as espécies de animais e plantas aquáticas de uma possível toxicidade.

O pH do efluente deve ser monitorado, pois o pH do corpo d'água é condição primária para manutenção das reações químicas e fisiológicas deste ecossistema.

O oxigênio dissolvido (OD) indica a concentração de oxigênio dissolvido na água em mg/L. O oxigênio dissolvido é o elemento principal no metabolismo dos microrganismos aeróbios e os peixes nos mananciais. A maioria das espécies não resiste a concentrações de oxigênio dissolvido na água inferiores a 4.0 mg/L. O oxigênio é um gás pouco solúvel em água e a sua solubilidade depende da pressão (altitude), temperatura e sais dissolvidos. Normalmente a concentração de saturação está em torno de 8 mg/L a 25°C entre 0 e 1.000 m de altitude.

Demanda bioquímica de oxigênio (DBO) é um indicador que determina indiretamente a concentração de matéria orgânica biodegradável através da demanda de oxigênio exercida por microrganismos através da respiração. O oxigênio dissolvido na amostra é medido logo após a coleta e após 5 dias de incubação, a 20°C. Esta diferença de concentração de oxigênio representa a DBO (oxigênio consumido para oxidar a matéria orgânica via respiração dos microrganismos).

Já a demanda química de oxigênio (DQO) é um indicador de matéria orgânica baseado na concentração de oxigênio consumido para oxidar a matéria orgânica, biodegradável ou não, em meio ácido. A amostra é titulada com um agente oxidante, dicromato ou permanganato. Esta técnica apenas estima a concentração de matéria orgânica, pois espécies inorgânicas, tais como nitritos, compostos reduzidos de enxofre e algumas substâncias orgânicas, como hidrocarbonetos aromáticos, compostos alifáticos de cadeia aberta e piridinas, não são oxidadas por estes agentes oxidantes. [21]

Estes parâmetros gerais são atualmente utilizados como padrão de lançamento de efluentes de diferentes tipos de indústrias, no Brasil e no exterior. Este tipo de análise é empregado, devido a sua facilidade de execução, baixo custo

de realização e à facilidade de recursos humanos. Os compostos orgânicos são quantificados em efluentes industriais de forma indireta, por análise de DBO e DQO. Alguns efluentes com contaminantes mais específicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais pesados, devem ser quantificados por técnicas analíticas mais complexas. Para a maioria dos efluentes industriais, inclusive para efluentes farmacêuticos, a análise de parâmetros gerais é suficiente para seu descarte e lançamento de acordo com a legislação ambiental atualmente em vigor no Brasil.

As técnicas analíticas usadas para a quantificação de compostos inorgânicos e orgânicos requerem equipamentos e mão de obra especializada para sua execução e são utilizadas em casos específicos, como já descritos, ou na pesquisa para verificar a eficiência dos novos tratamentos de efluentes propostos. Para a quantificação de compostos orgânicos em efluentes aquosos, a técnica mais utilizada é a cromatografia acoplada à espectrometria de massas.

## **2.3. Técnicas analíticas em análise ambiental**

### **2.3.1. Cromatografia**

A cromatografia é um método físico-químico de separação de constituintes de uma amostra que são particionados entre duas fases: uma estacionária e outra móvel. A fase móvel percorre a fase estacionária e os constituintes da amostra são separados devido à interação física e química com as fases; a magnitude destas interações determina o tempo que o constituinte fica retido na coluna cromatográfica.

Na cromatografia gasosa (CG) a fase móvel é constituída de um gás inerte, e as fases estacionárias são as colunas capilares, constituídas de um suporte

sólido recheado com um líquido viscoso, que pode apresentar diferentes polaridades. A separação cromatográfica se dá por um mecanismo de partição do analito com a coluna e seu ponto de ebulição [22].

Na cromatografia líquida (CL), a fase móvel é líquida, constituída de água e/ou solventes que podem ser combinados resultando em diferentes polaridades. A fase estacionária é um sólido que apresenta diferentes polaridades e porosidades. A separação dos constituintes da amostra é baseada no equilíbrio de partição do analito com a fase móvel e a fase estacionária. .

A cromatografia gasosa não é aplicada a compostos termicamente instáveis e não voláteis. Métodos de derivatização podem ser utilizados para aumentar a estabilidade térmica das moléculas, através da adição de grupos funcionais que minimizem os pontos de instabilidade da mesma. Além disso, amostras aquosas não devem ser analisadas por cromatografia gasosa quando se utiliza colunas apolares, devido à incompatibilidade química que causa danos à coluna. Nesta perspectiva, é necessário que seja realizado um preparo de amostra para transferir o analito para uma fase compatível com colunas de baixa polaridade.

Na cromatografia líquida espécies não voláteis, termicamente instáveis e em amostras aquosas podem ser analisadas sem preparo de amostra, a não ser que o objetivo do preparo de amostra seja a pré-concentração do analito e a eliminação de substâncias indesejáveis [22].

Apesar das diferenças, ambas as técnicas, quando otimizadas, apresentam eficiência, sensibilidade e podem ser empregadas em diferentes tipos de analitos e em vários campos das ciências, como nas indústrias farmacêuticas, análises químicas, ambientais e forenses. [7-9, 23-25].

A cromatografia quando acoplada à espectrometria de massas é uma importante ferramenta para detecção e quantificação de micro-contaminantes em água. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta eficiência na separação) com as vantagens da espectrometria de massas (informação estrutural e seletividade). [26].

#### **2.3.1.2. Preparo de amostra – Microextração em fase sólida (SPME)**

A microextração em fase sólida é utilizada na cromatografia gasosa, com o objetivo de extrair o analito de interesse presente na amostra aquosa para uma fase sólida ou líquida.

O preparo de amostra é uma etapa importante em análises ambientais. Os analitos de interesse são encontrados em concentrações ao nível de traços, portanto há a necessidade de uma etapa de pré-concentração. Existe uma variedade de técnicas, que se baseiam na diferença de afinidade entre o analito e a matriz em contato com uma fase líquida (extração líquido-líquido-LL), ou em contato com uma fase sólida de diferentes polaridades (extração em fase sólida-EFS).

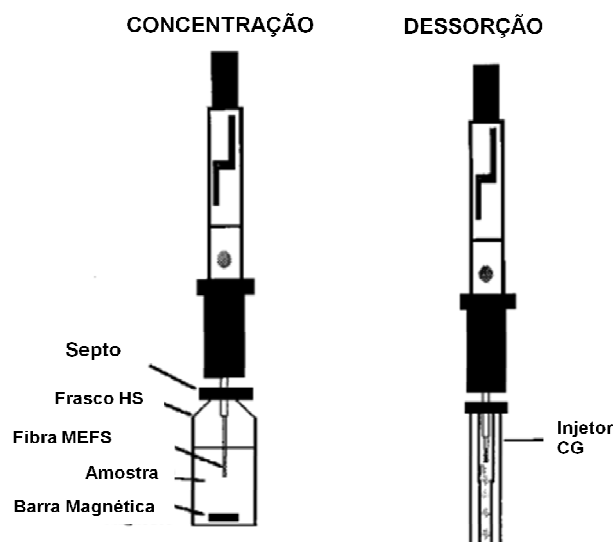
A microextração em fase sólida (SPME) foi uma verdadeira “revolução verde” no preparo de amostra, pois não utiliza solvente. Além disso, combina amostragem e pré-concentração em uma única etapa [27]. O dispositivo de SPME consiste em uma haste de sílica fundida, com 10 mm de comprimento, recoberta por uma fase polimérica de diferentes polaridades e espessuras como demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2. Fibras de SPME e suas principais características.**

Composição da fase polimérica	Polaridade	Interação	Espessura da fase ( $\mu\text{m}$ )	Aplicação
Polidimetilsiloxana (PDMS)	apolar	absorção	100	voláteis
			30	semi-voláteis apolares
			7	semi-voláteis polaridade intermediária
Polidimetilsiloxana / Divinilbenzeno (PDMS/DVB)	polar	adsorção	60	voláteis polares
			65	polares
Carbowax / Divinilbenzeno (CAR/DVB)	polaridade intermediária	adsorção e absorção	65	voláteis polares
Poliacrilato (PA)	polar	absorção	85	semi-voláteis polares

A técnica se baseia no equilíbrio do analito entre a matriz e a fase polimérica. Se a fase polimérica for sólida, um equilíbrio de partição é formado, o qual é influenciado pelo tamanho dos poros. Além disso, os analitos interagem com os sítios ativos da fibra. Em fases poliméricas líquidas, há absorção do analito e se estabelece um equilíbrio de partição que é afetado pela espessura do filme polimérico e pelo tamanho do analito. No processo de absorção, a massa do analito extraída é proporcional à concentração do analito na amostra.

A extração por SPME pode ser feita pela imersão direta da fibra (Figura 3) na solução ou por *headspace*. A técnica por *headspace* é utilizada para compostos voláteis, na qual amostra é lacrada num frasco de vidro sob aquecimento e a fibra é colocada no espaço do topo do frasco, sem contato direto com a amostra. Após a extração, o analito é dessorvido termicamente no injetor do cromatógrafo (Figura 3).



**Figura 3. Representação de SPME por imersão direta na solução (à esquerda). Esquema de dessorção da fibra no injetor do cromatógrafo (à direita).**

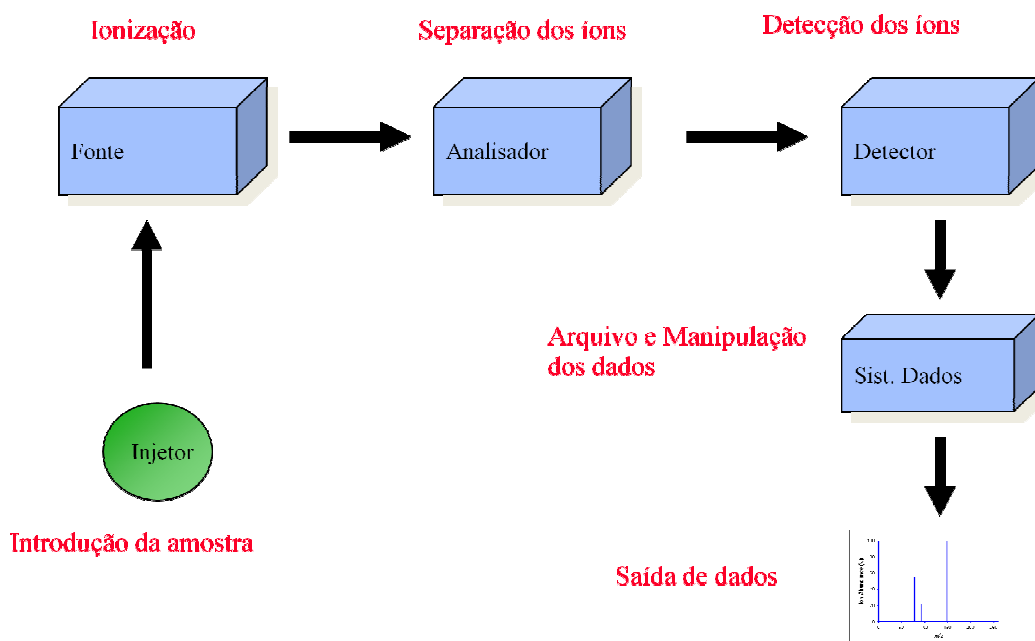
A imersão direta da fibra em matrizes aquosas deve ser otimizada para melhor eficiência no processo de extração. De uma forma geral, a agitação facilita o processo de difusão do analito para a fibra. Ao aquecer a amostra, a água diminui sua constante dielétrica e facilita a remoção dos compostos mais apolares da amostra. Além disso, o desempenho do método está relacionado com as condições experimentais (tempo, temperatura, concentração salina) que devem ser determinadas para maior sensibilidade do método analítico [28].

### 2.3.2. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM) é baseada na inserção de íons em fase gasosa em um analisador de massas que se encontra em alto vácuo. O detector de massas determina a razão massa-carga ( $m/z$ ) deste íon. Desta forma é possível obter informações estruturais assim como determinar as massas molares das espécies.

A Figura 4 representa esquematicamente um espectrômetro de massas, que é constituído de um injetor, fonte de íons (onde as moléculas são ionizadas),

analisadores de massas (que seleciona a razão massa-carga das espécies iônicas) e pelo detector. Os dados são apresentados na forma de um espectro de massas.



**Figura 4. Representação esquemática de um espectrômetro de massas.**

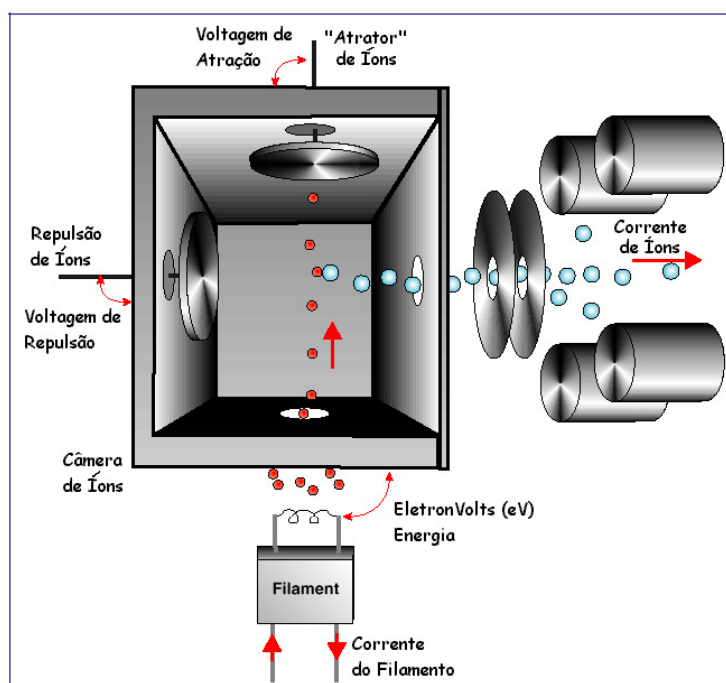
### 2.3.2.1. Técnicas de ionização

Técnicas de ionização são necessárias para que as espécies carregadas possam ser geradas e direcionadas para o analisador de massas. Várias técnicas de ionização são empregadas com o objetivo de conferir carga aos analitos. As amostras podem ser diretamente inseridas no espectrômetro de massas ou podem ser inseridas através de um fino capilar, quando acopladas à cromatografia.

As primeiras técnicas de ionização utilizavam alto-vácuo e elevadas temperaturas, portanto era limitada às espécies termicamente estáveis. Estas condições foram compatíveis com as utilizadas na cromatografia gasosa. Atualmente, técnicas de ionização mais brandas permitiram o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas.

As condições da cromatografia gasosa foram ideais para o acoplamento com o espectrômetro de massas já que o baixo fluxo que elui da coluna capilar não

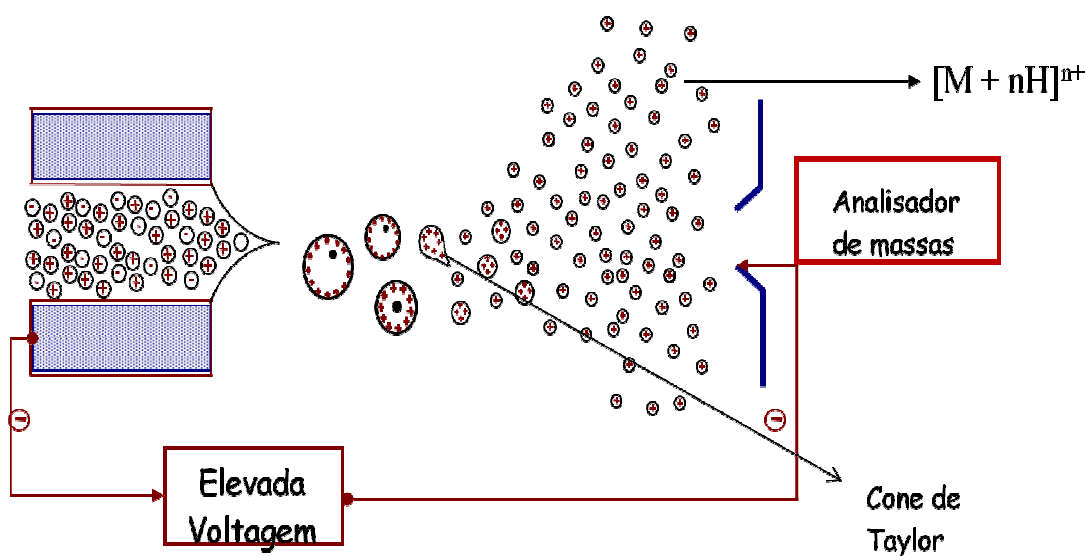
interfere no alto vácuo necessário para o funcionamento do espectrômetro. A técnica de ionização mais utilizada quando acoplada à cromatografia gasosa é a ionização por impacto de elétrons (EI), onde as moléculas são ionizadas devido a uma colisão com um feixe de elétrons. Nesta colisão ocorre, principalmente, a retirada de um elétron formando íons  $M^+$ , chamados íons moleculares, os quais são formados com excesso de energia interna e se fragmentam total ou parcialmente em fragmentos. Os íons são direcionados para o analisador de massas, como representado na Figura 5.



**Figura 5. Representação esquemática da Ionização por impacto de elétrons (EI)**

O acoplamento da cromatografia líquida com o espectrômetro de massas é mais recente, pois a fase móvel que elui da coluna é incompatível com o alto vácuo do espectrômetro de massas. Deste modo, foi necessário desenvolver uma interface que permitisse este acoplamento. Na cromatografia líquida a técnica de ionização mais utilizada é a ionização por eletrospray (ESI), por ser uma ionização

mais branda. Uma representação esquemática da técnica ESI é apresentada na Figura 6. Esta técnica se baseia na formação de um “spray” eletrostático, formado pela amostra já ionizada em solução, após ser aspirada e nebulizada por um gás através de um capilar. De acordo com a estrutura química do analito podem ser adicionados ácidos ou bases orgânicas para facilitar sua ionização em solução. Na ponta deste capilar, ou seja, na saída do “spray” um campo elétrico (Kv) é aplicado resultando em pequenas gotas carregadas. A evaporação do solvente, devido à ação do gás nebulizador, diminui o tamanho destas gotas e, conseqüentemente, aumenta a repulsão eletrostática entre as cargas formais que existem em suas superfícies. A tensão superficial das gotas vai se tornando cada vez menor até que os íons sejam liberados e direcionados para o analisador de massas.



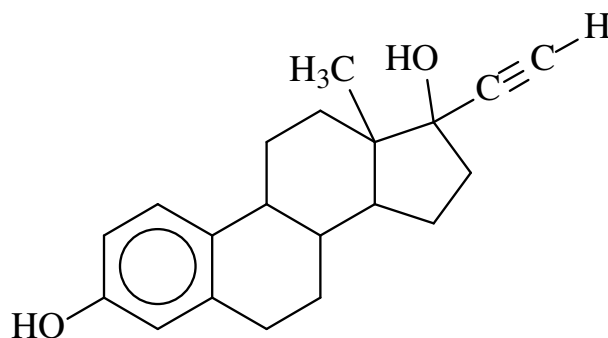
**Figura 6. Representação da Ionização por Eletrospray (ESI).**

## **2.4. Micro-contaminantes estudados**

### **2.4.1. Etililestradiol**

O etinilestradiol (Figura 7) é um hormônio sexual amplamente utilizado como contraceptivo pelas mulheres, e amplamente encontrado no ambiente [4, 24]. Este hormônio pode ser de origem natural (produzido pelo próprio organismo) ou de

origem sintética (fármacos). Ambos são extremamente ativos biologicamente, funcionando como desreguladores endócrinos. Estes medicamentos se ligam a receptores específicos em organismos não-alvos (invertebrados, peixes, répteis, aves e mamíferos), imitando seus efeitos estrogênicos endógenos [24].



**Figura 7. Estrutura química do etinilestradiol**

Nos peixes, os estrogênios estão envolvidos em inúmeras funções fisiológicas reprodutoras. Estudos apontam que estas espécies, quando em contato com estes hormônios, mesmo em baixas concentrações (ng/L), levam à feminização de machos e hermafroditismo, com conseqüente diminuição da população da espécie. Os peixes podem ainda acumular este hormônio nos tecidos adiposos e o homem, ao ingerir este alimento, entra em contato com esta substância. Além disso, a água também é uma fonte de contaminação, e estudos demonstram que a presença destes fármacos na água e alimentos tem sido relacionada à diminuição da contagem do número de espermatozóides e ao crescimento de mama em homens [29, 30], [31-33].

Este hormônio já foi detectado em diversas estações de tratamento de água (ETA) e de esgoto (ETE), e em diferentes regiões do mundo [7, 8]. No Brasil, o etinilestradiol foi encontrado em efluentes de ETE e, em rios no estado do Rio de Janeiro [11, 34]. Em esgoto bruto, os estrogênios 17- $\beta$ -estradiol e estrona foram detectados nas concentrações de 0,021  $\mu\text{g/L}$  e 0,04  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente [35]. Na

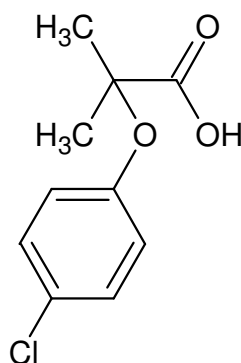
Tabela 3 estão representadas algumas características físico-químicas do etinilestradiol.

**Tabela 3. Propriedades físico-químicas do etinilestradiol. Fonte: [36]**

Nome	Etinilestradiol
	17-etinil-13-metil7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopentafenantreno-3,17-diol17- $\alpha$ -etinil-1,3,5(10)estratrieno-3,17- $\beta$ -diol(17- $\alpha$ )-19-norpregnana-1,3,5(10)-trien-20-ino-3,17-diol
CAS RN	57-63-6
Fórmula molecular	$C_{20}H_{24}O_2$
Massa Molar	296,40 g/mol
Solubilidade em água	4,3 mg/L
Coeficiente de partição octanol/ água (Log Kow)	3,67

#### 2.4.2. Ácido Clofíbrico

O ácido clofíbrico é o metabólito ativo da classe dos fibratos. São fármacos anti-lipêmicos, ou seja, diminuem o teor de colesterol e triglicerídeos no sangue (Figura 8). Possui elevada persistência no ambiente devido a sua estrutura química, sendo encontrado freqüentemente em amostras de água de diversos países da Europa e também em estações de tratamento de esgoto (ETEs) e estações de tratamento de água (ETAs) do Brasil [7] [8, 11].



### Figura 8. Estrutura química do ácido clofíbrico.

Alguns estudos de toxicidade demonstram que, em baixas concentrações, o ácido clofíbrico é capaz de aumentar a proporção de machos em espécies do zooplâncton e de inibir o crescimento de algumas espécies de bactérias e cianobactérias, além de estar relacionado com alterações nos órgãos reprodutores de peixes [37, 38].

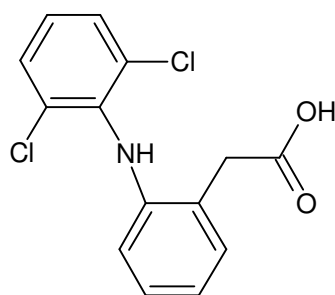
Na Tabela 4 estão representadas algumas características físico-químicas do ácido clofíbrico.

**Tabela 4. Propriedades físico-químicas do ácido clofíbrico. Fonte: Budavari S., The Merck Index, 1989.[36]**

Nome	Ácido Clofíbrico Ácido 2-(p-clorofenoxi)-2-metilpropionico
CAS RN	882-09-7
Fórmula molecular	$C_{11}H_{13}ClO_2$
Massa Molar	214,65 g/mol
Solubilidade em água	580mg/L

### 2.4.3. Diclofenaco

O diclofenaco pertence à classe dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). Seu mecanismo de ação envolve a inibição da enzima ciclooxigenase, que é responsável pela síntese de diferentes prostaglandinas. Estas substâncias são importantes na dor e inflamação, mas também são mediadores de outras funções fisiológicas, como no metabolismo de lipídeos. (Figura 9)



**Figura 9. Estrutura química do diclofenaco.**

No ambiente, sua presença vem sendo relacionada com ovos quebradiços de aves, alterações citológicas no fígado e rim de peixes, e inibição do crescimento do fitoplâncton [25, 39, 40]. Este fármaco tem sido detectado em diferentes amostras de água por todo o mundo [7, 8, 11].

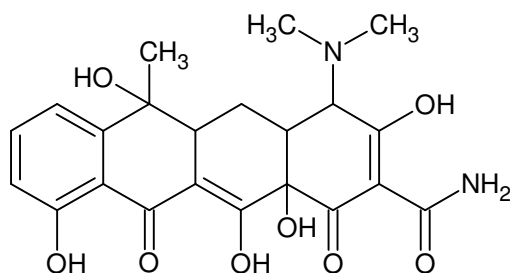
Na Tabela 5 estão listadas as características físico-químicas do diclofenaco.

**Tabela 5. Propriedades físico-químicas do diclofenaco.**

Nome	Diclofenaco
CAS RN	15307-86-5
Fórmula molecular	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$
Massa Molar	296 g/mol
Solubilidade em água	10 mg/L
Log Kow	1,09

#### 2.4.4. Tetraciclina

As tetraciclinas são antibióticos produzidos por diversas espécies do fungo *Streptomyces sp.*, e algumas são semi-sintéticas. As tetraciclinas recebem essa denominação devido à sua estrutura química, formada por quatro anéis, como demonstrado na Figura 10.



**Figura 10. Estrutura química da tetraciclina**

A tetraciclina tem sido encontrada em diferentes amostras de água, como em efluentes provenientes da agropecuária [41], e em amostras de água subterrânea e superficiais [42]. Sua presença em ambientes aquáticos tem sido relacionada com o aumento da resistência bacteriana contra antibióticos [43] [42]. Suas propriedades estão listadas na Tabela 6.

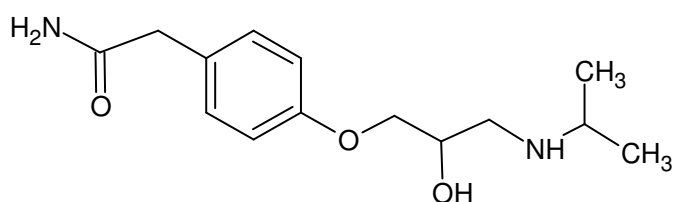
**Tabela 6. Propriedades físico-químicas da tetraciclina.**

Nome	Tetraciclina [4-(dimetilamino)1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octaidro3,6,10,12,12a-pentaidroxi-6-metil-1,11-dioxo-2-aftacenocarboxamida]
CAS RN	60-54-8
Fórmula molecular	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
Massa Molar	444,435 g/mol
Solubilidade em água	1500 mg/L
Log Kow	2,2

#### 2.4.5. Atenolol

O atenolol é um  $\beta$ -bloqueador usado no tratamento de doenças cardiovasculares. É rapidamente excretado pelas vias urinárias e vem sendo encontrado em estações de tratamento de esgotos [44] e relacionados com toxicidade para alguns organismos aquáticos como invertebrados e aves. [37, 45]

Na Figura 11 é apresentada a estrutura química do atenolol e na Tabela 7 suas propriedades físico-químicas.



**Figura 11. Estrutura química do atenolol.**

**Tabela 7. Propriedades físico-químicas do atenolol.**

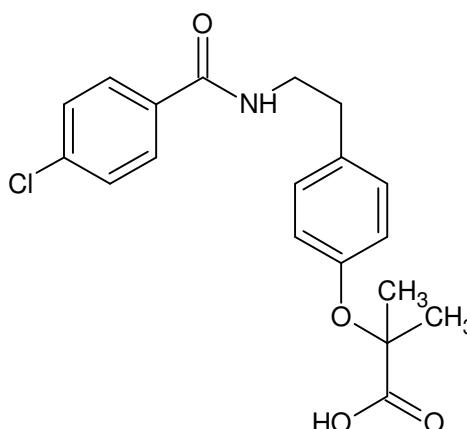
Atenolol	
Nome	(RS)-2-[4-[2-hidroxi-3-(1-metiletilamino)propoxy]fenil]etanamida
CAS RN	29122-68-7
Fórmula molecular	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Massa Molar	266,34 g/mol
Solubilidade em água	26,7g/L
Coeficiente de partição octanol/água (Log Kow)	0,16

#### 2.4.6. Bezafibrato

Bezafibrato é um fármaco da classe dos fibratos, um antilipêmico usado para reduzir os níveis de colesterol LDL e triglicérides no sangue e aumentar o HDL. Na Tabela 8, estão listadas suas propriedades físico-químicas e na Figura 12 sua estrutura química.

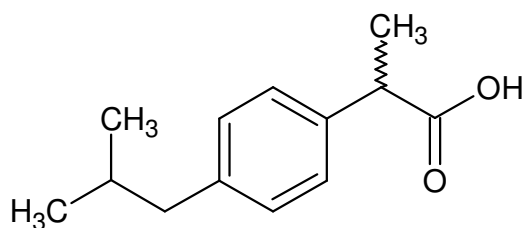
**Tabela 8. Propriedades físico-químicas do bezafibrato.**

Bezafibrato	
Nome	2-[4-[2-[(4-chlorobenzoyl)amino]ethyl]phenoxy]-2-methylpropanoic acid
CAS RN	41859-67-0
Fórmula molecular	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>4</sub>
Massa Molar	361,82 g/mol
Solubilidade em água	
Coefficiente de partição octanol/ água (Log Kow)	4,25

**Figura 12. Estrutura química do bezafibrato.**

#### 2.4.7. Ibuprofeno

O ibuprofeno é um fármaco do grupo dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) sendo também analgésico e antitérmico. Sua estrutura química está demonstrada na Figura 13. Juntamente com o bezafibrato, têm sido encontrados com frequência, na faixa de µg/L, em rios da Alemanha e Espanha. Suas propriedades estão descritas na Tabela 9 [35].



**Figura 13. Estrutura química do ibuprofeno.**

**Tabela 9. Propriedades físico-químicas do ibuprofeno.**

Nome	Ibuprofeno
CAS RN	15687-27-1
Fórmula molecular	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
Massa Molar	206,27 g/mol
Solubilidade em água	21 mg/L
Coeficiente de partição octanol/ água (Log Kow)	3,5

## 2.5. Uso de cianobactérias como agentes de biodegradação

### 2.5.1. Biodegradação de contaminantes aquáticos por microorganismos

A biodegradação de poluentes em ambientes aquáticos é afetada por processos físico-químicos. Fatores hidrológicos (fluxo de água), geoquímicos (composição e granulometria dos sedimentos) e condições ambientais (temperatura, pH, salinidade) podem alterar a biodisponibilidade de compostos inorgânicos e orgânicos na fase aquosa, interferindo na atividade dos microorganismos [46].

A biodegradação baseia-se na capacidade dos microorganismos de metabolizar compostos orgânicos utilizando-os como fonte nutricional. Nesta perspectiva, a utilização de microorganismos capazes de degradar poluentes com

maior eficiência, menor produção de resíduos e com custo operacional reduzido, tem sido objeto de inúmeras pesquisas aplicadas a área de química ambiental.

A utilização de bactérias heterotróficas e fungos, em processos de biodegradação, já são rotineiros nos sistemas de tratamento de água e esgoto. No tratamento de esgoto, biorreatores aeróbios e anaeróbios são utilizados para degradar a matéria orgânica [47].

Durante décadas, os estudos de biodegradação estiveram direcionados unicamente a bactérias e fungos. Nos últimos anos, porém, têm crescido o interesse nas cianobactérias, as quais apresentam grande potencial para sistemas de biodegradação. Estes microorganismos têm ampla distribuição e possuem mecanismos bem desenvolvidos de adaptação às condições ambientais, o que lhes confere grande resistência [46].

A biorremediação tem vantagens em relação à remediação mediada por processos físico-químicos, tais como o custo e facilidade operacional, além da possibilidade de mineralização dos poluentes.

### **2.5.2. Biodegradação de contaminantes aquáticos por cianobactérias**

As cianobactérias são microrganismos simples, de vida livre, desenvolvem-se em todas as regiões do planeta, e estão disseminadas no ambiente, inclusive naqueles poluídos. As cianobactérias possuem metabolismo mixotrófico, ou seja, podem fazer fotossíntese e/ou captar a matéria orgânica do ambiente para produzir energia. Devido a este fato, as cianobactérias diferem de outras bactérias heterotróficas, já que são menos sensíveis à redução do crescimento pela diminuição da matéria orgânica. [48]

As cianobactérias têm apresentado uma ampla capacidade metabolizadora, tanto de produtos naturais quanto de xenobióticos [49, 50]. São descritos na

literatura alguns estudos utilizando as cianobactérias na biotransformação de pesticidas. Lee et al. (2003) avaliaram a biotransformação do inseticida endossulfan, que também funciona como um desregulador endócrino, pelas espécies de *Anabaena sp* PCC 7120 e *Anabaena flos aquae*. A concentração de endossulfan decaiu até o quarto dia de incubação para menos de 10% da concentração inicial [50]. El-Rahman Mansy (2002) e colaboradores avaliaram a biotransformação da Fluometurona por *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cylindrica*, *Anabaeanaflos-aquae* e *Anabaena spiroides*. Em cinco dias as espécies foram capazes de reduzir em 87,5% a 93,0% a concentração do pesticida no meio. Os autores sugeriram uma biotransformação redutiva via citocromo P450 [51].

Estudos de biodegradação de fármacos utilizando cianobactérias são escassos na literatura. Della Greca et al. (2008) detectaram produtos de degradação da progesterona no meio extracelular, ao incubar este hormônio com diferentes espécies de cianobactérias. Estes produtos eram conjugados com ácido glicurônico intracelular para facilitar a excreção deste hormônio inalterado [52].

### **2.5.3. Metabolismo de compostos orgânicos por cianobactérias**

A persistência de fármacos nos ambientes aquáticos resulta na acumulação destes contaminantes por organismos que vivem nos corpos d'água [53]. A biotransformação realizada por microorganismos pode levar à detoxificação do meio se os metabólitos gerados forem menos tóxicos que o composto original.

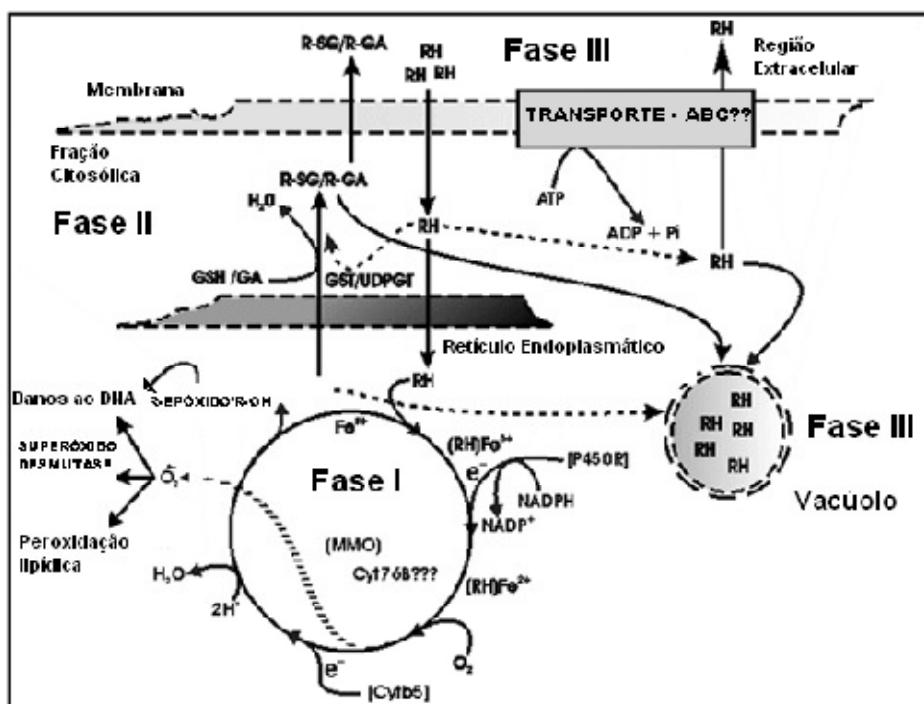
As cianobactérias possuem um papel importante para a redução de poluentes orgânicos no ambiente, seja por mecanismos de bioacumulação ou por biodegradação. Estes microorganismos ocupam a base da cadeia alimentar, e podem acumular os poluentes presentes no meio, como por exemplo, na bioconcentração de bifenilas policloradas [54].

A acumulação em vacúolos lipídicos pode ser a primeira etapa da biotransformação na degradação de uma variedade de poluentes, entre eles hidrocarbonetos aromáticos policíclicos [55], pirenos e flourantenos [56, 57], naftalenos e diariléteres [58].

Após a acumulação ou absorção do contaminante, o metabolismo de biotransformação das cianobactérias pode ser dividido em três fases. A primeira fase (Fase I) é caracterizada pela adição de grupos funcionais reativos e envolve oxidação, redução ou hidrólise catalisada por enzimas microsossomais do Citocromo P450, geralmente localizadas no retículo endoplasmático (Figura 14).

O processo de oxidação é catalisado pelas enzimas monooxigenases (MO), oxidases de funções mistas (MMO), oxidases do sistema citocromo P450 (Cyt P450). Os processos de redução em geral envolvem a NADPH gerada na fotossíntese [59] [60] [61].

As reações de Fase I caracterizam-se pela transferência de elétrons, via sistema citocromo P450. O substrato (R-H) liga-se ao ferro trivalente do grupo heme da enzima MO, reduzindo-o a divalente por catálise pela flavoproteína redutase (P450R). O Oxigênio ( $O_2$ ), um aceptor de elétrons, ao recebê-los forma o radical peroxila ( $HOO^{\cdot}$ ) que é rapidamente convertido em água e oxigênio radicalar. Este radical possui afinidade pelo complexo substrato-ferrodivalente (RH)- $Fe^{+2}$  transformando o substrato em compostos oxidados (R-OH ou R-epóxido) [62].



**Figura 14. Metabolismo de xenobióticos por cianobactérias. Adaptado da referência [63].**

As reações de Fase II consistem na conjugação do substrato oxidado com o ácido glicurônico (R-SG) e glutadiona (R-AS) facilitando sua excreção. Alguns xenobióticos já possuem os grupos funcionais necessários (-COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>) à conjugação direta com os sistemas enzimáticos da Fase II, não passando pela Fase I. Na Fase II, as reações são catalisadas pelas enzimas: glutadiona S-transferase (GSTs) e UDP-glicuronil transferases (UDPGTs) [64].

Em cianobactérias fotossintetizantes ocorre uma terceira etapa que é caracterizada pela excreção dos xenobióticos conjugados através da parede celular. Pode ocorrer ainda o armazenamento dessas substâncias em vacúolos lipídicos antes de serem excretadas. O transporte ativo transmembrana é responsável pela excreção do xenobiótico com a participação de proteínas transportadoras [65] [66].

Alguns autores apontam evidências de que poluentes orgânicos podem induzir à produção de enzimas que conferem multiresistência a xenobióticos

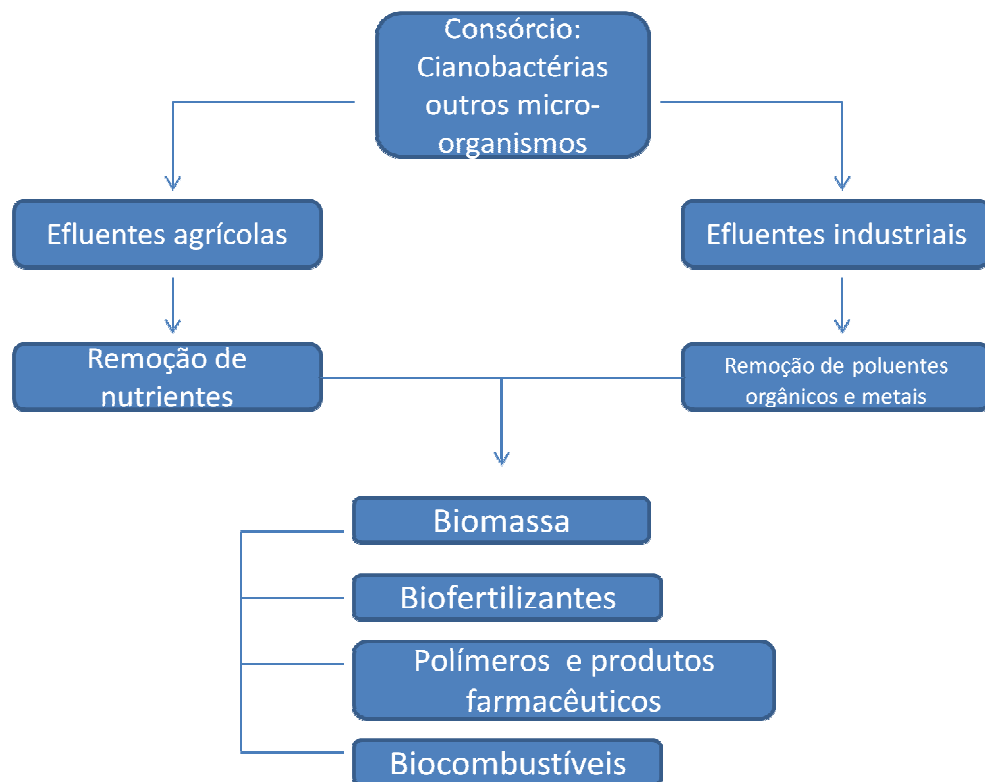
(MXR). Tais enzimas estariam envolvidas no Transporte Transmembrana (ABC). Suspeita-se que a presença destas enzimas acelere a excreção por transporte ativo de contaminantes em cianofíceas aquáticas [67]. As primeiras fases de detoxificação (Fases I e II) são muito semelhantes as que ocorrem no fígado dos mamíferos. Por isso, as cianobactérias são chamadas de “Green – Liver” por muitos autores [68-71].

As cianobactérias como importantes constituintes da biomassa dos sistemas aquáticos, podem significar uma importante ferramenta em estudos ecotoxicológicos e de biorremediação.

#### **2.5.4. Aspectos biotecnológicos das cianobactérias como agentes de biodegradação**

As cianobactérias têm demonstrado um grande potencial para sua aplicação como agente de biodegradação, como descrito no item 2.3.2. Outras aplicações biotecnológicas de cianobactérias já descritas na literatura estão esquematizadas na Figura 15 [72]

A biotecnologia tem o interesse de aplicar a engenharia molecular para que a biomassa utilizada em processos de biodegradação seja reutilizada, já que o lodo gerado nestes processos tem sido considerado um problema ambiental. O lançamento deste lodo em mananciais pode levar a eutrofização do ambiente, com morte dos organismos aquáticos. As cianobactérias possuem um metabolismo diversificado e suas espécies são capazes de produzir substâncias com propriedades distintas. As cianobactérias podem ser reutilizadas como, por exemplo, fertilizantes na agricultura, na produção de biocombustíveis ou produção de produtos de interesse e valor comercial [72, 73].



**Figura 15. Aplicações biotecnológicas da biomassa resultante de processos de biodegradação.**

Algumas espécies de cianobactérias são capazes de fixar o nitrogênio da atmosfera. Se esta biomassa for inoculada em um solo empobrecido, pode aumentar sua fertilidade através da fixação de nitrogênio [74]. Os autores relataram uma elevada taxa de fixação de nitrogênio 10 kg N/ha, por cianobactérias em uma lavoura de tomate. Outros pesquisadores utilizaram cianobactérias em um solo desértico, e seus resultados são semelhantes, ou seja, observaram um aumento na fertilidade do solo. [75]

Outra aplicação da biomassa de cianobactérias é na produção de biocombustíveis. Algumas espécies são capazes de produzir hidrogênio gasoso. O hidrogênio pode ser utilizado como combustível e é considerada uma energia limpa. Alguns autores quantificaram a produção de hidrogênio em um biorreator de degradação biológica constituído por um consórcio de bactérias e cianobactérias e a produção de hidrogênio observada foram de 30 mL para cada litro de cultura. O

custo da produção biológica foi de 25 US\$ / m<sup>3</sup>, valor muito inferior quando comparado ao custo da geração de hidrogênio por eletrólise que é de US\$170 /m<sup>3</sup>.

[76] Caso a espécie não possua um metabolismo tão específico, como no caso das cepas produtoras de hidrogênio, a biomassa ainda pode ser reaproveitada. Se submetida a condições anaeróbias, a fermentação da biomassa leva a produção de biogás. [72]

Alguns produtos de metabolismo secundário produzidos por cianobactérias foram descritos na literatura e demonstraram diferentes atividades biológicas, como descrito na Tabela 10. As substâncias não só apresentaram atividade contra outros microorganismos (antifúngica, antialga) como demonstraram ser eficientes como agente antitumoral e antiviral.

**Tabela 10. Substâncias isoladas de cianobactérias com atividade biológica.**

Espécie	Composto	Atividade biológica	Referência
<i>Fischerella muscicola</i>	Fisherellin	Antialga Antifúngica	Dahms H.U., et al. ,2006.
<i>Synechocystis sp.</i>	Naienones A-C	Anti-tumoral	Nagle D.G. and Gerwick W.H., 1995.
<i>Anabaena circinalis</i>	Anatoxin-a	Anti-inflamatória	Rajeev K.J.and Xu Z. , 2004.
<i>Lyngbya lagerheimii</i>	Sulpholipid	Anti-HIV	Rajeev K.J. and Xu Z.,2004.

Polímeros foram isolados de algumas espécies de cianobactérias por Abed R.M.M. *et al.*, 2009. O polímero isolado e identificado como poli-3-hidroxitirato, apresentou maior biodegradação quando comparado com plásticos de combustíveis fósseis. Além disso, ao contrário dos polímeros convencionais, sua matéria prima é totalmente renovável [77].

A reutilização de biomassa de cianobactérias pode contribuir para um processo de carbono neutro, reciclando o carbono indesejável e o transformando em substâncias de interesse energético, farmacêutico e industrial. .

## **2.6. *Microcystis novacekii* – Espécie estudada**

A espécie estudada no presente trabalho pertence à classe das cianobactérias. Estes microorganismos são procariontes, pois não possuem membrana envolvendo o material genético, como nas bactérias. Possuem retículo endoplasmático rudimentar localizado em membranas, chamadas de tilacóides. Os tilacóides possuem diferentes pigmentos fotossintéticos, tais como clorofila a (responsável pela coloração esverdeada), sendo considerados produtores primários de energia (fotossíntese). São microrganismos autotróficos e apresentam pequenas exigências nutricionais, alta capacidade de fotossíntese e de assimilação de nitrogênio. Seus processos vitais requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. No entanto, na presença de substâncias orgânicas, podem utilizá-las como fonte de energia. Exercem papel importante na manutenção do equilíbrio ambiental, pois constituem o fitoplâncton nos mais variados ambientes aquáticos, sendo a base da cadeia alimentar. Estão presentes mesmo em condições inóspitas como em desertos, geleiras e águas sulfurosas [46].

Esta espécie caracteriza-se por um denso arranjo celular no centro da colônia e com células isoladas na periferia. As colônias podem ser arredondadas, alongadas, lobadas ou irregulares com células esféricas, não estratificadas, distribuídas irregularmente na mucilagem de cor transparente. (Figura 16). Possuem aerótopos, que são vacúolos gasosos que permitem a flutuação das colônias na coluna d'água. As espécies deste gênero são produtoras de mucilagem com adesão entre as células formando colônias. A mucilagem é composta de

lipopolissacarídeos que funcionam como um envoltório que agrega as células da espécie e as protegem do ambiente. [78].

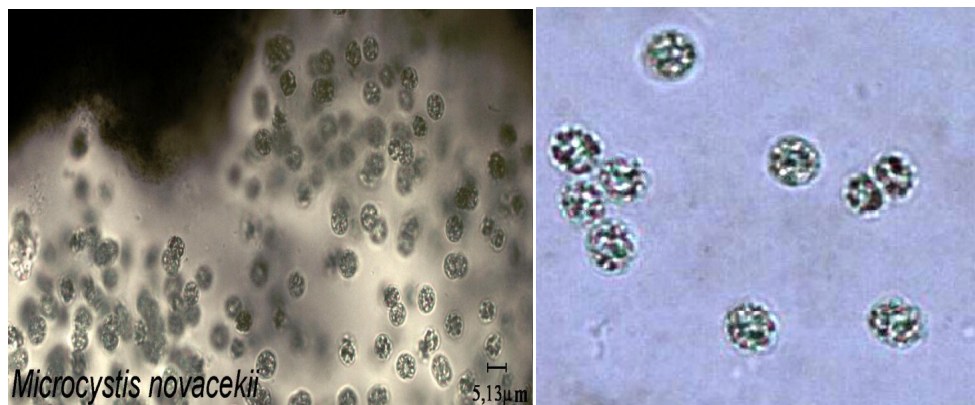
Uma preocupação para o uso de cianobactérias, é que algumas espécies produzem toxinas que podem ser classificadas quanto a atividade: neurotóxicas, hepatotóxicas e dermatóxicas; ou quanto à estrutura química: alcalóides, peptídeos cíclicos. As cianotoxinas são produtos do metabolismo secundário e relacionadas à defesa das células. [77, 79]

O gênero *Microcystis* é produtor da toxina microcistina, um peptídeo cíclico hepatotóxico, com grande estabilidade química, pois podem persistir em corpos d'água de meses ou até anos. O consumo destas toxinas, seja em alimentos ou pelo consumo de água potável contaminados, está relacionado à diarreia, enterites e o surgimento de tumores hepáticos. [80] Devido aos danos causados à saúde humana este tipo de substância é regulamentado pela Portaria Nº 2.914 de 2011, do Ministério da Saúde, que estabelece o limite máximo aceitável em água potável de 1 µg/L de microcistina.

Nesta perspectiva, a espécie estudada, já foi mapeada geneticamente (dados não publicados) e não possui o gene responsável pela produção deste tipo de toxina. Devido a uma mutação genética, a espécie estudada poderia adquirir este gene de outra espécie, e passar a produzi-la, situação pouco provável. Pois, a produção de microcistina, está relacionada com o crescimento exagerado de cianobactérias em ambientes aquáticos naturais eutrofizados. [79]

Condições opostas quando estes microorganismos são utilizados como agentes de biodegradação, já que seu crescimento é controlado em ambientes confinados, como lagoas de estabilização e biorreatores. Portanto, a espécie

*Microcystis novacekii*, apresenta grande potencial de aplicação como agente de tratamento de ambientes aquáticos contaminados

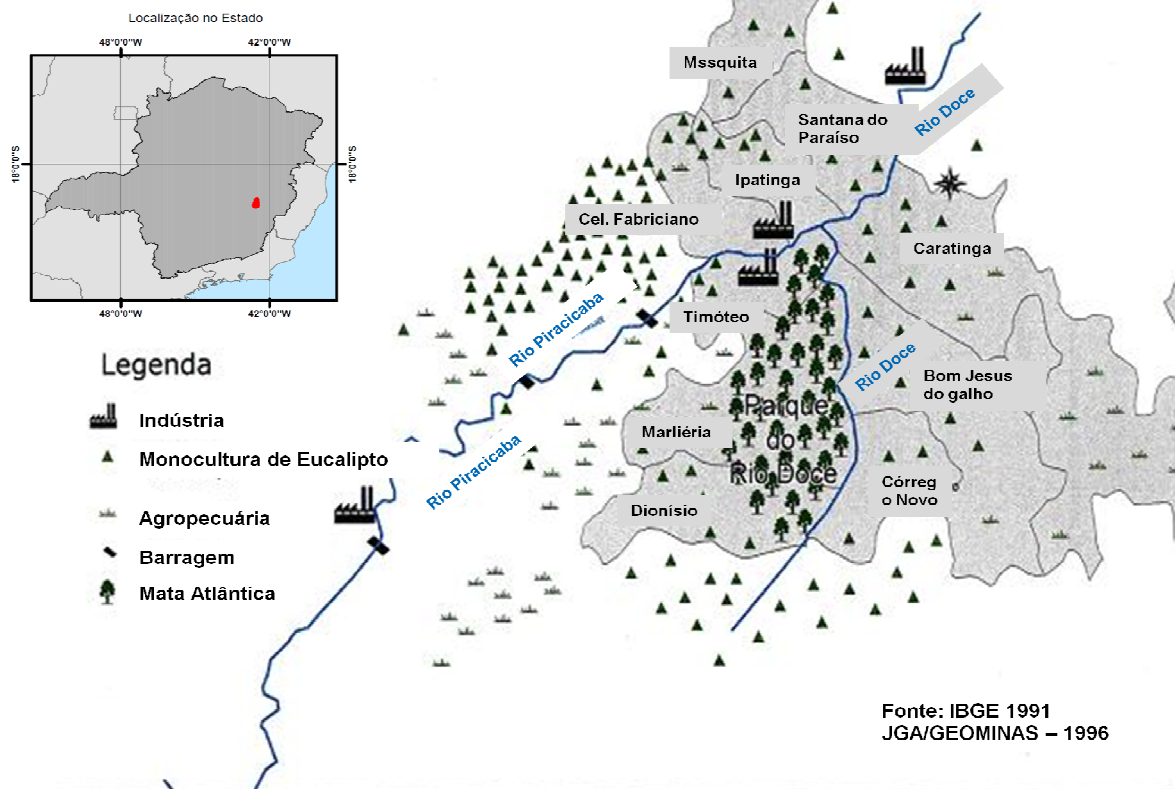


**Figura 16. Foto da colônia (esquerda) e as células em detalhe (direita).**

## **2.7. Parque Estadual do Rio Doce**

O Vale do médio Rio Doce possui mais de 60% da biodiversidade da Mata Atlântica. O Parque Estadual do Rio Doce – PERD - localiza-se no trecho médio da bacia do Rio Doce e está inserido no bioma Mata Atlântica. As diferentes áreas de seu entorno recebem impactos antrópicos variados, destacando-se áreas ocupadas por extensas plantações de *Eucalyptus sp* para atender tanto a indústria siderúrgica como a de celulose. O restante dessas áreas é ocupado por pastagens e culturas diversificadas (Figura 17). Ocorre ainda a contaminação das águas por grandes áreas de mineração/garimpo que existem na cabeceira do Rio Piracicaba, um dos principais afluentes do trecho médio do Rio Doce, e por uma quantidade considerável de esgotos domésticos e industriais [48].

## PARQUE DO RIO DOCE E ENTORNO IMEDIATO



**Figura 17. Atividades antrópicas ao entorno do PERD.**

O laboratório de limnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) desenvolve um amplo projeto de pesquisa no PERD e tem, entre seus objetivos, identificar espécies de algas planctônicas nesse ambiente tropical. Estudos preliminares nos lagos da região identificaram várias espécies de algas planctônicas. Dentre elas, a cianobactéria *Microcystis novacekii* vêm sendo mantida pelo Laboratório de Limnologia do ICB-UFMG e aplicada em ensaios de biodegradação, explorando seu potencial metabólico. [48]

## **CAPÍTULO 3**

### **3. Materiais e métodos.**

#### **3.1. Condições de cultivo da *Microcystis novacekii***

##### **3.1.1. Banco de cianofíceas - Manutenção da cultura-mãe**

A cultura de *M. novacekii*, isolada da lagoa Dom Helvécio no PERD (Parque Estadual do Rio Doce- MG) foi mantida pelo laboratório de Limnologia do Departamento de Biologia Geral/ Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais. O meio utilizado no cultivo e nos experimentos utilizando *Microcystis novacekii*, com característica não-axênica, foi o meio líquido *Water Culture* (WC). [81] O cultivo foi mantido sob temperatura controlada a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  em câmara de germinação (FANEM mod. 347-CDG Microprocessada) sob irradiância de fótons de  $98 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e 12 horas de fotoperíodo.

##### **3.1.2. Preparo do meio WC**

O meio WC (*water culture*) adaptado [81] foi preparado pela adição de 1 mL de cada uma das soluções estoque n° 1 a 6 (Tabela 11) e de 1 mL da solução 8 (Tabela 12) e diluídos para 1 L com água destilada. Essa solução foi autoclavada a  $120^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Após a esterilização, foram adicionados 1,0 mL de cloreto férrico (solução 7) e 1,0 mL da solução de micronutrientes (solução 9) (Tabela 13). O pH foi ajustado para 7.0 com solução de HCl ou NaOH 0,1 mol/L e tamponado com o tampão ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfônico (MOPS) na concentração de 750 mg/L,  $\text{pK}_a = 7,2$  a  $25^\circ\text{C}$ . Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas em capela de fluxo laminar equipada com luz ultravioleta (UV). O meio WC é constituído de sais inorgânicos e três vitaminas: tiamina, biotina e vitamina B12. A adição destas soluções à água simula as condições naturais de água doce.

**Tabela 11. Preparo do meio WC para cultivo de *M. novacekii*. Composição das soluções estoque de 1 a 7.**

Solução	Substância	Conc. da solução estoque (g/L)
1	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36,76
2	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	39,97
3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,71
4	NaNO <sub>3</sub>	85,01
5	NaSiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	28,42
6	NaHCO <sub>3</sub>	12,60
7	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,15

**Tabela 12. Composição da solução estoque 8 utilizada no preparo do meio WC.**

Substância	Concentração (g/L)
Na <sub>2</sub> EDTA	4,36
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,022
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,18
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,006
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0

**Tabela 13. Composição da solução estoque 9, utilizada no preparo do meio WC.**

Substância	Concentração (g/L)
Tiamina.	0,1
Biotina	0,0005
Vitamina B <sub>12</sub>	0,0005

### **3.2. Curva de crescimento da *M. novacekii***

O crescimento da espécie durante o experimento foi monitorado através da leitura da densidade ótica da cultura em 680 nm em um espectrofotômetro UV (Thermo-2011). Para comprovar a correlação linear entre a absorbância a 680 nm e a contagem celular ao microscópio, curvas de crescimento com duração de 10 dias foram monitoradas pelos dois métodos de contagem, os quais foram então comparados.

Para a contagem das células por microscopia, foram adicionados três gotas de solução de lugol e 1 mL de solução de NaOH 0,1 mol/L em 2 mL de amostra. As amostras foram mantidas sob aquecimento em banho-maria a 80°C por 5 minutos. Após a digestão da mucilagem (camada gelatinosa composta de polissacarídeos, que mantêm as células agregadas e por isso diminuem a homogeneidade da amostra), as amostras foram submetidas à agitação mecânica em Vórtex por 1 minuto e contadas por meio de microscopia ótica em câmaras de Fuchs-Rosenthal.

Os dados de densidade ótica e contagem celular foram analisados por regressão linear, sendo determinado o fator de conversão entre as variáveis

### **3.3. Reagentes**

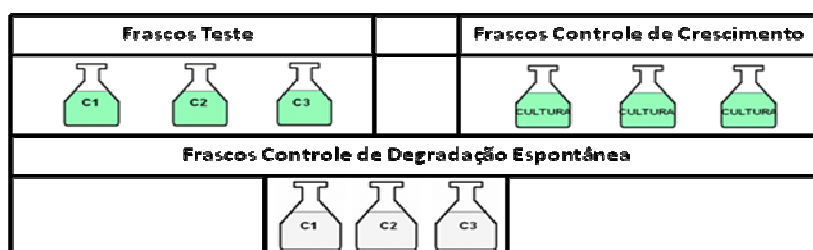
Os seguintes reagentes foram utilizados: ácido clofíbrico (Sigma-Aldrich, 97%), 17- $\alpha$ -etinilestradiol (Sigma-Aldrich, 98%) e diclofenaco (Sigma-Aldrich, 99%), tetraciclina (Sigma-Aldrich, 99%) , bezafibrato (Sigma-Aldrich, 99%), ibuprofeno(Sigma-Aldrich, 99%) e atenolol (Sigma-Aldrich, 99%). Os solventes utilizados todos grau HPLC (Merck) : acetona, metanol, acetonitrila. Além disso, utilizou-se, em todos os experimentos, água milli-Q para o preparo das soluções.

### 3.4. Ensaio biodegradação/bioacumulação utilizando meio WC

#### 3.4.1. Montagem do experimento

Volumes adequados da cultura-mãe foram diluídos para obter uma concentração de  $10^5$  células/mL na cultura-teste. Esta cultura foi mantida nas condições de cultivo e sob aeração por 4 dias, tempo suficiente para que a espécie se encontre na fase exponencial de seu crescimento. Nesta fase a espécie demonstra maior atividade biológica.

Para cada analito foram testados três níveis de concentração e, em cada nível, além dos frascos teste (alga + meio de cultura + fármaco), frascos de controle de degradação espontânea (meio de cultura + fármaco), cada nível de concentração C1, C2 e C3, foi realizado em triplicata. Para o controle de crescimento (alga + meio de cultura), uma triplicata de culturas foi utilizada (Figura 18).



**Figura 18. Esquema do ensaio de biodegradação/bioacumulação. Triplicatas para cada concentração (C1,C2 e C3).**

Nos frascos-teste, 100,00 mL da cultura-teste (alga + meio de cultura) foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL. Em seguida foi adicionado 1,00 mL de solução padrão (em metanol) dos fármacos testados. As soluções padrão foram preparadas em concentrações adequadas de forma que, nos diferentes níveis de concentração, todos os frascos-teste e controle receberam o mesmo volume de solvente.

A concentração nos frascos teste foi determinada de acordo com a adaptação da espécie frente aos contaminantes estudados. Foi necessária a realização de ensaios-piloto para determinar a faixa de concentração ideal para cada fármaco estudado. Diferentes concentrações foram incubadas por 7 dias com a cianobactéria, o crescimento da espécie foi monitorado, e os ensaios de biodegradação foram realizados na maior faixa de concentração testada, que não levou a espécie à morte. (Tabela 14)

**Tabela 14. Concentrações testadas para os fármacos estudados para o ensaio com o meio WC.**

Fármaco	Concentrações testadas no meio WC (mg/L)		
	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Etinilestradiol	0,17	0,15	0,11
Diclofenaco	0,25	0,10	0,075
Ácido clofíbrico	1,20	1,00	0,80
Atenolol	0,60	0,15	0,10
Tetraciclina	1,45	0,65	0,15
Ibuprofeno	1,50	1,00	0,55
Bezafibrato	0,20	0,10	0,05

A elevada mortalidade das cianobactérias poderia inviabilizá-las como agentes de biodegradação, pois se os fármacos de interesse fossem bioacumulados poderia haver o risco de redissolução destes no meio devido à lise celular.

Nos frascos-controle, foram adicionados 100,00 mL de meio WC seguido de 1,00 mL das soluções padrão dos analitos testados. Desta forma, foi possível avaliar a degradação espontânea durante os ensaios, que foram realizados em triplicata. Para avaliar o crescimento da espécie durante o experimento, 100,00 mL

da cultura foram mantidos nas mesmas condições do ensaio e seu crescimento foi comparado com o crescimento dos frascos-teste.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de águas FAFAR/UFMG, em condições assépticas, temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e uso de capelas de fluxo laminar para evitar a contaminação por outros microorganismos durante o ensaio. Os experimentos tiveram duração de sete dias, sendo mantidos sob condições de cultivo (item 3.1) e sob constante agitação (Figura 19).



**Figura 19. Fotos da montagem de um experimento típico, realizado sob temperatura controlada, agitação constante e foto-período de 12 horas.**

### **3.4.2. Coleta de amostras**

#### **3.4.2.1. Amostras de biodegradação – concentração extracelular dos fármacos**

As amostras do primeiro dia de experimento foram coletadas assim que o ensaio foi montado. Em seguida as coletas foram realizadas nos dias quatro e sete.

Para todos os fármacos testados, nos dias 1,4 e 7, 10,00 mL de amostra dos frascos-teste e controle foram filtrados em filtros Millex - 45 $\mu\text{m}$  (Millipore).

Para os fármacos etinilestradiol e diclofenaco, o filtrado foi submetido à imersão direta por microextração em fase sólida (SPME) e analisados por

cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), condições descritas no item 3.6.1.1

Para o ácido clofíbrico, o filtrado obtido das amostras de biodegradação foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massas sem preparo de amostra.

Para os demais fármacos (tetraciclina, atenolol, ibuprofeno e bezafibrato), o filtrado coletado nos dias 1, 4 e 7, foi analisado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) , também sem preparo de amostra.

Picos cromatográficos referentes aos analitos de interesse e, também, ao surgimento de novos picos foram monitorados nos cromatogramas obtidos nos ensaios, para avaliar a formação de metabólitos provenientes da biodegradação presentes no meio aquoso WC.

#### **3.4.2.2. Amostras - Curva de crescimento**

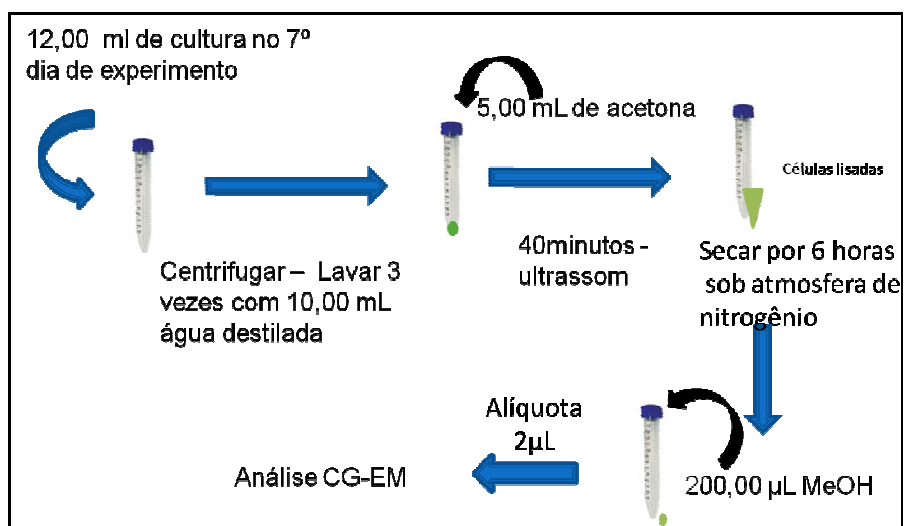
Avaliou-se o crescimento da espécie comparando-se amostras dos frascos-testes com as amostras dos frascos-controle de crescimento. Para todos os fármacos testados, alíquotas de 2 mL foram coletadas, nos dias 1, 4 e 7, e procedeu-se a leitura das amostras num espectrofotômetro UV/Visível (Hitachi U-200) a 680 nm.

#### **3.4.2.3. Amostras de bioacumulação (Procedimento de lise celular) - concentração intracelular dos fármacos**

Avaliou-se a bioacumulação dos fármacos pela cianobactéria submetendo-se as amostras dos frascos-teste ao procedimento de lise celular (Figura 20). No 7º dia de ensaio, 12,00 mL de cultura dos frascos-teste foram quantitativamente transferidos para tubos tipo Falcom, e em seguida, centrifugados a 3.000 rpm, a

15°C, durante 15 minutos. O “pellet” formado foi lavado três vezes com 10 mL de água destilada. Ao “pellet” lavado foram adicionados 5,00 mL de acetona e submetido a 40 minutos no ultrassom para que as células fossem rompidas. As células foram lisadas e seu conteúdo intracelular foi liberado no volume total de 5,00 mL de acetona. Este volume foi seco em atmosfera de nitrogênio e, em seguida, foram adicionados 200 µL de metanol. A amostra foi, então, agitada, centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos e 2 µL do sobrenadante foram analisados por cromatografia e espectrometria de massas e submetidas às mesmas condições instrumentais de análise descritas no item 3.6..

Este procedimento de lise celular foi adaptado de métodos utilizados para extração de clorofila de cianobactérias [82-84], mas estes métodos utilizam ácidos e bases fortes para promover a lise celular, que poderiam levar a uma degradação dos analitos testados e uma interpretação errônea dos produtos de degradação.



**Figura 20. Esquema do procedimento para lise celular.**

As áreas dos picos das amostras obtidas foram interpoladas nas respectivas curvas de calibração, as quais foram construídas preparando-se soluções dos padrões em metanol.

A eficiência do procedimento de lise celular foi estimada pela contagem de células ao microscópio ótico, utilizou-se uma câmara de Fuchs Rosenthal (BRAND), na qual volumes fixos de cultura (1µL) são adicionados e o número de células por volume de cultura pode ser estimado. Foram coletados 2 mL de cinco amostras, antes e depois do procedimento de lise celular, e a eficiência do processo foi estimada comparando o número de células intactas.

### **3.5. Ensaio de bioacumulação/biodegradação de um efluente farmacêutico real.**

#### **3.5.1. Coleta do efluente**

O efluente farmacêutico foi coletado em uma indústria farmacêutica do estado de Minas Gerais, Brasil. Para garantir a homogeneidade e a representatividade da amostra, foi realizada a coleta de 200 mL do efluente a cada 2 horas durante 24 horas de atividade industrial. A coleta foi realizada por uma empresa contratada que realiza as análises dos parâmetros exigidos pela legislação para lançamento do efluente. O efluente com volume final de aproximadamente 2,5 L foi acondicionado em uma caixa com gelo até o seu transporte para o laboratório. O efluente foi mantido na geladeira por 10 dias até a realização do experimento.

#### **3.5.2. Termo de Sigilo**

Um termo de sigilo foi assinado com a indústria farmacêutica onde o efluente foi coletado. Neste termo determinou-se a proibição da divulgação do nome da empresa assim como a concentração e quais fármacos foram encontrados no efluente.

Devido a este motivo, o efluente foi usado no ensaio de biodegradação como matriz, onde os fármacos que apresentaram boa eficiência de remoção pela cianobactéria no ensaio com o meio WC foram adicionados ao efluente real. Desta forma, foi possível avaliar se a eficiência de remoção de contaminantes orgânicos pela cianobactéria encontrada nos experimentos com o meio WC, foi mantida quando a espécie foi colocada em contato com uma amostra real contaminada (efluente farmacêutico).

### **3.5.3. Caracterização do efluente**

Os parâmetros de qualidade do efluente foram determinados por uma empresa contratada pela indústria farmacêutica para realizar as análises. Todos os parâmetros exigidos pela legislação foram aceitáveis para o lançamento deste efluente, exceto DQO, DBO e OD. Portanto, estes foram os parâmetros medidos antes e após o ensaio de biodegradação. Estes ensaios foram realizados pelo Laboratório Limnos, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

### **3.5.4. Montagem do experimento**

O efluente coletado foi homogeneizado e filtrado. Ao filtrado (1,5 L) deste efluente foram adicionados volumes adequados de soluções padrão aquosas de diclofenaco, etinilestradiol e tetraciclina para se obter uma concentração final de 0,2 mg/L, 0,1 mg/L e 1,0 mg/L, respectivamente. As concentrações testadas no efluente foram próximas às concentrações usadas nos ensaios de biodegradação com o meio WC. Metade deste volume foi reservada e dividida em 3 erlenmeyers de 200 mL, para avaliar a degradação espontânea dos contaminantes do efluente, chamados de frascos controle (efluente+fármacos).

À outra metade do volume do efluente, volumes adequados da cultura-mãe de cianobactéria foram adicionados para obter uma concentração de  $10^6$  células/mL. Este efluente foi posteriormente dividido em 3 erlenmeyers de 200 mL, chamados de frascos controle (cianobactéria+efluente+fármaco).

Para os frascos de controle de crescimento (cianobactéria+meio WC+fármacos), volumes adequados da cultura-mãe de cianobactéria foram adicionados ao meio WC para obter uma concentração final de  $10^6$  células/mL.

Os experimentos tiveram duração de sete dias, sendo mantidos sob condições de cultivo (item 3.1.1) e sob constante agitação

### **3.5.5. Coleta de amostras**

#### **3.5.5.1. Amostras de biodegradação – concentração extracelular de matéria orgânica.**

Para avaliar a remoção de fármacos e outros compostos orgânicos no efluente, análises de DQO, DBO e OD foram realizados ao fim de 7 dias de incubação. As amostras, dos frascos teste e controle, foram filtradas em filtros Millex -  $45\mu\text{m}$  (Millipore). O filtrado foi encaminhado para o laboratório Limnos, Belo Horizonte. As técnicas analíticas de quantificação dos fármacos no meio extracelular não foram utilizadas por dois motivos; (1) o termo de sigilo assinado com a indústria farmacêutica, veda a quantificação dos fármacos no efluente e o segundo; (2) o mecanismo de remoção dos fármacos adicionados do meio extracelular, foi a bioacumulação no interior das células ou possivelmente a mineralização.

### **3.5.5.2. Amostras - Curva de crescimento**

Avaliou-se o crescimento da espécie comparando-se amostras dos frascos-teste com as amostras dos frascos-controle de crescimento. Alíquotas de 2 mL foram coletadas, nos dias 1, 4 e 7 e procedeu-se a leitura das amostras num espectrofotômetro UV/Visível (Hitachi U-200) a 680 nm.

### **3.5.5.3. Amostras de bioacumulação (Procedimento de lise celular) - presença intracelular dos fármacos**

Avaliou-se a bioacumulação dos fármacos adicionados ao efluente farmacêutico submetendo-se as amostras, no último dia de ensaio, dos frascos-teste ao procedimento de lise celular descrito no item 3.4.2.3. A amostra foi, então, analisada por injeção direta no espectrômetro de massas, nos modos positivo e negativo, para avaliar a presença dos fármacos diclofenaco, etinilestradiol e tetraciclina no interior das células da espécie de cianobactéria estudada.

## **3.6. Instrumentação- Ensaio com meio WC**

### **3.6.1. Determinação da concentração extracelular dos fármacos no ensaio com o meio WC.**

A quantificação dos fármacos nas amostras de biodegradação foi feita em diferentes tipos de equipamentos de cromatografia e espectrometria de massas. A escolha dos equipamentos foi devido a sua disponibilidade e estabilidade química dos analitos testados.

#### **3.6.1.1. Etinilestradiol e diclofenaco**

Nos ensaios com etinilestradiol e diclofenaco, as amostras de biodegradação foram submetidas à microextração em fase sólida. A fibra de Poliacrilato (PA -

SUPELCO) foi imersa diretamente em 10,00 mL das amostras filtradas por 10 minutos, à temperatura ambiente e sob constante agitação. Após a fase de extração, a fibra foi dessorvida durante 5 minutos no injetor do cromatógrafo, a 250°C. (Tabela 15)

As análises foram conduzidas num equipamento GC-MS modelo Ultra GC POLARIS Q (ThermoScientific, San Jose, CA). A coluna capilar apolar (%5 difenil 95% polidimetilsiloxano) utilizada no experimento foi HP-5 MS 30 m × 0,25 mm id x 0,25 µm (Agilent, EUA).

A programação de temperatura para o etinilestradiol foi a seguinte: 120°C por 2 minutos, 10°C por minuto até 300°C, permanecendo por 4 minutos. O tempo total da corrida foi de 15 minutos., com um fluxo de gás hélio a 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi 250 °C, o qual operou no modo *splitless* por 2 minutos. A análise foi realizada no modo de varredura completa (faixa 50-650 *m/z*). Os íons extraídos dos espectros de massas, para gerar os respectivos cromatogramas reconstituídos, dos compostos foram os seguintes: *m/z* 296 (etinilestradiol) e *m/z* 277 (diclofenaco).

Foram feitas duas curvas de calibração uma curva na matriz, na qual se utilizou o meio WC filtrado após 7 dias de incubação com a cianobactéria; outra curva aquosa. As curvas foram analisadas por SPME, nas mesmas condições utilizadas nas amostras de biodegradação (imersão direta por 10 minutos, à temperatura ambiente).

### **3.6.1.2. Ácido Clofíbrico**

No ensaio com o ácido clofíbrico, 2,00 µL das amostras de biodegradação foram analisadas por injeção direta no cromatógrafo à gás. A análise sem preparo de amostra foi possível, pois o equipamento GC-MS utilizado, GC-P-2010

(Shimadzu), é equipado de uma bomba de alto vácuo no detector de massas e, além disso, uma coluna capilar polar, a FFPA (OPTIMA), com 100% de polietilenoglicol-2-nitrotereftalato foi empregada nas análises. O alto vácuo no detector de massas e uma coluna polar, compatível com a elevada polaridade das amostras de biodegradação, tornou possível sua análise por injeção direta no cromatógrafo à gás. (Tabela 15)

A programação de temperatura para o ácido clofíbrico foi a seguinte: 120°C aumentando 10°C por minuto até 240°C, permanecendo por 5 minutos. O tempo total da corrida foi de 17 min., com um fluxo de gás hélio a 1,5 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor foi 250 °C, o qual operou no modo *splitless* por 0,75 min. A análise foi realizada no modo de varredura completa (faixa 50-650 *m/z*). O íon extraído dos espectros de massas, para gerar os respectivos cromatogramas reconstituídos do ácido clofíbrico foi *m/z* 127.

Soluções padrão preparadas em água Milli-Q (Millipore), foram utilizadas para a quantificação do fármaco extracelular nas amostras de biodegradação.

### **3.6.1.3. Atenolol, tetraciclina, bezafibrato e ibuprofeno.**

A avaliação quantitativa da concentração extracelular dos fármacos: atenolol, tetraciclina, bezafibrato e ibuprofeno foi realizada por CLAE/EM-IT-TOF (Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, com analisador do tipo tandem ion-trap – time-of-flight), da Shimadzu.

As amostras de biodegradação foram analisadas por injeção direta no cromatógrafo sem preparo de amostra. Para todos os fármacos, o volume de injeção foi de 5µL, utilizou-se uma coluna de fase reversa C-18 (Supelco), com dimensões de 15 cm x 4,6 mm x: 5µm., fluxo de fase móvel de 2 mL/minuto,

temperatura do forno de 40 °C, temperatura do CDL 200 °C, e no modo de varredura de 50,0000 a 650,0000  $m/z$ , nos modos positivo e negativo.

O acoplamento da ionização a pressão atmosférica com os analisadores de massa seqüenciais *ion trap* (IT) e tempo de voo (TOF) permitem a obtenção alta exatidão de massa e alta resolução (10.000 a 1000  $m/z$ ). Os íons extraídos dos espectros de massas, para gerar os respectivos cromatogramas reconstituídos, dos compostos foram os seguintes:  $[M+H]^+ = 267,1705$  (atenolol),  $[M+H]^+ = 445,1605$  (tetraciclina), ( $[M-H]^- = 205,1217$  (ibuprofeno) e  $[M+H]^+ = 360,1005$  (bezafibrato).

Para o atenolol foi utilizado o seguinte gradiente das fases móveis: fase A (água Milli-Q) e solvente B (metanol). As condições cromatográficas foram: gradiente de 0 a 95% do solvente B em 7 minutos; 95% de B isocrático por 3 minutos; de 95 a 100% de B em 10 minutos; mantendo 100% de B por 5 minutos.

Para as análises do ensaio com a tetraciclina, as fases A (Água Milli-Q– 0,2 % de Ácido Fórmico) e a fase B (Metanol - – 0,2 % de Ácido Fórmico) foram usadas nas seguintes condições cromatográficas: um gradiente de 0 a 60% de B em 8 minutos; 60% de B isocrático por 2 minutos; de 60 a 100% de B em 12 minutos; e finalmente 100% de B por 3 min.

As condições cromatográficas de análise para o bezafibrato e ibuprofeno, foram idênticas. A fase A (Água Milli-Q) e a fase B (Metanol) foram utilizadas nas seguintes condições cromatográficas: gradiente de 0 a 90% de B em 10 minutos; 90% de B isocrático por 5 minutos; de 90 a 100% de B em 15 minutos; mantendo 100% de B por 5 minutos.

As condições instrumentais resumidas para a análise do conteúdo extracelular nas amostras de biodegradação, do ensaio com o meio WC, estão descrita na Tabela 15.

**Tabela 15. Condições instrumentais para quantificação dos fármacos nos ensaios com o meio WC.**

Fármaco	Equipamento	Informações Gerais	Coluna	Condições Cromatográficas
Etinilestradiol	Trace-GC (ThermoFinnigan) PolarisQ-Ion Trap (Thermo Finnigan).	Injetor - 250°C. Modo splitless (2 min) Linha de transferência-275°C. Fonte - 250°C. Fluxo de hélio: 1ml/mim	HP-5-MS (Agilent). Dimensões: 30m x0.25 mm x 0.25 µm.	120°C por 2 minutos, 10°C por minuto até 300°C, por 4 minutos
Diclofenaco	Trace-GC (ThermoFinnigan)	Injetor - 250°C. Modo splitless (2 min) Linha de transferência - 275°C. Fonte - 250°C. Fluxo de hélio: 1mL/mim	HP-5-MS (Agilent) Dimensões: 30mx 0.25 mm x 0.25 µm.	60°C, aumentando a 25 °C por minuto até 190 °C, por 1 minuto, seguidos de 15 °C por minuto até 240, mantendo por 1 minutos. e finalmente 30 °C/min até 300°C, por 3 minutos
Ácido Clofíbrico	GC-P-2010 (Shimadzu)	Injetor - 250°C. Modo splitless (0,75 min) Linha de transferência - 250°C Fonte - 200°C. Fluxo de hélio: 1,5mL/mim	FFPA (OPTIMA) 30m x 0.32 mm x 0.25 µm	120°C aumentando 10°C por minuto até 240°C, por 5 minutos.
Atenolol	LCMS-IT-TOF (Shimadzu)	Fase Móvel: A- Água Milli-Q (Millipore) B- Metanol Fluxo da fase móvel : 1mL/mim	C-18 (Supelco) Dimensões: 15 cm x 4,6 mm Partículas : 5µm	Forno a 40 °C. Gradiente de 0 a 95% de B em 7 min; 95% de B isocrático por 3 min; de 95 a 100% de B em 10 min; 100% de B por 5 min.
Tetraciclina	LCMS-IT-TOF (Shimadzu)	Fase Móvel: A- Água Milli-Q (Millipore) – 0,2 % de Ácido Fórmico B- Metanol - – 0,2 % de Ácido Fórmico Fluxo da fase móvel : 2mL/mim	C-18 (Supelco) Dimensões: 15 cm x 4,6 mm Partículas : 5µm	Forno a 40 °C. Gradiente de 0 a 60% de B em 8 min; 60% de B isocrático por 2 min; de 60 a 100% de B em 12 min; 100% de B por 3 min.
Ibuprofeno	LCMS-IT-TOF (Shimadzu)	Fase Móvel: A- Água Milli-Q (Millipore) B- Metanol Fluxo da fase móvel : 1mL/mim	C-18 (Supelco) Dimensões: 15 cm x 4,6 mm Partículas : 5µm	Forno a 40 °C. Gradiente de 0 a 90% de B em 10 min; 90% de B isocrático por 5 min; de 90 a 100% de B em 15 min; 100% de B por 5 min.
Bezafibrato	LCMS-IT-TOF (Shimadzu)	Fase Móvel: A- Água Milli-Q (Millipore) B- Metanol Fluxo da fase móvel : 1mL/mim	C-18 (Supelco) Dimensões: 15 cm x 4,6 mm Partículas : 5µm	Forno a 40 °C. Gradiente de 0 a 90% de B em 10 min; 90% de B isocrático por 5 min; de 90 a 100% de B em 15 min; 100% de B por 5 min.

### **3.6.2. Determinação da concentração intracelular dos fármacos no ensaio com o meio WC**

Para avaliar o conteúdo intracelular, as amostras de bioacumulação foram submetidas ao procedimento de lise celular (descrito no item 3.4.2.3.), e analisadas nas mesmas condições instrumentais empregadas nas análises de biodegradação, descritas na Tabela 15

Quando um fármaco foi encontrado no interior das células da cianobactéria, foi necessária a quantificação em uma curva de calibração feita em metanol (grau HPLC), já que as amostras de lise celular se encontravam neste solvente.

### **3.6.3. Limites de detecção e limites de quantificação**

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pela injeção seguida de 10 brancos e foram calculados de acordo com as seguintes equações [85];

Limite de detecção (LD):

$$LD = xb + 3 sb,$$

Limite de quantificação (LQ):

$$LQ = xb + 10 sb,$$

$xb$  = valor médio do branco

$sb$  = desvio padrão do branco

O branco utilizado foi o meio WC após 7 dias de incubação com a cianobactéria.

#### **3.6.4. Pesquisa de metabolitos nos meios extracelular e intracelular no ensaio com o meio WC**

Com o intuito de identificar os intermediários e possíveis produtos de degradação formados durante os ensaios de biodegradação, utilizou-se a espectrometria de massas com fonte de ionização *eletrospray* (ESI-MS-IT-TOF-Shimadzu). As amostras de biodegradação e bioacumulação foram analisadas por injeção direta no espectrômetro de massas, nos modos positivo e negativo. Íons referentes a possíveis metabólitos foram pesquisados, em todos os espectros de massa obtidos.

A temperatura do CDL foi de 200 °C, as análises foram feitas no modo de varredura de 50,0000 a 650,0000 *m/z*, detector com 1,65 Kv, nos modos positivo e negativo.

#### **3.7. Instrumentação- Ensaio com o efluente farmacêutico**

##### **3.7.1. Determinação do teor de matéria orgânica no meio extracelular dos fármacos no ensaio com o efluente farmacêutico.**

Como não foi possível a quantificação dos fármacos no meio extracelular, devido ao termo de sigilo assinado com a indústria farmacêutica, o teor de matéria orgânica total foi determinado por análises de DBO e DQO. As amostras de biodegradação filtradas no ultimo dia de ensaio foram encaminhadas para um laboratório terceirizado, onde e procedeu-se as análises de DQO, DBO e OD.

Todos os ensaios foram realizados baseados no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, um guia publicado pela Associação Americana de Saúde Pública e usado como literatura técnica para análises e controle de efluentes. [21]

### **3.7.2. Determinação dos fármacos etinilestradiol, diclofenaco e tetraciclina no meio intracelular no ensaio com o efluente farmacêutico.**

Para avaliar se os fármacos adicionados ao efluente farmacêutico (diclofenaco, etinilestradiol e tetraciclina) foram bioacumulados, as amostras de bioacumulação (item 3.4.2.3) foram analisadas por injeção direta no ESI-MS-IT-TOF( Shimadzu), nos modos positivo e negativo, com temperatura do CDL 200 °C, e no modo de varredura de 50,0000 a 650,0000 *m/z*, e detector com 1,65 Kv,

## **CAPÍTULO 4**

## 4. Resultados e discussões

### 4.1. Curva de crescimento da cianobactéria *M.novacekii*

As cianobactérias são organismos fotossintetizadores, sendo a clorofila o principal responsável pela absorção de energia luminosa. A clorofila funciona também como centro de reação fotossintética, a qual possui dois picos de absorção: um na região do azul (433 nm) e outro na região do vermelho (686 nm) [86]. Diversos autores demonstram a viabilidade de se monitorar a curva de crescimento de cianobactérias por meio de densidade ótica [82-84]. A relação entre a curva de crescimento da *Microcystis novacekii* por contagem microscópica em câmara de Fuchs-Rosenthal e sua absorbância em 440 nm e 680 nm, comprimento de onda de absorção da clorofila a, foi determinada por regressão linear. Não foi observada correlação entre a absorbância a 440 nm e a contagem ao microscópio. Em 680 nm, porém, a densidade ótica mostrou-se mais regular, com coeficiente de correlação linear  $R^2 = 0,992$  com a contagem celular. (Figura 21)

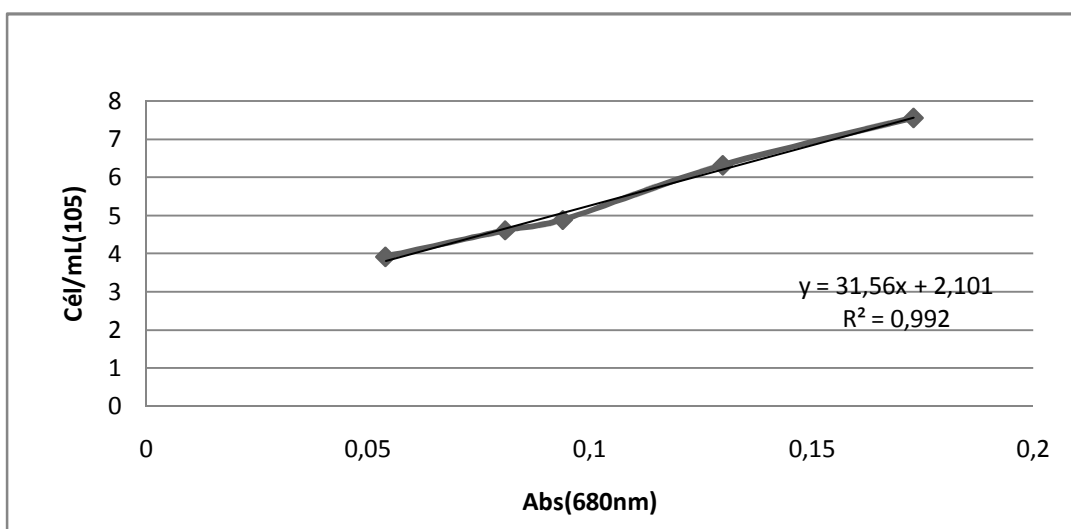


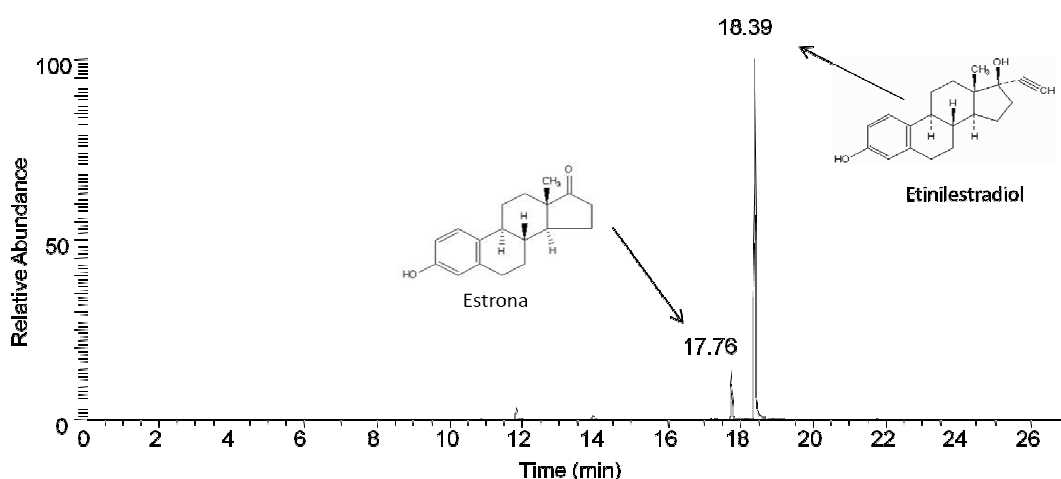
Figura 21. Correlação entre o crescimento monitorado por densidade ótica (A = 680nm) e a contagem celular ao microscópio da cultura de *M.novacekii*.

## 4.2. Ensaio biodegradação/bioacumulação utilizando meio WC

### 4.2.1. Ensaio de biodegradação/bioacumulação do etinilestradiol

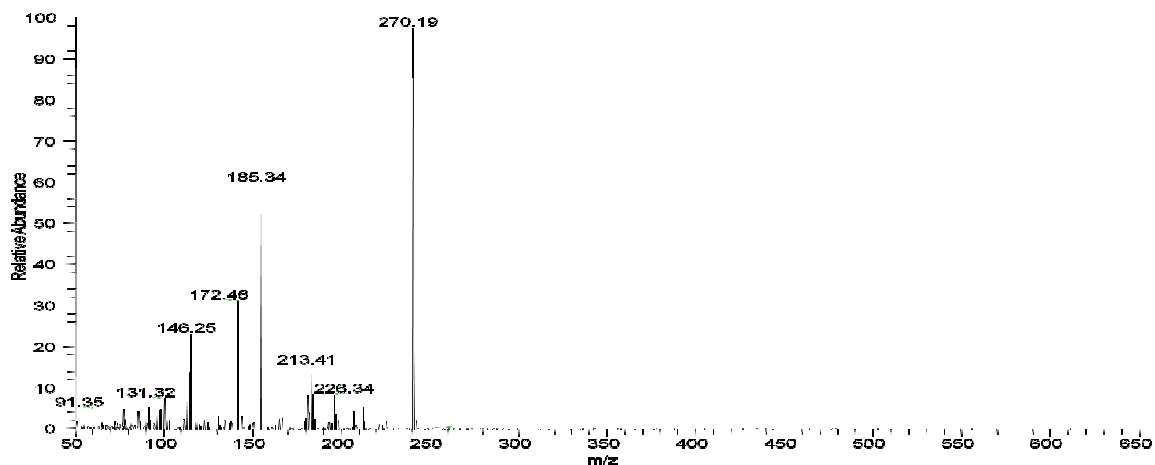
#### 4.2.1.1. Biodegradação

A injeção via SPME de uma solução padrão de etinilestradiol resultou no aparecimento de dois picos. No tempo de retenção de 17,7 minutos observou-se o pico referente à estrona e, em 18,4 minutos, o pico do etinilestradiol. Este comportamento observado, tanto nas soluções padrão quanto nas amostras do experimento, deve-se à conversão do etinilestradiol a estrona no injetor do cromatógrafo (Figura 22).

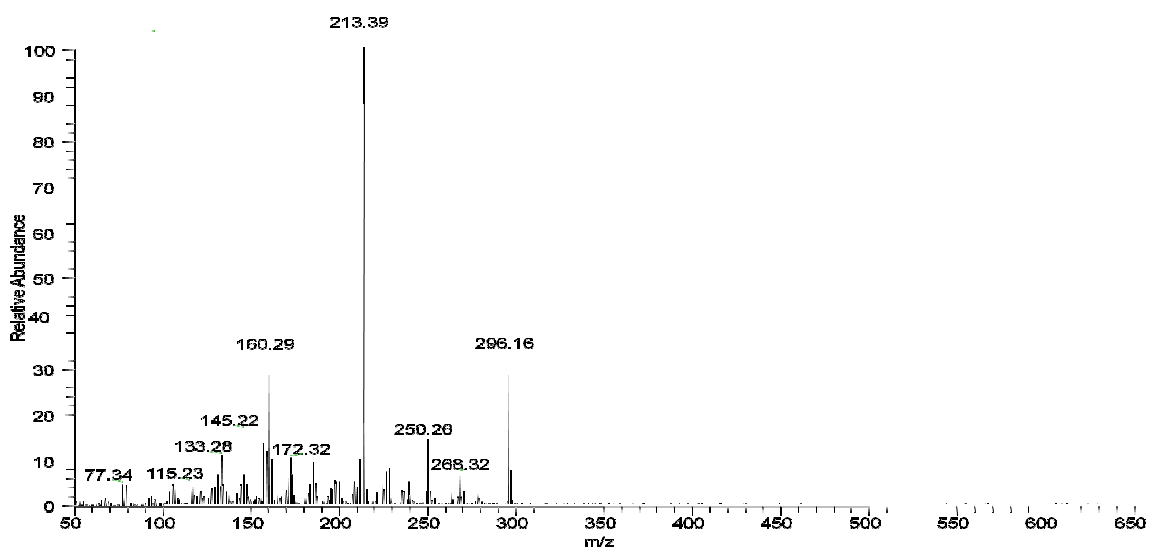


**Figura 22. Cromatograma obtido por injeção SPME, de uma solução aquosa de etinilestradiol.**

No tempo de retenção de 17,7 e 18,4 minutos, a estrona e o etinilestradiol, respectivamente, foram confirmados por comparação com o espectro de massas da biblioteca NIST, do próprio software do equipamento. Observam-se os picos dos íons moleculares a  $m/z$  270 e  $m/z$  296, respectivamente, e seus fragmentos característicos (Figura 23 e Figura 24).



**Figura 23. Espectro de massas da estrona com o íon molecular de  $m/z$  270.**



**Figura 24. Espectro de massas do etinilestradiol com o íon molecular de  $m/z$  296.**

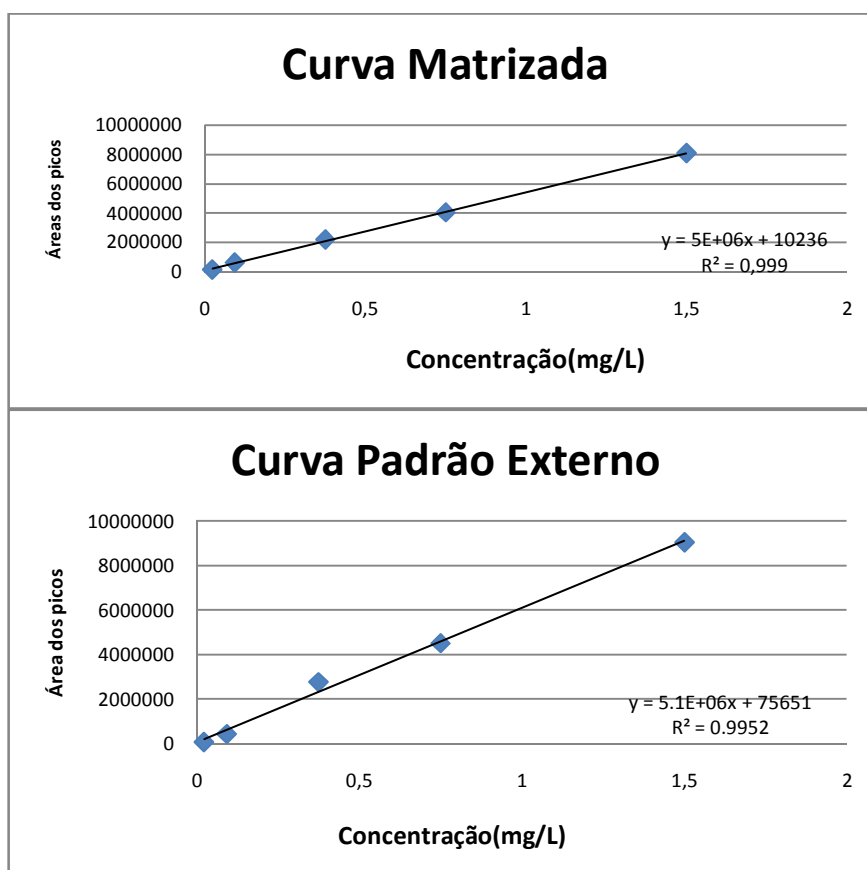
A soma das áreas dos dois picos cromatográficos nas curvas de calibração e nas amostras foi utilizada para a quantificação do hormônio. Para avaliar o efeito de matriz, foram testadas duas curvas (Tabela 16).

**Tabela 16. Concentrações das curvas de calibração para o etinilestradiol com os desvios relativos S.D. (%). Os ensaios foram feitos em triplicata.**

Conc.(mg/L)	Curva Padrão Externo		Curva na matriz	
	Área	S.D. (%)	Área	S.D. (%)
1,5	9058524	2,67	8108620	8,06
0,75	4529262	3,66	4054310	8,68
0,375	2781007	1,98	2202951	14,56
0,093	448036	4,56	626374	4,16
0,023	90880	6,70	149258	24,93

S.D. (%): desvio padrão relativo

Nas curvas de padrão externo e na matriz utilizou-se água deionizada (Milli-Q-Millipore) e o meio de cultura WC filtrado após 7 dias de incubação, respectivamente (Figura 25).



**Figura 25. Curvas de calibração para o etinilestradiol.**

Para comparar as inclinações das duas retas, aplicou-se o teste t de student para variâncias equivalentes. Os coeficientes angulares das duas retas foram estatisticamente iguais num nível de 95% de confiança. Deste modo, utilizou-se a curva aquosa para a quantificação do hormônio etinilestradiol. Os limites de detecção e de quantificação calculados foram de 4,18 ng/L e 10,32 ng/L, respectivamente.

As concentrações testadas do etinilestradiol nos ensaios foram, aproximadamente, 0,17 mg/L, 0,15 mg/L e 0,10 mg/L. As amostras dos frascos-teste e controle foram coletadas nos dias 1, 4, 7 e analisadas por SPME. O ensaio foi realizado em triplicata para cada nível de concentração e a média das áreas foi interpolada na curva de calibração, obtendo-se as concentrações do hormônio no meio. Na Tabela 17, é apresentada a porcentagem de redução do etinilestradiol no meio, tanto para os testes quanto para os controles. As médias das concentrações obtidas nos testes e controles foram estatisticamente comparadas, em cada dia de ensaio, utilizando o teste t. No primeiro dia, teste e controle apresentaram o mesmo nível de concentração. A partir do quarto dia estas médias passaram a divergir, com redução acentuada das concentrações nos frascos-teste, e pequena degradação espontânea nos frascos-controle, comportamento observado em todas as concentrações testadas.

As taxas de remoção (%) foram calculadas até o 4º dia e até o 7º dia, considerando o primeiro dia o tempo inicial do experimento. Pois assim que o ensaio foi montado, as amostras foram coletadas.

**Tabela 17. Porcentagem de redução do etinilestradiol nos frascos-teste e nos frascos-controle nos três níveis de concentração testados durante o ensaio.**

Nível	Concentração Etinilestradiol (mg/L)			Redução(%)	
	Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 4	Dia 7
<b>Nível 1</b>					
Frasco-Teste 1	0,177±0,004 <sup>(a)</sup>	0,074±0,012 <sup>(b)</sup>	0,062±0,007 <sup>(d)</sup>	58,16	64,97
Frascos-Controle 1	0,178±0,003 <sup>(a)</sup>	0,164±0,005 <sup>(c)</sup>	0,163±0,053 <sup>(e)</sup>	7,97	8,55
<b>Nível 2</b>					
Frasco-Teste 2	0,155±0,017 <sup>(a)</sup>	0,042±0,026 <sup>(b)</sup>	0,057±0,009 <sup>(d)</sup>	73,18	63,32
Frascos-Controle 2	0,142±0,013 <sup>(a)</sup>	0,128±0,006 <sup>(c)</sup>	0,124±0,006 <sup>(e)</sup>	9,50	12,56
<b>Nível 3</b>					
Frasco-Teste 3	0,109±0,023 <sup>(a)</sup>	0,019±0,006 <sup>(b)</sup>	0,034±0,006 <sup>(d)</sup>	82,57	68,45
Frascos-Controle 3	0,109±0,008 <sup>(a)</sup>	0,099±0,022 <sup>(c)</sup>	0,093±0,010 <sup>(e)</sup>	9,02	14,43

\*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais para cada nível testado.

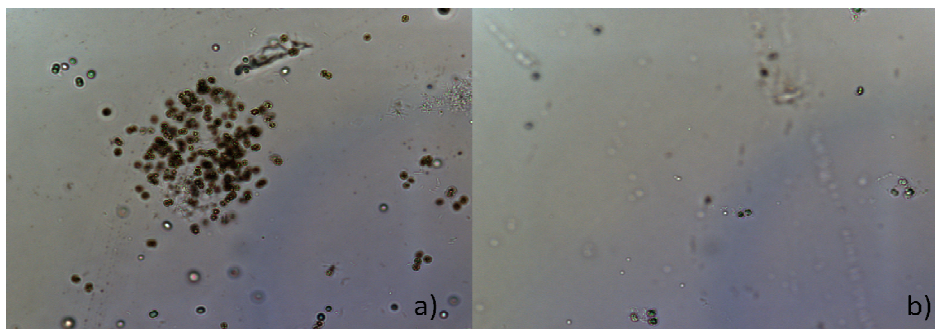
Ao analisar a Tabela 11 observa-se que, do quarto para o sétimo dia de ensaio, houve uma tendência à diminuição da porcentagem de redução do hormônio nos frascos-teste, a qual passou de 73,18% para 63,32% e de 82,58% para 68,45%, nos níveis 2 e 3, respectivamente. Este resultado talvez possa ser atribuído às imprecisões inerentes das etapas experimentais, especialmente para os ensaios realizados com baixas concentrações do hormônio.

No sétimo dia de ensaio, a redução do hormônio nos frascos-teste variou de 63-68% nos diferentes níveis de concentração testados, enquanto que a degradação espontânea nos frascos-controle variou de 8-14%, indicando a participação da *Microcystis novacekii* na remoção deste hormônio do meio aquoso WC. Este resultado, quando comparado ao tratamento de esgoto tradicional (redução de 13 a 17%), demonstra ser promissor devido sua alta eficiência em poucos dias de incubação [87, 88].

Durante o ensaio foi monitorado o aparecimento de novos picos na tentativa de se identificar metabólitos de biodegradação; no entanto, foi observado somente a redução do pico referente ao etinilestradiol.

#### 4.2.1.2. Bioacumulação

A eficiência da lise celular foi estimada pela contagem celular no microscópio óptico, antes e depois do “pellet” ser submetido ao ultrassom. As contagens foram realizadas em triplicatas e  $81 \pm 1\%$  das células foram lisadas (Figura 26).



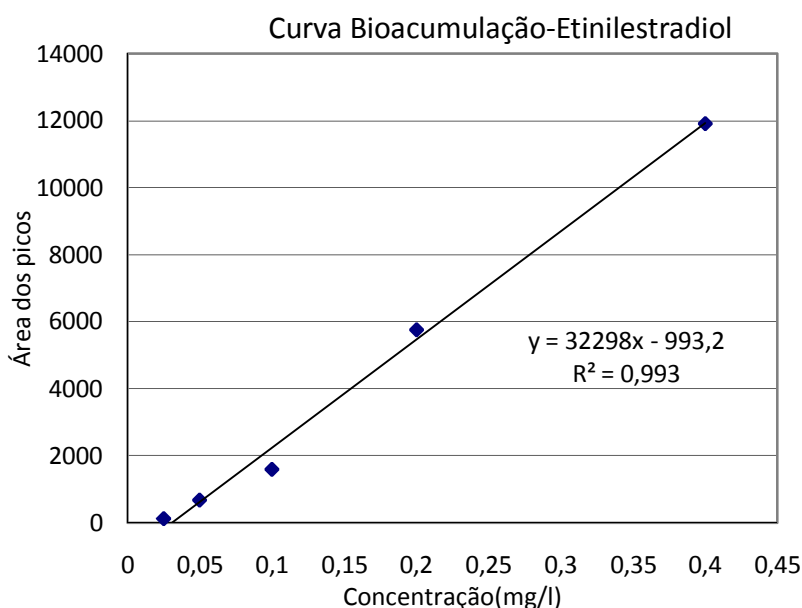
**Figura 26. Foto das amostras (aumento de 40X) antes (a) e após (b) serem submetidas ao procedimento de lise celular.**

Como não foi possível detectar nenhum metabólito no meio extracelular, procedeu-se a análise do conteúdo intracelular da cianobactéria para avaliar a bioacumulação deste hormônio. As células foram lisadas e seu conteúdo intracelular foi liberado em um volume total de 5,00 mL de acetona. (Procedimento descrito no item 3.3.2.3). Este volume foi seco em atmosfera de nitrogênio e após secagem foram adicionados 200  $\mu$ L de metanol, concentrando 25 vezes a amostra. Uma alíquota deste sobrenadante foi analisada por GC-MS, e o hormônio foi detectado no conteúdo intracelular em todos os níveis de concentração testados (Tabela 18).

**Tabela 18. Concentração intracelular (mg/L) de etinilestradiol no sétimo dia de ensaio.**

Amostras	Área (média)	Área corrigida (F.D=25)	Concentração (mg/L)
Teste_nível1	88632	3545	0,144±0,04
Teste_nível2	57558	2302	0,106±0,08
Teste_nível3	16632	665	0,055±0,13

As áreas dos picos referentes às amostras foram interpoladas na curva de calibração, que foi preparada utilizando metanol como solvente (Figura 27).



**Figura 27. Curva de calibração usada para quantificação intracelular do etinilestradiol.**

A concentração extracelular foi monitorada por SPME durante todo o ensaio, mas a concentração intracelular foi determinada somente no último dia, quando as amostras dos frascos-teste foram submetidas ao procedimento de lise celular. Conhecendo a concentração nos meios intra e extracelular foi possível determinar a quantidade de matéria distribuída entre eles, determinando assim a proporção bioacumulada pela cianobactéria.

A eficiência do processo foi então estimada pela comparação da quantidade de matéria encontrada nos diferentes meios com a quantidade total de matéria adicionada em cada nível de concentração para 12 mL de cultura (Tabela 19).

**Tabela 19. Balanço de massas para o etinilestradiol no último dia de experimento.**

	Teste- Nível1	Teste- Nível2	Teste- Nível3
Quantidade total de matéria adicionada (mg)	0,00212	0,00186	0,00131
Qt, Matéria Extracelular (mg)	0,00074	0,00068	0,00041
Qt, Matéria Intracelular (mg)	0,00072	0,00059	0,00040
Soma	0,00146	0,00127	0,00081
% Matéria Extracelular	35,03	36,68	31,55
% Matéria Intracelular	34,01	31,76	30,49
% Matéria não encontrada	30,97	31,57	37,96

A quantidade de matéria total se refere à concentração extracelular determinada no primeiro dia de ensaio (Dia 1), pois assim que o experimento foi montado uma amostra foi coletada. Por exemplo, a concentração encontrada no frasco teste (nível 1) foi de 0,177 mg/L (Tabela 17); portanto em 12 mL havia 0,00212 mg de etinilestradiol. Esta quantidade de matéria (0,00212 mg) foi considerada a quantidade de matéria total adicionada no frasco teste (nível 1), Tabela 19. Para estimar a proporção da matéria total adicionada nos meios extracelular e intracelular, procedeu-se da seguinte forma: para determinar a quantidade de matéria extracelular, a concentração de etinilestradiol quantificada no sétimo dia de ensaio foi de 0,0062 mg/L (Tabela 17), portanto em 12 mL de cultura foram encontrados 0,00074 mg de etinilestradiol, que representa 35,03% da quantidade de matéria total adicionada (0,00212).

Para determinar a quantidade de matéria no conteúdo intracelular, foi quantificada a concentração de etinilestradiol que foi liberado do interior das células da cianobactéria em 5 mL de acetona. A concentração determinada para os frascos teste (nível 1) foi de 0,144 mg/L (Tabela 18); portanto em 5 mL de acetona a quantidade de matéria encontrada foi de 0,00072 mg (Tabela 19). Esta é a

quantidade de matéria encontrada no interior do pellet das cianobactérias (matéria intracelular) e representou 34,01% da quantidade de matéria total adicionada (0,00212 mg).

Na Tabela 19 observa-se que 30-34% do etinilestradiol foi acumulado no interior das células da cianobactéria, nos níveis de concentração testados. Cerca de 30 a 37% do etinilestradiol não foi encontrado, fato que pode ser explicado levando-se em consideração que cerca de 20% das células não foram lisadas, ou seja, o conteúdo intracelular não foi liberado.

Poluentes com coeficientes de partição octanol/água ( $\log K_{ow} < 5$ ) podem ser acumulados por microorganismos aquáticos fotossintetizantes, já que o poluente precisa ter polaridade suficiente para dissolver em água e, ao mesmo tempo, permear a membrana lipídica da célula. Por outro lado, os poluentes hidrofóbicos ( $\log K_{ow} > 5$ ) podem sofrer partição e se depositar nos sedimentos dos corpos d'água [89]. Assim, as microalgas podem reduzir a exposição de poluentes através da biodegradação destes analitos, utilizando-os como fonte de carbono. Entretanto, como ocupam a base da cadeia alimentar, podem facilitar a biomagnificação em organismos superiores, aumentando a possibilidade de toxicidade ambiental e humana.

A bioacumulação de herbicidas e pesticidas com  $\log K_{ow}$  próximos ao do etinilestradiol,  $\log K_{ow} = 3,67$ , já foi descrita na literatura. Os herbicidas triazínicos, como a atrazina ( $\log K_{ow} = 2,56$ ) e terbutrim ( $\log K_{ow} = 3,49$ ), foram encontrados no conteúdo intracelular de diferentes espécies de cianobactérias, cerca de 80% do total adicionado, após 24 horas de incubação. [90-92] O etinilestradiol foi encontrado também no interior de células de plantas superiores que foram testadas quanto ao seu potencial de fito-remediação do solo. No fim de 28 dias de

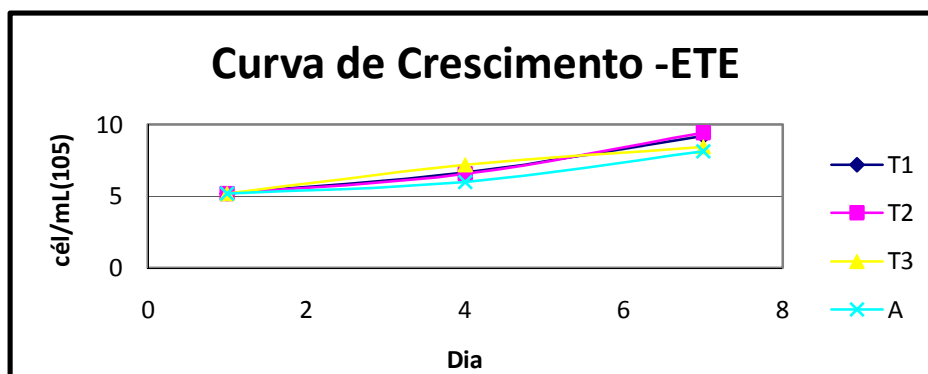
experimento, cerca de 20% do etinilestradiol aplicado no solo foram distribuídos em células da raiz e das folhas da planta. [93]. Quando comparado com a literatura, o resultado obtido neste trabalho se torna promissor, desde que a *Microcystis novacekii* demonstrou potencial para bioacumulação de cerca de 30-35% do hormônio etinilestradiol, em sete dias de ensaio. Este valor pode ser maior, pois cerca de 20% das células da cianobactéria não sofreram lise celular.

A biorremediação é uma técnica que utiliza microorganismos para detoxificação de ambientes poluídos. No ambiente aquático natural, os microorganismos já desempenham este papel, podendo detoxificar o ambiente de três maneiras: mineralizando o substrato, transformando-o em outros produtos, e bioacumulando.

Como agente de biorremediação, a cianobactéria possui vantagens em relação aos outros microorganismos heterotróficos, que são a natureza autotrófica e a fixação de nitrogênio. A produção de energia pelas cianobactérias, e a necessidade de suplementação do meio para fungos e bactérias, torna a manutenção de seu crescimento de baixo custo. O meio WC, utilizado no cultivo e nos ensaios de biodegradação é enriquecido basicamente com sais inorgânicos, na tentativa de mimetizar a água doce, tornando economicamente viável a utilização deste microorganismo como agente de biorremediação.

#### **4.2.1.3. Curva de crescimento**

O crescimento da espécie foi monitorado durante o ensaio de biodegradação. O crescimento dos frascos testes (T1, T2, T3), foi comparado com o crescimento dos frascos controle (A), para avaliar a viabilidade biológica da *Microcystis novacekii* durante o ensaio. (Figura 28)



**Figura 28. Curva de crescimento da *Microcystis novacekii* durante o ensaio do etinilestradiol, nos frascos-teste e controle.**

O crescimento durante o ensaio foi monitorado pela leitura das absorvâncias a 680 nm e, para converter em células por mililitro de solução, foi utilizada a curva ( $y=31,56x+2,101$ ,  $R^2= 0,992$ ) que determina a relação linear entre as duas medidas.

A razão do crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ) foi calculada pela fórmula:

$$\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2(t-t_0)$$

Onde  $N_t$  é a densidade celular (células/mL) no tempo  $t$  em dias, e  $N_0$  a densidade celular no tempo 0. [91]

**Tabela 20 - Razão do crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ), dos testes e controle durante o ensaio com etinilestradiol.**

	Dia 4 ( $\text{d}^{-1}$ )	Dia 7 ( $\text{d}^{-1}$ )
Teste_nível1	1,25±0,22 <sup>(a)</sup>	1,60±0,24 <sup>(b)</sup>
Teste_nível2	1,13±0,17 <sup>(a)</sup>	1,55±0,17 <sup>(b)</sup>
Teste_nível3	1,35±0,19 <sup>(a)</sup>	1,89±0,08 <sup>(b)</sup>
Controle_alga	1,27±0,13 <sup>(a)</sup>	1,30±0,15 <sup>(b)</sup>

\*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais.

Durante todo o ensaio, os frascos-teste apresentaram uma razão de crescimento estatisticamente igual a dos frascos-controle, com significância de

95%, utilizando o teste t de student para variâncias equivalentes. Portanto, estes resultados demonstram a resistência da espécie, mantendo sua viabilidade celular durante todo o ensaio (Tabela 20).

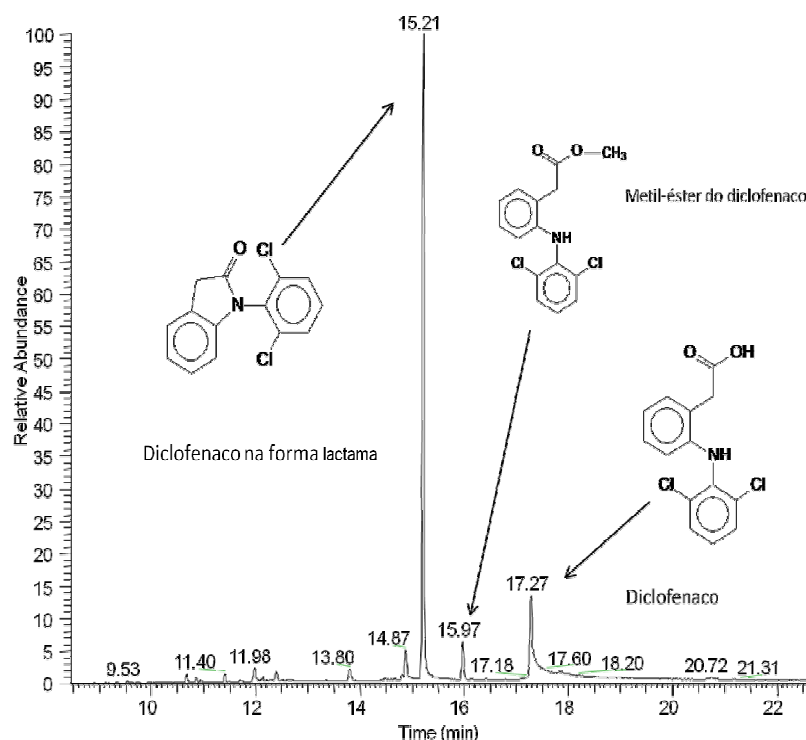
A adaptação da espécie frente à xenobióticos é de extrema importância para sua utilização como agente de biorremediação. Quando há inibição do crescimento da espécie frente a algum poluente, indica que este está exercendo alguma toxicidade para o microorganismo, porém insuficiente para levar a morte celular. [91, 94] O crescimento nos frascos-teste foi estatisticamente igual aos dos frascos controle, indicando elevada capacidade adaptativa da espécie. A *Microcystis novacekii* foi isolada do PERD, uma região que sofre o impacto de diversas atividades antrópicas apresentando, portanto, capacidade adaptativa frente à xenobióticos.

Em um estudo anterior do grupo, a espécie estudada removeu cerca de 90% do pesticida organofosforado metilparation do meio WC, em sete dias de ensaio. Neste estudo, também foi observado um estímulo ao crescimento celular, demonstrando seu potencial como agente de biorremediação de ambientes aquáticos poluídos. [95]

#### **4.2.2. Ensaio de biodegradação/bioacumulação do diclofenaco.**

##### **4.2.2.1. Biodegradação**

A injeção de uma solução padrão do diclofenaco resultou no aparecimento de três picos nos tempos de retenção de 15,21, 15,97 e 17,32 minutos. As estruturas identificadas foram, respectivamente, o diclofenaco na forma de lactama (1), o metil-éster do diclofenaco (2) e o próprio diclofenaco (3). (Figura 29).



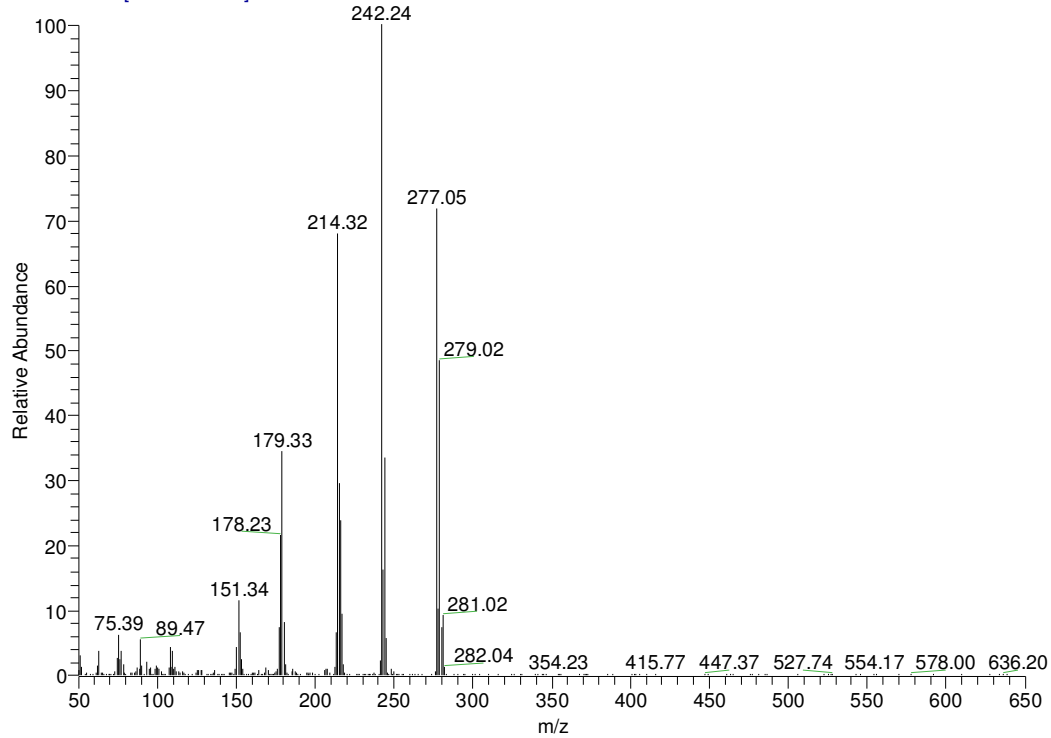
**Figura 29. Cromatograma obtido por injeção SPME de uma solução aquosa de diclofenaco.**

As estruturas identificadas já foram descritas na literatura. A ciclização do anel ocorre com o ataque nucleofílico do nitrogênio ao carbono da carbonila, perdendo água e resultando na forma de lactama do diclofenaco. Esta reação ocorre no injetor do GC. O metil-éster do diclofenaco é encontrado quando a solução padrão é preparada em metanol, ocorrendo a metilação da hidroxila do ácido carboxílico. [96]. Surpreendentemente, estas estruturas já foram identificadas como produtos de biodegradação do diclofenaco (Figura 29). [97] O diclofenaco na forma de lactama (1) e o metil-éster do diclofenaco (2), não podem ser considerados produtos de biodegradação, já que esta transformação ocorre nas condições da análise por GC-MS, ou durante o preparo da solução. [96]

Nos tempos de retenção característicos, as três estruturas foram confirmadas comparando com a biblioteca NIST, encontrada no software do equipamento. As formas 1, 2 e 3 foram identificadas pelo pico do íon molecular

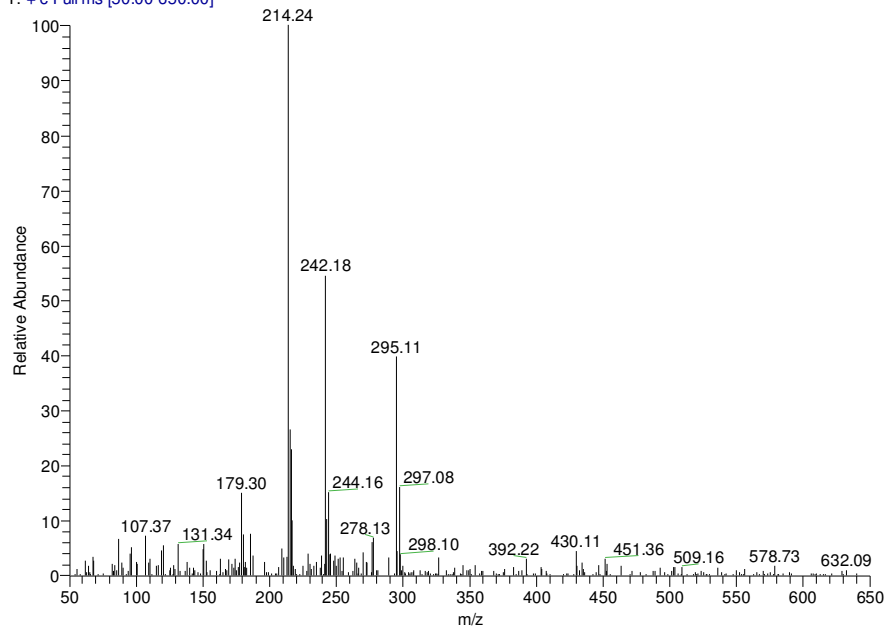
$m/z$  277,  $m/z$  295 e  $m/z$  309, respectivamente, e por seus fragmentos característicos.(Figura 32, 33 e 34)

2 #1368 RT: 15.21 AV: 1 SB: 27 15.24-15.51 NL: 2.25E5  
T: + c Full ms [50.00-650.00]



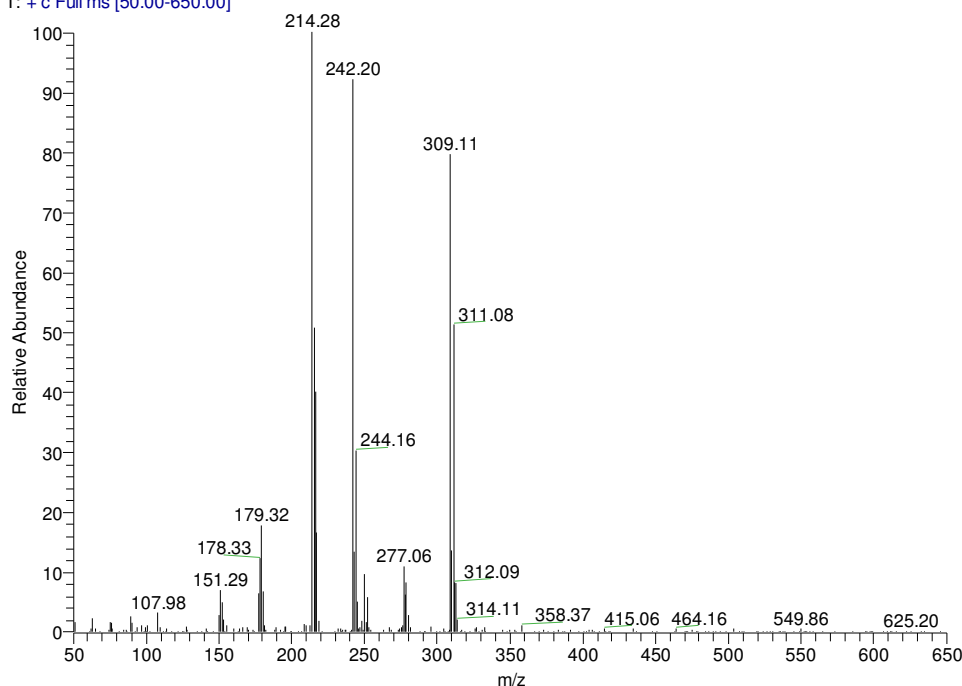
**Figura 30. Espectro de massas da forma lactama do diclofenaco.**

2 #1549 RT: 17.21 AV: 1 SB: 21 17.00-17.23 NL: 1.45E3  
T: + c Full ms [50.00-650.00]



**Figura 31. Espectro de massas do diclofenaco**

2#1438 RT: 15.97 AV: 1 SB: 27 15.24-15.51 NL: 1.19E4  
 T: + c Full ms [50.00-650.00]



**Figura 32. Espectro de massas do metil-éster do diclofenaco**

A forma lactama foi escolhida para a quantificação do diclofenaco, pois as demais estruturas apresentam baixa resposta instrumental e no decorrer do ensaio, com a diminuição da concentração, estas formas não foram detectadas.

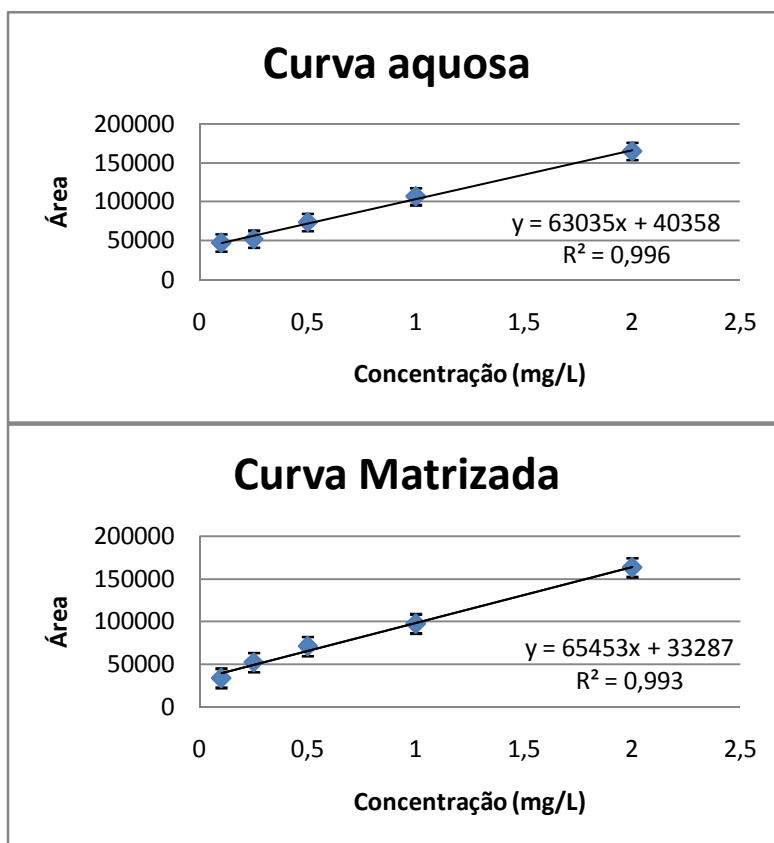
Para avaliar o efeito de matriz, foram testadas duas curvas. Na curva de padrão externo utilizou-se como solvente água deionizada (Milli-Q-Millipore) e, na curva na matriz, foi utilizado o meio de cultura WC filtrado após 7 dias de incubação. (Tabela 21)

**Tabela 21. Concentrações das curvas analíticas com seus desvios relativos S.D.(%).**

Conc.(mg/L)	Curva Padrão Externo		Curva matrizada	
	Área (média)	S.D(%)	Área (média)	S.D(%)
2,000	164747	7,32	163445	6,11
1,000	106829	6,49	97556	6,33
0,500	73730	9,73	71234	16,64
0,250	51862	7,75	52311	5,81
0,100	47309	18,21	33884	13,70

\* S.D. (%): desvio padrão relativo

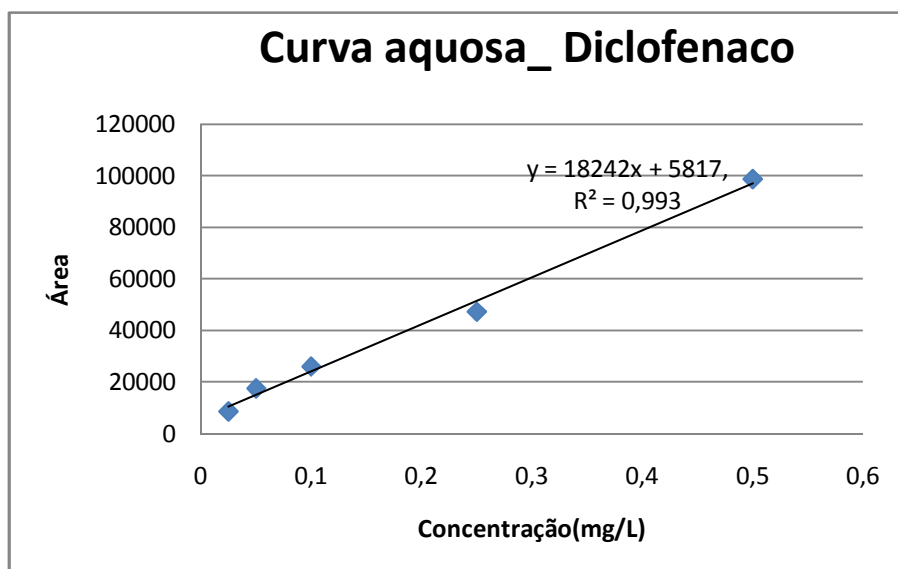
Ao comparar as inclinações das duas retas aplicou-se o teste F e, em seguida foi aplicado o teste t de Student para variâncias iguais. Os coeficientes angulares das duas retas foram estatisticamente iguais com 95% de confiança. Portanto, utilizou-se a curva aquosa para quantificação do diclofenaco (Figura 33).



**Figura 33. Curvas de calibração para o diclofenaco.**

Foram testados três níveis de concentração do diclofenaco, aproximadamente 0,25 mg/L, 0,10 mg/L e 0,075 mg/L, níveis 1, 2 e 3, respectivamente. As amostras dos frascos-teste e dos frascos-controle (degradação espontânea) foram coletadas nos dias 1, 4, 7, e analisadas por SPME e GC-MS. O ensaio foi realizado em triplicata para cada nível de concentração e a média das áreas foi interpolada na curva de calibração, obtendo-se as concentrações do analito no meio.

A curva de calibração utilizada para a quantificação do diclofenaco durante o ensaio está representada na Figura 34. Os limites de detecção e quantificação calculados foram 1,12 µg/L e 5,43 µg/L, respectivamente.



**Figura 34. Curva de calibração usada para quantificação do diclofenaco durante o ensaio.**

Na Tabela 22 é apresentada a porcentagem de redução do diclofenaco no meio, tanto para os testes quanto para os controles. As médias das concentrações dos testes e controles foram comparadas utilizando o teste t em cada dia de ensaio.

**Tabela 22. Porcentagem de redução do diclofenaco durante o ensaio**

Nível 1	Concentração Diclofenaco de sódio (mg/L)			% Redução	
	Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 4	Dia 7
<b>Frasco-Teste 1</b>	0.273±0.026 <sup>(a)</sup>	0.111±0.023 <sup>(b)</sup>	0.073±0.023 <sup>(d)</sup>	54.52	69.96
<b>Frasco-Controle 1</b>	0.231±0.030 <sup>(a)</sup>	0.181±0.006 <sup>(c)</sup>	0.146±0.006 <sup>(e)</sup>	21.65	36.80
<b>Nível 2</b>					
<b>Frasco-Teste 2</b>	0.119±0.002 <sup>(a)</sup>	0.007±0.007 <sup>(b)</sup>	0.008±0.004 <sup>(d)</sup>	94.12	93.28
<b>Frascos-Controle 2</b>	0.118±0.033 <sup>(a)</sup>	0.076±0.009 <sup>(c)</sup>	0.065±0.005 <sup>(e)</sup>	35.59	44.92
<b>Nível 3</b>					
<b>Frasco-Teste 3</b>	0.078±0.008 <sup>(a)</sup>	0.014±0.001 <sup>(b)</sup>	0.003±0.002 <sup>(d)</sup>	82.05	96.15
<b>Frascos-Controle 3</b>	0.082±0.012 <sup>(a)</sup>	0.063±0.006 <sup>(c)</sup>	0.058±0.002 <sup>(e)</sup>	23.17	29.17

\*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais.

No primeiro dia de ensaio, as médias das concentrações dos frascos-teste. e controle são iguais, no quarto dia estas médias passam a divergir, com redução acentuada das concentrações do analito nos frascos-teste. Tal comportamento foi observado em todas as concentrações e no último dia de ensaio.

Até o quarto dia de ensaio, a porcentagem de redução nos frascos- teste, no maior nível de concentração foi de 54.52% enquanto que, nos menores níveis, foi de 94,12% e 82,05%. No decorrer do ensaio, esta relação se mantém, ou seja, maiores remoções estão relacionadas com menores níveis de concentração. No sétimo dia, nos níveis 1, 2 e 3, observou-se uma remoção de 69,96%, 93,28% e 96,15%, respectivamente. Este resultado foi estatisticamente diferente, com 95% de confiança, dos frascos-controle nos níveis 1, 2 e 3, que apresentaram remoção de 36,80%, 44,92% e 29,17%, respectivamente. Este resultado indica que a cianobactéria exerceu influência na remoção deste fármaco do meio aquoso WC.

As menores taxas de remoção do diclofenaco nas concentrações mais altas sugerem que o fármaco possa estar saturando as enzimas do citocromo P450 da cianobactéria. Este fato será discutido adiante na curva de crescimento da alga durante o experimento.

Os mecanismos de remoção de poluentes aquáticos descritos na literatura são distintos para bactérias e cianobactérias. As bactérias são capazes de metabolizar xenobióticos através de estimulação gênica e, conseqüentemente, produção de diferentes tipos de enzimas capazes de degradar estes compostos. [19] Para organismos fotossintetizantes, como as plantas e cianobactérias, é relatada a remoção de xenobióticos por ação das rotas usuais do sistema citocromo P450 para detoxificação de xenobióticos, utilizando compostos orgânicos como fonte de carbono [63].

Durante o ensaio foi monitorado o aparecimento de novos picos na tentativa de se identificar metabólitos da biodegradação; no entanto, foi observada somente a redução do pico referente ao diclofenaco.

Nos frascos-controle, houve uma redução significativa da concentração do diclofenaco, indicando que este fármaco pode ser degradado por fotólise ou hidrólise. Produtos de fotólise descritos na literatura [98] não foram detectados nos cromatogramas.

Aguera et al. (2005) incubaram uma solução de 50 mg/L de diclofenaco de sódio sob irradiação de uma lâmpada UV e detectaram os produtos por LC-MS e GC-MS. Os produtos identificados por CG-MS foram pesquisados nos controles do ensaio, mas também não foram encontrados. No presente estudo, a concentração do diclofenaco testada foi cerca de 200 vezes menor do que o descrito na literatura [98]. Assim, se estes produtos foram formados, podem estar abaixo do limite de detecção do método.

Produtos de degradação formados por via fotolítica ou por biodegradação apresentam uma polaridade maior que a do diclofenaco, visto que reações de oxidação, hidroxilação e hidrólise podem ocorrer. O diclofenaco é um fármaco bastante polar e seus produtos de degradação apresentam ainda maior polaridade. Quanto maior a polaridade de uma molécula, mais termolábil ela se torna, prejudicando sua análise por GC-MS. Este fato pode ter impedido a identificação de produtos de fotólise no controle e de biodegradação nos testes. Outra hipótese seria a mineralização deste fármaco pela cianobactéria. Amostras do frasco teste foram analisadas por injeção direta, nos modos positivo e negativo, no espectrômetro de massas com ionização por *electrospray*, mas nenhum produto de degradação foi encontrado, indicando uma possível mineralização deste fármaco.

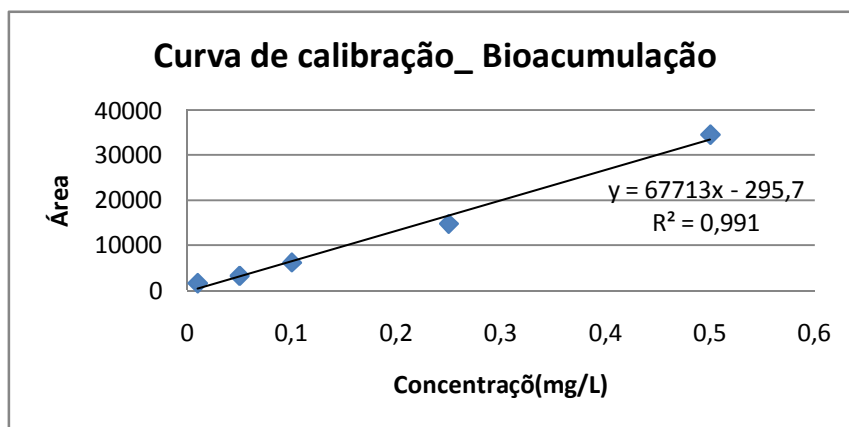
No entanto, fica claro o papel da cianobactéria na remoção do diclofenaco do meio. A remoção por via biológica pode ser estimada pela diferença entre a porcentagem de degradação do teste e do controle. Portanto, a remoção deste fármaco pela cianobactéria nos níveis 1, 2 e 3 foi, respectivamente, cerca de 33%, 48% e 67%.

No menor nível de concentração observou-se a maior remoção, Este resultado é bastante significativo quando comparado com estudos que quantificaram este fármaco antes e após o tratamento de esgoto convencional. Em tais condições observou-se uma taxa de remoção de 17 a 25%. Vale ressaltar que os processos oxidativos apresentam eficiência de remoção da ordem de 90%; no entanto, esta é uma alternativa onerosa para aplicação em larga escala [18].

#### **4.2.2.2. Bioacumulação**

Na análise do conteúdo intracelular da cianobactéria durante o ensaio do diclofenaco, as células foram lisadas como descrito no Item 4.3.2.3 e, em seguida, seu conteúdo intracelular foi analisado por GC-MS.

A curva de calibração para a quantificação destas amostras está representada na Figura 35. Os limites de detecção e quantificação calculados foram 1,27 µg/L e 5,49 µg/L, respectivamente. Os dados referentes a construção desta curva está disposto na Tabela 23.



**Figura 35. Curva de calibração do diclofenaco utilizada para o cálculo da fração bioacumulada.**

**Tabela 23. Dados utilizados para a construção da curva de calibração representada na Figura 17.**

Pontos	Área (média)	S.D(%)
0,50	34552	2,82
0,25	14716	7,74
0,10	6151	22,64
0,05	3169	5,00
0,01	1551	7,02

\* S.D (%): desvio relativo

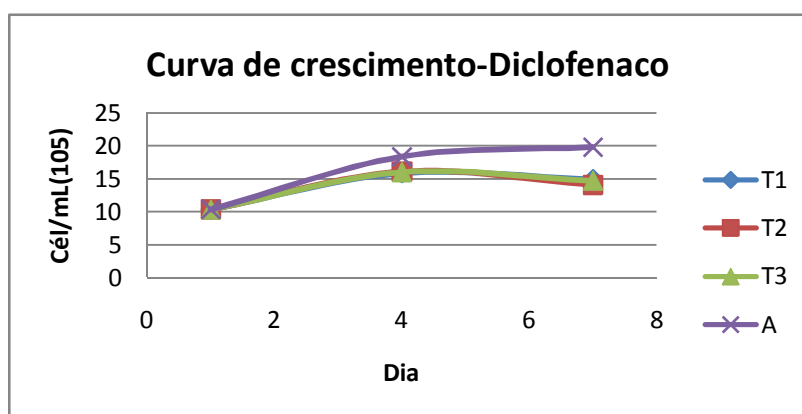
No entanto, o diclofenaco não foi encontrado no conteúdo intracelular e sua concentração está abaixo do limite de detecção calculado. A espécie *M. novacekii* não foi capaz de bioacumular o diclofenaco e isto se deve, provavelmente, ao pequeno valor de log Kow (1,09) para este fármaco, o que demonstra sua elevada polaridade. Poluentes muito polares (log Kow < 2), não são encontrados no interior das células de microorganismos, pois a bioacumulação ocorre geralmente nos vacúolos lipídicos .[89]

Este resultado reforça a hipótese de que o diclofenaco foi biotransformado em outros produtos ou pode ter sido mineralizado.

### 4.2.3 Curva de Crescimento

Durante o ensaio, o crescimento da espécie foi monitorado pela leitura das amostras dos frascos-teste e dos frascos-controle de crescimento, a 680 nm. A conversão desta leitura em células ( $10^5/\text{mL}$ ) foi realizada por interpolação da curva ( $y=31,56x+2,101$ ,  $R^2= 0,996$ ), que descreve a correlação linear entre estes dados.

O crescimento dos frascos testes (T1, T2, T3), foi comparado com o crescimento dos frascos controle (A) para avaliar a viabilidade biológica da *Microcystis novacekii* durante o ensaio. (Figura 36)



**Figura 36. Curva de crescimento da *M.novacekii* nos frascos-teste e controle.**

A razão do crescimento dos testes e controle foi comparada com 95% de confiança utilizando o teste t de student para variâncias equivalentes (Tabela 24).

**Tabela 24. Razão do crescimento da *M.novacekii* nos dias 4 e 7 do ensaio.**

	Dia 4 ( $d^{-1}$ )	Dia 7 ( $d^{-1}$ )
Teste_nível1	$1,85 \pm 0,24^{(a)}$	$0,28 \pm 0,60^{(b)}$
Teste_nível2	$1,91 \pm 0,13^{(a)}$	$0,58 \pm 0,37^{(b)}$
Teste_nível3	$1,87 \pm 0,06^{(a)}$	$0,24 \pm 0,51^{(b)}$
Controle_alga	$1,93 \pm 0,06^{(a)}$	$0,32 \pm 0,24^{(b)}$

\*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais.

Durante todo o ensaio os frascos-teste apresentaram uma razão de crescimento igual a dos frascos-controle, com significância de 95%. Estes resultados demonstram o potencial adaptativo da espécie estudada, pois a presença do diclofenaco não inibiu o crescimento da espécie.

Nos frascos-teste a cianobactéria removeu cerca de 33% no nível 1, 48% no nível 2 e 67% no nível 3 do fármaco. A remoção foi mais eficiente no menor nível de concentração; no entanto, uma menor remoção nas concentrações mais elevadas não pode ser atribuída a uma possível toxicidade, já que o crescimento das cianobactérias nos frascos-teste foi estatisticamente igual aos frascos-controle. Uma possível explicação para este comportamento é que o mecanismo de detoxificação de xenobióticos pela espécie se dê via Citocromo P450. (CYT-P450)

A viabilidade enzimática do CYT-P450, depende do potencial redutor (NADPH) gerado na fotossíntese. Geralmente, substâncias tóxicas para as cianobactérias inibem o sistema fotossintético e inibem seu crescimento. Portanto, a resistência celular frente à xenobióticos facilita sua biodegradação enzimática. Basicamente, o NADPH gerado na fotossíntese é fundamental nas reações de transferência de elétrons e ativação do oxigênio molecular para oxidação de xenobióticos.

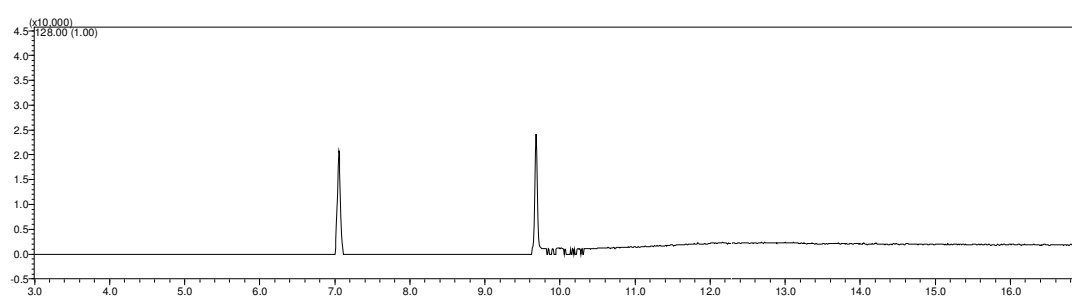
Como durante o ensaio o diclofenaco não apresentou toxicidade para a espécie, sugere-se que o potencial redutor gerado pela fotossíntese foi mantido, viabilizando a atividade enzimática da espécie. Apesar disso, maiores concentrações do diclofenaco podem ter saturado as enzimas do CYT-P450, que geralmente possuem uma concentração ótima de substrato para seu funcionamento. [63]

A significativa remoção do diclofenaco nos frascos-teste, e a não detecção deste fármaco no conteúdo intracelular, são evidências que reforçam a hipótese de que a espécie estudada foi capaz de degradar o diclofenaco em metabólitos ou levar a uma possível mineralização. Se o mecanismo de remoção foi a biodegradação, e não a mineralização, os metabólitos gerados também não apresentaram toxicidade para a espécie. O tratamento de efluente ideal seria aquele que não gerasse metabólitos mais tóxicos para o ambiente do que o composto original.

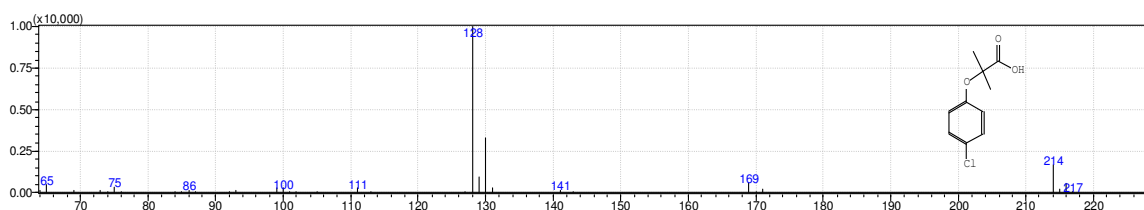
#### 4.2.3. Ensaio de biodegradação/bioacumulação do ácido clofíbrico.

##### 4.2.3.1. Biodegradação

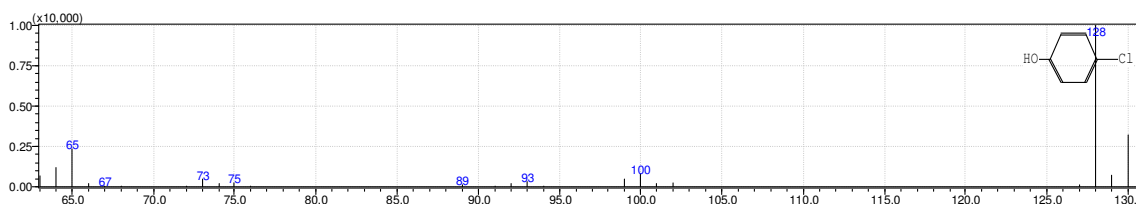
A injeção de uma solução padrão de ácido clofíbrico resulta no aparecimento de dois picos. No tempo de retenção de 7,12 minutos observa-se o ácido clofíbrico e, no tempo de retenção de 9,63 minutos, seu produto de hidrólise, o p-clorofenol (Figura 29). As estruturas foram confirmadas comparando-se com os espectros da biblioteca NIST presente no software do equipamento (Figura 38 e Figura 39).



**Figura 37. Cromatograma obtido a partir da injeção de uma solução padrão de ácido clofíbrico.**



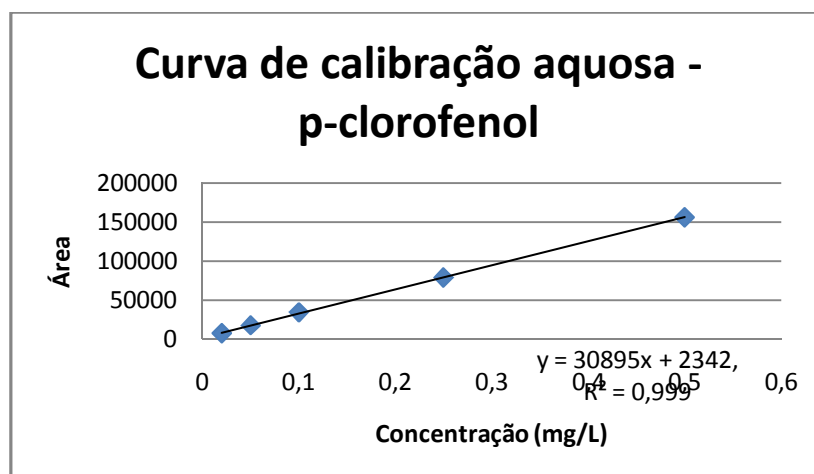
**Figura 38. Espectro de massas do ácido clofíbrico.**



**Figura 39. Espectro de massas do *p*-clorofenol.**

A hidrólise do ácido clofíbrico em *p*-clorofenol ocorre devido às condições instrumentais do GC-MS. O *p*-clorofenol foi escolhido para o monitoramento durante o ensaio devido a sua maior resposta instrumental. Além disso, em amostras com concentração abaixo de 1,00 mg/L, o pico referente ao ácido clofíbrico não aparece nos cromatogramas.

As amostras de biodegradação foram quantificadas pela curva aquosa do ácido clofíbrico, mas somente a área referente ao *p*-clorofenol foi integrada nas soluções padrão. (Figura 40)



**Figura 40. Curva de calibração aquosa para o *p*-clorofenol.**

Foram testados três níveis de concentração do ácido clofíbrico, aproximadamente 1,20 mg/L, 1,00 mg/L e 0,80 mg/L, níveis 1, 2 e 3, respectivamente. As amostras dos frascos-teste e dos frascos-controle (degradação espontânea) foram coletadas nos dias 1, 4, 7 e analisadas por injeção direta da solução aquosa no GC-MS. (Tabela 25)

**Tabela 25. Concentração do ácido clofíbrico no meio extracelular durante o ensaio.**

	Concentração do ácido clofíbrico (mg/L)			% Redução	
	Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 4	Dia 7
<b>Frasco-Teste 1</b>	1,216±0,086 <sup>(a)</sup>	1,205±0,073 <sup>(b)</sup>	1,141±0,123 <sup>(c)</sup>	0,2	5,6
<b>Frasco-Controle 1</b>	1,272±0,102 <sup>(a)</sup>	1,284±0,086 <sup>(b)</sup>	1,252±0,106 <sup>(c)</sup>	0,9	1,6
<b>Nível 2</b>					
<b>Frasco-Teste 2</b>	1,070±0,032 <sup>(a)</sup>	1,072±0,090 <sup>(b)</sup>	1,004±0,044 <sup>(c)</sup>	0,2	6,0
<b>Frascos-Controle 2</b>	1,103±0,043 <sup>(a)</sup>	1,063±0,076 <sup>(b)</sup>	1,010±0,035 <sup>(c)</sup>	3,8	8,2
<b>Nível 3</b>					
<b>Frasco-Teste 3</b>	0,814±0,088 <sup>(a)</sup>	0,800±0,077 <sup>(b)</sup>	0,754±0,067 <sup>(c)</sup>	2,1	7,8
<b>Frascos-Controle 3</b>	0,820±0,022 <sup>(a)</sup>	0,752±0,056 <sup>(b)</sup>	0,785±0,033 <sup>(c)</sup>	9,3	4,7

\*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais, para cada nível de concentração.

Para todos os níveis de concentração testados, as concentrações dos frascos teste e controle foram estatisticamente iguais a 95% de confiança, em todos os dias do ensaio, este resultado demonstra que não houve degradação biológica, pois a taxa de degradação espontânea (frascos controle) foi semelhante à taxa de degradação nos frascos teste. Pode-se concluir também que as taxas de degradação espontânea deste fármaco foram baixas, a maior taxa de remoção encontrada foi de 9,2%. Possíveis produtos de degradação espontânea foram pesquisados em todos os frascos, mas também não foram encontrados, possivelmente devido à sua baixa concentração no meio extracelular.

A estabilidade química deste fármaco foi descrita na literatura, pois foi encontrado inalterado na faixa de concentração de ng/L a µg/L em diversas estações de tratamento de esgoto e de água potável da Europa. [17, 35]

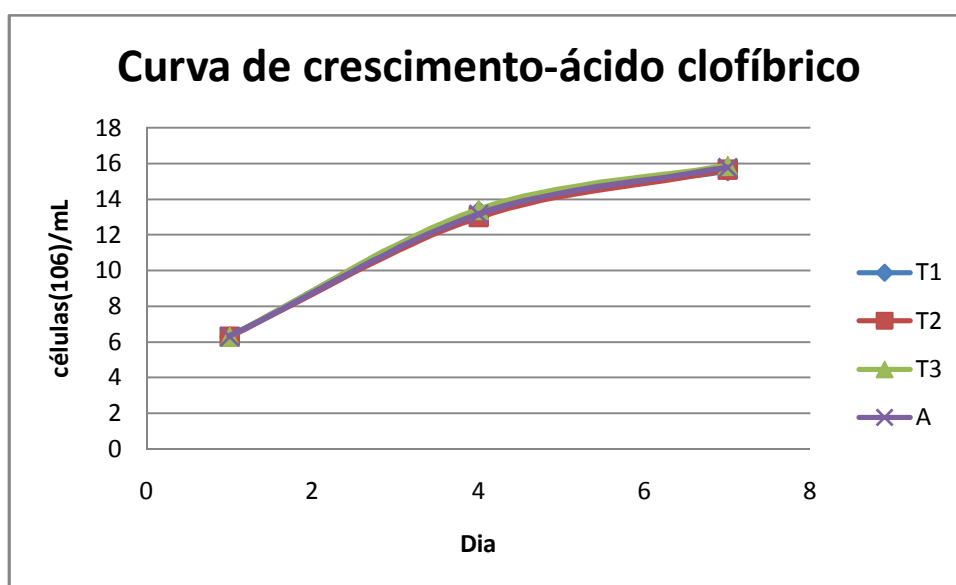
#### **4.2.3.2. Bioacumulação**

As amostras de bioacumulação foram analisadas por GC-MS, mas como esperado, o fármaco inalterado não foi bioacumulado no interior da célula da cianobacteria. O ácido clofíbrico apresenta log kow = 2.88, [99] e possui moderada

lipossolubilidade, mas não foi bioacumulado. Possíveis produtos de degradação espontânea foram pesquisados e não foram encontrados.

#### 4.2.3.3. Curva de crescimento

A densidade celular (células/mL) foi determinada pela absorbância da cultura a 680nm, nos dias 1, 4 e 7. O crescimento nos frascos-teste nível 1 (T1), nível 2 (T2) e nível 3 (T3), foi semelhantes ao crescimento nos frascos controle (A) (Figura 41).



**Figura 41. Curva de crescimento para o ácido clofíbrico durante o ensaio.**

Como o crescimento dos frascos teste (com ácido clofíbrico) e controle (sem ácido clofíbrico) foram semelhantes, pode-se concluir que este fármaco não exerceu toxicidade para a espécie.

As taxas de crescimento dos frascos teste e controle foram então calculados e demonstraram ser estatisticamente iguais a 95% de confiança (Tabela 26). Resultado que demonstra grande potencial adaptativo da espécie estudada frente a concentrações consideradas elevadas do fármaco estudado.

**Tabela 26. Razão de crescimento por dia de ensaio (d<sup>-1</sup>) até o quarto e sétimo dia de ensaio.**

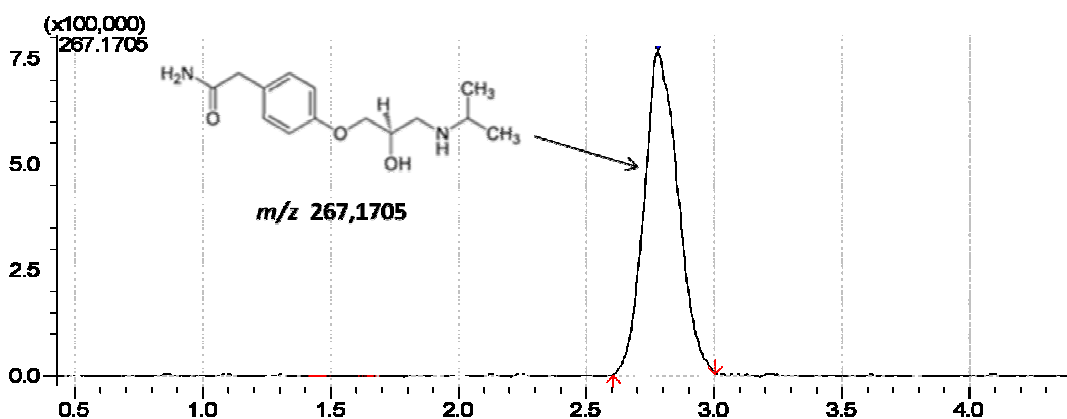
	Dia 4(d <sup>-1</sup> )	Dia 7(d <sup>-1</sup> )
T1 (teste nível 1)	0,68±0,05 <sup>(a)</sup>	0,14±0,03 <sup>(b)</sup>
T2 (teste nível 1)	0,66±0,04 <sup>(a)</sup>	0,17±0,03 <sup>(b)</sup>
T3 (teste nível 1)	0,69±0,07 <sup>(a)</sup>	0,15±0,06 <sup>(b)</sup>
A (controle alga)	0,67±0,04 <sup>(a)</sup>	0,16±0,04 <sup>(b)</sup>

\*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais.

#### 4.2.4. Atenolol

##### 4.2.4.1. Biodegradação

As amostras de biodegradação do ensaio do atenolol foram feitas por HPLC-ESI-MS (Shimadzu). A injeção de uma solução padrão aquosa na concentração de 1,00 mg/L de atenolol resultou no aparecimento de um pico no tempo de retenção de 2,70 minutos. (Figura 42)



**Figura 42. Cromatograma de uma solução padrão de atenolol obtido no modo positivo de ionização ( [M+H]<sup>+</sup>=267, 170).**

As análises foram realizadas no modo positivo e sua estrutura química confirmada pela alta resolução de massas  $[M+H]^+ = 267, 1705$ , com um erro de 5,24 ppm.

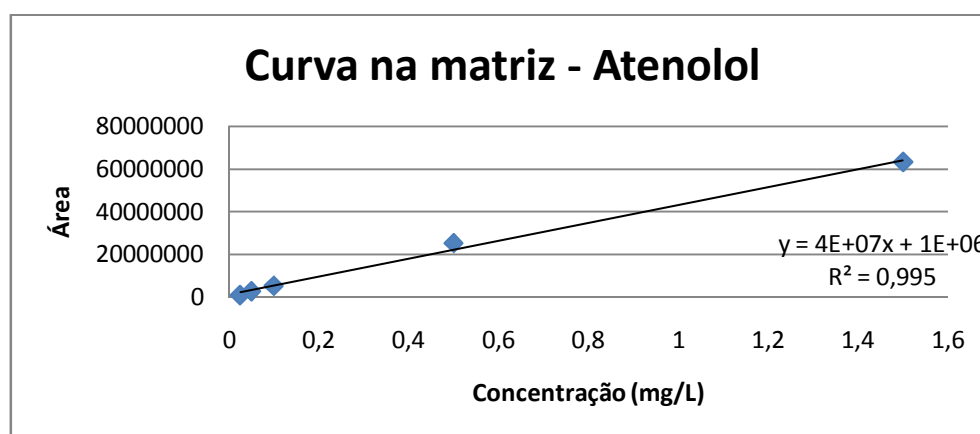
Para o monitoramento da concentração extracelular do atenolol, uma curva de calibração matrizada foi feita, o solvente utilizado foi o meio WC após 7 dias de incubação com a cianobactéria. A curva na matriz foi diretamente utilizada devido ao elevado efeito de matriz na técnica de ionização por *eletrospray* (ESI-MS). Nos últimos 10 anos, fontes de ionização à pressão atmosférica (como o *eletrospray*) têm sido freqüentemente acopladas à cromatografia líquida para análises de compostos farmacêuticos. Como são fontes de ionização branda não geram fragmentos, e sim a formação da molécula protonada ou desprotonada. Os efeitos de supressão ou melhoria do sinal do analito em matrizes complexas têm sido amplamente relatados na literatura [100, 101]. Este fenômeno indesejável, denominado efeito de matriz, pode comprometer a análise quantitativa se não for minimizado. Alguns mecanismos determinam o efeito de matriz em ESI-MS. A maioria deles pode ser controlada de modo que as análises sejam reprodutíveis de amostra para amostra, quando é possível construir a curva de calibração com os componentes da matriz. Neste caso, a sensibilidade pode ser afetada, mas não as habilidades quantitativas da técnica.

Os fatores controlados pela curva na matriz e que interferem no processo de ionização são o pH da solução e a concentração de eletrólitos. Esses fatores podem interferir na passagem do analito de interesse para a fase gasosa. À medida que o solvente do *spray* é evaporado, as gotas ficam carregadas e os analitos competem entre si para serem expulsos para a fase gasosa. Uma vez na fase gasosa, o analito de interesse pode se apresentar na forma carregada, neutra ou

junto com moléculas do solvente carregadas, chamadas *clusters*. A carga do analito pode ser perdida em fase gasosa através de reações de neutralização e de transferência de carga com outros componentes da matriz.

Nesta perspectiva, a curva na matriz foi utilizada em todas as análises feitas por HPLC-ESI-MS, evitando o efeito de matriz [102] no processo de ionização do analito de interesse.

A curva na matriz foi preparada adicionando quantidades apropriadas do padrão atenolol ao meio de cultura WC após 7 dias de incubação com a cianobactéria. Os limites de detecção e de quantificação calculados foram de 28,12 ng/L e 90,34 ng/L, respectivamente. (Figura 43)



**Figura 43. Curva na matriz para o atenolol.**

As concentrações testadas para o atenolol nos ensaios com a cianobactéria foram, aproximadamente, 0,60 mg/L, 0,15 mg/L, 0,10 mg/L. O ensaio foi realizado em triplicata para cada nível de concentração e a média das áreas foi interpolada na curva de calibração, obtendo-se as concentrações do fármaco no meio extracelular.

Na Tabela 27, observa-se que a concentração nos frascos teste e controle se mantiveram constantes durante todo o ensaio. As médias das concentrações obtidas nos testes e controles foram estatisticamente comparadas, em cada dia de

ensaio, utilizando o teste t. As concentrações dos testes e controle foram estatisticamente idênticas, não havendo degradação biológica (testes inalterados) ou fotolítica (controles inalterados).

**Tabela 27. Concentração extracelular do atenolol durante o ensaio.**

	Concentração			% Remoção		
	Nível_1 (mg/L)	Nível_2 (mg/L)	Nível_3 (mg/L)	Nível_1 (mg/L)	Nível_2 (mg/L)	Nível_3 (mg/L)
<b>Dia 1</b>						
Teste	0,605 <sup>(a)</sup> ±0,055	0,168 <sup>(b)</sup> ±0,002	0,100 <sup>(c)</sup> ±0,005			
Controle	0,568 <sup>(a)</sup> ±0,008	0,171 <sup>(b)</sup> ±0,008	0,107 <sup>(c)</sup> ±0,002			
<b>Dia 4</b>						
Teste	0,627 <sup>(a)</sup> ±0,008	0,143 <sup>(b)</sup> ±0,061	0,115 <sup>(c)</sup> ±0,004	103,5	85,5	114,9
Controle	0,603 <sup>(a)</sup> ±0,013	0,181 <sup>(b)</sup> ±0,003	0,110 <sup>(c)</sup> ±0,003	106,2	105,8	103,4
<b>Dia 7</b>						
Teste	0,655 <sup>(a)</sup> ±0,022	0,196 <sup>(b)</sup> ±0,012	0,127 <sup>(c)</sup> ±0,011	104,5	136,9	110,3
Controle	0,650 <sup>(a)</sup> ±0,011	0,204 <sup>(b)</sup> ±0,008	0,125 <sup>(c)</sup> 0,004	107,6	112,5	113,5

\*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais, para cada nível de concentração.

Este resultado é corroborado com a literatura, que demonstra a dificuldade de degradação deste fármaco devido sua elevada persistência no meio ambiente, sendo freqüentemente encontrado em águas subterrâneas e superficiais. Além disso, são encontrados na faixa de ng/L, mesmo após tratamento nas estações de tratamento de esgoto [45].

A cianobactéria não exerceu nenhuma influência na concentração do atenolol do meio extracelular. Mesmo a concentração do atenolol se mantendo constante procedeu-se as análises das amostras provenientes da lise celular para confirmar a ausência deste fármaco no meio intracelular.

#### 4.2.4.2. Bioacumulação

As amostras provenientes da lise celular foram injetadas por injeção direta no espectrômetro de massas e as análises executadas no modo “single íon” (modo SIM), onde somente a razão massa/ carga do atenolol ( $m/z$  267,17) foi pesquisada. No entanto, tal íon não foi encontrado nas amostras analisadas.

Este resultado já era previsto, já que a concentração do atenolol nos frascos-teste e controle se manteve constante durante todo ensaio. Além disso, o coeficiente de partição octanol/água deste fármaco,  $\log K_{ow} = 0,16$ , demonstra sua baixa capacidade de bioacumulação no interior da cianobactéria, devido sua baixa lipossolubilidade.

#### 4.2.4.3. Curva de crescimento

O crescimento da espécie foi monitorado nos dias 1, 4 e 7 do ensaio de biodegradação. Os resultados demonstram que o atenolol exerceu toxicidade para a espécie estudada, já que o crescimento do frasco controle (A) foi maior do que o crescimento monitorado nos frascos- teste (T1, T2 e T3). (Figura 44)

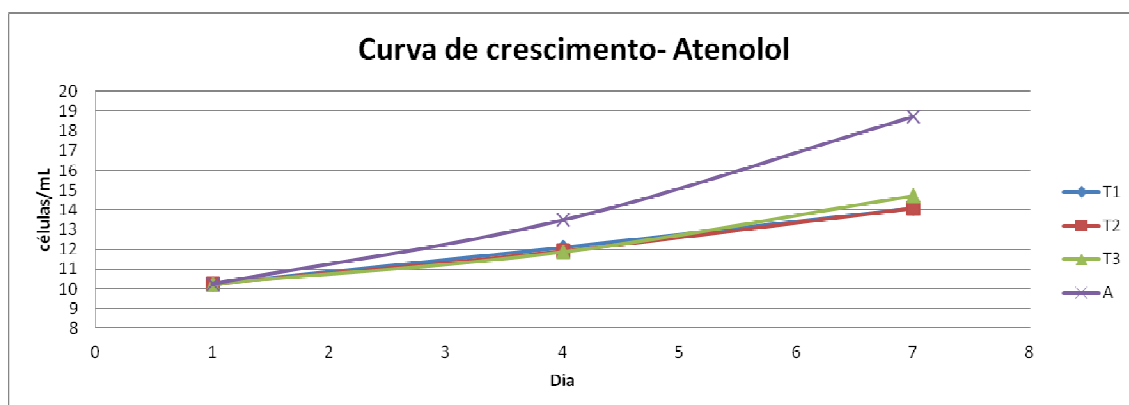


Figura 44. Curva de crescimento durante o ensaio de biodegradação do atenolol.

As médias das razões dos crescimentos foram testadas para os dias 4 e 7. Os resultados demonstraram que até o dia 4, o crescimento nos frascos-teste foi estatisticamente diferente do crescimento nos frascos-controle. O crescimento nos frascos-teste foi inferior ao crescimento nos controles, os quais apresentaram uma multiplicação celular de  $0.25 \times 10^6$  células/mL de cultura, indicando inibição do crescimento. (Tabela 28)

**Tabela 28. Razão do crescimento por dia ( $d^{-1}$ ) dos dias 4 e 7.**

	Dia 4 (d-1)	Dia 7 (d-1)
T1 (teste-nível 1)	$0,15 \pm 0,08^{(a)}$	$0,14 \pm 0,09^{(a)}$
T2 (teste-nível 2)	$0,14 \pm 0,06^{(a)}$	$0,15 \pm 0,05^{(a)}$
T3 (teste-nível 3)	$0,13 \pm 0,10^{(a)}$	$0,20 \pm 0,02^{(b)}$
A (controle-alga)	$0,25 \pm 0,04^{(b)}$	$0,30 \pm 0,04^{(c)}$

\*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais, para cada dia testado.

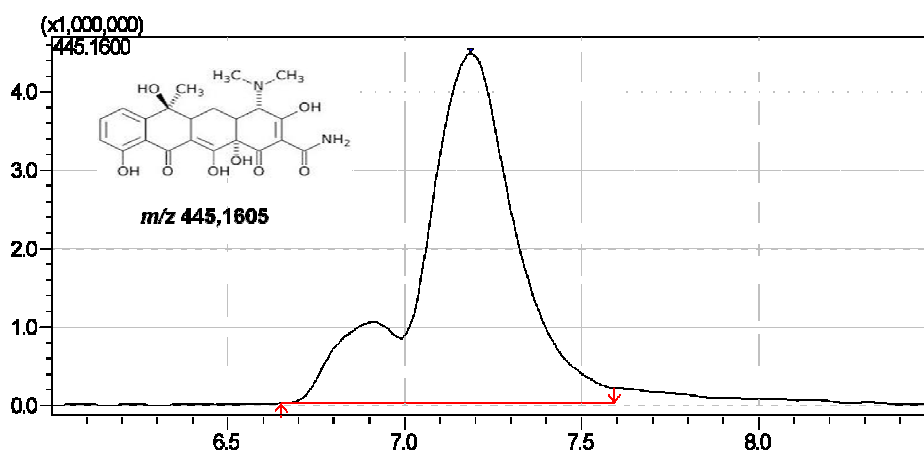
No 7º dia, as duas maiores concentrações do frasco teste (T1 e T2), mantiveram a razão do crescimento. No entanto em T3 houve uma recuperação do crescimento, mas que ainda foi estatisticamente diferente da razão do crescimento dos frascos-controle, de  $0,30 \times 10^6$  células/mL de cultura.

Este resultado indica que o atenolol exerceu toxicidade dependente de concentração para a *M.novacekii*, inibindo o crescimento, mas não causando a mortalidade da espécie. A possível redução de células vivas de cianobactérias inviabilizaria o uso destas como agentes de biorremediação de efluentes contaminados por fármacos. Estudos demonstram que mesmo substâncias com baixo potencial de bioacumulação, como é o caso do atenolol, podem exercer toxicidade para várias espécies de cianobactérias [82-84].

## 4.2.5. Tetraciclina

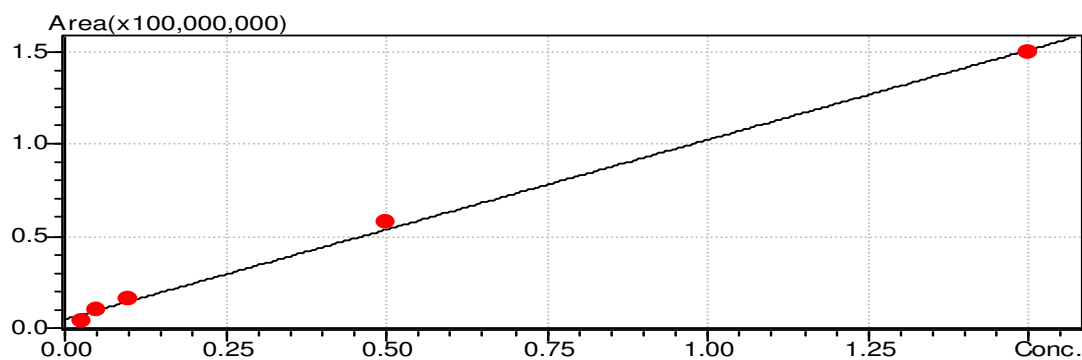
### 4.2.5.1. Biodegradação

As condições cromatográficas para a análise da tetraciclina foram otimizadas com uma solução padrão aquosa de 1,00 mg/L, utilizando a técnica de HPLC-ESI-MS (Shimadzu). A tetraciclina foi monitorada no modo positivo ( $m/z$  445,1605), com um erro de 5,62 ppm e apresentou tempo de retenção de 7,20 minutos



**Figura 45. Cromatograma obtido a partir de uma solução padrão de tetraciclina por HPLC-ESI-MS.**

Uma curva de calibração matrizada foi construída adicionando quantidades apropriadas do padrão de tetraciclina ao meio WC filtrado após 7 dias de incubação com a cianobactéria. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 89 ng/L e 127 ng/L(Figura 46)



**Figura 46. Curva de calibração na matriz para a tetraciclina ( $R^2=0.9981$ ).**

As concentrações testadas da tetraciclina no ensaio de biodegradação foram, aproximadamente, 1,45 mg/L, 0,65 mg/L e 0,15 mg/L, concentrações medidas no primeiro dia de ensaio (Tabela 29). Amostras de biodegradação dos frascos-teste e dos frascos-controle foram coletadas nos dias 1, 4, 7. O ensaio foi realizado em triplicata para cada nível de concentração e a média das áreas foi interpolada na curva de calibração, obtendo-se as concentrações da tetraciclina no meio extracelular.

**Tabela 29. Concentração extracelular da tetraciclina durante o ensaio de biodegradação.**

	Concentração			Remoção(%)		
	Nível_1 (mg/L)	Nível_2 (mg/L)	Nível_3 (mg/L)	Nível_1 (mg/L)	Nível_2 (mg/L)	Nível_3 (mg/L)
Dia 1						
Teste	1,455 <sup>(a)</sup> ±0,040	0,614 <sup>(a)</sup> ±0,042	0,163 <sup>(a)</sup> ±0,071	-	-	-
Controle	1,462 <sup>(a)</sup> ±0,167	0,706 <sup>(a)</sup> ±0,015	0,130 <sup>(a)</sup> ±0,009	-	-	-
Dia 4						
Teste	0,652 <sup>(b)</sup> ±0,034	0,337 <sup>(b)</sup> ±0,047	0,097 <sup>(b)</sup> ±0,008	55,2	45,2	40,7
Controle	1,309 <sup>(c)</sup> ±0,044	0,65 <sup>(c)</sup> 8±0,025	0,121 <sup>(c)</sup> ±0,011	10,4	6,9	6,4
Dia 7						
Teste	0,587 <sup>(d)</sup> ±0,035	0,214 <sup>(d)</sup> ±0,055	<L.D	59,7	65,1	100
Controle	1,194 <sup>(e)</sup> ±0,030	0,623 <sup>(e)</sup> ±0,027	0,114±0,009	18,3	11,8	12,1

\* As médias dos testes e controles foram comparadas estatisticamente (teste t) por dia de ensaio. Letras iguais indicam médias iguais a 95% de confiança, para cada nível testado

As concentrações dos testes e controles foram estatisticamente idênticas a 95% de confiança no tempo inicial do ensaio. No quarto dia de ensaio, estas médias passam a divergir; observou-se uma degradação que variou de 40,7% (nível 3) a 55,2% (nível 1) nos frascos-teste. Tais taxas de remoção foram muito superiores às taxas encontradas nos frascos-controle, que variaram de 6,4% (nível 1) a 10,4% (nível 2), indicando que a degradação biológica (frascos-teste) foi significativa quando comparada com a degradação espontânea (frascos-controle) da tetraciclina. A partir do quarto dia, houve um aumento na taxa de degradação biológica no menor nível de concentração (nível 3), o qual atingiu 100% de remoção no dia 7. No nível 1 houve um pequeno aumento na taxa de remoção no

frasco teste, que foi de 55,2% (dia 4) a 59,7% (dia 7). Já para o nível 2, houve um aumento mais significativo de 45,2% (dia 4) a 65,1% (dia 7). Estes resultados demonstram que a eficiência da remoção da tetraciclina do meio extracelular foi dependente da concentração. Fato que indica uma possível toxicidade do fármaco para a espécie, a qual será avaliada na curva de crescimento durante o ensaio, como apresentado a seguir.

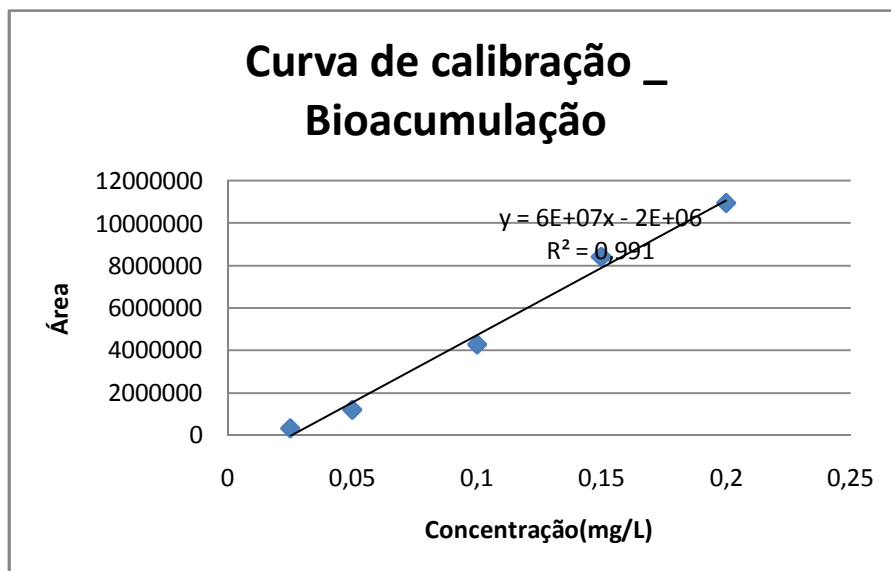
Os dados demonstraram que a cianobactéria, (degradação biológica) foi responsável pela remoção da tetraciclina do meio extracelular, pois as taxas de degradação espontânea nos frascos-controle variaram de 11,8% a 18,3%, taxas inferiores quando comparadas com as taxas de remoção dos frascos-teste.

Durante o ensaio foi monitorado o aparecimento de novos picos na tentativa de se identificar metabólitos de biodegradação; no entanto, somente a redução do pico referente à tetraciclina foi observada. As amostras de biodegradação também foram analisadas por injeção direta (modo positivo e negativo) no espectrômetro de massas na tentativa de se observar o surgimento de um íon referente a algum metabólito, no entanto, novamente não foram encontrados produtos de biodegradação. Deste modo, a etapa seguinte foi determinar se a tetraciclina foi bioacumulada no interior das células da cianobactéria.

#### **4.2.5.2. Bioacumulação**

As amostras de bioacumulação foram analisadas por injeção direta no espectrômetro de massas, no modo positivo. Nestas análises, a tetraciclina foi encontrada em todos os frascos-teste de todos os níveis de concentração testados, indicando que houve bioacumulação no interior da cianobactéria. Detectada a presença do fármaco no meio intracelular, procedeu-se a construção de uma curva de calibração para sua quantificação.

A curva de calibração foi construída adicionando quantidades apropriadas do padrão de tetraciclina ao solvente metanol (grau HPLC), e os resultados demonstrados na Figura 47.



**Figura 47. Curva de calibração para quantificação da tetraciclina intracelular.**

A área do pico cromatográfico da tetraciclina foi quantificada pela curva de calibração e sua concentração foi corrigida usando um fator de correção de 25 vezes, devido a uma pré-concentração da amostra (procedimento descrito no item 3.3.2.3). (Tabela 30)

**Tabela 30. Concentração intracelular corrigida. (F.C- fator de correção=25)**

Amostras	Concentração (mg/L)	F.C	Concentração corrigida (mg/L)
T1	0,1421	25	0,0057
T2	0,0932	25	0,0037
T3	0,0423	25	0,0017

Estes resultados demonstram que parte da tetraciclina foi bioacumulada no interior das células. Esta bioacumulação pode ser justificada pela moderada lipossolubilidade da tetraciclina, que possui um log Kow=2,2 e por isso pode ser bioacumulado por microorganismos. [103]

Para avaliar a quantidade de matéria inicial acumulada no interior das células da cianobactéria foi realizado um balanço de massas no último dia de ensaio. (Tabela 31)

**Tabela 31. Balanço de massas da tetraciclina no dia 7.**

Dia 7	Teste-nível1	Teste-nível2	Teste-nível 3
Quantidade de matéria total	0,0145	0,0061	0,0016315
Quantidade de matéria extracelular	0,0070	0,0026	0,0000
Quantidade de matéria intracelular	0,0000284	0,0000186	0,00000846
Soma	0,0071	0,0026	0,0000
% conteúdo extracelular	48,39	41,90	0,01
% conteúdo intracelular	0,20	0,30	0,52
% não encontrada	51,41	57,80	99,47

No último dia de ensaio, somente 0,2 a 0,5 % da tetraciclina foi encontrada no interior das células, nos níveis de concentração testados. A maior parte da tetraciclina não foi encontrada; assim no maior nível de concentração 51,4% da tetraciclina, e no menor nível de concentração testado aproximadamente 100% da tetraciclina não foi localizada pelo balanço de massas.

As amostras de bioacumulação foram então analisadas por injeção direta no espectrômetro de massas, nos modos positivo e negativo, mas não foi possível detectar a presença de nenhum metabólito intracelular.

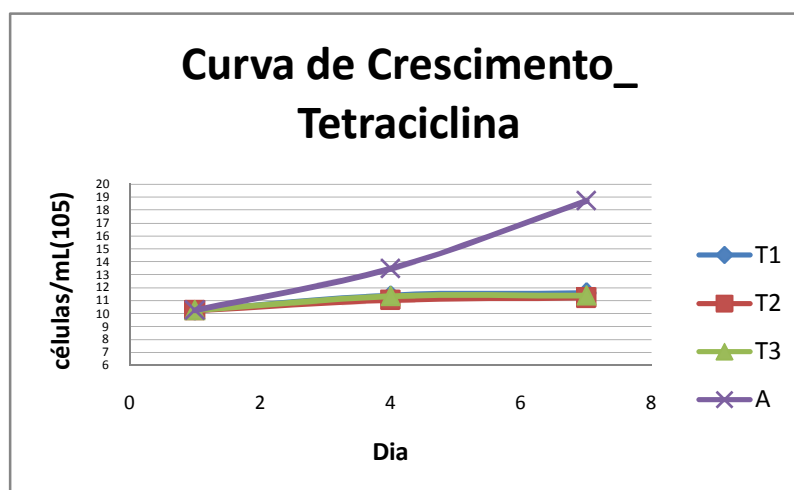
Após uma exaustiva procura de metabólitos em sucessivas repetições deste ensaio, pode-se atribuir a redução da concentração da tetraciclina no meio extracelular a uma possível mineralização. Para tratamento de efluentes este seria o melhor resultado, visto que os metabólitos formados em processos de tratamento podem ser mais tóxicos que o composto original. [50, 104]

Alguns autores sugerem que a bioacumulação pode ser a primeira etapa para a biodegradação de compostos orgânicos por cianobactérias. A biotransformação dos compostos orgânicos ocorre via enzimas do citocromo P450

presentes no citoplasma das cianobactérias. Estas enzimas oxidam os compostos orgânicos e energia na forma de ATP (trifosfato de adenosina) é liberada para o metabolismo da célula. Se o composto orgânico for oxidado completamente a gás carbônico e água, ocorre então a mineralização do contaminante. [46, 63]

#### 4.2.5.3. Curva de crescimento

A viabilidade do uso da espécie estudada foi avaliada pelo crescimento da espécie durante o ensaio. O crescimento nos frascos-teste nível 1 (T1), nível 2 (T2) e nível 3 (T3), foi inferior ao crescimento nos frascos controle (A), indicando que a tetraciclina exerceu toxicidade para a espécie (Figura 48).



**Figura 48. Curva de crescimento durante o ensaio da tetraciclina.**

Para avaliar se houve mortalidade da espécie, calculou-se a razão de crescimento por dia, até o 4º e 7º dias de ensaio. (Tabela 32)

**Tabela 32. Razão do crescimento por dia ( $d^{-1}$ ) até os dias 4 e 7.**

	Dia 4 ( $d^{-1}$ )	Dia 7 ( $d^{-1}$ )
T1 (teste-nível 1)	0,098±0,020 <sup>(a)</sup>	0,013±0,003 <sup>(a)</sup>
T2 (teste-nível 2)	0,098±0,013 <sup>(a)</sup>	0,015±0,003 <sup>(a)</sup>
T3 (teste-nível 3)	0,093±0,020 <sup>(a)</sup>	0,013±0,002 <sup>(a)</sup>
A (controle-alga)	0,250±0,090 <sup>(b)</sup>	0,300±0,120 <sup>(b)</sup>

\*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais, para cada dia testado.

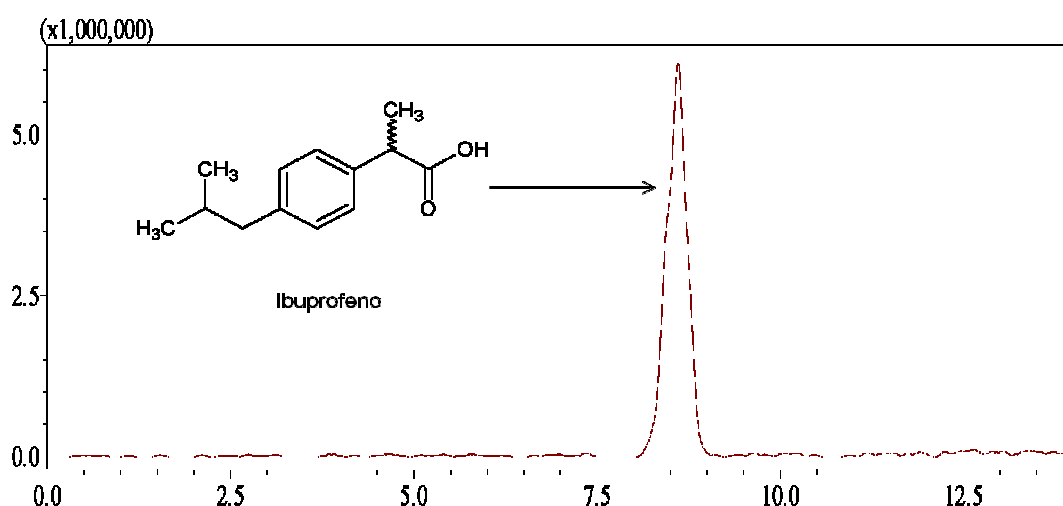
Até o quarto dia de ensaio, o frasco-controle apresentou uma taxa de crescimento de  $0,25 \times 10^6$  células/mL, valor muito superior em relação aos frascos-teste que foram de aproximadamente  $0,095 \times 10^6$  células/mL. A partir do 4º até o 7º dia, um comportamento semelhante foi observado. No entanto, um resultado positivo foi verificado; não houve morte da cianobactéria durante o ensaio. Este resultado demonstra que a espécie pode ser aplicada como agente de biodegradação, pois a morte das células seria um obstáculo para sua aplicação. Neste caso, o conteúdo intracelular poderia ser liberado e redissolver o contaminante.

#### 4.2.6. Ibuprofeno

##### 4.2.6.1. Biodegradação

As amostras de biodegradação foram analisadas por HPLC-ESI-MS; e a injeção de uma solução padrão aquosa na concentração de 1,00 mg/L de ibuprofeno resultou no aparecimento de um pico no tempo de retenção 8,6 minutos.

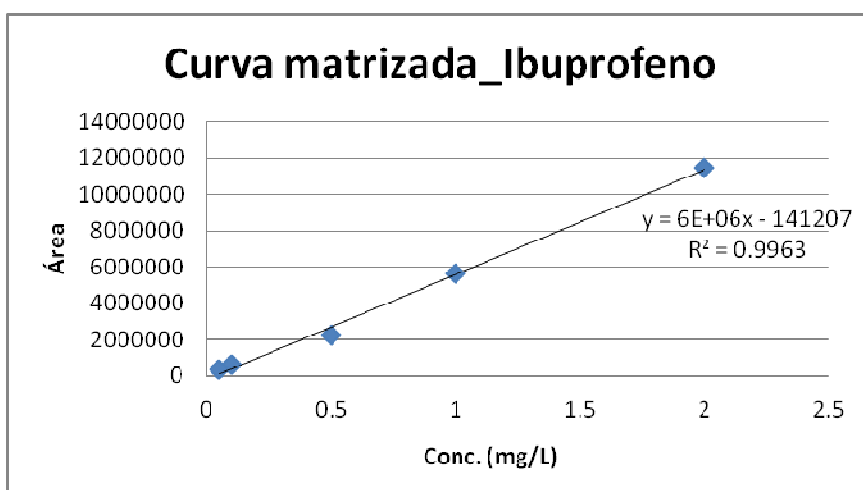
(Figura 49)



**Figura 49. Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS, de uma solução padrão de ibuprofeno.**

As análises foram realizadas no modo negativo e a estrutura química do ibuprofeno confirmada pela alta resolução de massas ( $[M-H]^- = 205,1217$ ), com erro de 7,31 ppm.

A concentração extracelular do ibuprofeno, nas amostras de biodegradação, foi determinada pela quantificação das áreas dos picos cromatográficos, pela curva de calibração matrizada (Figura 50).



**Figura 50. Curva na matriz para quantificação do ibuprofeno extracelular.**

Durante o ensaio foram testados 3 níveis de concentração para o ibuprofeno: 1,50 mg/L (nível 1), 1,00 mg/L (nível 2) e 0,55 mg/L (nível 3), a concentração encontrada no primeiro dia de ensaio, é considerada a concentração inicial do experimento. (Tabela 33). A concentração deste fármaco, nas amostras de biodegradação, foi monitorada durante o ensaio nos dias 4 e 7 e os resultados estão demonstrados na Tabela 33.

**Tabela 33. Concentração do ibuprofeno nos frascos-teste e controle durante o ensaio de biodegradação.**

Dia	Concentração			Remoção (%)		
	Nível_1 (mg/L)	Nível_2 (mg/L)	Nível_3 (mg/L)	Nível_1 (mg/L)	Nível_2 (mg/L)	Nível_3 (mg/L)
Dia 1						
Teste	1,567 <sup>(a)</sup> ±0,042	1,066 <sup>(a)</sup> ±0,011	0,557 <sup>(a)</sup> ±0,037	-	-	-
Controle	1,522 <sup>(a)</sup> ±0,068	1,048 <sup>(a)</sup> ±0,039	0,556 <sup>(a)</sup> ±0,091	-	-	-
Dia 4						
Teste	1,186 <sup>(b)</sup> ±0,030	0,761 <sup>(b)</sup> ±0,066	0,417 <sup>(b)</sup> ±0,073	24,4	28,6	27,3
Controle	1,363 <sup>(c)</sup> ±0,026	0,820 <sup>(b)</sup> ±0,070	0,405 <sup>(b)</sup> ±0,057	10,4	22,1	27,1
Dia 7						
Teste	0,459 <sup>(d)</sup> ±0,025	0,453 <sup>(d)</sup> ±0,037	0,330 <sup>(d)</sup> ±0,026	70,4	57,5	40,7
Controle	0,460 <sup>(d)</sup> ±0,062	0,565 <sup>(d)</sup> ±0,239	0,310 <sup>(d)</sup> ±0,043	68,9	46,1	44,2

\* As médias dos testes e controles foram comparadas estatisticamente (teste t) por dia de ensaio. Letras iguais indicam médias iguais a 95% de confiança, para cada nível testado

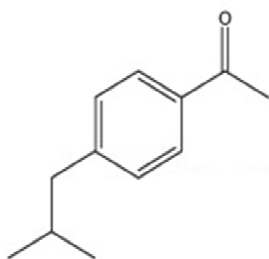
As concentrações das amostras de biodegradação dos frascos-teste e controle foram estatisticamente idênticas, no tempo inicial do ensaio, para todos os níveis de concentração testados. No 4º dia de ensaio, observou-se uma degradação significativa tanto nos frascos-teste quanto nos frascos controle. Nos níveis 2 e 3 de concentração, as taxas de remoção do ibuprofeno nos frascos-testes foram estatisticamente iguais ao frasco-controle. Portanto, a degradação biológica não foi a responsável pela remoção deste fármaco do meio, houve degradação espontânea, de aproximadamente 27% da concentração inicial. Somente no nível 1 de concentração, as médias dos frascos-teste e controle foram estatisticamente diferentes, fato que não interfere na interpretação dos dados, que apontam para intensa degradação espontânea. Apesar da eficiência de remoção do frasco teste, de 24,4%, ser superior à degradação do frasco-controle, de 10,4%, até o quarto dia de ensaio, no último dia de ensaio as taxas de remoção de todos os níveis de concentração foram estatisticamente idênticas,

Como a degradação espontânea foi significativa, tanto nos frascos-teste quanto nos frascos-controle, procedeu-se a procura de produtos de degradação de

degradação espontânea nestas amostras, por injeção direta, no espectrômetro de massas, nos modos positivo e negativo.

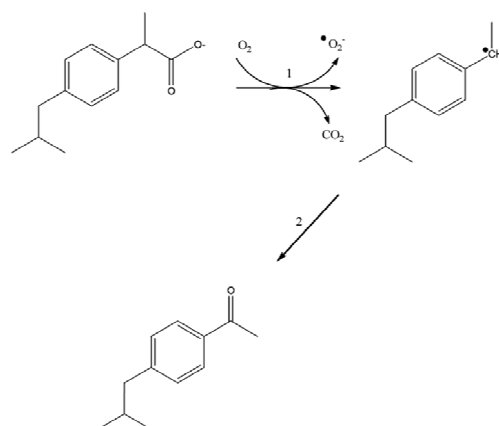
Nos níveis 2 e 3 não foi possível detectar produtos de degradação espontânea. No entanto, no nível maior de concentração testada foi encontrado um produto de degradação do ibuprofeno, já descrito na literatura [105], tanto nos frascos-teste quanto nos frascos-controle. Uma possível explicação para este fato é que, no maior nível de concentração, a concentração deste produto é maior do que nos outros níveis testados.

O produto identificado em todos os frascos do nível 1, foi a isobutilacetofenona (Figura 51), cuja estrutura química foi confirmada pela razão massa/carga, da molécula protonada ( $m/z$  177,2626), com um erro de em relação ao valor calculado pela fórmula  $C_{12}H_{17}O$  de 4,95 ppm..



**Figura 51. Estrutura química da isobutilacetofenona.**

O mecanismo de formação deste produto descrito na literatura é por via fotolítica [105]. A primeira etapa da reação (1) consiste na fotodescarboxilação, seguida da adição radicalar no carbono secundário pelo oxigênio. A próxima etapa (2) é um rearranjo para formação da isobutilacetofenona. (Figura 52)



**Figura 52. Mecanismo de formação da isobutilacetofenona por fotólise descrito na referência [105].**

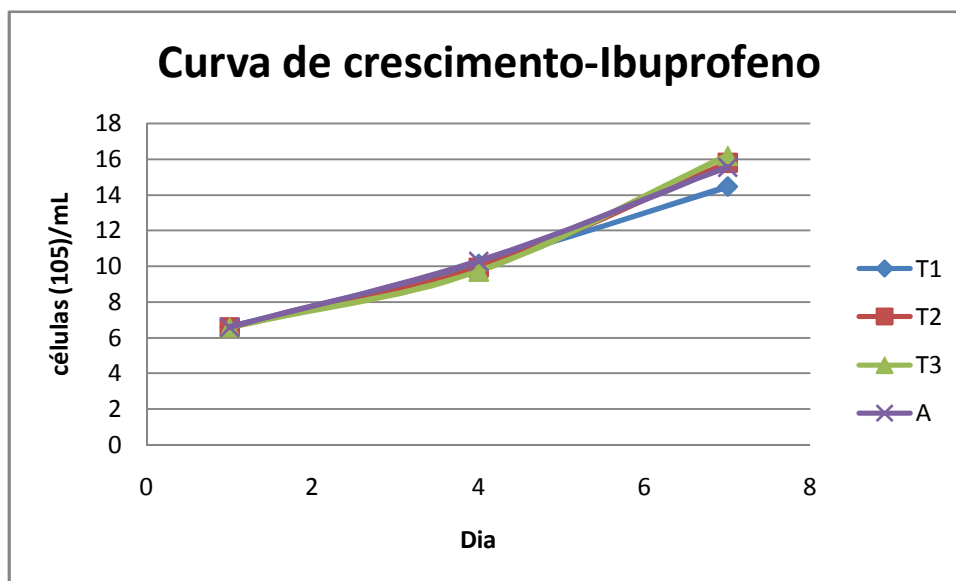
#### 4.2.6.2. Bioacumulação

Para o ibuprofeno o log Kow é 3,48, indica uma elevada lipossolubilidade [106]. O resultado esperado, portanto, seria a bioacumulação no interior da célula da cianobactéria. No entanto, não houve bioacumulação, ou seja, o ibuprofeno e nem possíveis produtos de degradação espontânea foram detectados nas amostras de bioacumulação.

Este resultado indica que o coeficiente de partição octanol/água não é o único fator que interfere na bioacumulação e que a célula da cianobactéria possui mecanismos seletivos para bioacumulação dos compostos orgânicos [63]

#### 4.2.6.3. Curva de crescimento

O crescimento da espécie nos frascos teste e controle da alga, foi monitorado pela medida da densidade celular, nos dia 1, 4 e 7. (Figura 53)



**Figura 53. Curva de crescimento durante o ensaio para o ibuprofeno. (T1: teste nível 1, T2: teste nível 2, T3: teste nível 3 e A: controle alga.)**

O crescimento nos frascos-teste e nos frascos-controle foram estatisticamente iguais (95% de confiança), indicando elevado potencial adaptativo da espécie estudada, pois nem o ibuprofeno nem os possíveis produtos de degradação espontânea causaram diminuição na razão do crescimento dos frascos-teste. (Tabela 34)

**Tabela 34. Razão do crescimento por dia (d<sup>-1</sup>) até o dia 4 e até o dia 7 de ensaio.**

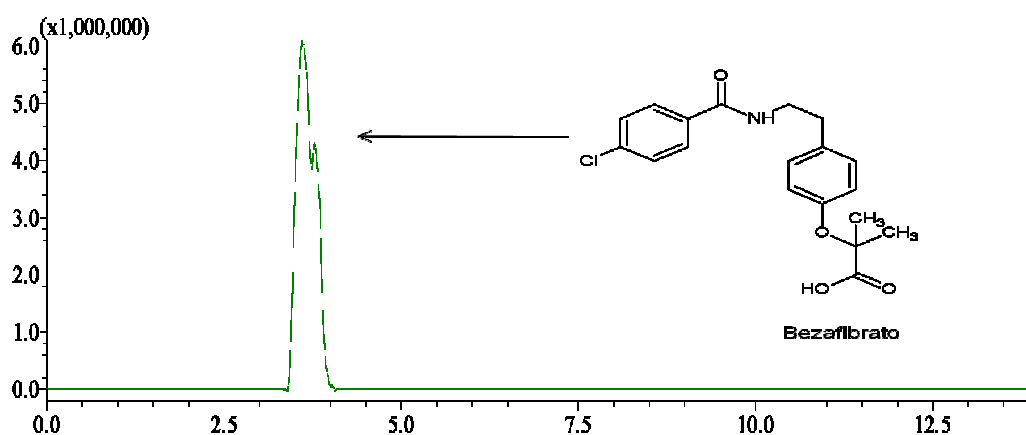
	Dia 4 (d <sup>-1</sup> )	Dia 7 (d <sup>-1</sup> )
T1 (teste nível-1)	0,393±0,055 <sup>(a)</sup>	0,323±0,072 <sup>(b)</sup>
T2 (teste nível-2)	0,372±0,044 <sup>(a)</sup>	0,424±0,083 <sup>(b)</sup>
T3 (teste nível-3)	0,355±0,098 <sup>(a)</sup>	0,465±0,099 <sup>(b)</sup>
A (controle alga)	0,404±0,091 <sup>(a)</sup>	0,378±0,059 <sup>(b)</sup>

\*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais, para cada dia testado.

## 4.2.7. Bezafibrato

### 4.2.7.1. Biodegradação

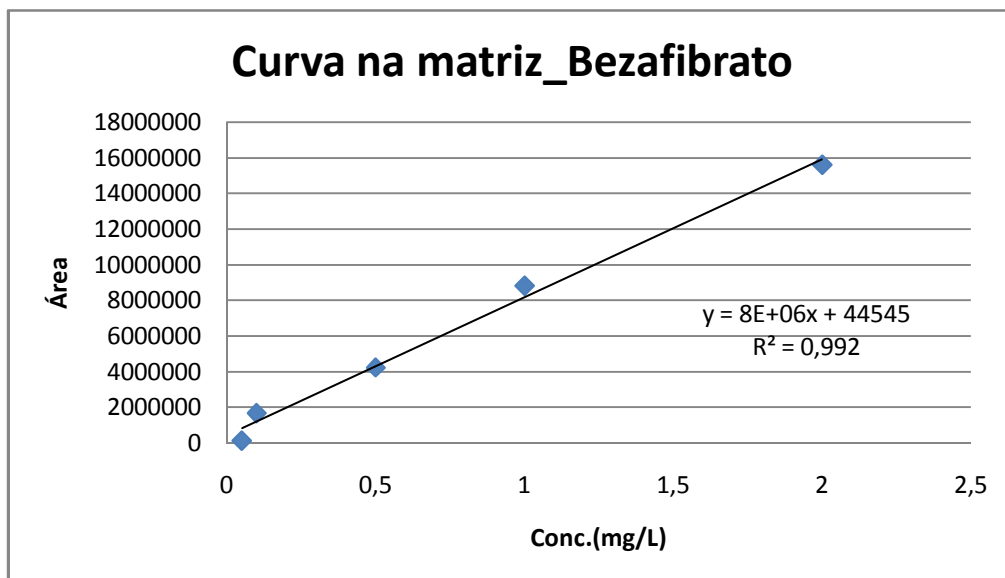
As condições de análise para o bezafibrato foram determinadas a partir da injeção de uma solução padrão aquosa de 1,00 mg/L de bezafibrato, no modo negativo, por HPLC-ESI-MS. O bezafibrato apresentou tempo de retenção de minutos e foi monitorado pela razão massa/carga da forma protonada  $m/z$  360,1005 (Figura 54)



**Figura 54. Cromatograma obtido por HPLC-ESI-MS a partir de uma solução padrão de bezafibrato.**

Com as condições otimizadas, construiu-se uma curva de calibração na matriz para o bezafibrato para a quantificação das amostras de biodegradação.

(Figura 55)



**Figura 55. Curva de calibração matrizada para o bezafibrato.**

As amostras de biodegradação foram quantificadas e a concentração extracelular do bezafibrato determinada nos frascos teste e controle, durante o ensaio de biodegradação. (Tabela 35)

**Tabela 35. Concentração extracelular do bezafibrato nos frascos teste e controle durante o ensaio.**

Dia 1	Concentração (mg/L)			Remoção(%)		
	Nível_1	Nível_2	Nível_3	Nível_1	Nível_2	Nível_3
Teste	0,204 <sup>(a)</sup> ±0,090	0,130 <sup>(a)</sup> ±0,043	0,063 <sup>(a)</sup> ±0,007			
Controle	0,194 <sup>(a)</sup> ±0,032	0,124 <sup>(a)</sup> ±0,080	0,059 <sup>(a)</sup> ±0,003			
Dia 4						
Teste	0,183 <sup>(b)</sup> ±0,028	0,134 <sup>(b)</sup> ±0,009	0,060 <sup>(b)</sup> ±0,006	10,3	5,1	5,0
Controle	0,180 <sup>(b)</sup> ±0,014	0,120 <sup>(b)</sup> ±0,005	0,059 <sup>(b)</sup> ±0,005	7,6	0,1	0,8
Dia 7						
Teste	0,190 <sup>(d)</sup> ±0,006	0,125 <sup>(d)</sup> ±0,012	0,055 <sup>(d)</sup> ±0,006	7,2	4,3	13,7
Controle	0,178 <sup>(d)</sup> ±0,002	0,119 <sup>(d)</sup> ±0,012	0,050 <sup>(d)</sup> ±0,013	8,7	4,1	15,5

\* As médias dos testes e controles foram comparadas estatisticamente (teste t) por dia de ensaio. Letras iguais indicam médias iguais a 95% de confiança, para cada nível testado.

Durante o ensaio foram testados 3 níveis de concentração : 0,20 mg/L (nível 1), 0,10 mg/L (nível 2) e 0,05 mg/L (nível 3). A concentração encontrada no primeiro dia de ensaio é considerada a concentração inicial do experimento. A

concentração extracelular do bezafibrato nos frascos teste e controle permaneceram praticamente constantes durante todo o ensaio.

Até o quarto de dia de ensaio, as taxas de remoção do frasco-teste dos níveis 1, 2 e 3 foram de 10,3 %, 5,1 % e 5,0 %, respectivamente. Estas taxas foram superiores à dos frascos-controle, os quais variaram de 0,1 a 7,6%. No entanto, as taxas de remoção dos frascos-teste e controle foram similares até o último dia de ensaio. Além disso, as taxas de remoção foram baixas, indicando que não houve degradação biológica ou espontânea.

Este resultado é coerente, visto a dificuldade de degradação do bezafibrato em ambientes naturais, já que o bezafibrato é freqüentemente encontrado em águas superficiais e subterrâneas [9, 18].

Por exemplo, outros autores submeteram uma solução de bezafibrato em água destilada à irradiação de um simulador solar e, após 200 h, somente 10% de degradação foi observada. Foi também avaliada a fotólise dos fármacos bezafibrato quando presentes em efluente de ETE, situação em que não foi observada degradação. [107, 108]

Produtos de degradação espontânea foram pesquisados por injeção direta no espectrômetro de massas, nos modos positivo e negativo, mas não foram encontrados tanto nos frascos teste quanto nos frascos-controle. Uma possível explicação é que se houve formação de produtos, suas concentrações no meio extracelular seriam muito baixas, dificultando a detecção.

#### **4.2.7.2. Bioacumulação**

As taxas de remoção dos frascos-teste e controle foram semelhantes indicando que a cianobactéria não foi a responsável pela remoção deste fármaco do meio aquoso. Apesar das evidências, o bezafibrato e seus possíveis metabólitos

foram pesquisados nas amostras de bioacumulação. As análises foram realizadas por injeção direta no espectrômetro de massas, nos modos positivo e negativo, mas não detectados sinais do analito e de produtos de degradação.

O bezafibrato possui elevado coeficiente de partição octanol/água ( $\log K_{ow}=4,25$ ), com elevado potencial de bioacumulação. No entanto, os resultados demonstraram que não houve bioacumulação deste fármaco no interior da célula da cianobactéria. Como dito anteriormente, a polaridade do analito não é o único fator que determina sua bioacumulação pela cianobactéria, a qual possui mecanismos seletivos de transporte ativo na membrana celular, que a possibilita selecionar os compostos bioacumulados. [63]

#### 4.2.7.3. Curva de crescimento

O crescimento nos frascos-teste nível 1 (T1), nível 2 (T2) e nível 3 (T3), foi semelhante ao crescimento nos frascos controle (A), demonstrando o potencial adaptativo da espécie estudada. (Figura 56)

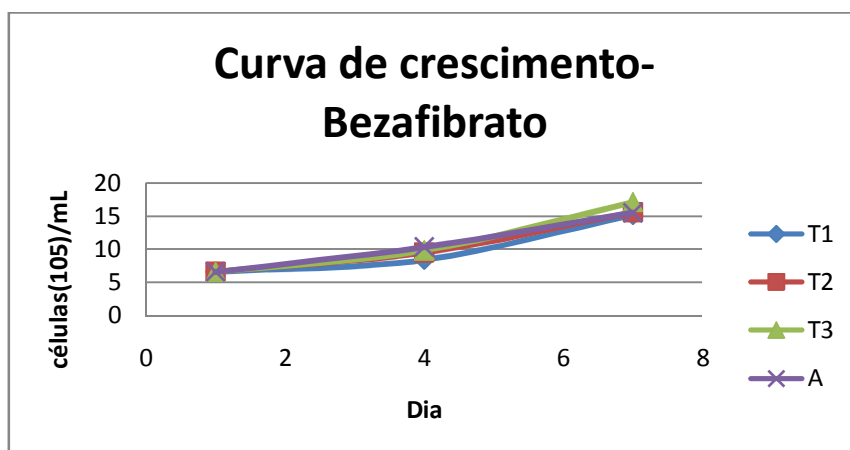


Figura 56. Curva de crescimento durante o ensaio para o bezafibrato. (T1: teste nível 1, T2: teste nível 2, T3: teste nível 3 e A: controle alga.)

A razão do crescimento foi calculada, e como esperado, as taxas de crescimento por dia dos frascos-teste e controle foram estatisticamente iguais até o quarto e sétimo dia de ensaio. (Tabela 36)

**Tabela 36. Razão do crescimento por dia ( $d^{-1}$ ) até o dia 4 e até o dia 7 de ensaio.**

	Dia 4( $d^{-1}$ )	Dia 7 ( $d^{-1}$ )
T1(teste nível-1)	0,304±0,055 <sup>(a)</sup>	0,539±0,053 <sup>(b)</sup>
T2(teste nível-2)	0,335±0,026 <sup>(a)</sup>	0,550±0,035 <sup>(b)</sup>
T3(teste nível-3)	0,364±0,077 <sup>(a)</sup>	0,506±0,081 <sup>(b)</sup>
A(controle alga)	0,411±0,093 <sup>(a)</sup>	0,571±0,046 <sup>(b)</sup>

\*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais, para cada dia testado.

#### **4.3. Ensaio biodegradação/bioacumulação utilizando o efluente farmacêutico.**

Ao efluente farmacêutico incubado com as cianobactérias foram adicionados fármacos que foram removidos por via biológica (etinilestradiol, diclofenaco e tetraciclina). Na Tabela 37, estão resumidos os resultados obtidos nos experimentos com o meio WC. Estes resultados demonstram que o ácido clofíbrico, o atenolol e o bezafibrato não sofreram degradação, seja por via biológica ou físico-química, indicando elevada estabilidade química destes fármacos no meio. No ensaio para o ibuprofeno verificou-se a presença de um produto de degradação por via fotolítica, não havendo também participação da cianobactéria na remoção deste fármaco do meio. Desta forma, os fármacos que apresentaram degradação biológica foram adicionados ao efluente farmacêutico para avaliar se os mecanismos de remoção dos fármacos etinilestradiol, diclofenaco e tetraciclina, propostos para o ensaio com o meio WC, foram mantidos quando as cianobactérias foram incubadas com uma amostra contaminada real.

**Tabela 37. Resumo dos resultados obtidos nos ensaios com o meio WC.**

Fármaco	Resultado biodegradação	Mecanismo de remoção proposto
Diclofenaco	Degradação biológica significativa nos frascos teste : 70 a 96%	Mineralização
Etinilestradiol	Degradação biológica significativa nos frascos teste 63 a 68%	Bioacumulação e Mineralização
Tetraciclina	Degradação biológica significativa nos frascos teste 60 a 100%	Bioacumulação e Mineralização
Ácido Clofíbrico	Não houve degradação espontânea Não houve degradação via biológica Concentração constante nos frascos teste e controle	_____
Atenolol	Não houve degradação espontânea Não houve degradação via biológica Concentração constante nos frascos teste e controle	_____
Bezafibrato	Não houve degradação espontânea Não houve degradação via biológica Concentração constante nos frascos teste e controle	_____
Ibuprofeno	Degradação espontânea significativa, Não houve degradação biológica	Via fotolítica – Identificação produto de fotólise (Isobutilacetofenona) já descrito na literatura <sup>12</sup>

#### 4.3.1 Biodegradação do efluente farmacêutico

O ensaio de biodegradação com o efluente farmacêutico teve duração de 7 dias. A este efluente foram adicionados volumes adequados de soluções padrão dos seguintes fármacos: diclofenaco, etinilestradiol e tetraciclina, para se obter concentrações finais de 0,2 mg/L, 0,1 mg/L e 1mg/L, Nos frascos-teste , foram inoculados a cianobactéria (cianobactéria + efluente +fármacos) e os frascos controle (efluente + fármacos) ficaram incubados nas mesmas condições (Figura 57).



**Figura 57. Foto do ensaio de biodegradação do efluente farmacêutico. Frascos-teste e controle são mostrados á esquerda e direita, respectivamente.**

Os fármacos diclofenaco, etinilestradiol e tetraciclina foram adicionados ao efluente farmacêutico, pois foram os que apresentaram maiores eficiências de remoção do meio WC pela cianobactéria (Tabela 37).

Além dos fármacos adicionados, o efluente farmacêutico contém outros tipos de medicamentos, que não podem ser divulgados nem quantificados, devido a um termo de compromisso assinado com a indústria farmacêutica.

Para avaliar a eficiência de remoção dos fármacos presentes neste efluente, foram realizadas análises de DQO, DBO e OD, nos frascos teste e nos frascos controle no último dia de ensaio (Tabela 38).

**Tabela 38. Resultados das análises de DBO, DQO e OD, dos frascos-teste e controle após 7 dias de ensaio.**

Ensaio	Frascos teste (com tratamento)				Frascos controle (sem tratamento)			
	Resultado (mg/L)	LQ (mg/L)	Método*	Limite aceitável (mg/L)	Resultado (mg/L)	LQ (mg/L)	Método*	Limites não definidos (mg/L)
Demanda bioquímica de oxigênio (DBO)	69,3	2	SM-5210B	60,0	156	2	SM-5210B	----
Demanda química de oxigênio (DQO)	145	10	SM-5520D	180	277	10	SM-5520D	----
Oxigênio dissolvido (OD)	6,67	0,2	SM-4500OC	-----	5,60	0,2	SM-4500OC	----

\* Relatório de ensaio Limnos nº 0494/13 – Ver Anexo I.

Os resultados demonstraram que ao fim de 7 dias de incubação, nos frascos-teste (efluente submetido ao tratamento biológico com cianobactéria) apresentou menor teor de matéria orgânica e maior teor de oxigênio dissolvido que nos frascos-controle. A matéria orgânica biodegradável, medida pela DBO, e a matéria orgânica total, medida pela DQO, apresentaram valores muito inferiores que nos frascos controle, onde o efluente não recebeu nenhum tratamento (Tabela 38).

O tratamento do efluente com a cianobactéria representou uma redução de 52% do teor de matéria orgânica biodegradável em relação ao frasco que não recebeu o tratamento (DBO do efluente tratado foi de 69,3 mg/L e do efluente não tratado de 156 mg/L). A redução do teor de matéria orgânica total, biodegradável e não biodegradável, foi de 48% no efluente tratado (DQO neste frasco foi de 145 mg/L e do efluente não tratado 277 mg/L). Este resultado indica que a cianobactéria estudada foi capaz de remover do efluente farmacêutico cerca de 50% de sua carga orgânica total.

Os valores de DQO, no efluente tratado, de 145 mg/L, ficaram dentro dos limites aceitáveis pela legislação ambiental, que é de 180 mg/L. Já para DBO, o valor encontrado no efluente tratado (69,3 mg/L) foi muito próximo do limite aceitável pela legislação (60 mg/L). O resultado é muito significativo, pois no efluente, além dos fármacos adicionados, havia a presença de outros compostos orgânicos com concentração desconhecida, e mesmo com esta carga de matéria orgânica elevada, a cianobactéria foi capaz de promover uma elevada taxa de redução de contaminantes orgânicos em apenas 7 dias.

É muito importante reduzir a carga de matéria orgânica dos efluentes, pois seu lançamento sem o devido tratamento, com altas cargas de carbono, nitrogênio e fósforo, (elevados níveis de DQO e DBO), pode levar a uma eutrofização do corpo d'água onde este efluente foi lançado. A eutrofização é o crescimento exagerado de espécies de cianobactérias, que são muito bem adaptadas à ambientes poluídos [46].

O uso de cianobactérias como agentes de biodegradação consiste em utilizar esta capacidade adaptativa da espécie, ou seja, crescimento exagerado em ambientes poluídos, como agente de biorremediação de efluentes em ambientes controlados antes do lançamento. Alguns estudos já demonstraram que espécies de cianobactérias foram capazes de degradar contaminantes orgânicos [47, 49, 91, 94, 109], bem como adsorção de metais pesados na membrana celular. [110]. Assim, podem ser utilizados de forma eficiente em tecnologias avançadas para biorremediação de efluentes contaminados, com uma variedade de contaminantes.

Recentemente tem sido crescente o interesse sobre o uso de cianobactérias como agentes de biorremediação uma vez que possuem muitas vantagens sobre

outros microorganismos isolados a partir do solo. Seu metabolismo mixotrófico permite um baixo custo para crescimento, cultivo e replicação. [46, 72, 111]

O presente estudo contribui para a pesquisa das cianobactérias como agentes de biodegradação de um efluente farmacêutico, confirmando sua possibilidade de aplicação para o tratamento de uma variedade de efluentes contaminados com matéria orgânica. As cianobactérias demonstraram ser altamente eficientes como acumuladores e degradadoras de diferentes tipos de poluentes ambientais, possibilitando seu uso em tratamento de efluentes contaminados.

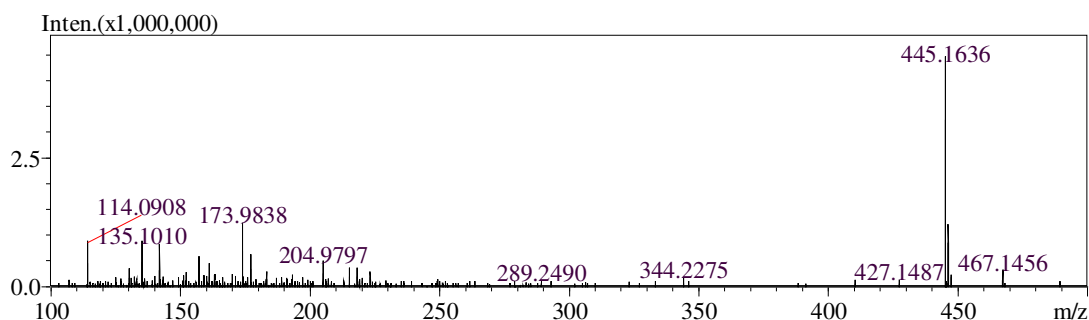
#### **4.3.2. Bioacumulação**

As elevadas taxas de remoção de matéria orgânica demonstrada pelas medidas de DBO e DQO do efluente tratado demonstram que a cianobactéria foi capaz de remover os contaminantes do meio extracelular.

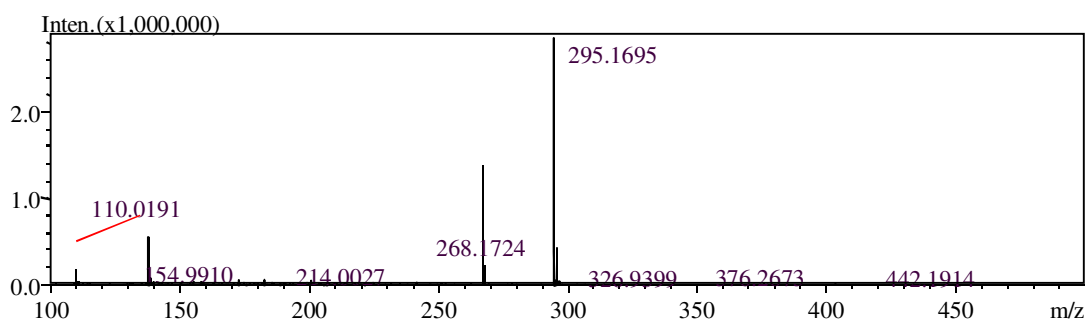
Os mecanismos de remoção propostos para os fármacos adicionados ao efluente foram a mineralização para o diclofenaco e a mineralização/bioacumulação para o etinilestradiol e tetraciclina.

No fim de 7 dias de ensaio, as amostras dos frascos teste foram submetidas ao procedimento de lise celular e analisadas por injeção direta no espectrômetro de massas.

Os resultados demonstram que a tetraciclina e o etinilestradiol foram bioacumulados no interior das células da cianobactéria. A tetraciclina foi detectada no interior da célula, na sua forma protonada ( $m/z$  445,1636). O etinilestradiol foi detectado, na sua forma desprotonada ( $m/z$  295,1695). O diclofenaco não foi detectado, o que indica, portanto que não houve bioacumulação deste fármaco (Figura 58 e Figura 59)



**Figura 58. Espectro de massas da tetraciclina no modo positivo. Forma protonada  $m/z$  445.1636.**



**Figura 59. Espectro de massas do etinilestradiol no modo negativo. forma desprotonada  $m/z$  295.1695.**

Estes resultados obtidos no ensaio com o efluente real são semelhantes aos resultados observados nos ensaios de biodegradação com o meio WC. Os fármacos diclofenaco, tetraciclina e etinilestradiol, foram os fármacos que apresentaram as melhores taxas de remoção no ensaio com o meio WC, e os mecanismos de remoção propostos foram a mineralização, para o diclofenaco, e a bioacumulação conjugada com a mineralização, para o etinilestradiol e a tetraciclina.

Neste ensaio com um efluente real, o diclofenaco não foi detectado no interior das células da cianobactéria, resultado esperado já que o mecanismo de remoção do diclofenaco do meio proposto foi a mineralização.

A presença da tetraciclina e do etinilestradiol no interior da célula da cianobactéria, confirma que um dos mecanismos de remoção destes fármacos do efluente foi a bioacumulação. Portanto, mesmo frente a um efluente real contendo outros fármacos como contaminantes, a cianobactéria foi capaz de bioacumular a tetraciclina e o etinilestradiol. Como os fármacos adicionados não foram quantificados no meio extracelular, não foi possível estimar a eficiência de remoção dos mesmos.

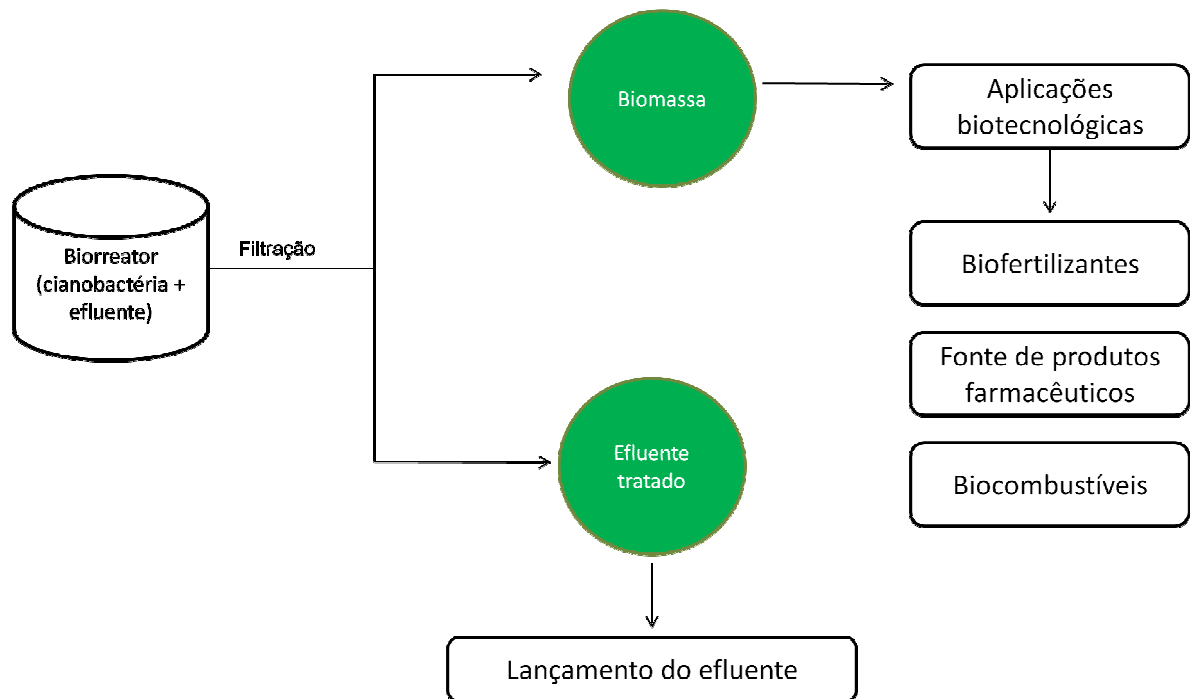
Do teor de matéria orgânica total, medida pela (DQO), os fármacos (etinilestradiol, tetraciclina e diclofenaco) adicionados representa somente 0,8 %. Portanto, a eficiência de remoção encontrada de 48% de DQO refere-se ao teor de matéria orgânica total, ou seja, de outros contaminantes do efluente farmacêutico.

Este resultado demonstra o grande potencial adaptativo da espécie frente a diferentes tipos de contaminantes, sendo possível sua aplicação como agente de biodegradação, no tratamento de efluentes, caso sejam feitos maiores estudos de aplicação em escala real deste tipo de tratamento. Além disso, é importante otimizar as condições de tratamento com o objetivo de reduzir o tempo de tratamento estudado neste trabalho que foi de 7 dias.

O tratamento de efluentes com cianobactérias deve ser realizado em ambiente confinado, como em reatores ou lagoas de estabilização, e as cianobactérias devem ser filtradas antes do lançamento do efluente, para evitar a introdução de uma nova espécie no ambiente natural

Como é necessária a filtração deste microorganismo, é interessante e viável economicamente aplicar a biotecnologia para reutilização da biomassa usada no tratamento de efluentes utilizando cianobactérias (Figura 60). Estes microorganismos possuem inúmeros produtos de metabolismo secundário que

podem ser isolados e comercializados, como por exemplo, biofertilizantes [75], produtos farmacêuticos, polímeros e como uma fonte de combustíveis renováveis [72, 77].



**Figura 60. Esquema de aproveitamento biotecnológico da biomassa usada no tratamento de efluentes.**

. Além disso, devem-se evitar espécies que possuam o gene que sintetizam estas toxinas. A espécie *Microcystis novacekii* não possui este gene (dados não publicados), somente uma mutação, poderia levar a espécie estudada neste trabalho, a produzir este tipo de toxina. Mutações e produção de cianotoxina estão relacionadas com o crescimento descontrolado de espécies de cianobactéria em ambientes aquáticos eutrofizados. [79, 112] Em possível tratamento de efluentes com cianobactérias a biomassa de cianobactéria é controlada dificultando a produção de cianotoxinas neste tipo de tratamento, o que viabiliza o uso da espécie estudada.

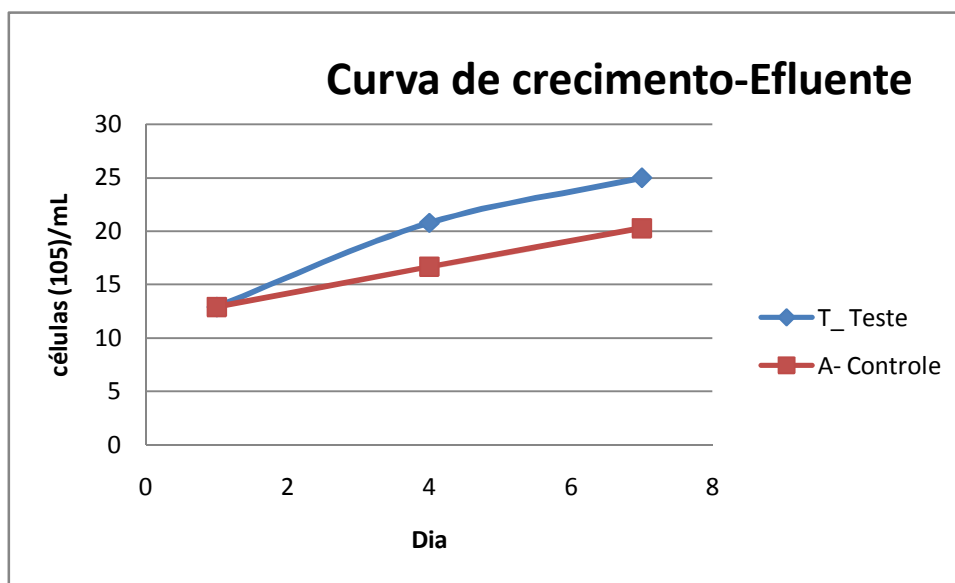
O presente estudo é pioneiro no sentido de propor e investigar o possível mecanismo de remoção de contaminantes de um efluente farmacêutico real. Os

estudos descritos na literatura, que utilizam cianobactérias como tratamento de diferentes tipos de contaminantes orgânicos, como pesticidas [94], petróleo bruto [113] e ácidos graxos [114], determinam somente a redução de matéria orgânica do meio extracelular, através de análises com DQO, DBO, COT (carbono orgânico total) ou análise cromatográfica, sem se preocupar com o possível mecanismo de remoção dos mesmos. Seguindo a mesma linha de pesquisa, pesquisadores coletaram um efluente misto, em uma região industrial da Índia, contendo contaminantes farmacêuticos e têxteis. A cianobactéria usada no tratamento foi isolada do próprio efluente e esta cultura mista foi incubada com o efluente durante 7 dias. O teor de matéria orgânica do meio extracelular foi medido através da DQO e por COT. Os resultados demonstraram uma redução de cerca de 90% da matéria orgânica do meio extracelular. O mecanismo proposto pelos autores foi a bioacumulação e a biodegradação dos contaminantes, mas não foi realizada nenhuma análise para confirmar esta hipótese [111].

Este trabalho contribui para a elucidação do mecanismo de remoção de compostos orgânicos por cianobactérias. O mecanismo de bioacumulação não depende somente do coeficiente de partição octanol/água, pois a tetraciclina, diferente do etinilestradiol, possui elevada polaridade. Este resultado demonstra que estes contaminantes são bioacumulados de forma seletiva, através de transporte ativo pela membrana da cianobactéria. Uma vez no interior das células são metabolizados pelo citocromo P450, presente no interior do citoplasma da cianobactéria, para liberação de energia para as atividades celulares. As enzimas do citocromo P450 são capazes de levar a matéria orgânica a seu estágio máximo de oxidação, produzindo CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, levando a uma possível mineralização da matéria orgânica [63].

### 4.3.3. Curva de crescimento

O crescimento da espécie foi monitorado pela sua densidade ótica em 680 nm, nos dias 1, 4 e 7. A densidade ótica dos frascos teste (cianobactéria+efluente+fármacos) foi comparada com a densidade ótica do frasco controle (cianobactéria+meioWC+fármacos). (Figura 61)



**Figura 61. Curva de crescimento durante dos frascos teste e controle durante o ensaio com o efluente real.**

O resultado demonstra que nos frascos teste houve um estímulo do crescimento em relação ao frasco controle, indicando que o alto teor de matéria orgânica presente no efluente farmacêutico estimulou o crescimento da cianobactéria. Este resultado é corroborado com a literatura que relata a presença de quantidades elevadas de matéria orgânica oxidável, traços de oxigênio dissolvido e considerável quantidade de nitrato e fosfato em efluentes, fatores que favorecem o crescimento de cianobactérias [111].

Este resultado demonstra a viabilidade de aplicação desta espécie em efluentes com elevados teores de matéria orgânica devido a sua capacidade adaptativa em ambientes contaminados.

## **CAPÍTULO 5**

## 5. Considerações finais

No ensaio de biodegradação de fármacos utilizando o meio WC, foram testados 7 fármacos: etinilestradiol, diclofenaco, ácido clofíbrico, atenolol, tetraciclina, bezafibrato e ibuprofeno.

A espécie *Microcystis novacekii* demonstrou importante papel na remoção do etinilestradiol e da tetraciclina do meio extracelular; o possível mecanismo de remoção proposto foi a bioacumulação dos fármacos, pois uma proporção da matéria total dos fármacos adicionados foi encontrada no meio intracelular da cianobactéria. Parte da matéria total adicionada, não foi encontrada, nem metabólitos identificados, tornando a mineralização destes fármacos pela cianobactéria uma hipótese provável. Para o ensaio de biodegradação do diclofenaco houve degradação biológica significativa; no entanto, não foram encontrados produtos de degradação nos frascos-teste e nos frascos-controle. As hipóteses prováveis para a remoção do diclofenaco seriam sua biodegradação e posterior mineralização. Possíveis metabólitos podem ter sido formados, no entanto, sua concentração foi tão baixa que não foram detectados no presente estudo.

No ensaio de biodegradação do ácido clofíbrico e do atenolol a concentração dos frascos-teste e dos frascos-controle se mantiveram constantes durante todo ensaio, indicando elevada estabilidade química deste tipo de contaminante. Os fármacos não sofreram degradação química ou biológica.

No ensaio de biodegradação do bezafibrato houve uma degradação espontânea por via fotolítica nos frascos-teste e nos frascos-controle, indicando que a cianobactéria não exerceu nenhum papel na remoção deste fármaco do

meio. Um produto de fotólise, isobutilacetofenona, já descrito na literatura, foi detectado tanto nos frascos-teste, quanto nos frascos-controle.

Em todos os ensaios com o meio WC, a espécie *Microcystis novacekii* apresentou grande capacidade de adaptação frente aos fármacos estudados. A grande capacidade de adaptação da espécie aliada à significativa remoção dos fármacos indica a possibilidade de uso deste microorganismo como agente de biorremediação.

A bioacumulação dos fármacos não depende somente da polaridade do contaminante, já que fármacos com polaridades tão distintas, pois o etinilestradiol é mais lipossolúvel que a tetraciclina, mas ambos foram bioacumulados. Já o bezafibrato é tão lipossolúvel quanto o etinilestradiol mas não foi bioacumulado. Estes resultados indicam que a cianobactéria exerce um papel seletivo quanto a absorção deste tipo de xenobiótico através de transporte ativo pela membrana.

Os fármacos com as melhores taxas de remoção devido a atividade da cianobactéria (etinilestradiol, tetraciclina e diclofenaco) foram adicionados a um efluente farmacêutico real e os resultados demonstraram que a espécie foi capaz de reduzir consideravelmente o teor de matéria orgânica total do meio extracelular, devido à redução dos teores de DQO e DBO do meio. Esta redução permitiu o enquadramento destes parâmetros do efluente abaixo do limite máximo aceitável para seu lançamento de acordo com a legislação ambiental vigente. Os fármacos, etinilestradiol e tetraciclina foram encontrados no interior das células da cianobactéria, indicando que mesmo frente a uma amostra real com uma variedade de contaminantes foi capaz de bioacumular os fármacos adicionado, mesmo resultado encontrado nos ensaio com o meio WC.

Além disso, houve um estímulo do crescimento da cianobactéria durante o experimento com o efluente real, indicando que altos teores de matéria orgânica, favorecem o crescimento da espécie, tornando viável sua aplicação em tratamentos de efluentes industriais contaminados.

Finalmente, este trabalho mostra sua relevância no contexto de recuperação ambiental, investigando os possíveis mecanismos envolvidos na remoção desta de matéria orgânica do meio, servindo de base para novas investigações de biodegradação utilizando espécies locais, que possam contribuir para a biorremediação de corpos d'água contaminados ou na sua utilização em biorreatores ou lagoas de estabilização para tratamento de efluentes.

## **CAPÍTULO 6**

## 6. Referências Bibliográficas

1. Hignite, C. and D.L. Azarnoff, *Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent*. Life Sci, 1977. **20**(2): p. 337-41.
2. Kummerer, K., *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources--a review*. Chemosphere, 2001. **45**(6-7): p. 957-69.
3. Fent, K., A.A. Weston, and D. Caminada, *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. Aquat Toxicol, 2006. **76**(2): p. 122-59.
4. Crane, M., C. Watts, and T. Boucard, *Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals*. Sci Total Environ, 2006. **367**(1): p. 23-41.
5. Daughton, C.G. and T.A. Ternes, *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?* Environ Health Perspect, 1999. **107 Suppl 6**: p. 907-38.
6. Halling-Sorensen, B., et al., *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment--a review*. Chemosphere, 1998. **36**(2): p. 357-93.
7. Verenitch, S.S., C.J. Lowe, and A. Mazumder, *Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2006. **1116**(1-2): p. 193-203.
8. Lee, H.B., T.E. Peart, and M.L. Svoboda, *Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2005. **1094**(1-2): p. 122-9.
9. Moldovan, Z., *Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania*. Chemosphere, 2006. **64**(11): p. 1808-17.
10. Bendz, D., et al., *Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden*. J Hazard Mater, 2005. **122**(3): p. 195-204.
11. Stumpf, M., et al., *Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil*. Sci Total Environ, 1999. **225**(1-2): p. 135-41.
12. Kolpin, D.W., et al., *Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance*. Environ Sci Technol, 2002. **36**(6): p. 1202-11.
13. Weigel, S., J. Kuhlmann, and H. Huhnerfuss, *Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea*. Sci Total Environ, 2002. **295**(1-3): p. 131-41.
14. Batt, A.L., S. Kim, and D.S. Aga, *Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations*. Chemosphere, 2007. **68**(3): p. 428-35.
15. Barnes, K.K., et al., *A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States--I) groundwater*. Sci Total Environ, 2008. **402**(2-3): p. 192-200.
16. Santos, L.H., et al., *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*. J Hazard Mater, 2010. **175**(1-3): p. 45-95.

17. Bila, D.M. and M. Dezotti, *Fármacos no meio ambiente*. Química Nova, 2003. **26**: p. 523-530.
18. Ziylan, A. and N.H. Ince, *The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: treatability by conventional and non-conventional processes*. J Hazard Mater, 2011. **187**(1-3): p. 24-36.
19. Ang, E.L., H. Zhao, and J.P. Obbard, *Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering*. Enzyme and Microbial Technology, 2005. **37**(5): p. 487-496.
20. Agency, E.P. [cited 2012 12/12]; Available from: <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/index.cfm>.
21. American Public Health, A., et al., *Standard methods for the examination of water and wastewater* 2005, Washington, D.C.: APHA-AWWA-WEF.
22. Vogel, A.I., *Química analítica qualitativa* 1981: Ed. Mestre Jou.
23. Batt, A.L., D.D. Snow, and D.S. Aga, *Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA*. Chemosphere, 2006. **64**(11): p. 1963-71.
24. Sanderson, H., et al., *Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones*. Toxicology, 2004. **203**(1-3): p. 27-40.
25. Hoeger, B., et al., *Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (Salmo trutta f. fario)*. Aquat Toxicol, 2005. **75**(1): p. 53-64.
26. Vekey, K., *Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography*. J Chromatogr A, 2001. **921**(2): p. 227-36.
27. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Analytical Chemistry, 1990. **62**(19): p. 2145-2148.
28. Lancas, F.M., J.C. Rodrigues, and S.S. de Freitas, *Preparation and use of packed capillary columns in chromatographic and related techniques*. J Sep Sci, 2004. **27**(17-18): p. 1475-82.
29. Parrott, J.L. and B.R. Blunt, *Life-cycle exposure of fathead minnows (Pimephales promelas) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males*. Environ Toxicol, 2005. **20**(2): p. 131-41.
30. Pawlowski, S., et al., *Effects of 17alpha-ethinylestradiol in a fathead minnow (Pimephales promelas) gonadal recrudescence assay*. Ecotoxicol Environ Saf, 2004. **57**(3): p. 330-45.
31. Orn, S., et al., *Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone*. Aquat Toxicol, 2003. **65**(4): p. 397-411.
32. Nash, J.P., et al., *Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish*. Environ Health Perspect, 2004. **112**(17): p. 1725-33.
33. Xu, H., et al., *Exposure to 17alpha-ethinylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (Danio rerio)*. Aquat Toxicol, 2008. **88**(1): p. 1-8.
34. Kuster, M., et al., *Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil)*. Environment International, 2009. **35**(7): p. 997-1003.

35. Ternes, T.A., et al., *Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil*. *Sci Total Environ*, 1999. **225**(1-2): p. 81-90.
36. Budavari, S., *The Merck Index: an encyclopedia of chemical drugs, and biological*. 11 ed 1989, New Jersey.
37. Flaherty, C.M. and S.I. Dodson, *Effects of pharmaceuticals on Daphnia survival, growth, and reproduction*. *Chemosphere*, 2005. **61**(2): p. 200-7.
38. Runnalls, T.J., D.N. Hala, and J.P. Sumpter, *Preliminary studies into the effects of the human pharmaceutical Clofibric acid on sperm parameters in adult Fathead minnow*. *Aquat Toxicol*, 2007. **84**(1): p. 111-8.
39. Schmitt-Jansen, M., et al., *Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products*. *Anal Bioanal Chem*, 2007. **387**(4): p. 1389-96.
40. DeLorenzo, M.E. and J. Fleming, *Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta**. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2008. **54**(2): p. 203-10.
41. Kim, H., et al., *Sulfonamides and tetracyclines in livestock wastewater*. *Chemosphere*, 2013. **91**(7): p. 888-894.
42. Hoa, P.T.P., et al., *Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam*. *Science of The Total Environment*, 2011. **409**(15): p. 2894-2901.
43. Hirsch, R., et al., *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*. *Science of The Total Environment*, 1999. **225**(1-2): p. 109-118.
44. Radjenović, J., et al., *Identification and structural characterization of biodegradation products of atenolol and glibenclamide by liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion trap mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1210**(2): p. 142-153.
45. Küster, A., et al., *Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in the European Union: A case study with the  $\beta$ -blocker atenolol*. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2010. **6**(S1): p. 514-523.
46. Vidotti, E.C. and M.d.C.E. Rollemberg, *Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica*. *Química Nova*, 2004. **27**: p. 139-145.
47. Cajthaml, T., et al., *Microbial transformation of synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol*. *Environ Pollut*, 2009. **157**(12): p. 3325-35.
48. Barbosa, F.A.R., Moreno, P., *Mata Atlântica e sistema lacustre do médio Rio Doce. Os sites e o programa brasileiro de pesquisas ecológicas de longa duração. Projeto Fapemig*. Dados não publicados, 2002: p. 184 p.
49. Barton, J.W., et al., *Reductive transformation of methyl parathion by the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004. **65**(3): p. 330-5.
50. Lee, S.E., et al., *Biotransformation of an organochlorine insecticide, endosulfan, by *Anabaena* species*. *J Agric Food Chem*, 2003. **51**(5): p. 1336-40.
51. El-Rahman Mansy, A. and E. El-Bestawy, *Toxicity and biodegradation of fluometuron by selected cyanobacterial species*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002. **18**(2): p. 125-131.
52. Della Greca, M., et al., *Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae*. *Chemosphere*, 2008. **70**(11): p. 2047-53.
53. Guha, H., *Biogeochemical influence on transport of chromium in manganese sediments: experimental and modeling approaches*. *J Contam Hydrol*, 2004. **70**(1-2): p. 1-36.

54. Juei Shen, W., et al., *Uptake and transfer of high PCB concentrations from phytoplankton to aquatic biota*. Chemosphere, 1998. **36**(6): p. 1201-1210.
55. Bopp, S.K. and T. Lettieri, *Gene regulation in the marine diatom Thalassiosira pseudonana upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*. Gene, 2007. **396**(2): p. 293-302.
56. Lei, A.P., Y.S. Wong, and N.F. Tam, *Removal of pyrene by different microalgal species*. Water Sci Technol, 2002. **46**(11-12): p. 195-201.
57. Lei, A.P., et al., *Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species*. Bioresour Technol, 2007. **98**(2): p. 273-80.
58. Todd, S.J., R.B. Cain, and S. Schmidt, *Biotransformation of naphthalene and diaryl ethers by green microalgae*. Biodegradation, 2002. **13**(4): p. 229-38.
59. Thies, F., et al., *Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae. Involvement of cytochrome P450 in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide metflurazon*. Plant Physiol, 1996. **112**(1): p. 361-70.
60. Pflugmacher, S. and H. Sandermann, Jr., *Cytochrome P450 monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae*. Plant Physiol, 1998. **117**(1): p. 123-8.
61. Barque, J.P., et al., *Constitutive overexpression of immunoidentical forms of PCP-induced Euglena gracilis CYP-450*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **298**(2): p. 277-81.
62. Stegeman, J.J. and J.J. Lech, *Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure*. Environ Health Perspect, 1991. **90**: p. 101-9.
63. Torres, M.A., et al., *Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008. **71**(1): p. 1-15.
64. Pflugmacher, S., P. Schroder, and H. Sandermann, Jr., *Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics*. Phytochemistry, 2000. **54**(3): p. 267-73.
65. Jabusch, T.W. and D.L. Swackhamer, *Subcellular accumulation of polychlorinated biphenyls in the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Environ Toxicol Chem, 2004. **23**(12): p. 2823-30.
66. Aviles, C., et al., *Time-course development of the Cd<sup>2+</sup> hyper-accumulating phenotype in Euglena gracilis*. Arch Microbiol, 2005. **184**(2): p. 83-92.
67. Bard, S.M., B.R. Woodin, and J.J. Stegeman, *Expression of P-glycoprotein and cytochrome p450 1A in intertidal fish (Anoplarchus purpureus) exposed to environmental contaminants*. Aquat Toxicol, 2002. **60**(1-2): p. 17-32.
68. Sandermann, H., Jr., *Plant metabolism of xenobiotics*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(2): p. 82-4.
69. Sandermann, H., Jr., *Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept*. Pharmacogenetics, 1994. **4**(5): p. 225-41.
70. Sandermann, H., Jr., *Molecular ecotoxicology of plants*. Trends Plant Sci, 2004. **9**(8): p. 406-13.
71. Pflugmacher, S., K. Geissler, and C. Steinberg, *Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in different cormus parts of Phragmites australis*. Ecotoxicol Environ Saf, 1999. **42**(1): p. 62-6.
72. Subashchandrabose, S.R., et al., *Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential*. Biotechnology Advances, 2011.
73. Irisarri, P., et al., *Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007. **23**(2): p. 237-242.

74. Lem, N.W. and B.R. Glick, *Biotechnological uses of cyanobacteria*. Biotechnology Advances, 1985. **3**(2): p. 195-208.
75. Garcia-Pichel, F. and O. Pringault, *Microbiology: Cyanobacteria track water in desert soils*. Nature, 2001. **413**(6854): p. 380-381.
76. Smith, G.D., G.D. Ewart, and W. Tucker, *Hydrogen production by cyanobacteria*. International Journal of Hydrogen Energy, 1992. **17**(9): p. 695-698.
77. Abed, R.M.M., S. Dobretsov, and K. Sudesh, *Applications of cyanobacteria in biotechnology*. Journal of Applied Microbiology, 2009. **106**(1): p. 1-12.
78. KOMÁREK, J.K., J., *Review of the European Microcystis morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature*. Czech Phycology, 2002. **2**: p. 1-24.
79. Bargu, S., et al., *Effects of freshwater input on nutrient loading, phytoplankton biomass, and cyanotoxin production in an oligohaline estuarine lake*. Hydrobiologia, 2011. **661**(1): p. 377-389.
80. Carmichael, W.W., *Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs"*. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 2001. **7**(5): p. 1393-1407.
81. Guillard, R.R.L. and C.J. Lorenzen, *YELLOW-GREEN ALGAE WITH CHLOROPHYLLIDE C1,2*. Journal of Phycology, 1972. **8**(1): p. 10-14.
82. Ma, J., et al., *Differential response of four cyanobacterial and green algal species to triazophos, fentin acetate, and ethephon*. Bull Environ Contam Toxicol, 2004. **73**(5): p. 890-7.
83. Ma, J., et al., *Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides*. Ecotoxicol Environ Saf, 2006. **63**(2): p. 268-74.
84. Ma, J., et al., *Toxicity of organophosphorous insecticides to three cyanobacterial and five green algal species*. Bull Environ Contam Toxicol, 2005. **75**(3): p. 490-6.
85. IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition* 1997.
86. Richardson, L.L., *Remote Sensing of algal bloom dynamics; New research fuses remote sensing of aquatic ecosystems with algal accessory pigment analysis*. BioScience, 1996. **46**(7): p. 492-501.
87. Castiglioni, S., et al., *Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(1): p. 357-63.
88. Kuster, M., et al., *Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil)*. Environ Int, 2009. **35**(7): p. 997-1003.
89. Binelli, A. and A. Provini, *The PCB pollution of Lake Iseo (N. Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web*. Chemosphere, 2003. **53**(2): p. 143-51.
90. Rioboo, C., et al., *Physiological response of freshwater microalga (Chlorella vulgaris) to triazine and phenylurea herbicides*. Aquat Toxicol, 2002. **59**(3-4): p. 225-35.
91. Gonzalez-Barreiro, O., et al., *Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms*. Environ Pollut, 2006. **144**(1): p. 266-71.
92. Gonzalez-Barreiro, O., et al., *Atrazine-induced chlorosis in Synechococcus elongatus cells*. Arch Environ Contam Toxicol, 2004. **46**(3): p. 301-7.
93. Karnjanapiboonwong, A.e.a., *Uptake of 17 $\alpha$ -ethynilestradiol and triclosan in pinto bean, Phaseolus vulgaris*. Ecotoxicol Environ Saf, 2001.

94. El-Bestawy, E.A., A.Z.A. El-Salam, and A.E.-R.H. Mansy, *Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2007. **59**(3): p. 180-192.
95. Fioravante, I.A., et al., *Removal of methyl parathion by cyanobacteria *Microcystis novacekii* under culture conditions*. J Environ Monit, 2010. **12**(6): p. 1302-6.
96. el Haj, B.M., et al., *The GC/MS analysis of some commonly used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical dosage forms and in urine*. Forensic Sci Int, 1999. **105**(3): p. 141-53.
97. Scheurell, M., et al., *Occurrence of diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan*. Chemosphere, 2009. **77**(6): p. 870-6.
98. Agüera, A., et al., *Application of time-of-flight mass spectrometry to the analysis of phototransformation products of diclofenac in water under natural sunlight*. Journal of Mass Spectrometry, 2005. **40**(7): p. 908-915.
99. Scheytt, T., et al., *1-Octanol/Water Partition Coefficients of 5 Pharmaceuticals from Human Medical Care: Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, and Propyphenazone*. Water, Air, and Soil Pollution, 2005. **165**(1-4): p. 3-11.
100. Souverain, S., S. Rudaz, and J.-L. Veuthey, *Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures*. Journal of Chromatography A, 2004. **1058**(1-2): p. 61-66.
101. Krueve, A., I. Leito, and K. Herodes, *Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach*. Analytica Chimica Acta, 2009. **651**(1): p. 75-80.
102. King, R., et al., *Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2000. **11**(11): p. 942-950.
103. Chang, P.-H., et al., *Sorptive removal of tetracycline from water by palygorskite*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **165**(1-3): p. 148-155.
104. Racz, L. and R.K. Goel, *Fate and removal of estrogens in municipal wastewater*. Journal of Environmental Monitoring, 2010. **12**(1): p. 58-70.
105. Jacobs, L.E., et al., *Fulvic acid mediated photolysis of ibuprofen in water*. Water Research, 2011. **45**(15): p. 4449-4458.
106. Scheytt, T., et al., *Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments*. Chemosphere, 2005. **60**(2): p. 245-53.
107. Melo, S.A.S., et al., *Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados*. Química Nova, 2009. **32**: p. 188-197.
108. Cermola, M., et al., *Phototransformation of fibrate drugs in aqueous media*. Environmental Chemistry Letters, 2005. **3**(1): p. 43-47.
109. Cáceres, T., M. Megharaj, and R. Naidu, *Biodegradation of the Pesticide Fenamiphos by Ten Different Species of Green Algae and Cyanobacteria*. Current Microbiology, 2008. **57**(6): p. 643-646.
110. Malik, A., *Metal bioremediation through growing cells*. Environment International, 2004. **30**(2): p. 261-278.
111. Sanjay Kumar Dubey, J.D., Sandeep Mehra, Pradeep Tiwari and A. J. Bishwas, *Potential use of cyanobacterial species in bioremediation of industrial effluents*. African Journal of Biotechnology, 2011. **10**(7): p. 1125-1132.
112. Kaebernick, M. and B.A. Neilan, *Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production*. FEMS Microbiology Ecology, 2001. **35**(1): p. 1-9.

113. Chaillan, F., et al., *Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat*. Chemosphere, 2006. **62**(10): p. 1574-1582.
114. Cohen, Y., *Bioremediation of oil by marine microbial mats*. Int Microbiol, 2002. **5**(4): p. 189-93.

# ANEXO I



## Relatório de Ensaios LIMNOS N° 0794/13

Revisão 00

Cliente	Isabela Araújo Fioravante	Telefone	
Endereço			
Amostra(s)	Efluentes	Recepção	11/01/13 14:00

Laboratório de ensaios acreditado pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005

O escopo da acreditação pode ser visto em:  
<http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/docs/CRL0462.pdf>



Amostra	Efluente - amostra 2 - antes de tratar				Código	0794/13-01	Coleta em	11/01/13 13:00
Ensaio	Resultado	Unidade	Limites não definidos	LQ	Método		Data do Ensaio	
Demanda Bioquímica de Oxigênio (ac)	156	mg/L	--	2,0	SM-5210 B		11/01/13	
Demanda Química de Oxigênio (ac)	277	mg/L	--	10	SM 5220 D		15/01/13	
Oxigênio Dissolvido (ac)	5,60	mg/L	--	0,20	SM- 4500-O C		11/01/13	

Amostra	Efluente - amostra 1 - depois de tratar				Código	0794/13-02	Coleta em	11/01/13 13:00
Ensaio	Resultado	Unidade	Limite aceitável (L1)	LQ	Método		Data do Ensaio	
Demanda Bioquímica de Oxigênio (ac)	69,3	mg/L	60	2,0	SM 5210 B		11/01/13	
Demanda Química de Oxigênio (ac)	145	mg/L	180	10	SM 5220 D		15/01/13	
Oxigênio Dissolvido (ac)	6,67	mg/L		0,20	SM 4500 O C		11/01/13	

Página: 1/2

## Relatório de Ensaios LIMNOS N° 0794/13

Revisão 00

<b>Cliente</b>	Isabela Araújo Fioravante	<b>Telefone</b>	
<b>Endereço</b>			
<b>Amostra(s)</b>	Efluentes	<b>Recepção</b>	11/01/13 14:00

### Legenda

**(L1):** Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG N°1, de 05 de maio de 2008 - Efluentes  
**(ac):** Ensaio no escopo da acreditação deste laboratório pela norma NBR ISO/IEC 17025:2005, pelo Cgcre/INMETRO sob número CRL 0462, validade 03/12/12. Os resultados dos ensaios não acreditados sairão em tabelas separadas.

**SM:** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th. Edition, 2005.

**LQ:** Limite de Quantificação.

### Observações

Os métodos neste(s) ensaio(s) apresentam-se conformes em relação ao método referenciado. Caso algum ensaio tenha apresentado desvios, adições ou exclusões, estes estarão listados nas observações.

### Abrangência

Análises validadas por manutenção dos padrões dentro dos desvios de leitura aceitável. Os resultados têm significado restrito e aplicam-se somente às amostras analisadas.

### Reprodução do Relatório

Este relatório somente poderá ser reproduzido em sua totalidade. Reprodução de partes requer aprovação. A Limnos Sanear se isenta de qualquer responsabilidade pela reprodução parcial do mesmo.

### Incertezas

A estimativa da incerteza de medição é conhecida e encaminhada se solicitado.

### Informações de Coleta

Coleta efetuada pelo cliente.

A descrição do material ensaiado e o plano de amostragem são de inteira responsabilidade do cliente.

A Limnos Sanear não mantém amostra sob custódia após a liberação dos resultados.

Belo Horizonte, 17 de janeiro de 2013.



Geovana de Cássia  
Assunção  
Técnica Química  
CRQ-02411982  
Responsável Técnico



Anete Moreira  
Gerente Técnica  
CRQ-02406728  
Responsável Técnico

Documento verificado e aprovado por meios eletrônicos